

令和元年6月10日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26113006

研究課題名(和文) 高次神経機能制御に関わるncRNA機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of noncoding RNAs in nervous systems

研究代表者

影山 裕二 (Kageyama, Yuji)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：90335480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 81,500,000円

研究成果の概要(和文)：トランスクリプトーム解析により、真核生物には多くの長鎖ノンコーディングRNA (long noncoding RNA, lncRNA) が存在することが明らかにされている。これらlncRNAのほとんどは機能未知のRNA分子であり、その体系的な理解はほとんど進んでいない。本研究では、中枢神経において機能するlncRNAのモデル系として、ショウジョウバエLOL RNAの機能解析を行い、LOL RNAがキノコ体ニューロンの軸索誘導に必須因子であること、軸索誘導に関わる多くの遺伝子の発現制御に関与していることを示した。また、Polycomb遺伝子群がlolと強い遺伝学的相互作用を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lobe-less (LOL) RNAはショウジョウバエの中枢神経系に発現する長鎖ノンコーディングRNAであり、LOL RNAを欠損した変異体では、行動や記憶を司る脳内中枢であるキノコ体の部分欠損が起こることが知られている。本研究ではlol変異体の詳細な解析を行い、lol変異体の表現型がキノコ体神経細胞の軸索誘導の異常に起因するものであること、実際にlol変異体では多数の軸索誘導関連遺伝子の発現に異常が見られることを示した。これらの結果は、LOL RNAのみならず、多数見つかった他の神経系特異的長鎖ノンコーディングRNAもまた神経発生において重要な機能を担っていることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)： Transcriptome studies in eukaryotes have uncovered a large number of long noncoding RNAs (lncRNAs) in their genomes. Physiological and biochemical roles of these lncRNAs are enigmatic, and thereby comprehensive understandings of lncRNA function is far away from the goal. In current study, we chose *Drosophila* Lobe-less (LOL) RNA as a model, which is specifically expressed in proliferating neuroblasts during embryogenesis. Using various nerve cell specific cell markers, we found that the lol gene is essential for axon guidance of mushroom body neurons. Transcriptome analysis with a high-throughput sequencer showed that lol regulates many genes including neurogenesis- and axon-guidance specific genes in. We also found lol genetically interacts with Polycomb Group (Pc-G) genes, suggesting that lol functions as chromatin modifiers, consistent with its nuclear localization.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ノンコーディングRNA ショウジョウバエ 中枢神経系 軸索誘導 PRC複合体 lncRNA 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

トランスクリプトーム解析により、ヒトでは約 9,600、マウスでは 5,500、ショウジョウバエでは約 5,000 個の長鎖ノンコーディング RNA (long noncoding RNA: lncRNA) が存在することが明らかにされている。これらの lncRNA のほとんどは機能未知の RNA 分子であり、現在でもその体系的な理解はほとんど進んでいない。特に、多数報告されている神経系特異的な lncRNA については、神経活動と密接な関係にある可能性が指摘されているものの、ほとんどは解析されないまま手つかずと言ってよい状態にあった。

LOL RNA は、胚発生期の未分化な神経芽細胞に特異的に発現する lncRNA として単離されたが、その後の変異体の解析により、昆虫の行動や記憶を司る脳内中枢であるキノコ体の発生に必須であることが明らかにされている。このことから、LOL RNA の生理学的・分子生物学的解析を行い、その詳細を明らかにすることにより、神経系特異的な lncRNA の理解が進むと期待された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、中枢神経系に発現する lncRNA のモデルとしてショウジョウバエ LOL RNA に着目し、その変異体の詳細な解析を行うことで、中枢神経系で機能する RNA の「作動エレメント」を同定し、高次神経機能を制御する ncRNA タクソンを確立することにある。

## 3. 研究の方法

本研究では、*lol* 変異系統における表現型を各種神経細胞特異的細胞マーカーを用いて解析した。キノコ体ニューロンの細胞形態については、遺伝学的に 1 細胞標識を行い、共焦点顕微鏡で得た画像データから三次元構築を行い解析した。また、*lol* 変異系統のトランスクリプトーム解析を行い、LOL RNA により発現の変動する遺伝子群を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) *lol* 変異体の細胞学的解析

