

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14451

研究課題名(和文)生殖細胞増殖分化制御におけるRNAスプライシングの新規機能

研究課題名(英文)A novel function of RNA splicing in control of proliferation and differentiation of germ cells

研究代表者

坂本 博 (SAKAMOTO, HIROSHI)

神戸大学・理学研究科・教授

研究者番号：00187048

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)：生殖細胞は有糸分裂期を経て減数分裂期へと移行する唯一の細胞である。生殖細胞の増殖分化過程が転写制御や翻訳制御によって厳密に調節されていることは古くから知られているが、スプライシング制御の関与については明らかにされていない。我々は、線虫*C. elegans*においてスプライシング制御因子をリン酸化する酵素SPK-1を同定し、この酵素が減数分裂への移行を妨げることにより生殖細胞の増殖状態を維持する働きを見出した。さらに我々は、SPK-1が翻訳制御因子の発現調節を介して生殖細胞の増殖状態を維持している可能性を見出し、生殖細胞の増殖分化過程におけるスプライシング制御の新たな役割が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Germ cells are the only cells that undergo meiosis as well as mitosis. It is well known that the balance between self-renewal and differentiation of germ cells is strictly regulated through transcriptional and translational mechanisms, yet it remains unclear whether splicing regulation is involved in this process. We identified an SR protein kinase SPK-1 that phosphorylates splicing factors in *C. elegans* and found that SPK-1 is essential to maintain the proliferative state by prohibiting precocious entry into meiosis. Furthermore, our genetic analyses suggest that SPK-1 regulates a translational repressor that is known as germline tumor suppressor. Thus, we propose a novel role of splicing regulation in the control of germline proliferation.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 生殖細胞 スプライシング制御 細胞増殖 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達するための特別な細胞であり、その増殖・分化過程は極めて厳密に制御されている。胚発生過程において、体細胞からなる生殖巣内に移動した始原生殖細胞は、特定のニッチからのシグナルを受けて有糸分裂による増殖を開始し、その後、減数分裂を経て配偶子（精子または卵）を形成する。ニッチから生殖幹細胞への増殖開始のシグナル伝達は増殖・分化関連遺伝子の転写制御に至り、最終的には分化過程における様々な mRNA の翻訳制御につながる。この一連のスキームは多くの動物で共通しており、生殖細胞の増殖・分化過程における転写制御、および翻訳制御の重要性を示している (Hansen, T. & Schedl, T., *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013)。一方で、研究代表者は転写と翻訳の中間段階であるスプライシングによる制御も、生殖細胞の増殖・分化過程において重要な役割を担っているのではないかと着想した。この仮説を検証するため、線虫においてスプライシング制御に必須な SR タンパク質群をリン酸化する酵素 SPK-1 を阻害し、その表現型を解析した結果、SPK-1 阻害個体では、生殖幹細胞から増殖した有糸分裂細胞が異常な形態の染色体像を示すとともに、減数分裂に必須なシナプトネマ複合体の構成因子 HIM-3 や SYP-1 の異所的発現が観察された。即ち、これらの結果は生殖細胞の増殖・分化制御において従来知られていた転写制御や翻訳制御のみならず、スプライシング制御が重要な役割を担っていることを強く示唆するものであった。

2. 研究の目的

生殖細胞は次世代を生む特別な細胞であり、その増殖・分化機構の解明は生命科学の最重要課題の一つである。生殖細胞の増殖・分化過程における転写制御や翻訳制御の重要性は、これまでの研究から明らかになっていた。研究代表者は新たに、生殖細胞の増

