

平成 24 年 9 月 13 日
新潟薬科大学応用生命科学部
独立行政法人理化学研究所

精子から新タイプの小さな機能性 RNA 分子の発見

—次世代に伝達されうる新たな情報伝達物質の探索に向けて一歩前進—

◇ポイント◇

- ・次世代シーケンシング技術を用い、精子から miRNA や piRNA など様々な機能性 RNA を同定
- ・生殖細胞特異的に存在する、相同性の高い新規小分子 RNA を二つ発見し、それらの特性を解明
- ・精子から卵に伝達された RNA の、初期発生における遺伝子発現制御因子としての役割に期待

1. 発表者：

川野 光興 (独立行政法人理化学研究所 オミックス基盤研究領域 研究員 (当時)、
北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 助教 (当時))
新潟薬科大学 応用生命科学部 助教

- ・川路 英哉 (独立行政法人理化学研究所 オミックス基盤研究領域 小分子 RNA 解析
連携ユニット ユニットリーダー)
- ・Valérie Grandjean (Inserm, U636, Nice, France, Laboratoire de Géne'tique du De'veloppement
Normal et Pathologique, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France 研究員)
- ・Jafar Kiani (Inserm, U636, Nice, France, Laboratoire de Géne'tique du De'veloppement Normal et
Pathologique, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France 博士研究員)
- ・Minoo Rassoulzadegan (Inserm, U636, Nice, France, Laboratoire de Géne'tique du De'veloppement
Normal et Pathologique, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France 教授)

2. 発表概要：

精子細胞では転写や翻訳は行われていないため、その唯一の生物学的な役割は、父親の半数体ゲノムを受精の際に卵に伝達することだと考えられている。精子中にも RNA 分子が含まれていることは以前から知られていたが、その中身については未だ不明な点が多く、生理機能をもつ RNA の存在は知られていない。本研究では、次世代シーケンシング解析 (注1) により、マウス精子に含まれる RNA の塩基配列を網羅的に決定し、その種類や存在量を明らかにした。さらに、二つの新規小分子機能性 RNA (注2) を見いだし、これらが精子に相対的に多く存在することを示した。これ

らは、受精の際に卵に伝達されると、細胞核において安定に維持される性質があり、発生初期において遺伝子発現を制御していることが示唆された。これらの発見により、精子の中には次の世代で働く RNA が存在しており、ゲノム DNA 以外の物質も情報伝達物質として用いられている可能性が示唆された。

本研究は、新潟薬科大学、理化学研究所、ニース大学（フランス）との共同研究として行われた。

3. 発表内容：

次世代シーケンシング解析（注1）により、様々な組織や細胞における転写産物の網羅的な発現解析が近年精力的に行われている。これらの研究から、約 20~30 塩基ほどの小分子機能性 RNA（注2）が遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。発表者は、これら小分子 RNA の中には、次世代において遺伝子発現制御因子として機能する RNA が存在するという仮説を立て、生殖細胞である精子に着目し、その中に存在する小分子 RNA の塩基配列解析を行った。

最初に、精子の全 RNA を用いて長さの分布を調べたところ、体細胞で見られる ribosomal RNA (rRNA) のピークを確認することができず、約 100 塩基をピークとする短い RNA で構成されていることが分かった（図1）。次に、これら RNA を用いて cDNA を作製し、ロッシュ 454 およびイルミナ GA 次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。その結果、マウス精子では翻訳が行われていないにも関わらず、rRNA や tRNA など翻訳に関わる RNA の断片配列が半数以上を占めていることが明らかになった。さらに、小分子機能性 RNA である miRNA や piRNA、snoRNA、snRNA など多数同定することができた（図2）。配列解析により新規の小分子 RNA を探索したところ、13 個の候補 RNA を見つけることができた。その内の 2 つの小分子 RNA (spR-12 [21 塩基]と spR-13 [20 塩基]) は同じ染色体上の piRNA クラスタ（注3）にマップされ、遺伝子部位が異なるにも関わらず、その塩基配列は相同性が高く 5'末端から 9 塩基目までは配列が完全に一致しており（図3）、3'末端のリボースが化学的修飾されていることが分かった。RT-PCR や qPCR によってそれらの発現プロファイルを調べたところ、驚いたことに、体細胞では検出されず精子および成熟精子貯蔵器官である精巣上体、さらに、卵、初期胚で存在が確認された（図4）。このような発現パターンを示す RNA は今まで報告がなく、既知の機能性 RNA である miRNA や piRNA とも特性が異なることから、これらは新規に分類される生殖細胞特異的な小分子 RNA と考えられる。

