

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650129

研究課題名(和文)精子形成減数分裂期染色体におけるSINE(B1F)RNAの機能解析

研究課題名(英文)A small non-coding RNA containing SINE/B1 motif functions in meiotic metaphase germ cells during spermatogenesis

研究代表者

野瀬 俊明(Nose, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70183902

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):ES細胞からのin vitro生殖細胞分化を解析する中で、誘導開始時に発現上昇する一つの非コードRNA(R53)を同定した。R53は約80塩基の最終RNA産物を生じ、その配列にはSINE-B1モチーフを含み、生体内発現は精巢の減数分裂M期相同染色体に局在するという極めて特異な特性を示した。その生理機能を調べるため、精巢器官培養に対してshRNAレンチベクターを用いたKnock-Down実験を行った結果、対照区には見られない顕著な精子細胞分化の阻害効果が確認された。この研究成果はSINE-B1 RNA転写物の非コードRNAが精子形成分化の制御に関わる機能を持つことを示す初めての実証例となった。

研究成果の概要(英文):Transcripts derived from a small subset of SINEs have been known to be expressed during spermatogenesis, whereas their functions remain unknown. We have identified a non-coding RNA, R53, which starts to express shortly after germ cell induction from ES cells in vitro. The mature product of R53 is ca. 80 base-RNA containing a SINE/B1 motif. Surprisingly, R53 RNA shows a unique accumulation on the pairing chromosomes in meiotic cells at the MI/II-meiotic stage.

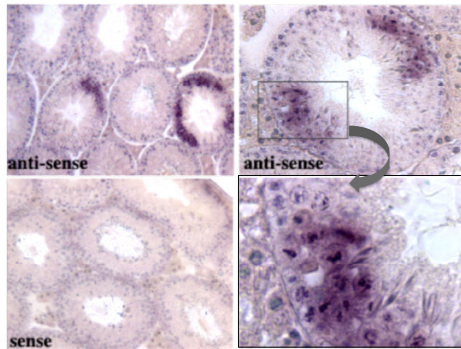
To know the function of R53 RNA, we examined knock-down effect on spermatogenesis by micro-injection of lenti-virus expressing R53 shRNA into testis tubules in an organ-culture. When testes of Acrosin-GFP tg mice were used as recipients and cultured for 2-3 weeks, differentiation of GFP-positive spermatids was significantly inhibited by R53 knock-down, suggesting that a specific SINE/B1-derived small RNA plays a critical role for regulating meiotic cell division and/or post-meiotic gene expression.

研究分野：発生生物学

キーワード：非コードRNA 精子形成 減数分裂

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは マウスES 細胞からの *in vitro* 生殖細胞分化系において分化初期に誘導依存的発現を示す遺伝子を差次選別する操作から、一つの新コード RNA由来cDNAを単離した。その生体内発現を確認べく *in situ* hybridization (ISH)を行ったところ、下図のように精巣の精子形成生殖細胞の減数分裂 M期細胞に局限した希有な発現特異性が見られた。このようなM期染色



体局在を示すRNA産物の特定には先例がなく、全く新たな事象の存在が示唆された。この非コードRNA (*R53*と命名)は配列内部にSINE/B1モチーフをコア配列に持つが、ISH検出がDNA反復配列への非特異的結合に依るものではないことは、*R53*センス鎖や他のB1配列をプローブにした対照実験ではこのような特異性は検出されないことから確認された。また、Northern blotによって*R53*最終転写産物はB1モチーフを含む約 90塩基であり、この*R53*コア配列をプローブとした場合にのみM期染色体局在性シグナルが検出されること、*R53*発現は成体組織では精巣特異的発現を示し、生後の精巣分化において減数分裂中期をピークとした分化段階特異的な変動を示すことが判明していた。

これまでもマウスSINE-B1反復配列(ヒトではAlu配列)が生殖腺特異的なエピゲノム制御や染色体構築の制御に関与する可能性があること、また一部のB1配列から精巣特異的な転写物が存在することは知られていた。しかし、実際にB1型RNAが機能を持つことを示した実例はなく、さらに減数分裂やM期染色体構造との関連を示す知見もなかった。これに対して、本研究が見出した*R53*RNAの発現挙動は、その機能が相同染色体の対合・分離などの精子形成分裂期の制御に関連することを強く示唆するものであった。よって、この*R53*RNAという特定されたRNA分子に注目し、その生理機能の解明を図ることが出来るならば、SINE型RNAが担うエピゲノム制