殖・分化過程においてスプライシング制御も重要な役割を果たすことを示す知見を得た。本研究は、スプライシング制御に必須な SR タンパク質群をリン酸化する酵素 SPK-1 を手がかりにして、生殖細胞の増殖開始シグナル伝達系と SPK-1 によるスプライシング制御をつなぐ未知の経路の解明に取り組むものである。そして、得られた知見をもとに、生殖細胞の増殖・分化過程の理解において、スプライシング制御の重要性という新たな概念を加えることを目的とした。本研究の成果は幹細胞の増殖・分化制御の一般性の理解につながり、ひいては癌幹細胞の発生機構の理解やその抑制法の開発など医学的な分野にも貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) SPK-1 はスプライシング制御の重要因子であるため、*spk-1* 遺伝子破壊株は胚発生の途中段階で致死となる。そこで、RNAi 法を活用して任意の時期に SPK-1 の発現を阻害することにより、生殖細胞の増殖・分化過程におけるスプライシング制御機構の解析を行う。

(2) 線虫は生殖細胞の形成・分化過程の解析に優れたモデル生物であり、発達の各段階を示すマーカー遺伝子や制御因子等が数多く同定されている。これらマーカー遺伝子の発現レベルや分布、また既知の増殖分化制御因子との遺伝学的な相互作用を指標とすることによって、SPK-1 が関与するスプライシング制御が、生殖細胞の増殖・分化過程に果たす役割を明らかにする。

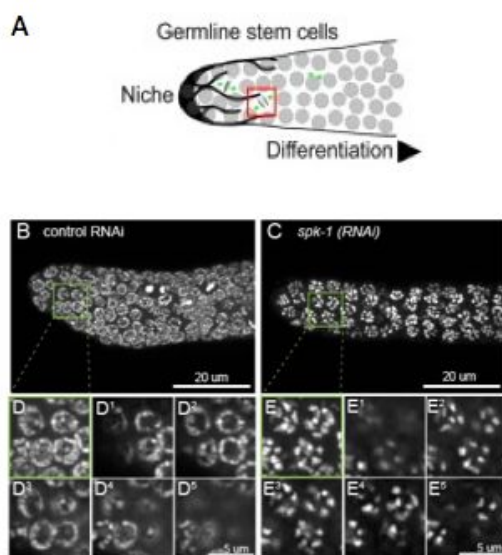
4. 研究成果

(1) SPK-1 は SR タンパク質群のリン酸化酵素であると考えられているが、哺乳類等、他の実験モデル生物における相同タンパク質の解析結果に基づいた推察であり、線虫において SPK-1 が SR タンパク質のリン酸化に関

与することを示す直接的な証拠は得られていなかった。そこで、リン酸化修飾を受けた SR タンパク質群を特異的に認識する抗体を用いて検証を行なった結果、SPK-1 の阻害個体では SR タンパク質群のリン酸化レベルが著しく低下することが確認された。これにより、SPK-1 は SR タンパク質のリン酸化酵素として機能することが示された。

(2) これまでの解析において研究代表者は、SPK-1 の発現阻害によって異常な染色体像を示す生殖細胞が出現することを見出している。そこで、SPK-1 が生殖細胞の増殖・分化過程に与える影響をより詳細に解析するため、生殖巣の先端部に存在する Niche 近傍領域の高解像度観察を行なった。その結果、本来は増殖期（有糸分裂期）にあるべき生殖細胞が、SPK-1 の阻害により、減数分裂ディプロテン期とよく似た特徴の染色体像を示すことが明らかとなった(図 1)。これにより、SPK-1 は生殖幹細胞の維持、あるいは減数分裂への移行の阻止に関与している可能性が示唆された。

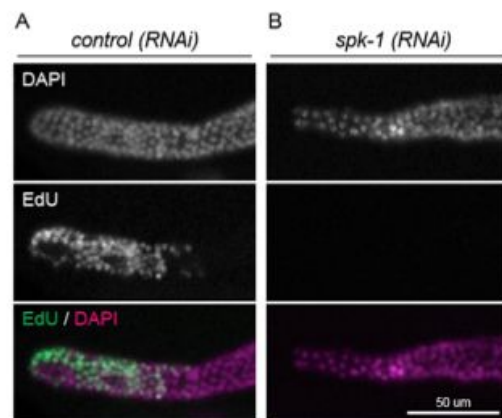
図 1



(3) 先の実験において、SPK-1 が生殖幹細胞

の維持に関与している可能性が示唆されたため、生殖細胞の増殖能力に変化があるかをより直接的に検証した。ヌクレオシドアナログである EdU を用いて新生 DNA を標識することにより細胞の増殖速度を解析した結果、SPK-1 阻害個体では、生殖細胞の増殖が停止していることが明らかとなった(図 2)。さらに、DNA 染色試薬である DAPI の蛍光強度を指標に核あたりの DNA 量を測定した結果、DNA 複製を完了した後、すなわち S 期後に細胞周期を停止している可能性が高いことが判明した。

