



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on physiological functions and regulatory mechanisms of a newly identified murine testis-specific long noncoding RNA, Start [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大塚, 海
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14608号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82762
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kai_Otsuka_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 大 塚 海

審査担当者	主査	准教授	木 村 敦
	副査	教 授	勝 義 直
	副査	教 授	黒 岩 麻 里
	副査	准教授	小 谷 友 也

学 位 論 文 題 名

Studies on physiological functions and regulatory mechanisms of a newly identified murine testis-specific long noncoding RNA, *Start*

(新規同定されたマウス精巣特異的な長鎖非コード RNA「*Start*」の生理機能ならびに分子基盤解析)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

長鎖非コード RNA (lncRNA, long noncoding RNA) は、タンパク質に翻訳されずに機能する 200 塩基以上の RNA 分子である。21 世紀に入ってその存在が明らかとなり、機能や作用メカニズムについて注目が集まっている。哺乳類では、精子形成とテストステロン産生を担う精巣で特に多くの lncRNA 発現が見られるものの、精巣における機能解析は進んでいない。著者は、マウスの *Prss/Tessp* 遺伝子座において新規の lncRNA「*Start*」を同定し、その発現と機能解析および作用メカニズムについて研究を行った。その結果、*Start* がライディッヒ細胞において miRNA との相互作用を通じてステロイド合成系遺伝子の発現を活性化することでテストステロン産生を制御すること、そして、生殖細胞内ではエンハンサー様の転写活性化機能を持つことを明らかにした。

Prss/Tessp 遺伝子座はマウス 9 番染色体上に位置しており、6 つの精巣特異的なプロテアーゼ遺伝子と 2 つの精巣特異的 lncRNA を含むことなどから、精子形成には特に重要なゲノム領域であると考えられている。著者は、この遺伝子座の *Prss43/Tessp-3* 遺伝子下流から、精巣の生殖細胞とライディッヒ細胞のみで発現する新規の lncRNA を発見し、*Start* と名づけた。ゲノム編集法によって *Start* を欠失したノックアウトマウスを作成したところ、生後 2.5 カ月齢では精子形成に形態的な異常は見られなかったが、生後 8 日齢ではライディッヒ細胞の数が減少していた。また RNA-seq 解析と定量的 RT-PCR などによると、生後 2.5 カ月齢と生後 8 日齢でステロイド合成系の *Hsd3b1* 遺伝子と *Star* 遺伝子の発現異常が観察され、血清テストステロン濃度はいずれもノックアウトマウスで有意に低かった。生後 2.5 カ月齢では精巣内のテストステロン濃度もノックアウトマウスで低かった。*Start* をライディッヒ由来の 2 つの細胞株に強制発現する実験などから、*Start* はステロイド合成を促進する因子であると結論した。

次に、著者は *Start* がステロイド合成系の遺伝子を調節する分子メカニズムを解析した。*Start* がライディッヒ細胞で細胞質に局在することから miRNA 系の関与を想定して、ルシフェラーゼ遺伝子に *Start* 配列をつなぐとその酵素活性が有意に減少すること、その減少が *Ago2* ノックダウンによって見られなくなること、ステロイド合成系遺伝子の発現が *Ago2* ノックダウンで上昇および過剰発現で減少することを示した。また精巣から実際に *Start* と結合する miRNA 候補を 3 つ同定することにも成功した。したがって *Start* は *Hsd3b1* や *Star* の mRNA に結合する miRNA を吸収する形で無力化するように機能する可能性が高いと結論づけた。

最後に、著者は *Start* の生殖細胞における機能を解析した。*Start* は多くの遺伝子が転写活性化

するパキテン期の一次精母細胞で核局在を示すこと、および*Start* ノックアウトマウスで*Prss/Tessp* 遺伝子座の 2 つの遺伝子の発現が減少していたことから、著者は *Start* の転写調節活性を調べた。*Start* を含む 5.4 kb の配列を用いて、レポーター解析を行ったところ、エンハンサー活性が確認された。この時、Tet-On システムによって *Start* の転写を誘導するとレポーター活性は有意に高くなることがわかり、逆に *Start* のノックダウンでは減少した。一次精母細胞で *Start* に転写されるゲノム領域にエンハンサーを示すヒストン修飾があることも確認し、一次精母細胞では *Start* が核内で転写活性化因子として機能すると結論した。

以上を要するに、著者は、*Start* がライディッヒ細胞で miRNA 系の制御を通じてステロイド合成を調節すると同時に、一次精母細胞では転写活性化を担うという、多機能性を持つことを明らかにした。これは、世界で初めて精巣ステロイド合成を制御する lncRNA を同定し、その作用メカニズムを解明したと同時に、ライディッヒ細胞と一次精母細胞で異なる機能を発揮する精巣 lncRNA を発見したものでもある。その成果は、生殖生物学ならびに RNA 生物学において多大な貢献をするものである。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。