

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15808

研究課題名(和文) エピトランスクリプト輸送：反復多コピー遺伝子が織りなす全能性制御の解明

研究課題名(英文) Epitranscript transfer, a totipotency regulation operated by repetitive genes

研究代表者

小林 美栄 (KOBAYASHI-ISHIHARA, Mie)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00748337

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)： Refee(Gm21312)は、マウス初期胚の分化全能性期に一過的に発現する遺伝子で、タンパク質をコードし、ゲノムに多コピーに保存されている。本研究ではRefeeの全能性制御に対する機能意義を追究した。その結果、Refeeはマウス内在性レトロウイルスL(MERVL)のRNAに主に結合し、その発現レベルや核外輸送を促していることが明らかとなった。このRefee結合RNA配列の多くは、m6A修飾部位である事もわかった。Refeeノックダウン胚を用いた解析では、Refeeは2細胞期後期で起こる胚性遺伝子の転写活性化を促進することがわかり、初期胚発生に必須な因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の全能性期胚では父方と母方のゲノムが融合して新たなゲノム(胚性ゲノム)が構築され、遺伝子の転写が一気に活性化される時期である。RefeeはRNAの安定性や核外輸送を促進することで、できた胚性ゲノムを正常に機能させる役割があると考えられた。概して、全能性期特有に発現するRNA結合タンパク質が哺乳類の全能性制御に必須であるという新しい知見を得ることができた。また従来、初期胚の全能性制御には母性因子が重要である事が多々証明されてきたが、本研究結果は胚性因子もその制御に必要なことを示す先駆的なデータとなった。

研究成果の概要(英文)： Refee (Gm21312) is an uncharacterized protein that is transiently and specifically expressed in mouse totipotent embryos. In the present research project, the grantee aimed to elucidate the functional significance of Refee in totipotency regulation. The grantee studied Refee-binding transcripts and phenotype of Refee knockdown (KD) embryos. These results showed that Refee mainly binds RNA transcribed from Mouse endogenous retrovirus L to enhance its expression and cytoplasmic distribution. In addition, the grantee found that Refee likely recognizes m6A sites on the transcripts. Refee KD embryos failed to develop beyond the two-cell or four-cell stage as they lack zygotic gene activation (ZGA). ZGA is one of the pivotal events in mammalian totipotent embryos; to activate a newly zygotic genome created by the assembly of maternal and paternal genomes. Our findings suggest that Refee, though an RNA binding protein, plays an essential role in facilitating the zygotic genome function.

研究分野：分子生物学

キーワード：全能性 初期胚 Refee (Gm21312) 胚性ゲノム活性化 エピトランスクリプト

## 1. 研究開始当初の背景

全能性を獲得した細胞はそれ1個から胎盤を含む全ての組織に分化することができる。哺乳類における全能性細胞は受精卵ただ一つである。その上、受精卵が全能性を保有する期間はかなり短く、マウスなら2細胞期でピークに達しその後8細胞期にかけて徐々に失われてゆく。この2細胞期で一過性に発現する遺伝子を2C遺伝子と呼び、その中には反復配列が多く含まれている。例えばマウスゲノムの40%を占めるトランスポゾンや Dux, Zscan4, Gm21312 遺伝子群がよく知られている (図 1a, b)。これらの遺伝子群は、それぞれにタンパク質をコードする反復配列である。Dux タンパク質は転写因子として多くの2C遺伝子の転写を活性化し、この遺伝子をノックアウトした受精卵はそれ以上分化しないことが報告されている (Chen ら, Nat Genet. 2019)。つまり2C遺伝子が初期発生に必要不可欠であるがゆえ、多コピーに保有する方が進化学的に有利なのだろう。しかしながら2C遺伝子のタンパク質の機能はごく一部しかわかっていない。

