

令和元年6月1日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14784

研究課題名(和文) meRNAシーケンシング法の確立とSINE非コードRNAの機能解析

研究課題名(英文) Development of a method for medium-length RNA, and functional analysis of SINE non-coding RNAs

研究代表者

一柳 健司 (Ichianagi, Kenji)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70401560

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)：中程度の長さを持つRNAに関する発現解析方法が今までなかったので、本研究ではこれらのRNAを網羅的にシーケンシングする方法を開発することを第一目の目標に研究を進めた。細胞内RNAを精製後にRppH酵素で処理し、アダプターを付加後にMiSeqでシーケンシングすることで(300 bpシングルエンド)、tRNA等の発現量を網羅的に解析する方法を確立した(meRNA-seq)。SINE発現に注目して、さらに解析を進め、SINEは生殖細胞で特異的に強く発現していること、ただ、その生殖細胞においてもDNAメチル化やpiRNAといったエピジェネティック制御機構によって抑制を受けていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまで解析が不可能であったAlu, B1, B2などのSINEレトロトランスポゾンの発現量について、ローカスを区別しながら、しかも定量的に解析できるようになった。特にAluの発現は癌化や神経疾患などの病態と関連があることが知られている。Aluはゲノムに100万コピーあり、その配列は少しずつ異なっているが、この解析方法を使えば、Aluが発現しているかどうかを全体で見ただけでなく、どんな配列をもったどのゲノムローカスにAluなのかというように個々に解析できる。また、細胞分化等に伴ってtRNAレパートリーがどのように変化するかなど、これまで不可能であった解析を可能にした。

研究成果の概要(英文)：No technique was available to comprehensively analyze the expression levels of RNAs of medium length, such as tRNA, 5S rRNA, splicing RNA, and SINE RNA. In this study, we have developed a protocol to do this, which we designated as meRNA-seq. The protocol involves processing of the 5' end of RNAs by the RppH enzyme to make a monophosphated end, specific adaptor ligation to the 5' and 3' ends, respectively, PCR, and deep sequencing on Illumina MiSeq in a single-end sequencing mode of 300 bp. We then focused on SINE RNA expression, and revealed that SINEs show tissue-specific expression pattern with very high expression in spermatogonia (male germ cells). Interestingly, even in spermatogonia, loss of DNA methylation or piRNA resulted in upregulation of SINEs, suggesting that SINE transcription by RNA polymerase III is epigenetically regulated.

研究分野：エピジェネティクス

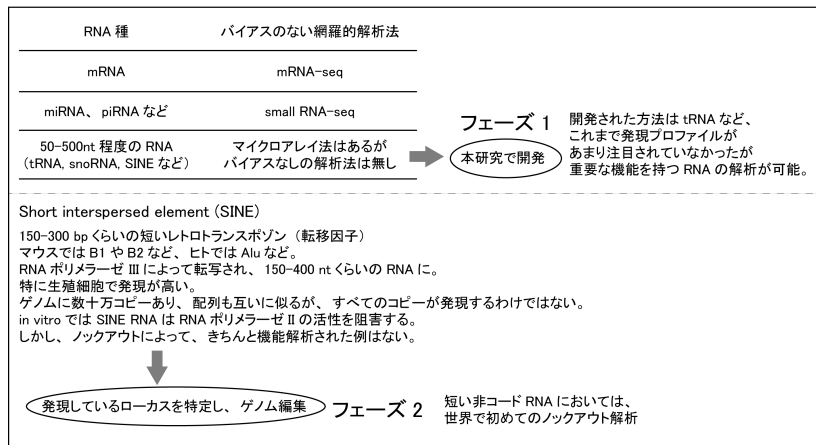
キーワード：RNA 大規模シーケンシング SINE tRNA snRNA rRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Short interspersed element (SINE) は 300bp 程度の短いレトロトランスポゾンで、哺乳類ゲノムには 50 万~100 万コピーほど存在する。マウスでは B1 や B2 が知られており、主に生殖細胞で発現し

