

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月29日現在

機関番号： 12102
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：22770207
研究課題名（和文）
 *let-7*マイクロRNA 依存的発生タイミング経路のゲノムワイド解析
研究課題名（英文）
 A genome-wide analysis of *let-7* microRNA-dependent developmental timing pathway
研究代表者
 丹羽 隆介（NIWA RYUSUKE）
 筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：60507945

研究成果の概要（和文）：
多細胞生物が適切に発生して成体へ達するためには、未成熟なステージから成熟に向けて決まったタイムスケジュールに沿って段階的に成長する必要がある。本研究代表者は線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫から成虫へのスイッチングを正に制御する *let-7* マイクロRNA の作用に関わる新規遺伝子群を探索した。その結果、複数の核内受容体やクロマチン構造制御因子をコードする遺伝子が、幼虫から成虫への発生運命のスイッチングに重要な役割を果たすことを証明した。

研究成果の概要（英文）：
The development of multicellular organisms is tightly regulated under a precise time schedule. To unravel the molecular mechanisms underlying developmental timing in multicellular organisms, I used the nematode *Caenorhabditis elegans* as the model organism. I identified and characterized genes involved in the *let-7* microRNA pathway, which is essential for the larva-to-adult transition. I found that the *let-7* microRNA pathway is controlled by several transcription regulatory factors and receptor and chromatin-remodeling factors.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合 計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 平成22年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 平成23年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総 計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学
キーワード：発生・分化、発現制御、線虫、発生タイミング、マイクロRNA、転写因子、クロマチン構造制御因子

1. 研究開始当初の背景
多細胞生物の発生が適切に進行するためには、個体内のそれぞれの組織のそれぞれの細胞が特定の分化を遂げ、3次元空間の中の適切な場所に位置することが必須である。一方、こうした分化と形態形成は、3次元空間

軸における決定だけでなく、第4の次元「時間」軸に沿って適切なタイミングで決定されることも必要である。しかし、こうした発生のタイミングを実際にどのような遺伝子が制御しているのかについては未だ断片的な知見に留まっており、3次元空間軸における

発生メカニズムの膨大な知見の蓄積に比べて大きく立ち遅れている。

現在までに発生タイミングの分子的解析が最も進んでいる研究系の1つに、線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下、単に「線虫」) の後胚発生がある。線虫では、発生過程の細胞系譜のすべてが記載されており、各発生ステージごとに固有の細胞分裂と分化が観察される。この時期特異的な細胞系譜を指標として、各ステージの個性の発現タイミングに異常がある突然変異株が同定され、その原因遺伝子の正体が明らかにされつつある。

こうした遺伝子の1つである *let-7* は、成虫期においても成虫形質が分化せずに幼虫期の個性のままの突然変異株から同定された。*let-7* は、線虫のみならず他の多細胞動物にも高度に保存されたマイクロ RNA をコードしており、他の動物においても未成熟段階から成熟段階への移行に関わることが示唆されている。さらに *let-7* は、ヒトの病気にも深く関わる可能性が示唆されている。すなわち、ヒトの原ガン遺伝子 *RAS* は *let-7* によって発現抑制されること、さらにはヒトのある種の肺ガン発症患者では *let-7* ファミリーの発現量が著しく低く、逆に *RAS* のタンパク量が顕著に上昇することが判明している。また本研究代表者は、本研究開始以前に、アルツハイマー病に関与するアミロイド前駆体タンパク質 *APP* の線虫類縁分子 *apl-1* が、成虫時に *let-7* によって機能抑制を受けることを発見した。これらの事実は、*let-7* が個体の生活史における若さや老いを反映した細胞分化と細胞分裂の特徴を規定しており、その異常はヒトの病気にもつながる可能性を提示している。

let-7 マイクロ RNA は、*RAS* や *apl-1* を含め、その下流で複数の転写因子やシグナル伝達分子の発現を制御することで、成虫成熟のスイッチとして機能する。*let-7* 依存的な発生タイミング経路の特徴は、*let-7* マイクロ RNA そのものが進化的に高度に保存されているだけでなく、*let-7* の下流に位置する遺伝子およびその *let-7* 依存的な発現制御も動物界に広く保存されている点にある。こうした保存性の観点から、*let-7* 経路に作用する新規遺伝子およびそのネットワークを解明することは、動物界に共通する発生タイミングの分子基盤に迫る上で、有効なアプローチである。

