

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840010

研究課題名(和文) piRNAの生合成機構解析と新奇標的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Analysis of piRNA biosynthesis mechanism and identification of its target gene

研究代表者

中川 武弥 (NAKAGAWA, Takeya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：50363502

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)：この研究ではpiRNAの生合成機構と標的遺伝子の解明を目的とした。piRNAの転写制御機構を明らかにするために、全ゲノムDNAからのpiRNA転写を試験管内で再現する事に成功した。今後この手法を用いてpiRNA転写制御に関わる因子の同定を進めることが可能となった。この手法はpiRNAの標的遺伝子の解析にも有効で、piRNAを作用させた際の遺伝子転写の変化を網羅的に解析することができる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated mechanism of piRNA biosynthesis and its target gene. To elucidate the mechanism of piRNA transcription, we established the in vitro transcription system which can transcribes piRNA from whole genome DNA. This system is useful to identify the factor which regulates piRNA transcription. Furthermore, this system can analyze target gene of piRNA comprehensively.

研究分野：生化学

キーワード：piRNA 試験管内遺伝子転写

1. 研究開始当初の背景

RNA は、従来タンパク質を合成するための情報伝達物質にすぎないと考えられていたが、RNA の大部分はタンパク質の情報をコードしていない non-coding RNA(ncRNA) であることが判明しつつあった。ncRNA の中でも、small RNA と呼ばれる小さな RNA は遺伝子発現の制御に関わっていることが明らかになり、非常に重要な新しい研究分野として注目を浴びていた。piRNA は生殖細胞に特異的に発現しており、DNA のメチル化を介してレトロトランスポゾンの発現を抑制し、ゲノムの転移を防ぐという生殖細胞形成において非常に重要な役割を担っていることは以前から知られていた。しかし、トランスポゾンを標的にすると考えられる piRNA は少数で、多くはその標的が確認されておらず、トランスポゾン以外を標的にしていると考えられていた。また、当時様々な種類の体細胞での発現も確認されていた。しかし、piRNA の転写から生合成経路、標的に作用するメカニズムに関して解明されていない部分が多く、これらの piRNA に関する未知の領域の解明が進めば、今まで知られていなかった生命現象に対する small RNA の関与が明らかになることが期待された。

私は研究開始当時まで、遺伝子の転写制御機構の解析を行ってきた。特にヒストンの翻訳後修飾による遺伝子転写制御の解析を行い、ヒストン H2A の 119 番目のリシンを脱ユビキチン化する酵素を同定し、このユビキチン化がヒストン H3 の 4 番目のリシンのメチル化を抑制することにより遺伝子転写を抑制することを明らかにした(Genes Dev 22: 37-49,2008)。その際に用いた試験管内での遺伝子転写解析法を発展させることにより、従来なら数千塩基対程度のプラスミド DNA を用いていたものを、10 万塩基対以上の巨大なゲノム配列を含む大腸菌人工染色体 (BAC) からの遺伝子転写を検出すること

を可能にした。piRNA は数十キロ塩基対におよぶ大きなクラスターを形成しゲノム上にコードされているが、この方法を用いることにより、piRNA クラスターを含む BAC DNA から piRNA 前駆体を試験管内で転写させることに成功した。しかしゲノム DNA や RNA の混入の影響を強く受けるため、より精度を上げるための改良を必要としていた。

2. 研究の目的

(1) piRNA 自身の転写制御機構を試験管内で明らかにすることである。piRNA 前駆体は転写後 26 - 33ヌクレチドに切断される為、どのような形態で転写されているのか解析するのが困難であった。しかし試験管内で転写直後の前駆体 piRNA を用いることにより、切断を受けていない piRNA 前駆体の解析が可能となる。

(2) 得られた前駆体 piRNA から成熟型 piRNA を生合成すること。大きな前駆体を加工し、適切な長さの成熟型を生合成する経路は一部しか解明されていなかった。HeLa 細胞で piRNA の発現が確認されることから、この細胞の抽出液を用いて成熟型 piRNA を生合成できる可能性がある。抽出液をカラムクロマトグラフィーによる分画等の生化学的解析を行うことにより、成熟型 piRNA を生合成するために必要な因子の同定ができる。

(3) まだ特定されていない piRNA の標的遺伝子を、試験管内遺伝子転写解析法を用いて同定すること。そのためにはこれまでの研究成果を発展させ、細胞から抽出した全ゲノム DNA からの試験管内遺伝子転写の解析を可能とする必要があった。既に全ゲノム DNA でのクロマチンの再構築には成功していた。転写産物の解析には次世代シーケンサーを用いる。これにより全ての転写産物を網羅的に解析することができる。この試験管内遺伝子転写解析法に生合成した piRNA を添