御機構という新たな研究領域を拓く突破口となることが期待された。

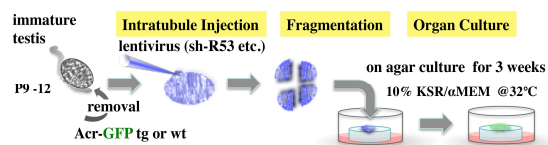
### 2. 研究の目的

本研究が対象とする*R53*RNAは、SINE-B1型反復配列に由来する非コードRNAに属するにも拘らず、その発現特異性やISHによって検出された局在性は極めて特異的であり、精子形成過程分裂期に起こる減数分裂期相同染色体の制御への関与が推定された。しかし一方、その機能解明に向けては、*R53*が反復配列に由来する遺伝子産物であり、small RNAが最終産物となること、さらに適切な培養細胞株が存在しない精子分化が解析対象となることなど大きな障害が予測された。本研究は、この難題に対処する手段として近年開発された*in vitro* 生殖細胞分化系や*in vitro* 精子形成培養系を適用することに挑戦した。これによって、*R53*RNAの生理機能の検証を行い、SINE配列由来RNAと減数分裂染色体動態における新たな分子制御メカニズムの解明を図ることを本計画の目的とした。

### 3. 研究の方法

*R53*RNAの発現特異性から推定される精子形成減数分裂期を機能解析の対象とするため、以下の2つの方法を計画した。

1) 生体精巣への*R53*shDNA導入によるノックダウン(Knock -Down:KD)効果の検定。shDNAを組み込んだレンチウイルスを幼若精巣精細管に顕微注入した後、近年Satoらによって開発されたOn-Agar 器官培養(Sato *et al*, Nature, 2011)を用いて精子分化の進行を継続観察し、そのKD効果を分子レベルおよび免疫組織化学レベルからの検証を行う(下図参照)。



(2) 培養樹立株である精子幹細胞を用いてshDNA組換え体幹細胞を作製し、その精子幹細胞移植と器官培養による精子形成の再構築を行う。これによりKD効果の厳密な定量評価を可能にし、同時にKD阻害変異の分子的機序の解明に迫る。

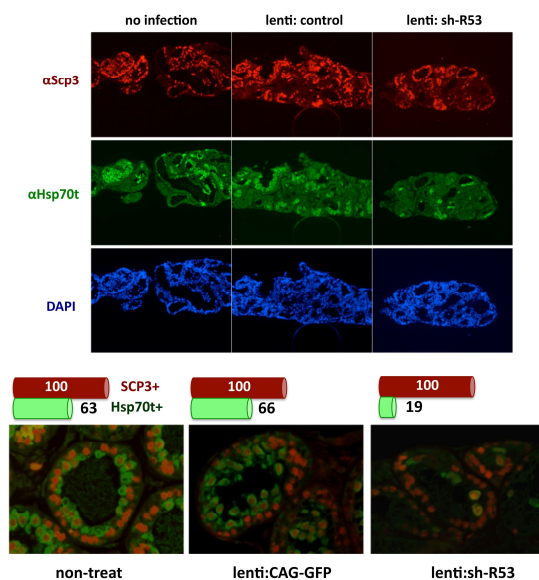
なお、予備実験において生体精細管への顕微注入によるレンチウイルス感染は、これまで遺伝子導入が困難とされた精子形成細胞に対して

高効率の遺伝子導入を可能にすることが判明していた。また、精巣断片の器官培養を用いることによって、蛍光蛋白質レポーター発現による分化進行の経時的観察が可能となること、複数の実験区を均質かつ同時進行で実施できることなど、この手法の利便性や応用性は高く、その実用性の実証は今後の *in vitro* 精子分化を対象とする遺伝子機能解析に有効な解析手法を提供するものと考えられた。

