

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22310118

研究課題名(和文)迅速な遺伝子破壊法を用いたマウス・ノンコーディングRNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of mouse noncoding RNAs by a rapid gene disruption method

研究代表者

堀江 恭二(Horie, Kyoji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒトやマウスのゲノムの大部分が転写されており、かつ、その大半が、タンパクをコードしないRNA(noncoding RNA)であることが明らかとなった。しかし、noncoding RNAの機能を塩基配列から推測するのは困難である。本研究では、我々が開発した迅速な遺伝子破壊法を用いて、noncoding RNAを破壊したマウスES細胞を多数作製し、noncoding RNAの機能を系統的に解析した。

研究成果の概要(英文)：Recent researches demonstrated that most regions of the mammalian genome such as human and mouse are transcribed. Furthermore, most of such transcripts are noncoding RNAs. However, speculation of the function of noncoding RNAs from nucleotide sequences is difficult. We recently developed a method to rapidly generate mutant mouse ES cells. In the present study, we generated mutant mouse ES cell lines using this method and conducted systematic functional analysis of noncoding RNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：ES細胞 ゲノム 遺伝子 non-coding RNA 変異体

1. 研究開始当初の背景

近年、多細胞生物ゲノム上のタンパクをコードする遺伝子数は、ヒトや線虫のように進化的に離れた種間においても大差の無いことがわかってきた。一方、ヒトやマウスのゲノムの大部分が転写されており、かつ、その大半が、タンパクをコードしない RNA (noncoding RNA) であることも明らかとなった。Noncoding RNA の種類は高等な生物種ほど多様化する。これより、noncoding RNA の多様性こそが生物の複雑さを規定しているのではないかとの仮説が提唱された (Mattick, J.S.: Nature Rev. Genet., 5, 316-323, 2004) 。

しかし、この仮説の検証は、困難を極めている。Noncoding RNA には、microRNA や piRNA に代表される、数十塩基からなる短鎖型と、mRNA と構造の類似した長鎖型に大別される。短鎖型の解析については、過去 10 年で、極めて大きく進展したが、長鎖型の解析は大きく遅れている。その最大の理由は、長鎖型 noncoding RNA の膨大な数と、配列の多様性による。このため、どの RNA から解析すれば一般的な原理に辿り着けるのかの判断が難しい。

このような状況の中で、John Rinn と Eric Lander のグループは、マウスゲノムのヒストン修飾の特徴から、機能的に重要な可能性のある 1,600 個の non-coding RNA を推定した (Guttman, M. et al.: Nature, 458, 223-227, 2009) 。

この中には、HOTAIR のような、機能が証明されている noncoding RNA も含まれており、膨大な数の noncoding RNA の解析の糸口を与えるものとして、注目に値する。ただし、HOTAIR のような極一部の例以外は、機能については推測の域に留まっており、実験的な検証が待たれる状況にある。

2. 研究の目的

上記の背景を鑑み、本研究では、noncoding RNA を、機能面から系統的に解析することを試みる。そのために、申請者が独自に開発した、「マウス ES 細胞でホモ変異体を迅速に作製する方法 (Horie et al. Nature Methods 8: 1071-1077, 2011)」を用いて、noncoding RNA が破壊されたホモ変異体 ES 細胞を大量に単離する。過去の報告から、noncoding RNA の中には、核内で機能しているものも多い。このため、細胞質が主たる効果の場である RNAi 法は、適用が困難と予想され、DNA レベルで遺伝子を破壊する本手法の特性が生かされると考えられる。さらに、ES 細胞の分化誘導系と遺伝子発現プロファイル解析により、変異体の表現型を同定する。本研究は、培養細胞を用いた実験系であるため、多くの noncoding RNA に対して同一の機能解析法を適用することで、実験結果の標準化・比較が容易である。この特性を利用し、かつ、多くの変異体解析をすることに

より、noncoding RNA の機能に関する一般原理の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ホモ変異体 ES 細胞の単離

Guttman, M. et al. の手法に準拠して、転写領域に特異的なヒストン修飾を有すゲノム領域をリスト化し、我々が所有している変異体と照合した。ホモ変異体の単離は、既に樹立済みの、テトラサイクリン添加による手法 (Horie et al. Nature Methods 8: 1071-1077, 2011) を用いた。