LOL RNA は、胚発生期の未分化な神経芽細胞に特異的に発現する lncRNA として単離されたが、その後の変異体の解析により、*lol* 変異体では昆虫の行動や記憶を司る脳内中枢であるキノコ体の部分欠損（垂直方向の神経叢の欠損）が起こることが示されている。この表現型が、発生過程のどのような異常に起因するものであるかを明らかにするため、胚発生後期から蛹期にかけて、体細胞組換えによる 1 細胞標識を行った。キノコ体ニューロンは、胚発生後期において軸索が分岐し、それぞれ水平方向（内側）と垂直方向（背側）に軸索を伸長させることが知られているが、*lol* 変異体では二分岐した軸索はいずれも水平方向にのみ軸索が伸長し、この異常はニューロンの分化時期に関わらず常に観察された。したがって、*lol* 表現型は、キノコ体神経細胞の軸索誘導の異常に起因するものであると結論づけられた。

### (2) *lol* と遺伝学相互作用を示す遺伝子の同定

脚成虫原基の形態形成を指標に、*lol* 遺伝子とクロマチン再構成複合体 PRC1 のサブユニットをコードする遺伝子との相互作用を解析し、*Polycomb* および *Posterior sex combs* 遺伝子を同定した。*Polycomb* あるいは *Posterior sex combs* 遺伝子の単独の変異のみを持つ個体は、中脚から前脚への穏やかなホメオティックトランスフォーメーションが観察されるが、その遺伝学的浸透度は 10% 以下である。また、*lol* 変異のみを持つ個体は中脚に異常を示さない。一方、*lol* と上記遺伝子の二重変異体においては、ほぼ完全な中脚のトランスフォーメーションが起こり、

遺伝学的浸透度も 5%まで上昇した。これらの結果は LOL RNA と PRC1 が遺伝学的に強く相互作用していると解釈され、これらの因子が細胞内で協調的に働いていることを強く示唆するものである。

LOL RNA が強く発現している発生中期の胚を用い、LOL RNA に対する蛍光 in situ ハイブリダイゼーションのシグナルを超解像顕微鏡により観察したところ、LOL RNA が核内に特異的に局在しており、核内では多数のドット上の構造を形成していることが明らかになった。また、LOL RNA に対する in situ ハイブリダイゼーションと抗 Polycomb 抗体を用いた免疫染色を同時に行ったところ、それぞれのシグナルは全く重ならず、LOL RNA は Polycomb タンパク質のシグナル周辺にやや多い傾向が認められた。したがって、上記の遺伝学的相互作用は物理的な相互作用の結果ではなく、両者の標的遺伝子の一部が共通であるか、あるいは標的遺伝子間の協調的作用による間接的なものと解釈された。

### (3) lol 変異系統のトランスクリプトーム解析

野生型および lol 変異系統の、胚発生中期、胚発生後期、1 令幼虫、雌雄成虫頭部より、それぞれ RNA を調製して cDNA ライブラリーを作成し、各 1000 万リード以上の塩基配列を得た。野生型と lol 変異系統との比較では、lol 遺伝子が強く発現する胚発生中期において、最も顕著な遺伝子発現の違いが見られ、約 7,000 個の遺伝子について有意な変動があった。また、これらの発現変動を示す遺伝子 (differentially expressed genes: DEG) のうち、2 倍以上の発現変動があったものは約 2,000 個であった。上記 DEG のオントロジー解析を行ったところ、特に神経発生 (neurogenesis) に関わる遺伝子群が最も多く変動しており、中期胚発生において lol 変異体で発現が下がるものが 173 個、lol 変異体で発現が上がるものが 120 個あった。また、軸索形成に関わるものが 120 個あり、これらは軸索の反発に関わる Ephrin/Eph、Semaphorin/Plexin、Robo/Slit シグナル経路のリガンド及び受容体の両方を含んでいた。

### (4) LOL RNA の機能ドメインの同定

ショウジョウバエ近縁種のゲノム配列の比較により、系統学的に非常に近い種においては lobe-less 遺伝子と思われる保存性の高い領域が存在するものの、通常のタンパク質遺伝子に比べると非常に進化速度が速いことが明らかとなった。また、特に保存性の高い領域 (conserved region : CR) が 5 箇所存在し、それ以外の領域の保存性が極めて低いことが明らかとなった。また、CR 領域はショウジョウバエ属のみに見られることから、Lobe-less RNA がタクソン特異的な機能を担っている可能性が考えられた。そこで上記の CR 領域について、5 箇所の領域のみを含むトランスジーン (*lol-CR*) および 5 箇所全てを欠損しているトランスジーン (*lol- CR*) を発現する系統を作成して lol 変異系統に導入し、表現型の回復を指標とした解析を行ったところ、*lol-CR* にはほとんど活性が見られず、また *lol- CR* は野生型 *lol* 全長を含むトランスジーン (*lol-FL*) と同等の活性を保持していた。これらの結果から、*lol* の遺伝子活性には少なくとも CR 領域のみでは不十分であることが明らかになった。次に *lol* 遺伝子の転写領域を約 1 kb の 4 つの領域に分断し、それぞれの領域を欠損したトランスジーン (*lol- 1~ 4*) を作成して同様の解析を行ったところ、*lol- 2* のみが遺伝子活性の減少を示した。今後はこの領域について詳細な解析を行うことにより、LOL RNA の活性を担う作動エレメントを同定することが可能になると期待される。本研究では *lol-CR* トランスジーンに遺伝子活性は認められなかったが、CR 領域の高い保存性に鑑みると、CR 領域に加え *lol- 2* で欠損した領域の両方が存在することでタクソン特異的な機能を発揮している可能性も考えられる。

### (5) lol 遺伝子座と重複する CG9650 遺伝子との遺伝学的相互作用の解析

CRIPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて、*lol* プロモーター領域を欠いたノックアウト系統を計 4 種作成した。また、4.25 kb の *lol* 被転写領域を含む、5.4 kb あるいは 10.5 kb のゲノム領域を欠失させ、その代わりに *Pax6* エンハンサー下で RFP ORF を発現するノックイン

系統を作成した。これらのノックアウトおよびノックイン系統は、LOL RNA を発現しないにもかかわらず、約 2 割の個体が弱い表現型を示すのみであり、*lol* 欠失系統 (*lol* を含む約 30 kb のゲノム領域の欠失) の表現型は、*lol* 遺伝子座の近傍の領域にも原因があると考えられた。上記の欠失では、*lol* と重複して存在する *CG9650* 遺伝子の一部 (母性アイソフォームの第 1 エクソン) が失われていることから、CRISPR-Cas9 技術を用いて *CG9650* ノックアウト系統を作成した。その結果、*CG9650* ノックアウト系統 (母性アイソフォームを含む全てのアイソフォームに共通するエクソンの欠失系統) は劣勢致死性を示した。興味深いことに、*CG9650* と *lol* 欠失染色体とをヘテロに持つ個体 (*lol* +/+ *CG9650*) では、約 8 割の個体で *lol* 表現型が観察された。これらの結果から、*lol* 欠失系統の表現型は、*lol* のすぐ近傍にある *CG9650* との遺伝学的相互作用が大きな原因の一つになっていると考えられた。一方、*lol* 欠失系統の表現型は *lol* の過剰発現によりほぼ完全に回復することから、*lol* 領域は *CG9650* の *cis* 配列 (エンハンサー) として機能するのではなく、*trans* 因子として作用していると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

① Jérôme Bohère, Alexandra Mancheno-Ferris, Sandy Al Hayek, Jennifer Zanet, Philippe Valenti, Kohsuke Akino, Yuya Yamabe, Sachi Inagaki, Héléne Chanut-Delalande, Serge Plaza, Yuji Kageyama, Dani Osman, Cédric Polesello and François Payre (2018)

Shavenbaby and Yorkie mediate Hippo signaling to protect adult stem cells from apoptosis

*Nat. Commun.* 9, 5123. DOI: 10.1038/s41467-018-07569-0

② Héléne Chanut-Delalande\*, Hashimoto, Y.\*, Pelissier-Monier, A., Spokony, R., Dib, A., Kondo, T., Bohere, J., Niimi, K., Latapie, Y., Inagaki, S., Dubois, L., Valenti, P., Polesello, C., Kobayashi, S., Moussian, B., White, K.P., Plaza, S., Kageyama, Y.\* and Payre, F.\* (2014)

Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development.

*Nat. Cell Biol.* 16: 1035-1044.

[学会発表](計 21 件)

21 件のうち、招待講演のみを以下に示す。

影山裕二、平雄樹

マイクロペプチドによるショウジョウバエ胚発生の制御

第 18 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「拡大する蛋白質の世界：Anfinsen のドグマを超えて」、新潟、平成 30 年 6 月 28 日

影山裕二

ゲノムの舞台袖に控える役者たち：ノンコーディング RNA とマイクロペプチド

第 23 回山形分子生物学セミナー、山形、平成 27 年 12 月 21 日

影山裕二

coding vs noncoding

第 20 回分生研シンポジウム、東京、平成 27 年 10 月 28 日

稲垣幸、影山裕二

Lobe-less RNA is essential for mushroom body in *Drosophila* brain and genetically interacts with

*Polycomb Group* genes.

第2回兵庫県立大学ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム、上郡、平成26年10月9-10日

〔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:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/faculty/kageyama.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 稲垣幸、中村奈月、吉田雄生、濱田悠生、山部拓也、中野美幸、平雄樹

ローマ字氏名: Sachi Inagaki, Natsuki Nakamura, Yuki Yoshida, Yuki Hamada, Takuya Yamabe, Miyuki Nakano, Yuki Taira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。