2. 研究の目的

本研究代表者は、発生のタイミングの制御機構に迫ることを目的とし、平成 20~21 年度に若手研究 (スタートアップ) (課題番号

20870005) で実施した内容を継続する形で、*let-7* マイクロ RNA 依存的な発生タイミング決定経路をより詳細に解明することを目指した。*let-7* 経路に関わる遺伝子を探索するために本研究代表者は、先述した *apl-1* をレポーターとして利用した新規遺伝子の探索を行った。*apl-1* は、幼虫→成虫スイッチとして機能する *let-7* 依存的な発生タイミング経路の活性を転写レベルでモニターできる数少ない遺伝子である。そこで、*apl-1* の発現変動を指標とした二重鎖 RNA 干渉 (RNAi) スクリーニング、および *apl-1* の発現調節に関わるエンハンサー領域の解析に取り組み、遺伝子発現レベルから *let-7* 経路に関わる因子を探索した。この本研究代表者のアプローチによって、従来の形態指標だけでは見落とされていた発生タイミング遺伝子を見出すことが出来ると考えた。線虫は、遺伝学的ツールおよび網羅的 RNAi のためのライブラリーが良く整備されたモデル系であり、未知遺伝子を迅速に発掘するのに好適である。

3. 研究の方法

平成 20~21 年度の若手研究 (スタートアップ) (課題番号 20870005) から継続する形で、*apl-1* エンハンサー領域の下流に GFP を融合させたコンストラクトを持つトランスジェニック線虫系統 (*apl-1::GFP* 系統) を利用した発生タイミング関連遺伝子の同定と機能解析に従事した。*apl-1* の発現に影響を与える遺伝子の探索を目的として、RNAi を利用した遺伝子スクリーニングを行った。線虫は大規模な RNAi スクリーニング系が良く整備されたモデル生物であり、線虫の予想コーディング遺伝子の大半に対する RNAi クローンライブラリーが利用可能である。本研究代表者は、若手研究 (スタートアップ) においては、ゲノム中に予測されている転写制御因子群に着目したスクリーニングを行い、*apl-1::GFP* 系統の GFP 発現レベルに変化を与える転写制御因子遺伝子を探索した。本申請研究においては、スタートアップの研究を継続しつつ、市販されているゲノムワイド RNAi ライブラリーからより広範に遺伝子をピックアップし、*apl-1::GFP* 系統の GFP 発現レベルに変化を与える遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(結果)

英国の Julie Ahringer 博士らによって開発されたゲノムワイド RNAi ライブラリーを利用し、*apl-1::GFP* の発現に影響が及ぼす遺伝子を摂食 RNAi 法によってスクリーニングした。若手研究 (スタートアップ) においては、複数の転写制御因子が *apl-1::GFP* の

発現に顕著な影響を及ぼすことを見出した。本申請研究においては、これらのうち特に進化的に保存された核内受容体をコードする *nhr-25* 遺伝子に着目して詳細な解析を継続した。その結果、*apl-1* の発現調節のみならず、上皮細胞分裂の停止、上皮細胞の融合、成虫特異的コラーゲン遺伝子の発現など、幼虫から成虫への分化の幅広い現象に関与していることが判明した。すなわち、*nhr-25* は、新規の発生タイミング遺伝子であることを示した。さらに興味深い事に、幼虫から成虫への上記の分化現象を精緻に観察してみると、成虫特異的コラーゲンの発現に際しては *nhr-25* は成虫スイッチングを負に制御するが、上皮細胞分裂の停止や上皮細胞の融合に関しては、*nhr-25* は成虫スイッチングを正に制御する方向で働くことが分かった。つまり、*nhr-25* は、成虫化の個別の現象のそれぞれに対して、正に機能する時も負に機能する時もあるという、多面的な機能を持ったこれまでにないタイプの発生タイミング遺伝子であることが判明した。これらの成果は、次節「5. 主な発表論文」に記した2本の論文において公表した。

さらに本研究代表者は、*apl-1::GFP* の発現に顕著な影響を及ぼす遺伝子として、複数のクロマチン構造制御因子を同定した。また、これらの遺伝子についても、上皮細胞の分裂と分化、そして成虫特異的コラーゲン遺伝子の発現といった幼虫から成虫への成熟化に広くに関与することを見出した。次いで本研究代表者は、これらのクロマチン構造制御因子の *let-7* マイクロ RNA 経路に対する具体的な機能を分子遺伝学および生化学的に追究した。その結果、同定した遺伝子の1つ *lin-59* は、*let-7* マイクロ RNA そのものの発現を負に調節する役割を持つことを見出した。*lin-59* の1次構造は、ヒストンメチル基転移酵素と高いホモロジーをもつ。この情報を元に生化学的な解析を行ったところ、*lin-59* 機能欠損個体ではヒストンの第9番目のリジン残基のヒストンメチル化が著しく低下していることが判明した。これらの結果は、*let-7* マイクロ RNA の発現制御には、ヒストンのメチル化を介したエピジェネティックな制御が関与することを強く示唆する。

