

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20770145

研究課題名（和文）

受精時に精子から受精卵に伝達される転写産物の同定と機能解析

研究課題名（英文）

Identification and characterization of transcripts transmitted from sperm to oocyte

研究代表者

川野 光興 (KAWANO MITSUOKI)

独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発ユニット・研究員

研究者番号： 00455338

研究成果の概要（和文）：

次世代シーケンサーを用いた解析により、マウス精子において特異的に存在する小分子 RNA を 2 つ発見した。これらの小分子 RNA は約 20 塩基からなり、全体に渡って相同性が高く、5' 末端から 9 塩基目までは完全に配列が一致していた。これら小分子 RNA をマイクロインジェクションによりマウス受精卵の雄性前核に導入し、初期発生における細胞内局在の観察を行ったところ、胚盤胞期まで核に安定に局在することがわかった。さらに、変異型の RNA を作製し同様の実験を行ったところ、核局在に寄与する 8 塩基からなるモチーフ配列を見いだした。精子特異的小分子 RNA が、受精の際に精子から卵子へ伝達されるのか qPCR 法によって調べたところ、未受精卵においては検出されなかったが、受精卵において約 10 コピーの小分子 RNA が検出された。

研究成果の概要（英文）：

I report the discovery by deep sequencing technology of a suite of small noncoding RNAs in mature mouse sperm. Two of them were highly enriched in sperm and detectable exclusively in germ cells. Designated 'spR-12 and -13' for 'sperm RNAs'. After fertilization, they were maintained in low copy numbers in the egg and the dividing blastomeres. A strict nuclear localization was evidenced by microinjection of fluorescence-tagged RNAs into the male pronucleus of one-cell embryos. Stably maintained during the preimplantation period, they were equally distributed between blastomeres at cell division, remaining strictly localized in the nucleus until the blastocyst stage at which they were not detectable. A sequence motif UGGG(G)CGGG common to the two spRs was sufficient for nuclear addressing of unrelated small RNAs. A knock-down experiment performed by microinjection of the spR-12 and spR-13 complementary sequences linked to the nuclear addressing motif showed a deleterious effect suggestive of a functional role of the two RNAs in early embryogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：

精子 RNA、生殖細胞特異的小分子 RNA、世代伝達性 RNA、核局在モチーフ配列

## 1. 研究開始当初の背景

近年行われた大規模な cDNA 配列解析プロジェクトにより、タンパク質をコードしている mRNA の他に膨大な数の非コード RNA がゲノムの至る所から転写されていることが明らかとなった。また、mRNA の分解や翻訳抑制、ヘテロクロマチンの形成などに関わっている micro RNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA) などの機能性小分子 RNA が多くの動植物から見つかってきている。最近、複数のグループによって Piwi-interacting RNA (piRNA) とよばれる生殖細胞特異的に転写する小分子 RNA が同定された。これらの機能は不明であるが、転写部位の幾つかはヒトとマウスで保存されていることから、生殖細胞形成において何らかの役割を果たしていると考えられている。一方、成熟精子ではプロタミンタンパク質による非常に凝集したクロマチン構造のため転写や翻訳は行われておらず、その役割は受精の際に半数体ゲノムを卵細胞に伝達することだと考えられている。しかしここ数年のトランスクリプトーム解析により、ヒト精子中に様々な RNA が存在していることが明らかとなってきた。さらに昨年、54 種類の miRNA がマウス精子より同定された。これらの解析は精子中の転写産物の存在を明確にしたが、RNA の検出にマイクロアレイを用いたため、アレイ上にプローブが設計されている RNA しか検出できないことから、精子中には未同定の RNA が存在すると考えられる。今まで精子を用いた大規模な cDNA 配列解析はなされていない。ところで、ヒト精子由来の RNA が受精時に卵細胞に伝達されることがハムスターテストによって示された。また最近、野生型とヘテロ変異型の親から産まれたマウスにおいて遺伝子型は野生型にもかかわらず変異型の表現型が現れ、その表現型が次世代の野生型マウスにも遺伝するという現象が報告された。詳細な解析から、親から伝達された RNA がこの現象の原因ではないかという仮説が立てられている。これらのことから、精子内にある RNA のなかには単に精子形成の際に転写された RNA の残存だけではなく、生理機能をもって存在しているものもあると予想される。

## 2. 研究の目的

マウス精巣と精子中に存在する小分子 RNA の網羅的同定を塩基配列決定により行う。これらのデータは、RNA が遺伝物質であるという仮説の上に立った候補 RNA を探索する基礎データになりうる。これらのデータから、新規の機能性小分子 RNA 分子を探索する。さらに、受精時に精子から受精卵に伝達される転写産物を同定し、その転写産物の機能を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いて、マウス精巣と精子の小分子 RNA のライブラリーを作成し、塩基配列を決定する。精子特異的小分子 RNA をマイクロインジェクションにより生殖細胞に導入し、それらの細胞内局在を解析する。精子特異的 RNA の卵子への伝達を qPCR 法により調べる。

