

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03285

研究課題名(和文) 長鎖非コードRNAと多機能性ゲノムによる新規精子形成機構の解明

研究課題名(英文) A novel mechanism of spermatogenesis regulated by long noncoding RNA and multi-functional genome element

研究代表者

木村 敦 (KIMURA, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：90422005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成において重要なステップである減数分裂では、一次精母細胞と呼ばれる時期に多数の重要遺伝子が転写活性化する。我々はこの転写活性化に長鎖非コードRNAおよびプロモーターとエンハンサーの役割を同時に果たすdual promoter-enhancer (DPE) が機能することを明らかにした。本研究では、これら長鎖非コードRNAとDPEが減数分裂において協働して機能するという仮説を検証した。一次精母細胞のDPEと長鎖非コードRNAの標的遺伝子を網羅的に同定して比較した結果、これらが実際に協働している可能性が示唆された。また長鎖非コードRNAがテストステロン合成を調節するという新しい機能も発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は哺乳類のゲノムにおいて大部分を占める、タンパク質を指定しない非コード領域の機能解明に貢献するものである。非コード領域は生命科学のダークマターともよばれる大きな謎であり、本研究はその機能解明に貢献する点で学術的価値がある。しかも本研究は、生命を次世代につないでいくうえで不可欠な精子をつくる過程で機能する非コード領域の研究であり、ゲノムの最も本質的な機能を明らかにすることにつながる。社会的観点からは、晩婚化が進む日本社会において男性側の問題によって不妊治療を行うケースが増えており、本研究の成果はこの社会的問題解決の糸口を見出す可能性がある。

研究成果の概要(英文)：An important process during spermatogenesis is meiosis, in which many functional genes are transcriptionally activated in primary spermatocytes. We revealed that the long noncoding RNA (lncRNAs) and the dual promoter-enhancer (DPE), a genome sequence possessing both promoter and enhancer activity, play roles in this transcriptional activation. In this study, we tested the hypothesis that lncRNAs and DPEs cooperatively function in gene regulation during meiosis. Genome-wide analyses identified DPEs and target genes of lncRNAs in primary spermatocytes, and as a result of comparison of those data, we suggest the cooperative contribution of DPEs and lncRNAs to the gene activation. Moreover, we also found that some lncRNAs are involved in the regulation of steroidogenesis in the testis.

研究分野：生殖ゲノム生物学

キーワード：精子形成 長鎖非コードRNA ゲノム dual promoter-enhancer 遺伝子発現調節 テストステロン エピジェネティクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

マウスの精子形成では減数分裂過程で 2300 個程度の遺伝子が特異的に転写活性化することが知られており、中でも一次精母細胞の時期に重要な遺伝子が多数転写活性化する [1]。そのため、精子形成の全容を理解するにはこの時期の転写活性化の詳細を明らかにする必要があるが、いまだに多くの謎が残されている。

我々はこれまでマウスにおいて一次精母細胞で転写活性化する 2 つの遺伝子座について研究を行ってきた。1 つ目は 11 番染色体上の *Tcam1* 遺伝子であり、我々の解析によって精母細胞特異的に *Tcam1* 遺伝子の転写活性化に寄与するエンハンサーを同定した。興味深いことに、このエンハンサーは *Tcam1* 遺伝子に隣接する 2 つの遺伝子のプロモーターにもなっていることが判明し、すなわち同時にプロモーターとエンハンサーの両方の機能を発揮する多機能性の dual promoter-enhancer (DPE) であることが明らかとなった [2]。この結果を受けて、我々は精子形成において DPE がより普遍的に機能している可能性を考え、科学研究費補助金 (15H04317) の支援を受けて網羅的解析などを行った結果、一次精母細胞で 4000 カ所あまりの DPE 候補配列の同定に至った。しかし、その後他の研究室から報告された網羅的解析のデータを調べたところ、我々のデータと必ずしも一致しないことが判明し、再検討が必要と思われた。

我々が解析を行っている 2 つ目の遺伝子座はマウス 9 番染色体上の *Prss/Tessp* 遺伝子座である。この遺伝子座は 6 つの精巣特異的プロテアーゼ遺伝子を含んでおり、精子形成における重要性が指摘されていた [3,4]。我々はこの遺伝子座から 3 つの精巣特異的長鎖非コード RNA を同定し、その発現と機能解析を行ってきた [5,6]。このうち *lncRNA-HSVIII* は精母細胞の核に局在することが判明しており、本研究開始時点では少数の *lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスの解析を行って、精子形態に異常の出る個体がいることを確認していた。*lncRNA-HSVIII* は一次精母細胞の核とライディッヒ細胞の細胞質に局在するが、本研究開始時点ではこの長鎖非コード RNA が一次精母細胞で転写調節を行い、それによって精子の形態形成に寄与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

上述した背景のもと、我々は、ともに一次精母細胞で転写調節に関わる DPE と長鎖非コード RNA が協働的に機能しているのではないかと、という仮説をたてた。本研究では、我々が同定した長鎖非コード RNA の生理機能を明らかにするとともに、長鎖非コード RNA が DPE と協働して精子形成における転写調節を行っている可能性を検討した。

3. 研究の方法

DPE 候補配列の同定は、一次精母細胞で発現している遺伝子上流にエンハンサーのマークとされるヒストン H3K4me1 のピークを検出することで行った。公共の ChIP-seq データを展開し、我々の研究室ですでに DPE 活性を持つことが判明している配列がピークとして検出されるようにパラメーターの調整を行った。我々が独自に行った ChIP-seq データも同様のパラメーターで解析し直した。その後、これらのデータを、我々がすでに持っている RNA-seq データの結果と比較した。

DPE 活性の検出には、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター解析を行った。それぞれの DPE 配列をルシフェラーゼに直接つなぐか TK プロモーターで駆動されるルシフェラーゼ遺伝子の下流につないだコンストラクトを作成し、マウス精母細胞由来の GC-2spd(ts)細胞にトランスフェクションして 2 日後にルシフェラーゼ活性を測定した。また、長鎖非コード RNA の転写調節活性もレポーター解析によって確認した。この際に shRNA 発現ベクターを用いたノックダウンを行って、その効果も検証した。作製したコンストラクトは必要に応じて、安定発現培養細胞の作製にも用いた。

長鎖非コード RNA のノックアウトマウスの解析では、ヘマトキシリンエオシン染色による組織学的観察を行い、血清テストステロンの測定は ELISA 法によって行った。また、精巣からトータル RNA を精製して RNA-seq 解析を行い、その結果を定量的 RT-PCR によって確認した。

長鎖非コード RNA に結合するタンパク質については、BrU ラベルした RNA を生殖細胞の核抽出液と混ぜて BrdU 抗体でプルダウンし、一緒に落ちてきたタンパク質を質量分析することで候補を同定し、RNA 免疫沈降によって確認した。

4. 研究成果

(1) 一次精母細胞における DPE 候補配列の同定

公共のデータベースからマウス一次精母細胞におけるヒストン H3K4me1 修飾の ChIP-seq データ (SRR11848355) をとりだして展開し、ピークを検出した。このデータを、我々がすでに持っている一次精母細胞の RNA-seq データと照合し、一次精母細胞において発現している遺伝子の転写開始点から 500 塩基以内にある H3K4me1 ピークを DPE 候補配列とした。その結果、8799 カ所の配列を同定した。そして、我々が独自に行っていた一次精母細胞の H3K4me1 修飾の

ChIP-seq データを同様の方法で解析し直して比較したところ、8799 カ所の候補配列のうち 5840 カ所が我々のデータでも DPE 候補となることがわかった。

(2) 新たな DPE 候補配列の DPE 活性の検証

得られた DPE 候補配列の中から 10 個を選んで、それらのプロモーター活性と TK プロモーターに対するエンハンサー活性を、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター解析によって検証した。マウス精母細胞由来の GC-2spd(ts)細胞で検証した結果、10 個中 8 個の配列が TK プロモーターの活性を有意に上昇させ、10 個中 5 個の配列がバックグランドレベルよりも高いプロモーター活性を示した。すなわち、10 個中 5 個がこの細胞株で DPE 活性を持つことがわかった。ただし実際には、発現している遺伝子の転写開始点から 500 塩基の配列は少なくともプロモーターの一部として機能していると考えられるので、ここで解析した 10 個の DPE 候補配列はすべて一次精母細胞でプロモーターとしての機能を持つと考えることができる。この考え方では、同定した DPE 候補配列 10 個のうち 8 個は DPE 活性を持つことになる。

(3) *lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスの表現型解析

lncRNA-HSVIII ノックアウトマウスはオスメスともに不妊ではなかったが、性成熟直後の 2 ヶ月齢と老化が始まる直前の 6 ヶ月齢のオスについて、複数個体を用いて組織学的解析を行った。その結果、どちらの月齢でも *lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスにおいて、精細管ステージが野生型と少し異なっており精巣中の血管の数が増えていることもわかった。6 カ月齢ではこれに加えて、*lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスの精巣縦隔と呼ばれる領域の形態が異常となっており、精細管内では異常形態を示す生殖細胞が増えていることなどがわかった。さらに 6 カ月齢では精巣上体から採取した精子に野生型より多くの異常形態が見られることもわかった。これらのことから、*lncRNA-HSVIII* は精子形成に何らかの役割を果たしていると考えられる。

