

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21507

研究課題名（和文）トランスポゾンによる全能性制御機構の解析

研究課題名（英文）Role of retrotransposons in early embryonic development and totipotency control

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：初期胚発生過程で高発現するレトロトランスポゾンLINE-1に対し、宿主が採用する防御機構は不明である。2細胞期胚様ES細胞抽出液を用いて免疫沈降法により精製し、質量分析を行ったところLINE-1 ORF1タンパク質の相互作用因子としてTDP-43を同定した。siRNAをマウス受精卵に注入し、TDP-43の発現抑制実験を行なったところ、TDP-43ノックダウンにおいて有意にLINE-1のコピー数が増加した。以上の結果から、TDP-43は初期胚発生の過程で脱抑制されるLINE-1の転移活性を抑制し、ゲノム恒常性の維持に寄与してい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

LINE-1はマウスゲノムの約20%を占め、ゲノム上に自分自身のコピーを増やしていく性質を持つレトロトランスポゾンである。初期胚発生過程においてLINE-1は高発現するが、その生物学的意義や、宿主への影響についての研究はまだ少ない。本研究の成果により、TDP-43は初期胚発生の過程で脱抑制されるLINE-1の転移活性を抑制し、ゲノム恒常性の維持に寄与していることが示された。本研究によりトランスポゾンと宿主の共生関係の一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The host defense mechanism against LINE-1, a retrotransposon highly expressed during early embryogenesis, remains elusive. We identified TDP-43 as a protein interacting with LINE-1 ORF1 protein from cell extract of a two-cell stage-like cell derived from mouse ES cells. We tried to knock down TDP-43 expression by injecting siRNA into fertilized mouse eggs. TDP-43 knockdown significantly increased LINE-1 copy number on the mouse genome. These results indicate that TDP-43 contributes to genome integrity by suppressing LINE-1, which is de-repressed during early embryogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：レトロトランスポゾン 初期胚発生 LINE-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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、ゲノムに内在する変異原であり、転移を繰り返すことで宿主ゲノムを損傷するものと考えられてきた。つまりトランスポゾンは宿主によって抑制されなければならない対象である。一方、近年のゲノム解析の進展から、トランスポゾンはゲノム進化の原動力であると考えられるようになった。トランスポゾンは、宿主の遺伝子発現系に取り込まれ(Co-option)、複雑な発生を可能にする遺伝子プログラムの構築に寄与するというモデルが提唱されている。

マウスのレトロトランスポゾン MuERVL (Murine Endogenous RetroVirus with Leucine tRNA primer) は、ゲノムの1000ヶ所以上に存在する。受精直後の初期胚ではゲノムワイドにDNAメチル化の除去が起きる。それに伴い MuERVL は2細胞期胚に急激に活性化した後、徐々に減少し着床前の胚盤胞ではほとんど検出されなくなる(図1)。

MuERVL の mRNA は2細胞期胚トランスクリプトームの3%も占めている (Peaston et al., *Dev Cell*2004)。この MuERVL の一過的な活性化は、胚発生過程において全能性から多能性への移行期とリンクしている。8細胞期胚までの細胞は全能性を有し、胎盤などの胚体外組織を含むあらゆる種類の細胞へ分化が可能である。一方、胚盤胞の内部細胞塊や胚性幹細胞(ES細胞)は胚体組織のみに分化が可能な「多能性」を保持している。しかし、ES細胞集団のうち0.1%の細胞は「2細胞期様細胞(2C-like細胞)」

と呼ばれ、胚体外組織に分化が可能な全能性を保持していることが報告されている (Macfarlan et al., *Nature* 2012)。

全能性から多能性に遷移する時期において、マウスゲノムの20%程度を占めるレトロトランスポゾン LINE-1 も MuERVL と同様に活性化する。LINE-1 は現在も増殖伝播するトランスポゾンであると考えられている。ゲノムDNAの恒常性を維持するため、LINE-1の転移・増殖は一般的に転写段階で抑制されている。しかし、マウス初期胚発生、特に2細胞期胚においてLINE-1は脱抑制され、コードするタンパク質 L1ORF1 タンパク質(L1ORF1p)が翻訳される。LINE-1 RNA と L1ORF1p の複合体(LINE-1 RNP 複合体)は、ゲノムDNAへの挿入の前段階であることから、宿主ゲノムDNA恒常性の脅威であると考えられる。ところが、初期胚発生という重大な局面において、転写翻訳されたLINE-1の転移と増殖を抑制するメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究ではトランスポゾンと宿主の攻防や、トランスポゾンによる宿主遺伝子プログラムへの貢献という観点に立ち、マウス初期胚発生期におけるトランスポゾンと宿主の共生関係の理解を目指す。特に全能性期において転写翻訳されるLINE-1に着目し、宿主がゲノムDNAを保護し、全能性を担保するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