## 4. 研究成果

次世代シーケンサーを用いた解析により、マウス精子において特異的に存在する小分子 RNA を 2 つ発見した。これらの小分子 RNA は約 20 塩基からなり、全体に渡って相同性が高く、5'末端から 9 塩基目までは完全に配列が一致していた。それらは piRNA クラスター内にコードされており、その周辺の転写の状況から piRNA 前駆体 RNA 由来の小分子 RNA と推測された。これら小分子 RNA の末端に蛍光標識を連結して、マイクロインジェクションによりマウス受精卵の雄性前核に導入し、初期発生における細胞内局在の観察を行った。その結果、これら小分子 RNA は胚盤胞期まで核に安定に局在することがわかった。さらに、変異型の RNA を作製し同様の実験を行ったところ、核局在に寄与する 8 塩基からなるモチーフ配列を見いだした。これら小分子 RNA に特異的に結合するタンパク質の同定を共免疫沈降法によって試みたところ、RNA 結合タンパク質を含む複数のタンパク質が結合しうることが示唆された。この精子特異的小分子 RNA が、受精の際に精子から卵子へ伝達されるのか qPCR 法によって調べたところ、未受精卵においては検出されなかったが、受精卵において約 10 コピーの小分子 RNA が検出された。精子特異的小分子 RNA が高発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、コントロールと比べて有意に成長の遅い小型マウスが現れた。

## 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 4 件)

- ① Shinohara, Y., Yahagi, K., Kawano, M., Nishiyori, H., Kawazu, C., Suzuki, N., Manabe, R., and Hirase, H. miRNA profiling of bilateral rat hippocampal CA3 by deep sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 293-298 (2011) 査読有り
- ② Kawano, M., Kawazu, C., Lizio, M., Kawaji, H., Carninci, P., Suzuki, H., and Hayashizaki, Y. Reduction of non-insert sequence reads by “dimer eliminator” LNA oligonucleotide for small RNA deep sequencing. *Biotechniques.* 49(4), 751-755 (2010) 査読有り
- ③ Kawano, M., Kawazu, C., Lizio, M., Kawaji, H., Carninci, P., Suzuki, H., and Hayashizaki, Y. Efficient small RNA library preparation protocol. *Biotechniques Protocol Guide 2011.* 4-6 (2010) 査読無し
- ④ de Hoon, M. J., Taft, R. J., Hashimoto, T., Kanamori-Katayama, M., Kawaji, H., Kawano, M., Kishima, M., Lassmann, T., Faulkner, J., Mattick, J. S., Daub, C. O., Carninci, P., Kawai, J., Suzuki, H., and Hayashizaki, Y. Cross-mapping and the identification of editing sites in mature microRNAs in high-throughput sequencing libraries. *Genome Res.* 20 (2), 257-264 (2010) 査読有り

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 川野光興、河津知佳、リッチオ・マリーナ、川路英哉、甲斐田薫、荒川貴博、カルニンチ・ピエロ、鈴木治和、林崎良英  
Reduction of non-insert sequence reads by

LNA oligonucleotide for small RNA deep sequencing

- 第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)  
神戸、2010 年 12 月 7-10 日
- ② 川野光興、河津知佳 (発表者)、リッチオ・マリーナ、川路英哉、林崎良英  
次世代小分子 RNA ネットワーク研究基盤の開発  
第 32 回日本分子生物学会年会  
横浜、2009 年 12 月 9-12 日
  - ③ 川野光興、ラソールザデガン・ミノー、川路英哉、林崎良英  
マウス初期胚の核に局在する精子特異的マイクロ RNA 様小分子 RNA  
第 32 回日本分子生物学会年会  
横浜、2009 年 12 月 9-12 日
  - ④ 川野光興、ラソールザデガン・ミノー、川路英哉、林崎良英  
マウス初期胚の核に局在する精子特異的 miRNA-like small RNA  
第 11 回日本 RNA 学会年会  
新潟、2009 年 7 月 27-29 日
  - ⑤ 川野光興、川路英哉、林崎良英  
世代を越えて機能する RNA の同定に向けて  
第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)  
神戸、2008 年 12 月 9-12 日
  - ⑥ 川野光興、川路英哉、林崎良英  
精子中の RNA: 世代を越えて機能する RNA の同定に向けて  
第 10 回日本 RNA 学会年会  
札幌、2008 年 7 月 23-25 日

⑦ Ma Kawano, M., Kawaji, H., Hasegawa, A., Severin, J., Sano, H., and Hayashizaki, Y.  
RNA in sperm: Towards an identification of RNAs transmitting genetic information to zygote.  
Joint 7th Human Genome Organization (HUGO)-Pacific Meeting and the 8th Asia-Pacific Conference on Human Genetics, Symposium: Transmissible Nucleic Acids,  
April 2-5, 2008, Cebu, Philippines

⑧ Kawano, M., Hasegawa, A., Sano, H., Kawaji, H., Severin, J., Lassmann, T., and Hayashizaki, Y.  
RNA in sperm: Towards an identification of RNAs transmitted from sperm to zygote on fertilization.  
Miami Winter Symposium Regulatory RNA in Biology and Human Health,  
February 2-6, 2008, Miami, USA

[その他]  
ホームページ等  
[http://genome.gsc.riken.jp/osc/members/Mitsuoki\\_Kawano.html](http://genome.gsc.riken.jp/osc/members/Mitsuoki_Kawano.html)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
川野 光興 (KAWANO MITSUOKI)  
独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発ユニット・研究員  
00455338