(2) 変異体の表現型解析

ES 細胞の未分化性の評価時の培養条件には、通常の血清培地に加えて、極めて未分化な ES 細胞分画の濃縮・維持が可能な 2i 培地 (Gsk3b/Mek 阻害剤を添加した無血清培地) も用いた。遺伝子の発現レベルは、Roche LightCycler または ABI7900HT による qRT-PCR で定量した。分化誘導実験系には、血清培地からの LIF 除去や、embryoid body 形成、N2B27 無血清培地による神経系への分化誘導等を用いた。

(3) ベクター除去による復帰株の単離

CAG-Flp-IRES-puro ベクターを変異 ES 細胞株へトランスフェクトし、puro 選択によりトランスフェクトされた細胞を濃縮した。この細胞を希釈して播種し、1 細胞由来の細胞株を樹立し、ベクター領域の除去の有無をベクターの内外に配置したプライマーを用いて、PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) ヘテロ変異体 ES 細胞バンクにおける noncoding RNA の特定と、ホモ変異体 ES 細胞の作製

我々が作製済みの約 2,000 株のヘテロ変異体 ES 細胞株の中から、長鎖型 noncoding RNA に変異を有す細胞株を、in silico 解析でスクリーニングした。具体的には、「ヒストン H3 の 4 番目のリジンの trimethylation のピークに続いてヒストン H3 の 36 番目のリジンの trimethylation の高値が継続する」という特徴を有す遺伝子を、ヘテロ変異体のデータベースから特定した。これらのヘテロ変異体を解凍後、テトラサイクリンシステムを用いて Bloom 遺伝子を一過性に抑制し、相同組換え間頻度を高めることにより、ホモ変異体を誘導した。さらに、我々が開発した薬剤選択法を用いて、ヘテロ変異体を死滅させ、ホモ変異体を濃縮した。得られた細胞株がホモ変異体であることを、変異部位にリンクした SNP の解析と、変異部位の PCR 解析により確認した。

(2) ホモ変異体の表現型解析

上記で単離したホモ変異体について、増殖因子・feeder 細胞の除去や embryoid body

形成等による分化誘導を行った。形態的な変化に加えて、分化誘導前後での RNA の単離と、未分化マーカー/分化マーカーの qRT-PCR による定量的解析、および、免疫染色による未分化マーカー/分化マーカーの空間的な発現分布についても検討した。Flp/FRT を用いてベクター配列をゲノムから除去し、表現型が消失することを確認した。

(3) 生細胞による表現型解析

上記解析の過程で、同一細胞株内においても、個々の細胞ごとに表現型がばらつくことを観察した。このため、生細胞を用いた時系列解析の必要性を痛感し、蛍光蛋白質を用いた多能性の評価実験系を構築した。具体的には、細胞の追跡用に、細胞の核を各タンパクと融合した mCherry を発現させることで標識し、かつ、多能性マーカー遺伝子内へ EGFP や Venus をノックインした。蛍光蛋白質のデータを生細胞で取得するには、励起光の照射による細胞毒性を最小限に抑える必要があるため、種々の観察条件を検討し、安定的に蛍光蛋白質の発現レベルを定量できるようになった。また、蛍光蛋白質の発現レベルに応じた cell sorting も可能となったので、これを利用して、発現レベルが ES 細胞の多能性と相関を示す noncoding RNA を特定した。

(4) 考察

本研究を通じて、我々は、新規の noncoding RNA の機能の特定に成功した。Noncoding RNA の機能は多岐に渡り、研究開始当初の期待のように、機能に関する一般的原则を導き出すにはさらに多くの解析が必要と考えられた。しかしながら、本研究で確立した実験手法は、今度も noncoding RNA の解析に有用であることは間違いない。また、ES/iPS 細胞の分化誘導系の進展により、表現型解析法はさらに広がりをもてられる。CRISPR/Cas9 システムの開発により、遺伝子破壊株の作製も簡便化しつつある。このような手法を統合することにより、noncoding RNA に関するさらなる機能解析を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Yusuke Maeda, Jun Sese, Kyoji Horie, Nakaba Sugimoto, Taroh Kinoshita, Kosuke Yusa, Junji Takeda. Simulation and estimation of gene number in a biological pathway using almost complete saturation mutagenesis screening of haploid mouse cells. BMC Genomics, 査読有, 15:1016, 2014.

