

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430087

研究課題名(和文)疾患モデル動物における長鎖非コードRNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of long non-coding using a mouse model

研究代表者

小林 慎(KOBAYASHI, Shin)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：10397664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類ではタンパク質をコードしないnon-coding RNA(ncRNA)が多量に転写される。この内200塩基以上の長いlncRNA(long ncRNA, lncRNA)は個体レベルで生理機能が明らかになっているものは稀である。本研究では、独自に発見したFat60lncRNAを人為的に破壊したKOマウスを作製、lncRNAの生理機能を明らかにした。Fat60 KOマウスは個体発生に異常を示し、その異常はヒト疾患に酷似している。本研究結果は古典的な疾患モデルとは異なり、「タンパク質をコードしないlncRNA」が疾患の原因となりうることを示す点で、新しい疾患モデルの概念に発展する可能性を秘める。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNAs(lncRNA)are thought to be involved in various biological processes, but their functions in vivo largely remain to be elucidated. Here, we showed that targeted deletion of Fat60 lncRNA causes abnormal development, which resembles a human disease. Our results indicate that a functional loss of lncRNA abolishes proper development, suggesting that lncRNA could be a cause for human genetic disease.

研究分野：実験動物学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

古典的なセントラルドグマの考え方によると、ゲノムのDNAの情報は、一旦mRNAに読み取られた後、mRNAの情報はタンパク質に翻訳され機能する(図1)。しかし、ゲノムプロジェクトの結果から、「ゲノム上のがらくた」とわれてきた領域には、タンパク質をコードしない非コードRNA(non-coding RNA, ncRNA)が多量に存在することが分かった(Kapranov P, Science, 2007)。これらの非コードRNAの内でも、miRNAを代表とする20塩基程度の小さなRNAの解析は進みつつある。miRNAは標的となるmRNAの転写やタンパク質への翻訳の過程で働き、標的遺伝子の機能を制御することが分かってきた。一方、200nt以上の長い非コードRNA(long non-coding RNA, lncRNA)は、培養細胞などを用いた実験から標的となる遺伝子の発現を抑制する例や、活性化する例が報告され、エピジェネティックな発現制御との関わりが注目を浴び始めている(Mercer, T, Nat. Rev, Genet.2009)。しかし、個体レベルではlncRNA機能が明らかになったものは僅かであり、その役割を明らかにすることが求められている状況である。

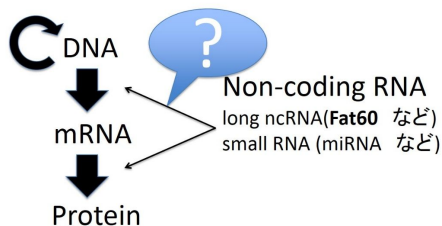


図1、非コードRNAが関わる新しいセントラルドグマの概念図
古典的なセントラルドグマに非コードRNAの機能を加える必要がある?

これまで、我々は着床前に雌でのみ発現する特殊な発現制御を受ける lncRNA として、*Fat60* (*Female abundant transcript 60*)を同定し報告してきた(Kobayashi S, PlosOne, 2013)。

更に、この lncRNA の機能を個体レベルで明らかにするため、ノックアウトマウスを作製した。その結果、*Fat60* KO マウスは発生に異常をきたすことが明らかになった。この表現型は、ヒトの先天性疾患と非常に良く似た表

現型を示すことが分かった。

2. 研究の目的

近年、哺乳類ではタンパク質をコードしない非コードRNA(non-coding RNA, ncRNA)が多量に転写されていることが分かってきた。これらの中でも、200nt 以上の長い ncRNA(long noncoding RNA, lncRNA)は生理機能についてはよくわかっていない。我々が独自に作製した、新規非コードRNA *Fat60* の KO マウスはヒト疾患に似た表現型を示すことがわかった。本研究では、*Fat60* KO マウスの解析を行うことにより発症の分子機構を明らかにすると共に遺伝子制御に果たす lncRNA の機能について基礎的な検討を行う。

3. 研究の方法

長い非コードRNAである *Fat60* lncRNA の発生における機能を明らかにするため、本研究では、以下の 2 課題に取り組む。

Fat60 KO マウスの表現型を発生ステージを遡り、組織切片を詳細に解析することにより、ヒト疾患との対比を行い、疾患モデル動物としての有用性を評価する。また、*Fat60* KO マウスの表現型の遺伝パターンまた、KO マウスにおける網羅的遺伝子発現を詳細に解析することにより、lncRNA の生理機能及び、分子作用機能を明らかにする。lncRNA は種類や発現量とも多く、何らかの機能を持つものと注目されているが、small RNA に比べ、その機能や分子作用機構の解析は非常に遅れている。*Fat60* lncRNA が「いつ」、「どこで」、「どのようにして」働き、発生に関わるのか? その過程を明らかにする。

4. 研究成果

ヘテロ KO マウス、ホモ KO マウスの交配実験を行い、表現型の遺伝パターンの特徴を明らかにした。さらに KO マウスの発生を遡り、異常は胎児期に出現することを明らかにした。検出に成功した発生異常を組織切片を詳細に観察し、ヒト疾患の表現型との比較をおこな

った。その結果、ヒト疾患と非常によく似た発生異常であることを突き止めた(論文投稿中)。異常の観察は共焦点レーザー顕微鏡等を用いて行い、詳細な細胞および組織部位の観察を可能にできる工夫を行っている。また、発生ステージを追いながら real time PCR 及び、fluorescence in situ hybridization を用いて lncRNA の詳細な発現パターンの解析を行ない、lncRNA は発生初期から発現すること、更に細胞内での局在を突き止めた。さらに KO マウスの遺伝子発現を体系的に調べ、遺伝子発現レベルでの異常を検出することに成功した(論文投稿中)。これまで謎の多かった lncRNA の個体での機能を明らかにし、疾患モデルマウスとしての有用性を示唆することに成功した。

ゲノムプロジェクトや次世代シーケンサーの解析結果から、たんぱく質をコードしない非コード RNA は mRNA よりも 4 倍もの量が転写されているという報告もあり、非コード RNA の生理機能に注目が集まりつつある。これまで、多くの生命現象及び疾患モデルは、タンパク質をコードする遺伝子の遺伝子組み換え動物や、突然変異体を用いて解析が行われてきたが、本研究ではこれまで未開拓であった lncRNA に注目してその生理機能の解明に取り組んだ。我々の KO マウスは古典的なセントラルグマの概念とは異なり、蛋白をコードしない lncRNA がマウスの発生過程で機能を持ち、組織形成に働くことを示唆している。これまでヒト疾患は、「タンパク質をコードした遺伝子」が主な解析対象と考えられてきたが、本申請の研究の成果は古典的な疾患モデルとは異なり、「タンパク質をコードしない lncRNA」が疾患の原因となりうることを示す点で、新しい疾患モデルの概念に発展する可能性を示す点で重要である。この研究は将来、様々なヒト疾患解析にも lncRNA の研究が展開できることを示す道しるべとなりうる。

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 11 件)

Parental age and gene expression profiles in individual human blastocysts.

Kawai K, Harada T, Ishikawa T, Sugiyama R, Kawamura T, Yoshida A, Tsutsumi O, Ishino F, Kubota T, Kohda T.

Sci Rep. 2018 Feb 5;8(1):2380. doi:

10.1038/s41598-018-20614-8. (査読あり)

PMID:29402920

Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells.

Takahashi S, Kobayashi S., Hiratani I.

Cell Mol Life Sci. 2018 Apr;75(7):1191-1203.

doi: 10.1007/s00018-017-2703-x. Epub 2017

Nov 13. Review.(査読あり)

PMID:29134247

Live imaging of X chromosome inactivation and reactivation dynamics.

Kobayashi S.

Dev Growth Differ. 2017 Aug;59(6):493-500.

doi: 10.1111/dgd.12365. Epub 2017 Jun 21.

Review. (査読あり)

PMID:28635043

Reply to Ferlazzo and Foray: About the Space Pup project.

Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T.

Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I,

Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H,

Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug

15;114(33):E6734. doi:

10.1073/pnas.1711468114. Epub 2017 Aug 1.

No abstract available. (査読あり)

PMID:28765376

Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months.

Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, [Kohda T](#), Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jun 6;114(23):5988-5993. doi: 10.1073/pnas.1701425114. Epub 2017 May 22.

(査読あり)

PMID:28533361

A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at a single base resolution.

Kawasaki Y, Kuroda Y, Suetake I, Tajima S, Ishino F, [Kohda T](#).

Nucleic Acids Res. 2017 Feb 28;45(4):e24. doi: 10.1093/nar/gkw994. No abstract available. (査読あり)

PMID:28204635

Protein-restricted diet during pregnancy after insemination alters behavioral phenotypes of the progeny.

Furuse T, Miyake K, [Kohda T](#), Kaneda H, Hirasawa T, Yamada I, Kushida T, Kashimura M, Kobayashi K, Ishino F, Kubota T, Wakana S.

Genes Nutr. 2017 Jan 19;12:1. doi: 10.1186/s12263-016-0550-2. eCollection 2017. (査読あり)

PMID:28127411

Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naïve from primed pluripotent stem cells.

[Kobayashi S](#), Hosoi Y, Shiura H, Yamagata K, Takahashi S, Fujihara Y, [Kohda T](#), Okabe M, Ishino F.

Development. 2016 Aug 15;143(16):2958-64. doi: 10.1242/dev.136739. Epub 2016 Jul 28. (査読あり)

PMID:27471261

Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells.

Takahashi S, Lee J, [Kohda T](#), Matsuzawa A, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Kaneko-Ishino T, Ishino F.

Development. 2014 Oct;141(20):3842-7. doi: 10.1242/dev.110726. Epub 2014 Sep 24. (査読あり)

PMID:25252944

Establishment of paternal genomic imprinting in mouse prospermatogonia analyzed by nuclear transfer.

Kamimura S, Hatanaka Y, Hirasawa R, Matsumoto K, Oikawa M, Lee J, Matoba S, Mizutani E, Ogonuki N, Inoue K, [Kohda T](#), Ishino F, Ogura A.

Biol Reprod. 2014 Nov;91(5):120. doi: 10.1095/biolreprod.114.120451. Epub 2014 Sep 17. (査読あり)

PMID:25232016

Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos.

Soma M, Fujihara Y, Okabe M, Ishino F, [Kobayashi S](#).

Sci Rep. 2014 Jun 5;4:5181. doi: 10.1038/srep05181. (査読あり)

PMID: 24899465

(学会発表) (計 6 件)

小林 慎 (1,2)、細井勇輔 (2)、志浦 寛相(2)、山縣 一夫(3)、高橋 沙央里 (2)、藤原祥高(3)、岡部勝(3)、石野史敏(2)、五島直樹(1)

X染色体再活性化ライブイメージングシステムを用いた幹細胞研究

Stem cell research using live imaging of X-chromosome reactivation

第17回産総研・産技連LS-BT合同発表会

20180206 - 20180207

会場:産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂

小林 慎

X染色体再活性化のライブイメージングを可能にする“momiji マウス”の開発と応用

第5回 X染色体研究会

20170922 - 24

会場:東京工業大学すずかけ台キャンパスS2棟

小林 慎 1, 細井 勇輔 1, 志浦 寛相 1, 山縣 一夫 2, 高橋 沙央里 1, 藤原 祥高 2, 幸田 尚 1, 岡部 勝 2, 石野 史敏 1

発生における X 染色体の不活性化および再活性化ダイナミクスのライブイメージング

第11回日本エピジェネティクス研究会 2017年5月22日・23日、会場:学術総合センター 一橋講堂

Live imaging of X chromosome inactivation and reactivation dynamics in early mouse development.

小林 慎, 細井 勇輔, 志浦 寛相, 山縣 一夫, 高橋 沙央里, 藤原 祥高, 幸田 尚, 岡部 勝, 石野 史敏

X染色体の再活性化ライブイメージング技術を用いた多能性幹細胞の区別

Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naive from primed pluripotent stem cells

第39回日本分子生物学会、2016年11月30日～12月2日 パシフィコ横浜

Shin Kobayashi, Yusuke Hosoi, Saori Tkakahashi, Yoshitaka Fujihara, Masaru Okabe, Fumitoshi Ishino, “Stem cell research using live imaging of X chromosome reactivation.” THE 40th NAITO CONFERENCE, September 15th-18th 2015, poster presentation, (Chaterase Gateux kingdom) Sapporo

小林慎(Kobayashi Shin)、細井勇輔、藤原祥高、岡部勝、石野史敏

「X染色体再活性化ライブイメージング技術と幹細胞研究」

第9回日本エピジェネティクス研究会 2015年5月25 - 26日 一ツ橋学術総合センター (東京都千代田区)

Stem cell research using live imaging of X chromosome reactivation

9th Annual Congress of The Japanese Society for Epigenetics, May 25-26, 2015, Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences Building

[その他]

ホームページ等

小林 慎 研究紹介

http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/shin_kobayashi.html

産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリングセンター
<http://www.molprof.jp/research/qpt1.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 慎 (KOBAYASHI, Shin)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号:10397664

(2)研究分担者

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 60211893