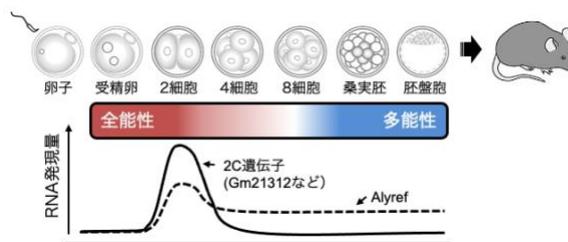


図1a. マウス2細胞期胚に一過的に発現する2C遺伝子

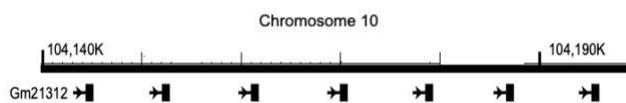


図1b. Gm21312遺伝子群の遺伝子座

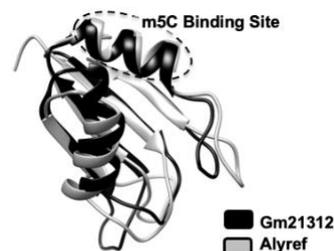


図1c. AlyrefとGm21312の立体構造比較

Gm21312 も機能不明な遺伝子群で、マウスゲノムに30コピー保存されている。また、その一部はクラスターを作り、タンデムに複数コピー存在する (図 1b)。Gm21312 の相同遺伝子は Alyref であり、このタンパク質は mRNA の核外輸送調節に関わる転写後遺伝子発現制御因子である。本因子は核で、ターゲット RNA を選別し、それを①核外輸送マシーナリーに受け渡す、あるいは②核内に繫留する役目を持っている。

興味深いことに、Alyref は RNA のメチル化シトシン(m5C)に特異的に結合することでターゲット RNA を識別する (Yang ら, Cell Res. 2017)。こういった RNA の化学修飾が RNA の機能・発現制御に関与している、という概念がごく近年提唱され、エピトランスクリプトームと称されている (Trixl ら, WIREs RNA. 2019)。化学修飾の種類には m5C 以外にもメチル化アデノシン(m6A)、シュドウリジン(Ψ)など多様にあることが分かっており、それらが様々な経路を介して遺伝子の転写後調節に貢献する (Roundtree ら, Cell. 2017)。申請者の予備検討では、Gm21312 タンパク質が Alyref の m5C 認識部位のアミノ酸配列及び立体構造と類似性が高いことを発見した (図 1c)。以上のことから、Gm21312 が2細胞期でエピトランスクリプトームの核外輸送を制御する因子ではないかと推測し、これを Refee (RNA and Export Factor in Early Embryo) と名付けた。

## 2. 研究の目的

本研究では反復多コピー遺伝子である Refee タンパク質の全能性制御における機能意義を明らかにすることを目的とした。Alyref の機能に基づき、以下のように仮定し、実験を行った。

- ① 2細胞期では全能性誘導因子の mRNA が m5C 修飾されており、Refee がその核外輸送を促進する。これにより全能性誘導因子の発現が促進し、2細胞期胚の全能性の獲得・維持がなされる (図 2)。

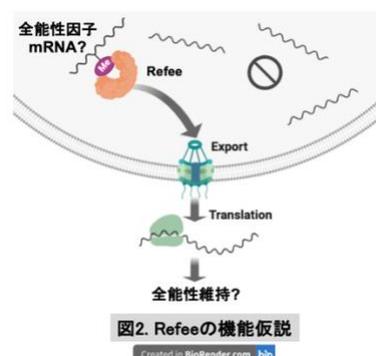


図2. Refeeの機能仮説

- ② Refee を含む 2C 遺伝子の発現消失とともに、エピトランスクリプトームのリモデリングが起こると、多能性誘導因子 mRNA が Alyref によって核外輸送されるようになる。これによって全能性の消失・多能性の誘導が促進される。

### 3. 研究の方法

#### (1) Refee 結合 RNA の網羅的探索

##### ①抗 Refee モノクローナル抗体の作製

Refee の機能解析のためのツール獲得のため行った。Refee 全長配列、C'末端配列、N'末端配列の組換えタンパク質を作製し、マウスにそれぞれ免疫した。このマウス脾臓細胞を用いてハイブリドーマを作製した。ウエスタンブロット、免疫染色、免疫沈降に使用できる抗体の獲得を試みた。

##### ②iCLIP-seq

Refee が i)RNA に結合するか、そして結合するとしたら ii)どのような RNA に結合しているのかを iCLIP-seq 法により調べた。Dux 発現誘導 ES 細胞(TRE:Dux)と抗 Refee モノクローナル抗体(#9-8)を用いて免疫沈降を行い、その免疫沈降産物の RNA を放射性同位体 <sup>32</sup>P-ATP でラベルした。この RNA を用いて cDNA library を作製し、Mi-seq により次世代シーケンシングを行った。得られた配列は STAR によりマウスリファレンスゲノム(mm10)にマップした。その後、Piranha によってピークコールを行った。ES 細胞(ESC)や初期胚における m5C 及び m6A 修飾部位の情報は Amort ら、Teissandier ら(GSE83432, GSM4314656)によるデータを用い、bedtools を用いて重複するピークを同定した。

