

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16149

研究課題名(和文) 成体全能性幹細胞制御に重要な核局在型PIWI-piRNAの標的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the targets of nuclear PIWI-piRNA complexes important for the planarian adult pluripotent stem cell system

研究代表者

鹿島 誠 (Kashima, Makoto)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：10780562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアは成体でも多くの全能性幹細胞(PSC)を維持しており、iPS細胞等のin vitro PSCでは迫ることが難しい、PSCのin vivo制御機構にアプローチすることができる。本研究では、機能阻害によりプラナリアの再生不全が引き起こされるpiwi遺伝子の標的遺伝子の探索を通じて、PSC制御におけるpiwiの重要性の理解を目指した。結果、再生不全が起こる際に特異的に発現が上昇する、すなわち、再生能力の低下原因である可能性が高い、Piwiの標的遺伝子候補の同定に成功した。また、プラナリアのゲノム解析を行い、既存のゲノム解読結果を上回るゲノム決定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Piwi遺伝子はプラナリアだけでなく、成体で全能性幹細胞を維持している無脊椎動物の全能性幹細胞において、共通して特異的に発現しており、全能性の維持・制御に重要な役割を担っていると考えられる。そのため、本研究によって発見された再生不全の現象となる可能性があるPiwi標的遺伝子の機能解明が進めば、全能性幹細胞制御の普遍原理が解明され、より自然な全能性幹細胞の制御法の理解が深まることが期待される。また、プラナリアのゲノム解析の改善は、本研究以外のプラナリア研究共通のリソースとして、再生・幹細胞研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Planarians maintain a considerable number of adult pluripotent stem cells (aPSCs). In asexually reproducing invertebrates, such as planaria, piwi family genes are the markers most commonly expressed in aPSCs. While piwi family genes are known as guardians against transposable elements in the germline cells of animals that only sexually propagate, their functions in the aPSC system have remained elusive. In this study, we aimed to identify Piwi target gene in aPSC regulation. As a result, we succeed in identification of a gene that could be up-regulated specifically in piwi knockdown animals lacking regenerative ability. In addition, we conducted genome sequencing and succeeded in update *Dugesia japonica* genome assembly.

研究分野：発生生物学

キーワード：幹細胞 再生 プラナリア piwi RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

全能性幹細胞(PSC)は、全ての細胞種に分化できる能力(全能性)と自己複製能を持つ細胞である。脊椎動物のPSCは、発生初期か培養環境下でしか維持できない。一方、プラナリアは成体でも多くのPSCを維持しており(Hayashi et al., 2006)、iPS細胞等の*in vitro* PSCでは迫ることが難しい、PSCの*in vivo*制御機構にアプローチすることができる。申請者は、プラナリアPSCで発現する三種類の*piwi*遺伝子に注目し研究を行ってきた。PIWIは生殖細胞(受精により全能性を獲得)と成体PSCの両方で重要であり、全能性を支える普遍的な分子基盤である可能性が高い(Juliano et al., 2011)。また、piRNAと呼ばれるガイドRNAを介して、潜在的に無数の標的遺伝子の制御が可能であり、全能性制御において多機能を担う分子である。一般に、*piwi*遺伝子は生殖細胞で転移因子を抑制することで、次世代に受け継がれるゲノムを保護している。一方、無性生殖を行う無脊椎動物では、*piwi*遺伝子はPSCでも発現しているが、その具体的な機能は不明であった。

*piwiB(RNAi)*、*piwiC(RNAi)*プラナリアは共に再生不全を示すが、*piwiB(RNAi)*個体はより早期に表現型を示す(表1)。申請者は、これら二つの*piwi*遺伝子のPSC制御における機能解明を行ってきた。PiwiBは、*piwiB* mRNAは発現しているPSCだけでなく、分化中の細胞や分化細胞でも維持されており、転移因子に加えて、タンパク質コード遺伝子の発現を負に制御していた

