

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06628

研究課題名(和文) 包括的なmRNAの塩基修飾解析が明らかにする生殖幹細胞の維持と分化のメカニズム

研究課題名(英文) Comprehensive mRNA base modification analysis reveals mechanisms of germline stem cell maintenance and differentiation

研究代表者

河口 真一 (Kawaguchi, Shinichi)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：40321749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、mRNAの塩基がメチル化などの修飾を受けていることが明らかとなり、その機能が注目されている。本研究では、新規なナノポア装置を用いた第4世代塩基配列決定法を用いて、mRNAの塩基修飾部位を検出した。その結果、1遺伝子あたり最大で30程度の修飾候補部位を1塩基レベルで同定することができた。生殖幹細胞様の未分化な細胞では、翻訳伸長因子やアクチンをコードするmRNAに塩基修飾が多いことが示された。さらに、代謝系酵素の1つであるMen-bの3' UTR領域は、塩基修飾部位が複数あり、スプライシング制御が見られることから、それらの関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子をコードする塩基配列の変化が疾患の原因となることと同様に、塩基修飾の変化に伴う疾患も知られている。これまで、mRNA上の修飾塩基を直接検出する方法はなかったが、新規なナノポア装置を用いた第4世代塩基配列決定法によって可能となってきた。この方法を用いることによって、簡便に、さまざまな細胞種における塩基修飾を測定することが出来る。今後、細胞単位での遺伝子発現情報に加えて、塩基修飾情報が蓄積され、それらを統合することによって、塩基修飾の多様な生理学的意義が明らかになると期待される。

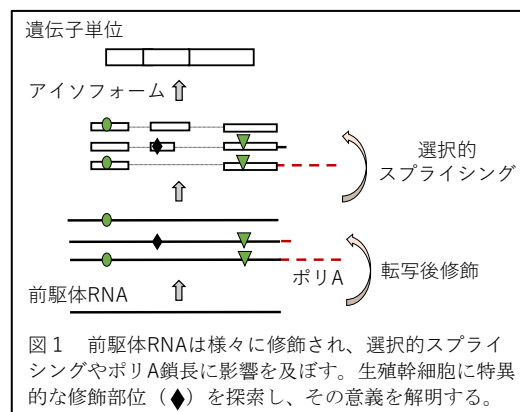
研究成果の概要(英文)：Recently, it has become clear that mRNA bases undergo modifications such as methylation, and their functions have attracted much attention. In this study, we used a fourth-generation sequencing method based on a novel nanopore device to detect sites of base modification in mRNA. As a result, we were able to identify up to about 30 candidate sites for modification per gene at the single nucleotide level. In undifferentiated germline stem cell-like cells, mRNAs encoding translation elongation factors and actin were shown to have many base modifications. Furthermore, the 3' UTR region of Men-b, one of the metabolic enzymes, has multiple base modification sites and splicing regulation, suggesting that they are related.

研究分野：生化学

キーワード：エピトランスクリプトーム 塩基修飾 生殖幹細胞 ナノポア Direct-mRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

細胞の核内で転写された前駆体 mRNA は、5'末端のキャッピング、スプライシング、ポリ A 鎖の付加などの様々なプロセッシングを受けて成熟 mRNA となる (図 1)。プロセッシングに加えて、tRNA や rRNA では、塩基がメチル基転移酵素などによって修飾されることが知られていたが、mRNA でも、約 0.1~1%の塩基が修飾されることが明らかとなってきた。RNA の塩基配列情報に基づくトランスクリプトームに対して、塩基修飾などの転写後修飾を加えた RNA 情報はエピトランスクリプトームと呼ばれ、注目されている。これまでに 100 種類以上の塩基修飾が報告されているが、そのうち、N6-メチルアデノシン (m6A)、5-メチルシトシン (m5C)、シュードウリジン (Ψ) の 3 種の修飾が mRNA 塩基修飾全体の 80% 以上を占める。特に m6A 修飾は、その近傍のスプライシングやポリ A 鎖伸長に関与し、遺伝子発現を制御することによって、体内時計や性決定に寄与することや、細胞の癌化とも関連することが報告されている²⁾。しかし、具体的にどの塩基の修飾が、mRNA のプロセッシングに関わっているのか特定されていないケースが多く、また、存在量の少ない塩基修飾の機能については、ほとんどが不明である。



塩基配列解析の革新的な技術開発の成果によって、膨大な数の cDNA 断片の解析が比較的容易になり、特定の塩基修飾を検出する手法も開発されつつある。しかし、一般的に用いられている次世代塩基配列決定法では、mRNA を cDNA に変換する過程で、多くの塩基修飾情報が失われる。さらに、1~3 のような技術的な問題点があり、包括的な修飾塩基の解析は困難である。

1. mRNA 鎖中の特定部位の修飾塩基が、全 mRNA でどの程度修飾されているか、修飾割合を測定することが困難である。

2. 1つのプロトコールで異なるタイプの塩基修飾型を検出できないため、同一 mRNA 中に異なる修飾塩基が存在しているのかを解析できない。

3. 選択的スプライシングによって複数の転写アイソフォームが存在する場合、塩基修飾とプロセッシングを同時に検出できないために、その修飾塩基がどの転写アイソフォームに由来するのか特定できない。

1) Helm M, Motorin Y., *Nat Rev Genet.* (2017); 18(5):275-291.