加した際の各遺伝子の転写量の変化を解析することにより、標的遺伝子の同定を可能とする。

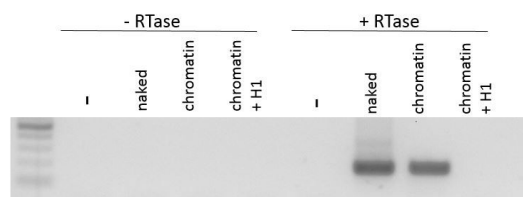
3. 研究の方法

piRNA の転写制御に関与する因子を同定するための実験系を構築するために、試験管内での piRNA 転写の再現を試みた。piRNA の転写はクラスター領域を含む BAC DNA と全ゲノム DNA を鋳型とし、RNA ポリメラーゼや基本転写因子を含む HeLa 細胞の核抽出液を用いて行った。転写産物の確認は RT-PCR 法で行った。この試験管内転写に影響を与える因子を細胞核抽出液から分画精製を行うことにより同定する。

4. 研究成果

試験管内でヒトの遺伝子転写をヒトの核抽出液で行う際には解決すべき問題点がある。鋳型 DNA と核抽出液中の mRNA を RT-PCR で検出してしまう点である。この点を解決するために幾つかの改善を行った。一つ目は核抽出液の RNase 処理を行った。処理後にタグを利用して RNase の除去を行っている。二つ目は転写後抽出した RNA の DNaseI 処理に加えて制限酵素処理を行い、鋳型 DNA の混入を抑えた。BAC DNA からの転写は以上の処理で十分検出可能となった。しかしゲノム DNA を鋳型とした場合、各遺伝子領域のコピー数が大幅に減少することから検出するためには PCR の増幅サイクル数を必要が生じた。その結果微量な DNA や RNA の混入が問題となった。これらの混入をより厳密に抑える為に、転写の際に RNA の基質である UTP に変えて BrUTP を用いた。BrUTP を含む新生 RNA を BrUTP に対する抗体で特異的に精製した。その結果、精製に用いたアガロースビーズに対する核酸の非特異的な結合がみられた。この結合は核酸の持つ電荷による相互作用である可能性が考えられ、これを抑えるためにポリアミ

ンの添加を検討した。その結果スperlミジンの添加により非特異的な核酸の混入を大幅に抑えることができることが明らかになった。図に示すように鋳型なしや逆転写酵素なしではシグナルが検出されなくなった。



上の図は piRNA クラスター領域の転写を検出したものである。この結果は試験管内で piRNA を転写させ、検出できることを意味する。今後はこの試験管内のシステムを活用し研究を進めていく。活用法は第一に piRNA 転写制御機構の解析を行う。転写開始点や制御領域を決定し、piRNA 転写制御に関与する因子の同定を行う。第二に試験管内転写で得られた前駆体 piRNA を用いて piRNA 合成経路の解明を目指す。細胞抽出液からカラムクロマトグラフィーによる分画を繰り返し生合成関連因子の同定を行う。第三に生合成できた piRNA を加えて試験管内遺伝子転写を行い、次世代型シーケンサーで転写量の変化を網羅的に解析する。この方法で標的遺伝子の同定を行う。

今後研究を進めることにより piRNA の新奇的な標的遺伝子の同定が期待できる。この結果により生殖細胞の発生において今まで知られていなかった piRNA の役割が明らかとなり、生殖細胞発生メカニズムの詳細な理解が進む可能性がある。これにより得られた知見は生殖医療に応用できる可能性がある。また、複数のガン細胞で piRNA の発現が増加しており、その発現の抑制によりガン細胞の

増殖が抑制されるという報告がある。本研究により piRNA 合成経路が明らかになれば、その知見はガン治療を目的とした piRNA 発現の効果的な抑制法の開発に貢献できる。

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 1 件)

1) Okuda H, Ohdan H, Nakayama M, Koseki H, Nakagawa T, Ito T.

The USP21 short variant (USP21SV) lacking NES, located mostly in the nucleus in vivo activate transcription by deubiquitylating ubH2A in vitro.

PLOS ONE 8 (11) e79813 (2013) 査読有

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 武弥 (NAKAGAWA, Takeya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

助教

研究者番号: 5036502