

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291048

研究課題名(和文) 長鎖非コードRNAが制御する生殖細胞の維持と分化機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of germline maintenance and differentiation via long-noncoding RNAs

研究代表者

甲斐 歳恵 (KAI, TOSHIE)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：40579786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モデル生物のショウジョウバエを用いて、生殖細胞の維持と分化を制御する非コードRNAの分子機能の解析を行った。生殖幹細胞のみに発現する長鎖非コードRNAを網羅的に同定し、その発現ネットワークの解明を進めつつある。また、助成期間中に、精子形成時における小分子piRNAのダイナミクスや、piRNAの生合成におけるヘテロクロマチンタンパク質(HP1a)の役割を明らかにした。これらの成果は、生殖細胞に特異的に発現する非コードRNAの包括的理解の基礎になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular function of noncoding RNAs which regulate maintenance and differentiation of germline stem cells using *Drosophila* as a model organism. We identified wide-variety of long noncoding RNAs expressed only in germline stem cells, and we hope to elucidate their expression network. We also clarified the dynamics of small noncoding piRNA during spermatogenesis, and the role of heterochromatic protein 1 (HP1a) in piRNA biosynthesis during the subsidy period. These results would consolidate the basis for comprehensive understanding of germline-specific noncoding RNAs.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 非コードRNA 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

世代を超えて受け継がれていく生殖細胞のゲノムは、種を存続させるために、さまざまな変異の脅威から保護され、維持されねばならない。生殖細胞はその性質上、ゲノムに寄生するトランスポゾンが非常に活発に発現するのであるが、生殖巣のみ発現する、蛋白質をコードしない小分子 RNA : Piwi associated RNA (piRNA) によって抑制されている。我々の研究室では、生殖細胞に特異的に発現する Tudor ドメイン蛋白質群に着目し、それらが piRNA の産生に必須であることを明らかにしてきた (Pek JW, Anand A, and Kai T., 2012)。piRNA は生殖細胞の核膜近傍にある電子密度の高いヌアージュと呼ばれる構造体で産生・増幅され、トランスポゾンの発現を転写後抑制またはエピジェネティック制御によって抑制し、ゲノムをその脅威から保護している。

また、生殖幹細胞は、配偶子の産生を確実にするために、自分自身を再生産して幹細胞を維持するとともに、減数分裂という極めて特殊な細胞分裂を経て、配偶子へ分化していく生殖細胞を生み出さなくてはならない。この生殖細胞の運命決定や細胞分裂などのさまざまな局面で、非コード RNA が機能することが知られてきた (Pek JW, and Kai T., 2011)。

ヒトでは 16 万種におよぶ RNA のうち、およそ約半分が非コード RNA として機能していると考えられているが、そのほとんどの機能が不明のままであり、非コード RNA が生殖細胞に果たす役割も解明されていない。非コード RNA は大別すると、数十ヌクレオチドのリボ核酸からなる小分子 RNA と、200ヌクレオチド以上の長鎖 RNA に分けられる。生殖細胞には、前述の小分子 RNA のみならず、他の体細胞系列と比べて多くの非コード RNA が発現していることが報告されている。

本研究課題では、多様な遺伝学・細胞生物学ツールが豊富なモデル生物のショウジョウバエを用いて、雌雄の生殖細胞の維持と分化に果たす新規長鎖非コード RNA の機能解析を目指して研究を展開した。

2. 研究の目的

次世代を生み出す生殖細胞は動物にとって最も重要な細胞種である。生殖細胞には他の細胞種に比べて多種多様な非コード RNA が発現しており、ゲノムの保護や遺伝子発現制御に関わっているが、大半の非コード RNA の機能は未知である。本申請では、モデル生物のショウジョウバエを用いて、生殖細胞の維持と分化を制御する長鎖非コード RNA の機能解析に取り組んだ。生殖細胞の分化に伴うポリ A を持たない長鎖非コード RNA の発現パターンの変化を、最新の次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスで解析し、これま

で見逃されてきた新規非コード RNA を同定した。また、コーディング領域についても解析を行い、特に生殖幹細胞に特異的なコーディングエキソンを持つ遺伝子を幾つか同定した。これらの解析で同定された、非コード長鎖 RNA 及び特異的スプライシングパターンを示すコーディング遺伝子が、生殖細胞の維持と分化に果たす機能解析を目的として研究を展開した。

また派生プロジェクトとして、非コード長鎖 RNA だけでなく、非コード小分子である、piRNA の精子形成過程におけるダイナミクスや、卵巣におけるヘテロクロマチン領域由来の小分子非コード piRNA の生合成経路について検証した。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの生殖幹細胞は、生殖巣の先端部に位置し、ニッチと呼ばれる体細胞からなる構造体に隣接している。生殖幹細胞は、隣接するニッチから供給される細胞外因子 (卵巣では TGFβ リガンド) によって維持されている。これらのリガンドを卵巣内で過剰供給することによって、幹細胞は腫瘍化し、増殖する。また、TGFβ シグナル経路によって抑制される分化因子 Bag-of marbles (Bam) の欠損変異体でも同様に生殖幹細胞は腫瘍化する。これらの生殖細胞特異的に GFP 蛋白質を発現させた。これらの遺伝学的トリックを用いて生殖幹細胞を増幅したショウジョウバエ 200-400 個体から卵巣を解剖し、コラゲナーゼとトリプシン処理によって細胞懸濁液を作成した。その後、細胞選別器によって GFP 陽性の生殖細胞を選別し、生殖幹細胞のみを単離した。卵細胞は、野生型の卵巣から手作業で最終分化の 14 期のものを分別した。対照として、成熟卵や卵巣由来の培養体細胞、胚由来の培養体細胞、2 種の精巣サンプルとして野生型精巣 (細胞選別なし)、生殖幹細胞が増殖した Bam 欠損変異体の精巣 (細胞選別なし) を解析した。

サンプルリスト

- ① TGFβ リガンド過剰発現によって増殖した生殖幹細胞 (分別した細胞)
- ② 分化因子 Bam 欠損変異体で増殖した生殖幹細胞 (分別した細胞)
- ③ 成熟卵
- ④ 卵巣培養体細胞
- ⑤ ショウジョウバエ胚由来の培養体細胞
- ⑥ 精巣
- ⑦ 生殖幹細胞が増殖した Bam 欠損変異体の精巣

それぞれのサンプルから全 RNA を調製し、ショウジョウバエでその有効性が実証されているイルミナ社 Ribo-Zero kit を用いて、リボゾーム RNA を除去し、cDNA を作成した。新規の長鎖非コード RNA 種を同定するた

めに、圧倒的なリード数と解析総塩基数の多さを誇るイルミナ HiSeq2500 (解析総塩基数: 30~60 億) の次世代シーケンサーマシンを用いて、100bp ペアエンドでシーケンシングを行った。得られた配列を、バイオインフォマティクス解析にてゲノム上にマッピングし、非コード RNA を同定した。タキシードスーツを初めとするソフトウェアを組み合わせたパイプラインを構築し、解析を行った。

また、派生プロジェクトとして、精子形成における非コード小分子 piRNA のダイナミクスを解析した。解析には、未分化な生殖細胞が増殖した bam 及び bgcn 変異体、また第一精原細胞が蓄積した can 及び sa 変異体の精巣から小分子 RNA を精製し、ライブラリーを作成して Highseq2500 で塩基配列を決定した。ヘテロクロマチン領域由来の piRNA 生合成については、ヘテロクロマチン結合タンパク質である HP1a の piRNA 産生での機能を検証した。HP1a の機能を shRNA で生殖細胞特異的にノックダウンさせ、卵巣から RNA を抽出した。トランスポソンの発現解析にはこの RNA からライブラリーを作成し、300-400 延期長の cDNA を解析した。また、小分子の解析には小分子 RNA のライブラリーを作成し、解析した。さらに、Piwi タンパク質に結合している piRNA を解析した。それぞれから、どの piRNA が影響を受けているかをバイオインフォマティクスで解析した。

4. 研究成果

約 300-400 塩基長の cDNA ライブラリーを調製した。次世代塩基配列決定法を用いて、7 千万から 1 億リードの塩基配列情報が得られた。これらの配列をショウジョウバエのゲノム配列にマッピングしたところ、約 70% のリードをマッピングすることが出来た。既知の遺伝子の発現量については、14,000 の全遺伝子中、それぞれの細胞種で 8,000 から 10,000 遺伝子が発現していた (FPKM>1)。7 つの細胞種について、各ペアでの発現遺伝子比較を行ったところ、それぞれ 1,000-2,000 の遺伝子が有意に変動していることが明らかとなった。新規な転写物については、特に精巣内で特異的に発現している新規遺伝子候補が多く見つかった。

これまでに、解析したいずれかのサンプルで有意な発現レベルを示す既知の計 630 種の非コード長鎖 RNA (lncRNA) を同定した。これらのうち 96 個が生殖系列細胞に特異的な発現を示す。そのうちの 80% が生殖幹細胞で高い発現を示した。

現在、幾つかの異なる解析パイプラインを用いて、lncRNA の数と発現量の差を比較している。予備的解析から、それらの解析法のうち、スプライスグラフおよび t-DBG グラフに

基づくワークフローが lncRNA をより強固に同定し、発現量の差についてもより確かな推定ができると考えている。我々は、生殖系列幹細胞および体細胞集団における長期コード RNA を確実にするために、堅牢な統計分析を行っている。

新規非コード長鎖 RNA (lncRNA) を探索するために、現在までにアノテートされているコーディング遺伝子を除外し、また転写産物に開始コドンが見られないなど、lncRNA の特徴を検出するパイプラインを構築し、バイオインフォマティクス解析を行った。スプライスグラフに基づく方法を用いて、有意なコード可能性のない約 200 の lncRNA を見出した。また、トリニティを使ってデータを分析しており、ワークフローの最適化によって、すべての転写予測ツールの中でトリニティが最も優れていると考えられる。トリニティでの予備解析によって、500 個の新規 lncRNA を同定した。現在、これらの転写産物の発現量、また発現パターンを解析中である。これらの結果は今年度中に投稿予定である。

次世代シーケンスのデータを用いて、コーディング転写産物の解析も行った。遺伝子の発現量は変わっていない場合でも、スプライシングのパターンが変化していることが考えられる。そこで、スプライシングパターンを検出するプログラムを用いて、各遺伝子のスプライシングの変化を調べた。7 つの細胞種について、各ペアでのスプライシングを比較したところ、それぞれ 600-1000 の遺伝子において、スプライシングのパターンが有意に変動していることが明らかとなった。それらのうち、タンパク質の配列に影響を与えるようなスプライシングの変化は、全体の約 2-3 割程度であった。

これらのうち、生殖幹細胞で特異的なエキソンが現れるようなスプライシングの変化に注目している。バイオインフォマティクス解析によって、体細胞系列よりも、生殖細胞で発現している転写産物は選択的スプライシングを受けるものが非常に多いことがわかった。解析結果から、注目する遺伝子をいくつか選び、RT-PCR でスプライシングの変化を確認した。これらの候補のうちの幾つかは、遺伝子機能が生殖細胞に機能していることが知られている。現在、スプライシングパターンの変化が生殖細胞の機能に必須であるかを、遺伝学的に検証している。具体的には、特定のスプライシングフォームをターゲットにした shRNA (short hairpin RNA) を発現させてノックダウンする。もしくは、特異的なエキソンの部位をターゲットにした CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により変異を作成している。

派生プロジェクトとして、精子形成時にお

ける非コード小分子 piRNA のダイナミクスを解析した。精巣では、体細胞分裂で増殖している未分化な精原細胞がやがて第一減数分裂を開始して一次精母細胞へと分化するが、この分化の過程で、生産される piRNA が全く異なっていることを見出した。piRNA は、1 次生産と、ピンポンサイクルと呼ばれる 2 次生産の二つの生合成過程があるが、精原細胞と精母細胞では、いずれの過程も異なる特徴を示し、分化の過程で piRNA の生合成が多様に制御を受けていることが明らかとなった。この成果は、2016 年に責任著者として RNA 誌に発表した。また、piRNA は、前駆体であるクラスター転写産物がヘテロクロマチン領域から転写される場合、ヘテロクロマチン結合タンパク質である HP1a が必要であることを明らかにした。HP1a は、ヘテロクロマチンからの転写に機能している Rhi タンパク質と協働し、piRNA の生合成を妨げる splicing を抑えることによって、piRNA の生合成を促進する。この成果は、2017 年度に Nature Communications に共同責任著者として発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Teo RYW, Anand A, Sridhar V, Okamura K, Kai T. (2018) Heterochromatin protein 1a functions for piRNA biogenesis predominantly from pericentric and telomeric regions in Drosophila. Nature Commun. 9:1735, 査読有
DOI: 10.1038/s41467-018-03908-3
- ② Gleason RJ, Anand A, *Kai T., and *Chen X. (2017) Protecting and diversifying the germline. GENETICS 208(2):435-471 (review article) *Co-corresponding, 査読有
DOI: 10.1534/genetics.117.30020
- ③ Quénerch' du E, Anand A and Kai T. (2016) The piRNA pathway is developmentally regulated during spermatogenesis in Drosophila. RNA 22(7):1044-54, 査読有
DOI: 10.1261/rna.055996.116
- ④ Lim RSM and Kai T. (2015) A piece of the pi(e): the diverse roles of animal piRNAs and their PIWI partners. Sem. Cell Dev. Biol. (Review article) (47-48): 17-31, 査読有
DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.10.025

[学会発表] (計 4 件)

- ① 河口 真一、ショウジョウバエの Meiosis

Arrest Female protein-1 (dMarf1) は、卵母細胞の成熟に必須である、第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会) 2017 年、神戸

- ② Minbo Zang, Standstill, a BED type zinc finger protein which is essential for oocyte specification and development, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会)、2017 年、神戸
- ③ 甲斐 歳恵, Tudor Domain Proteins and Small Interfering RNAs Protects Germline Cells (招待講演)、2017 年、The International Conference of the Genetics Society of Korea 2017、ソウル (韓国)
- ④ 甲斐 歳恵, HP1a は進化的に古いトランスポゾンとテロメア領域にあるトランスポゾンを piRNA 経路によって抑制する (招待講演)、第 88 回日本遺伝学会、2016 年、三島

[その他]

研究室ウェブサイト

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/kai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 歳恵 (KAI, Toshie)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号: 40579786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし