

論文内容の要旨

*1700108J01Rik* and *1700101O22Rik* are mouse testis-specific long non-coding RNAs

*1700108J01Rik* と *1700101O22Rik* はマウス精巣特異的長鎖ノンコーディング RNA である

日本医科大学大学院医学研究科 分子解剖学分野

大学院生 宋曉輝

Histochemistry and Cell Biology (2018 年掲載予定)

## 【目的】

精巣における精子形成は、精祖細胞から精子が形成される、一連の精細胞分化過程である。この形成過程において、近年、蛋白質をコードしていない非コード RNA(ncRNA)が遺伝子発現の調節 役として注目を集めている。ncRNA は、20 から 50 塩基ほどの短鎖 ncRNA、および 200 塩基以上の長鎖 ncRNA の 2 種類に大別される。microRNA などの短鎖 ncRNA の精子形成過程における転 写後レベルでの遺伝子発現制御への関与が報告されているが、長鎖 ncRNA については発現プロ ファイルおよびその役割は未だ明らかにされていない。本研究では、精巣特異的長鎖 ncRNA を同定するために、公開データベースを利用して長鎖 ncRNA の精巣発現をイン・シリコ解析するとともに、生化学的および組織化学的解析により長鎖 ncRNA の発現解析を行った。

## 【方法】

日本医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。The Functional ANnotation Of the Mammalian genome 5 (FANTOM5) 公開データベース[マウスの様々な細胞・組織について、どの遺伝子がゲノム上のどの場所からどの程度転写されているかを Cap Analysis of Gene Expression (CAGE)法を用いて網羅的に調べたデータ]を用いて、成獣マウス精巣に発現している長鎖 ncRNA プロファイリングを行った。次に、FANTOM5 によるイン・シリコ解析から、成獣組織において主に精 巣に発現し、かつ精巣で高発現している長鎖 ncRNA を選択し、reverse transcription quantitative polymerase chain reaction(real-time PCR)法を用いて成獣マウス臓器(精巣、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、小腸、腎臓、および卵巣)における発現レベルを定量的に比較解析した。さらに、RNA プローブを作製し、in situ hybridization (ISH)法を用いて成獣精巣における発現ステージと発現細胞を解析した。

## 【結果】

FANTOM5 によるイン・シリコ解析から、成獣マウス精巣データの CAGE ピークに Ensembl gene ID が割り当ることができた遺伝子発現のうち、コード RNA は 95.70%を占めていたのに対して、長鎖 ncRNA は 2.91%であった。574 種の長鎖 ncRNA が検出され、アンチセンス長鎖 ncRNA とインター ジェニック長鎖 ncRNA がそのほとんどを占めていた。成獣マウス精巣で高発現している長鎖 ncRNA(上位 50 位)のうち、多くの長鎖 ncRNA は精巣特異的に発現しており(その他の成獣組織 ではほとんど発現しておらず)、さらに、精巣の発達段階(胎生 13 日から成獣まで)において、生後 最初の精子形成時期以降から発現が増加し、成獣でピークに達することが示された。 イン・シリコ解析から成獣マウス精巣で高発現している精巣特異的長鎖 ncRNA のうち、アンチセ ンス長鎖 ncRNA である 1700108J01Rik(J01Rik)およびインタージェニック長鎖 ncRNA である 1700101O22Rik(O22Rik)を選択し、real-time PCR 解析と ISH 解析を行った。Real-time PCR 解析 により、J01Rik および O22Rik は精巣以外の臓器ではほとんど検出されず、精巣で高発現しており、 精巣特異的長鎖 ncRNA であることを確認した。次に ISH 解析から、

J01Rik および O22Rik はともに 精細管内の精細胞に陽性であり、セルトリ細胞およびライディッヒ細胞には陰性であった。J01Rik は stage VI のパキテン精母細胞から step 10 の精子細胞まで検出され、stage XII の精母細胞に発現が 一番高いことが示された。O22Rik は step 6 から step 9 の精子細胞にのみ陽性に検出され、step 8 の精子細胞において最も発現が高かった。J01Rik および O22Rik の細胞内局在は、主に細胞質に 局在していた。

## 【考察】

近年、遺伝子発現のゲノムワイド解析研究から多くの長鎖 ncRNA の存在が報告されつつあるが、ほとんどの長鎖 ncRNA の細胞・組織特異的な発現様式や機能は明らかになっていない。今回、イン・シリコ解析により、成獣マウス精巣に発現する長鎖 ncRNA のプロファイルを明らかにした。さらに、生化学的および組織化学的解析から、アンチセンス長鎖 ncRNA である J01Rik およびインター ジェニック長鎖 ncRNA である O22Rik がマウス精巣特異的長鎖 ncRNA であり、特定の成熟段階の 精細胞に発現していることを明らかにした。精巣における長鎖 ncRNA の役割は、僅かしか報告されていない。J01Rik および O22Rik がマウス精巣特異的な長鎖 ncRNA であり、パキテン後期の精母細胞から円形精子細胞までの限られた 時期の精細胞に発現していた。この発現時期は、精子形成時期の精細胞において、mRNA 貯蔵および翻訳遅延のための転写の再活性時期に一致していた。さらに ISH 解析から明らかにされた主な 細胞内局在が核ではなく細胞質であることから、転写再活性時期において、エピジェネティック制御や 転写レベルでなく、転写後レベルでの遺伝子発現調節に J01Rik および O22Rik が関与していることが推察される。また、J01Rik および O22Rik に関する相同性検索において、僅かな齧歯目(それぞれゴールデン ハムスターとラット)に配列の相同性を認めるのみであった。しかし、長鎖 ncRNA の場合、配列だけでなく二次構造の相同性が共通の機能を果たす可能性も報告されており、解釈に注意が必要である。今回、FANTOM5 データベースを用いたイン・シリコ解析により明らかとなった成獣マウス精巣に 発現する長鎖 ncRNA のプロファイルは、今後のラット精巣の長鎖 ncRNA の発現と機能を解明する うえで有用なリソースになることが期待される。イン・シリコ解析と生化学的および組織化学的解析を 組み合わせた解析は、マウス精巣特異的長鎖 ncRNA の同定に有効な方法であった。組織化学的 解析、特に ISH は精巣における長鎖 ncRNA の細胞・組織特異的な発現様式を明らかにするための解析方法として優れていた。J01Rik および O22Rik がマウス精巣特異的長鎖 ncRNA であることを明らかにすることができたが、機能解析は課題として残った。今後、J01Rik および O22Rik のノック ダウン、ノックアウトによる機能解析を進め、精子形成における役割の解明に努めたい。