初期胚発生においてLINE-1 RNP複合体と相互作用し、ゲノムDNAへの挿入を阻害する因子の探索を行なった。LINE-1がコードするL1ORF1pに対するモノクローナル抗体を作製した。ES細胞集団の0.1%を占める2C-like細胞においてL1ORF1pが発現することを確認した。そこで2C-like細胞の抽出液を用いて、L1ORF1pに相互作用する因子を、作製したモノクローナル抗体を用いて精製し、質量分析によって同定した。同定した因子は、293T細胞を用いたLINE-1転移活性レポーターシステムを用いて評価を行なった。初期胚において、同定した因子をノックダウンし、内在LINE-1のコピー数の増減を検討した。

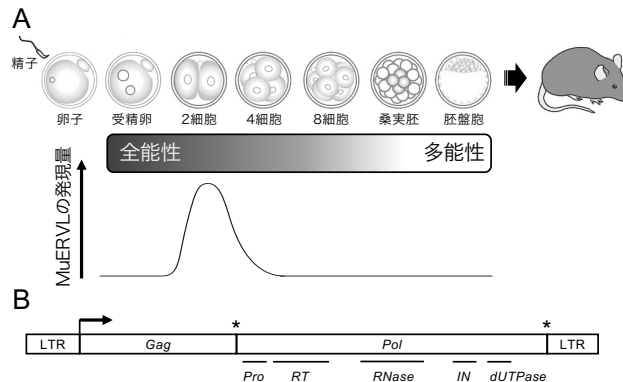


図1. マウス2細胞期胚に一過的に発現するMuERVL
A. 2細胞期で起こるゲノムの初期化と同調したMuERVLの活性化と、全能性から多能性への移行を模式的に示す。
B. MuERVLの構造(基準配列 No. Y12713, 6471 bp) LTR: long terminal repeat, Gag: 構造タンパク質, Pol: ウイルス酵素群, Pro: プロテアーゼ, RT: 逆転写酵素, IN: インテグラーゼ, アスタリスクは終止コドン。

4. 研究成果

(1) L1ORF1 タンパク質(L1ORF1p)に対する抗体を作製した。この抗体を用いて2細胞期胚で発現する L1ORF1p を検出することができた。また、ES 細胞に発現する L1ORF1p を免疫沈降法によって精製することが可能であった。免疫染色法により、ES 細胞集団のごく一部の細胞で L1ORF1p が強く発現することが明らかとなった。ごく一部の ES 細胞集団は MuERV L の Gag タンパク質を共発現していることから、2C-like 細胞において LINE-1 が脱抑制し、L1ORF1p を発現していることが明らかとなった。この細胞集団を大量に得るため、転写因子 DUX を発現誘導することが可能な ES 細胞株を構築した。

(2) 転写因子 DUX の発現により、大量に得られた 2C-like 細胞の抽出液を用いて、L1ORF1p 複合体を精製し、質量分析によって相互作用因子の探索を行なった。同定した9因子について、EGFP をベースとした LINE-1 のレポーターシステムと 293t 細胞により、LINE-1 転移活性への影響を評価した。その結果、LINE-1 の転移を抑制する因子として TDP-43 (Tardbp) を同定した(図2)。新たに TDP-43 に対するモノクローナル抗体を作製し、免疫沈降法とウェスタンブロッティング法により L1ORF1p と TDP-43 の相互作用を確認した。

