

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08632

研究課題名(和文) piRNAをガイドとしたレトロトランスポゾン・遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Research for understanding mechanisms to regulate retrotransposons and genes by piRNA-guided system

研究代表者

能村 卓慈 (Yoshimura, Takuji)

奈良県立医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10506231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞において、レトロトランスポゾンを抑制する分子機構としてpiRNA経路が存在する。雄マウスの生殖細胞のpiRNA経路において、レトロトランスポゾンRNAはMILI-piRNA複合体によって切断されるが、GTSF1タンパク質はこの過程において極めて重要なタンパク質であることを示した。また、免疫細胞に着目し、レトロトランスポゾンの発現と脾臓T細胞の機能が関係する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報を担うゲノムDNAの維持にとって、レトロトランスポゾンの侵入は脅威であるため、その抑制機構が存在する。piRNA経路は、生殖細胞などにおいて働き、レトロトランスポゾンを抑制する細胞内免疫機構の一つである。研究代表者らは過去に、マウス雄の生殖細胞においてGTSF1がレトロトランスポゾンの抑制に関係していることを明らかにしたが、その分子機構は不明であった。本研究課題においては、GTSF1はpiRNA経路において働くことを示した。また、免疫とレトロトランスポゾンの関連を示唆するデータは、レトロトランスポゾン抑制機構と生体恒常性維持機構がどのように関連するのかを理解する上で重要である。

研究成果の概要(英文)：In germ cells, a molecular machinery, piRNA pathway, suppresses retrotransposons. Our data indicate that GTSF1 protein has a critical role in a process, where retrotransposon RNAs in mouse male germ cells are sliced by MILI-piRNA complexes. We next focused to retrotransposons in immune cells. Our data suggested that retrotransposon activation may link to the function of splenic T cells.

研究分野：免疫学、分子生物学

キーワード：retrotransposon

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、生殖細胞の分化過程においてゲノム全体の DNA メチル化レベルが大きく変化する。マウスの精子形成過程では、胎齢 10.5~13.5 の生殖細胞においてゲノムの脱メチル化が起こり、胎齢 15.5~18.5 においてメチル化の再形成が生じる。piRNA 経路は、このメチル化再形成の時期(胎仔期前精原細胞)において、転写レベルと翻訳前レベルの2段階でレトロトランスポゾンや遺伝子の発現を抑制する。この機構では、piRNAs (25-30 nt) という small RNAs と結合する Piwi family タンパク質 MILI と MIWI2 がそれぞれの関連タンパク質と複合体を形成して中心的な役割を果たす。MILI-piRNA 複合体は、レトロトランスポゾンや遺伝子の mRNA を切断することによって、新たに piRNA を生成すると同時に、相補性を利用して増幅する(翻訳前抑制、piRNA 増幅サイクル)。生成した piRNA は MIWI2 複合体にも捕捉されて MIWI2-piRNA 複合体となり核へ移行する。MIWI2-piRNA 複合体は、piRNA 配列を参照してゲノム上のレトロトランスポゾンや遺伝子の発現調節領域をメチル化し、転写抑制すると考えられている(Kuramochi-Miyagawa, Watanabe et al., *Genes Dev.*, 2008; Fazio et al., *Nature*, 2011)。

