

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08644

研究課題名(和文)非コードRNAによる生殖細胞ゲノムの恒常性維持機構

研究課題名(英文)Maintenance of the germ cell genome by non-coding RNA

研究代表者

村野 健作 (MURANO, Kensaku)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80535295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞系列で転移と増殖を繰り返すレトロトランスポゾン(Transposon)は、生命の次世代継承にとって脅威である。非コード小分子RNA(piRNA)とPIWIタンパク質の複合体は、配列情報と相補的なレトロトランスポゾンを抑制し、ゲノムの恒常性を維持している。本研究により、Piwi-piRNA複合体と相互作用するNuclear export factor 2 (Nxf2)がトランスポゾンの転写反応を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエ個体の解析結果から、Nxf2がPiwiと同様に不妊の原因遺伝子であった。詳細な分子メカニズムの解析により、Piwi-piRNA経路によるトランスポゾンの抑制機構は少なくとも二段階からなることがわかった。すなわち、Nxf2-Panx複合体はヘテロクロマチンを形成する前に、トランスポゾンの転写反応を抑制することが明らかとなった。マウスを用いた解析からNxf2は精巣の発達に重要であることを踏まえると、同じ哺乳類であるヒトの生殖においても、トランスポゾンを抑制することが重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Retrotransposons, which repeatedly proliferate in the germline genome, are a threat to the next generation of inheritance of life. A complex of non-coding small molecule RNAs (piRNAs) and PIWI proteins represses retrotransposons to maintain genomic homeostasis. This study has shown that the newly identified nuclear export factor 2 (Nxf2) represses the transcription of transposons through its interaction with Piwi-piRNA complex.

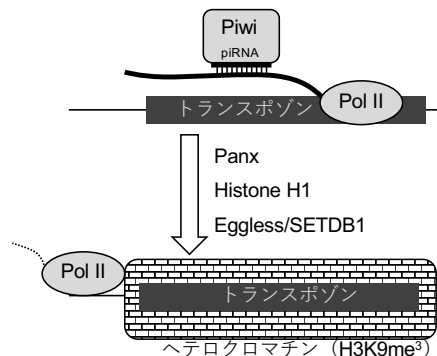
研究分野：分子生物学

キーワード：トランスポゾン 小分子RNA PIWI 転写 生殖

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの膨大な領域 (ヒトでは 40%以上) を占めるトランスポゾン、転移によりゲノム配列と構造を変えることでゲノム進化の原動力となってきた。一方、その無秩序な増殖はゲノム恒常性維持の脅威となる。そこで次世代に遺伝情報を安定的に継承するため、私たちの細胞はトランスポゾンの増殖を抑制する仕組みを備えている。近年、アルゴノートである PIWI タンパク質と PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる 20~30 塩基長の非コード RNA の複合体が、生殖細胞におけるトランスポゾン抑制の中核をなすことが明らかとなった (reviewed in Iwasaki YW *et al.*, *Annu Rev Biochem* 2015)。PIWI 遺伝子に変異を持つショウジョウバエは、卵巣の発生異常により不妊となる。ショウジョウバエ PIWI タンパク質のひとつである Piwi と piRNA の複合体は、細胞核内に移行し、piRNA の配列情報と相補的なトランスポゾンの新生 RNA 鎖に結合する。図 1 にあるように、Piwi-piRNA 複合体は認識したトランスポゾンの周辺にメチル化ヒストン H3 (H3K9me3) を特徴とする高度に凝集したヘテロクロマチンを形成することで転写反応を抑制する (Sienski G *et al.*, *Cell* 2012)。大規模な遺伝学的スクリーニングが行われた結果、トランスポゾン抑制に関わる因子群が多数同定されている (Czech B *et al.*, *Molecular Cell* 2013, Muerdter F *et al.*, *Molecular Cell* 2013, Handler D *et al.*, *Molecular Cell* 2013)。各スクリーニングで上位にランクされた Panx は、Piwi-piRNA 複合体と相互作用し、ヘテロクロマチン形成に関与することが示された。また、Panx によるヘテロクロマチン化にはヒストンメチル基転移酵素 Eggless/SETDB1 が必要であることが遺伝学的に証明された (Yu *et al.*, *Science* 2015, Sienski G *et al.*, *Genes Dev* 2015)。しかし、Panx が Eggless をリクルートする分子機構やヘテロクロマチン形成を介した転写反応抑制メカニズムは分かっていない。