これら小分子 RNA の末端を蛍光標識し、マイクロインジェクション法によりマウス受精卵に導入したところ、これらの精子優先的 RNA は胚盤胞期まで核に安定に局在する性質があることが分かった。このことから、受精の際に精子を介して受精卵に伝達されたこれら精子 RNA は（図5）、初期胚の核内においてゲノム DNA のメチル

化などを介して、遺伝子発現制御に寄与する可能性をみいだすことができた。今回の研究で得られた精子 RNA の塩基配列データは、RNA が遺伝情報物質にもなり得るといふ仮説の上に立った候補 RNA を探索する基礎データにもなりうる。この知見を元に、今後、精子 RNA が関わる初期発生の機構解明や、男性不妊や低重力環境における精子 RNA の発現変動解析に向けた研究に進展することが期待される。

なお本研究は、JSPS 科研費 若手研究(B) [20770145]の助成を受けて行われた。

4. 発表雑誌：

雑誌名：「PLoS ONE」（オンライン版）

論文タイトル：Novel small noncoding RNAs in mouse spermatozoa, zygotes and early embryos

著者：Mitsuoki Kawano*, Hideya Kawaji, Valérie Grandjean, Jafar Kiani, Minoou Rassoulzadegan

*: corresponding authors

DOI 番号：doi:10.1371/journal.pone.0044542

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044542>

5. 問い合わせ先：

新潟薬科大学 応用生命科学部 遺伝子発現制御学研究室

助教 川野 光興（かわの みつおき）

Tel：0250-25-5124

Fax：0250-25-5021

E-mail：mkawano@nupals.ac.jp

6. 用語解説：

（注1）次世代シーケンシング解析：

従来のサンガー法とは異なり、1回の解析で数千万～数百億の塩基配列情報を得ることができ、ヒトの全ゲノム配列解読を一日で完了可能なハイスループットな塩基配列解読技術。短い DNA 配列を信頼性高く大量に読むことに優れており、新規ゲノム配列解析のみならず、遺伝子発現解析や小分子 RNA 解析など、様々なアプリケーションに応用されている。塩基配列決定後に産生される大量の塩基配列データを、高性能なコンピューターを用いて情報科学的に解析することで、生物学的情報を抽出する。

（注2）小分子機能性 RNA：

messenger RNA (mRNA) のようにタンパク質の設計図として用いられず、それ自身が RNA 結合タンパク質と結合して遺伝子の発現制御などに作用する。約 21 塩基からなる microRNA (miRNA) は mRNA と結合して翻訳の制御を行う。約 24～31 塩基からなる piwi-interacting RNA (piRNA) は主に生殖細胞で発現し、レトロトランスポゾンなど

の遺伝子部位の DNA メチル化を生じさせることにより遺伝子発現抑制などに働いている。3'末端のリボースの 2 位はメチル化されており、RNA の安定性に寄与していると考えられている。

(注 3) piRNA クラスタ :

piRNA がゲノム上にクラスタ状になってマップされる領域。マウスのパキテン期における 10 万種類以上の piRNA は、約 100 領域の piRNA クラスタにマップされる。ちなみに、今回の研究で発見された spR-12 と spR-13 精子 RNA は、マウスにおいて最大の piRNA クラスタにマップされる。クラスタ内において piRNA がマップされる向きは一方向的であり、piRNA の産生には miRNA を産生する Dicer タンパク質が必要ないことから、それぞれのクラスタから転写される長い前駆体一本鎖 RNA から、何かしらの酵素作用によって piRNA が生成すると考えられている (図 5)。piRNA とは塩基配列の特徴・長さや発現時期が異なる spR-12 と spR-13 精子 RNA がどのような機構によって産出されているかは今のところ不明である。

