

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14530

研究課題名(和文)新規手法を用いたショウジョウバエ母性胚性遷移におけるマイクロRNA経路の機能解析

研究課題名(英文) Investigation roles of the miRNA pathway in maternal-to-zygotic transition

研究代表者

中村 輝 (Nakamura, Akira)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：90323245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物発生における母性-胚性遷移(maternal-to-zygotic transition; MZT)は、卵内の母性情報を消去し、胚ゲノムの情報に従った発生プログラムへと移行する過程であり、動物種をこえた普遍的現象である。本研究では、ショウジョウバエMZTにおけるmiRNA経路の機能について解析を試みた。具体的には、miRNA経路因子であるDcr-1, Ago1, GwについてGFPノックインシステムを作成した。そして、GFP融合タンパク質を分解に導くdeGradFPシステムを初期胚で活性化させた。その結果、Gwをノックダウンすると約50%の胚においてMZTが起きる胚発生初期に致死となった。

研究成果の概要(英文)：The maternal-to-Zygotic transition (MZT) involves degradation of maternal product to switch zygotic gene-oriented development, and is the conserved process in animal development. To investigate roles of the miRNA pathway genes in MZT in the Drosophila embryo, we generated several GFP knocked-in flies for Dcr-1, Ago1 and Gw. We knocked down these GFP fusion protein specifically in early embryogenesis by activating deGradFP system, which poly-ubiquitinates GFP-fusion proteins to promote their degradation. We found that when GFP-tagged Gw was knocked down, about 50% of embryos stalled embryogenesis at the stage during which the MZT starts, suggesting that the miRNA pathway is indeed involved in the MZT.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ CRISPR-Cas9 miRNA ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

母性-胚性遷移 (maternal-to-zygotic transition: MZT) は、全ての動物卵の発生過程において観察される普遍的現象である。この過程では、卵形成過程で生産され卵に貯蔵されている母性因子 (RNA やタンパク質) が特異的に分解され、胚ゲノムにコードされる遺伝情報にしたがった発生プログラムへと移行する。また、MZT は生殖細胞である卵から体細胞が出現する過程であるとも解釈できる。しかし、動物発生において普遍的かつ重要な MZT の制御メカニズムについては良く分かっていない。ゼブラフィッシュやツメガエルにおいて、MZT 過程の母性 RNA 分解には miRNA 経路が関わっていることが報告されている (Reviewed in Giraldez 2010)。これら脊椎動物では、それぞれ miR-430 あるいは miR-427 と呼ばれる単一の miRNA が、ほとんどの母性 RNA の分解に関わっていると考えられている。一方、ショウジョウバエ MZT における母性 RNA 分解には、母性因子によって制御される経路と胚性遺伝子発現が必要とされる 2 つのプロセスが存在する。後者の過程では *mir-309 cluster* にコードされる 6 種の miRNA が胚発生のごく初期に発現を開始し、母性 RNA の分解に関わっている可能性が報告されている (Bushati et al 2008)。しかし、*mir-309 cluster* 遺伝子の突然変異のホモ個体は正常に発生し、正常な卵を生むことから、ショウジョウバエの MZT における miRNA 経路の関与については結論が出ていない。

2. 研究の目的

私たちは、ショウジョウバエ胚発生過程において、100 種以上の miRNA (78 遺伝子座) の発現パターンを解析した結果、少なくとも 18 遺伝子座に由来する 30 種の miRNA が、胚発生のごく初期に発現開始することを見出した (未発表)。これら miRNA が冗長的に MZT における母性 RNA の分解に関わっている可能性が予想される。しかし、18 遺伝子座を一括して遺伝学的に解析することは実質的に不可能である。一方、miRNA 経路の因子である Dcr1, Ago1 等は生殖細胞自律的に卵形成過程に必須の機能を持ち、クローン解析をもってしても、これら因子の機能を欠いた卵を得ることは不可能である。そこで本研究では、近年報告された GFP 融合タンパク質を特異的に分解することの出来る deGradFP システム (Caussin et al. 2012) と最新のゲノム編集技術を用いたショウジョウバエゲノム中への遺伝子ノックインの手法とを組み合わせた研究アプローチを確立し、MZT における miRNA 経路の機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

