

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14520

研究課題名(和文) ホヤにおける新規母性因子特異的ノックダウン法によるmRNAの局在機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of mechanisms of mRNA localization in the ascidian eggs with the novel genetic method to knockdown maternal genes

研究代表者

笹倉 靖徳 (SASAKURA, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10400649

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)：ホヤの卵には特定の領域に局在して発生を制御する母性mRNAが存在する。これらの母性mRNAの局在機構は不明である。我々の研究グループが開発したMASK法は卵内での遺伝子機能を阻害できる画期的な手法であり、mRNAの局在メカニズムの詳細を解明するブレイクスルーとなりうる。しかしながらMASK法の原理が不明なことが欠点であった。本研究の最大の成果はその動作原理を解明したことである。MASK法では、遺伝子機能を阻害する人工DNAからpiRNAと呼ばれる小分子RNAが作られ、ターゲット遺伝子のmRNAを分解することが判明した。この解明によって、MASK法によって安定した遺伝子阻害が可能になった。

研究成果の概要(英文)：A group of mRNA is localized at the specific region in eggs of ascidians. Mechanisms of the mRNA localization have not been understood. We have recently developed the novel genetic method MASK that knocks down genes in the eggs in the ascidian *Ciona*. The mechanisms how maternal genes are knocked down by MASK was unknown. In this research, we showed the mechanisms of MASK. In the MASK transgenic lines, piRNA-like small RNAs are produced from the MASK vector in the transcription-dependent manner. The piRNA-like small RNAs induce degradation of mRNA of targeted maternal gene. Because piRNAs are produced by the ping-pong mechanism, the addition of such an element in the MASK vector will increase the efficiency to knockdown target genes by MASK.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：ホヤ mRNA 母性因子 piRNA 局在

1. 研究開始当初の背景

海産無脊椎の脊索動物であるホヤの卵には、初期発生における細胞分化や形態形成を指定する母性因子が蓄積していることが100年以上もの前から知られている。これらの因子の多くは母性 mRNA であり、またその一部は卵の特定の領域へと局在しており、その局在パターンがホヤの発生を正常に進行させるために必要である。しかしながら、母性 mRNA を局在させる分子メカニズムについてはほとんど分かっていないのが現状であった。その理由の1つは、ホヤにおいては母性因子研究にとって中心的な技術である遺伝学的手法が発達しておらず、母性因子の機能を阻害することが難しいことであった。

私の主宰する研究室では、ホヤの一種であるカタコウレイボヤに、トランスジェニック系統樹立や突然変異体作製方法などの遺伝学的手法を導入し、母性因子研究に必要な技術基盤を構築してきた。特に我々は、MASK 法と名付けた新しい母性因子ノックダウン方法を開発した。この MASK 法では、ノックダウンのターゲットとなる母性因子をコードする遺伝子の転写調節領域と5'非翻訳領域(5'UTR)を用いて GFP を卵で発現させると、GFP のみならずターゲットした遺伝子の母性発現が抑制される。ターゲット遺伝子が胚性の発現を示す場合、MASK 法では母性発現のみがノックダウンされるため、従来の方法では難しかった、遺伝子の母性の機能と胚性の機能を区別することが可能である。MASK 法は逆遺伝学的手法であり、研究者が任意の遺伝子をターゲットとして解析できることが期待できることもあり、この方法によって、カタコウレイボヤにおける母性因子機能を包括的に解析するブレイクスルーがもたらされると判断された。一方で MASK 法には、遺伝子がノックダウンされるメカニズムが不明であるという欠点があり、その解決が重要であった。

2. 研究の目的

ホヤの卵内には母性 mRNA が特定の領域に局在しており、初期発生における細胞分化や形態形成の制御を担っている。これらの母性 mRNA の局在するメカニズムは不明であり、その解明がホヤの発生の理解に必須である。本研究では MASK 法を用いて卵で機能する遺伝子の機能を抑制することを通じて、mRNA の局在を担う分子実体を同定し、局在の分子メカニズムを解明する。また、MASK 法の動作機構が不明であるためこれを解明することによって、より洗練されたテクニックへと昇華することも狙う。

3. 研究の方法

(1) ホヤの1種であるカタコウレイボヤを

材料に用いる。ホヤの母性 mRNA の局在は細胞骨格系・モータータンパク質と RNA 結合タンパク質に依存することが予想されており、これらをコードしており、かつ卵内で発現する遺伝子の転写調節領域を単離し、ノックダウンベクターを作製する。ノックダウンベクターをトランスポゾン技術を用いてゲノムへと挿入させたカタコウレイボヤ系統を作製する。系統の卵を受精させ、発生に異常が生じるものを選別する。それらの卵におけるターゲット遺伝子のノックダウンを *in situ* ハイブリダイゼーション法や RT-PCR 法によって確認する。また、母性 mRNA の局在への影響についても同様の手法によって調べ、本来局在するはずの mRNA が局在しなくなる異常を示すことを調べる。局在に關与する遺伝子が同定されれば、それらの遺伝子がコードするタンパク質機能について、GFP 融合タンパク質や抗体作製などの技術、局在 RNA との結合などの解析によってその詳細を解析して mRNA 局在のメカニズムを明らかにする。

(2) MASK 法の動作原理として、ノックダウンベクターから合成された small RNA が関与していることが推定されている。まずレポーター遺伝子やベクター内のトランスポゾン領域、ベクターバックボーン配列など様々な領域を改変したノックダウンベクターを作製し、これらのベクターをもったカタコウレイボヤ系統を作製する。作製された系統におけるターゲット遺伝子のノックダウンの有無を記録する。また、卵巣から small RNA を単離し、それらの配列を次世代シーケンスで同定する。ノックダウンの有無とベクターの改変箇所、それらのベクターから合成された small RNA を比較し、ノックダウンに必要なベクター内条件を明らかにする。またノックダウンを起こしていると推定される small RNA については強制発現を試みることによる検証を進める。以上の実験を通じて MASK 法の原理に迫り、その情報を基に再現性高くノックダウンを引き起こすことができるベクターの構築など、手法の改良を目指す。

4. 研究成果

(1) モータータンパク質および RNA 結合タンパク質の MASK 法によるノックダウン

カタコウレイボヤの卵で発現を示す、モータータンパク質と RNA 結合タンパク質をそれぞれ4および5種類選択し、それらの転写調節領域と5'UTRをコードするDNA領域をPCR法で単離した。これらのDNA断片をGFP遺伝子とつなぎ、トランスポゾン Minos へと組み込んだノックダウンベクターを作製した。これらのベクターを用いてカタコウレイボヤを形質転換させ、形質転換体の卵からの発生を観察することで発生異常を示す系統

のスクリーニングを試みた。合計 16 系統をスクリーニングしたものの、目立った表現型を示す系統を得ることができなかった。また 13 系統においてターゲット遺伝子のノックダウンの有無を調べたところ、12 系統においてノックダウンが生じていないことが判明した。原因として、ノックダウンを起こすために必要な要素が構築したベクターにおいて欠けていること、例えば単離した転写調節領域に母性での発現を誘導する活性がないことなどが予想された。このため、これらの問題点を解決することが重要であると考えられた。

(2) 新規ノックダウンベクターの構築と母性因子のノックダウン

上記のように、第 1 世代の MASK ベクターでは様々な遺伝子に対するノックダウンは非効率であることが分かり、その代替方法の構築を検討した。具体的には、ノックダウンさせるための DNA 配列の母性発現をドライブする転写調節領域を、ターゲット遺伝子のものでなく再現性高く発現誘導できるものに固定したベクターを構築した。このベクターを用いて Y-box 型 RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子のノックダウンを試みたところ、4 系統のうち 1 つの系統において、幼生期に尾部の伸長が異常になる表現型を再現性高く得ることに成功した。この表現型は maternal T 遺伝子をノックダウンしたものに酷似しており、今後は両者の関係性を含めて解析し、Y-box 遺伝子の機能に迫る予定である。

(3) MASK 法の代替法の検討

MASK 法によるノックダウンと平行して、ゲノム編集技術による母性発現遺伝子のノックアウト法の樹立を進めた。カタユウレイボヤでは TALEN を用いた効率よいノックアウト法を我々のグループが構築しており、特に生殖細胞系列に変異を導入できる手法を確立している。この系を用いた。母性発現遺伝子に対してノックアウト効率の高い TALEN を 7 遺伝子に対して構築した。

(4) MASK 法の動作原理の解明

MASK 法によって遺伝子の母性発現がノックダウンされる原理を調べる目的で、Ci-pem 遺伝子のノックダウンベクターを使ってベクターに改変を加え、ノックダウンに必要な DNA 配列の探索を行った。これまでの解析では、MASK ベクターには必ず eGFP の配列と Minos トランスポゾンが含まれていたため、これらの必要性を追求する目的で、eGFP 配列を全く含まず、レポーター遺伝子を別のもの (wild type GFP, Kaede, DsRed, Kusabira Orange) に改変した複数のベクター、トランスポゾンを従来の Minos から Sleeping Beauty に改変したもの、トランスポゾン配列を含まないベクターを作製して Ci-pem のノ

ックダウンの有無を検証した。結果、どの改変型ベクターでもノックダウンは生じたため、ノックダウンを引き起こすベクター内の特別な DNA 配列は存在しないと結論づけた。

Ci-pem 遺伝子については様々なデザインの MASK ベクターによるノックダウン系統を作製してきた。また、ノックダウンの実績のあるベクターをトランスジェニックとして有するにもかかわらず、ノックダウンが生じない系統も得ている。これらの Ci-pem 遺伝子の MASK 系統において特異的に発現している small RNA を解析したところ、これらの RNA は piRNA の特徴を有することが判明した。この RNA 群を MaskRNA と名付けた。MaskRNA は転写依存的に作製されること、つまりノックダウンベクター内で転写されない領域からは生じないこと、同一の DNA 配列からは、系統やベクターのデザインが異なっても相同な MaskRNA が合成されること、逆にノックダウンする遺伝子が同一であっても例えば異なるレポーター遺伝子からは異なるパターンで MaskRNA が合成されること、が判明した。MaskRNA が piRNA の一種であると判断されたことから、MaskRNA は piRNA の合成機構の、特に ping-pong 機構によって転写依存的に合成されることや、生殖細胞特異的に合成されるであろうことが予想され、MASK 法が生殖細胞特異的であることや、母性発現遺伝子の転写調節領域やターゲットとする遺伝子の部分配列がベクター内に必要であることがうまく説明できる結果であった。次世代の MASK ベクターとしては、piRNA 合成機構をミミックしたデザインにすることで、より効果的にノックダウンを生じさせることができると予想される。以上のことを論文として発表した。

(5) トランスジェニック系統作製の新手法の構築

MASK 法の効果的な運用のためには、遺伝子組換え系統を迅速にまたローコストで作製できるシステムが必須である。この基盤達成のために、PhiC31 によるトランスジェニック系統作製方法のカタユウレイボヤへの導入を試みた。PhiC31 の組換え認識配列を有するカタユウレイボヤ系統の樹立、PhiC31 がカタユウレイボヤゲノムにおいて組換えを引き起こすこと、組換え効率はカタユウレイボヤの従来の形質転換法であるトランスポゾンを用いた手法と比べて高効率であろうと予想されること、を期間内に突き止めた。

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 2 件)

Satoh T., Iitsuka T., Shiraishi A., Hozumi A., Satake H., Sasakura Y. (2018)

piRNA-like small RNAs are responsible for the maternal-specific knockdown in the ascidian *Ciona intestinalis* Type A. Scientific Reports 8, 5869. 査読有

Sasakura Y. (2018)

Germline transgenesis in *Ciona*. Adv. Exp. Med. Biol. 1029, 109-119. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~sasakura>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笹倉 靖徳 (SASAKURA, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：23681039