

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19359

研究課題名（和文）細胞融合にかかわる内在性レトロウイルス由来遺伝子の同定および機能解析

研究課題名（英文）Identification and function of endogenous retrovirus derived genes that mediate cell fusion

研究代表者

上田 真保子（UEDA, Mahoko）

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：60760353

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、筋細胞や破骨細胞が分化する際に必須な「細胞融合」を直接媒介する遺伝子の同定、その分化・融合メカニズムの解明を目的とする。そこで、哺乳類ゲノムにおいて、融合能を持つ可能性がある、内在性レトロウイルス（ERV）の膜タンパク質ドメインに由来する配列に着目し、分化融合時のマウス筋細胞・破骨細胞のRNA-seq解析から候補配列を同定した。タンパク構造解析によるさらなる選定を行なった後、siRNAノックダウンと強制発現解析により、候補配列の融合能の有無を調べた。本解析では、融合能を持つ配列を既に確認しており、現在、論文文化に向けた最終的な確認実験中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、分化時の融合細胞で多くの発現解析が行われてきたにも関わらず発見されていない、細胞融合にかかわる直接因子の特定を目指したものである。本研究により、ERV由来の遺伝子が筋細胞・破骨細胞の分化融合にかかわることが明らかになれば、広く細胞融合という現象が、機能の無いと思われてきたゲノム領域にある、外来性の遺伝子により媒介されることを示すことになり、進化遺伝学やゲノム科学の分野に新しい知見をもたらすと考えられる。また今後、ヒトの筋細胞・破骨細胞の分化・融合メカニズムが解明されれば、発症機序が不明な筋再生や骨代謝疾患の治療開発に道を開くことも期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify novel genes that directly mediate cell fusion during myoblast and osteoclast differentiation. In these cells, the mutual fusion is indispensable for normal cell differentiation, however the gene that mediate the fusion and the fusion mechanism are unclear. To identify such novel genes, we focused on an envelope domain of endogenous retroviruses (ERV), which have the potential to mediate cell fusion, in mammalian genomes. First, we performed RNA-seq analyses and identified candidates for the envelope-derived genes in mice myoblasts and osteoclasts. After further filtering using protein structures predicted based on candidate sequences, we obtained final candidate sets. Then, we performed siRNA knockdown and over-expression analyses and identified a sequence that showed fusion activity in myoblasts. We are now in the final stage of this project, and confirming the function of the candidates.

研究分野：ゲノム比較

キーワード：Endogenous retrovirus envelope gene cell differentiation cell fusion novel gene

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞融合は、細胞の膜構造がダイナミックに変化し、複数の細胞から多核化した一つの細胞を生じる現象で、様々な組織の細胞分化に重要な役割を果たしている。体細胞の代表的な融合細胞である、筋細胞や破骨細胞では、細胞の分化と融合は切り離すことができない。しかし、これらの細胞の融合に直接かかわる遺伝子や、その分化・融合メカニズムはよくわかっていない。

哺乳類ゲノムには、細胞融合能を持つ配列が存在する。過去に生殖細胞に感染し、宿主ゲノムに内在化したレトロウイルス(Endogenous Retrovirus: ERV)の、膜タンパク遺伝子(*env*)に由来する配列(本研究ではenERVと呼ぶ)である。大部分のERVは不活化し機能がない配列と考えられているが、一部のERVは膜融合能を持ち、哺乳類の胎盤形成にかかわっている。このような、胎盤で膜融合能を持つERV由来の遺伝子は特殊な進化の例と考えられてきた。しかし我々は、千以上のORFを保持するenERVがヒトやマウスのゲノムに存在することから、新規のenERV由来の遺伝子が、胎盤以外の細胞融合にかかわる可能性を示唆してきた(Nakagawa, Ueda Takahashi, Database 2016)。

実際、SRAなどの公共データベースに登録されている、マウス融合細胞(筋細胞・破骨細胞)の、次世代シーケンサーによる大規模転写産物の発現データ(RNA-seq)を解析すると、分化時の融合細胞で発現が上昇する新規enERV配列を特定することができた。これらの配列の中にはORFを保持しているものが含まれており、新規enERV遺伝子が胎盤以外の細胞融合にかかわる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、enERV 遺伝子を介した細胞の分化・融合メカニズムの解明を目指す。そのため、以下の4つの解析を行い、enERV 遺伝子を同定し、その機能および生物学的な影響を明らかにすることを目的とする。

- (1) 分化融合時のマウス筋細胞・破骨細胞の RNA-seq 解析
- (2) enERV 遺伝子の立体構造や機能領域の予測
- (3) 細胞を用いた機能解析による enERV 遺伝子の同定
- (4) enERV の系統間の配列比較