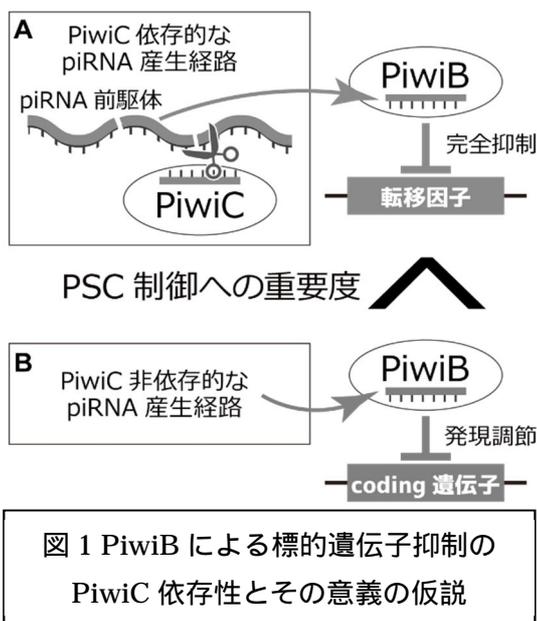
(Kashima et al., 2018; Shibata et al., 2016)。また、PiwiCは、PiwiBの標的認識に関わるPiwiB結合piRNAの産生に関わることが示唆された(図1A)(Kashima et al. 2016)。さらに、PiwiBの標的遺伝子は、PiwiC依存的なもの(主に転移因子)と、PiwiC非依存的なもの(タンパク質コード遺伝子)に分けられることを、見出していった(図1)(Kashima et al. unpublished)。*piwiB(RNAi)*個体と*piwiC(RNAi)*個体の表現型の重篤さ度合いの違いから、PiwiC非依存的なPiwiB標的遺伝子は、PSC制御により重要である可能性が高い(図1B)。PiwiBは核局在型PIWIタンパク質であり、イントロンを含む転写中のRNAを介して標的遺伝子を制御していると考えられる。しかし、当時は、ゲノムが未解読であったため、mRNA配列とpiRNAの配列を比較し、PiwiB標的遺伝子を予測していた。そのため、先行研究では、PiwiB標的タンパク質コード遺伝子を三種類しか同定できておらず、PSC制御に重要な標的遺伝子を取り漏らしている可能性があった。

2. 研究の目的

PiwiB標的遺伝子の網羅的な同定を目指す。また、PiwiB結合piRNA産生経路には、PiwiC依存的なものと、非依存的なものが存在することを示す。加えて、成体PSCシステムにおいて、

表1 *piwi* RNAi 個体の表現型

		RNAi後日数	
		7日目	14日目
<i>piwiA(RNAi)</i>	再生能力	○	○
	PSC維持	○	○
<i>piwiB(RNAi)</i>	再生能力	×	×
	PSC維持	○	×
<i>piwiC(RNAi)</i>	再生能力	○	×
	PSC維持	○	○



を制御していると考えられる。しかし、当時は、ゲノムが未解読であったため、mRNA配列とpiRNAの配列を比較し、PiwiB標的遺伝子を予測していた。そのため、先行研究では、PiwiB標的タンパク質コード遺伝子を三種類しか同定できておらず、PSC制御に重要な標的遺伝子を取り漏らしている可能性があった。

PiwiC 依存的/非依存的な PiwiB による制御がそれぞれ担う役割を解明する。

### 3. 研究の方法

- 申請者が開発した Direct-TRI (Ujibe et al., 2021) 及び Lasy-Seq (Kamitani et al., 2019) を用いて、*piwiA*, *piwiB*, *piwiC* に対する RNAi 処理後、1-16 日個体に対する時系列一細胞 RNA-Seq 解析を行い、*piwiB(RNAi)* 個体と *piwiC(RNAi)* 個体で共通して、あるいは *piwiB(RNAi)* 個体で特異的に発現が変動している遺伝子の同定を試みた。
- マウスに抗原ペプチドを投与することで抗 PiwiC 抗体の作成を試みた。
- 先進ゲノム支援 Sequel の HiFi シークエンスを用いて、プラナリア *Dugesia japonica* のゲノム解読を試みた。
- 高感度・ハイスループット Single cell RNA-Seq (TAS-Seq) をイムノジェネティクス社に依頼し、プラナリア主要細胞種アトラスの作成を試みた。

### 4. 研究成果

#### *piwi(RNAi)* 個体の時系列一細胞 RNA-Seq 解析

*gfp* (コントロール) 及び *piwiA*, *piwiB*, *piwiC* RNAi 個体の時系列一細胞 RNA-Seq 解析を行った。

その結果、最も重篤な再生不全を示す *piwiB(RNAi)* 個体ではなく、二番目に重篤な再生不全を示す *piwiC(RNAi)* 個体で、最多数の発現変動遺伝子が検出された (図 1)。