#### 4. 研究成果

(1) 幼若精巣断片の On Agar 器官培養系を用いて、R53shDNA を組み込んだレンチウイルスベクターを顕微注入することによる機能的 KD 解析を行った結果、R53-KD は器官培養後に起こる減数分裂から精子細胞への分化を阻害する効果を示した。下図に示すように、無処理および対照ベクター導入実験区との比較において、円形精子細胞分化期に相当する培養開始後 3 週目において、R53shRNA KD 精巣では HSP70t 抗体染色陽性の精子細胞の出現が劇的に減少することが判明した。

また、この *in vitro* 分化の遺伝子発現の



変動を解析するため、培養後 4 日目の RNA 試料について定量的 RT-PCR 解析を実施した結果、まず R53 KD 精巣断片で R53RNA 発現の減少（類縁の SINE-B1D 型 RNA には変化はない）が確認された。また、培養開始後 4 日目は減数分裂開始期に相当する発生段階（生後 14 日目）であるにも拘らず、対照群では低レベルに留まる複数種の精子核リモデリング遺伝子に異常な発現上昇が起きていることが判明した。これは R53 KD によってクロマ

チンリモデリング因子の同期的制御が破綻することによって、精母細胞の分裂異常もしくは精子細胞分化の阻害をもたらした可能性が考えられ、R53RNA の機能が減数分裂前期における精子細胞遺伝子群の抑制的制御に関与することを強く示唆する。

(2) SINE-B1 配列は互いに配列相同性が高い反復配列集団であることから、R53 RNA と同時期に発現する同族 RNA が存在した場合には、KD 実験における off-target 効果の可能性を厳密に排除することは難しい。この問題も視野に入れた上で R53 機能を検証し、さらに分子機序の解明を図るためには再現的に均質な培養細胞レベルでの解析が求められる。しかしながら、現状では精子形成期減数分裂を *in vitro* で再現するマウス培養細胞株は存在しない。そのため、生殖細胞系譜に由来し、潜在的に精子分化能を持つと考えられるマウス ES 細胞、EG(始原生殖細胞由来)細胞、GS(精子幹細胞由来)細胞の各培養細胞株を用いた機能解析の可能性を検討した。このため R53-senseRNA 前駆体および R53-antisense RNA を強制発現する遺伝子の導入を行った結果、いずれのマウス細胞株においても一過的な R53 sense/antisense 発現は見られるものの、薬剤選別に耐える恒常的発現細胞株を得ることはできなかった。このことから R53 強制発現がマウス生殖系列細胞の増殖もしくは生存に阻害的效果を及ぼす可能性が考えられた。一方、ヒト 293T 細胞に導入した場合には R53 sense/antisense の恒常的発現細胞株を得ることができ、その組換え体 293T 細胞において、R53 shRNA 導入による特異的 KD 効果が確認された。

以上、想定外の結果が得られたことによる一部計画の変更があったものの、研究計画全体の進捗は順調であったと言える。なお、本研究で使用した器官培養による精子分化系を遺伝子機能検定に用いるという新たな解析方法は、個体と培養細胞レベルの両方の優位性を併せ持つ利点があり、本研究が行った非コード RNA に限らず、生殖細胞分化における幅広いエピジェネティック機能の有効な解析手段となることが期待できる。

また、「SIN-B1 配列 RNA 産物が減数分裂 M 期染色体に作用し、特定の遺伝子発現抑制に機能する」という本研究の知見は、従来研究には見られない全く新たな small RNA(SINE 配列)機能を提起する成果であり、国際的な学術専門誌での発表に適うものとする。そのこともあって、当初目標としていた課題期間内での論文発表に至らなかったのは残念であるが、現在、本研究成果の論文投稿に向けた作業を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 中島 竜介, 野瀬 俊明ほか, “A small non-coding RNA containing SINE/B1 motif functions in meiotic metaphase germ cells during spermatogenesis.” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on “Germ Cells 2014” 2014 年 10 月 9 日, ニューヨーク (アメリカ合衆国)

(2) 中島 竜介, 野瀬 俊明ほか, “A small non-coding RNA containing SINE/B1 motif functions in meiotic metaphase germ cells during spermatogenesis.” 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野瀬 俊明 (Nose Toshiaki)

慶應義塾大学 (医学部) 共同研究員

研究者番号: 70183902

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 協力研究者

中島 龍介

慶應義塾大学 (医学部) 博士課程 4 年