

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21688021

研究課題名（和文） 非コードRNAによるエピジェネティック脳機能制御の種間多様性

研究課題名（英文） Species-level Diversity of Epigenetic Regulation for Brain Function Mediated by Non-coding RNA

研究代表者

今村 拓也（IMAMURA TAKUYA）

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90390682

研究成果の概要（和文）：脳の形態学的・機能的な違いは遺伝的に98%の相同性を示すヒト・サルでも明らかであり、実験動物として汎用されるマウスも、殆どの遺伝子セットを共通に利用しているが、独特な神経系を獲得している。一方、タンパクになれない非コードRNAセットは種間多様度が高い。本課題では、ゲノムへの偽遺伝子挿入による非コードRNA獲得と機能化が、既存のペプチド・タンパク質をコードする遺伝子の発現スイッチを多様化しうることを発見した。

研究成果の概要（英文）：Brains of mammalian species mutually differ in the morphology and functions, even those of human and chimpanzee that share ~98% nucleotide homologies. We have reported promoter-associated noncoding RNA (pancRNA) that acts to activate downstream gene expression through DNA demethylation. This study shows that DNA elements inserted into gene promoter regions of a certain species have provided the templates for species-specific pancRNAs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：非コードRNA、DNAメチル化、生物多様性、エピジェネティック制御、脳

1. 研究開始当初の背景

獣医・畜産学分野では、様々なほ乳動物を包括的に理解することが常に求められる。しかし種を超えた「保存性」と「多様性」を必然的に内包した本分野においても、生物多様性を分子メカニズムから記述する研究は未だ

黎明期にあると言わざるをえない。脳の形態学的・機能的な違いは遺伝的に98%の相同性を示すヒト・サルでも明らかに異なり、畜産上有用なウシ・ブタも、実験動物として汎用されるマウスも、殆どの遺伝子セットを共通に利用しているが、個々に独特な神経内

分泌系や付随する繁殖戦略を獲得している
のである。

2. 研究の目的

本課題では、多様性の源を遺伝子発現のスイッチに相当するエピジェネティック制御の種特異性に求めることにより問題点の打開をはかった。種間や組織間で非常に多様であることが明らかとなってきた機能性非コード RNA (ncRNA) 群に着目し、特にゲノムレベルで働く分子種の高度利用を目的とした。遺伝子のスイッチとして働く、いわゆる遺伝子プロモーターに由来する、**promoter-associated ncRNA (pancRNA** : 申請者が発見・命名)について、

(1) 全マウス脳ゲノム解析を基点に制御下遺伝子を網羅的に同定し、その配列特異的エピジェネティック遺伝子発現制御活性がもたらす脳の部域化を解析した。

(2) 遺伝子発現制御と脳機能の種間多様性を生み出す要因となっているか、サル特異的 **pancRNA** を、強制発現系により他種細胞に賦与し、その機能を検定した。これにより、脳エピジェネティック制御の普遍性・多様性形成における RNA の意義を考察した。

3. 研究の方法

本課題においては、マウスをモデル動物に、

(1)については、

①pancRNA の網羅的同定

(プロモーターアレイ及び第2世代シーケンサーを利用し、Unix ベースの各種公共解析ツール及びPerl、Ruby プログラミングを活用した情報抽出を行った)

②in vitro 強制発現系を利用したクロマチン構造改変

(各種ほ乳類培養細胞株を利用し、ライブイメージングとクロマチン構造解析に依った)

の2点を進行した。加えてマカクザルその他のほ乳動物種との比較により、

(2)については、

①非コード RNA の発現多様性解析

(項目(1)の①と同様に行った)

②in vivo 強制発現系を利用したマウス脳の改変

(受精卵雄性前核への各種 RNA 発現コンストラクトのマイクロインジェクションによ

る導入に依った)

の2点を進行した。これにより、pancRNA の機能性をクロマチンレベルから検討した。

4. 研究成果

pancRNA をサルで約 400、マウスで約 180 同定した成果を元に、発現量が最も高い8つのサル特異的 pancRNA の解析を進めたところ、いずれの pancRNA も確かに直下の遺伝子のスイッチオンに関わっていることが示された。興味深いことに、例えばサル CCDC65 遺伝子の場合、pancRNA の鋳型近傍に、ribosomal protein L32 の偽遺伝子と高い相同性を示す配列が存在し、マウスでは相当する配列は存在していない。一方、HSPA2 遺伝子では、pancRNA のシグナルは下流のコード遺伝子の転写開始点付近の CpG アイランドと重なっていた。以上から、種特異的な pancRNA を生み出す2つのメカニズムが示唆された。一つは、レトロポジションにより偽遺伝子 DNA 断片がプロモーター領域に種特異的に挿入され、pancRNA の鋳型を獲得したというもの(図1)、もう一つは、元々両方向性の転写活性を持つ GC 含量の高いプロモーター配列に種特異的な変異が入ることで、その領域から転写される pancRNA の発現パターンが変化したというものである。