一方で、*piwiB(RNAi)* 個体でのみ発現が変動する転写因子を含む 35 遺伝子を同定した (図 2)。その中でも、機能未知遺伝子 X は再生不全が起こる七日目以降で *piwiB(RNAi)* 個体で発現上昇が確認された (図 3)。さらに、*piwiC(RNAi)* 個体でも遺伝子 X の発現は上昇傾向を示し、*piwiC(RNAi)* 個体で再生不全が確認される二週間前後で、発現量が *piwiB(RNAi)* 個体の RNAi 後一週間以降程度の高発現を示す個体が確認された (図 3)。再生不全という表現型の現出と非常に高い相関を持つ遺伝子発現を示した遺伝子は、本研究において再遺伝子 X のみであり、今後は遺伝子 X のノックダウンによる *piwiB(RNAi)* 個体のレスキュー実験を行うことで、遺伝子 X の機能と再生不全・PSC 制御の関連性について迫っていく。

#### プラナリア *Dugesia japonica* のゲノム解読

先進ゲノム支援の受け、プラナリア *Dugesia japonica* のゲノム解読を行った。まず、ショートリードで 80x 程度のシークエンスデータを入手したが、その結果を解析したところ、ゲノム解読に使用したクローナル集団のゲノムの多様性が想定以上に

高いことが判明した。そこで、ロングリードシーケンサーによる追加解析を実施した。結果、塩基同定精度 99% 以上で平均長 19 Kbp の HiFi リードを想定ゲノムサイズ (1.5 Gbp) の 25x で取得することに成功した。予備解析で HiCanu (Nurk et al., 2020) を用いたアセンブルを行ったと