図1. Piwi-piRNAによるトランスポゾン抑制



2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、Piwi-piRNA 経路による生殖細胞系列ゲノムの恒常性維持の分子機構を解き明かすため、本研究課題では、(1) コファクター Wde との相互作用を介した Eggless の動態制御機構、(2) Panx の相互作用因子の探索を糸口としたヘテロクロマチン形成によるトランスポゾン転写反応抑制メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

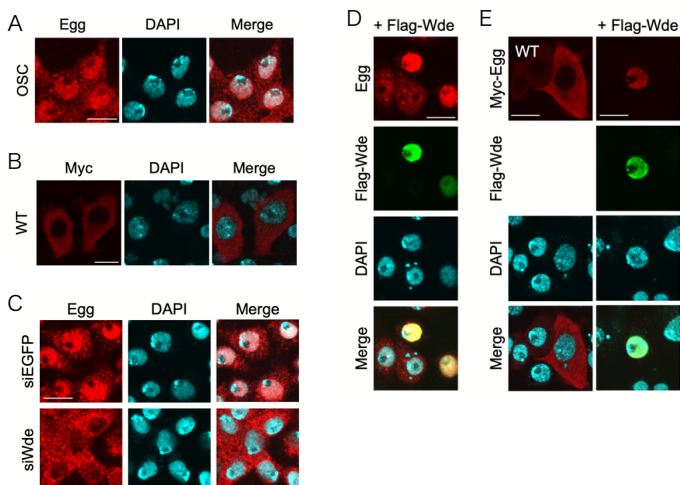
(1) **Eggless の動態制御機構**: ショウジョウバエの卵巣体細胞由来の培養細胞 OSC を用いて解析を進めた。Eggless および Wde の欠損変異体や点変異体を作製し、OSC に発現させて互いの細胞内局在を免疫染色法で観察した。また siRNA を用いて Eggless と Wde をそれぞれ発現抑制した場合の各因子の細胞内分布を、内在因子に対するモノクローナル抗体を用いて可視化した。

(2) **Panax によるトランスポゾン転写反応抑制機構**: Panx に対するモノクローナル抗体を作製した。独自に作製したモノクローナル抗体を用いて培養細胞 OSC の抽出液から Panx を精製した。その精製産物を質量分析により相互作用因子の探索を行った。得られた因子および Panx に対する siRNA を設計し、当該因子の発現抑制下、トランスポゾンの脱抑制レベルを RT-PCR 法や RNA-seq 法を用いて網羅的に定量した。また、トランスポゾン上のリンカーヒストン H1 や H3K9me3 の分布量を ChIP-seq 法を用いて定量化した。ルシフェラーゼ遺伝子を用いた遺伝子発現抑制効果を評価するレポーター系を培養細胞 OSC を用いて確立した。この実験系を用いて Panx や同定した因子、およびその変異体の転写抑制活性を評価した。

4. 研究成果

(1) **Eggless の動態制御機構**: 独自に作製した Eggless に対するモノクローナル抗体を用いて、OSC 内の Eggless の分布を観察したところ、図 2A にある通り細胞核内であった。Eggless はヒストン H3 のメチル基転移酵素であることから、機能と場所が一致していると判断

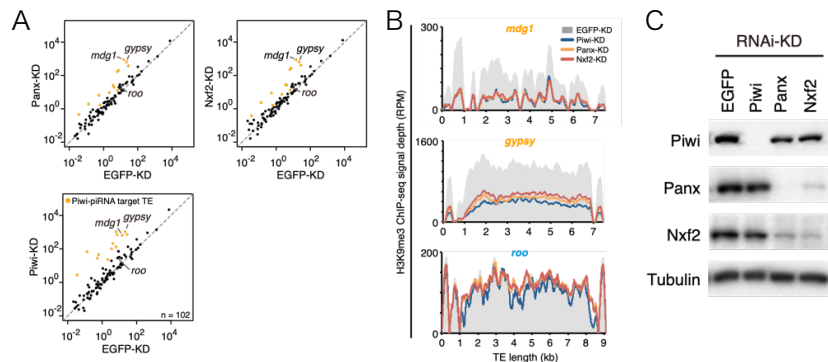
図2. コファクターWdeによって細胞核内に分布するEggless



できる。ところが、Myc タグを融合した Egless を発現させ局在を観察すると、明らかに細胞質であった (図 2B)。Egless のコファクターである Wde は、H3 のメチル化に重要であることは分かっていたが、詳細な Egless と Wde の関係については曖昧なままであった。そこで siRNA を用いて Wde の発現抑制を試みると、Egless が細胞質に分布する様子が観察された (図 2C)。また、内在の Egless は主に細胞核に分布するが、細胞質にも若干量であるが広がっている。そこに、Flag タグの Wde を過剰発現させると、内在 Egless が細胞核に強く分布する様子が観察された (図 2D)。さらに、Myc-Egless と Flag-Wde を同時に発現させた場合、Myc-Egless も細胞核に局在した (図 2E)。以上の結果から、ヒストンメチル基転移酵素 Egless はコファクターである Wde によって細胞核に分布し、トランスポゾンのヘテロクロマチン化を介してゲノムの恒常性を維持していることがわかった (Osumi K and Murano K *et al.*, *EMBO Rep* 2019)。

(2) Panx によるトランスポゾン転写反応抑制機構：独自に作製した抗 Panx モノクローナル抗体を用いて精製した Panx 複合体を質量分析にかけると、

図3. Panx新規相互作用因子Nxf2のトランスポゾン抑制活性

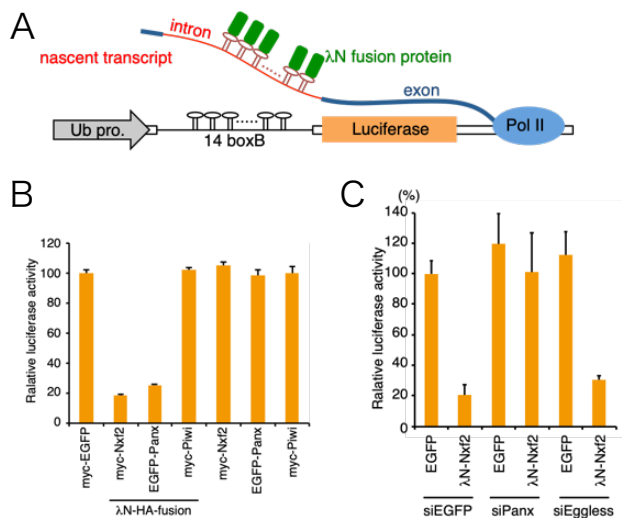


これまで報告のあった Piwi タンパク質の他に Nuclear Export Factor 2 (Nxf2) と p15/Nxt1 が同定された。抗 Nxf2 抗体および抗 Nxt1 抗体を作製し、Panx との相互作用を免疫沈降後のウェスタンブロッティング法により確認した。

siRNA を用いた Nxf2 の発現抑制は、Panx と Piwi の発現抑制と同様に、トランスポゾンである *mdg1* や *gypsy* の脱抑制を引き起こした (図 3A)。また、ヘテロクロマチンのマーカーである H3K9me3 の分布量を ChIP-seq 法で検出した。その結果、Nxf2 の発現抑制により *mdg1* 上の H3K9me3 量が減少し、ヘテロクロマチンが崩壊している様子が観察された (図 3B)。興味深いことに、Nxf2 と p15 の発現抑制は Panx タンパク質の減少を引き起こした (図 3C)。以上の結果から、Nxf2 は Panx と協働して、Piwi-piRNA が認識したトランスポゾンの周辺にヘテロクロマチンを形成することで転写反応を抑制していることが明らかとなった。