#### (2) Refee 結合 RNA の制御解析

Refee が RNA に結合することによってどのような影響を及ぼしているのかを調べた。

##### ①Refee 誘導発現 ESC を用いた解析

ドキシサイクリン(Dox)によって Refee を誘導発現できる ESC を樹立した。Dox 処置後 24、48、72 時間目の細胞を用いて MERVL Gag や Zscan4 に対するウエスタンブロット、RNA 量の定量を行った。

##### ②Refee KD 胚を用いた解析

Refee に対するアンチセンスオリゴを設計し、それを BDF1 マウス受精卵に注入した結果、Refee を効率的にノックダウンできることを確認した(Refee KD 胚)。この 2 細胞期胚を用いて MERVL RNA に対する FISH と MERVL Gag, Refee, Alyref に対する免疫染色を行った。

#### (3) Refee KD 胚の表現型解析

Refee の in vivo におけるインパクトを調べるため、Refee ノックダウン(KD)胚の表現型解析を行った。Refee に対するアンチセンスオリゴを受精卵に注入して作製した Refee KD 胚の発生レベルを観察した。また、Refee KD 胚を 2 細胞期中期(M2C)、後期(L2C)、4 細胞期(4C)でそれぞれ回収し、RNA-seq を行った。得られたデータを用いて発現変動(DEG)解析を行い、DEG 遺伝子のジーンオンロジー(GO)解析や初期胚ステージ特有に発現する遺伝子群の DEG 解析を、Gene Enrichment Analysis(GSEA)法により行った。遺伝子群の情報は DBTMEE データベース(Park ら, NAR 2015)から得た。

#### (倫理面への配慮)

マウスモノクローナル抗体の作製及びマウスの胚採取に関しては予め慶應義塾動物実験委員会から承認を得た。動物愛護の精神に則って動物実験を行った。

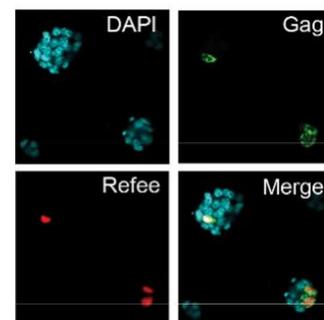


図3a. Refeeは2CLCに発現している

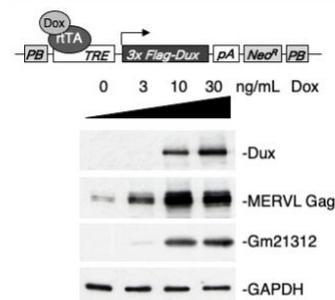


図3b. RefeeはDuxにより転写活性化する

#### 4. 研究成果

##### (1) Refee 結合 RNA の網羅的探索

###### ①抗 Refee モノクローナル抗体の作製

Refee 全長配列免疫マウスのハイブリドーマから、ウエスタンブロット、免疫染色に使用できるモノクローナル抗体(#8-4)を得た。Refee C'末端配列免疫マウスのハイブリドーマから、免疫沈降用のモノクローナル抗体(#9-8)を得た。ESC を用いて免疫染色を行った結果、ESC で 1%の頻度で出現する 2CLC で Refee が発現していることがわかった(図 3a)。TRE:Dux 細胞を用いて、ウエスタンブロットを行うと Dux 量依存的に Refee の発現が上昇することがわかった(図 3b)。Hendrickson らによる Dux 発現 ESC を用いた ChIP-seq (GSE85632)を再解析した結果、Refee 遺伝子上流に Dux 結合部位が検出され、Dux が Refee の転写因子となっているようである。

###### ②iCLIP-seq

抗 Refee モノクローナル抗体(#9-8)を用いて免疫沈降を行い、その免疫沈降産物の RNA を <sup>32</sup>P-ATP でラベルした結果、強い RNA シグナルが検出された。つまり、Refee は RNA 結合タンパク質だということが明らかとなった。次世代シーケンシングの結果から、Refee 結合 RNA 配列のピークを同定したところ、その半分以上がトランスポゾン(TE)配列で、次に coding-RNA 配列のピークが 22.8%を占めた。TE 配列の内、半分以上がマウス内在性ウイルス L(MERVL)配列であることがわかった。つまり MERVL RNA 配列が同定された Refee 結合サイトの約 1/4 を占めることがわかった(図 4a)。Refee が結合する coding-RNA 配列の内訳は、2C 遺伝子である、Zscan4 や Refee RNA であった。既に同定された ESC における m5C 修飾部位と比較すると Refee 結合サイトとの重複は見られなかった。一方、m6A 修飾部位と比較すると、Refee 結合サイトと重複することがわかった(図 4b)。