Ken Igawa, Chikara Kokubu, Kosuke Yusa, Kyoji Horie, Yasuhide Yoshimura, Kaori Yamauchi, Hirofumi Suemori, Hiroo Yokozeki, Masashi Toyoda, Nobutaka Kiyokawa, Hajime Okita,

Yoshitaka Miyagawa, Hidenori Akutsu, Akihiko Umezawa, Ichiro Katayama, Junji Takeda. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. Stem Cells Transl Med, 査読有, 3:992-1001, 2014.

③ Yasuhiro Umemura, Junko Yoshida, Masashi Wada, Yoshiki Tsuchiya, Yoichi Minami, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Junji Takeda, Hitoshi Inokawa, Kyoji Horie, Kazuhiro Yagita. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2a as an endogenous clock regulator. PLoS One, 査読有, 8: e67241, 2013.

Kyoji Horie, Chikara Kokubu, Junko Yoshida, Keiko Akagi, Ayako Isotani, Akiko Oshitani, Kosuke Yusa, Ryuji Ikeda, Yue Huang, Allan Bradley, Junji Takeda. A homozygous mutant embryonic stem cell bank applicable for phenotype-driven genetic screening. Nat Methods, 査読有, 8: 1071-1077, 2011.

〔学会発表〕(計 10 件)

① Junko Yoshida, Kyoji Horie. Rapid identification of homozygous mutant mouse embryonic stem cell clones showing differentiation resistant or differentiation prone phenotype. Global Controls in Stem Cells, November 5-7, 2014, Biopolis, Singapore.

② Junko Yoshida, Kyoji Horie. Live cell imaging for the analysis of cellular heterogeneity in mouse embryonic stem cell mutant clones identified by forward genetic screening. 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 18-21, 2014, Vancouver, Canada.

③ 堀江恭二、吉田純子. ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた包括的遺伝子機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25-27 日, 横浜.

Junko Yoshida, Kyoji Horie. Genome-wide comparative analysis and DNA-type transposon vector integration sites in mouse embryonic stem cells: implication for reprogramming study. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 12-15, 2013, Boston, USA.

堀江恭二, ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた迅速な表現型スクリーニング. 理研シンポジウム, 2013 年 6 月 28 日, つくば.

Junko Yoshida, Kyoji Horie. Genome-wide comparative analyses of

該当者無し

retroviral and DNA-type transposon vector integration sites in mouse embryonic stem cells: Implication for reprogramming study. June 12-15, 2013, Boston, USA.

吉田純子、竹田潤二、堀江恭二. レトロウイルスおよびトランスポゾンベクターのゲノムワイドな挿入部位解析. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸.

Junko Yoshida, Junji Takeda, Kyoji Horie. Screening for critical epigenetic factors involved with regulation of pluripotency and differentiation using a homozygous mutant mouse embryonic stem cell bank. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 13-16, 2012, Yokohama, Japan.

吉田純子、竹田潤二、堀江恭二. ホモ変異体 ES 細胞バンクを用いたマウス ES 細胞の多能性制御因子の遺伝学的スクリーニングとエピゲノム解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 13-16 日, 横浜.

Junko Yoshida, Chikara Kokubu, Junji Takeda, Kyoji Horie. Using conditional knockout of the bloom's syndrome gene in a recessive genetic screening for novel factors involved in differentiation of mouse embryonic stem cells. 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 16, 2011, Tronto, Canada.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
該当無し

○出願状況(計 0 件)
該当無し

○取得状況(計 0 件)
該当無し

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.naramed-u.ac.jp/~2phy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
堀江 恭二 (HORIE, Kyoji)
奈良県立医科大学・第二生理学・教授

研究者番号：30333446

(2)研究分担者
該当者無し

(3)連携研究者