研究代表者らは、真核生物種の間で保存され、マウス雄性生殖細胞で強い発現を示す遺伝子として、UPF0224 family 遺伝子群を見出した。マウスにおいてこの family のタンパク質には GTSF1、GTSF1L、GTSF2 の3つがあり、RNA との結合活性を有する CHHC Zinc-finger domain を2つもつ。GTSF1 は胎仔期前精原細胞から精細胞まで、GTSF1L、GTSF2 は胎仔期前精原細胞に加えて一過性に精細胞で発現することが分かった(Yoshimura et al., *Gene Expr. Patterns*, 2007; Takemoto, Yoshimura et al., *PLoS ONE*, 2016)。GTSF1L 欠失マウス、GTSF2 欠失マウスは、いずれも精子形成異常を示さなかったが、タンパク質間相互作用解析から、GTSF1L と GTSF2 はいずれも Piwi family タンパク質複合体に結合し得ることから、Piwi family タンパク質が関わる機序に何らかの役割を果たしているものと予想された(Takemoto, Yoshimura et al., *PLoS ONE*, 2016)。一方 GTSF1 欠失マウスは、雄性不妊を示し、成獣精巣は著明に萎縮し、生殖細胞の精子形成は減数分裂ザイゴテン期以降へ進行しなかった。また、GTSF1 欠失マウス成獣精巣では、レトロトランスポゾンの発現が上昇し、その発現制御領域におけるメチル化レベルが低下していた。これらの結果は GTSF1 が精子形成およびレトロトランスポゾンを抑制する機構に参与することを示していた(Yoshimura et al., *Dev. Biol.*, 2009)。次に、GTSF1 がレトロトランスポゾン抑制機構においてどのように機能しているのかを解析した。タンパク質局在解析から、胎仔期前精原細胞において GTSF1 タンパク質は、piRNA 経路で中心的に働く MILI および MIWI2 タンパク質と共局在することが分かった。タンパク質間相互作用解析においては、GTSF1 タンパク質は MILI-および MIWI2-piRNA 複合体の両者に含まれることが分かった。これらの解析は、GTSF1 タンパク質が MILI-および MIWI2-piRNA 複合体と相互作用して働くことを示唆していた。また、GTSF1 欠失胎仔期前精原細胞において、レトロトランスポゾンの発現は顕著に上昇し、MIWI2 および MIWI2 複合体関連タンパク質の局在は異常を示した。このとき、MILI-piRNA 複合体による piRNA 増幅サイクルは阻害されており、MIWI2 は piRNA と結合できないことが分かった。

## 2. 研究の目的

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝えるための細胞である。そのため、体細胞とは異なる分子機構を持つ。生殖細胞などで働くレトロトランスポゾン抑制機構として、piRNA 経路が存在し、ゲノムに有害な変異が入るのを防いでいる。研究代表者らは雄の生殖細胞の分化に必須な因子として GTSF1 を同定し、GTSF1 が piRNA 経路で働くことを明らかにした。本研究課題では piRNA をガイドとしてレトロトランスポゾンを制御するという真核生物種に普遍的な分子機構の解明を進める。

## 3. 研究の方法

(1) GTSF1 欠失 piRNA 胎仔期前精原細胞において増幅サイクルがどのように障害されているのかを詳細に調べるために、次世代シーケンサーを用いて GTSF1 欠失胎仔期前精原細胞における MILI 結合 piRNAs と MIWI2 結合 piRNAs を網羅的に調べた。

(2) GTSF1 欠失胎仔期前精原細胞における MILI-piRNA 複合体のターゲット RNA を解析し、切断されているかどうかを調べた。GTSF1 の piRNA 増幅サイクルにおける役割を明らかにするために、Piwi タンパク質により切断された際に生じるモノリン酸化 5' 末端をもった RNA にのみアダプター配列を結合させる反応(Modified RACE 法)を用いて(Watanabe et al., *Science*, 332, 848-52, 2011)、アダプター配列結合 RNA のみを PCR 増幅し、MILI-piRNA 複合体のターゲット RNA の切断を調べた。また、RT-qPCR 法を用いて、このターゲット RNA の発現レベルを調べた。

(3) レトロトランスポゾンと免疫細胞の関連を調べるために、抗体カラムを用いて Dock2 欠失マウスの脾臓から T 細胞および B 細胞を精製し、RNA を抽出した。RT-PCR を行い、レトロトランスポゾン(LINE-1 と IAP)の発現変化を野生型のものと比較して調べた。

(4) マウス血液凝固第八因子 (FVIII) を取得するために、げっ歯類細胞株に対して piggyBac transposon ベクターを導入し、マウス FVIII 発現カセットをゲノムへ挿入した。得られたマウス FVIII 発現げっ歯類細胞株を suspension culture し、その培養上清に含まれる FVIII タンパク質を凝固活性 (U/ml) により測定した。

