HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the mechanism of spermatocyte-specific gene activation by enhancer and long noncoding RNA during mouse spermatogenesis [an abstract of entire text]
Author(s)	佐藤, 優衣
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第13167号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70049
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学部図書室】
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Yui_Satoh_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　佐　藤　優　衣

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of spermatocyte-specific gene activation by enhancer and long noncoding RNA during mouse spermatogenesis
（マウス精子形成におけるエンハンサーと long noncoding RNA による精母細胞特異的遺伝子活性化メカニズムに関する研究）

精子形成は精原細胞が一次精母細胞、二次精母細胞、精細胞を経て精子を形成する過程であり、いまだに未解明な事象が多く残されている。中でも減数分裂期ステージ特異的遺伝子の活性化機構の解明は、そのような遺伝子が精子形成の進行に重要な役割を担うことから、特に重要な課題である。一般的に転写活性化にはプロモーターやエンハンサー、クロマチン修飾など様々な因子が関与するが、その一方で、精巣生殖細胞においては長らく近位プロモーターのみで調節されていると考えられてきた。しかし、近年プロモーター以外の因子が減数分裂中の転写活性化に関与するという報告がなされてきていて、さらに詳細な解析が必要な状況となっている。

本研究ではマウス精母細胞特異的に発現する *Protease, serine* (*Prss*)*/Testis specific serine protease* (*Tessp*)遺伝子クラスターをモデルとして、この謎の解明を目指した。*Prss/Tessp* 遺伝子クラスターは、精巣の精母細胞特異的に転写される 3 つのセリンプロテアーゼをコードするパラログ遺伝子（*Prss42/Tessp-2*、*Prss43/Tessp-3*、*Prss44/Tessp-4*）からなり、これらの遺伝子は減数分裂の進行に重要な機能を持つことがわかっている。今回は *Prss/Tessp* 遺伝子座においてもプロモーター以外の因子が関与すると考えて解析したところ、long noncoding RNA (lncRNA)やエンハンサーによる調節が明らかになった。

第一章

まずは転写活性化に関与する領域の候補として *Prss/Tessp* 遺伝子座における DNase I Hypersensitive site (DHS)の探索を行ない、8 つの DHS の存在を確認した。これらのうち *Prss42/Tessp-2* 遺伝子下流の HSVIII 近くの領域において、精巣特異的な転写産物の存在がトランスクリプトーム解析で示唆されたため、RT-PCR 解析を行なったところ、新規 lncRNA の発見に至り *lncRNA-HSVIII* と命名した。*in situ* hybridization などの結果から、*lncRNA-HSVIII* は *Prss/Tessp* 遺伝子の転写される精母細胞において核に局在していた。すでに *lncRNA-HSVIIII* の転写領域が精母細胞において *Prss42/Tessp-2* プロモーターと結合している事が判明していたので、*Prss42/Tessp-2* 活性化に関与する可能性を検証した。*Prss42/Tessp-2* プロモーターで駆動する

Luciferase 遺伝子の下流に *lncRNA-HSVIIII* 転写領域を含む 5.8kb 配列(HSVIII5.8kb)をつないだコンストラクトを作成し、この遺伝子を内在で発現する Hepa1-6 細胞と P19TG1 細胞で転写活性を測定した。その結果、*Prss42/Tessp-2* プロモーター活性は上昇したが、このコンストラクトから *lncRNA-HSVIII* が転写されていない事も判明した。したがって、この *Prss42/Tessp-2* プロモーター活性の上昇は HSVIII5.8kb 中のエンハンサー活性によるものと考えられた。実際に、*lncRNA-HSVIII* 転写領域の上流と下流の配列がいずれもエンハンサー活性を持つ事が分かった。

第二章

トランスクリプトーム解析では、*Prss44/Tessp-4* の下流からも精巣特異的な転写産物の存在が示されていて、実際に RT-PCR を行なったところ、もう１つの新規 lncRNA を発見し、*Tesra* と名付けた。生化学的解析によると *Tesra* は精母細胞の核に局在することが明らかとなり、*Prss/Tessp* 遺伝子の転写活性化に寄与する可能性を検証した。その結果、Hepa1-6 細胞に *Tesra* を過剰発現させたところ *Prss42/Tessp-2* の発現量が有意に上昇し、レポーター解析でも *Tesra* の過剰発現が *Prss42/Tessp-2* プロモーター活性を有意に上昇させることがわかった。さらに Chromatin Isolation by RNA purification (ChIRP) assay により、*Tesra* 転写産物が精巣生殖細胞で *Prss42/Tessp-2* プロモーター領域に結合していることもわかった。したがって、*Tesra* は *Prss42/Tessp-2* プロモーターに結合してその活性を上昇させる事でこの遺伝子の転写活性化に寄与する事が判明した。最後に、*Tesra* が第一章で同定したエンハンサーと機能的に協働する可能性について、Tet-on system を用いて検討した。その結果、*Tesra* は *lncRNA-HSVIII* 下流エンハンサーと同時に存在する時に *Prss42/Tessp-2* プロモーター活性を加算的に上昇させることがわかった。つまり、下流エンハンサーと *Tesra* は *Prss42/Tessp-2* 遺伝子の転写活性化に対して、それぞれ独立でも機能できるが機能的に協働もしうる事が判明した。

本研究により *Prss/Tessp* クラスターのうち *Prss42/Tessp-2* 遺伝子の転写活性化にエンハンサーと lncRNA が機能することが明らかとなった。これにより減数分裂における精母細胞特異的遺伝子活性化という重要な現象に新たな知見を加えることができた。*Tesra* の知見はこれまで大部分が未解明であった精巣の減数分裂における lncRNA 機能の解明という点でも意義のある成果となった。また、一般的に発現パターンが同一のクラスター遺伝子は１つの因子による調節を受けるとされてきたが、*Prss/Tessp* クラスターでは *Prss42/Tessp-2* と他の遺伝子で異なる機構がはたらくことになり、クラスター遺伝子の調節機構においても新たな知見を提供する事ができた。さらに、今回の *Tesra* とエンハンサーの関係性はこれまでにないものであり、lncRNA とエンハンサーの関連において興味深いメカニズムを提示した。以上の事から、本研究の成果は精子形成、転写調節、lncRNA 機能において新たな知見をもたらす大きな意義のあるものである。