(結論)

apl-1::GFP 系統を用いた RNAi スクリーニングおよびエンハンサー解析を利用した実験から、転写制御因子やクロマチン構造制御因子が *let-7* マイクロ RNA 依存的な発生タイミング経路に関与することを見出した。*nhr-25* と *lin-59* は、いずれも線虫の陰門 (vulva) における細胞分化や形態形成に必要な遺伝子としてすでに記載はされていたが、

発生タイミングにおける機能についてはまったく報告がなかった。これは、これらの遺伝子の役割が複合的かつ複雑であるために、表面的な形態のみを指標とした従来の突然変異株スクリーニングでは発生タイミングにおける機能を見出すことが出来なかったことに起因すると思われる。よって、今回の発見は、本研究代表者による *apl-1::GFP* 系統を利用するアイデアが新しい研究ツールとして有効であることを強く示している。

核内受容体をコードする *nhr-25* は、幼虫から成虫へのスイッチングにおいて非常に多面的な機能を持つ遺伝子であった。このように、1つの遺伝子が発生時期の移行に複雑に機能する例はこれまでに報告がなく、*nhr-25* は全く新しいタイプの発生タイミング遺伝子であると言える。また、*nhr-25* は線虫からヒトまで進化的に高度に保存された遺伝子であることから、本成果は動物一般の発生タイミングの理解に新しい糸口を与えるものでもあると期待できる。

また本研究では、*let-7* マイクロ RNA の発現調節に関わる進化的に保存されたクロマチン構造制御因子を見出すことに成功した。*let-7* マイクロ RNA の発現は、最終分化を遂げた細胞で非常に高く、逆に未分化な細胞では低いという特徴が進化的に高度に保存されている。しかし、こうした細胞分化状態に応じた時間的発現パターンを制御するメカニズムは現在に至るまでほとんど解明されていない。*let-7* マイクロ RNA の発現状態の異常は、ヒトのがんの発症とも強く関連することが知られており、その発現制御機構の解明は基礎生物学分野だけでなく医学分野においても重要な問題である。本研究の成果は、この重要問題に足がかりを与えるはじめての知見である。将来的には、*let-7* の発現制御におけるエピジェネティックな制御が高等動物においても保存されているかを検討することが重要な課題である。

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2件)

- ① Ryusuke Niwa and Kazumasa Hada (2010) Identification of a Spatio-Temporal Enhancer Element for the Alzheimer's amyloid precursor protein-like-1 Gene in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 12 巻, 1497-2500 ページ. 責任著者. 査

読有り。

- ② Kazumasa Hada, Masako Asahina, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, Frank J. Slack, and Ryusuke Niwa (2010) The nuclear receptor gene *nhr-25* plays multiple roles in the *C. elegans* heterochronic gene network to control the larva-to-adult transition. *Developmental Biology*、344 巻、1100-1109 ページ。責任著者。査読有り。

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Kazumasa Hada, Minori Onda, Yuta Takahashi, Haruyasu Amano, Sora Enya, Keiko Hirota, Akiyoshi Fukamizu and Ryusuke Niwa 『The histone H3 methyltransferase LIN-59 regulates the expression of the *let-7* family microRNAs during the larva-to-adult transition in *C. elegans*』、5th East Asian Worm Meeting、2012 年 6 月 29 日、Chientan Youth Activity Center (台湾台北市)
- ② Kazumasa Hada, Haruyasu Amano, Minori Onda, Sora Enya and Ryusuke Niwa 『The histone methyltransferase LIN-59 controls the expression of the *let-7* family microRNAs during the larva-to-adult transition in the nematode *Caenorhabditis elegans*』、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜
- ③ 波田一誠、塩谷天、恩田美紀、丹羽隆介 『線虫 *C. elegans* の発生タイミングを制御するクロマチンリモデリング因子の同定』、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 (東日本大震災により学会大会は中止となったが、発表は成立していることが正式に認められている。)
- ④ Kazumasa Hada, Masako Asahina, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, Frank J. Slack and Ryusuke Niwa 『A role of the nuclear receptor gene *nhr-25* in the *C. elegans* heterochronic gene network』、International Symposium on Cell Functions Mediated by Small Molecules、2010 年 11 月 8 日、筑波大学総合研究棟 D 棟
- ⑤ Kazumasa Hada, Masako Asahina, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, Frank J. Slack and Ryusuke Niwa 『The nuclear receptor gene *nhr-25* plays multiple roles in the *C. elegans* heterochronic gene network to control the larva-to-adult transition』、4th East Asian Worm Meeting、2010 年 7 月 12 日、国立オリンピック記念青少年総合センター (代々木)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~rniwa/>

<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/Profiles/0005/0005746/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 隆介 (NIWA RYUSUKE)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：60507945