(図 1) 研究の目的



ている。SINE 全体の発現量はノーザンブロットにより定量できるが、どのコピーからどれくらい発現しているのかが分からないのが問題であった。一方、コンセンサス配列を用いた実験から、SINE RNA は直接 RNA ポリメラーゼ II と結合し、その活性を抑制することが報告されている(Allen et al. Nat Struct Mol Biol 2004, Espinoza et al. Nat Struct Mol Biol, Mariner et al. Mol Cell 2008, Ichihanagi Genes Genet Syst 2013, Ichihanagi Cell Cycle 2014)。興味深いことに、マウス B1 および B2 SINE は生殖細胞で高い発現を示すが (Ichihanagi et al. Genome Res 2011, Ichihanagi et al. Nucleic Acids Res 2013) それらの生殖細胞は発生の後期で RNA ポリメラーゼ II による遺伝子転写をストップする。これらのことは SINE RNA が生殖細胞での転写抑制に関与することを推察させるが、実験的な証拠はない。また、SINE RNA が実際にどのゲノムローカスから転写されているのかは全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

RNA シーケンシング技術は mRNA をランダムに cDNA 化して解析する mRNA-seq や 20-30 nt 程度の短い RNA を全長シーケンシングする small RNA-seq などがあり、それぞれ今世紀の生命科学に多大な寄与をしてきた。しかし、中程度の長さを持つ tRNA やスプライソソーム RNA、さらに SINE RNA に関する解析方法は存在しない。したがって、どの SINE コピーが転写されているのかを同定することができないでいた。そこで、本研究では「miRNA より長い mRNA より短い中程度の長さ」の RNA (meRNA または medium length RNA と呼ぶ) を網羅的に同定する方法を開発することを第一の目標とした (meRNA シーケンシング)。さらに、その技術を適用して転写されている SINE コピーを同定することを目的とし、生殖細胞での SINE 発現がごく少数のローカスから生じているのであれば、それらのコピーのノックアウトマウスを作成して遺伝学的な解析を行い、SINE RNA の機能に迫ることを目指した。

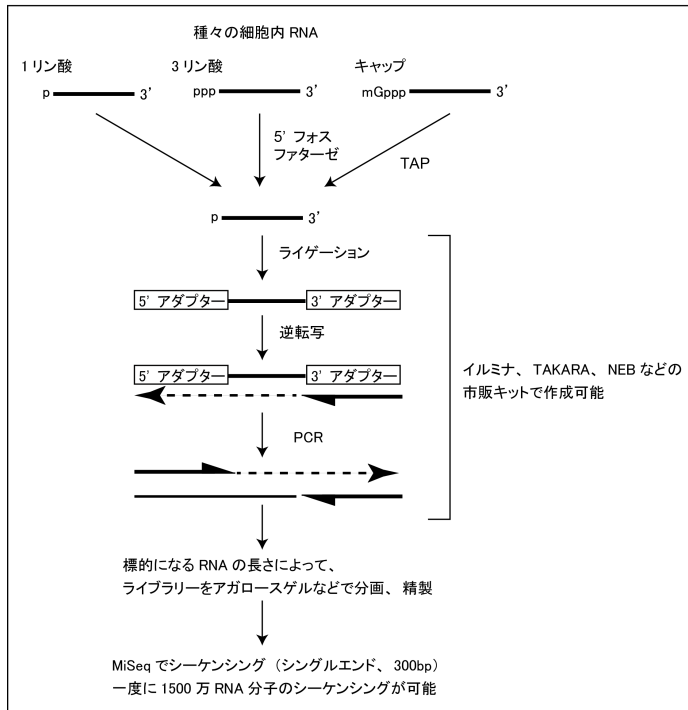
3. 研究の方法

meRNA シーケンシングライブラリーの作成には、miRNA や piRNA などの small RNA を解析するためのプロトコルを参考に、以下の 3 つのステップを行った。

- (1) RNA ライゲースを用いて RNA の両末端にそれぞれ特異的なアダプターを付加
- (2) 3'アダプターに相補的な DNA プライマーで逆転写
- (3) 5'アダプターと同じ配列を持つプライマーも加えて PCR

