

心臓形成における長鎖ノンコーディング RNA の機能

川原敦雄

山梨大学医学教育センター 発生生物学

【研究の背景】

研究課題実施者は、これまでに心臓発生に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の順遺伝学的解析から、その原因遺伝子産物である Spns2 が脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の輸送体として機能することを報告した (Kawahara A et al. *Science*, 2009)。S1P シグナルは、心臓前駆細胞の移動を制御することにより心臓形成に寄与していると考えられた。次に、ゼブラフィッシュにおけるゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) を用いた標的遺伝子のノックアウト法を日本で最初に確立した。本研究では、未解析ゲノム領域の機能解析を可能とする新しいゲノム編集技術を開発し、長鎖非翻訳 RNA (lncRNA: long non-coding RNA) の機能解析に応用する。

【目 的】

本研究は、心臓・血管組織に発現する lncRNA の単離とその心臓・血管発生における役割を明らかにすることを目的とする。ゼブラフィッシュ初期胚に発現する非翻訳 RNA の中から未解析の lncRNA を同定し、初期発生過程における発現パターンを解析する。次に、lncRNA の機能解析に応用可能な未解析ゲノム領域を自在に操作しうるゲノム編集技術を開発する。最終的には、hsp70 promoter を GFP 遺伝子に接続したレポーター遺伝子を標的 lncRNA のゲノム部位に挿入することで、標的 lncRNA の心臓・血管形成における機能を明らかにする。

【方 法】

本研究は、最初に初期発生過程で心臓・血管組織などの循環器系に発現が認められる lncRNA を単離する。次に、hsp70 promoter 制御下に GFP 遺伝子を接続したレポーター遺伝子を標的ゲノム部位にノックインするゲノム編集技術を開発し、標的 lncRNA 座位を hsp70 promoter-eGFP と置換することで lncRNA の心臓・血管形成における機能を明らかにする。

(1) 心臓・血管組織に発現する未解析 lncRNA の同定: ゼブラフィッシュ初期胚の RNA データーベースから心臓・血管発生を制御しうる遺伝子の近傍に位置する新規の lncRNA 候補を検索し、pCS2 発現ベクターにサブクローニングする。DIG (digoxigenin) で標識された RNA プローブを調整し、whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 法で心臓・血管に発現する lncRNA を単離する。

(2) 新規ノックイン法の開発: hsp70 promoter-GFP と CRISPR 切断部位を組み込んだベクターを標的部位に挿入するゲノム編集技術を開発する。次に、上記で同定した候補 lncRNA 座位に対する crRNA をデザインし、ゲノム編集活性を評価する。

(3) 標的 lncRNA 座位へのレポーター遺伝子の挿入: 上記で開発した CRISPR による新規ノックイン法を用い標的 lncRNA の標的ゲノム部位に hsp70 promoter-GFP コンストラクトを挿入する。樹立した系統を用い lncRNA の初期発生における動態解析を行うとともに、ノックイン・アレルのホモ接合体を作製し、標的 lncRNA が欠損した時の表現型解析を行う。

【結 果】

心臓・血管を制御する遺伝子の近傍に位置する未解析 lncRNA の 70 候補を単離し、DIG 標識した RNA を用いた WISH 法により初期発生過程における発現パターン解析を行った。lncRNA-7 と lncRNA-27 が中枢神経系に強く発現し、lncRNA-43 が筋間隔に特異的に発現していた。解析した lncRNA 候補の中で、lncRNA-10 のみが循環器系に特異的に発現しているという結果が得られた。次に、lncRNA-10 の座位を標的とした crRNA をデザインし、tracrRNA と Cas9 スクレアーゼと一緒に受精卵にインジェクションすることにより高い効率でゲノム編集を誘導できるという結果が得られた。一方、lncRNA の機能解析に応用できるゲノム編集技術を開発する必要性があったため、hsp70 promoter-GFP コンストラクトを標的ゲノム部位に挿入することで、ヘテロ接合体で標的遺伝子の動態解析を行い、ホモ接合体で機能欠損の表現型解析が行うことができるかを、pax2a 遺伝子座へのゲノム改変で検証した(pax2a の遺伝子破壊の表現型が顕著な表現型を示すために解析法の評価が容易である)。レポーター遺伝子の挿入により、遺伝子発現動態解析と機能欠損の表現型解析が機能することが証明されたため(参考文献を本研究成果として発表)、lncRNA-10 の機能解析に応用した。現在、lncRNA-10 座位へのノックイン系統の樹立に進んでいる。

【考 察】

ゼブラフィッシュのゲノム配列が公表されたが、タンパク質をコードしている領域以外の非翻訳領域(microRNA や lncRNA が広範囲に発現している)におけるゲノムの機能は不明な点が多い。本研究では、lncRNA に焦点を絞り、最初に循環器系を制御する遺伝子の近傍に位置する未解析の lncRNA の初期発生における発現パターンを WISH 法で解析した。その結果、ほとんどの lncRNA が循環器系に発現が認められず、特に神経系に発現する lncRNA が多いという結果が得られた。これは、lncRNA が近傍の遺伝子の発現制御を受けるといよりも独自の発現制御システムを保持していると考えられた。lncRNA-10 は、循環器系に発現が限定しており(ゲノム編集活性の高い crRNA が得られており)、最適な標的 lncRNA と考えられた。hsp70 promoter-GFP コンストラクトを標的 lncRNA に挿入する新しいゲノム編集技術も開発することができたので、lncRNA-10 の標的ゲノム部位にレポーター遺伝子を挿入することが遂行できると考えている。今後、lncRNA-10 発現細胞の循環器系における動態解析を行い、lncRNA-10 を欠損した時の表現型解析から lncRNA の生体内での機能を明らかにしたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでヒト循環器疾患と lncRNA の関連性は報告されていない。本研究において循環器系に特異的に発現する lncRNA-10 が同定できたので、hsp70 promoter-GFP コンストラクトを標的 lncRNA にノックインした系統を用いた機能解析から lncRNA-10 の循環器系における役割を明らかにできることを期待している。もし lncRNA-10 を破壊したゼブラフィッシュ胚が循環器系に異常を示した場合、ヒト循環器疾患と関連する可能性があるので、ヒト lncRNA の循環器系における機能解析へと展開したい。

【参考・引用文献】

- (1) Ota S, Taimatsu K, Yanagi K, Namiki T, Ohga R, Higashijima S and Kawahara A “Functional visualization and disruption of targeted genes using CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration in zebrafish” *Scientific Reports* 6, 34991 (2016)
- (2) Kawahara A, Hisano Y, Ota S, Taimatsu K “Site-specific integration of exogenous genes using genome editing technologies in zebrafish” *International Journal of Molecular Sciences* 6, 34991 (2016)