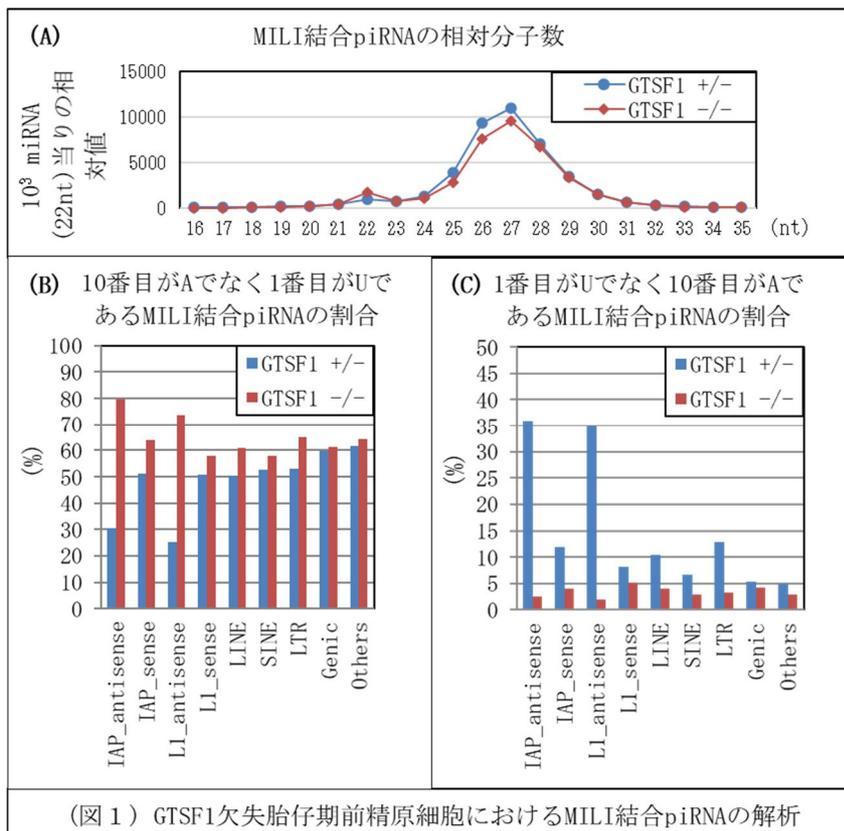
#### 4. 研究成果

##### (1) 生殖細胞におけるレトロトランスポゾン抑制機構

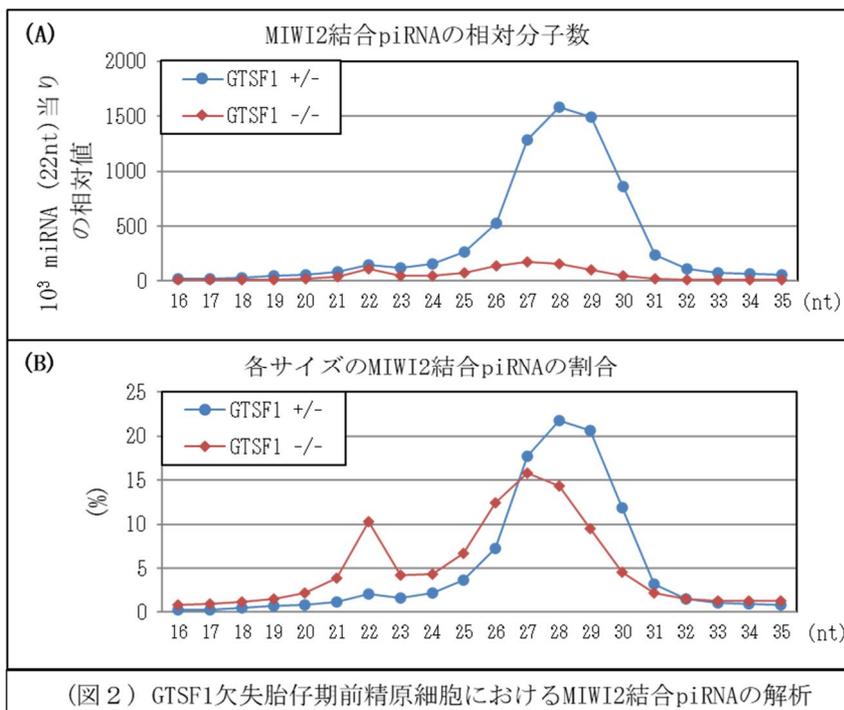
本研究課題では、GTSF1 遺伝子の片アリル欠失 (GTSF1 +/-) は野生型 (GTSF1 +/+) と同じ表現型を示すため、GTSF1 +/- と GTSF1 欠失 (GTSF1 -/-) を比較した。マウス GTSF1 -/- 胎仔期前精原細胞において、piRNA の増幅サイクルがどのように障害されているのかを詳細に調べるために、MILI 結合 piRNAs と MIWI2 結合 piRNAs を網羅的に調べた。

GTSF1 -/- における MILI 結合 piRNAs は量的に大きく変化していなかった (図 1A)。この結果は、MILI 結合 piRNAs を Northern Blot で検出した既存データと一致していた。また、GTSF1 -/- における MILI 結合 piRNAs は piRNA 増幅サイクルが機能しているときの特徴を持たなかった (図 1B, C)。この結果は、GTSF1 -/- 胎仔期前精原細胞に含まれる総 piRNAs を網羅的に調べた既存データと一致していた。