3. 研究の方法

- (1) 分化融合時のマウス筋細胞・破骨細胞のRNA-seq解析

マウスの筋芽細胞と破骨前駆細胞を分化させ、分化前後の計3点でサンプリングしたRNAライブラリを用いて、次世代シーケンサーによるRNA-seqを行なった。ERV由来の転写物は発現量が低いいため、深いカバレッジのシーケンスをIllumina社のHiSeq 4000を用いて行った。申請者らで開発したORFをもつERVを予測したデータベースgEVEを利用して、分化融合時の細胞で発現が上昇するERV配列を抽出後、さらに*env*遺伝子に特徴的なドメインを持つERVのみ選定しenERV遺伝子候補とした。

- (2) 立体構造や機能領域の予測

解析(1)で抽出した候補配列から、二次構造や立体構造を予測した。特に、相同性を利用したホモロジー・モデリング法を用いて作成した立体構造から機能領域の予測を行い、機能をもちそ

うな候補配列の優先順位を決定した。

(3) 機能解析によるenERV遺伝子の同定

解析(2)で決定した優先順位の高い候補配列を、マウスの筋細胞・破骨細胞由来のサンプルから候補配列をクローニングし、qPCRにより分化時の発現の変動がRNA-seqと同様なパターンを示すかどうかを確かめた。その後、enERV配列のsiRNAノックダウンを行い、分化・融合が阻害されるERV配列を特定した。強制発現実験では、細胞の融合活性が上昇するかを調べた。

(4) enERVの系統間の配列比較

enERV遺伝子が関わる細胞融合メカニズムの進化を理解するため、機能が認められたenERV遺伝子が、どの生物種に存在するのかBlast等の相同性検索プログラムを用いて調べた。

4. 研究成果

分化時のマウス筋細胞や破骨細胞のRNA-seq解析から、分化融合時に有意に発現が上がる、*env*ドメイン由来の遺伝子候補を同定し、十分な長さのORFをもち、かつ融合ドメインや膜貫通領域があるもののみを選定した(図1:筋細胞の例)。さらに、候補配列を用いて機能ドメインや立体構造の予測を行い、機能を持ちそうな計6配列の候補を得た。これらの候補配列に対し、1) qPCRおよびクローニングによる融合が盛んな時期の発現パターンの確認(図2)、2) FLAGタグをもちいた遺伝子導入・免疫染色による膜への発現の可否、3) 発現自体の強さを指標として優先順位を決定し、最終的に選出された候補配列にたいし機能解析実験を行った。

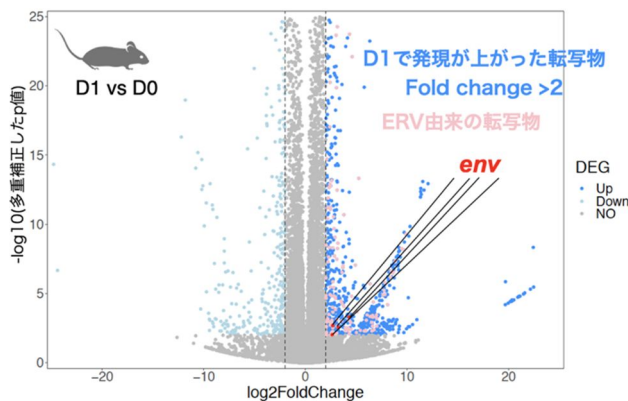


図1 細胞融合時に発現が上がる候補配列

マウス筋細胞における、未分化(D0)と分化後1日目(D1)の転写物の発現比較。Log2Fold>2がD1で有意に発現が上昇した配列。ERV由来の転写物(ピンク)、ERVの*env*ドメイン由来の転写物(赤)。

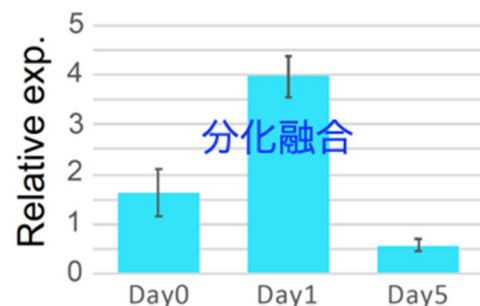


図2 qPCR結果

マウス筋細胞で選定された候補配列の例。細胞の融合がさかんな時期(D1)で発現が上昇していることが確認された。

具体的には、siRNAノックダウン解析と強制発現による融合活性の評価を実施した。マウス筋細胞で候補配列をノックダウンし、筋細胞分化マーカーをコントロールと比較すると、筋管細胞の減少が観察され、さらに細胞の未分化度も上昇していた。また候補配列の強制発現をマウス筋細胞で行うと、融合し多核になる細胞がコントロールに比べ多くなることが観察された(図3)。以上の結果から、これらの候補配列は細胞融合に関与する可能性が高いと考えている。

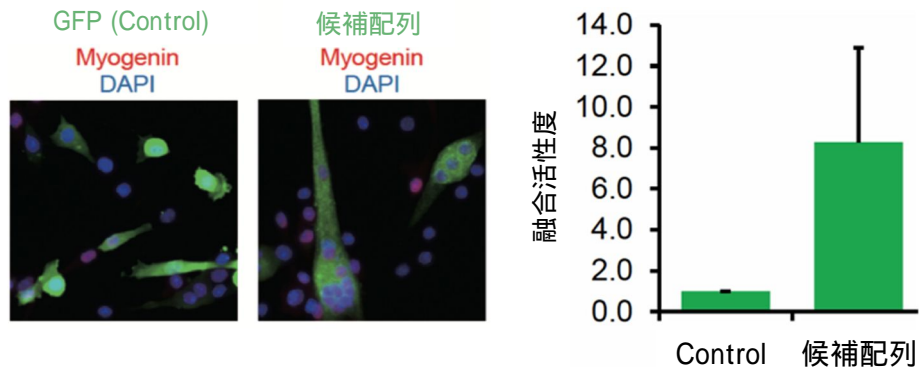


図3 強制発現による融合活性の上昇

[左] 筋細胞のサテライト細胞に候補配列を強制発現し分化させると、候補配列が存在する細胞で、核の数がコントロールより上昇した。DAPI（青）は核、Myogenin（赤）は筋芽細胞から筋管細胞への分化マーカー。[右] 核の数（ ≥ 2 ）を数え細胞の融合活性度を算出した。

機能を持つ可能性のある候補配列を用いた網羅的な配列比較を哺乳類ゲノムで行った。その結果、候補配列は齧歯類に特異的な配列であることがわかっている。もしこれらの新規ERV配列が遺伝子として実際に筋細胞の分化に関わっているとすると、マウスの筋再生能がヒトなどに比べ活発であること等への関連も考えられる。このようなERV由来の配列の、種や系統特異的な特徴にたいする影響を調べるため、今後は様々な種で、enERVを同定して行く予定である。本研究は、現在、最終段階にあり、論文化に向けた確認実験を進めている。

これらの研究結果を、国内外の学会で既に発表している。例えば、2017年の日本分子生物学会年会・生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）では、フォーラム「“ 遺伝子の水平伝播 ” とは何か？」に、また2019年の国際学会 The Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2019)では、シンポジウム “Repeats and mobile elements as drivers of innovations in protein coding genes” に採択され口頭発表した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mahoko T. Ueda, Kirill Kryukov, Satomi Mitsuhashi, Hiroaki Mitsuhashi, Tadashi Imanishi, So Nakagawa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Comprehensive genomic analysis reveals dynamic evolution of endogenous retroviruses that code for retroviral-like protein domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mobile DNA	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） なし	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11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中川草, 上田真保子, クリュコフ キリル, 今西規
2. 発表標題 ウイルスが形作る生物進化
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田真保子, 三橋里美, 三橋弘明, 今西規, 中川草
2. 発表標題 細胞融合にかかわる内在性レトロウイルス由来遺伝子の同定
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会・生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田真保子, 三橋里美, 三橋弘明, 中川草
2. 発表標題 哺乳類のトランスポゾンに由来するタンパク質コード配列の比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueda MT, Mitsuhashi S, Mitsuhashi H, Imanishi T, Nakagawa S
2. 発表標題 Transcriptome analysis to identify genes derived from endogenous retrovirus that mediate cell-cell fusion during myoblast differentiation
3. 学会等名 Society of Molecular Biology and Evolution 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa S, Ueda M
2. 発表標題 Genome-wide expression analysis for endogenous viral elements in mammalian genomes.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川草, 上田真保子, クリュコフ キリル, 三橋里美, 三橋弘明, 今西規
2. 発表標題 真核生物ゲノムに内在化したウイルス様配列データベースgEVEを活用したトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川草, 上田真保子, 今川和彦, 宮沢孝幸
2. 発表標題 転移因子に由来する遺伝子の進化
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田真保子, クリュコフ キリル, 三橋里美, 三橋弘明, 今西規, 中川草
2. 発表標題 哺乳類のタンパク質をコードするトランスポゾンの比較ゲノム解析
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 上田真保子, クリュコフ キリル, 三橋里美, 三橋弘明, 今西規, 中川草
2. 発表標題 哺乳類ゲノムのレトロトランスポゾンに由来するタンパク質コード配列のダイナミックな進化
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda MT, Mitsuhashi S, Mitsuhashi H, Imanishi T, Nakagawa S
2. 発表標題 Genome-wide comparative analysis of mammalian transposable elements that code for proteins
3. 学会等名 Society of Molecular Biology and Evolution 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川草, 上田真保子
2. 発表標題 哺乳類ゲノムに存在するレトロウイルス様タンパク質をコードする配列の比較ゲノム進化解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 (MBSJ2019)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	三橋 里美 (MITSUHASHI Satomi) (40466222)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究 協力者	中川 草 (NAKAGAWA So)		