

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657140

研究課題名(和文) 脊索動物ホヤにおける母性因子特異的ノックダウン法の動作原理の解明と応用

研究課題名(英文) Mechanisms of maternal mRNA-specific knockdown in *Ciona intestinalis*

研究代表者

笹倉 靖徳 (Sasakura, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10400649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：カタユレイボヤの母性mRNAの新規ノックダウン法の動作原理を明らかにすることと、母性mRNAの局在機構を解明することを目的とした。ノックダウン法の、ベクター内の必要領域の同定を進めた。遺伝子の5'UTRと結合するレポーター遺伝子はeGFP, Kaede, mKO2, DsRedのいずれでもノックダウンが生じる。またトランスポゾン(Minos以外)にSBであってもよい。遺伝子の5'UTRがターゲットとする遺伝子を指定するのに重要であり、この領域からアンチセンスRNAが合成されることを突き止めた。本ノックダウン法を用いて、母性遺伝子Ci-YB1が初期発生に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research purposed the characterization of the targeted and specific knockdown method of maternal mRNAs in the ascidian *Ciona intestinalis*, and understanding the mechanisms of the localization of maternal mRNAs in *Ciona* with the knockdown method. We identified the DNA elements necessary for the knockdown. eGFP, Kaede, mKO2 and DsRed reporter genes can cause knockdown of target genes when expressed with the promoter and 5' UTR of target genes. Both Minos and Sleeping Beauty transposons can be used for the knockdown method. We found that 5'UTR is crucial for determining the target gene of knockout, and we showed that small antisense RNAs are produced from the 5'UTR in the knockdown lines. We knocked down a maternally expressed gene Ci-YB1 that encodes Y-box type RNA-binding protein. The animals in which maternal Ci-YB1 was knocked down showed abnormal development, suggesting that this gene is necessary for proper embryogenesis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：脊索動物 ホヤ 母性因子 トランスポゾン ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

(1) 海産の原始脊索動物ホヤは脊椎動物に最も近い無脊椎動物である。ホヤの卵は典型的なモザイク卵であり、細胞分化や形態形成の決定因子が卵の特定の領域に局在していることは100年以上前から知られてきた。このことからホヤ卵は母性因子の良い研究材料となっている。近年の分子生物学的解析から、卵の特定の領域に局在する母性 mRNA がそれらの決定因子の分子の実体であることが明らかにされつつある。しかしながらホヤ母性因子の機能には不明な点が多く、その包括的機能解明には至っていないのが現状である。特にホヤでは遺伝子機能解明の効果的な手法である遺伝学が発達しておらず、特に卵形成過程で翻訳され、タンパク質として存在する因子の機能を阻害する有効な手法がないことが欠点であり、その問題を解決する必要がある。

(2) 上記の問題を打破するため、我々の研究グループはホヤの一種カタユレイボヤを研究材料として遺伝学的技術、特にトランスポゾンを用いたゲノム改変技術を導入してきた。我々はトランスポゾン Minos がホヤで活性を持つことを示し、Minos をゲノムへ挿入させたトランスジェニック系統を作製した。さらに Minos を用いてエンハンサートラップ法や挿入突然変異体の単離を達成するなど、トランスポゾンを用いた遺伝子機能解析の新しい手法論をこのホヤにおいて展開してきた。その過程で我々はカタユレイボヤにおいて母性因子を特異的に阻害する新しい手法の開発に成功した。本手法では GFP 遺伝子がカタユレイボヤの卵母細胞内でエピジェネティックな発現抑制を受けることを応用しており、GFP とターゲットとなる遺伝子のプロモーター並びに 5'UTR 領域を連結させた人工 DNA を持つトランスジェニック系統を作

製すると、その系統の卵内でターゲットの母性遺伝子の発現が抑制させるものである。この母性遺伝子特異的ノックダウン法では遺伝子の発現は卵形成時から mRNA レベルで抑制されるため、卵内での翻訳の有無に関わらず遺伝子をノックダウンできる。さらに本手法ではザイゴティックな遺伝子の発現には全く影響を与えないことが判明しており、ターゲットの遺伝子が母性および胚性の両方の発現を示す場合においても、母性における機能のみを特異的に抑制でき、母性における機能のみを明らかにすることが可能である。また、本手法は逆遺伝学的見地から行われるため、母性因子のように変異体の単離に1世代余計にかかる遺伝子の機能解明においてスピーディで効果的なスクリーニングを展開できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、このカタユレイボヤの母性因子特異的ノックダウン法の動作原理を追求することを第一の目的とする。特にノックダウンベクターを改変してノックダウンに必要な条件を探り、より効率よくノックダウンを生じさせるベクターを開発する。

(2) ノックダウンの条件を探る過程で実際に機能未知の母性因子 10 種類程度を選択してその発現における機能を明らかにする。特に、母性決定因子の分子の実体である mRNA が卵の特定の領域に局在していることに着目し、その局在に関与していると考えられる RNA 結合タンパク質と細胞骨格制御因子、モータータンパク質をコードする遺伝子群の機能を調べ、母性因子の卵内での局在機構を解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 母性因子の特異的ノックダウン法の動作原理を明らかにする。ノックダウンに

必要な DNA 配列を、ベクター上の配列の一部の改変により特定し、ノックダウンに必要なシス配列を同定すると同時に最適な条件を探る。

(2) ノックダウンはベクター近傍のゲノム環境に影響されることが分かっているため、そのゲノム上の条件を明らかにする。

(3) ノックダウン手法を洗練されたものにするために、ノックダウンで得られた表現型の特異性を確認するシステムチックなレスキュー実験を構築する。母性遺伝子の全てを対象にしたノックダウンが可能かどうかを検証するために、母性遺伝子 10-20 種類程度を選択してノックダウンし、全てがノックダウンされるか、されなければノックダウンできない遺伝子の特徴を明らかにする。この実験で得られたノックダウン系統のうち母性 mRNA 局在に関わるものを詳細に解析して、局在メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ノックダウンのシス配列の同定

ノックダウン法の、ベクター内の必要領域の同定を進めた。ノックダウンのターゲット遺伝子上流領域と 5'UTR に結合して発現させるレポーター遺伝子は eGFP, Kaede, mKO2, DsRed のいずれでもノックダウンが生じることが判明した。またトランスポゾンベクターは Minos 以外に Sleeping Beauty であってもよいことも突き止めた。すなわち、これらの DNA 配列はノックダウンには重要ではないことが明らかとなった。一方、レポーター遺伝子と連結する遺伝子の 5'UTR がターゲットとする遺伝子を指定するのに非常に重要であることが判明した。

ノックダウン系統の卵母細胞を単離し、RNA seq 法により特殊な転写産物ができ

ている可能性を追求した。その結果、ターゲット遺伝子の 5' UTR から、野生型卵母細胞には見られないアンチセンス鎖の small RNA が転写されていることが明らかとなった。この small RNA がノックダウンを生じている直接の原因であると考えられる。

(2) ノックダウンを生じるゲノム環境
ノックダウン系統 3 種類について、トランスポゾンベクターが挿入されたゲノム領域を同定した。しかしながら、特に目立った特徴は有しておらず、ノックダウンを引き起こすゲノム環境の同定には至らなかった。

(3) システムチックなレスキュー系
Cre-loxP を用いて、ノックダウンに重要な領域を欠失させることによるレスキューコンストラクトを計画し、本ベクターによるノックダウンのレスキューを試みた。しかしながら、loxP 配列をノックダウンベクターへと挿入させると、ノックダウンが生じる確率が著しく低くなることが明らかとなった。そのため、計画していたベクターのデザインを一部改変するバージョンを構築した。

(4) ノックダウン法を用いたホヤ母性 mRNA の機能解明

本ノックダウン法を用いて、母性 mRNA の機能解明を進めた。まず、3) で述べたベクターデザインの改変の影響もあり、ノックダウン系統を作製できたのは 11 遺伝子であった。そのうちノックダウンに成功したのは 6 遺伝子であった。まず、本ノックダウンによっては、細胞の維持に必須と考えられるハウスキーピング遺伝子のノックダウン卵を得ることはできないと結論づけた。逆に他の多くの遺伝子については、ベクターデザインが適切であればノックダ

ンできる可能性が高いことが判明した。但し、系統を複数作製したにもかかわらずノックダウン系統を得ることができない遺伝子 (macho-1) があったことから、ノックダウンは万能ではないことが明らかとなった。1) で述べた small RNA の転写とも絡めて、今後の研究からノックダウンが生じるより適切な条件を設定することが本技術を洗練されたものにするに重要である。このノックダウン系統作製から、Ci-pem 及び mT 遺伝子の母性転写産物が受精後の形態形成に必要であることが明らかとなった。さらに RNA 結合タンパク質をコードする母性発現遺伝子 Ci-YB1 をノックダウンすると、その卵から発生した胚が形態異常を示すことが明らかとなった。その表現型は、局在 mRNA の1つである Ci-pem のノックダウン胚と酷似しており、Ci-YB1 が局在 mRNA の制御に関わることが強く示唆される結果となった。

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 1件)

Iitsuka T., Mita K., Hozumi A., Hamada M., Satoh N., Sasakura Y. (2014)
Transposon-mediated targeted and specific knockdown of maternally expressed transcripts in the ascidian *Ciona intestinalis*. Scientific Report in press. 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

飯塚貴子、佐藤瑛生、三田薫、保住暁子、濱田麻友子、佐藤矩行、笹倉靖徳。
カタユレイボヤ卵を用いた母性 mRNA の新規発現抑制系の開発。
第36回日本分子生物学会年会。2013年12月4日。神戸ポートアイランド。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~sasakura/index.html>

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201405231800.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹倉 靖徳 (SASAKURA YASUNORI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：23681039