##### (2) Refee 結合 RNA の制御解析

Refee が RNA に結合することによってどのような影響を及ぼしているのかを調べた。

###### ①Refee 誘導発現 ESC を用いた解析

コントロール ESC に比べ、Refee 発現誘導 ESC に Refee 結合ターゲットである MERVL や Zscan4 RNA のレベルが上昇していた。また、タンパク質レベルも上昇していることがわかった(図 5a)。

###### ②Refee KD 胚を用いた解析

逆に Refee KD 胚では MERVL 由来タンパク質 Gag の発現レベルの低下が認められた(図 5b)。この胚を用いて MERVL RNA に対する FISH を行ったところ、MERVL RNA レベルの全体的な減少が認められた他、細胞質への分布量が減少していた。

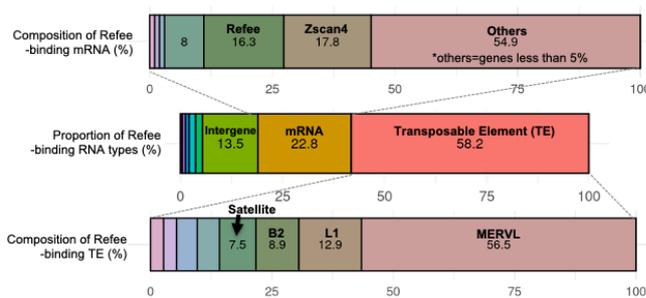


図4a. iCLIPにより同定されたRefee結合RNAの内訳



図4b. Refeeの結合サイトとm6A修飾サイトの重複例 Zscan4f遺伝子における例。Refeeとm6Aピークが重なっている

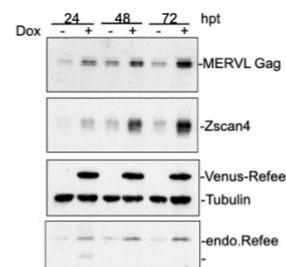


図5a. Refeeは結合RNAの発現レベルを促進する

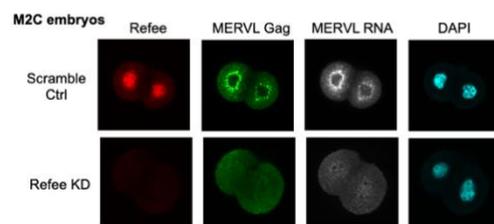


図5b. RefeeはMERVL Gagタンパク質の発現レベルを促進する

(3) Refee KD 胚の表現型解析

Refee KD 胚の発生レベルを観察した結果、2細胞期胚(2C)から4細胞期胚(4C)で発生を停止してしまうことがわかった(図6a)。この RefeeKD 胚の RNA-seq を行った結果、MERVL RNA の顕著な減少が各ステージで確認できた。全体的に Refee の KD によって発現減少するとランスクリプトが多く、その中には、転写に関わるような遺伝子の減少が多く見られた(図 6b)。4C では、Nanog や Myc, Esrrb と行った多能性因子遺伝子の発現減少が見られ、Refee KD による転写因子の減少が多能性期への分化を阻害している様子が推測できた。GSEA を用いて、どのような初期発生段階