(図2) 細胞内の meRNA (medium length RNA) の解析戦略

この方法は RNA の 5'末端が 1 リン酸になっていることが前提であるが、SINE RNA を含め、転写された RNA の 5'末端は 3 リン酸またはキャップが付いた構造になっているので、5'フォスファターゼ (5' 3 リン酸を 1 リン酸にする) やタバコアルカリリフォスファターゼ (TAP、キャップ構造を外し、5'1 リン酸の形にする) を用いて、末端を処理し、ライゲーションを可能にした。しかし、研究の途中で 5'フォスファターゼや TAP が販売中止となってしまったので、その後は反応条件次第で TAP



と同じ活性を持つ RppH 酵素を使用して、再度、有効性を検証した。

PCR後に 50-300bp 程度の長いインサートを持つ DNA を回収した。なお、tRNA は 70-80 nt 程度、SINE は 150-250nt 程度である。ライブラリーをイルミナ MiSeq で 300 bp のシングルエンド・シーケンシングを行い、シーケンシングデータから 3'アダプターに相当するところを同定して、RNA の長さ、塩基配列、転写の向きを同時に同定した。

4. 研究成果

マウス脳、肝臓、精原細胞 (精子形成途上の生殖細胞) から RNA を抽出し、RppH で処理したものと処理しなかった RNA サンプルを用意し、両末端にそれぞれ特異的なアダプターを RNA ライゲースを用いて付加した。その後、(2)と(3)の操作を経て DNA をゲル精製し、シーケンシングを行ったところ、すべてのサンプルで 5.8S rRNA (Pol I 転写産物が切断されてできる)の全長配列が含まれていた。5.8S rRNA の 5'末端はモノリン酸であるため、RppH 処理無しでもライブラリーに含まれることになる。一方、5S rRNA (Pol III 転写産物) は 5'末端はトリリン酸化していることと一致して、RppH を処理しないサンプルではほとんど検出できなかった。しかし、RppH 処理を行ったサンプルでは多くの 5S rRNA の全長配列を得ることができた。このことは、この方法により、5'末端がモノリン酸でない RNA でもきちんとシーケンシングでき、全長配列が分かることから Pol III による転写産物であって、別の RNA の部分配列ではないことが確認できる上、その相対量を 5.8S rRNA 量を内部コントロールとして定量できることを意味している。

SINE は B1 と B2 が発現していたが、それは精原細胞で非常に高く、脳で少量、肝臓ではほとんど発現していなかった。B1 は B1_Mus1 や B1_Mm といった若いサブファミリーからの発現が主であったが、B2 は B2_Mm2 のようなやや古いサブファミリーでも発現していた。多くの配列がゲノム配列上でユニークに同定することができ、各ローカスの発現量も解析することができた。精原細胞では数百ものローカスで発現しており、限られたローカスから発現しているわけではないことを明らかにした。

次に DNA メチル化が低下する Dnmt3L ノックアウトマウスおよび piRNA を合成できない

Pld6 ノックアウトマウスから精原細胞を FACS で回収し、同様の解析を行ったところ、DNA メチル化が低下すると B1 と B2 の発現量が 10 倍以上高くなることが明らかとなった。piRNA が除かれた場合、B1 は 2 倍程度、B2 は 10 倍程度の上昇が見られた。このことは、RNA Pol III による SINE の転写は DNA メチル化による抑制を受けていることを示している。これは遺伝学的に Pol III 転写のエピジェネティック制御を明らかにした世界で最初の報告となる。piRNA も SINE RNA 量に影響を与えているが、その効果は SINE の種類に異なることが明らかとなった。RNA 二次構造の安定性の違いや細胞内局在などの違いが関わっているのかもしれない。

一方、フェーズ 2 として計画していた研究は実行できなかった。これは野生型で発現している SINE ローカスが予想以上に多く、また、発現が圧倒的に高いローカスがあるというよりは、比較的どのコピーでも平均的に発現していたため、数コピーのノックアウトで SINE 発現量を激減させることはできないと判断したことによる。機能解析には shRNA を使うなど別のアプローチが必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Kenji Ichiyanagi “Expression, DNA methylation and chromatin boundary formation of mouse short interspersed elements, SINEs.” 3rd Korea-Japan international symposium on transposable elements (2019, Busan, Korea)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://nuagr2.agr.nagoya-u.ac.jp/~ged/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：一柳朋子

ローマ字氏名：Tomoko Ichiyanagi

研究協力者氏名：毛利 嘉伸

ローマ字氏名：Yoshinobu Mori