7. 添付資料：

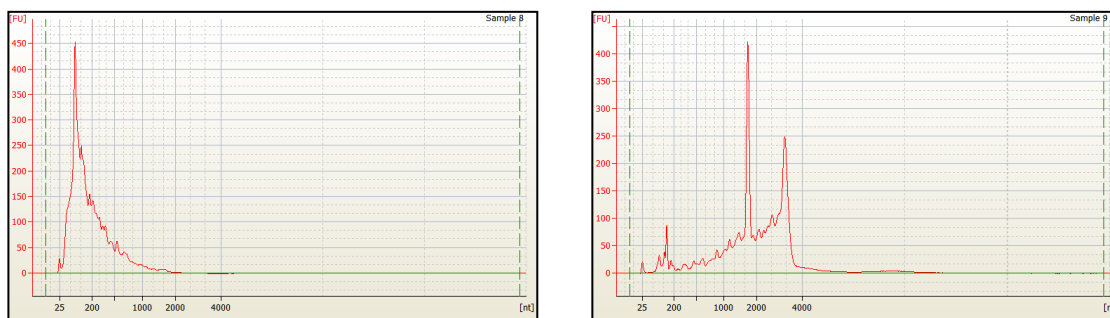


図1 マウス精子および精巣に含まれる RNA 分子の長さ分布
 精子の全 RNA は、完全長の 18S および 28S rRNA のピークがなく、約 100 塩基をピークとする断片化された短い RNA で構成されていた。

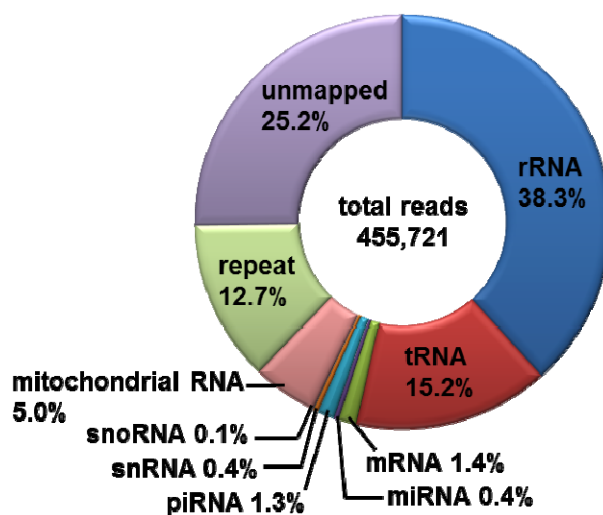


図2 マウス精子に含まれる RNA 分子の種類と割合
 細胞内に大量に含まれる rRNA、tRNA や繰り返し配列由来の短い RNA が半数以上を占めた。機能性 RNA である miRNA や piRNA、snoRNA、snRNA なども多数同定された。

