

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21115006

研究課題名(和文) 高次生命現象における時空間的な小分子RNAの生理機能解析

研究課題名(英文) Studies on the roles of small RNA in mice

研究代表者

中澤 敬信(NAKAZAWA, Takanobu)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：00447335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 92,500,000円、(間接経費) 27,750,000円

研究成果の概要(和文)：高等生物の高次機能における小分子RNAの重要性について、以下の4点を明らかにした。1) コカイン応答に關与するmiRNAを同定し、マイクロRNAとヒト薬物中毒との關連性を見いだした。2) miRNAが關与する神経細胞形態制御機構ネットワークの分子基盤の一端を明らかにした。3) 精巢幹細胞に相当するGS細胞を用い、piRNAの生合成に關与するMILIに結合するタンパクとして、ミトコンドリア外膜の脂質代謝酵素(GPAT2)を同定した。4) piRNAの二次生成やpiRNAを介するde novo DNAメチル化を人為的に起こすシステムをマウス胎仔精巢内で構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed the importance of small RNAs in brain and testis as described below. 1) We found that several miRNAs in the striatum are involved in cocaine addiction. 2) Using unbiased screening methods, we found that several miRNAs, such as miR-132, regulates neural morphogenesis. 3) To analyze the molecular function of MILI in piRNA biogenesis, we utilized germline stem (GS) cells, which are derived from testicular stem cells and possess a spermatogonial phenotype. We found that glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (GPAT2), a mitochondrial outer membrane protein for lysophosphatidic acid, binds to MILI in GS cells. 4) We developed a novel artificial piRNA production system to reveal that the concomitant expression of sense and antisense RNA transcripts is necessary and sufficient for piRNA production and subsequent piRNA-dependent gene silencing.

研究分野：分子神経科学

科研費の分科・細目：生物学・生物科学・分子生物学

キーワード：小分子RNA miRNA piRNA non-coding RNA 中枢神経系 精巢 神経細胞 精子形成

1. 研究開始当初の背景

miRNA や piRNA といった小分子 RNA が、様々な標的遺伝子の発現制御等を通して、発生・代謝・稔性等の多様な生物学的機能を緻密にコントロールしていることが急速に明らかになってきている。しかしながら、哺乳類の脳高次機能発現や精子形成といった複雑な生命現象における、個別の小分子 RNA の生理機能はほとんど解明されていない。

(miRNA) 神経細胞の高度に極性を伴った形態形成は、神経回路の特有の機能、ひいては脳の高次機能発現を決定していると考えられている。miRNA は中枢神経系に豊富に発現しているが、その機能はほとんど未知であり、miRNA による神経細胞形態制御についてもごくわずかしき報告がない。

(piRNA) これまでに、piRNA は DNA のメチル化を介してエピジェネティックにレトロトランスポゾンの発現を抑制していることを明らかにしている。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。また、piRNA は一次生成と二次生成によって産生されることが知られている。一次生成では、MILI を介して 5' 末端がウラシルである piRNA (1stU piRNA) が産生される過程であり、胎仔期の精巣で生じる二次生成では、MILI と MIWI2 が機能し、センス鎖とアンチセンス鎖の RNA から piRNA が産生されることが考えられている。この piRNA の多くが、レトロトランスポゾン配列を持つこと、piRNA クラスタと呼ばれる遺伝子領域に由来すること、から、piRNA の産生には、レトロトランスポゾン配列に何らかの意義があるのではないかと考えられている。また、piRNA クラスタに由来する長い RNA 転写産物が必要なのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

これまで中澤、宮川らは、新規スパイン形態制御分子が miRNA による発現調節を受けていること、またマウスの PIWI ファミリータ

ンパク質が精子形成における piRNA の発現と精子形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

本研究では、脳高次機能制御の基盤である神経系細胞の miRNA による形態制御、および、生殖細胞特異的な piRNA による精子形成過程制御という二つの優れたモデルシステムを用い、小分子 RNA 作用マシナリーが果たす具体的な生理機能とそのメカニズムを体系的に解析する。得られた研究成果を統合的に解析することにより、高等生物の高次機能や複雑性における小分子 RNA の重要性を、時間・空間の二つの側面から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コカイン投与によって発現が変動する miRNA を同定し、その欠損マウスを作製し、解析することによって、miRNA による薬物依存制御の分子基盤の解明を行う。

(2) 神経活動依存的にその挙動が変化し、かつ神経細胞の形態制御に関与する miRNA をマイクロアレイの系を用いて同定する。同定した miRNA のうち、刺激依存的に局在を変えるものや、発現量の変わるものを同定する。特に、神経系細胞の形態を制御する遺伝子の制御に関連する miRNA に注目する。

(3) miR-132 による p250GAP の発現制御の意義は不明である。miR-132 による神経細胞形態制御分子 p250GAP の発現制御の解析を、上記実験 1 のモデルケースとして先行して研究する。

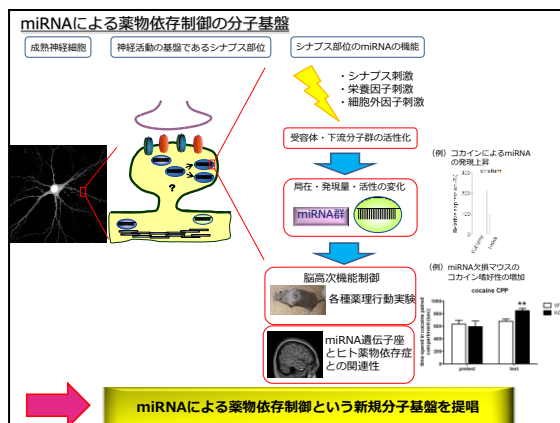
(4) 生殖幹細胞での MILI の生理機能を明らかにするために、精巣より樹立した GS 細胞 (germ stem cell) を用いて解析をおこなう。変異マウスに由来する GS 細胞を実験材料として活用し、より効率的かつ多面的に、piRNA と PIWI ファミリーの解析をおこなうことができる。具体的には、通常マウスの精巣中では、生殖幹細胞の数は非常に少なく、生殖幹細胞を大量に必要とする生化学的実験

等を行うことは困難である。GS 細胞を用いることによりこの問題点を解決することができ、さらに、遺伝子の過剰発現やノックダウンもおこなうことができる。

(5) piRNA の産生には、レトロトランスポゾン配列や、piRNA クラスターに由来する長い RNA 転写産物が必要なのではないか、と考えられているが、我々は、これに対して、単に、センス鎖とアンチセンス鎖の RNA が存在しさえすれば、piRNA の産生に必要十分ではないかという仮説を立て、EGFP 遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウスを用いたモデル系を構築し、解析をおこなう。

4. 研究成果

(1) マイクロ RNA による薬物依存制御の分子基盤の解析：線条体は薬物依存や報酬系の制御を司っている神経核である。マイクロ RNA による線条体機能制御の報告は世界的にほとんどない。本研究では、線条体に高発現しているマイクロ RNA 群を同定し、解析を行った。特に高発現しているものについては欠損マウスの作出・解析を行い、欠損マウスではコカインに対する感受性が高いことやコカインに対して嗜好性が上昇することを見いだした(中澤ら、投稿中)。また、その分子基盤としてモノアミンの代謝異常を明らかにした(中澤ら、投稿中；下図)。興味深



(miRNA による薬物依存制御)

いことにヒトの当該マイクロ RNA 遺伝子座に薬物中毒と関連する変異を共同研究にて見

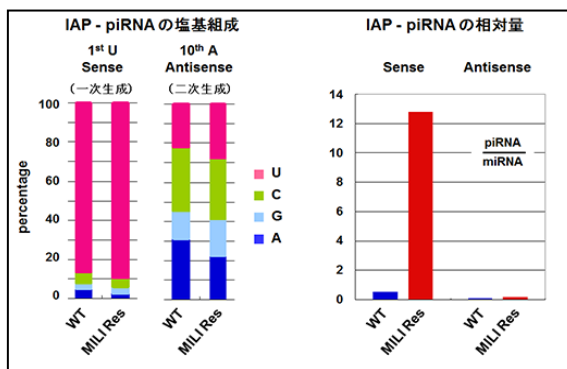
いだした。マイクロ RNA と薬物中毒に関する報告はほとんどなく、マウスおよびヒトレベルにおける本研究の成果は、世界的に見てもがなく新規性が極めて高いと考えている。

(2) マイクロ RNA による神経細胞の形態制御の分子基盤の解析：神経細胞の極性をもった特徴的な形態形成は、脳機能の礎である。マイクロ RNA による神経細胞の形態制御の分子機構を明らかにすることを目的として、初代分散培養神経細胞の系を用いて unbiased スクリーニングを行った結果、神経細胞の形態の変化によって発現が変動する miRNA を複数個同定した(小林ら、投稿中)。また、miRNA 自身の転写制御機構や標的分子群を明らかにし、細胞外液性因子群→受容体→リン酸化酵素群→miRNA 群→標的分子群という miRNA が関与する神経細胞形態制御機構ネットワークの一端を明らかにした(小林ら、投稿中)。

(3) miR-132 およびその標的である p250GAP と統合失調症との関連性の解析：以前の研究で、神経細胞形態制御分子として新規分子 p250GAP を同定していた(中澤ら、*Mol. Biol. Cell*, 2003)。また、p250GAP は miR-132 の標的遺伝子となっていることを見いだしている。統合失調症患者では miR-132 の発現が低下していることから、p250GAP と統合失調症との関連性を解析した結果、miR-132 の標的配列に近い 3' -UTR 領域に疾患と関連する一塩基多型を同定するとともに、統合失調症型パーソナリティ障害と p250GAP との関連性を明らかにした。本研究によって、p250GAP/miR-132 ネットワークと統合失調症との関連性を明らかにすることができた(大井ら、*PLoS One*, 2012)。

(4) piRNA 合成過程と PIWI タンパクの機能解析：欠損マウスを用いた研究をおこなう過程において、雄性生殖細胞の純化、すなわち、実験材料の得にくさが研究の進捗における大きな制約であることがわかってきた。そこで、新たな研究ツールとして、精巣幹細胞

に相当する培養細胞である GS (germ stem) 細胞に着目した実験を開始した。正常な GS 細胞と MILI 欠損 GS 細胞における piRNA の網羅的解析により、GS 細胞は piRNA が発現していること、特に、MILI 欠損マウス由来の GS 細胞に MILI 遺伝子を導入した MILI rescue GS 細胞は、1 次生成過程を解析するために最適な細胞であることをみいだした (下図)。

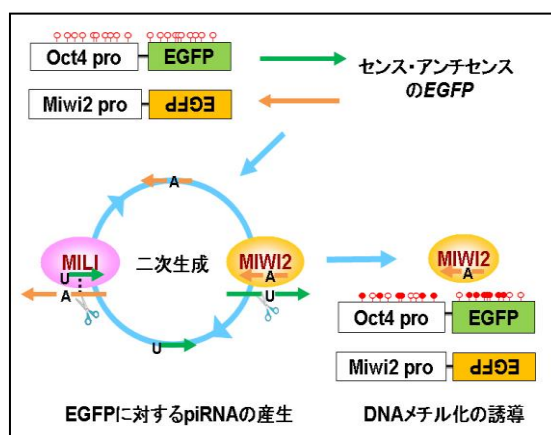


(GS 細胞は piRNA 一次生成に特化した細胞である。)

この結果は、今後の哺乳類の piRNA 研究における有用な細胞として、期待できるものである。この細胞を用い、MILI に結合するタンパクとして、ミトコンドリア外膜の脂質代謝酵素である GPAT2 (Glycerol-3- phosphate acyltransferase 2) を同定した。Gpat2 遺伝子のノックダウン実験から、GPAT2 は piRNA の産生に必須であり、さらに、GPAT2 の脂質代謝酵素としての活性は piRNA 産生には不必要であることを明らかにした (Shiromoto, *et al. RNA*, 2013)。

(5) 人為的 piRNA 合成と *de novo* DNA メチル化 : piRNA の二次生成や piRNA を介する *de novo* DNA メチル化を人為的に起こすシステムをマウス胎仔精巣内で構築した。piRNA の二次生成は MILI および MIWI2 が機能して、センス鎖とアンチセンス鎖の RNA から piRNA が産生される過程である。我々は、単に、センス鎖とアンチセンス鎖の RNA が存在しさえすれば二次生成が進行するのではないかという仮説の下に実験系を構築した。胎生期の雄性生殖細胞において、EGFP アンチセンス

鎖を発現する Miwi2-asEGFP トランスジェニックマウスを作製し、同時期に EGFP のセンス鎖を発現する Oct4-EGFP トランスジェニックマウスと交配した。その結果、piRNA 依存的に EGFP 遺伝子に対する DNA のメチル化が生じ、EGFP 遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった (下図)。この結論は従来までの piRNA 産生の常識 (クラスター由来の転写産物やレトロトランスポゾン配列が必要であるという考え方) を覆すものであり、そのインパクトはきわめて大きいと考えられる。(投稿中)



(人為的 piRNA 合成と *de novo* DNA メチル化)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)

(27 件のうち、代表的なもの 14 件)

- 1 Retrograde Semaphorin Signaling Regulates Synapse Elimination in the Developing Mouse Brain. Uesaka N, Uchigashima M, Mikuni T, Nakazawa T, Nakao H, Hirai H, Aiba A, Watanabe M, Kano M. *Science*. 2014 May 15. 344: 1020-1023. PMID: 24831527
- 2 LMTK3 Deficiency Causes Pronounced Locomotor Hyperactivity and Impairs Endocytic Trafficking. Inoue T, Hoshina N, Nakazawa T, Kiyama Y, Kobayashi S, Abe T, Yamamoto T, Manabe T, Yamamoto T. *J*

- Neurosci.* 2014 Apr 23;34(17):5927-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1621-13.2014.
- 3 Analysis of DNA methylation in Mouse Testis. Kuramochi-Miyagawa S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Itou D, Koshima H, Nakano T. *Methods in Mol. Biol.* 2014 1093: 97-109. doi: 10.1007/978-1-62703-694-8_8.
 - 4 Protocadherin 17 regulates presynaptic assembly in topographic corticobasal Ganglia circuits. Hoshina N, Tanimura A, Yamasaki M, Inoue T, Fukabori R, Kuroda T, Yokoyama K, Tezuka T, Sagara H, Hirano S, Kiyonari H, Takada M, Kobayashi K, Watanabe M, Kano M, Nakazawa T, Yamamoto T. *Neuron.* 2013 Jun5;78(5):839-54.doi:10.1016/j.neuron.2013.03.031.
 - 5 The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. Lim AK, Lorthongpanich C, Chew TG, Tan CW, Shue YT, Balu S, Gounko N, Kuramochi-Miyagawa S, Matzuk MM, Chuma S, Messerschmidt DM, Solter D, Knowles BB. *Development.* 2013 Sep; 140 (18):3819-25. doi: 10.1242/dev.099184.
 - 6 Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus. Yamamoto Y, Watanabe T, Hoki Y, Shirane K, Li Y, Ichiiyanagi K, Kuramochi-Miyagawa S, Toyoda A, Fujiyama A, Oginuma M, Suzuki H, Sado T, Nakano T, Sasaki H. *Genome Res.* 2013 Feb 23(2): 292-299. doi: 10.1101/gr.137224.112.
 - 7 Metaplasticity gated through differential regulation of GluN2A versus GluN2B receptors by Src family kinases. Yang K, Trepanier C, Sidhu B, Xie YF, Li H, Lei G, Salter MW, Orser BA, Nakazawa T, Yamamoto T, Jackson MF, Macdonald JF. *EMBO J.* 2012 Feb 15;31(4):805-16. doi: 10.1038/emboj.2011.453.
 - 8 NYAP: a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signalling in neurons. Yokoyama K, Tezuka T, Kotani M, Nakazawa T, Hoshina N, Shimoda Y, Kakuta S, Sudo K, Watanabe K, Iwakura Y, Yamamoto T. *EMBO J.* 2011 Sep 23;30(23):4739-54. doi: 10.1038/emboj.2011.348.
 - 9 Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. Ichiiyanagi K, Li Y, Watanabe T, Ichiiyanagi T, Fukuda K, Kitayama J, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Yabuta Y, Seki Y, Saitou M, Sasaki H. *Genome Res.* 2011 Dec;21:2058-2066.doi:10.1101/gr.123679.111.
 - 10 Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, Kitamura K, Yamanaka H, Kondoh G, Okawa K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sachidanandam R, Hannon GJ, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Jun; 108: 10579-10584. doi: 10.1073/pnas.1015447108.
 - 11 Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiiyanagi K, Soloway PD, Sasaki H. *Science.* 2011 May; 332: 848-852. doi: 10.1126/science.1203919.
 - 12 MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y,

Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce T, Nakano T, Nakatsuji N, Lin H, Sasaki H. *Dev Cell*. 2011 Mar; 23: 364-375. doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.005.

- 13 MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, Nakano T *Genes Dev*. 2010 May;23:887-892.doi:10.1101/gad.1902110.
- 14 Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behaviour. Taniguchi S, Nakazawa T, Tanimura A, Kiyama Y, Tezuka T, Watabe AM, Katayama N, Yokoyama K, Inoue T, Izumi-Nakaseko H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Umemori H, Inoue T, Murphy NP, Hashimoto K, Kano M, Manabe T, Yamamoto T. *EMBO J*. 2009 Dec 2;28(23):3717-29.doi:10.1038/emboj.2009.300.

[学会発表] (計 45 件)

(45 件のうち、代表的なもの 9 件)

- 1 中澤敬信 神経細胞の形態形成と統合失調症 Neuro2013 2013 年 6 月 20 日~2013 年 6 月 23 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- 2 伊藤大介、宮川さとみ、仲野徹 MVH ヘリカーゼ活性は LINE-1 レトロトランスポソンの抑制に必須である。第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 03 日~2013 年 12 月 06 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 3 中澤敬信 Association between the p250GAP/TCGAP family of RhoGAP genes and schizophrenia. 第 35 回日本神経科学学会大会 2012 年 09 月 19 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

4 Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Nishimura K, Nakano T PAT2, a mitochondrial acyltransferase, in piRNA biogenesis in germline stem cells. REGULATORY & NON-CODING RNAs in Cold Spring Harbor Laboratory meeting 2012 年 8 月 30 日 Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

5 Nakazawa T. Essential role of tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor in mouse behavior. ISN-ESN2011 2011 年 08 月 30 日 Greece Megaron Athens International Conference Center, Greece

6 Kuramochi-Miyagawa S Production and function of piRNA in spermatogenesis. アジア RNA 会議 2011 年 11 月 11 日 淡水福容ホテル 台湾

7 Kuramochi-Miyagawa S piRNA: its production and possible functions. 2010 SDB and JSDB Joint Meeting. 2010 年 08 月 05 日 Albuquerque, USA

8 中澤敬信 Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behavior. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 12 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

9 宮川さとみ small RNA とエピジェネティック制御 日本生化学会 2009 年 10 月 22 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

[その他]

<http://molpharm.umin.jp/>

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/nakano/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 敬信 (NAKAZAWA Takanobu)

大阪大学・大学院薬学研究科・特任准教授
研究者番号：00447335

(2) 研究分担者

宮川 さとみ (MIYAGAWA Satomi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：90291153