次に我々は、2 カ月齢の精巣から精製したトータル RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、野生型マウスに比べて 2212 個の遺伝子が *lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスで発現減少していることがわかった。これらを精査したところ、テストステロン合成に関わる *Star* 遺伝子や *Hsd3b1* 遺伝子などの発現が *lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスの精巣で低下していることが判明した。定量的 RT-PCR によって、この *Star* 遺伝子と *Hsd3b1* 遺伝子の発現減少が他の *lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスの精巣でも見られることがわかった。そこで、血清を用いた ELISA 解析を行ったところ、*lncRNA-HSVIII* ノックアウトマウスではテストステロンレベルが野生型よりも低いことが明らかになった。これらの結果より、*lncRNA-HSVIII* はテストステロン合成を制御しており、そのノックアウトマウスの精巣や精子で見られた形態異常はテストステロンレベルの低下によるものである可能性が考えられる。

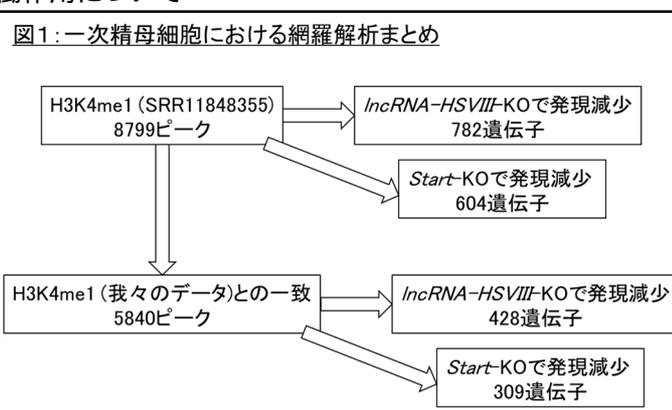
(4) *Prss/Tessp* 遺伝子座の他の長鎖非コード RNA の機能解析

我々は *Prss/Tessp* 遺伝子座における他の長鎖非コード RNA の解析も行った。*Start* はこの遺伝子座のもう 1 つの長鎖非コード RNA であり、生殖細胞とライディッヒ細胞で発現が確認された。*Start* ノックアウトマウスも不妊ではなく、2.5 カ月齢の個体を調べたところ、精巣形態、精子数、精子運動能に野生型との違いは見られなかった。しかし、*Start* ノックアウトマウスの精巣でもステロイド合成遺伝子の発現が低下していることがわかり、血清と精巣におけるテストステロンレベルの低下が確認された。したがって、*Start* もステロイド合成の制御因子である可能性が考えられる。

一方で、*Start* ノックアウトマウスでは *Prss/Tessp* 遺伝子の 1 つである精母細胞特異的な *Prss43/Tessp-3* 遺伝子の発現が大きく低下していることもわかった。そこで、*Start* が *Prss43/Tessp-3* 遺伝子のプロモーター活性に与える効果をレポーター解析によって調べたところ、*Start* は *Prss43/Tessp-3* プロモーター活性を上昇させることが分かった。すなわち、*Start* はライディッヒ細胞でテストステロン合成を制御するだけでなく、精母細胞で *Prss43/Tessp-3* 遺伝子の転写活性化を行うという、2 つの機能をもつ長鎖非コード RNA であることが判明した。

(5) 長鎖非コード RNA と DPE の協働作用について

(1) (2) で同定した一次精母細胞における DPE が、*Prss/Tessp* 遺伝子座の長鎖非コード RNA と協働的に機能する可能性を検証するため、長鎖非コード RNA のノックアウトマウスで発現減少を示した遺伝子群と DPE が制御すると思われる遺伝子群を比較した。公共の H3K4me1 修飾の ChIP-seq データ (SRR11848355) のみを用いた解析では、*lncRNA-HSVIII* の標的遺伝子のうち 782 個、*Start* の標的遺伝子のうち 604 個が DPE 候補配列近傍に存在することがわかった。我々が独自に行った H3K4me1 修飾の ChIP-seq データも加えて解析すると、*lncRNA-HSVIII* の標的遺伝子のうち 428 個、*Start* の標的遺伝子のうち 309 個が DPE 候補配列近傍に存在することがわかった (図 1)。これらの遺伝子は、長鎖非コード RNA と DPE の調節を同時に受けている可能性がある。