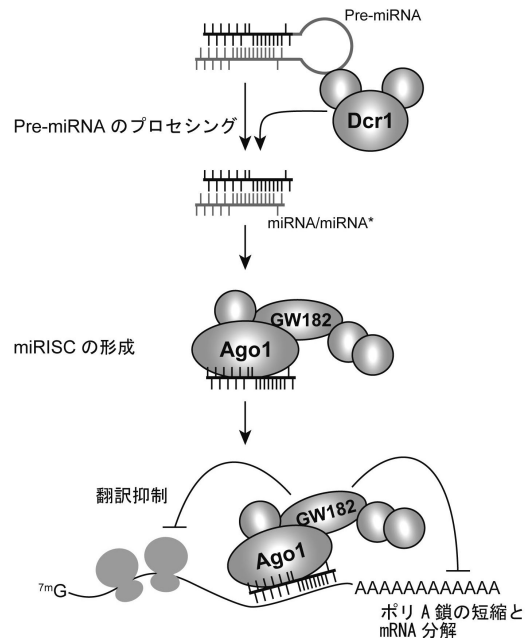
deGradFP システムとは、SCF (Skp1/Cullin-1/F-box) ユビキチンリガーゼ経路における基質認識サブユニットであ

る Slmb 由来の F-box ドメインと、GFP に対するラクダ単鎖抗体に由来する vhhGFP4 断片とのハイブリッドタンパク質 (NSlmb-vhhGFP4) によって、GFP 融合タンパク質を特異的にユビキチン化して分解するシステムである。

本研究では、NSlmb-vhhGFP4 タンパク質が排卵直後の胚発生初期で特異的に翻訳開始されるシステムを構築することにより、標的タンパク質の卵形成過程における機能を GFP 融合タンパク質の形で維持しつつ、排卵後に速やかにロックダウンする実験系の構築をはかった。具体的には、NSlmb-vhhGFP4 を、卵形成過程から転写されるが排卵後にのみ翻訳開始される *smaug (smg)* の発現制御エレメントや、卵形成終期に翻訳が開始される *nanos (nos)* の発現制御エレメントに融合させたトランスジェニックシステムを作成し、卵形成過程で合成され胚全体に分布する Histone2Av::GFP の分解を指標に、検討を行った。

つぎに、miRNA 生合成経路の因子について GFP ノックインシステムの作成を行った。具体的には、核外輸送された miRNA 前駆体 (pre-miRNA) のプロセシング酵素である Dicer-1 (Dcr-1)、miRNA 機能の場である miRISC の機能発現に必須である Argonaute-1 (Ago1)、Ago1 と相互作用して miRISC 依存的な翻訳抑制や RNA 分解を介在する Gw182 (ショウジョウバエでは Gawky と呼ばれる) を標的とした (下図参照; Seila and Sharp 2008)。

細胞質中における miRNA の生合成経路

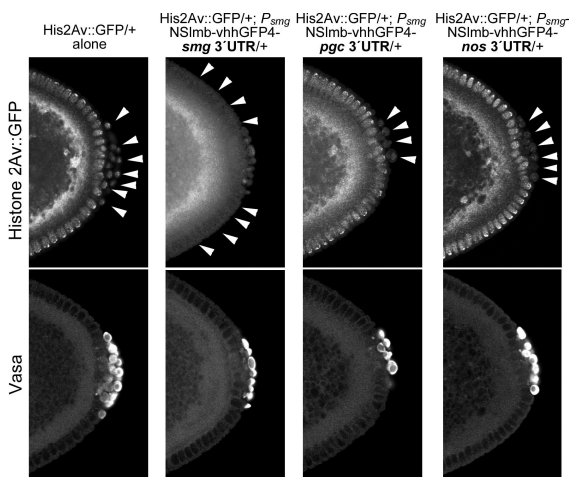


GFP のノックインについては、平成 25~26 年度の挑戦的萌芽研究により確立した、CRISPR/Cas9 システムを活用した手法により作成した。以上のシステムを掛け合わせることで、miRNA 経路因子を胚発生初期にロックダウンすることによる影響を解析した。