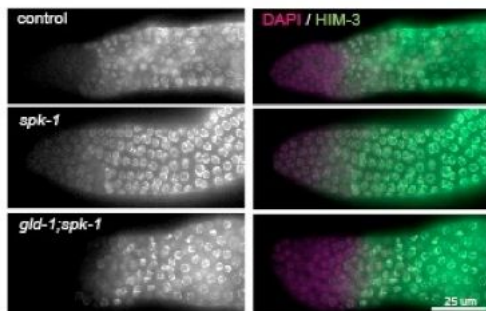
図 2



(4) SPK-1 の発現阻害によって生殖細胞の増殖が停止したこと、さらには染色体像が減数分裂ディプロテン期様に変化していたことから、SPK-1 阻害個体では、生殖細胞が増殖段階を担う有糸分裂期を外れ、減数分裂へと早期に移行した可能性が考えられた。そこで、減数分裂期のマーカーであるシナプトネマ複合体因子 HIM-3 の発現を調べた結果、本来は生殖幹細胞が維持され、盛んに有糸分裂が行なわれるべき Niche 領域の近傍にまで減数分裂期の細胞が分布していることが明らかとなった(図 3)。さらに興味深いことに、SPK-1 阻害個体で見られた HIM-3 の分布異常は、翻訳抑制因子として知られる GLD-1 の発現抑制によって正常に回復することを見出

した。以上の結果は、SPK-1 が有糸分裂から減数分裂の切り替えの制御に深く関与していること、さらに制御は GLD-1 を介して行なわれている可能性が強く示唆された。

図 3



(5) SPK-1 によってリン酸化される SR タンパク質群の中で、生殖細胞の増殖分化過程に関与するものを同定するために RNAi 法によって個々または組合せて SR タンパク質を阻害し、その表現型を調べた。その結果、予想に反して SPK-1 阻害時の表現型と一致するものは見出すことができなかった。このことから、SPK-1 は SR タンパク質以外の標的分子を通じて生殖細胞の有糸分裂から減数分裂への切り替え過程を制御している可能性が示唆された。

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 5 件)

Kobayashi, M., Tani-Matsuhana, S., Ohkawa, Y., Sakamoto, H., Inoue, K. DND protein functions as a translation repressor during zebrafish embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 484, 235-240, 2017. (DOI:) (査読有り)

Fukumura, K., Wakabayashi, S., Kataoka, N., Sakamoto, H., Suzuki, Y., Nakai, K., Mayeda, A., Inoue, K. The Exon Junction

Complex controls the efficient and faithful splicing of a subset of transcripts involved in mitotic cell-cycle progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1153, 2016. (DOI: 10.3390/ijms17081153) (査読有り)

Yamamoto, K., Furukawa, M.T., Fukumura, K., Kawamura, A., Yamada, T., Suzuki, H., Hirose, T., Sakamoto, H., Inoue, K. Control of the heat stress-induced alternative splicing of a subset of genes by hnRNP K. *Genes to Cells*, 21, 1006-1014, 2016. (DOI: 10.1111/gtc.11400) (査読有り)

Miwa, T., Takasaki, T., Inoue, K., Sakamoto, H. Restricted distribution of mrg-1 mRNA in *C. elegans* primordial germ cells through germ granule-independent regulation. *Genes to Cells*, 20, 932-942, 2015. (DOI: 10.1111/gtc.12285) (査読有り)

