

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06059

研究課題名(和文) TGF- 経路が誘導する幹細胞遺伝子サイレンシングの機能転換

研究課題名(英文) TGF-beta-induced alteration of gene silencing for stem cell maintenance and differentiation

研究代表者

井木 太一郎 (Iki, Taichiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20774011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの精巣において精子を成熟させるために不可欠な因子として Cyclophilin 40(Cyp40)という分子シャペロンを同定した。miRNAやsiRNAなどの小分子RNAは、Argonaute(Ago)タンパク質に結合することによりRISCをつくり、相補的な標的認識を介して遺伝子のサイレンシングを引き起こす。精巣の生殖細胞において、Cyp40タンパク質はAgo2タンパク質と相互作用しており、Ago2とRISCをつくる精巣特異的なmiRNAを助ける役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は精子や卵子をつくり、受精を経て次世代を紡ぐ重要な細胞です。しかしながら、生殖細胞がどのように配偶子を形成するのか、私たちの理解は進んでいません。小分子RNAと呼ばれる多様な分子が生殖細胞において遺伝子の制御を行うことは知られていましたが、小分子RNAそのものがどのように制御されるのか、よくわかっていませんでした。今回、ショウジョウバエを用いた研究において、ヒトにも発現しているCyclophilin 40(Cyp40)タンパク質が小分子RNAを制御するはたらきをもち、精子の成熟に欠かせない因子であることがわかりました。今回の発見は不妊などの疾患の解明に繋がる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：This project identified and characterized Cyclophilin 40 (Cyp40) as a factor essential for sperm maturation processes in *Drosophila melanogaster*. Small non-coding RNAs including microRNA (miRNA) and short-interfering RNA (siRNA) form the effector RNA-induced silencing complex (RISC) with Argonaute (Ago) family members. RISCs direct the silencing of genes through sequence-specific recognition of complementary targets. It was found that, in the testicular germline cells, Cyp40 assists the loading of testis-specific miRNA species onto Ago2 through the physical interaction during RISC formation. These Cyp40-dependent testis-specific miRNA, including miR-316-3p, supported the organization of individualization complex formation during sperm maturation.

研究分野：生殖生物学 RNA生物学 分子生物学 生化学

キーワード：精子 microRNA サイレンシング シャペロン ショウジョウバエ 生殖細胞 RISC

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)はガイド鎖という一本鎖のRNAとして標的のmRNAを認識しサイレンシングを誘導するが、ガイド鎖はそもそも二本の鎖で出来た前駆体から選択される。ガイド鎖の選択が組織や細胞において変化することが知られてきたが、その背景にある分子機構はよくわかっていなかった。ショウジョウバエの卵巣に蓄積するmiRNAのディープシーケンス解析をおこなったところ、ハエ生殖幹細胞で機能するmiR-278などにおいて、通常選ばれることのない方の鎖がガイド鎖に選ばれる現象が観察された。TGF- $\beta$ /BMP経路は生殖幹細胞を維持に不可欠であり、これまでに転写レベルでの遺伝子発現制御が重点的に解析されてきたが、それとは別に、miRNAを利用した転写後レベルの制御もおこなうことが知られている。卵巣においてTGF- $\beta$ /BMP経路がmiRNAのガイド鎖選択の制御に関わる可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

TGF- $\beta$ /BMP経路において、miRNA経路のガイド鎖転換がどのようにして生じるのかを明らかにすることにより、生殖幹細胞の維持に必要な二つの経路の関係を明らかにすることが当初の目的であった。しかしながら、研究を進めると、TGF- $\beta$ /BMP経路そのものがmiRNAのガイド鎖転換を引き起こすことを支持する知見を蓄積することができなかった。一方、卵巣と比較するために、精巣に蓄積するmiRNAをディープシーケンス解析することにより、精巣特異的なガイド鎖転換の現象も発見された。では、miRNAのガイド鎖転換はどのように引き起こされるのか。ガイド鎖のmiRNAはArgonaute(Ago)タンパク質とエフェクター「RISC」を形成する。ガイド鎖の転換はRISC形成の過程においてなんらかの制御が加えられることにより引き起こされるのではないかと考えた。RISC形成は分子シャペロンに依存する。そこで申請者は、ショウジョウバエの生殖器官において分子シャペロンがmiRNAのガイド鎖転換に関わる可能性を調べることにした。

### 3. 研究の方法

Hsp90は分子シャペロン複合体の中核を成す。Hsp90に様々なコシャペロンが相互作用することにより、複合体は機能を特化させる。コシャペロンには、miRNA経路に関与することが示唆されてきたCyclophilin 40「Cyp40」やFK506-binding protein 59「Fkbp59」が含まれる。そこで、それらコシャペロンをコードする遺伝子の機能欠損株をゲノム編集技術を用いて網羅的に作成することにした。それぞれの機能欠損株において表現型を調べ、配偶子の形成に関与するコシャペロンを探索するとともに、機能欠損株においてmiRNAの蓄積をディープシーケンスと定量PCRにより解析することにした。

### 4. 研究成果

f kbp59の機能欠損株が蛹の段階で致死に至る一方、cyp40の機能欠損株は雄性の不妊の表現型を示し、精巣において精子が成熟を完了できず、精嚢に蓄積されないことが判明した「図1」。内在のCyp40タンパク質を検出する抗体を作成したところ、表現型と一致して、Cyp40は精巣において顕著に蓄積していた。cyp40の機能欠損株において、GFP-FLAGタグを付与したcyp40遺伝子を生殖細胞特異的に発現させると、成熟精子の形成が野生型と同等のレベルにまで回復したが、生殖細胞を取り巻く体細胞に発現させても顕著な表現型の回復は観察されなかった。以上の結果から、Cyp40は精巣の生殖細胞において精子の成熟のために不可欠な役割を果たしていることが明らかになった。

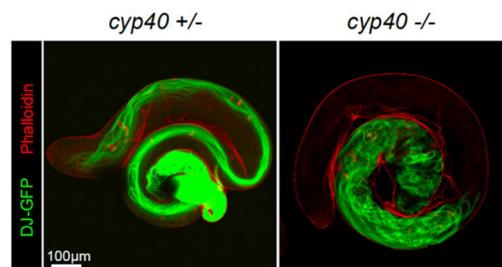


図1. cyp40の機能欠損株における精子の成熟異常

ショウジョウバエの精巣には内在の short-interfering RNA「siRNA」が活発に産生されることが知られる。cyp40の機能欠損株において、miRNAや内在のsiRNAの蓄積をディープシーケンスにより調べた。しかしながら、野生型と比較して、顕著なmiRNAとsiRNAの蓄積の異常は観察されなかった。ショウジョウバエのAgo1とAgo2タンパク質はmiRNAとsiRNAにそれぞれ結合することによりRISCを形成する。Ago2はAgo1に結合しにくい一部のmiRNAとRISCを形成することも知られる。そこで、Ago1とAgo2タンパク質をそれぞれ免疫沈降することにより、それぞれのRISCに含まれているmiRNAとsiRNAを分けて解析することにした。その結果、全RNAを解析した場合に検出できなかった一部のmiRNAがAgo2に積

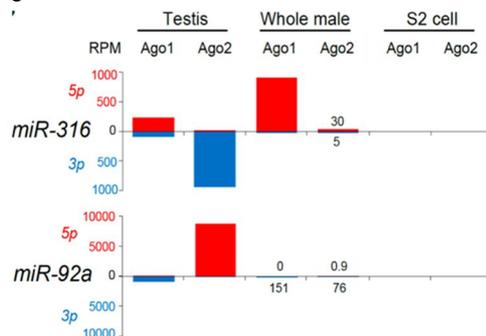


図2. 鎖転換により精巣のAgo2に蓄積するmiRNA

込まれて RISC を形成していることがわかった。Ago2 と結合する miRNA には、卵巣や培養細胞において観察されない、精巣特異的なものが含まれていた。それらの一部はガイド鎖転換の現象を示した「図 2」。

cyp40 の機能欠損株において、Ago2 に結合する精巣特異的な miRNA が顕著な蓄積の低下を示すことが明らかとなった「図 3」。これと一致して、生殖細胞の細胞抽出液において、Cyp40 が二本鎖の siRNA を積み込む途中の Ago2 タンパク質と複合体をつくることが示された。つまり、Cyp40 は RISC 形成にはたらきかけることにより、Ago2-RISC が保持する siRNA と miRNA の集団を制御するのだと考えられる。残念ながら、ガイド鎖転換を起こして Ago2 に積み込まれている miRNA については、cyp40 機能欠損株において転換の現象そのものがなくならなかったため、Cyp40 がガイド鎖転換を引き起こす主因ではないと結論づけられた。以上の結果から、Ago2 に結合する miRNA を制御する Cyp40 の機能が、精子の成熟に支えていることが示唆された。

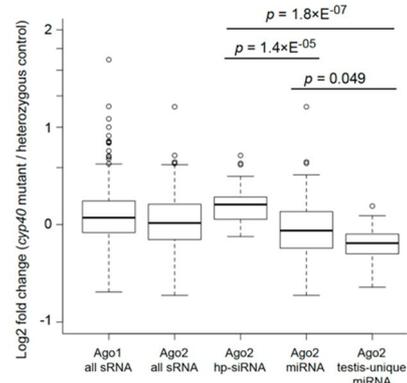


図 3. 精巣特異的に Ago2 と RISC をつくる miRNA は cyp40 の欠損株において蓄積が低下する。

Cyp40 に補助され、Ago2 と RISC をつくる精巣特異的な miRNA それぞれが精子の成熟過程に寄与するのかを調べた。各 miRNA の遺伝子の破壊株を集め、オスの精巣において精子の成熟過程に注目した解析を行なった。cyp40 の機能欠損株では、減数分裂を終えた半数体の精細胞が形状を針状に変化させる段階で異常が観察される。すなわち、64 個の精細胞が同調して針状化する途中で観察される Individualization complex 「IC」が崩壊する。miRNA の破壊株を調べたところ、miR-316 が IC の正常な形成に寄与することが明らかとなった。一致して、miR-316 を持たない精巣は妊性の低下を示した。miR-316 は鎖転換により Ago2 へ積み込まれる miRNA だった。以上のことから、Cyp40 は精子の成熟に関与する機能的な miRNA による Ago2 との RISC 形成を補助する役割を担うことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taichiro Iki, Moe Takami, Toshie Kai	4. 巻 33(6)
2. 論文標題 Modulation of Ago2 Loading by Cyclophilin 40 Endows a Unique Repertoire of Functional miRNAs during Sperm Maturation in Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井木 太郎
2. 発表標題 Tissue-specific regulation of RISC loading by Hsp90 cochaperone Cyclophilin 40
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井木 太郎
2. 発表標題 Hsp90 cochaperone-mediated ARGONAUTE regulation during Drosophila spermatogenesis
3. 学会等名 baRNAclub (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	甲斐 歳恵  (Kai Toshie)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------