

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24380158
研究課題名(和文) 偽遺伝子挿入による種特異的非コードRNA獲得に基づく遺伝子スイッチ制御の多様化

研究課題名(英文) Diversification of gene activation system by acquisition of species-specific non-coding RNAs through insertion/deletion and mutation

研究代表者
今村 拓也 (IMAMURA, TAKUYA)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90390682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：非タンパク質コードRNA(ncRNA)獲得と機能化が近傍遺伝子の発現スイッチを多様化する、という仮説を検証した。ほ乳類5種(チンパンジー・マカクザル・マーモセット・マウス・ラット)の5組織を用いた比較トランスクリプトーム・エピゲノム解析から、pancRNAと命名した遺伝子プロモーター近傍から発現する機能ncRNAの新種を4000以上発見し、遺伝子活性化に働くこと及びそのDNA配列上の特徴を明らかにした。種にしたがった固有のpancRNAレパートリーが存在し、それらが共通して遺伝子活性化機構を駆動することで、種特異的な遺伝子発現制御ネットワークが実現していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We performed directional RNA-seq analysis of mouse and chimpanzee tissue samples. Focusing on transcription start sites (TSSs) of protein-coding genes revealed that a significant fraction of them contain switching-points that separate antisense- and sense-biased transcription, suggesting that head-to-head transcription is more prevalent than previously thought. More than 90% of head-to-head type promoters contain CpG islands. Moreover, CCG and CGG repeats are significantly enriched in the upstream regions and downstream regions, respectively, of TSSs located in head-to-head type promoters. Genes with tissue-specific promoter-associated ncRNAs (pancRNAs) show a positive correlation between the expression of their pancRNA and mRNA, which is in accord with the proposed role of pancRNA in facultative gene activation, whereas genes with constitutive expression generally lack pancRNAs. We show here that pancRNA regulates tissue-specific gene expression in a species-dependent manner.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ノンコーディングRNA DNAメチル化 DNA脱メチル化 遺伝子活性化 生物多様性

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類における種間多様性の理解には、複数の遺伝子発現に影響をあたえるような転写因子の違いだけでなく、各遺伝子座の発現制御の違いに着目することが必須である。タンパク質をコードする領域と異なり、遺伝子発現制御領域では DNA 配列レベルの種間多様性が高いことから、例えば、プロモーターから転写され配列特異的に転写活性化を引き起こす長鎖 non-codingRNA (ncRNA) である promoter-associated ncRNA (pancRNA) の発現は、種間で多様である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究は、脳の動物種間多様性成立機構を解き明かすため、比較トランスクリプトーム解析を用いて、機能的 ncRNA クラスである pancRNA による遺伝子発現制御がさまざまなほ乳類種にわたって見られるのか (敷衍性) と、pancRNA レポートリーが種によって異なるのか (種間多様性)、という2つの問いを解くこととした。これにより、非タンパク質コード RNA (ncRNA) 獲得と機能が近傍遺伝子の発現スイッチを多様化する、という独自の実験的知見が、実際にほ乳類種分化に機能してきたのか、を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 第二世代シーケンサーを用いた directional RNA-seq により、マウス pancRNA を網羅的に取得し、mRNA 発現上昇をもたらすメカニズムについて、バイオインフォマティクスを駆使することにより、その一般則を導き出すことを試みた。

2) チンパンジー・マカクザルを含む5種のほ乳類について、比較エピゲノム解析と比較トランスクリプトーム解析を統合することにより、動物種を超えてあるいは動物種ごとに異なって、pancRNA による遺伝子発現活性化をもたらす制御構造が存在するのか、を明らかにすることを試みた。

3) 動物組織サンプルを用いて、pancRNA 発現レベルを操作することにより、種に依存して発現する pancRNA には確かに機能性があるのかを検定した。

4. 研究成果

マウスにおけるトランスクリプトーム解析から、pancRNA がゲノムワイドに存在することが示唆された。また、pancRNA は組織特異的な発現を示すことも分かった。さらに pancRNA が転写される領域は CpG アイランドと重なっており、特に CCG 反復配列が頻出するという DNA 配列の特徴を明らかにし、このことから GC 含量の高い領域から pancRNA は発現していることが示唆された (図1)。各

