

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20908

研究課題名（和文）生殖細胞の成熟過程に関わるノンコーディングRNAの同定と制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of germ cell specific non-coding RNA and their function

研究代表者

太田 博允 (Ota, Hiromitsu)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40772421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では生殖細胞で機能する低分子ncRNAとして新たにmiR-871とmiR-880を同定し、精子形成過程においてFzd4の発現を介してWnt/カテニン経路を制御していることを明らかにした。また長鎖ncRNAでは始原生殖細胞の分化に関与する可能性のある2つの長鎖ncRNAを同定した。本研究結果はタンパク質をコードしないノンコーディングRNAが生殖細胞の分化・成熟においても重要な働きをしていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで生殖細胞で発現するノンコーディングRNAは多く同定されてきたが、その機能まで明らかになっているものは少数であった。本研究では生殖細胞で発現するノンコーディングRNAを同定しその機能を明らかにした。生殖細胞の分化・成熟過程での異常は不妊症の原因となるほか、次世代の個体の発生・発達障害の原因となるため生殖細胞の成熟過程の分子機構の解明は基礎生物学的な観点だけでなく少子化の原因の一つである不妊症への予防や治療への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified miR-871 and miR-880 as small non-coding RNAs that specifically express and function in germ cells. They cooperatively repress the expression of Fzd4 gene, a WNT receptor gene, and regulate the WNT/ -catenin pathway during testicular germ cell development. We also identified two long non-coding RNAs that are involved in differentiation of primordial germ cell. These results indicate that non-coding RNAs have an important role in differentiation and development of germ cells,

研究分野：発生生物学

キーワード：精子形成 マイクロRNA ノンコーディングRNA 生殖細胞

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

1. 研究開始当初の背景

近年のシーケンシング技術の向上と次世代シーケンサーの普及により膨大な量のトランスクリプトームデータが蓄積されてきている。その中で、従来考えられていたよりも遥かに多くのタンパク質をコードしていないノンコーディング RNA (ncRNA) が転写されてきていることが明らかになった。生殖細胞においても多くの ncRNA が発現していることが明らかになってきているがその機能については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では生殖細胞の分化・成熟に関わる ncRNA を同定し、その作用機構を明らかにする。これらの結果により PGC の増殖や遊走、減数分裂や精子形成、卵子成熟など生殖細胞の分化・成熟を制御する分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 低分子 ncRNA の探索と機能解析

生殖細胞で発現する ncRNA の探索：様々な組織や細胞から得られた既存の低分子 RNA-seq データを再解析し、生殖細胞で特異的に発現するものを選別した。

生殖細胞での機能解析：CRISPR-Cas9 ゲノム編集システムを使用し、候補 ncRNA 遺伝子の F0 ノックアウトマウスを作成し表現型を調べた。

生殖細胞での該当 ncRNA の発現評価：ノックアウトマウスと野生型マウス精巣での発現量を RT-PCR 法で評価した。

該当 ncRNA の標的メッセンジャー RNA (mRNA) の探索：該当 ncRNA の配列から標的 mRNA を探索し、ノックアウトマウスと野生型マウスの精巣で標的 mRNA の発現量を RT-qPCR 法で評価した。

該当 ncRNA による標的 mRNA の発現抑制の評価：HEK293T 細胞で該当 ncRNA と標的 mRNA を融合したルシフェラーゼを共発現させて、ルシフェラーゼアッセイで評価した。

該当 ncRNA の生殖細胞での機能の評価：ノックアウトマウスと野生型マウスの精巣で標的 mRNA 遺伝子の下流の遺伝子の発現量を RT-qPCR 法で評価した。

(2) 長鎖 ncRNA の探索と機能解析

生殖細胞で発現する ncRNA の探索：胎齢 13.5 日の始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells: PGC) からトータル RNA を精製し RNA-seq を行い、既存の胎齢 10.5-13.5 日の PGC から得られた RNA-seq データと共に再解析し、PGC で高発現しているものを選別した。