4. 研究成果

(1) GFP ノックダウンシステムの検証

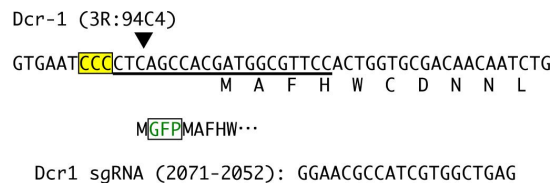
NS1mb-vhhGFP4 mRNA を卵形成過程特異的な *smg* プロモーターで発現させ、その翻訳タイミングを *smg*, *nos*, *pgc* の 3' UTR を使って制御するシステムを作成した。卵形成過程から発現する Histone2Av::GFP システムと掛け合わせて、初期胚における GFP シグナルのパターンを検討した結果、*smg* 3' UTR を連結した NS1mb-vhhGFP4 は体細胞領域全体で Histone2Av::GFP をノックダウンすることが可能であった。一方、*nos* あるいは *pgc* の 3' UTR を連結したシステムでは、始原生殖細胞（極細胞）特異的に Histone2Av::GFP をノックダウンすることが出来た。



(2) GFP ノックインシステムの作成

Dcr-1 ノックインシステムの作成

Dcr-1 には選択的スプライシングによるバリエーションが存在しないため、N 末端側に GFP をノックインするようにデザインした（下図参照。黄色は PAM 配列、下線は sgRNA 標的配列、黒三角形は Cas9 による切断部位を示す）。



sgRNA を発現するプラスミドと GFP をノックインするためのプラスミドを *P_{nos}-Cap9* 胚（*nanos* プロモーター制御下で Cas9 を発現するシステム）に顕微注射し GFP の挿入を指標にノックインシステムのスクリーニングを行った。約 40 匹の F0 成虫（ノックインされた染色体が生殖系列にモザイクに存在すると予想される）をバランサーシステムと掛け合わせて得られた F1 成虫よりゲノム DNA を抽出して、PCR により標的部位への GFP 配列の挿入したシステムをスクリーニングした。その結果、GFP

が Dcr-1 の N 末端側に挿入されたシステムを独立に 3 システム単離した。いずれのシステムもホモ個体で維持できるシステムであった。

Gw ノックインシステムの作成

Dcr-1 と同様、Gw も mRNA は 1 種類しか発現していないと予想されていることから、N 末端側に GFP が挿入したシステムを作成することにした。しかし sgRNA 認識配列を開始コドンより約 20 bp 顆粒にしか設定できなかったため、N 末側 8 アミノ酸の配列を重複させて、GFP をその間に挿入するようにデザインした。また、挿入後に再度 sgRNA で切断されないようにアミノ酸置換を引き起こさない塩基変異を導入した（下図橙色文字）。

Gawky (4:102D1-D3)



Gw sgRNA (6808-6799): GCTGACAGCCCCAGCCATCT

Dcr-1 と同様、sgRNA を発現するプラスミドと GFP をノックインするためのプラスミドを *P_{nos}-Cap9* 胚に顕微注射して F1 個体で GFP の挿入個体をスクリーニングしたが、ノックインシステムを得ることが出来なかった。そこで、再度 sgRNA と Cas9 を共発現するプラスミドを用いて、*yw* 胚に顕微注射して F1 個体においてスクリーニングした結果、独立にノックインされたシステムを 3 システム得ることが出来た。これら 3 システムはいずれもホモで維持可能であった。

Ago1 ノックインシステムの作成

Ago1 は複数の転写開始点を持ち、2 つの異なる翻訳開始部位から多様なアイソフォームが翻訳される。一方、C 末端側は全てのアイソフォームで共通である。このような状況であることから当初、C 末端側に GFP をノックインするシステム作成をデザインした。しかし、実験開始後、RNA サイレncing の専門家からの情報提供により、Ago1 の C 末端カルボキシ基が miRNA 認識に用いられており、C 末端側へのアミノ酸配列の付加は Ago1 の機能を失わせることが判明した。そこで、ショウジョウバエ属の Ago1 の配列を比較したところ、*melanogaster* グループ（配列が 100% 一致）よりも離れた種では全てのアイソフォームで共通する領域に、配列の変化に富む領域が見つかった（下図橙色線で囲んだ領域）。



これ以外の領域の配列保存性は極めて高いことから、この配列の変化に富む領域に GFP をノックインすることにした。

Ago1 (2R:50C9-C17)

GGTGCAGCAGCAACTGCCGC **CCA**GGTGGCCTCCGCCTTGGGTGCCACC
G A A A T A A Q V A S A L G A T

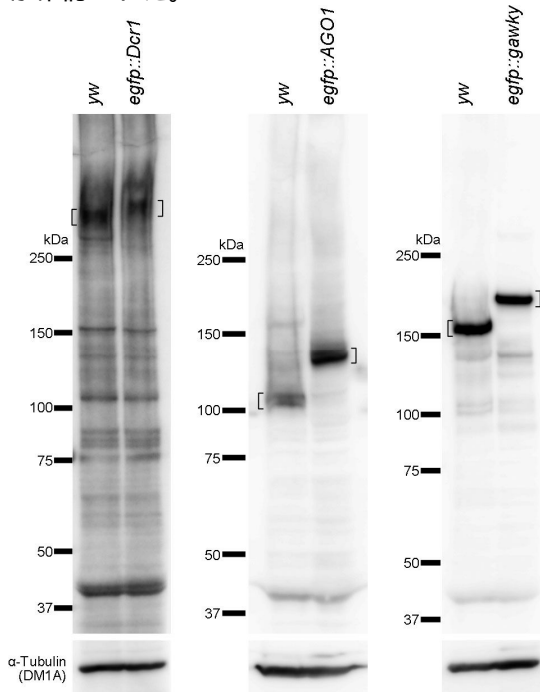
...ATAAQV**GFP**ASALG ...

Ago1 sgRNA (9304-9285): gCACCCAAGGCGGAGGCCACC

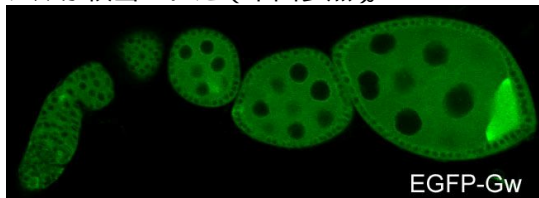
F1 個体でのスクリーニングにより独立した GFP ノックイン系統を 3 系統確立した。いずれの系統もホモで維持可能であった。

(3) GFP ノックイン系統の発現解析

ノックイン系統のホモ個体より卵巣を解剖して取り出し、SDS-PAGE でタンパク質を分離後、Dcr-1, Ago1, Gw に対するマウスモノクローナル抗体 (東大・塩見美喜子教授より分与) を用いてウエスタン解析を行った。その結果、GFP 融合タンパク質の発現が確認できた。ノックイン系統ホモ個体では、内在の未融合バンドは検出されないことから、妊性のあるホモ個体として維持できていることが確認された。



卵巣における GFP シグナルの発現を確認した結果、EGFP::Gw 系統の卵巣では、GFP シグナルが検出された (下図参照)。



一方、Dcr-1, Ago1 のノックイン系統では GFP の蛍光シグナルは検出することが出来なかった。これは、ウエスタン解析や modENCODE プロジェクトによる RNA-seq 解析でも支持されるとおり、内在遺伝子の発現レベルが低いためであると考えられた。

(4) ノックイン系統への deGradFP システムの適用

ノックイン系統と NS1mb-vhhGFP4 発現系統とを掛け合わせて、GFP ノックインをホモで NS1mb-vhhGFP4 をヘテロに持つメス由来の胚の表現型を解析した。その結果、Dcr-1, Ago1 のノックイン系統では、異常は全く観察されなかった。おそらく、発現レベルの低い遺伝子産物は低発現量で十分に機能すると予想され、本システムでは異常を観察できるレベルまでノックダウンするには不十分であると予想された。

一方、EGFP-Gw 系統を NS1mb-vhhGFP4_smg 3' UTR 系統を用いてノックダウンを行うと、胚の遺伝子型も EGFP-Gw ホモの場合、50%以上の胚において胚性致死の表現型が認められた。致死となった胚のほとんどは胚発生のごく初期に死んでいたことから、母性-胚性遷移 (MZT) を挟んだ時期で異常を生じている可能性が考えられた。すなわち、仮説の通り、miRNA 経路因子である Gw をノックダウンすることにより、MZT における母性 RNA 分解が異常となっている可能性が考えられた。そこで、Sex peptide (ACP70A) を発現するトランスジェニック雌由来の未受精卵、野生型及び NS1mb-vhhGFP4_smg 3' UTR; EGFP-Gw/EGFP-Gw に由来する 1.0-2.5h AEL 胚より total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行うこととした。現在までに、良質の total RNA 精製が終了しており、RNA-seq 解析を依頼しているところである。また、研究室で、RNA-seq の raw data から遺伝子発現解析することが出来るように、専門家より linux サーバーを用いた次世代シーケンス解析の手法を教授して頂いた。

(5) タンパク質ノックダウンシステムの改良

Dcr-1, Ago1 のノックイン系統のノックダウンでは異常を観察できなかったが、Dcr-1, Ago1 が胚発生期に機能を持っていないとは考えられず、ノックダウン効率が不十分であると考えられた。そこで、2 つのアプローチからタンパク質ノックダウンシステムの改良を試みた。

Slmb 由来の F-box ドメインに融合させる GFP 結合ペプチドの置換

ラクダ由来の GFP 結合単鎖抗体は複数報告されており、vhhGFP4 意外にもそのアミノ酸配列が公開されているものがある。そこで、X 線結晶解析が行われていて、vhhGFP4 とは異なる様式で GFP と結合することがわかっている GBP4 (Kirchhofer et al. 2010) について、414 bp からなるコーディング配列を化学合成し、vhhGFP4 と置換したコンストラクトを作成した。また、Ankyrin repeat をもとにデザインされた高親和性で GFP に結合する DARPIn 配列 (3G86.32; Brauchle et al. 2014) についても同様に vhhGFP4 と置換した。そして、これらコンストラクトを用いてトランス

ジェニックシステムを作成した。

作成したトランスジェニックシステムと Histone2Av::GFP 発現システムを掛け合わせて GFP タンパク質ノックダウンの効率を検討した結果、残念ながら vhhGFP4 に比べて効率が明確に上がったという結果は得られなかった。しかし、融合タンパク質の種類によっては効率が良くなる可能性はあるので、引き続き解析を続ける予定である

Auxin 誘導型デグロンシステムの導入

既に deGradFP システムを用いてショウジョウバエ体細胞で GFP タンパク質のノックダウンを行っている研究者より、NS1mb-vhhGFP4 が非融合性の単独 GFP 分子は分解できないとの情報を得た。これは、GFP 分子中にはポリユビキチン化されるリジン残基が存在していないためと考えられた。すなわち、分解のシグナルとなるポリユビキチン化の効率は融合パートナーに依存すると予想され、このことが deGradFP システムの効率低下を招いていると推察された。そこで、別のデグロンシステムについても試してみることとした。

具体的には、植物ホルモンである Auxin 依存的に会合してユビキチン化される Auxin inducible degron (Natsume et al. 2016) をショウジョウバエの系で試すことにした。イネ由来の F-box タンパク質である OsTIR1 を *smg* あるいは *nos* の 3' UTR と連結したトランスジェニックシステムを作成した。また、OsTIR1 によって Auxin 依存的に会合してユビキチン化される配列 (mAID) を GFP-HA と連結させた。現在、複数の標的遺伝子に対して、mAID-GFP-HA 配列をノックインしたシステムの作成を進めている。今後、ノックインシステムについて OsTIR1 あるいは NS1mb-vhhGFP4 によるノックダウン効率を検討する予定にしている。

<引用文献>

Brauchle et al. Protein interference applications in cellular and developmental biology using DARPins that recognize GFP and mCherry. *Biol. Open* 3, 1252-1261 (2014).

Bushati et al. Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18, 501-506 (2008).

Caussinus et al. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 117-121 (2012).

Giraldez. AJ microRNAs, the cell's Nepenthe: clearing the past during the maternal-to-zygotic transition and

cellular reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 369-375 (2010).

Kirchhofer et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 133-138 (2010).

Natsume et al. Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors. *Cell Reports* 15, 210-218 (2016).

Seila and Sharp Small RNAs tell big stories in Whistler Nat. *Cell Biol.* 10, 630-633 (2008).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Niwa, H., Nakamura, A., Urata, M., Shirae-Kurabayashi, M., Kuraku, S. and Ohtsuka, S.

The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells.

BMC Evol. Biol. 16, 173 (2016).

doi: 10.1186/s12862-016-0755-4

Liu, G., Sanghavi, P., Bollinger, K. E., Perry, L., Marshall, B., Roon, P., Tanaka, T., Nakamura, A. and Gonsalvez, G. B.

Efficient endocytic uptake and maturation in *Drosophila* oocytes requires

Dynamitin/p50. *Genetics* 201, 631-649

(2015).

doi:10.1534/genetics.115.180018.

[学会発表](計 7件)

Nakamura, A. Search for new factors that direct germ cell formation in the *Drosophila* embryo. The 26th Hot Spring Harbor International Symposium Trans-Omics: New Approaches in Biology and Medicine 2016, 2-3 November 2016, Kyushu University, Fukuoka.

Nakamura, A. and Yoshitani, T. A novel genetic strategy to investigate embryonic roles of maternal factors with essential functions in oogenesis. 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016年9月9~11日、立教大学(東京都豊島区).

Aimi, K., Hanyu-Nakamura, K. and Nakamura, A. An oogenic stage-specific RNAi screening for novel maternal-effect genes regulating germ cell development in the *Drosophila* embryo. 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016年9

月 9~11 日、立教大学 (東京都豊島区)。

Tanaka, T., Itsu, S., Tani, N. and Nakamura, A. Oocyte polarity establishment and germ plasm assembly require the endocytic regulation of the yolk protein receptor Yolkless. 12th Japanese Drosophila Research Conference, 2016 年 9 月 9~11 日、立教大学 (東京都豊島区)。

中村 輝 新規の遺伝学ツールを用いたショウジョウバエ初期胚における RNA サイレンシング因子の機能解析。第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15~17 日、ホテルライフオーツ札幌 (北海道札幌市)。

田中 翼、植田忠大、大津佐千子、反町典子、中村 輝、Katja Brückner ショウジョウバエの小胞型 H^+/Cl^- 交換輸送対 Clc-b は長鎖 dsRNA を介した RNAi 誘導に必要である。第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15~17 日、ホテルライフオーツ札幌 (北海道札幌市)。

Sano, H., Nakamura, A., Texada, M., Truman, J.W., Ishimoto, H., Kamikouchi, A., Nibu, Y., Kume, K., Ida, T. and Kojima, M. The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. 第 48 回日本発生生物学会年会 2015 年 6 月 2~5 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)。

〔図書〕(計 1 件)

中村 輝、中村-羽生賀津子 (2018 年刊行予定)。生殖細胞と体細胞, 動物学の百科事典(丸善) 刷り上がり 2 ページ。

〔その他〕

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/germline_development/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 輝 (NAKAMURA, Akira)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 90323245