Furukawa, M.T., Sakamoto, H., Inoue, K. Interaction and colocalization of HERMES/RBPMS with NonO, PSF, and G3BP1 in neuronal cytoplasmic RNP granules in mouse retinal line cells. *Genes to Cells* 20, 257-266, 2015. (DOI: 10.1111/gtc.12224) (査読有り)

[学会発表](計 18 件)

吉田篤史、古川真理、坂本博、井上邦夫：神経細胞における RNP 顆粒の形成機構の解析、第 39 回日本分子生物学会、2016.11.30-12.2、パシフィコ横浜（神奈川県）

Miwa, T., Takasaki, T., Inoue, K., Sakamoto, H. : Chromodomain protein MRG-1 is required for global repression of Pol

l1-dependent transcription in the primordial germ cells in *C. elegans*. JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB, 2016.6.1-2, 東京大学 (東京都)

吉田篤史、古川真理、坂本博、井上邦夫：神経細胞における RNP 顆粒の形成機構の解析、RNA Frontier Meeting 2015、2015.12.8-10、タカミヤヴィレッジホテル樹林 (山形県)

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚での Tob1a による母性 mRNA 制御機構の解析、RNA Frontier Meeting 2015、2015.12.8-10、タカミヤヴィレッジホテル樹林 (山形県)

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚における Tob1a の母性 mRNA 制御機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場 (兵庫県)

吉田篤史、古川真理、坂本博、井上邦夫：神経細胞における RNP 顆粒の形成機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場 (兵庫県)

高松陽紀、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ卵母細胞の mRNA 輸送機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場 (兵庫県)

古川 真理、坂本 博、井上 邦夫：網膜神経節細胞特異的 RNA 結合タンパク質 HERMES は NonO、G3BP1 などとともに神経 RNA 顆粒を形成する、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場 (兵庫県)

巳波孝至、井上邦夫、坂本博、高崎輝恒：

線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成に必須なクロマチン制御因子群の始原生殖細胞への限局機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場 (兵庫県)

巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* の始原生殖細胞成熟過程におけるクロマチン制御機構の研究、関西地区線虫勉強会、2015.10.15、アプローズタワーホテル関西学院大学梅田キャンパス (大阪府)

巳波孝至、高崎輝恒、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成に必須なクロマチン制御因子群の始原生殖細胞への限局機構の解析、第 17 回 RNA 学会年会、2015.7.15-17、ホテルライフオーツ札幌 (北海道)

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚における Tob1a の母性 mRNA 制御機構の解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜 (神奈川県)

巳波孝至、井上邦夫、坂本博、高崎輝恒：線虫 *C. elegans* におけるクロモドメイン蛋白質 MRG-1 の始原生殖細胞への限局メカニズムの解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜 (神奈川県)

相澤理丞、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* における RNA の輸送経路を決めるメカニズムの解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜 (神奈川県)

相澤理丞、井上邦夫、坂本博：線虫 *C. elegans* における RNA の輸送経路を決めるメカニズムの解析、関西地区線虫勉強会、2014.10.23、アプローズタワーホテル関西学院大学梅田キャンパス (大阪府)

山畑俊哉、坂本博、井上邦夫：ゼブラフィッシュ初期胚における Tob1a の母性 mRNA 制御機構の解析、RNA Frontier Meeting 2014、2014.9.16-18、ラフォーレ白浜（和歌山県）

Miwa, T., Inoue, K., Sakamoto, H., Takasaki, T. : The mechanism for enrichment of a chromodomain protein MRG-1 into the primordial germ cells in *C. elegans*. *C. elegans Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in Association with The 6th Asia-Pacific C. elegans Meeting*、2014.7.15-19、奈良県新公会堂（奈良県）

巳波孝至、井上邦夫、坂本博、高崎輝恒：線虫 *C. elegans* におけるクロモドメインパク MRG-1 の始原生殖細胞への限局メカニズムの解析、第 47 回日本発生生物学会、2014.5.27-30、ウインク愛知（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 博 (SAKAMOTO, Hiroshi)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：00187048

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

土橋 匠 (DOBASHI, Takumi)
高崎 輝恒 (TAKASAKI, Teruaki)
井上 邦夫 (INOUE, Kunio)