図1 ほ乳類遺伝子スイッチ進化のモデル

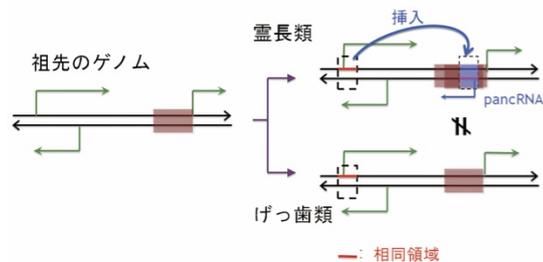


図1のケースについて、更に検討を加えた結果、以下の4点を初めて明らかにした(今村拓也 第152回日本獣医学会生理学・生化学分科会奨励賞受賞: 図2)

(1) ヒト、チンパンジー、マカクザル、マウス、ブタにおけるプロモーターへの偽遺伝子挿入頻度が種間で異なる(バイオインフォマティクス解析)

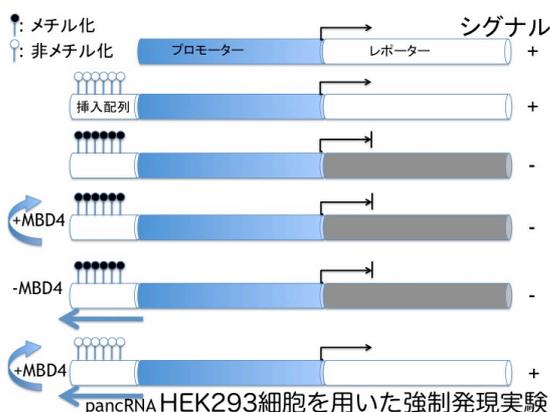
(2) 固定した挿入配列からは RNA 転写がコード遺伝子に対しアンチセンス方向に起こる

(プロモーターアレイの結果をイルミナ社次世代シーケンス解析により精度を高めて検定)

(3)挿入配列自体はプロモーター／エンハンサーとして、DNA メチル化した挿入配列はサイレンサーとして機能する(各種動物細胞レポーターアッセイ)

(4)挿入配列由来 promoter-associated ncRNA (pancRNA) と DNA グリコシラーゼの強制発現により、挿入配列を配列特異的に脱メチル化/遺伝子オンにできる(試験管内メチル化アッセイ)。

図2 種特異的 RNA と遺伝子スイッチ獲得



以上より、偽遺伝子由来配列が遺伝子制御領域に種特異的に挿入されることで、種特異的 pancRNA が獲得され、配列特異的 DNA メチル化パターン形成を介して、種特異的遺伝子発現スイッチの獲得に至ることが考えられた。成果の一部は米国生化学会誌などに報告し、大学広報を通じた成果の発信にも努めた(「ほ乳類の遺伝子 ON を RNA により制御する」<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/20111005-1.html>)

当初の計画以上に進展しており、本研究の成果をもとに、文部科学省科学研究費新学術領域研究(研究領域提案型)『生命科学系3分野支援活動』であるゲノム支援(研究代表者:郷康広、の研究分担者)にも採択いただき、研究開始当初の計画では漏れていた第2世代シーケンス解析を行うことができ、結果を格段に精細化できた。

今後の研究の推進方策として、本研究結果を基礎とした研究は、基盤研究(B)偽遺伝子挿入による種特異的非コードRNA獲得

に基づく遺伝子スイッチ制御の多様化(研究代表:今村拓也、平成24-26年度)に採択されており、発見したメカニズムの生化学・生理学・進化的側面を深く掘り下げて解析する予定である。

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4件)

① Takuya Imamura Epigenetic setting for long-term expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in cells.

Hormones and Behavior、査読有、Vol.59、2011、pp.345-352

DOI: 10.1016/j.yhbeh.2010.05.018

② Kinuyo Iwata, Mika Kinoshita, Shunji Yamada, Takuya Imamura, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Kei-ichiro Maeda Involvement of brain ketone bodies and the noradrenergic pathway in diabetic hyperphagia in rats.

Journal of Physiological Sciences、査読有、Vol.61、2011、pp.103-113

DOI: 10.1007/s12576-010-0127-6

③ Junko Tomikawa, Hiroko Shimokawa, Masahiro Uesaka, Naoki Yamamoto, Yuji Mori, Hiroko Tsukamura, Kei-ichiro Maeda, Takuya Imamura Single-stranded noncoding RNAs mediate local epigenetic alterations at gene promoters in rat cell lines.

Journal of Biological Chemistry、査読有、Vol.286、2011、pp.34788-34799

DOI: 10.1074/jbc.M111.275750

④ Masahiro Uesaka, Takuya Imamura Cell- to species-level diversity of epigenetic setting for androgen receptor expression in mammals.

Journal of Steroids and Hormonal Science、査読有、Vol.S2、2011、pp.004

DOI: 10.4172/2157-7536.S2-004

[学会発表](計12件)

① Yamamoto N, Hamazaki N, Uesaka M, Imamura T Possible involvement of cell-state-specific promoter-associated noncoding RNAs in the epigenome formation of rat PC12 cells.

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 パシフィコ横浜(横浜市)

② Uesaka M, Nishimura O, Uno K, Ueda HR, Oishi T, Imai H, Agata K, Imamura T Species-specific pseudogene insertions generate cis-acting RNA for promoter demethylation in the macaque.
第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 パシフィコ横浜 (横浜市)

③ 今村拓也、上坂将弘、西村理、大石高生、今井啓雄、阿形清和 マカクザルにおける偽遺伝子由来 promoter-associated noncoding RNA(pancRNA)による種特異的転写活性化
第152回日本獣医学会大会 2011年9月20日 大阪府立大学 (堺市)

④ 浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、今村拓也 エピゲノム制御に関連する promoter-associated noncoding RNA の卵活性化依存的発現
第104回日本繁殖生物学会大会 2011年9月16日 いわて県民交流センター・アイーナ (盛岡市)

⑤ 上坂将弘、西村理、大石高生、今井啓雄、阿形清和、今村拓也 マカクザルにおける偽遺伝子由来 promoter-associated noncoding RNA (pancRNA)による種特異的転写活性化
第104回日本繁殖生物学会大会 2011年9月16日 いわて県民交流センター・アイーナ (盛岡市)

⑥ Imamura T, Uesaka M, Agata K Species-specific promoter-associated noncoding RNA mediates DNA demethylation in macaques.
Society for Molecular Biology and Evolution 2011 2011年7月27日 京都大学 (京都市)

⑦ Uesaka M, Oishi T, Imai H, Nishimura O, Agata K, Imamura T Pseudogene insertions may drive pancRNA acquisition during mammalian evolution.
次世代シーケンサ現場の会 第一回研究会 2011年5月29日 熱海ニューフジヤマホテル (熱海市)

⑧ 浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、今村拓也 In vitro 卵活性化依存的に発現する promoter-associated noncoding RNA の同定
第5回エピジェネティクス研究会年会 2011年5月20日 KKR ホテル熊本 (熊本)

⑨ Yamamoto N, Hamazaki N, Uesaka M, Shimokawa, H, Tsukamura H, Maeda K, Mori Y, Imamura T Potential of

promoter-associated noncoding RNAs for epigenetic setting during differentiation.

16th International Conference of the International Society of Differentiation 2010年11月16日 奈良県新公会堂 (奈良市)

⑩ 今村拓也、東村博子、前多敬一郎、森裕司 ノンコーディングRNAによる性ステロイド受容体遺伝子発現とげっ歯類脳機能制御
第103回日本繁殖生物学会 2010年9月2日 北里大学獣医学部 (和田市)

⑪ Imamura T, Tomikawa J, Shimokawa H, Uesaka M, Tsukamura H, Maeda K, Mori Y Single-stranded noncoding RNA mediate local epigenetic alterations at gene promoters in rat cell lines.
Keystone Symposium: RNA Silencing 2010年1月16日 キーストンリゾートホテル (米国コロラド州キーストン)

⑫ 上坂将弘、上田泰己、宇野健一郎、阿形清和、今村拓也 マウス・サル脳における種特異的 promoter-associated noncoding RNA の同定
第102回日本繁殖生物学会 2009年9月1日 近畿大学農学部 (奈良県)

[その他]
研究成果公開ウェブページ
「ほ乳類の遺伝子 ON を RNA により制御する」
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/20111005-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA TAKUYA)
京都大学・理学研究科・准教授
研究者番号：90390682

(2) 研究分担者

該当者なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当者なし ()

研究者番号：