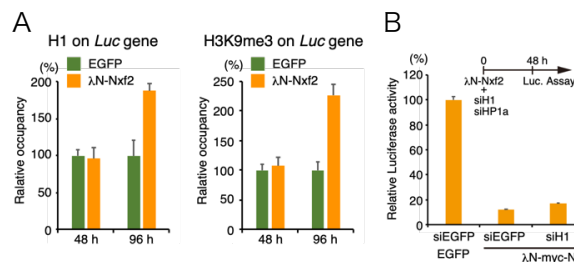
Nxf2 の機能を詳細に解析するため、OSC にラムダファージ由来の boxB RNA と λ N タンパク質の相互作用を用いた人工係留レポーターシステムを構築した (図 4A)。この実験系を用いて λ N-myc-Nxf2 を新生 mRNA 上へ係留したところ、 λ N-EGFP-Panx と同様に転写反応を抑制した (図 4B)。しかし、予想に反して λ N-Nxf2 による転写反応抑制はヒストン H3 メチル基転移酵素 Egless に非依存的であった (図 4C)。

図4. mRNA上へ係留されたNxf2による転写反応抑制



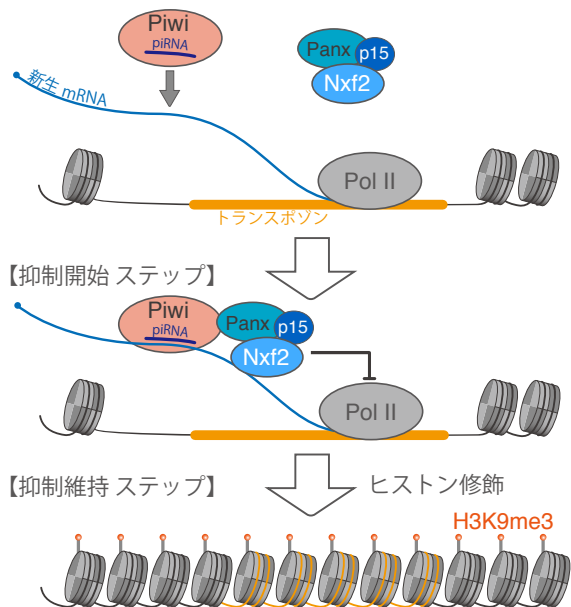
λ N-Nxf2 による転写抑制はヘテロクロマチン非依存的である可能性を確認するため、ヒストン H1 および H3K9me3 抗体を用いて、レポーター遺伝子上の各因子の量を検証した。その結果、 λ N-Nxf2 による転写抑制が観察される発現ベクター導入後 48 時間では、H1 および H3K9me3 の量に変化は見られなかった (図 5A)。また、H1 や HP1a の発現抑制をしても λ N-Nxf2 による転写抑制が観察された (図 5B)。一方で、発現ベクター導入後 96 時間では、H1 や H3K9me3 の蓄積が観察された (図 5A)。

図5. ヘテロクロマチン非依存的な転写抑制



発現ベクター導入後 96 時間ではλN-Nxf2 の発現が見られないにも関わらず、抑制効果が持続している結果も得られた。以上の結果から、Piwi-piRNA 経路において、piRNA の配列情報によって標的トランスポゾン上へリクルートされた Nxf2-p15-Panx 複合体は、ヘテロクロマチン形成以前に転写抑制反応を開始し（抑制開始ステップ）、その後ヘテロクロマチンが形成されることによって転写抑制状態が維持される（抑制維持ステップ）とする二段階抑制モデルを提唱した（図 6, Murano K and Iwasaki YW *et al.*, *EMBO J* 2019)。また、卵巣特異的に発現する RNA 核外輸送タンパク質ファミリー因子 Nxf2 が、ドメイン構造から予想される機能である核外輸送ではなく、piRNA によるトランスポゾンの転写抑制に寄与する点は非常に新しい。