2) Lewis CJ, Pan T, Kalsotra A., *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2017); 18(3):202-210.

2. 研究の目的

本研究では、前述の問題点を克服するため、1kb 以上の長い mRNA 分子を cDNA に変換することなく、塩基の種類を解析する。特に、m6A 塩基修飾が及ぼすスプライシングへの影響が注目されていることから、mRNA 1 分子ごとに、塩基修飾とスプライシング、ポリ A 鎖長を同定し、それらの関連性を解析する。さらに、遺伝学的・細胞生物学的アプローチが容易なキョウジョウバエの生殖幹細胞をモデル系として、mRNA 塩基修飾による生殖幹細胞の維持と分化の新しい制御機構を解明する。

3. 研究の方法

3つの細胞集団から RNA を調製: PCR 増幅を行わないナノポア Direct-mRNA-seq 解析は、比較的大量の精製 mRNA を必要とすることから、希少な生殖幹細胞を解析することは困難である。そこで、ショウジョウバエの生殖幹細胞の分化が進まない *bam* 変異体から、生殖幹細胞様の未分化な細胞を多く含む卵巣を調製した。解析対照としては、培養体細胞 (S2 株) と成熟した野生型卵巣を用いた。これらのサンプルから RNA を抽出し、mRNA 精製、ライブラリー調製を行った。

塩基修飾部位の解析: 調製した RNA ライブラリーを cDNA に変換することなく、オックスフォード社のナノポア装置で解析した (Direct-RNA-seq)。1 サンプルあたり約 4-8 時間の分析を行い、平均 1.5kb 程度の長さの RNA、約 50-100 万分子について塩基配列を解析した。さらに、修飾がある塩基は、修飾がない塩基と比べて、異なる測定値を示すことから、その違いを解析するプログラム、Tombo を用いて、m6A 修飾部位の検出を行った³⁾。

スプライシング変動解析: 前述の 3 つの細胞集団それぞれから RNA を抽出し、次世代塩基配列決定法を用いて、遺伝子毎の発現変動解析を行った。さらに、遺伝子アイソフォーム毎の変動解析を行うことによって、スプライシングが変動している遺伝子の検出を行った⁴⁾。

3) Stoiber, M.H. et al. *bioRxiv* (2016); doi: <https://doi.org/10.1101/094672>

4) Green CJ, Gazzara MR, Barash Y. *Bioinformatics* (2018); 15;34(2):300-302.

4. 研究成果

キイロショウジョウバエの雌性生殖幹細胞から成熟した卵細胞へと分化するシステムは、幹細胞のモデル系として詳細な分子生物学的研究が進められている。この過程における RNA 塩基修飾の変化を、ナノポア塩基配列決定法を用いて解析することを試みた。生殖幹細胞様の未分化な細胞を多く含む卵巣、及び、コントロールとして培養体細胞と成熟した野生型卵巣から RNA を調製し、mRNA の塩基配列を 1 分子単位で解析した。

(1) ポリ A 鎖長の網羅的解析

ナノポア塩基配列決定法では、mRNA のポリ A 鎖下流に付加したアダプターから解析するので、ポリ A 鎖のシグナルに続いて、3'UTR、CDS 領域のシグナルが得られる。ポリ A 鎖がナノポアを通過する時間から、ポリ A 鎖長の直接測定が可能になった。mRNA 分子がナノポアを通過する際のシグナルを解析する Nanopolish プログラムを

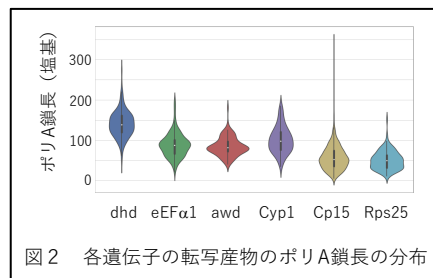


図2 各遺伝子の転写産物のポリA鎖長の分布

を導入し、独自のスクリプトと連携させることによって、ポリ A 鎖長を調べたところ、ポリ A 鎖の短い遺伝子 (平均して 50 塩基程度) と長い遺伝子 (平均して 150 塩基程度) が検出された (図2)。高発現遺伝子の場合には、mRNA 分子を多く得ることができるので、一度の解析で、多くの遺伝子について、ポリ A 鎖長の解析を行うことが可能であることが示された。低発現遺伝子の場合では、RNA 1 分子毎にポリ A 鎖長を決定することが可能であるが、遺伝子間で統計的に比較することは困難である。より多くの RNA 分子を解析するか、あるいは、ターゲットとなる遺伝子をポリ A 鎖も含めて増幅することによって可能になると期待される。

(2) mRNA 中の修飾塩基の解析

RNA ライブラリーを cDNA に変換する過程で、塩基配列情報は保存されるが、多くの場合、塩基修飾の情報は失われる。ナノポア法では、RNA 分子を直接解析するので、塩基修飾の有無を検出できる (Direct-RNA-seq)。RNA 塩基がナノポア装置を通過する際に計測される電流値は、周辺配列から推測することが可能であり、各塩基に対する期待電流値を見積もることが出来る。

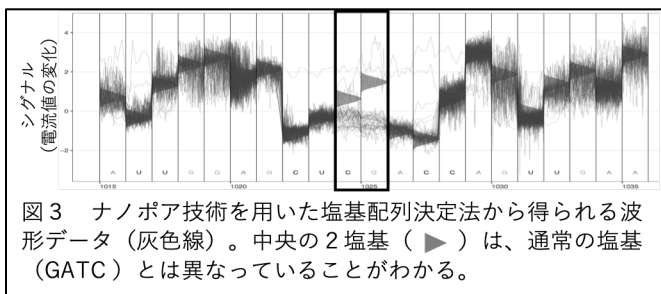


図3 ナノポア技術を用いた塩基配列決定法から得られる波形データ (灰色線)。中央の 2 塩基 (▶) は、通常塩基 (GATC) とは異なっていることがわかる。

期待値とは異なる値を示す部位では、当該塩基が何らかの修飾を受けていると考えられる (図3)。期待値とのズレ、および周辺配列への影響などから、修飾の種類を推測するアルゴリズムが開発されている。そのようなアルゴリズムを持つ解析ソフト (Tombo) を用いて、mRNA 塩基修飾解析を行なった。生殖幹細胞様の未分化な細胞を多く含む卵巣、培養体細胞 (S2 株)、成熟した野生型卵巣の 3 種類の RNA ライブラリーを用いて、m6A 修飾の検出を行なった。遺伝子領域における解析の結果、1 遺伝子あたり最大で 30 程度の修飾候補部位を 1 塩基レベルで同定することができた。塩基修飾が多く見られる遺伝子を抽出して比較した結果、スフィンゴ

脂質活性化タンパク質 (Sap-r) をコードする mRNA が、どの細胞種でも比較的多くの修飾を受けていることが示唆された。また、生殖幹細胞様の未分化な細胞では、翻訳伸長因子 (eEF) やアクチン (Act5C) をコードする mRNA 上に塩基修飾が多く見られた (図 4)。生殖細胞の発生過程では、哺育細胞が多くの mRNA やタンパク質を産生し、卵母細胞に供給しているが、その過程で大量に必要となる翻訳伸長因子の mRNA は塩基修飾を受け、安定性が増加していることが推察される。

培養体細胞 (S2株)			野生型卵巣			未分化な生殖幹細胞様細胞		
Transcript	No. of sites	Gene Name	Transcript	No. of sites	Gene Name	Transcript	No. of sites	Gene Name
FPtr0077014	33	LanA	FPtr0073898	47	yl	FPtr0085713	66	Sap-r
FPtr0085713	32	Sap-r	FPtr0332635	33	tral	FPtr0086740	63	pAbp
FPtr0079002	31	Col4a1	FPtr0072865	28	dre4	FPtr0332966	56	eEF2
FPtr0333328	30	CycG	FPtr0076685	28	msk	FPtr0346872	55	28SrRNA-Psi
FPtr0072951	30	Pxn	FPtr0079858	27	Mtpalpha	FPtr0070823	49	Act5C
FPtr0072597	30	Sf3b3	FPtr0082231	27	sle	FPtr0087560	49	Arc1
FPtr0346892	30	18SrRNA-Ψ	FPtr0075646	26	Msh6	FPtr0345894	49	Act5C
FPtr0076382	28	LanB2	FPtr0076550	26	smg	FPtr0100662	48	Act5C
FPtr0085074	27	CG14253	FPtr0083400	26	cal1	FPtr0071883	47	blw
FPtr0085704	26	cindr	FPtr0085713	26	Sap-r	FPtr0073040	47	Hsp83
FPtr0079036	26	vkg	FPtr0086740	26	pAbp	FPtr0085392	46	eEF1gamma
FPtr0307091	25	Glt	FPtr0339908	26	scy1	FPtr0085393	45	eEF1gamma
FPtr0086768	25	Ote	FPtr0346347	26	rim	FPtr0088391	45	TER94
FPtr0081254	25	Top4	FPtr0082534	25	Lk6	FPtr0302442	43	eEF1gamma

