

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19213

研究課題名(和文)長鎖RNAシーケンスによるCryptic exonの探索

研究課題名(英文)Identification of Cryptic exon by long RNA sequencing

研究代表者

宮脇 慎吾(Miyawaki, Shingo)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70756759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：隠れエキソン(Cryptic exon)は、特定の細胞・時期・病態の転写産物のバリエーションを構成するエキソンである。申請者は、性決定期の生殖腺体細胞のトランスクリプトームのデータから未知のCryptic exonを探索した。生殖腺の長鎖RNAシーケンスおよびCap Analysis of Gene Expression(CAGE)シーケンスから、Cryptic exonの探索した結果、Sryの転写調節に重要な役割を持つことが知られているGata4においてCryptic exonを見出した。現在、このCryptic exonをゲノム編集で欠失させたマウスを作出し、マウスの系統化と解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、レトロトランスポゾンの挿入で生じた新たなエキソン化によるCryptic exonが、新規遺伝子の形成や筋ジストロフィーの原因のような生物の発生や疾患に重要な役割を果たすことが知られている。本申請研究は、既存の解析では見つけられなかった現象を長鎖RNAシーケンス解析とCAGEシーケンスにより網羅的に探索することに挑戦する提案であり、新技術により新たな生命現象を発見できる可能性を含有している。今後、様々な生命現象に關与するCryptic exonを同定することことで、Cryptic exonが關与する病気の原因解明など、医学・生物学分野に大きなインパクトを与えると予想できる。

研究成果の概要(英文)：A hidden exon (Cryptic exon) is an exon that constitutes a transcript variant in a specific cell, stage, or condition. Through previous studies, the applicant has explored the possibility that unknown Cryptic exons may be harbored in other genes based on data from the transcriptome of gonadal somatic cells during the sex-determination phase. In other words, long RNA sequencing and Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) sequencing reveal transcriptomic diversity, which can be used to identify transcripts in which Cryptic exons may be latent. In this year's search for Cryptic exons in the gonads, we found a previously unknown Cryptic exon in Gata4, which is known to play an important role in the transcriptional regulation of Sry. The Cryptic exon was genome-edited by cutting the region between the exons, and mice deficient in the Cryptic exon were generated. We are now proceeding with the lineage development of these mice through crossbreeding.

研究分野：分子生物学

キーワード：cryptic exon ゲノム編集 long read

### 1. 研究開始当初の背景

隠れエクソン (Cryptic exon) は、特定の細胞・時期・病態の転写産物のバリエーションを構成するエクソンである。これまでの研究によって申請者は、ほ乳類の性決定遺伝子 *Sry* にレトロトランスポゾン自身の遺伝子の一部として“転用”した Cryptic exon が存在し、そのエクソンで構成される *Sry-T* が真の性決定遺伝子であることを明らかにした (Miyawaki et al., *Science* 2020)。性決定遺伝子 *Sry* に限らず、未知の Cryptic exon が他の遺伝子にも潜んでいる可能性がある。本申請研究では、これら未同定の Cryptic exon の探索に挑む。

### 2. 研究の目的

これまでも、レトロトランスポゾンの挿入で生じた新たなエクソン化による Cryptic exon が、新規遺伝子の形成や筋ジストロフィーの原因のような生物の発生や疾患に重要な役割を果たすことが知られている (Kaessman et al., *Genome Research* 2010, Goke et al., *EMBO rep.* 2016)。本申請研究では、申請者が性決定遺伝子 *Sry* で Cryptic exon を発見した方法を拡張することで、未知の Cryptic exon を同定することを目的とする。Cryptic exon を同定することができれば、遺伝子の新たな側面を浮き彫りにするものとなる。

### 3. 研究の方法

上述の発見は、長鎖 RNA シーケンスおよび Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) シーケンスといった先端トランスクリプトミクス解析を駆使することで成し得た (図 1)。これまで頻りに使用されてきた短鎖 RNA シーケンスは、シーケンス単位 (リード) が短いため、各リードがどの転写産物に由来するかを判定できなかった。一方で、長鎖 RNA シーケンスは、転写産物をひと続きでシーケンスするため、転写産物のバリエーションを明確に区別できる。すなわち、転写産物の多様性を明らかにすることで、Cryptic exon が潜む転写産物を同定することができる。

申請者は、マウスの性決定期の生殖腺の短鎖 RNA シーケンス、長鎖 RNA シーケンスおよび CAGE シーケンスのデータセットを既に得ている。これらのデータを使って、性決定に関与する Cryptic exon の探索を実施する (図 1)。具体的には、短鎖 RNA シーケンスの結果をゲノムにマッピングし、転写されている領域を統計的に抽出する。抽出した領域から、既知の遺伝子領域を除外することで、Cryptic exon、ノンコーディング RNA (ncRNA) および未同定の遺伝子を抽出する。長鎖 RNA シーケンスにより、遺伝子とエクソン-イントロン構造を形成しているものを抽出して Cryptic exon を絞り込む。最終的に、ゲノム編集により Cryptic exon を欠損させたマウスを作製して、Cryptic exon の生物学的意義を検証する。性決定期の生殖腺の解析により研究のプラットフォームを確立し、その後、中枢神経系において同様の解析を実施し、このプラットフォームの拡張性を検証する。

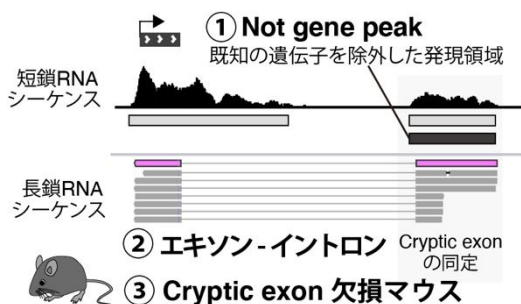


図 1 : Cryptic exon の絞り込み方法。

### 4. 研究成果

性決定遺伝子 *Sry* の Cryptic exon を発見した経緯を以下に示す。申請者は性決定期の *Sry* 発現細胞の遺伝子発現を調べたところ、*Sry* の近傍に未知の転写産物を発見した。当初、ncRNA を想定していたが、長鎖 RNA シーケンス解析を実施したところ、発見した転写産物は *Sry* のエクソンであることを明確に示すことができた。このプロセスを、他遺伝子、他細胞に適用することで、未同定の Cryptic exon を発見できるのではないかと着想した。遺伝子周辺の転写産物や機能未知の ncRNA の中には Cryptic exon が含まれている可能性がある。長鎖 RNA シーケンスと CAGE シーケンスを組み合わせることで Cryptic exon を明確に示すことができる。

本研究で、生殖腺で Cryptic exon を探索したところ、*Sry* の転写調節に重要な役割を持つことが知られている *Gata4* において、これまでに知られていない Cryptic exon を見出した (図 2)。次に、当該 Cryptic exon をゲノム編集の標的として、Cryptic exon をゲノム上から欠損させたマウスの表現型を解析する実験を計画した。当該 Cryptic exon を挟むイントロン領域にガ

イド RNA を設計し、挟まれた領域を欠損させたマウスを作製した。現在、このアليلをホモで有するマウスを作出し、系統化を進めているところである。

本申請研究は、既存の解析では見つけられなかった現象を長鎖 RNA シーケンス解析で網羅的に探索することに挑戦する研究提案であり、新技術により新たな生命現象を発見できる可能性を含有している。本研究で確立するプラットフォームは、性決定や神経発生のみならず、今後、様々な生命現象に關与する Cryptic exon を同定することに貢献できる。将来的には、疾患に關与する Cryptic exon の探索など、病気の原因解明に発展することで、医学・生物学分野に大きなインパクトを与えると予想する。

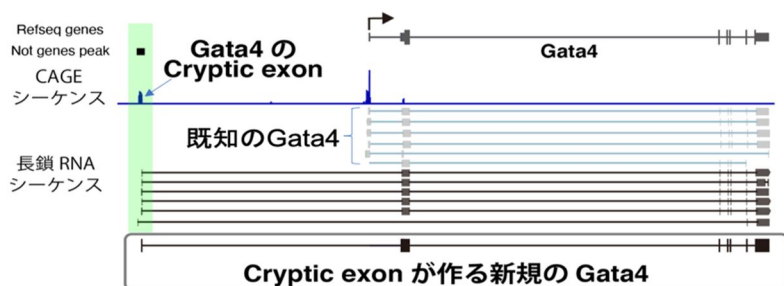


図 2 : *Gata4* の Cryptic exon を発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Mamu, Miyawaki Shingo, Kuroda Taishin, Umeta Miyu, Kawabe Mifumi, Watanabe Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Erythritol inhibits the growth of periodontal-disease-associated bacteria isolated from canine oral cavity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e10224 ~ e10224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e10224	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0件

〔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
---------	---------