PGC での該当 ncRNA の発現評価：胎齢 10.5, 11.5, 13.5 日の PGC での該当 ncRNA の発現を RT-qPCR 法で評価した。

該当 ncRNA の PGC における機能解析：該当 ncRNA をノックダウンしてエピブラスト様細胞 (Epiblast-like cell: EpiLC) から PGC 様細胞 (PGC-like cell: PGCLC) へ分化した際の PGC マーカー遺伝子の発現量の変化を RT-qPCR 法で評価した。

4. 研究成果

(1) 低分子 ncRNA の探索と機能解析

まず生殖細胞で特異的に発現する低分子 ncRNA を同定するために様々な組織や細胞の RNA-seq データを in-silico 解析で miR-741-3p, miR-871-3p, miR-880-3p の 3 つが生殖細胞で特異的に発現していることを発見した。これらの miRNA の生殖細胞での機能を調べるため CRISPR-Cas9 を使用したゲノム編集によってこれら 3 つの miRNA 遺伝子の欠失個体の雄をそれぞれ得られたが、生殖細胞の成熟に特に異常は見られなかった。miRNA 遺伝子の欠失個体の中で *miR-871* と *miR-880* の二重欠失個体の雄で精細管の生殖細胞の一部で異常が見られた。精巣での miR-741-3p, miR-871-3p, miR-880-3p の発現を調べるため、ノックアウトマウスと野生型マウスの精巣での発現を調べた。その結果、ノックアウトマウスではこの 3 つの miRNA の発現が消失していることを確認した (図 1)。

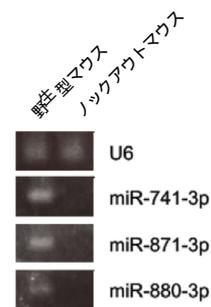


図1 ノックアウトマウス精巣での低分子ncRNAの発現

次にこれらの miRNA の標的 mRNA を調べるために *in silico* 解析を行い、miR-871-3p と miR-880-3p の共通標的遺伝子候補として 46 遺伝子見つかった。これら 46 遺伝子についてノックアウトマウスと野生型マウスの精巣での発現を調べた。その結果、*Fzd4* 遺伝子の発現がノックアウトマウスの精巣で有意に上昇していることを発見した(図 2)

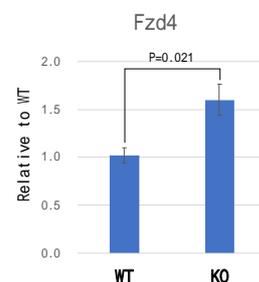


図 2 精巣での*Fzd4*遺伝子の発現量

Fzd4 遺伝子が miR-871-3p と miR-880-3p の直接の標的遺伝子かどうかを調べるためルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、*Fzd4* mRNA の 3' UTR を融合したルシフェラーゼ遺伝子と miRNA を共発現した HEK293T 細胞でルシフェラーゼの発現に抑制がかかった。この結果から miR-871-3p と miR-880-3p は直接 *Fzd4* 遺伝子の発現を抑制していることが確認された(図 3)

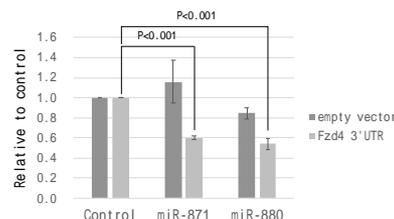


図 3 *Fzd4* mRNAの3' UTRを使用したルシフェラーゼアッセイ

Fzd4 遺伝子は Wnt/β-カテニンシグナル経路において FZD 受容体をコードしていることから、ノックアウトマウスでの Wnt/β-カテニンシグナル経路下流遺伝子のうち 5 つの遺伝子の発現を調べた。その結果、ノックアウトマウスでは Wnt/β-カテニンシグナル経路下流遺伝子のうち 4 つで発現が有意に上昇していることが確認された。また残る 1 つについても上昇傾向を示していた(図 4)

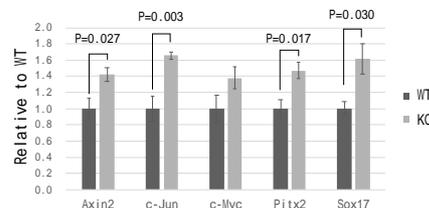


図 4 ノックアウトマウス精巣での Wnt/β-カテニンシグナル経路下流遺伝子の発現

これらの結果から *miR-871* と *miR-880* は生殖細胞において協調的に機能し、*Fzd4* 遺伝子の発現を介して Wnt/β-カテニンシグナル経路を制御していることが示唆された。

(2) 長鎖 ncRNA の探索と機能解析

始原生殖細胞で機能する lncRNA を同定するため、胎齢 13.5 日のマウス PGC からトータル RNA を精製し、RNA-seq を行った。その結果、PGC で高発現している lncRNA を 51 個同定した。E10.5, E11.5 PGC の既存の RNA-seq データを再解析し、51 個の候補の中から E10.5 と E11.5 でも発現しており、Pseudogene やリピート配列ではないものとして 14 個を解析対象として選別した。これらの候補 lncRNA の PGC での発現を RT-qPCR で確認し、11 個の lncRNA が PGC で特異的に発現していることを確認した。

次にこれらの lncRNA が PGC への分化に関与するかを調べるため、*in vitro* でエピプラスト様細胞から PGC 様細胞へと分化する際の発現変化を調べた。その結果、2 つの lncRNA (TCONS_290, TCON_136443) が PGC 様細胞への分化する際に発現上昇することが確認された(図 5)

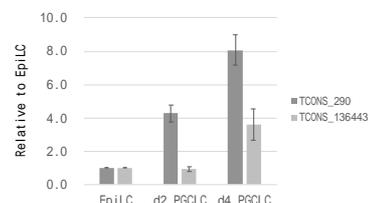


図 5 PGC様細胞における lncRNA の発現

TCONS_290 と TCON_136443 の PGC での機能を調べるため、PGC 様細胞で TCONS_290 と TCON_136443 のノックダウンを行い PGC マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、TCONS_290 のノックダウンでは初期 PGC マーカー遺伝子 *Stella*, *Prdm14* の発現が低下していることを確認した。また TCON_136443 のノックダウンでは後期 PGC マーカー遺伝子の *Mvh* の発現が上昇していることを確認した(図 6)

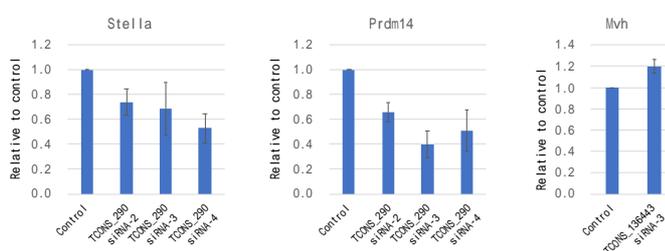


図 6 lncRNA ノックダウンした PGC 様細胞における PGC マーカー遺伝子の発現

今後、更なる解析を行いこれらの lncRNA がどのように PGC の分化に作用するのか、その作用機

序を明らかにしていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Hiromitsu Ota, Yumi Ito-Matsuoka, Yasuhisa Matsui: Identification of the X-linked germ cell specific miRNAs (XmiRs) and their functions. PLoS One. 2019 Feb 1;14(2):e0211739. (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

Hiromitsu Ota, Yumi Ito-Matsuoka, Yasuhisa Matsui, Identification of the X-linked germ cell specific miRNAs (XmiRs) and their functions, 第70回細胞生物第51回発生生物合同大会、2018年6月、東京

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：太田 博允

ローマ字氏名：Ota Hiromitsu

所属研究機関名：東北大学

部局名：加齢医学研究所

職名：助教

研究者番号(8桁): 40772421

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。