図 4 塩基修飾 (m6A) が多く検出された遺伝子のリスト

(3) スプライシングにおける塩基修飾の影響

塩基修飾の1つの生理的意義として、スプライシングの部位を制御する例が報告されている。塩基修飾部位とスプライシングの関係性を明らかにする目的で、遺伝子アイソフォームの発現解析を行なった。成熟した卵巣由来細胞と生殖幹細胞様の未分化な細胞由来の mRNA を比較して、スプライシングのパターンが変化している遺伝子を、約 600 個同定した。遺伝子のアイソフォームを考慮しない mRNA 発現量解析では、有意な発現変動を示す約 5,800 個の遺伝子が検出されるが、アイソフォームを考慮した場合には、さらに 244 個の遺伝子が変化していることが明らかになった。mRNA の塩基修飾解析とアイソフォーム変動解析とを統合して、塩基修飾がスプライシングに影響を及ぼすかどうか検討した結果、代謝系酵素の1つである Men-b の 3'UTR が、生殖幹細胞様の未分化な細胞では約 800 塩基長くなっていること (図 5)、さらに、その領域内において、塩基修飾の程度が高くなっていることが明らかになった (図 6)。即ち、Men-b 遺伝子の 3'UTR において、塩基修飾がスプライシング部位を変化させ、細胞種特異的なアイソフォームを安定化させていることが示唆された。

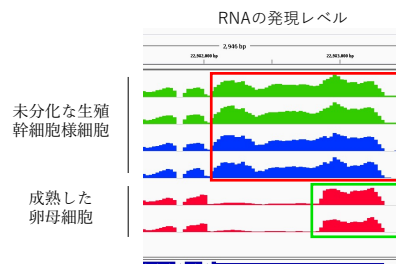


図 5 Men-b 遺伝子の 3'UTR 領域は選択的スプライシング制御を受けている。未分化な細胞では長く、成熟した卵母細胞では短くなっている。

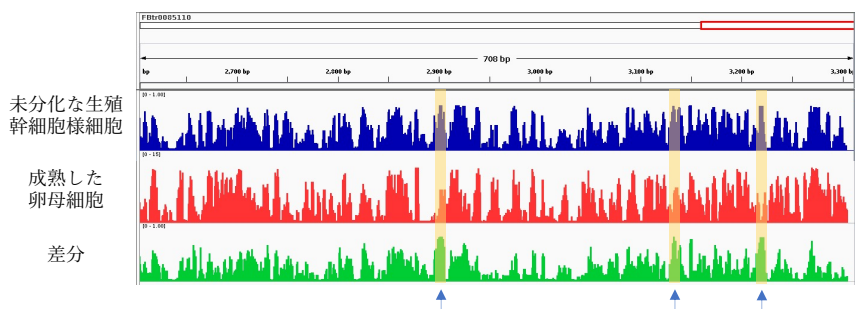


図 6 Men-b 遺伝子の 3'UTR 領域において、未分化な生殖幹細胞様細胞に特異的な m6A 修飾塩基が検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawaguchi S, Ueki M, Kai T	4. 巻 4
2. 論文標題 Drosophila MARF1 ensures proper oocyte maturation by regulating nanos expression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0231114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lin-Xenia Lim, Wakana Isshiki, Taichiro Iki, Shinichi Kawaguchi, Toshie Kai	4. 巻 9
2. 論文標題 The Tudor Domain-Containing Protein, Kotsubu (CG9925), Localizes to the Nuage and Functions in piRNA Biogenesis in <i>D. melanogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 818302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.818302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井 将也、須山 律子、河口 真一、甲斐 歳恵
2. 発表標題 stand still遺伝子は、ショウジョウバエの雌生殖細胞の維持と分化を保証する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河口真一、アナンドアミット、甲斐歳恵
2. 発表標題 ショウジョウバエ生殖幹細胞に特異的な発現遺伝子、スプライシング、RNA塩基修飾の探索
3. 学会等名 RNAフロンティア
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fengmei Xu, Kawaguchi Shinichi, Kai Toshie
2. 発表標題 HemK2 is required for Otu-mediated proper chromosome dispersion during oogenesis and egg maturation in <i>Drosophila melanogaster</i> .
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lim LinXenia, Wakana Isshiki, Taichiro Iki, Shinichi Kawaguchi, Toshie Kai
2. 発表標題 The Tudor domain-containing protein, Kotsubu (CG9925), forms discrete condensates in the male germline and is required for proper piRNA biogenesis and transposon silencing in <i>D. melanogaster</i> .
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井 将也, 河口 真一, 須山 律子, 甲斐 歳恵
2. 発表標題 Stand still (Stil)によるショウジョウバエ生殖細胞保護機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------