

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19219

研究課題名（和文）ノンコーディング配列Aluレトロトランスポソンの転移制御因子の探索

研究課題名（英文）Identification of host factors that regulate Alu retrotransposition

研究代表者

三好 知一郎（Miyoshi, Tomoichiro）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：60378841

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）：Aluレトロトランスポソンの転移は多くの疾患原因となることが知られているが、その転移メカニズム・制御因子はよくわかっていない。本研究ではAlu転移制御因子を探索し、これを解明すること主な目的とした。そこでAlu制御因子を探索する遺伝学スクリーニングへと発展させるために、Alu転移を蛍光蛋白質EGFPによって可視化する手法の開発に取り組み、新たなAlu転移測定手法を確立した。既に実施しているL1 ORF2蛋白質複合体の解析結果に加え、Alu-EGFPレポーターを用いてその制御因子を探索するための遺伝学的スクリーニングを実施する準備が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Aluは、少なく見積もっても20人に1人の割合で新規の転移を引き起こし、場合によっては疾患原因となる遺伝子変異を伴う。しかし現生人類でも転移を繰り返すAluの転移機構は殆どわかっておらず、その制御因子を同定・解析することは、我々のゲノムの成り立ちや、発生過程および環境変動によって変化するゲノムの性質を知る上で極めて重要である。新たに開発したAlu-EGFPレポーターはソーティング技術への応用のみならず、生体内にも導入することも可能であるため、将来、Aluが引き起こすゲノム不安定化を軽減する手法や、転移を人為的に制御する技術の開発にも貢献できるだろう。

研究成果の概要（英文）：Human Alu retrotransposon is a non-coding mobile genetic element and can mobilize through the genome using L1 reverse transcriptase; however, the mechanisms and regulators of this genome editing process are poorly understood. To apply the Alu retrotransposition reporter system to a wider range of cell lines for future research and to perform a genetic screening to identify its regulators, we developed a method to visualize Alu retrotransposition using EGFP, a fluorescent protein, and succeeded in measuring Alu retrotransposition by this fluorescent protein with FACS analysis. In addition to the lists already obtained for the L1 ORF2 complex by mass spectrometry, which may include potential Alu regulators, we are now ready to conduct a genetic screening using an Alu-EGFP reporter to search for its regulators.

研究分野：分子遺伝学、生化学

キーワード：Alu レトロトランスポゾン 転移 LINE-1 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

現生人類でもゲノム上を移動する DNA 配列であるレトロトランスポゾン、大きくわけて自律型と非自律型の 2 種類が存在する。前者は Long Interspersed Element-1 (LINE-1 または L1) とよばれる配列で、逆転写酵素 ORF2 をコードしており、これが転移を実行する触媒酵素となる。一方で非自律型レトロトランスポゾンの代表である Alu 配列は、翻訳途中のポリペプチド鎖を小胞体に輸送する Signal Recognition Particle (SRP) を構成する 7SL RNA から進化した non-coding 配列であり、転移するためには L1 の逆転写酵素を利用するしか方法がない。通常、L1 や Alu などのレトロトランスポゾンは転写抑制されているが、生殖細胞、初期発生や腫瘍細胞、あるいは種々のストレス刺激により転写が活性化され、変異や欠失、遺伝子破壊、染色体欠失や転座などゲノム不安定化を引き起こすが知られている。これまでは、エピジェネティック修飾のように、転移を未然に防ぐ宿主防御機構に焦点が当てられてきたが、ひとたび転写された Alu RNA および L1 の逆転写酵素と相互作用する宿主制御因子の役割は見逃されてきた。

これまでに L1 と Alu の転移制御メカニズムが異なるのではないかと推測されているが、これは決して突拍子もない仮説ではない。L1 は、RNA ポリメラーゼ II によって転写される翻訳型の mRNA であるが、Alu はリボソームやトランスファー RNA といった小分子非翻訳型 RNA の転写を行う RNA ポリメラーゼ III によって転写されるため、その RNA 代謝経路が異なることが予想される。Alu 転移を紐解く唯一の手がかりは L1 の逆転写酵素 ORF2 と結合することである。その転移プロセスおよび変化し続けるゲノムの本質の理解にむけて、申請者が L1 の研究で積み重ねた ORF2 の生化学的解析手法に加え、遺伝学的スクリーニングを加えることで、Alu の振る舞いを解明する新たな手がかりが得られると本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

L1 は自身の mRNA を自身がコードする逆転写酵素 ORF2 によって cDNA に変換し、ゲノム上を転移する。一方、上述したようにヒトゲノムの約 11% を占める Alu は non-coding 配列のため自身だけでは転移できないが、L1 の ORF2 を利用することで転移する、つまり L1 に寄生するレトロトランスポゾンである。新規の Alu 転移は、遺伝子破壊、染色体欠失や転座などゲノム不安定化を誘導し、様々な疾患原因になることも報告されているが、その転移プロセスはよく分かっていない。そこで本研究は、申請者が L1 転移機構の研究で確立した生化学的なアプローチと、CRISPR システムを用いた遺伝学的スクリーニングを組み合わせることによって、Alu の転移制御因子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

L1 は、自身の逆転写酵素 ORF2 によって転移する自律型レトロトランスポゾンだが、non-coding 配列の Alu は、この ORF2 を利用して転移する。しかし実際は、これらの配列は“宿主”である細胞内の様々な因子を利用することで転移・増幅する寄生因子である。L1 も Alu も ORF2 を用いる点では共通だが、宿主による Alu の制御機構は L1 と大きく異なると予想されている。そこで、Alu の転移プロセスを明らかにするために、A. ORF2 を利用した生化学的なアプローチと、B. CRISPR システムを利用したゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングによって、Alu 制御因子を同定する。

A. Alu-ORF2 複合体のプロテオミクス解析

Alu RNA と FLAG タグを付加した ORF2 を共発現するプラスミドを構築し、Alu が ORF2-FLAG 依存的に転移すること、および ORF2-FLAG が Alu RNA に結合することを確認した。そこで Alu RNA-ORF2-FLAG 複合体を標的細胞株から単離・精製し、HA 株に特有の複合体構成因子を質量分析によって同定する。

B. CRISPR ノックアウトライブラリーを用いたゲノムワイドな遺伝学的スクリーニング

Alu 転移頻度の変化を指標として、遺伝学的スクリーニングを実施する。CRISPR ライブラリーを用いて全遺伝子ノックアウト細胞群を作成し、さらに転移レポーターを用いて Alu が転移した細胞のみ選択する。しかし、Alu の転移をモニターするレポーターは、薬剤耐性遺伝子しか存在しないため、スクリーニングのスケールに供する Alu 転移細胞を薬剤選択からコロニー形成を経て回収するのは困難をとまなう。そこで FACS によるソーティング技術によって、短時間に効率よく Alu 転移細胞を回収する技術を開発する。その後、遺伝子ノックアウトライブラリーを導入することによって、Alu 転移細胞を大量に回収し、その細胞集団で濃縮または希釈されるガイド RNA 配列を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、転移頻度の変化につながる候補遺伝子を探索する。

4. 研究成果

上記で記述したように、Alu の転移をモニターするレポーターは、薬剤耐性遺伝子ただ 1 種類しか存在しない。このためコロニー形成能の低い細胞株や既に遺伝子改変により薬剤耐性となっている細胞株については Alu の転移を観察することができない。何よりスクリーニングの

ケールに供する Alu 転移細胞を薬剤選択からコロニー形成を経て回収するのは困難をともなう。そこで Alu の転移アッセイをより多くの細胞株または個体にも適用し、かつその制御因子を広範に探索するための遺伝学スクリーニングへと発展させるために、これを蛍光蛋白質 EGFP によって可視化する手法の開発に取り組んだ。新規に作成した Alu の転移可視化コンストラクトを細胞に導入したところ、既に報告されている薬剤耐性遺伝子で測定された Alu の転移頻度と、EGFP で可視化した場合で、ほぼ同等の転移頻度が観察された。さらに EGFP 陽性細胞を FACS ソーティングによって回収しゲノムを調べたところ、実際にこの Alu 転移レポーターがゲノム上に挿入されていることが確認された。この挿入パターンは従来 Alu が転移した場合の特徴を反映するものであった。すなわち薬剤耐性ではなく蛍光蛋白質によって Alu の転移を測定する実験系が新たに確立された。さらに SRP 構成因子をノックダウンした細胞を用いて Alu 転移頻度を測定したところ、この新規 Alu 転移アッセイ系を記述した論文を国際誌に投稿する準備を進めている。このように本研究の目標の一つである遺伝学的スクリーニングにむけた準備が整ってきたが、なお転移効率を改善する余地が残されている可能性も浮上してきた。また遺伝学的スクリーニングに用いる細胞株として Cas9 を恒常的に発現するクローン株を単離するとともに、L1 ORF2 蛋白質複合体の質量分析解析を一通り実施し、Alu 制御因子の候補を取得した。遺伝学的スクリーニングには到達していないものの、Alu 制御因子の同定にむけて着実に進展している。今後既に得られた質量分析による L1 ORF2 蛋白質複合体の解析結果に加え、改良した Alu-EGFP レポーターを用いてその制御因子を探索するためのスクリーニングに取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamamoto Io, Nakaoka Hidenori, Takikawa Masahiro, Tashiro Sanki, Kanoh Junko, Miyoshi Tomoichiro, Ishikawa Fuyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 Fission yeast Stn1 maintains stability of repetitive DNA at subtelomere and ribosomal DNA regions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10465 ~ 10476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab767	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 Luqman-Fatah Ahmad, Miyoshi Tomoichiro	4. 巻 98
2. 論文標題 Human LINE-1 retrotransposons: impacts on the genome and regulation by host factors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 121 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.22-00038	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 Hara Tomohiko, Nakaoka Hidenori, Miyoshi Tomoichiro, Ishikawa Fuyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 The CST complex facilitates cell survival under oxidative genotoxic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0289304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0289304	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 Mizumoto Ayaka, Yokoyama Yuta, Miyoshi Tomoichiro, Takikawa Masahiro, Ishikawa Fuyuki, Sadaie Mahito	4. 巻 28
2. 論文標題 <sc>DHX36</sc> maintains genomic integrity by unwinding G quadruplexes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 694 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13061	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 Luqman-Fatah Ahmad、Watanabe Yuzo、Uno Kazuko、Ishikawa Fuyuki、Moran John V.、Miyoshi Tomoichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 The interferon stimulated gene-encoded protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition and LINE-1 RNA-mediated type I interferon induction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35757-6	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 該当する

1. 著者名 Luqman-Fatah Ahmad、Watanabe Yuzo、Ishikawa Fuyuki、Moran John V.、Miyoshi Tomoichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 The interferon stimulated gene-encoded protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition and LINE-1 RNA-mediated type I interferon induction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.03.26.485892	査読の有無 無
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19件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Amano S., Onishi K., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 EGFPレポーターカセットを用いたヒトAluレトロトランスポソンの新規転移アッセイ系の構築
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西森奎、Abdul Fatah A.L.、渡邊祐三、石川冬木、三好知一郎
2. 発表標題 インターフェロン誘導遺伝子産物 HERC5 による LINE-1 ヒトレトロトランスポソンの転移抑制機構
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大原隆人、 足立真太郎、 渡邊祐三、 石川冬木、 三好知一郎
2. 発表標題 DNA Ligase1によるヒトLINE-1レトロトランスポソンの転移促進機構
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miyoshi T.
2. 発表標題 A network of interferon-stimulated genes inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 EMBL Symposium: The Mobile Genome: Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nishimori K., Abdul Fatah A.L., Watanabe Y., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 The interferon-stimulated gene product HERC5 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 EMBL Symposium: The Mobile Genome: Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Luqman-Fatah A., Watanabe Y., Uno K., Moran J.V., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 The interferon-stimulated gene protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 EMBL Symposium: The Mobile Genome: Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Adachi S., Watanabe Y., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 Human DNA ligase I facilitates LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishimori K., Abdul Fatah A.L., Watanabe Y., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 The interferon stimulated gene product HERC5 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato M., Watanabe Y., Ishikawa F. and Miyoshi T.
2. 発表標題 Nucleotide excision repair factors, XPC and Rad23b, regulate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 The 4th International Symposium of Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nishimori K., Abdul Fatah A.L., Watanabe Y., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 The interferon stimulated gene product HERC5 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 The 19th International Student Seminar in Kyoto University (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sugino K., Tang C-W., Watanabe Y., Abdul Fatah A.L., Makino T., Ishikawa F., Moran J.V. and Miyoshi T.
2. 発表標題 The mechanism of human LINE-1 retrotransposition facilitated by the mitochondrial protein SSBP1
3. 学会等名 The 19th International Student Seminar in Kyoto University (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三好 知一郎
2. 発表標題 宿主因子によるヒトLINE-1の制御メカニズム
3. 学会等名 第5回 転移因子研究会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好 知一郎
2. 発表標題 宿主因子による転移因子LINE-1の転移制御機構
3. 学会等名 第93回 日本遺伝学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好 知一郎
2. 発表標題 Multilayered host mechanisms that control human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abdul Fatah A.L., Watanabe Y., Ishikawa F., Moran J.V. and Miyoshi T.
2. 発表標題 The interferon-stimulated gene protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 Genetics Society of AustralAsia 2021 Online Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sugino K., Makino T., Watanabe Y., Ishikawa F., Moran J.V. and Miyoshi T.
2. 発表標題 Molecular interplay between mitochondrial and nuclear single-stranded DNA-binding proteins facilitate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 The Mobile DNA Conference: Evolution, Diversity, and Impact, FASEB Science Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abdul Fatah A.L., Watanabe Y., Ishikawa F., Moran J.V. and Miyoshi T.
2. 発表標題 Interferon-stimulated genes regulate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 The Mobile DNA Conference: Evolution, Diversity, and Impact, FASEB Science Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abdul Fatah A.L., Watanabe Y., Ishikawa F. and Miyoshi T.
2. 発表標題 The interferon-stimulated gene protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 EMBL Symposium: The Mobile Genome: Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato M., Watanabe Y., Ishikawa F., and Miyoshi T.
2. 発表標題 Nucleotide excision repair factors, XPC and RAD23B, regulate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
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		
米国	University of Michigan		