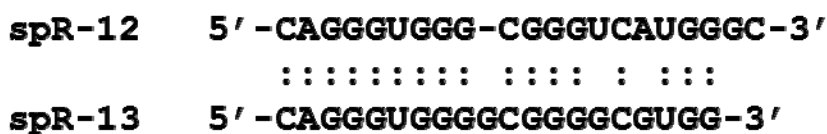


図3 精子に優先的に存在する 2 つの新規小分子 RNA (spRNA) の塩基配列比較

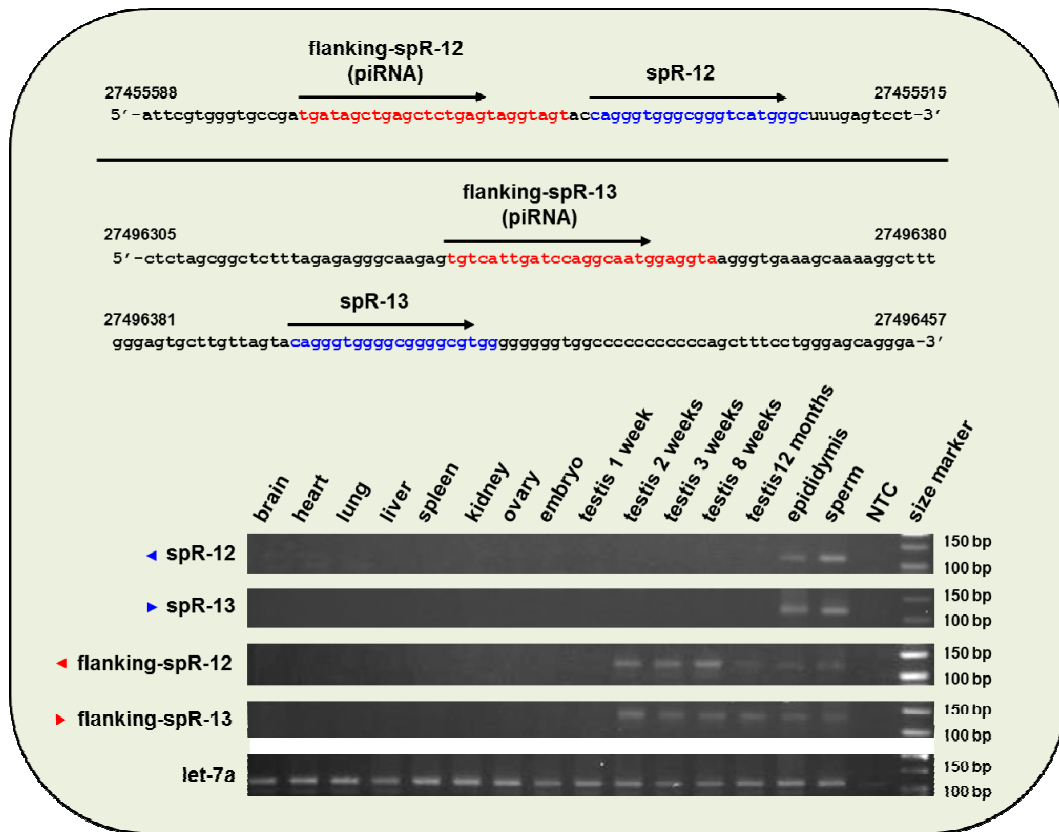


図4 精子優先的 RNA およびその周辺に位置する piRNA のマップ部位と発現分布
 spR-12 と spR-13 RNA は精子と精巣上体のみで存在が確認できたが、その近傍から発現される piRNA は精巣の二週齢期以降で発現を確認した。let-7 は生殖細胞、体細胞に関わらず恒常的に発現していた。spR-12 と spR-13 の転写領域を含む piRNA は確認されなかった。

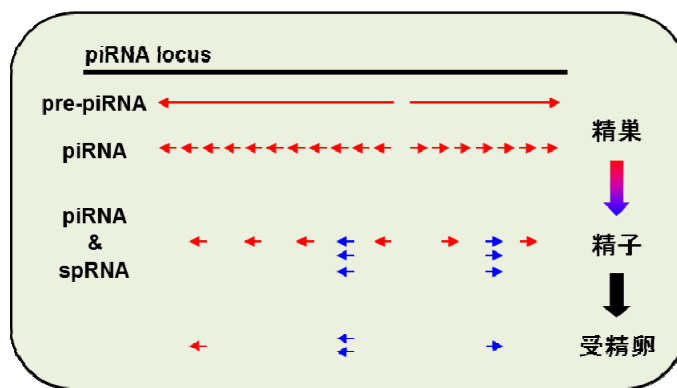


図5 精子優先的 RNA およびその周辺に位置する piRNA のマップ部位と発現分布モデル
 piRNA クラスター部位にマップされる、精子優先的に存在する spR-12 と spR-13 RNA は受精の際に精子を介して卵に伝達され、受精卵の核に移動して安定に存在し、初期発生において遺伝子発現制御に寄与することが示唆された。精子に存在する大量の piRNA も次世代に伝達され、受精卵において何かしらの生理作用をもつ可能性を認めている。