(6) その他の発見

(2) で検証した DPE 配列の 1 つは、*Prss/Tessp* 遺伝子座にある *Prss42/Tessp-2* 遺伝子上流配列である。この配列は、(2) の検証の結果、GC-2spd(ts)細胞で有意なプロモーター活性と有意なエンハンサー活性を示したため、真の DPE であると考えられる。我々のこれまでの解析によって、*Prss42/Tessp-2* プロモーターには *Prss/Tessp* 遺伝子座のもう 1 つの長鎖非コード RNA である *Tesra* が結合して *Prss42/Tessp-2* 遺伝子の転写活性化を行うことが明らかになっている[6]。すなわち、*Prss42/Tessp-2* 遺伝子上流の DPE は長鎖非コード RNA と協働する具体例の 1 つである可能性が高い。我々はそのメカニズムの一端を明らかにするために、*Tesra* 結合タンパク質を探索したところ PTBP2 タンパク質が同定された。そこで、*Tesra* 転写が *Prss42/Tessp-2* プロモーターを活性化する *in vitro* 細胞培養実験系を確立して、PTBP2 の役割を検討したところ、*Ptbp2* のノックダウンによって *Tesra* による *Prss42/Tessp-2* 遺伝子の転写活性化が減弱することがわかった。したがって、*Tesra* は精母細胞で PTBP2 とともに *Prss42/Tessp-2* 遺伝子の転写活性化に寄与しており、DPE 活性にも貢献している可能性が示唆される。

(7) まとめ

以上の結果から、一次精母細胞では多数の DPE が機能している可能性が高いことと、そのうち数百個程度が長鎖非コード RNA と協働している可能性があることが示唆された。また、*Prss/Tessp* 遺伝子座に存在する長鎖非コード RNA には一次精母細胞における転写調節のほかに、ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成の調節という機能があることも明らかになった。これらはいずれも精子形成における非コード配列の機能という、いまだに多くの謎が残されている課題の一端を明らかにしたものである。

引用文献

- [1] Schultz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12201-12206, 2003.
- [2] Kurihara *et al.*, *J Mol Biol* 426:3069-3093, 2014.
- [3] Yoneda *et al.*, *Biol Reprod* 88:118, 2013.
- [4] Scovell *et al.*, *Development* 148:dev197558, 2021.
- [5] Yoneda *et al.*, *Mol Reprod Dev* 83:541-557, 2016.
- [6] Satoh *et al.*, *Biol Reprod* 100:833-848, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Otsuka Kai, Yang Hong, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Kurihara Misuzu, Satake Honoo, Kimura Atsushi P. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Evidence for a functional role of Start, a long noncoding RNA, in mouse spermatocytes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0273279 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273279 | 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 - |
| 1. 著者名 Otsuka Kai, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Takei Natsumi, Satoh Yui, Terao Miho, Takada Shuji, Kotani Tomoya, Satake Honoo, Kimura Atsushi P. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 A Testis-Specific Long Noncoding RNA, Start, Is a Regulator of Steroidogenesis in Mouse Leydig Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 665874 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.665874 | 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 - |
| 1. 著者名 Bandara Thusitha A.M.K., Otsuka Kai, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Satake Honoo, Kimura Atsushi P. | 4. 巻 534 |
| 2. 論文標題 A dual enhancer-silencer element, DES-K16, in mouse spermatocyte-derived GC-2spd(ts) cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1012 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.049 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sato Josei, Satoh Yui, Yamamoto Takehiro, Watanabe Takehiro, Matsubara Shin, Satake Honoo, Kimura Atsushi P. | 4. 巻 893 |
| 2. 論文標題 PTBP2 binds to a testis-specific long noncoding RNA, Tesra, and activates transcription of the Prss42/Tessp-2 gene | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Gene | 6. 最初と最後の頁 147907 ~ 147907 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2023.147907 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 木村敦 |
| 2. 発表標題 マウス精巢長鎖非コードRNAの意義を求めて |
| 3. 学会等名 第8回生殖若手の会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 木村敦 |
| 2. 発表標題 マウス精子形成における長鎖非コードRNAの機能と作用機構 |
| 3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤丈生、佐藤優衣、山本雄広、渡辺健宏、松原伸、佐竹炎、木村敦 |
| 2. 発表標題 マウス精巢特異的長鎖非コードRNAの転写活性化におけるPTBP2タンパク質の寄与 |
| 3. 学会等名 第47回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム |
| 4. 発表年 2023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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 佐竹 炎 (SATAKE Honoo) (20280688) | 公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究 所・統合生体分子機能研究部・主幹研究員 (74408) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 松原 伸 (MATSUBARA Shin) | | |
| 研究協力者 | 白石 慧 (SHIRAISHI Akira) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |