

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659099
 研究課題名（和文）タンパク質をコードしない RNA による、精巣の幹細胞制御機構の解析
 研究課題名（英文）Analysis of non-coding RNA expression in stem and progenitor cells in mouse testes
 研究代表者
 大保 和之 (OHBO KAZUYUKI)
 横浜市立大学・医学研究科・教授
 研究者番号：70250751

研究成果の概要（和文）：

精巣幹細胞が自己複製能を喪失して前駆細胞へ移行する際に、形態学的視点から核内での変化を詳細に観察するとヘテロクロマチン化が急速に進行していた。さらに、この移行時に遺伝子発現を比較すると、大きく遺伝子発現パターンが変化していることを見出した。このような変化の一因として、最近蛋白質をコードしない RNA が関与していることが示されている。本研究では、精巣の幹細胞、前駆細胞それぞれに特異的に発現している miRNA や核内長鎖 non-coding RNA を探索し明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In mice, we found that the significant progression of heterochromatin formation occurred at the transition from stem to progenitor cells in adult male germ cells. In addition, the gene expression pattern was also significantly changed at the transition. Since it has been reported that non-coding RNA plays an important role in heterochromatin formation, resulting in changing of gene expression profiles, we analyzed and compared the expression profiles of miRNA and long non-coding RNA between stem cells and progenitor cells in adult male germ cells. We found several miRNA and long non-coding RNA that were specifically expressed in each of the cell populations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：幹細胞 精巣 Non-coding RNA 細胞分化 ゲノム修飾

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究において、精巣幹細胞特異的発現分子の同定は、幹細胞研究の常套手段として様々な臓器において行われてきた。同定された分子は、幹細胞で発現しているといってもそれぞれ異なる染色体上にあり、異なる転写因子の発現制御を受けている。従って、どのようにして全ての分子が同時に幹細胞で発現するように制御され

ているか、という点に対する答えを出すのは難しい。この質問に答えるために我々は、より高次に遺伝子発現制御を行っているエピジェネティクスの視点から、精巣の幹細胞と前駆細胞においてゲノム修飾が異なるのではないかと仮定し詳細に検索した。その結果、DNAメチル化酵素の発現や抑制性ヒストン修飾の一部が大きく異なることを見出した。これら、遺伝子発現を

基本的に抑制するゲノム修飾は、核においてゲノムのヘテロクロマチン化を進展させることに関与している。

一方、タンパク質をコードしている遺伝子はヒトではわずか2万5千個程度しかなく、ゲノムの大部分はタンパク質をコードせず、そこから多種多様な機能的な non-coding RNA が発現していることが知られていた。これら non-coding RNA の機能は、前述したヘテロクロマチン化からタンパク質の翻訳抑制に至るまで多岐に渡っている。そして、この non-coding RNA も細胞形質の多様性を生み出すにあたり大きな役割を果たしていることが報告されていたので、幹細胞分化に non-coding RNA が重要な役割を果たしているのではないかと考え、精巣幹細胞から幹細胞活性を失い前駆細胞へと分化する際に機能している non-coding RNA を同定しその役割を明らかにすることを目的に本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究ではタンパク質をコードしない non-coding RNA が、幹細胞から前駆細胞へと分化する際に大きな役割を果たしているのではないかという仮定のもと、non-coding RNA の中でも “micro-RNA” と “核内長鎖 non-coding RNA” の2つに焦点を絞って解析を行い、幹細胞、前駆細胞それぞれに特異的に発現している上記2つのタイプの non-coding RNA を同定し、これらが幹細胞分化にどのように機能しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 精巣幹細胞、前駆細胞分画の純化: Neurogenin-3 の promoter の下流に GFP を繋いだトランスジェニックマウスなどを用いてセルソーターにてそれぞれの細胞分画を集める。

(2) micro-RNA 解析のための小分子 RNA、長鎖 non-coding RNA 解析のための高分子 RNA の調整を、純化した細胞を用いてそれぞれ行う。

(3) 次世代シーケンサーを用い、micro-RNA の大規模シーケンスを行い、幹細胞特異的発現分子に関連ありそうな候補 micro-RNA の同定を in silico で行う。

(4) タイリングアレイを用いた長鎖 non-coding RNA の同定を行う。

(5) (3) (4) の結果から、幹細胞から前駆細胞への分化過程において、その発現が特異的に変化(増加或は減少)している分子に絞り込む。

(6) 絞り込んだ分子について、培養精巣幹細胞株を用い、過剰発現や機能抑制実験を行い、幹細胞活性への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 幹細胞分画、前駆細胞分画の純化と低分子 RNA、高分子 RNA の調整

Neurogenin-3 promoter 下に蛍光緑色蛋白 GFP を持つトランスジェニックマウス(以下 Ngn3-GFP マウス)を用い、精巣の mitosis 期の精原細胞を、自己複製能がある幹細胞と、それを喪失し精子形成へ向けて分化をスタートさせた前駆細胞に、セルソーター(蛍光励起細胞分取装置=以下 FACS)を用いて純化した。GFP 陽性の細胞中、チロシンキナーゼ型膜蛋白 Kit が陰性の細胞は幹細胞であり、Kit 陽性化に伴って速やかに幹細胞活性を喪失し前駆細胞になる。初年度に、比較的細胞数が多くとれる前駆細胞分画については必要細胞数を集めることができたが、幹細胞分画については数が少ないため初年度では必要細胞数が予定通りには集まらず、2年目になって必要数に達することができた。これは毎回純化細胞の一部をとって純度を確認していたためその分細胞をロスすることも一因であった。従って、予定以上に純化実験を繰り返すことが必要となった。

(2) miRNA, 核内長鎖 non-coding RNA の同定

幹細胞、前駆細胞の各分画で、micro-RNA などが特異的に濃縮されるように、15-35bp の RNA フラクションを選択的に精製し、その後はコマーシャルに入手可能な

キットを用い、すべてその方法論に従ってシーケンス用サンプルの準備を行った。前駆細胞分画はIllumina社のGenome Analyzer IIxを用い、幹細胞分画はHiSeqを用いてシーケンスを行った。また、核内長鎖 non-coding RNAについては、アジレント社製のDNAマイクロアレイを用い発現を検索した。その結果、核内長鎖 non-coding RNAについては前駆細胞での発現が幹細胞に比較して多かった。miRNAについては、幹細胞において前駆細胞に比較して10倍以上高く発現しているものが25分子、逆に、前駆細胞で幹細胞より10倍以上高く発現しているものが58分子同定された。現在、新たに幹細胞と前駆細胞を純化し、スクリーニングで大きく変化のあった上記のmiRNAについて、それが正しいか検証を行っており、確認が取れたmiRNAについては、順次TargetScanを用いて下流と考えられる遺伝子群を探索しているところである。

現在進行中の研究

最初の計画では初年度に解析に必要な細胞数を得られる予定であったが、実際は十分な純度が担保された幹細胞分画の細胞を必要数得ることが予想以上に難しく、2年目にやっと必要数を確保できシーケンスを行った。これにより、幹細胞と前駆細胞での違いを比較解析するのが遅くなり、現在はそれぞれの分画に特異的に発現している分子の絞り込みまで到達したところである。現在、スクリーニングで得られた結果が正しいか、絞り込んだ分子の検証を行っているところであるが、今後本研究で得られたデータから、幹細胞から前駆細胞へと移行する際に著名な動きがあるmiRNAと核内長鎖 non-coding RNAについて、その標的となる下流遺伝子やゲノム領域などを明らかにするとともに、培養精原細胞株を用いてこれら分子の過剰発現実験や機能抑制実験を行い、機能解析をすすめたい。今後詳細なメカニズムに関する研究展開は基盤研究として展開したいと考えている。

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3件)

1. SI. Yamashita, K. Tokuishi, T. Moroga, S. Yamamoto, K. Ohbo, S. Miyahara, Y. Yoshida, J. Yanagisawa, D. Hamatake, M. Hiratsuka, Y. Yoshinaga, T. Shiraishi, A. Iwasaki and K. Kawahara.

Serum level of HE4 is closely associated with pulmonary adenocarcinoma progression.

Tumour Biol. 33:2365-2370. (2012)

doi: 10.1007/s13277-012-0499-8 査読あり

2. K. Tokuishi, SI. Yamashita, K. Ohbo and K. Kawahara.

Splice variant HE4-V3 expression is associated with favorable prognosis in pulmonary adenocarcinoma

Tumour Biol. 33:103-109. (2012)

doi: 10.1007/s13277-011-0252-8 査読あり

3. Y. Takada, C. Naruse, Y. Costa, T. Shirakawa, M. Tachibana, J. Sharif, F. Kezuka-Shiotani, D. Kakiuchi, H. Masumoto, Y. Shinkai, K. Ohbo, A. H. F. M. Peters, J. A. M. Turner, M. Asano and K. Koseki.

HP1 links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice.

Development. 138:4207-4217. (2011)

doi: 10.1242/dev.064444. 査読あり

[学会発表] (計6件)

1. 10th. EMBL Conference, Transcription and Chromatin.

K. Ohbo, T. Shirakawa and H. Koseki.

“Changing epigenetic modification and chromocenter formation associating with spermatogonia differentiation.”

2012年8月26日, EMBL, Heidelberg, Germany

2. The 58th/60th NIBB Conference, Germline Specification, Sex, and Stem Cells.

K. Ohbo

“Analysis of epigenetic changes associated with spermatogonia stem cell differentiation.”

2012年7月21日、岡崎カンファレンスセンター
(愛知県)

3. 第117回日本解剖学会総会・全国学術総会
大保和之、白川峰征、神里亮人、中島久仁子、
古関明彦

“マウス精子形成過程における幹細胞と前
駆細胞をゲノム修飾からとらえる”

2012年3月28日、山梨大学甲府キャンパス
(山梨県)

4. Keystone Symposia, Epigenomics,
Chromatin Dynamics.

K. Ohbo, T. Shirakawa,

R. Yaman-Deveci, Y. Kamizato, K. Nakajima,

H. Sone, Y. Sato, S. Jafar,

Y. Takada-Horisawa, S. Yoshida, K. Ura,

M. Muto and H. Koseki.

“Analysis of epigenetic feature of
spermatogonial stem cells in mice.”

2012年1月19日, Keystone resort, Keystone,
USA.

5. Stem Cells in Development and Disease.

T. Shirakawa, R. Yaman-Deveci, Y. Kamizato,

K. Nakajima, H. Sone, Y. Sato, S. Jafar,

Y. Takada-Horisawa, S. Yoshida, K. Ura,

M. Muto, H. Koseki, T. Suda and K. Ohbo.

“Identification of an epigenetic
checkpoint that controls the
differentiation from spermatogonial stem
cells to progenitor cells.”

2011年9月12日

Max-Delbrueck-Center, Berlin, Germany

6. EMBO Conference Series on Chromatin and
Epigenetics.

K. Ohbo

“An epigenetic checkpoint controls the
transition from a stem cell pool to a
progenitor cell stage in testes.”

2011年6月3日、EMBL, Heidelberg, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大保 和之 (OHBO KAZUYUKI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70250751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：80325638