

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25112005

研究課題名(和文)小分子RNAが誘導するエピゲノム形成の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of small RNA-mediated epigenetic programming

研究代表者

齋藤 都暁(SAITO, KUNIAKI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：30423396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 63,300,000円

研究成果の概要(和文)：Piwi蛋白質の機能を解明するため、新たなPiwi相互作用因子の探索を行ったところ、DmGTSF1と命名した因子を発見した。DmGTSF1はレトロトランスポソンの抑制に必須であることやZn-fingerモチーフの重要性を明らかにした。更に、リンカーヒストンH1もPiwiと相互作用することを見いだした。生化学的解析から、Piwiが標的レトロトランスポソンとH1との相互作用を正に制御することを発見した。さらに、ATAC-seq法を駆使することでPiwiがH1を介してクロマチン凝集を促す因子であることを明らかにした。以上の結果から、小分子RNAによるエピゲノム制御の分子機構の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the function of Piwi, we looked for Piwi-interacting proteins and discovered a factor named DmGTSF1. We discovered that DmGTSF1 is essential for retrotransposon silencing and importance of Zn-finger motif of DmGTSF1. In addition, we found that linker histone H1 also interacts with Piwi. Biochemical analyses revealed that Piwi positively regulates the interaction between target retrotransposons and H1. Furthermore, ATAC-seq method enabled us to conclude that Piwi promotes chromatin aggregation of target retrotransposons via H1. Based on the above results, a molecular mechanism of epigenome regulation by small RNA was addressed.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピゲノム Piwi piRNA ショウジョウバエ クロマチン OSC ヒストン

## 1. 研究開始当初の背景

20~30塩基程度の小分子RNAによって引き起こされる遺伝子発現抑制機構をRNAサイレンシングと呼ぶ。RNAサイレンシングにおける中核因子はArgonauteである。Argonauteは小分子RNAと直接結合する事によってその塩基配列に従って標的RNAを認識し、それに作用する事によって標的RNAの発現を抑制する。ショウジョウバエは5種類のArgonauteタンパク質を発現する。AGO1とAGO2はほぼ全組織で恒常的に発現する一方、AGO3、Aubergine、Piwiは生殖細胞特異的に発現する(Brennecke et al. Cell 2007)。これらショウジョウバエArgonauteに結合する小分子RNAはお互い異なっており、さらには各Argonauteが機能するRNAサイレンシング経路は独立して存在する事が示されている。私はこれまでショウジョウバエArgonauteのうち、主にPiwiタンパク質に焦点をあて研究を進める事によって、Piwiが関わるRNAサイレンシング経路の存在を見出し、さらには本経路における必須、及び関連因子の同定およびそれらの機能解析を進めてきた。これら一連の研究を通して、Piwiは、レトロトランスポゾン由来の小分子RNAであるpiRNAと結合する事によってレトロトランスポゾンの発現を抑制する因子である事、piRNAの生合成にはAubergineとAGO3のSlicer活性が関わる事、これらSlicer活性依存的にpiRNA Amplification loopが成立し、様々な種類の、数多くのpiRNAが生成される事、またpiRNAはPimetによって3'末端メチル化修飾を受ける事、などを明らかにしてきた。一方で、ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞OSCを確立し、新しいpiRNA実験系の開発(Saito et al. Nature 2009)に成功した。それをもとにして生合成因子の同定した(Saito et al. Genes & Dev. 2010)。更に、piRNA生合成過程においてZucchiniがendoribonucleaseとして働くという仮説を提示した(Nishimasu and Ishizu et al. Nature 2012)。このようにpiRNA生合成機構の解明が進んでいた一方、piRNAによるレトロトランスポゾンの発現抑制機構については不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエをモデル動物として用い、Piwi-piRNA複合体によるレトロトランスポゾン抑制機構を解明することを目指す。ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞(OSC)ではpiRNAが発現し、トランスフェクション法、ノックダウン法など様々な生化学的実験手法が開発済みであることから、単純化された実験系を駆使することでpiRNAによるヘテロクロマチン形成誘導機構に迫りたい。具体的には、(a)Piwi-piRNA複合体によるレトロトランスポゾン認識機構の解明、(b)レトロトランスポゾン領域のエピゲノム変化の同定と誘導機構解明、(c)エピゲノム変化を誘導する蛋白質因子群の同定と、その役割の解明、

(d)エピゲノム変化の誘導に至るカスケードの解明、(e)小分子RNAによるエピゲノム変化が周囲のクロマチン領域に与える影響、を解明する。最終的にpiRNAによって誘導されるエピジェネティックマークとその誘導機構を関連蛋白質群の機能解明を通じて理解したい。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞OSC(Saito et al. Nature 2009)を駆使し、以下の解析を行う。

(1)トランスポゾンの発現抑制に重要な因子のスクリーニング

Piwiをノックダウンした場合、コントロールと比較して約100倍ものレトロトランスポゾンmRNAの過剰発現が起こる。この感度の良いシステムを用いて、既に150種の候補遺伝子から、4種の因子(HP1a, spindle E, maelstrom, CG3893)がトランスポゾンの抑制段階に必須であることを見いだした。そこで、これらに対するマウスモノクローナル抗体を作製し、直接結合する核酸や蛋白質を同定する。更に、クロマチン免疫沈降法による相互作用ゲノム領域の特定、免疫沈降法による蛋白質間相互作用と相互依存性解析、各種ヒストン修飾を認識する抗体を用いたChIP-seqパターンが、各因子のノックダウンで変動するかの検討、などを行う。これらの解析結果を統合し、各トランスポゾン抑制因子の機能と相互作用様式を決定する。

(2)piRNA-Piwi蛋白質群複合体によるトランスポゾン抑制機構

piRNAは一本鎖のRNA分子であり、これがレトロトランスポゾン認識の配列情報として働くには、DNAとの塩基対形成、もしくは転写途上のRNAと塩基対を形成することで機能すると考えられる。そこで、現有する抗Piwi抗体を用いてPiwi-piRNAが直接結合するRNA分子をCross-Linking ImmunoPrecipitation(CLIP)法で、直接結合するDNAをChIP法で検討し、Piwi-piRNA複合体が直接結合する核酸分子を同定する。次に(1)の解析において同定した蛋白質が、piRNA-Piwi複合体による標的核酸の認識に影響するか否かを検討する。更に(1)で同定した蛋白質の発現を抑えた際に標的核酸結合能が減少するか否かを定量的PCRによって検討する。

## 4. 研究成果

研究開始当時はpiRNAと結合するPiwiタンパク質が核内で働くことがレトロトランスポゾンの抑制に重要であることが分かっていたが、抑制段階に働く因子は報告されていなかった。OSCにおいてレトロトランスポゾンmdg1の発現を指標にレトロトランスポゾン抑制因子の探索を行った。100以上の候補遺伝子群に対してsiRNAによるノックダウンを行った結果、CG3893遺伝子を含む複数のレトロトランスポゾン抑制候補遺伝子を見

いだした。CG3893 遺伝子を DmGTSF1 と命名し、更にその機能解明を行った。はじめにノザンブロット法によって piRNA 生合成への関与を検討した。DmGTSF1 のノックダウン細胞では piRNA 量に変動が認められなかった。したがって、DmGTSF1 遺伝子は piRNA 生合成に関与しないことが明確となった。更に、細胞内局在を検討した結果、核に局在することが明らかとなった。DmGTSF1 遺伝子のハエ個体での機能を検討するため、DmGTSF1 変異ハエ系統を確立した。DmGTSF1 変異ハエを用いて解析下結果、著しく卵巣形成が阻害され、Piwi 変異ハエ同様、不稔となることを見いだした。次にトランスポゾンの発現について RT-qPCR 法で検討したところ、DmGTSF1 変異ハエでは、レトロトランスポゾンの発現が上昇していることが分かった。次に、DmGTSF1 の分子機能に迫るため、Piwi との相互作用の有無を IP-western blot 法で検討した。その結果、Piwi は DmGTSF1 と蛋白質間相互作用することを見いだした。次に、DmGTSF1 は CHHC type の Zn-finger ドメインを有することから、そのレトロトランスポゾンサイレンシングへの重要性を検討することとした。OSC を用いたレスキュー実験において、Zn-finger の点突然変異型は、Piwi と相互作用するものの、レトロトランスポゾンの抑制能を消失することが明らかとなった。以上のことから、DmGTSF1 は Piwi と核内で相互作用し、その Zn-finger ドメインを介して機能することで piRNA の標的となるレトロトランスポゾンの発現を抑制していることが明らかとなった。

更に Piwi-piRNA 複合体によるエピゲノム制御の分子機構に迫るため、Piwi と相互作用する新たな核内因子を探索した。OSC の核抽出液を用いて、抗 Piwi 抗体による免疫沈降解析を行った結果、Piwi がリンカーヒストン H1 と蛋白質間相互作用することを見いだした。H1 が実際に Piwi と相互作用するかを IP-western blot 法や GST-pull down 法によって確認したところ、Piwi と H1 は蛋白質間相互作用することが明らかとなった。次に H1 が Piwi 同様レトロトランスポゾンの抑制に関与するか否かを OSC で検討した。mRNA-seq 解析の結果、Piwi 同様、H1 のノックダウンでレトロトランスポゾンの発現が上昇した。従って、H1 はレトロトランスポゾンの抑制因子の一つであることが明確となった。

次に Piwi と H1 の相互関係を解析することとした。H1 は転写の抑制を担う因子として知られている。一方、Piwi も転写レベルでレトロトランスポゾンの抑制を担う。以上のことから Piwi は、レトロトランスポゾンと H1 との相互作用を担うのではないかと仮定した。これを検討するため抗 H1 マウスモノクローナル抗体を作製し、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行った。その結果、Piwi のノックダウンによって、H1 のレトロトランスポゾン上での密度が優位に減少することを見いだした。すなわち、Piwi は H1 の密度を正に

制御すると考えられた。次に、ChIP-seq、ATAC-seq 法を駆使し、H1 の制御が Piwi によるクロマチン凝集制御に必須であることを見だし、報告した (Iwasaki YW et al. Mol Cell 2016) (図)。

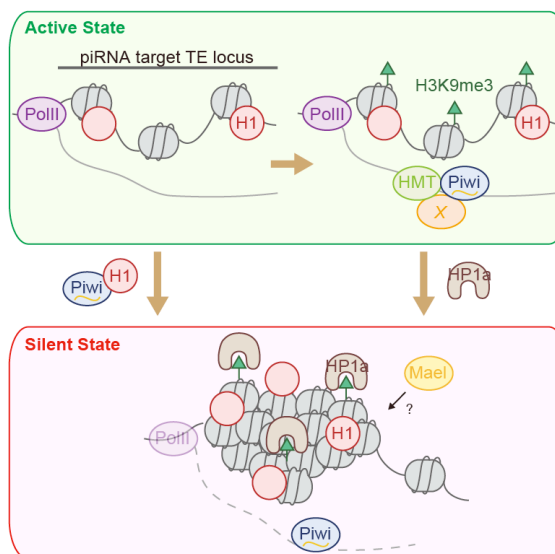


図:Piwi-piRNA 複合体によるエピゲノム制御モデル

以上の研究では、ヘテロクロマチンの指標として考えられている HP1a 蛋白質が高密度でクロマチン上に存在していても、必ずしもそれがクロマチン凝集につながらないことも併せて明らかにした。言い換えれば、HP1a とクロマチン凝集には 1 : 1 の相関関係が無いと結論づけられ、ヘテロクロマチンと転写の相互関係に対する理解を新たにする必要性があると考えられた。

以上のことから、研究開始当時に目標としていた関連因子群の同定と機構解明の両方を達成できたと考える。

## 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)

(1) Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, \*Siomi H, \*Saito, K. (2016). Piwi modulates chromatin accessibility by regulating multiple factors including histone H1 to repress transposons. *Molecular Cell* 63, 408-419. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.008. 査読有り

(2) Ohtani, H., Iwasaki, Y.W., Shibuya, A., Siomi, H., \*Siomi, M.C., and \*Saito, K. (2013). DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the Drosophila ovary. *Genes Dev* 27, 1656-1661. doi: 10.1101/gad.221515.113. 査読有り

〔学会発表〕（計 5 件）

(1) Saito K.

Small RNA-induced epigenetic control in Drosophila.

ConBio 2017: 4AS14 遺伝学とエピ遺伝学, 2017.12.9 (神戸, 日本)

(2) Saito K., Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H. Piwi silences transposon transcription by regulating chromatin compaction.

Cell Symposia: Functional RNAs, 2016.11.7 (Guangzhou, China)

(3) Saito K., Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H. Piwi promotes transcriptional silencing by regulating chromatin compaction.

Keystone Symposia, 2016.1.25 (Colorado, USA)

(4) Saito K.

ショウジョウバエ Piwi-piRNA 複合体によるクロマチン制御機構

日本エピジェネティクス研究会年会, 2015.5.25 (東京, 日本)

(5) Saito K.

Molecular mechanisms of piRNA-mediated transposon silencing.

日本遺伝学会年会, 2014.9.17 (長浜, 日本)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 都暁 (SAITO Kuniaki)

慶應義塾大学・医学部・准教授 (H25-H28 年度)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授 (H29 年度)

研究者番号: 30423396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし