

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15805

研究課題名（和文）始原生殖細胞のゲノム安定性を保障するクロマチン制御機構

研究課題名（英文）Chromatin regulatory mechanism rving preserving genomic integrity in primordial germ cells

研究代表者

巳波 孝至（Miwa, Takashi）

神戸大学・理学研究科・助教

研究者番号：70834969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：始原生殖細胞は生殖細胞（精子や卵など）の元となる細胞である。始原生殖細胞は形成後、遺伝情報を保持するために大規模な転写抑制状態が保たれている。特に線虫*C. elegans*では、転写抑制制御に伴って高密度に凝集した染色体構造が形成される。本研究では、この構造の形成に不可欠なクロモドメイン蛋白質MRG-1と協調的に機能する因子として、ヒストンアセチル化酵素CBP-1、ジンクフィンガー蛋白質ZFP-1を同定した。また、MRG-1を介したクロマチン制御が体細胞においても重要であり、MRG-1の欠失が転写因子DAF-16を起点としたストレス応答反応を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MRG-1と協調して機能するクロマチン制御因子としてZFP-1を見出した。ZFP-1の機能するヒストンH3K79メチル化修飾は線虫においては知見が乏しく、その機能の解明は始原生殖細胞におけるクロマチン制御の理解につながることを期待される。また、本研究では体細胞性MRG-1の欠失に起因するクロマチン制御の異常がストレス応答系を活性化させることを見出した。これは染色体動態の異常を感知する新規のストレス応答系が存在する可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Primordial germ cells (PGCs) are the precursors of germ cells, such as sperm and eggs. In *Caenorhabditis elegans*, PGCs remain transcriptionally silenced via the chromatin regulation for genomic integrity. In this study, we identified the histone acetyltransferase CBP-1 and the zinc finger protein ZFP-1 as the partner proteins of the chromodomain protein MRG-1, which is essential for chromatin remodeling in PGCs. We also found that MRG-1 can serve an important role in somatic cells and the deletion of MRG-1 causes a stress response dependent on the transcription factor DAF-16.

研究分野：発生生物学

キーワード：始原生殖細胞 クロマチン *C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞は生殖細胞(精子)や卵の元となる細胞であり、その形成・維持は生物が子孫を残す上で不可欠である。哺乳類であるマウスでは中胚葉性の細胞が始原生殖細胞へと分化した後、100細胞程度まで細胞増殖を行う。これらの細胞ではゲノム安定性を保障するために大規模な転写抑制状態が維持されるが、生殖巣へと移動し生殖細胞へと分化するまでの過程でその多くがDNA損傷により細胞死を起こす。一方で、線虫 *C. elegans* では始原生殖細胞がわずか2個しか形成されないため、その細胞死は不稔に直結する。これを回避するために線虫始原生殖細胞は高密度に凝集した染色体構造を形成する。その際、ヒストン修飾状態が劇的に変化することから、染色体構造の変化にはヒストン修飾因子依存的なクロマチン制御が重要であると考えられているが、その詳細は明らかにされていない。申請者の所属する研究室では生殖細胞形成に必須の母性因子としてクロモドメイン蛋白質 MRG-1 を同定しており(Fujita et al., Mech. Dev., 2002)、その変異体の始原生殖細胞において、転写促進に働くヒストン H3K4me2 やヒストン H4K16Ac などのヒストン修飾レベルが上昇し転写抑制状態が解除されるとともに、染色体構造が核内に分散することを発見し、「MRG-1 が始原生殖細胞において、大規模な転写抑制と染色体構造の安定化に寄与する」との報告を行った(Miwa et al., Genes to Cells, 2019)。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究により、MRG-1 が線虫始原生殖細胞におけるクロマチン制御の中核を担うことが示唆されている。MRG-1 はクロモドメインと MRG ドメインの2つのドメインを有し、クロモドメインを介してヒストン H3K36 メチル化修飾を認識し、MRG ドメインを介してヒストンアセチル化酵素をはじめとした様々な蛋白質と相互作用すると考えられているが、始原生殖細胞において MRG-1 と相互作用する因子は明らかにされていない。そこで、本研究では線虫始原生殖細胞において「MRG-1 と協調してクロマチン制御に寄与する因子の同定」を進め、その機能解析を実施することで、線虫始原生殖細胞におけるヒストン修飾に依存した高密度に凝集した染色体構造の形成機構の理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) クロマチン制御因子に対する RNAi スクリーニング解析

申請者は MRG-1 を始原生殖細胞特異的に発現する *mrg-1(s)* 株を作製している。この線虫株は稔性を有し次世代の個体を形成することができるものの、成長遅延や陰門の形成異常などの体細胞性の異常を示す。さらに、ヒストン H4K16 アセチル化酵素 MYS-2 などの阻害が *mrg-1(s)* 株特異的に陰門の形成異常や致死性を示すことを見出している。そこで、クロマチン制御因子群に対する網羅的な RNAi スクリーニング解析を実施し、形態形成異常や致死などの判別が容易な表現型を指標に *mrg-1* 変異体特異的に阻害効果が増強、あるいは軽減される遺伝子を探索することで、MRG-1 を介したクロマチン制御と遺伝学的相関のある因子を同定する。

(2) *mrg-1* 変異体におけるヒストン修飾変化の解析

申請者は *mrg-1* 変異体の始原生殖細胞において、ヒストン H3K4 メチル化、ヒストン H4K16 アセチル化のシグナルが亢進することを明らかにしている。そこで、*mrg-1* 変異体の始原生殖細胞、及び体細胞において他の代表的なヒストン修飾がどのように変化しているのかを免疫染色により比較解析を行う。

(3) *mrg-1* 変異体におけるストレス応答性の解析

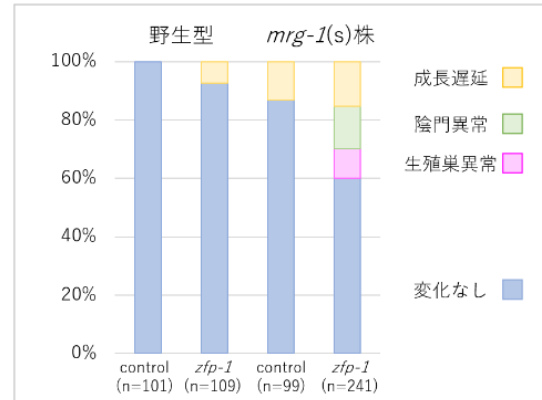
mrg-1(s) 株はストレス応答性遺伝子の変異体に近似した成長遅延や陰門の形成異常などの表現型を示す。そこで、MRG-1 が始原生殖細胞におけるクロマチン制御に加えて、体細胞におけるストレス応答反応の抑制にも寄与しているのではないかと、この予測を立てた。これを検証するため、既存のストレス応答に関わる因子群の阻害実験、並びにストレス環境条件化における表現型解析を実施することで、*mrg-1(s)* 株で生じている表現型の詳細を明らかにする。

4. 研究成果

(1) MRG-1 と遺伝学的相関のある因子の同定

MRG-1 と協調して機能するクロマチン制御因子を同定するため、クロマチン制御因子群をコードする遺伝子群に対する RNAi スクリーニング解析を実施した。*C. elegans* RNAi library (Kamath et al., 2003) 内においてクロマチン制御因子として区分される 264 遺伝子について、野生型、及び *mrg-1(s)* 株間における阻害効果を比較した。孵化後すぐの L1 幼虫期に二本鎖 RNA を含有する大腸菌株を摂食させる feeding RNAi 法によるスクリーニング解析を実施し、成長速度や陰門の形成に着目し比較解析を行ったところ、ジंकフィンガー蛋白質 ZFP-1、ヒストンアセチル化酵素 CBP-1、RNA 結合蛋白質 LIN-41 の 3 つについて、図 1 の *zfp-1* RNAi の例に示すような *mrg-1(s)* 株特異的に RNAi の効果が増強する結果が得られた。さらに、これらの遺伝子について個別にクローニングを行い、RNAi を行った場合においても同様の効果が得られたことから、ZFP-1、CBP-1、LIN-41 の 3 つが MRG-1 と遺伝学的相関のある因子として挙げられた。

図1: *zfp-1* RNAiは *mrg-1(s)* 株特異的に形態形成異常を引き起こす



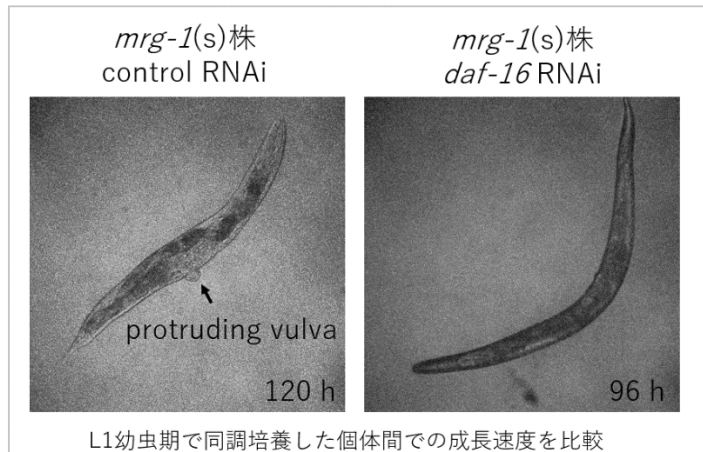
(2) *mrg-1* 変異体では一部のヒストン修飾状態のみが変化する

野生型、及び *mrg-1* 変異体間の始原生殖細胞におけるヒストン H3K9 メチル化、ヒストン H3K27 メチル化、ヒストン H3K36 メチル化、ヒストン H4K8 アセチル化のレベルを免疫染色により比較したところ、予測に反し、MRG-1 の欠失条件下においてもこれらヒストン修飾レベルの劇的な変化は見られなかった。さらに、*mrg-1(s)* 株を用いた成長過程の体細胞におけるヒストン修飾レベルの比較解析においても顕著な変化は見られなかった。これらより、MRG-1 によるクロマチン制御はヒストン H3K4 メチル化、ヒストン H4K16 アセチル化など、一部のヒストン修飾制御に対してのみ、強い影響をもたらすと考えられる。また、(1)で同定された ZFP-1 は線虫では知見の乏しいヒストン H3K79 メチル化修飾に関与することから、今後はその修飾レベルについて解析を行う必要がある。

(3) 体細胞における MRG-1 の欠失はストレス応答性反応を引き起こす

(1) で同定された因子のうち、ZFP-1、CBP-1 は共にストレス応答性転写因子 DAF-16 の抑制に機能することから、*mrg-1(s)* 株における成長遅延が DAF-16 の活性化依存的に生じているのではないかと予測の下、DAF-16 の阻害実験、並びにその標的遺伝子の発現解析を実施した。DAF-16 の阻害は野生型個体においては顕著な表現型を示さないが、*mrg-1(s)* 株においては control RNAi 条件下と比較して L1 幼虫期から成体までの成育にかかる期間が約 24 時間短縮されるなど、成長遅延が大幅に緩和されると共に、陰門の形成異常も殆ど見られなくなった (図 2)。さらに、*mrg-1(s)* 株では DAF-16 の標的遺伝子である *sod-2/3* 遺伝子の発現量が増加すると共に、熱ストレス条件下での飼育における成長速度や致死率の変化が小さいなど、ストレスに対する感受性が低下する様子が確認された。これらの結果は MRG-1 の欠失が発生を通じてストレス応答反応を引き起こしていることを示唆している。

図2: *mrg-1(s)* 株における成長遅延はストレス応答性転写因子 DAF-16 依存的に生じる



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Miwa Takashi, Ohtani Keigo, Inoue Kunio, Sakamoto Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 The germ cell specific TAP like protein NXF 2 forms a novel granular structure and is required for tra 2 3 UTR dependent mRNA export in Caenorhabditis elegans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 621 ~ 628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12978	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷啓悟、巳波孝至、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 The RNA transport-related factor NXF-2 forms a novel granular structure in C. elegans germ cells
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巳波孝至、井上邦夫、坂本博
2. 発表標題 線虫C. elegansにおいてクロモドメイン蛋白質MRG-1の阻害はストレス応答系の活性化に伴う成長遅延を誘導する
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 大谷 啓悟 , 巳波 孝至 , 井上 邦夫 , 坂本 博
2. 発表標題 The RNA transport-related factor NXF-2 forms a novel granule structure in C. elegans germ cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 啓悟 , 巳波 孝至 , 井上 邦夫 , 坂本 博
2. 発表標題 RNA輸送関連因子NXF-2の機能解析
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巳波孝至, 大谷啓吾, 井上邦夫, 坂本博
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> において生殖細胞特異的なTAP様蛋白質NXF-2は新規のRNPを形成しtra-2 3' UTR依存的なmRNA核外輸送に必要である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 巳波 孝至, 大谷啓吾, 井上 邦夫, 坂本 博
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> において生殖細胞特異的なTAP様蛋白質NXF-2は新規のRNPを形成しtra-2 3' UTR依存的なmRNA核外輸送に必要である
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 巳波 孝至, 大谷啓吾, 井上 邦夫, 坂本 博
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の生殖細胞において、TAP様蛋白質NXF-2は新規のRNP顆粒を形成し、3'非翻訳領域依存的にmRNAを核外へと輸送する
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会
4. 発表年 2023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
---------	---------