論を以下に述べると：

i) 4000以上の遺伝子の pancRNA を神経細胞を含む様々な細胞・組織に発見した。この際、ハウスキーピング遺伝子と呼ばれ、細胞系譜を規定しない遺伝子群には pancRNA が全く存在しないことも明らかになった。

ii) いわゆる長鎖 ncRNA は一本鎖 RNA として機能しているものが支配的であり、pancRNA 発現は直下に位置する遺伝子発現と正に相関していた (Uesaka et al., 2014)。

iii) 高い発現を示した遺伝子のプロモーター領域から転写される pancRNA について機能解析を進め、pancRNA が発現している胚や細胞では、対応するプロモーターの CG 配列が低メチル化状態にあり、pancRNA をノックダウンしたところ、逆にプロモーター領域が高メチル化された。例えば、初期発生において pancRNA をターゲティングした場合、胚発生が8細胞-桑実胚期において停止するものもあった (Hamazaki et al., 2015)

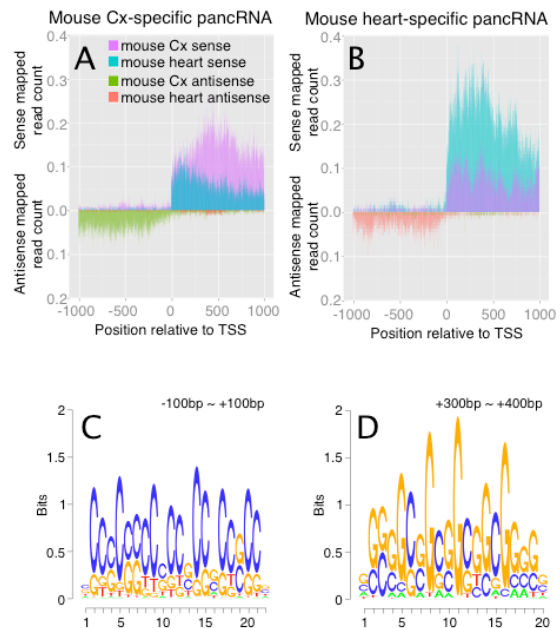


図1 pancRNA を有する遺伝子の特徴

図1は第二世代シーケンサーによる Directional RNA-Seq トランスクリプトームデータのまとめである。AとBではそれぞれ成熟大脳あるいは心臓特異的 pancRNA をもつ遺伝子群についてその発現量の総和を転写開始点を原点として重ね合わせたパネルであり、Y軸は転写方向 (+がセンス、-がアンチセンス) を表している。Aの場合、第三象限の緑色が脳特異的 pancRNA を示しており、これが存在する場合に、下流遺伝子の発現 (桃色) が心臓 (青色) に比べて2倍以上に上昇していることが分かる。パネルCとDで

は、このような特異的 pancRNA をもつ転写制御領域におけるコンセンサ配列を調べた結果を示しているが、pancRNA の鋳型がシトシンリッチであり (パネル C)、反対に下流遺伝子はグアニンリッチであることが明らかになったのである (パネル D)。したがって、GC リッチな CpG アイランドは、さらにその配列のグアニンとシトシンのバイアスの程度が細胞特異的 DNA 脱メチル化/遺伝子の転写上昇に極めて大事であり、ここに pancRNA 独自の機能的意義「細胞特異的遺伝子発現のファインチューニング」が強く浮かび上がってきたのである。

以上の解析から明らかになった pancRNA の特徴は、マウスだけでなくチンパンジーにおいても見られ、pancRNA による遺伝子発現制御機構はほ乳類種間で共通であることが示唆された。

さらに、pancRNA の発現様式の共通性と生物多様性の特徴を調べるために、ほ乳類 5 種の 5 組織を用いた比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、pancRNA は発現プロファイルと塩基配列の点で生物多様性が高いということ、pancRNA を持つ遺伝子は組織特異的な発現を示す傾向にあること、数百の生物種特異的 pancRNA が存在しているということが明らかになった。

また、マウス大脳皮質特異的発現を示す pancRNA の機能解析から、実際に種特異的 pancRNA が遺伝子発現制御に寄与し、表現型発現に結びついていることを示した。例えば、大脳においてげっ歯類にのみ認められた Sh3rf3 と Vwa5b2 遺伝子の pancRNA (pancSh3rf3、pancVwa5b2) については、pancSh3rf3 が神経幹細胞におけるニューロン分化の促進に寄与すること、反対に pancVwa5b2 が神経幹細胞におけるニューロン分化の抑制し、またアストロサイト分化の促進にも関与していること、を発見した。

以上より、動物種毎にそれぞれ特異的な pancRNA レポートリーが存在し、それらが共通の遺伝子発現活性化機構を駆動することで、種にしたがった遺伝子発現制御ネットワークを作り出している、という種間多様性発現機構が進化の過程で機能してきたことを提唱する。

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 5 件)

Junko Tomikawa, Yoshihisa Uenoyama, Makiko Ozawa, Tatsuya Fukanuma, Kenji Takase, Teppei Goto, Hitomi Abe, Nahoko Ieda, Shiori Minabe, Chikaya Deura, Naoko

Inoue, Makoto Sanbo, Koichi Tomita, Masumi Hirabayashi, Satoshi Tanaka, Takuya Imamura, Hiroaki Okamura, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura.

Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain.

Proc Natl Acad Sci USA, 109:E1294 (2012)
doi: 10.1073/pnas.1114245109

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Yasuhiro Go, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura

Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals

BMC Genomics 15:35 (2014)
10.1186/1471-2164-15-35

Takuya Imamura, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima

Epigenetic setting and reprogramming for neural cell fate determination and differentiation.

Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, 369:1652 (2014)

doi: 10.1098/rstb.2013.0511

Teppei Goto, Junko Tomikawa, Kana Ikegami, Shiori Minabe, Hitomi Abe, Tatsuya Fukanuma, Takuya Imamura, Kenji Takase, Makoto Sanbo, Koichi Tomita, Masumi Hirabayashi, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura, Yoshihisa Uenoyama.

Identification of hypothalamic arcuate nucleus-specific enhancer region of kiss1 gene in mice.

Molecular Endocrinology, 29:121 (2015)
doi: 10.1210/me.2014-1289

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura

Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development.

Development 142:910 (2015)
doi: 10.1242/dev.116996

[学会発表] (計 20 件)

浜崎伸彦、今村拓也

マウス初期胚における卵活性化刺激依存性非コード RNA 発現による遺伝子プロモーターの脱メチル化

第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会

2012 年 5 月 15 日

学術総合センター (東京都千代田区)

上坂将弘、西村理、宇野健一郎、上田泰己、

大石高生、今井啓雄、阿形清和、今村拓也
マカクザル特異的偽遺伝子挿入に由来する
非コード RNA による遺伝子プロモーターの
DNA 脱メチル化
第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会
2012年5月15日
学術総合センター（東京都千代田区）

Nobuhiko Hamazaki, Takuya Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs
mediate oocyte-activation-induced CpG and
non-CpG demethylation in the early mouse
embryo
第 45 回日本発生生物学会年会
2012年5月29日
神戸国際会議場（神戸市）

浜崎伸彦、今村拓也
遺伝子プロモーター非コード RNA はマウス人
為活性化胚の CG/非CG 配列の脱メチル化を仲
介することで異常 DNA メチル化パターン形成
に關与する
第 105 回日本繁殖生物学会大会
2012年9月6日
筑波大学（つくば市）

Takuya Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs for
the sequence-specific epigenetic
alterations during mammalian development
The 1st Hungarian Epigenetics Meeting
2012年9月20日
Semmelweis Egyetem, NET (Budapest,
Hungary)

上坂将弘、西村理、大石 高生、今井啓雄、
阿形 清和、今村 拓也
マカクザル特異的偽遺伝子挿入に由来する
非コード RNA による遺伝子プロモーターの
DNA 脱メチル化
2012年12月12日
福岡国際会議場（福岡市）

浜崎伸彦、今村拓也
マウス初期発生胚においてプロモーターノ
ンコーディング RNA は卵活性化刺激に応答し
て CG と非 CG 配列の脱メチル化を仲介する
第 35 回日本分子生物学会年会
2012年12月14日
福岡国際会議場（福岡市）

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka,
Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya
Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs
mediate gene-specific DNA demethylation
for mouse preimplantation development
第 7 回エピジェネティクス研究会年会

2013年5月30日
奈良県新公会堂（奈良市）

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Kinichi
Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura
プロモーターノンコーディング RNA によ
るほ乳類エピゲノム形成
Mammalian epigenome formation mediated by
promoter-associated noncoding RNA
第 7 回エピジェネティクス研究会年会
2013年5月30日
奈良県新公会堂（奈良市）

Takuya Imamura
Epigenome formation in the mammalian brain
mediated by promoter-associated noncoding
RNA
Neuro2013
2013年6月21日
国立京都国際会館（京都市）

上坂将弘、西村理、郷康広、中島欽一、阿形
清和、今村拓也
霊長類特異的偽遺伝子挿入に由来する非コ
ード RNA による遺伝子プロモーターの DNA 脱
メチル化
第三回 NGS 現場の会
2013年9月4日
神戸国際会議場（神戸市）

山本直樹、今村拓也
PC12 細胞を用いた不可逆的神経細胞分化制
御に關わる RNA の発現動態解析
第三回 NGS 現場の会
2013年9月4日
神戸国際会議場（神戸市）

上坂将弘、西村理、郷康広、中島欽一、阿形
清和、今村拓也
ノンコーディング RNA 群による遺伝子活性化
と大脳皮質における多様化
第七回神経発生討論会
2014年3月13日
大阪大学（吹田市）

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka,
Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya
Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs
mediate gene-specific DNA demethylation
for mouse preimplantation development
第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会
2014年5月26日
伊藤国際学術研究センター（東京都文京区）

山本直樹、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、
今村拓也
PC12 細胞分化過程におけるエピジェネティ
ック制御に關わる promoter-associated
noncoding RNA の機能

第8回日本エピジェネティクス研究会年会
2014年5月26日
伊藤国際学術研究センター（東京都文京区）

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura
Potential role for species-specific promoter-associated non-coding RNAs in the diversification of mammalian brain
第47回日本発生生物学会年会
2014年5月27日
ウイックあいち（名古屋市）

濱崎伸彦, 上坂将弘, 中島欽一, 阿形清和, 今村拓也
マウス初期胚の全能性を支える遺伝子を活性化するノンコーディング RNA の同定
第107回日本繁殖生物学会大会
2014年8月21日
帯広畜産大学（帯広市）

今村拓也
長鎖 ncRNA によるほ乳類エピゲノム制御
第157回日本獣医学会学術集会
2014年9月11日
北海道大学高等教育推進機構（札幌市）

Naoki Yamamoto, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura
Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells
第8回神経発生討論会
2015年3月19日
九州大学病院キャンパス（福岡市）

Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura
Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile
第8回神経発生討論会
2015年3月19日
九州大学病院キャンパス（福岡市）

〔図書〕（計2件）
今村拓也（分担）
脳の性差から生物多様性へ
「生き物たちのつづれ織り」阿形清和, 森哲（監修） ISBN978-4-87698-243-1 下巻 pp. 90-100, 京都大学学術出版会（2012）

Naoki Yamamoto, Masahiro Uesaka, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima（分担）
Roles of Epigenetics in the Neural Stem Cell and Neuron.
In: J. Peedicayil, D. Grayson, D. Avramopoulos (eds), ISBN 9780124171145

Epigenetics in Psychiatry, Elsevier, Amsterdam, (2014)

〔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〕
九州大学プレスリリース
特定遺伝子のスイッチ ON/OFF を制御するノンコーディング RNA の新種「pancRNA」を発見！
http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/2015/2015_02_05.pdf

研究代表者ホームページ
<http://www.scb.med.kyushu-u.ac.jp/imamura>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
今村 拓也 (IMAMURA, TAKUYA)

研究者番号：90390682

(2) 研究分担者
該当者なし（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者
該当者なし（ ）

研究者番号：