

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660250

研究課題名(和文) マウス初期胚エピゲノム変換に資するプロモーター非コードRNA機能の解明

研究課題名(英文) Function of promoter-associated non-coding RNA for the epigenome formation in the early mouse embryo

研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA, TAKUYA)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90390682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス初期胚の次世代シークエンサー解析から得られた一本鎖の非コードRNA(ncRNA)について、ゲノム配列特異的エピジェネティクス変換に係る機能性を解析し、これを基礎として、RNAを利用した人為操作胚の質的向上に向けた知見を得ることを目的とした。これまでは、遺伝子発現をOFFにするncRNAはよく知られていたが、本研究によりDNA脱メチル化などを介して遺伝子ONに働くncRNAを1000以上同定することに成功した。インターロイキン17d遺伝子その他5つのpancRNAについては、遺伝子の発現を介して細胞増殖・アポトーシス抑制・細胞運命決定に確かに機能することまで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mice, zygotic activation occurs for a wide variety of genes, mainly at the 2-cell stage. In this study, directional RNA-seq of MII oocytes and 2-cell embryos identified more than 1000 divergently transcribed long noncoding RNA (lncRNA)/mRNA gene pairs. Expression of these bidirectional promoter-associated noncoding RNAs (pancRNAs) was strongly associated with the upregulation of their cognate genes. Conversely, knockdown of three abundant pancRNAs led to reduced mRNA expression, accompanied by sustained DNA methylation even in the presence of enzymes responsible for DNA demethylation. In particular, microinjection of siRNA against the abundant pancRNA partner of interleukin 17d (Il17d) mRNA at the 1-cell stage caused embryonic lethality, which was rescued by supplying IL17D protein in vitro at the 4-cell stage. Thus, this novel class of lncRNAs can modulate the epigenetic machinery in cis to activate zygotic genes and is essential for preimplantation development.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ノンコーディングRNA DNAメチル化 DNA脱メチル化 遺伝子活性化 人為操作胚 雌性発生胚

1. 研究開始当初の背景

核移植/iPS細胞作製技術は家畜の効率的生産等の応用展開へのシーズであるが、両技術とも低成功率であるという大問題を抱えている。RNAは生化学的にも壊れやすい分子であり、したがって上記のゲノムプログラミングを伴う再生関連技術が安定しないことを説明する格好の分子標的である可能性が高い。

生物の設計図とも言われるゲノムDNAには、タンパク質を作る命令を出す遺伝子の他にも、タンパク質にはならずRNAとして機能を発揮する分子群を生み出す情報がコードされている。このようなRNAはノン(タンパク質)コーディングRNAあるいは非コードRNA(ncRNA)と呼ばれており、2006年には、米国のCraig Mello博士とAndrew Fire博士が、短い二本鎖RNA(<40塩基)による遺伝子の抑制機構である「RNAi」の発見によりノーベル医学・生理学賞を受賞している。2001年にヒトゲノムDNAの配列解読がなされて以来、ビッグデータ解析を基礎とした大規模RNA解読が進行しており、その過程において、短い二本鎖RNA以外にも多種多様なncRNAが見つかってきている。

2. 研究の目的

本研究では、まず、次世代シーケンサー解析から一本鎖のncRNAを同定し、バイオフィンフォマティクスにより統合的にmRNA発現情報と紐付けたデータベースを構築することを第一目標とした。また、得られるncRNAについてゲノム配列特異的のエピジェネティクス変換に係る機能性を実証し、これを基礎としてRNAを利用した人為操作胚の質的向上に向けて、マウス受精卵等を用いて検討した。特に、初期胚は受精後に全能性型遺伝子発現パターンを精確に再現するために配列特異性が高い分子である長鎖ncRNAによる制御機構を利用している、と予測し、それを検証することを最大の目標とした。

3. 研究の方法

promoter-associated noncoding RNA(pancRNA)と名付けた、両方向性の遺伝子プロモーター領域から遺伝子とは反対方向に転写されるpancRNAに着目した。pancRNAはいくつかの遺伝子座において、プロモーター領域を配列特異的にDNA脱メチル化し、パートナーとなる遺伝子を活性化することを我々のグループがすでに報告していた。そこで、胚性遺伝子活性化の際に多数のpancRNAが配列特異的遺伝子活性化に寄与しているという仮説をたて、以下の大別した3つの方法により検証した。

1) 当該課題が文科省新学術領域研究「ゲノム支援」の支援課題にも選ばれたため、次世代シーケンサー解析からの初期胚型pancRNA

含有遺伝子の網羅的取得を目指し、イルミナ社HiSeq2000を用いて、マウス微量RNAサンプルからのdirectional RNA-seq解析を強力に進めた。同様に、ブタのpancRNAについても生体におけるpancRNAの同定を進めた。

2) 項目1)で取得した初期胚型pancRNAのうち、ノックダウンにより胚性致死となるI117d遺伝子のpancRNA(pancI117d)について、機能解析をさまざまな細胞実験系を構築して遂行した。

3) 人為操作胚においてpancRNAの標的となりうるDNAメチル化異常をゲノムワイドに明らかにするため、マウス雌性発生胚を活用したPost-Bisulfite Adapter-Tagging(PBAT)法によるDNAメチローム解析を行った。

4. 研究成果

pancRNAのそれぞれは、特定の遺伝子とペアで機能しうることを確かめた。これまで、遺伝子機能をOFFにするノンコーディングRNAはよく知られていたが、今回、下述するように、pancRNAは、確かに遺伝子機能をONにするメカニズムに関与することで、ほ乳類個体発生のごく初期から機能していることが明らかになった。

まず、受精前後のマウス初期発生胚を用いて、directional RNA-seq解析を行ったところ、胚性遺伝子活性化時にpancRNA群が1000以上の遺伝子座からパートナーとなるmRNAに共役して転写されていることが明らかになった。そのうちの代表的な5つのpancRNAの機能解析結果から、マウス初期発生において、pancRNAが胚性遺伝子活性化メカニズムに寄与し、パートナーとなる直下の遺伝子を配列特異的に活性化する役割を担っていることが明らかになった。

興味深いことに機能解析を深化する過程で、インターロイキンファミリーの一つであるI117d遺伝子をパートナーとするpancRNAであるpancI117dのノックダウンが胚盤胞形成不全を引き起こすことが明らかになった。その阻害効果はIL17Dタンパク質の培養液中添加によりレスキューできた。胚盤胞形成期はマウス初期発生において、初めての細胞系列分岐が起こる重要なステージであり、この細胞系列分岐によって多能性を持つ内部細胞塊と胎盤系列細胞の栄養芽層が生み出される。したがって、その制御機構の解明は発生生物学上、極めて重要な課題であり、pancI117dノックダウンによる細胞系列分岐への影響を解析した。pancI117dノックダウンにより、桑実胚期に異所性の細胞死が亢進することが示された。pancI117dノックダウン胚のRNA-seq解析からは細胞死関連遺伝子に加え、栄養芽層分化と多能性細胞分化関連遺伝子発現にも異常をきたしていることが

示された。さらに、内部細胞塊の培養およびES細胞におけるノックダウン実験から、panc117dは細胞増殖を促進することが分かった。以上から、panc117dはI117d遺伝子を活性化することで、初期発生における細胞生存・細胞増殖・細胞運命決定に重要な役割を果たしていることが示された(図1)。

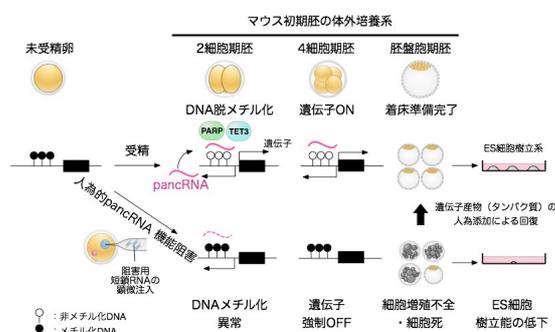


図1 pancRNAによる遺伝子発現ONの効果

上記のメカニズムが細胞の人為操作により乱される可能性が考えられたため、PBAT法によるDNAメチローム解析を人為操作胚に適用し、その妥当性を探索した。その結果、母方由来ゲノムにおいて、受動的脱メチル化領域以外にも、受精から二細胞期までに能動的脱メチル化あるいは新規メチル化が起こりうる39,000領域の同定に成功した。これらの可変領域には反復配列であるLTRのMERVKファミリー属する配列が多く含まれていた。今後の展開として、DNAメチル化異常領域による遺伝子発現の乱れについて、それを是正するための自在制御を目指して、pancRNAを含むncRNAの活用が見込まれた。

様々な動物種から得られてきた細胞リソースを医療・農畜産応用に結びつける上で、動物種差を理解し、安全性を考慮しながら活用することが必須である。機能性ncRNAが、遺伝子機能抑制だけでなく発生の最初期から遺伝子活性化に働くことを発見した本研究成果により、動物種を超えて遺伝子のスイッチON/OFFを制御する研究展開が見込まれた。

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5件)

Junko Tomikawa, Yoshihisa Uenoyama, Makiko Ozawa, Tatsuya Fukanuma, Kenji Takase, Teppei Goto, Hitomi Abe, Nahoko Ieda, Shiori Minabe, Chikaya Deura, Naoko Inoue, Makoto Sanbo, Koichi Tomita, Masumi Hirabayashi, Satoshi Tanaka, Takuya

Imamura, Hiroaki Okamura, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura. Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA, 109:E1294 (2012) doi: 10.1073/pnas.1114245109

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Yasuhiro Go, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals BMC Genomics 15:35 (2014) 10.1186/1471-2164-15-35

Takuya Imamura, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima Epigenetic setting and reprogramming for neural cell fate determination and differentiation. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, 369:1652 (2014) doi: 10.1098/rstb.2013.0511

Teppei Goto, Junko Tomikawa, Kana Ikegami, Shiori Minabe, Hitomi Abe, Tatsuya Fukanuma, Takuya Imamura, Kenji Takase, Makoto Sanbo, Koichi Tomita, Masumi Hirabayashi, Kei-ichiro Maeda, Hiroko Tsukamura, Yoshihisa Uenoyama. Identification of hypothalamic arcuate nucleus-specific enhancer region of kiss1 gene in mice. Molecular Endocrinology, 29:121 (2015) doi: 10.1210/me.2014-1289

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. Development 142:910 (2015) doi: 10.1242/dev.116996

[学会発表] (計20件)

浜崎伸彦、今村拓也
マウス初期胚における卵活性化刺激依存性非コードRNA発現による遺伝子プロモーターの脱メチル化
第6回日本エピジェネティクス研究会年会
2012年5月15日
学術総合センター(東京都千代田区)

上坂将弘、西村理、宇野健一郎、上田泰己、大石高生、今井啓雄、阿形清和、今村拓也
マカクザル特異的偽遺伝子挿入に由来する

非コード RNA による遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化
第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会
2012 年 5 月 15 日
学術総合センター (東京都千代田区)

Nobuhiko Hamazaki, Takuya Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs
mediate oocyte-activation-induced CpG and
non-CpG demethylation in the early mouse
embryo
第 45 回日本発生生物学会年会
2012 年 5 月 29 日
神戸国際会議場 (神戸市)

浜崎伸彦、今村拓也
遺伝子プロモーター非コード RNA はマウス人
為活性化胚の CG/非 CG 配列の脱メチル化を仲
介することで異常 DNA メチル化パターン形成
に関与する
第 105 回日本繁殖生物学会大会
2012 年 9 月 6 日
筑波大学 (つくば市)

Takuya Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs for
the sequence-specific epigenetic
alterations during mammalian development
The 1st Hungarian Epigenetics Meeting
2012 年 9 月 20 日
Simmelweis Egyetem, NET (Budapest,
Hungary)

上坂将弘、西村理、大石 高生、今井啓雄、
阿形 清和、今村拓也
マカクザル特異的偽遺伝子挿入に由来する
非コード RNA による遺伝子プロモーターの
DNA 脱メチル化
2012 年 12 月 12 日
福岡国際会議場 (福岡市)

浜崎伸彦、今村拓也
マウス初期発生胚においてプロモーターノ
ンコーディング RNA は卵活性化刺激に応答し
て CG と非 CG 配列の脱メチル化を仲介する
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 14 日
福岡国際会議場 (福岡市)

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka,
Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya
Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs
mediate gene-specific DNA demethylation
for mouse preimplantation development
第 7 回エピジェネティクス研究会年会
2013 年 5 月 30 日
奈良県新公会堂 (奈良市)

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Kinichi
Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura
プロモーターノンコーディング RNA によ
るほ乳類エピゲノム形成
Mammalian epigenome formation mediated by
promoter-associated noncoding RNA
第 7 回エピジェネティクス研究会年会
2013 年 5 月 30 日
奈良県新公会堂 (奈良市)

Takuya Imamura
Epigenome formation in the mammalian brain
mediated by promoter-associated noncoding
RNA
Neuro2013
2013 年 6 月 21 日
国立京都国際会館 (京都市)

上坂将弘、西村理、郷康広、中島欽一、阿形
清和、今村拓也
霊長類特異的偽遺伝子挿入に由来する非コ
ード RNA による遺伝子プロモーターの DNA 脱
メチル化
第三回 NGS 現場の会
2013 年 9 月 4 日
神戸国際会議場 (神戸市)

山本直樹、今村拓也
PC12 細胞を用いた不可逆的神経細胞分化制
御に関わる RNA の発現動態解析
第三回 NGS 現場の会
2013 年 9 月 4 日
神戸国際会議場 (神戸市)

上坂将弘、西村理、郷康広、中島欽一、阿形
清和、今村拓也
ノンコーディング RNA 群による遺伝子活性化
と大脳皮質における多様化
第七回神経発生討論会
2014 年 3 月 13 日
大阪大学 (吹田市)

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka,
Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya
Imamura
Promoter-associated noncoding RNAs
mediate gene-specific DNA demethylation
for mouse preimplantation development
第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会
2014 年 5 月 26 日
伊藤国際学術研究センター (東京都文京区)

山本直樹、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、
今村拓也
PC12 細胞分化過程におけるエピジェネティ
ック制御に関わる promoter-associated
noncoding RNA の機能
第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会
2014 年 5 月 26 日

伊藤国際学術研究センター（東京都文京区）

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura
Potential role for species-specific promoter-associated non-coding RNAs in the diversification of mammalian brain
第47回日本発生生物学会年会
2014年5月27日
ウインクあいち（名古屋市）

濱崎伸彦, 上坂将弘, 中島欽一, 阿形清和, 今村拓也

マウス初期胚の全能性を支える遺伝子を活性化するノンコーディング RNA の同定
第107回日本繁殖生物学会大会
2014年8月21日
帯広畜産大学（帯広市）

今村拓也

長鎖 ncRNA によるほ乳類エピゲノム制御
第157回日本獣医学会学術集会
2014年9月11日
北海道大学高等教育推進機構（札幌市）

Naoki Yamamoto, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura
Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells
第8回神経発生討論会
2015年3月19日
九州大学病院キャンパス（福岡市）

Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura
Species-specific repertoires of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile
第8回神経発生討論会
2015年3月19日
九州大学病院キャンパス（福岡市）

〔図書〕（計2件）

今村拓也（分担）

脳の性差から生物多様性へ

「生き物たちのつづれ織り」阿形清和, 森哲（監修） ISBN978-4-87698-243-1 下巻 pp. 90-100, 京都大学学術出版会（2012）

Naoki Yamamoto, Masahiro Uesaka, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima（分担）

Roles of Epigenetics in the Neural Stem Cell and Neuron.

In: J. Peedicayil, D. Grayson, D. Avramopoulos (eds), ISBN 9780124171145 Epigenetics in Psychiatry, Elsevier, Amsterdam, (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

九州大学プレスリリース
特定遺伝子のスイッチ ON/OFF を制御するノンコーディング RNA の新種「pancRNA」を発見！
http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/2015/2015_02_05.pdf

研究代表者ホームページ

<http://www.scb.med.kyushu-u.ac.jp/imamura>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA, TAKUYA)

研究者番号：90390682

(2) 研究分担者

該当者なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当者なし ()

研究者番号：