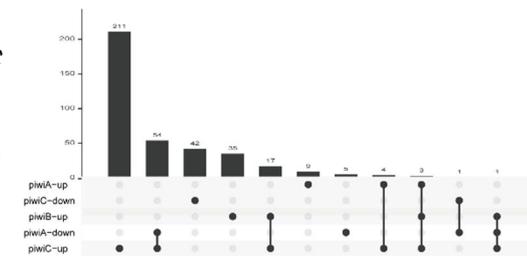


図 1 発現変動遺伝子数とその重なり

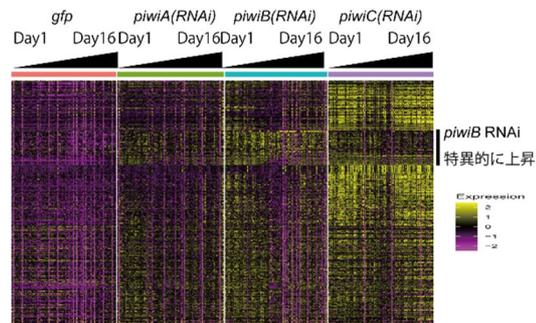


図 3 発現変動遺伝子の発現変動状況

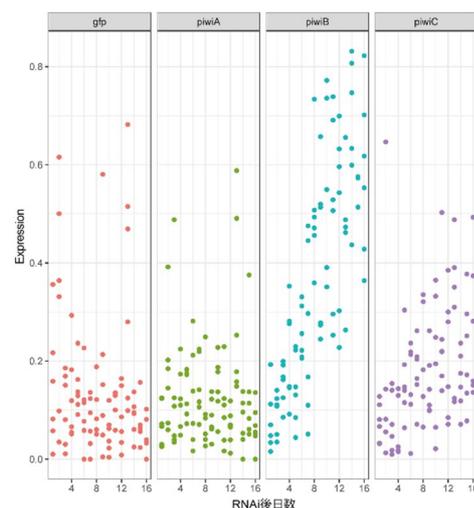


図 2 遺伝子 X の発現変化パターン

ころ、ゲノムサイズ 4.5 Gbp と、想定ゲノムサイズよりも大きくなった。BUSCO (Simão et al., 2015) を用いて必須遺伝子のアセンブル内における重複度合いを推定したところ、先行研究のゲノムアセンブルでの真核生物保存遺伝子の復元率が 47.4%であったのに対して (An et al., 2018)、本成果では 79.6%と大幅な改善に成功した。しかし、七割以上の遺伝子がアセンブル結果で重複しており、冗長性の高いゲノムであることが示唆された。先行研究でもゲノムの異質性が高いことが示唆されており、それを確認した結果と言える。現在、異質性の高さを考慮して先進ゲノム支援の解析チームによるゲノムアセンブル作業が進行中である。ゲノムアセンブル完成後、PiwiB 結合 piRNA に基づく標的予測と、*piwiB(RNAi)* 個体の発現変動遺伝子解析を組みわせることで、PiwiB に特異的な標的が同定させることが期待され、*piwiB* が担う PSC 制御の新たな理解に繋がることが期待される。

### プラナリア主要細胞種アトラス

前述の RNA-Seq 解析で得られた遺伝子がどのような細胞種で発現しているのか、いいかえると、各 *piwi RNAi* がどのような細胞種に影響を与えているのかを理解する上で、プラナリア *Dugesia japonica* の主要細胞種の遺伝子発現カタログ (アトラス) の作製を試みた。可能な限り生体内の状態での、各細胞の遺伝子発現プロファイルを取得するため、細胞乖離条件の検討及び BD Rhapsody を用いたシングルセル RNA-Seq 解析を行った。また、その際に、BD Rhapsody の正規プロトコルの改良版で感度が改良された TAS-Seq 法 (Shichino et al., 2021) を用いた。結果、一般的な FACS を用いた scRNA-Seq で法と比べて半分以下の所要時間で scRNA-Seq を実施し、約 7000 細胞の遺伝子発現情報を得た。本 scRNA-Seq が非常に多種多様な細胞種を含むため、細胞クラスタリングを行ったところ、単に Seurat パッケージを用いるだけではマーカー遺伝子が存在しない細胞クラスターが多数生じてしまった。そこで、少しずつクラスタリングをしていく反復クラスタリングを行うことで遺伝子発現の差異で明確に分かれる 91 細胞種を同定した。さらに、既知のマーカー遺伝子の発現情報や細胞周期マーカー遺伝子に基づく分裂能の推定スコアを付加することで、各細胞種がどのような細胞なのかの推定が可能な利便性の高い主要細胞種遺伝子発現カタログを作成し成功した。今後は、各 *piwiB(RNAi)* 個体の発現変動遺伝子の発現細胞種整理することで、*piwi* の機能阻害がプラナリアの PSC 制御・再生に与える影響を考察・検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kashima Makoto, Agata Kiyokazu, Shibata Norito	4. 巻 62
2. 論文標題 What is the role of PIWI family proteins in adult pluripotent stem cells? Insights from asexually reproducing animals, planarians	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 407 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12688	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 Makoto Kashima, Atsumi Miyata, Norito Shibata	4. 巻 NA
2. 論文標題 Planarian Piwi-piRNA interaction analysis using immunoprecipitation and piRNA-Sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 NA
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口善弘, 鹿島 誠
2. 発表標題 テンソル分解に基づく教師なし学習による変数選択のRNAiを適用したプラナリアのRNA-seq解析への応用
3. 学会等名 情報処理学会バイオ情報学研究会, 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿島 誠
2. 発表標題 Cooperation of nuclear and cytoplasmic PIWIs is indispensable for transposon silencing in planarian pluripotent stem cell system
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保坂美朋, 鹿島誠, 平田普三
2. 発表標題 経時一細胞RNA-Seqに基づくプラナリアの再生過程における網羅的ステージング
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿島誠, 河村嶺, 保坂美朋, 平田普三
2. 発表標題 シングルセルRNA-Seqによるプラナリア <i>Dugesia japonica</i> の主要細胞種遺伝子発現カタログ作成とその利用例
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Kashima, Kiyokazu Agata, Norito Shibata
2. 発表標題 Importance of nuclear PIWI inherited by the differentiated cells from the planarian adult pluripotent stem cells in differentiation.
3. 学会等名 2nd JSDB-GfE Young scientist exchange meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rei Komura, Makoto Kashima, Hiromi Hirata
2. 発表標題 Single cell RNA-Seq to identify all cell types in the planarian <i>Dugesia japonica</i> . Rei Komura 1, Makoto Kashima 1, Hiromi Hirata 1
3. 学会等名 発生物学学会2021
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------