図6. Piwi-piRNA経路によるトランスポゾンの二段階抑制モデル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murano K, Iwasaki YW, Ishizu H, Mashiko A, Shibuya A, Kondo S, Adachi S, Suzuki S, Saito K, Natsume T, Siomi MC, Siomi H	4. 巻 38
2. 論文標題 Nuclear RNA export factor variant initiates piRNA-guided co-transcriptional silencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019102870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osumi K, Sato K, Murano K, Siomi H, Siomi MC	4. 巻 20
2. 論文標題 Essential roles of Windei and nuclear monoubiquitination of Eggless/SETDB1 in transposon silencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bui PL, Nishimura K, Mondejar GS, Kumar A, Aizawa S, Murano K, Nagata K, Hayashi Y, Fukuda A, Onuma Y, Ito Y, Nakanishi M, Hisatake K	4. 巻 29
2. 論文標題 Template activating factor-1a regulates retroviral silencing during reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1909-1922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sadahiro T, Isomi M, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tamura F, Tani H, Tohyama S, Fujita J, Miyoshi H, Kawamura Y, Goshima N, Iwasaki YW, Murano K, Saito K, Oda M, Andersen P, Kwon C, Uosaki H, Nishizono H, Fukuda K, Ieda M	4. 巻 23(3)
2. 論文標題 Tbx6 Induces Nascent Mesoderm from Pluripotent Stem Cells and Temporally Controls Cardiac versus Somite Lineage Diversification.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 382-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murano K, Iwasaki YW, Siomi H.	4. 巻 1680
2. 論文標題 Profiling Open Chromatin Structure in the Ovarian Somatic Cells Using ATAC-seq	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecluar Biology	6. 最初と最後の頁 165-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7339-2_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekiya T, Murano K, Kato K, Kawaguchi A, Nagata K	4. 巻 7
2. 論文標題 Mitotic phosphorylation of CCCTC-binding factor (CTCF) reduces its DNA binding activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 397-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing is triggered by Nxf2-mediated transcriptional regulation prior to heterochromatin formation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 Nuclear RNA export factor variant initiates Piwi-piRNA-guided co-transcriptional silencing
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 Nuclear RNA export factor variant triggers Piwi-piRNA-mediated co-transcriptional silencing
3. 学会等名 RNA 2019 (Poland) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 Nuclear RNA export factor variant triggers Piwi-piRNA-mediated co-transcriptional silencing
3. 学会等名 Keystone symposia "Small Regulatory RNAs" (Korea) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensaku Murano, Yuka W. Iwasaki, Akane Mashiko, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 Nuclear RNA export factor variant triggers Piwi-piRNA-mediated co-transcriptional silencing
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on BioSciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎由香、村野健作、益子あかね、渋谷あおい、塩見春彦
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing is triggered by Nxf2-mediated transcriptional regulation prior to heterochromatin formation
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村野健作、岩崎由香、益子あかね、渋谷あおい、塩見春彦
2. 発表標題 Piwi-piRNAによるトランスポゾン抑制はNxf2を介した転写制御とヘテロクロマチン形成により引き起こされる
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 MuERV-L Gagタンパク質と相互作用するRNAの探索
3. 学会等名 転写因子研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村野健作、岩崎由香、益子あかね、塩見春彦
2. 発表標題 Essential function of Panoramix/Scilencio-Nxf2 complex in the Drosophila Piwi-piRNA pathway
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村野健作、岩崎由香、益子あかね、塩見春彦
2. 発表標題 Essential function of Panoramix/Scilencio-Nxf2 complex in the Drosophila Piwi-piRNA pathway
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Siomi Lab
<http://siomilab.med.keio.ac.jp>

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
--	---------------------------	-----------------------	----