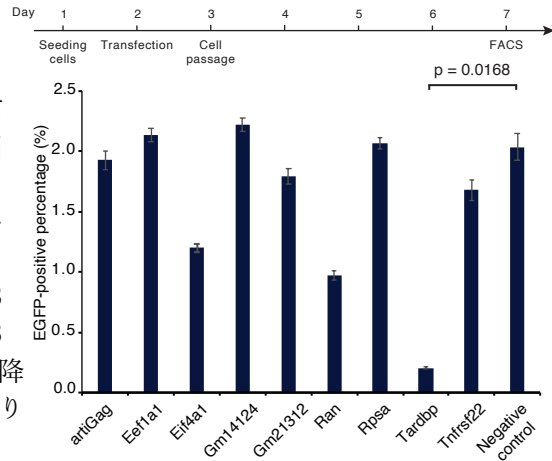


図2 LINE-1 の転移活性

(3) マウス初期胚に TDP-43 に対する siRNA を注入し、発現抑制を試みた。LINE-1 のうち現在でも活動的である Type A、T_F、G_F について、定量 PCR によりコピー数を比較したところ、スクランブル siRNA に比較し、TDP-43/Tardbp ノックダウンにおいて有意に LINE-1 のコピー数が増加していることが明らかとなった(図3)。また次世代シーケンサーを用いて LINE-1 の挿入箇所を決定することができる TIP-seq 法を用いたところ、TDP-43 ノックダウンにおいて LINE-1 の挿入箇所が増加していることがわかった。以上の結果から TDP-43 はマウス初期胚において LINE-1 の転移増殖活性を抑制していることが明らかとなった。

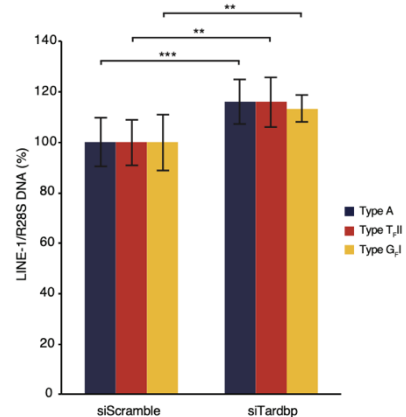


図3 LINE-1 のコピー数

(4) 初期胚で観察された TDP-43 の LINE-1 抑制効果を、ES 細胞を用いて再検証した。TDP-43 を発現抑制し、レポーターシステムを用いて評価したところ、ES 細胞においても TDP-43 は LINE-1 を抑制することが確認された。TDP-43 は ES 細胞の増殖に必須らしく、TDP-43 ノックアウト ES 細胞は得られなかった。一方で、ガイド RNA が標的とする開始コドンを読み、次のエクソンに存在する代替 ATG から翻訳される N 末欠損 TDP-43(TDP-43ΔN)を発現する ES 細胞株が得られた。この細胞株において LINE-1 Type A、T_F、G_F のコピー数が増加していることがわかった。

(5) さらに詳細な解析を進めるため TDP-43 の様々な変異体を作製し、293T 細胞を用いた LINE-1 レポーターシステムにより検討した。その結果、TDP-43ΔN は L1ORF1p との相互作用活性を失い、LINE-1 の転移活性を抑制できないことが明らかとなった。また、TDP-43 の C 末欠損体は L1ORF1p と相互作用できるが転移抑制活性は失っていた。また TDP-43 の RNA 結合ドメインは L1ORF1p との相互作用に関係なく、転移抑制活性を維持していた。

以上の結果から、TDP-43 は初期胚発生の過程で脱抑制される LINE-1 の転移活性を抑制し、ゲノム恒常性の維持に寄与していることが明らかとなった。すなわち TDP-43 は初期発生期におけるトランスポゾンと宿主の共生関係の一端を担っていると考えられる。

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 2件）

1. 著者名 Ryo Onishi, Kaoru Sato, Kensaku Murano, Lumi Negishi, Haruhiko Siomi, Mikiko C Siomi	4. 巻 6
2. 論文標題 Piwi suppresses transcription of Brahma-dependent transposons via Maelstrom in ovarian somatic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	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） 10.1126/sciadv.aaz7420	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 -

1. 著者名 Youjia Guo, Atsushi Kawaguchi, Masaru Takeshita, Takeshi Sekiya, Mikako Hirohama, Akio Yamashita, Haruhiko Siomi, Kensaku Murano	4. 巻 296
2. 論文標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	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） 10.1016/j.jbc.2021.100346	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ten D. Li, Kensaku Murano, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 Inhibition of LINE-1 retrotransposition by TDP-43 during embryogenesis
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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