一方で、GTSF1 -/- における MIWI2 結合 piRNAs は大きく減少していた (図 2A)。この結果は、MIWI2 結合 piRNAs を Northern Blot で検出した既存データと一致していた。しかしながら、MIWI2 結合 piRNAs は少し存在するように見える。サイズごとの piRNA の割合をプロットしてみると、MILI 結合 piRNAs の特徴と一致した曲線を示すこと (図 2B)、および MILI 複合体と MIWI2 複合体はわずかに相互作用することから、MILI 結合 piRNAs のわずかなコンタミネーションと考えられる。



(図 1) GTSF1欠失胎仔期前精原細胞におけるMILI結合piRNAの解析

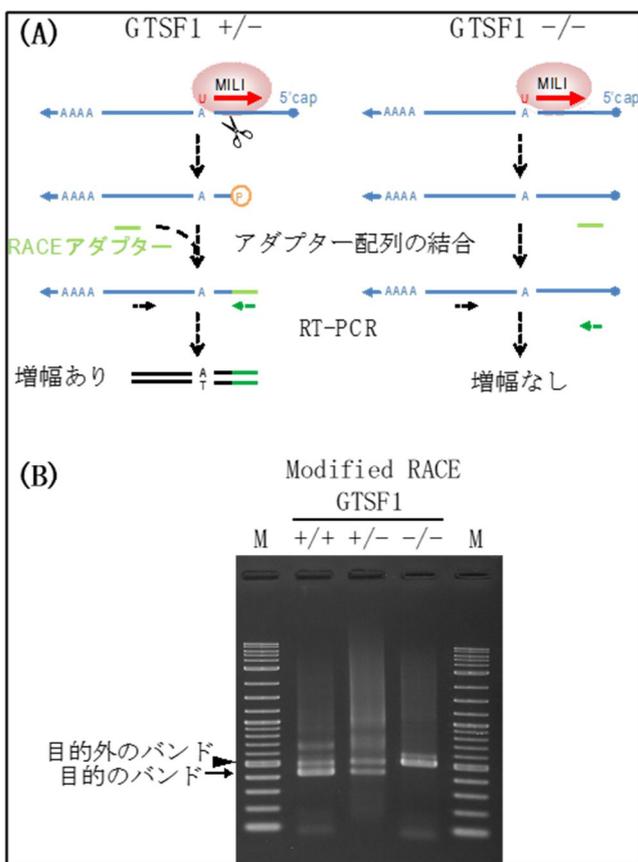


(図 2) GTSF1欠失胎仔期前精原細胞におけるMIWI2結合piRNAの解析

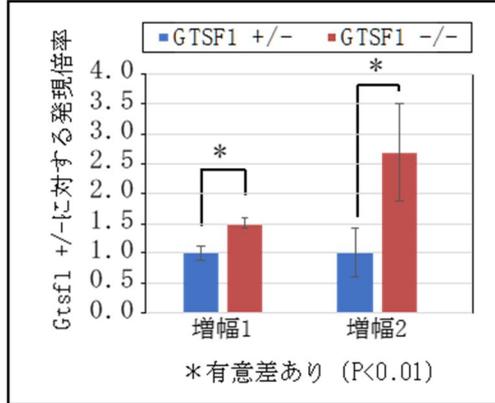
マウス GTSF1 の piRNA 増幅サイクルにおける役割を明らかにするために、MILI-piRNA 複合体によって切断される箇所が同定済みである 1 つのターゲット RNA に着目し、GTSF1 欠失胎仔期前精原細胞においてこの RNA が切断されているかどうかを調べたところ、この切断は検出されなかった (図 3)。また、このターゲット RNA の発現レベルは GTSF1 欠失によって有意に増大していた (図 4)。これらの結果から、マウス GTSF1 は MILI-piRNA 複合体がターゲット RNA を切断するために重要であることを明らかにした。

