

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870011

研究課題名（和文） 生存に必須なアンチセンスRNA, antiPeg11: 生体における機能の二面性

研究課題名（英文） AntiPeg11, as an essential antisense RNA: two differential role in mouse development.

研究代表者

遠藤 大輔 (ENDO DAIJUKE)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：90516288

研究成果の概要（和文）：本研究により、Peg11/Rtl1 のアンチセンス RNA である AntiPeg11/Rtl1as が siRNA として Peg11/Rtl1 発現を抑制することにより胎盤の血管形成を抑制しその過形成を防いでいること、また microRNA として様々な遺伝子の発現を制御することにより、胚の生存、成長、胸骨の形成に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, I demonstrated the two essential role of AntiPeg11/Rtl1as, non-coding antisense RNA of Peg11/Rtl1. MicroRNAs derived from AntiPeg11/Rtl1as repress the expression of their sense RNA, Peg11/Rtl1 as a siRNA and down regulate the angiogenesis in the placenta to avoid the placentomegaly. Moreover, these microRNAs also regulate the expression of their target genes as microRNAs and contribute to the normal development, embryonic growth, and the formation of sternum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：エピジェネティクス

科研費の分科・細目：ゲノム・遺伝動態

キーワード：胎盤、レトロトランスポゾン、microRNA、発生、ゲノムインプリンティング

## 1. 研究開始当初の背景

Peg11/Rtl1 はゲノムインプリンティングを受け、父親から受け継いだ染色体からのみ発現し、そのアンチセンス RNA である AntiPeg11/Rtl1as は母方由来から受け継いだ染色体からのみ発現する。ノックアウトマウスを用いた解析から Peg11/Rtl1 が胎盤における血管形成と胚への栄養供給に重要な役割を果たしていることは明らかになっていたが、AntiPeg11/Rtl1as の機能は Peg11/Rtl1 の発現の抑制が推測されているのみであった。

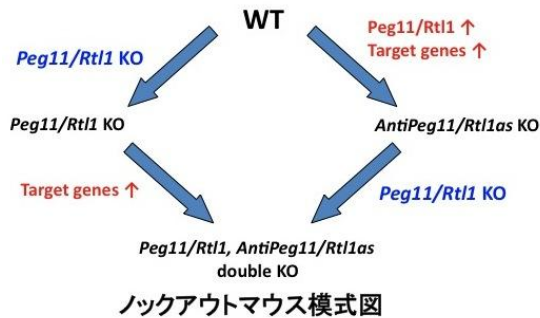
## 2. 研究の目的

そこで、本研究では AntiPeg11/Rtl1as にコードされる microRNA が Peg11/Rtl1 の抑制を通じて発生に関与しているのか、それとも microRNA としてその標的遺伝子群の発現を抑制することで機能しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

Peg11/Rtl1 のノックアウトマウスはすでに確立されていた。このマウスにおいて、ノックアウトアレルを父親から受け継ぐと Peg11/Rtl1 KO マウスに、母親から受け継ぐ

と AntiPeg11/Rt11as KO マウスとなる。この AntiPeg11/Rt11as KO マウスにおいてはこの遺伝子由来の microRNA において推定される二つの機能である Peg11/Rt11 の抑制機能と microRNA としての標的遺伝子群抑制機能の両方が失われていると考えられる。このため、このノックアウトマウスの解析では二つの機能を分離し、それぞれの役割を解析することが困難である。そこで、本研究においては Peg11/Rt11, AntiPeg11/Rt11as double KO マウスを作出し、その表現型を Peg11/Rt11 KO マウスと比較した。この比較により新しく表れた表現型については Peg11/Rt11 の過剰発現とは独立であると考えられるからである。



このようにして得られたノックアウトマウスの表現型はその新生児期における死亡率、体重、胎盤重量、transcriptome の解析を行った。

また、Peg11/Rt11 と AntiPeg11/Rt11as の発現部位の比較、AntiPeg11/Rt11 由来の microRNA が Peg11/Rt11 および標的遺伝子群の発現を抑制しうるかについて in vitro 系を用いた解析も行った。

#### 4. 研究成果

本研究のこれまでの成果を以下の3点についてまとめる。

- (1) Peg11/Rt11, AntiPeg11/Rt11as のマウス胚における発現器官の同定とその重なり
- (2) AntiPeg11/Rt11as 由来の microRNA の Peg11/Rt11 発現抑制機能の役割
- (3) AntiPeg11/Rt11as 由来の microRNA の標的遺伝子群の発現抑制機能の役割

#### (1) Peg11/Rt11, AntiPeg11/Rt11as のマウス胚における発現器官の同定とその重なり

Peg11/Rt11, AntiPeg11/Rt11as が胚のどの

器官で機能しているのか推定する目的で、それぞれの発現器官の同定を行った。

Peg11/Rt11 mRNA は胚において調べたすべての器官で発現が見られたが、ポリクローナル抗体を用いた Western blotting においては胎盤と筋肉においてのみシグナルが観察された。Peg11/Rt11 は翻訳レベルにおける調節を受け、この2つの器官でのみ機能していると考えられる。

AntiPeg11/Rt11as 由来の microRNA の発現は胎盤、筋肉を含む調べたすべての器官で発現が見られた。胎盤、筋肉では Peg11/Rt11 の発現を抑制すること、他の器官では Peg11/Rt11 とは独立した機構で働くことが推測される。

#### (2) AntiPeg11/Rt11as 由来の microRNA の Peg11/Rt11 発現抑制機能の役割

AntiPeg11/Rt11as ノックアウトマウスの胎盤、筋肉における RT-PCR, Western blotting において Peg11/Rt11 mRNA, タンパク質それぞれの過剰発現が観察された。また、MEF に対し AntiPeg11/Rt11as 由来の microRNA を投与することにより Peg11/Rt11 mRNA 発現量の低下が見られた。胎盤重量も AntiPeg11/Rt11as ノックアウトマウスでは WT に対し有意に増加、Peg11/Rt11 ノックアウトマウス、Peg11/Rt11, AntiPeg11/Rt11as ダブルノックアウトマウスでは有意に減少していたことから、胎盤の大きさは Peg11/Rt11 の発現量に直接制御されていることが明らかとなった。

また、免疫組織化学の結果から、Peg11/Rt11 タンパク質は胎盤の血管内皮細胞に発現していることが明らかとなっており、Peg11/Rt11 の過剰発現により胎盤ラビリ

ンス層内の血管の膨大が、発現が失われることにより収縮が起こることも観察された。胎盤を用いたマイクロアレイ解析からも *Peg11/Rt11* が過剰発現すると血管形成関連遺伝子の発現が上昇し、*Peg11/Rt11* 発現が失われるとそれら遺伝子の発現が低下していた。

これらのことから、*AntiPeg11/Rt11as* 由来の microRNA は胎盤において *Peg11/Rt11* の発現を抑制することで、血管形成を適切なレベルに調節していることが明らかとなった。

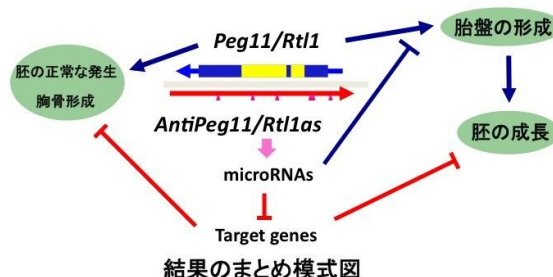
### (3) *AntiPeg11/Rt11as* 由来の microRNA の標的遺伝子群の発現抑制機能の役割

*Peg11/Rt11* ノックアウトでは新生仔致死が起きない 129 バックグラウンドにおいて、*Peg11/Rt11*, *AntiPeg11/Rt11as* のダブルノックアウトマウスを作出すると、新生仔致死、胚の (*Peg11/Rt11* ノックアウトマウスより重度の) 成長不良、胸骨の形成異常といった表現型が観察された。これらは *Peg11/Rt11* の過剰発現が起こらない条件で microRNA が失われたことにより表れたものであることから、microRNA の標的遺伝子群の発現調節を介した機能は胚の生存、成長、胸骨の形成に寄与していることが明らかとなった。

*Peg11/Rt11* タンパク質を発現していない肝臓、脳を用いたマイクロアレイ解析においても *AntiPeg11/Rt11as* の発現が失われると多くの遺伝子の発現が変動した。脳と肝臓で共通に発現が上昇していた遺伝子群の中には *in silico* 解析により得られた標的遺伝子候補が有意に濃縮されており、これらの遺伝子の多くは MEF に microRNA

を投与することにより発現の抑制が見られた。

これらのことから、*AntiPeg11/Rt11as* 由来の microRNA は標的遺伝子群の発現を調節することにより発生に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。



これらの結果を受け、現在は「更なる表現型の探索」、「microRNA として機能している器官の同定」、「表現型の原因となっている標的遺伝子の同定」、「レスキュー実験による表現型の回復とヒト UPD(14)pat 治療法の開発」を行っている。

これらの結果はヒトの重篤な先天性障害の発症機構の解明、治療法に大きく寄与するものと考えられる。現在、ヒト UPD(14)pat の症例報告は国内で数十例と多くないが、生殖医療の進展とともにこうしたインプリント遺伝子の発現異常による疾患の報告は増加しており、その発症機構の解明、治療法の開発は重要な課題である。

また、*Peg11/Rt11* は哺乳類特異的なレトロトランスポゾン由来の遺伝子であり、ファミリー遺伝子である *Peg10* とともに胎盤の形成に重要な役割を果たす進化的にも興味深い遺伝子である。哺乳類ゲノムにおいて急激に増加したレトロトランスポゾンが、そのアンチセンス RNA までも積極的に利用して発生を制御しているということは哺乳類のゲノム進化を考える上で注目すべき事例である。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① ○遠藤大輔<sup>5</sup>、関田洋一<sup>14</sup>、金児-石野知子<sup>15</sup>、鏡雅代<sup>16</sup>、小野竜一<sup>17</sup>、幸田尚<sup>18</sup>、緒方勤<sup>19</sup>、石野史敏<sup>20</sup>. *Peg11/Rt11* の antisense RNA である *AntiPeg11* にコードされる miRNA は *Peg11/Rt11* 以外の遺伝子の発現も制御する. 日本エピジェネティクス研究会第 3 回年会. 東京 (2009 年 5 月 22-23 日)
- ② ○遠藤大輔、関田洋一、金児-石野知子、鏡雅代、小野竜一、幸田尚、緒方勤、石野史敏. 生存に必須なアンチセンス RNA, *AntiPeg11/Rt11* が生体において果たす役割の二面性. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜 (2009 年 12 月 9-12 日)
- ③ ○遠藤大輔、関田洋一、金児-石野知子、石野史敏. *AntiPeg11/Rt11* 由来の microRNA は *Peg11/Rt11* とは独立に胚の成長や骨形成を制御する. 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会. 米子 (2010 年 5 月 28-29 日)
- ④ ○遠藤大輔<sup>5</sup>、関田洋一<sup>14</sup>、金児-石野知子<sup>15</sup>、小野竜一<sup>17</sup>、幸田尚、石野史敏. 12 番染色体上のインプリンティング遺伝子 *Peg11/Rt11* とそのアンチセンス RNA にコードされる microRNA は独立した経路で協調的に働きマウスの胚の成長、ろっ骨の形成を正に制御する. 第 33 回日本分子生物学会年会. 神戸 (2010 年 12 月 7-10 日)