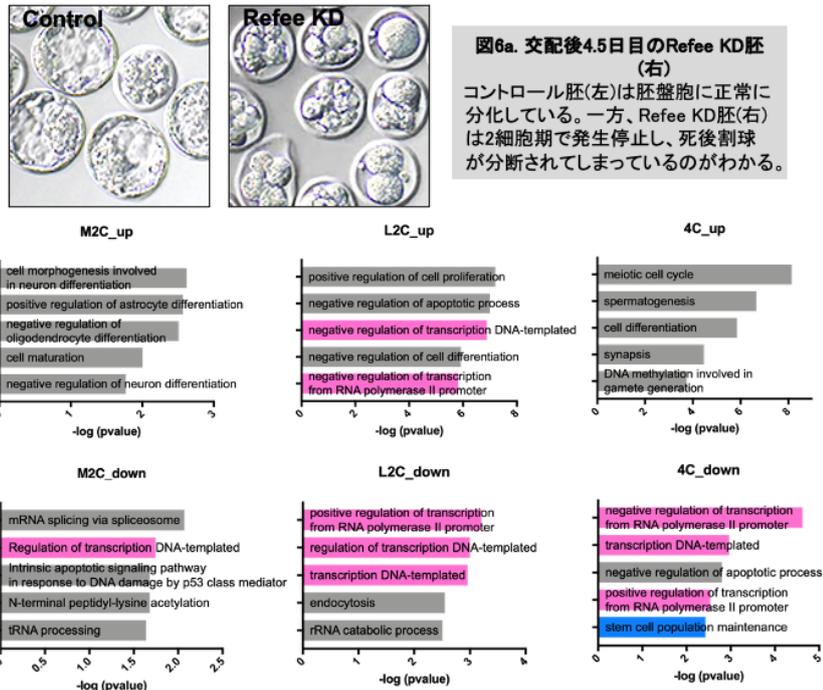


図6a. 交配後4.5日目のRefee KD胚(右)コントロール胚(左)は胚盤胞に正常に分化している。一方、Refee KD胚(右)は2細胞期で発生停止し、死後割球が分断されてしまっているのがわかる。

図6b. Refee KD胚におけるDEG遺伝子のGO Top5 転写に関わるGOをピンク、多能性因子遺伝子GOを青で示した。

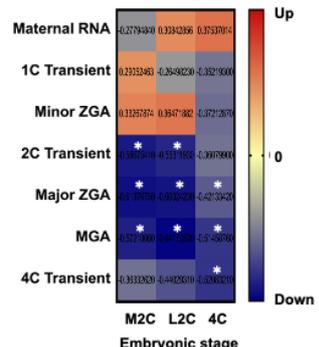


図6c. Refee KD胚における各遺伝子群のRNAレベル コントロール胚に比べ上昇している遺伝子群を赤、下降している遺伝子群を青で示した。白アスタリスクは有意な差異が認められる項目。

に関わる遺伝子の変化が起きているか調べたところ、全てのステージの KD 胚で major zygotic gene activation (major ZGA)に関連する遺伝子 RNA の発現が有意に低下していた(図 6c)。つまり、Refee は後期 2C(L2C)で起こる major ZGA に必須な因子であることがわかった。

(4) 考察

Refee は MERVL RNA に結合し、その RNA の核外輸送や安定性の促進に関わっているようである。また、in vivo においては、major ZGA の遂行に必須な因子であった。哺乳類の全能性期胚では父方と母方のゲノムが融合し、新たなゲノム(胚性ゲノム)が構築される場である。Refee は全能性期胚 RNA の安定性や核外輸送を促進することで出来立ての胚性ゲノムを正常に機能させる役割があることが明らかとなった。

また、Refee の標的 RNA の認識には m6A 修飾が関与している可能性が示された。実際、2細胞期における MERVL RNA の m6A 化は2細胞期終了後の速やかな RNA の分解に関与していることが報告された(Wu ら, Nat Cell Biol. 2022)。さらに RNA の m6A 化を阻害すると 2C 遺伝子 RNA が分解されず、正常な初期発生が進まないことも示された。Refee は m6A 修飾 RNA である MERVL RNA の発現レベルを促進することから、全能性期特有の m6A-Reader として、これらの分解を阻害している可能性がある。Refee によるエピトランスクリプトの保護が正常な ZGA 遂行に加担していると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mie Kobayashi-Ishihara, Akihiko Sakashita, Masaru Ariura, Hirotsugu Ishizu, Tomohiro Kitano, Yonjia Guo, Hidetoshi Hasuwa, Kensaku Murano, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 REFEE, A NUCLEAR RNA BINDING PROTEIN, REGULATES EARLY DEVELOPMENT IN MICE
3. 学会等名 ISSCR/JSRM International Symposium, Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mie Kobayashi-Ishihara, Akihiko Sakashita, Masaru Ariura, Hirotsugu Ishizu, Tomohiro Kitano, Yonjia Guo, Hidetoshi Hasuwa, Kensaku Murano, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 マウス全能性制御におけるRefecの転写後調節のインパクト
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mie Kobayashi-Ishihara, Florencia E. Alonso, Katarina Smutna, Jordi Argilaguuet, Jennifer Jungfleisch, Rene Bottcher, Javier P. Martinez, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Juana Diez Anton and Andreas Meyerhans
2. 発表標題 Mechanisms of HIV-1 restriction by Schlafen12, a codon-usage modifier to block targeted translation in homeostatic proliferating CD4 T cells
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
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
---------	---------