ハエにおける GTSF1 の分子機能解析に関する報告から、GTSF1 はレトロトランスポゾン抑制に重要な二つの過程 (piRNA 増幅サイクル、エピジェネティックな転写制御) のうち、エピジェネティックな転写抑制機構に関係していると報告されていた (Muerdter et al., Mol. Cell, 2013; Donertas et al., Genes Dev., 2013; Ohtani et al., Genes Dev., 2013)。そのため、マウスでも同様にエピジェネティックな転写抑制機構における GTSF1 の役割に焦点が当たっていた。研究代表者らは、ハエにおける解析の報告よりも前に、マウスにおいて GTSF1 はレトロトランスポゾンの抑制に必須であることを報告していたが (Yoshimura et al., Dev. Biol., 2009)、関係している分子機能については報告していなかった。本研究課題においては、マウスでは piRNA 増幅サイクルが作動するために GTSF1 が必須なタンパク質の一つであることを示し、マウス GTSF1 は piRNA 経路においてレトロトランスポゾン RNA の切断過程に関わり、そのため piRNA 増幅サイクルとエピジェネティックな転写制御の両方の過程で働く可能性を示した。

以上のような解析データをまとめ、論文発表を行った (Yoshimura et al., EMBO Rep., 2018)。



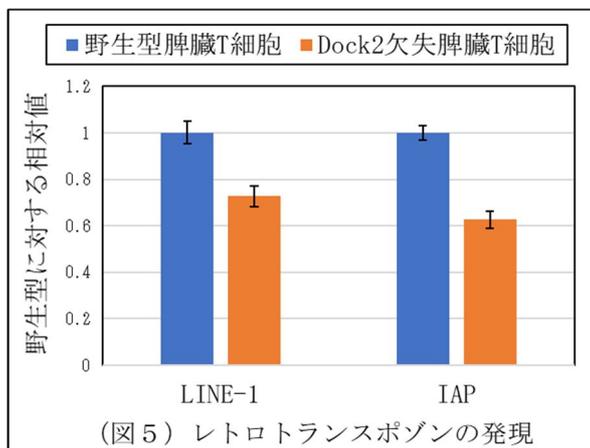
(図 3) MILI-piRNA複合体ターゲットRNAの切断の検出



(図 4) MILI-piRNA複合体ターゲットRNAの発現

(2) 免疫細胞におけるレトロトランスポゾン

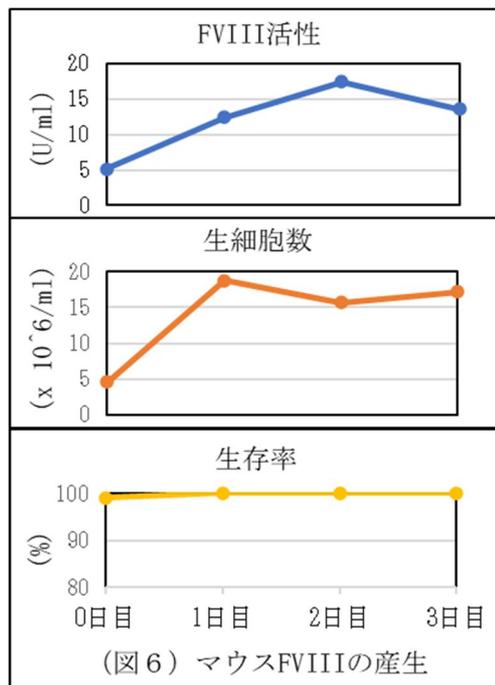
piRNA 経路は生殖細胞で機能する機構で、次世代へ受け渡すための大切なゲノムをレトロトランスポゾンから保護する機構に関わることが盛んに研究され、報告されてきた。近年では、piRNA 経路構成因子は特定の条件下で体細胞においても発現し、類似した機構で働く可能性について報告されている。ヒトやマウスにおいて、多くの体細胞由来がん細胞において piRNA 経路構成因子の発現について報告がある (Ross et al., Nature, 2014)。この中には、生殖細胞におけるレトロトランスポゾン抑制機構に関して研究代表者らが着目した分子、GTSF1 も含まれ、リンパ腫において発現する。また、マウスにおいては、炎症に伴って piRNA 経路構成因子である MIWI2 が肺上皮細胞で発現し、自然免疫系の誘導に機能することが示唆されている (Wasserman



(図 5) レトロトランスポゾンの発現

et al., J.Clin.Invest., 2017)。この知見は、piRNA 経路と類似した機構が免疫系の生理的な機序の中に組み込まれていることを示している。レトロトランスポゾン制御系に関して革新的な方向性を探る中、本研究課題においては上記のような驚くべき知見をもとに、レトロトランスポゾンと免疫系の関係に着目した。リンパ球の機能を阻害したときにレトロトランスポゾンの発現がどのように変化するかを明らかにするために、Dock2 欠失マウスを用いた。Dock2 は細胞骨格やシグナル伝達に関与し、免疫細胞の移動、活性化を制御している。脾臓に存在する Dock2 欠失 T 細胞および B 細胞におけるレトロトランスポゾンの発現を調べたところ、Dock2 欠失 T 細胞では野生型に比べてレトロトランスポゾンの発現が有意に低下していた(図 5)。この結果は、脾臓 T 細胞の活性変化とレトロトランスポゾンの発現が関連する可能性を示唆している。

脾臓には、血液凝固第八因子 (FVIII) に対する中和抗体の産生に関わる濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) が存在し(Jing et al., Blood Adv., 2019)、また、FVIII 由来ペプチドを Tfh に提示して駆動する抗原提示細胞も存在する (Navarrete et al., J. Thromb. Haemost., 2009; Zerra et al., Blood, 2017)。先天性血友病 A は FVIII の変異によってその活性が障害される血液凝固異常疾患で、FVIII の静脈内投与による補充療法が行われているが、30%の患者では FVIII 中和抗体が生じるため、この機序の解明は臨床上的重要な課題となっている。先天性血友病 A のモデルマウスに対しマウス FVIII を投与する実験系を用いて、マウス脾臓 T 細胞におけるレトロトランスポゾンの活性制御と FVIII 中和抗体産生機序の関係を調べることを試みた。マウス FVIII は細胞にとって高発現の困難なタンパク質の一つであり、またヒト FVIII のように製剤タンパク質を入手できないため、マウス FVIII 発現・精製系の構築が必要である。その課題を解決するために piggyBac transposon ベクターによるマウス FVIII 発現カセットのゲノムへの挿入法を用いた新規なタンパク質高発現系を構築したところ、マウス FVIII を効率よくげっ歯類細胞株に産生させることに成功した(図 6)。今後、マウス FVIII を先天性血友病 A マウスへ投与し、分子機構解析を進める。レトロトランスポゾンの活性化は自然免疫系を活性化し、FVIII 中和抗体産生を増強すると予想される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshiki Miyasaka, Yoshihiro Uno, Kazuto Yoshimi, Yayoi Kunihiro, Takuji Yoshimura, Tomohiro Tanaka, Harumi Ishikubo, Yuichi Hiraoka, Norihiko Takemoto, Takao Tanaka, Yoshihiro Ooguchi, Paul Skehel, Tomomi Aida, Junji Takeda, Tomoji Mashimo	4. 巻 19
2. 論文標題 CLICK: one-step generation of conditional knockout mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 000-000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-018-4713-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takuji Yoshimura, Toshiaki Watanabe, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Noriaki Takemoto, Yusuke Shiromoto, Akihiko Kudo, Masami Kanai-Azuma, Fumi Tashiro, Satsuki Miyazaki, Ami Katanaya, Shinichiro Chuma, Jun-ichi Miyazaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e42054 ~ e42054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201642054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fei Yang, Lingli Yang, Mari Wataya-Kaneda, Takuji Yoshimura, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama	4. 巻 138
2. 論文標題 Uncoupling of ER/mitochondrial oxidative stress in mTORC1 hyperactivation-associated skin hypopigmentation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 669 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2017.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satoko Yamamoto, Jun-Ya Kaimori, Takuji Yoshimura, Atsuko Imai, Kaori Kobayashi, Ryoichi Imamura, Naotsugu Ichimaru, Kazuto Kato, Akihiro Nakaya, Shiro Takahara, Yoshitaka Isaka	4. 巻 32
2. 論文標題 Analysis of a MCKD1 family with a novel frameshift mutation in MUC1 reveals extrarenal phenotype and characteristic features of mutant MUC1 protein	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 2010-2017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfx083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 能村卓慈、渡部聡朗、宮川さとみ、竹本記章、城本悠助、宮東昭彦、金井正美、田代 文、宮崎早月、刀谷在美、中馬新一郎、宮崎純一
2. 発表標題 マウスGTSF1はPIWI-piRNAがターゲットRNAを切断するために重要な因子である
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国内プレスリリース記事 <a href="http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180309_1">http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180309_1</a>
海外プレスリリース記事 EurekAlert! <a href="https://www.eurekalert.org/pub_releases/2018-03/ou-gdn032718.php">https://www.eurekalert.org/pub_releases/2018-03/ou-gdn032718.php</a>
AlphaGalileo <a href="https://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=184995&amp;CultureCode=en">https://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=184995&amp;CultureCode=en</a>
ScienceDaily <a href="https://www.sciencedaily.com/releases/2018/03/180328092523.htm">https://www.sciencedaily.com/releases/2018/03/180328092523.htm</a>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----