

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15054

研究課題名(和文) マウス初期胚における液性因子による転移因子制御機構

研究課題名(英文) Secretion-factor-dependent mechanisms regulating transposable elements in the early mouse embryo

研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA, TAKUYA)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90390682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類細胞の遺伝情報にはウイルス由来の転移因子群が紛れ込んでおり、これらの制御は個体の生存に必須である。本研究では、マウスの系を用いて、インターロイキンと呼ばれる液性因子のひとつであるIL17Dがその制御を行えることを発見した。さらに、IL17Dが作用する細胞膜受容体と下流シグナル伝達因子と標的遺伝子を同定し、胚を構成する細胞の一部が過剰な転移因子の活性化を起こしてしまった場合には、並行したアポトーシス経路が働くことで、細胞を除去し、胚の品質を一定に保つような経路が備わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transposable elements are dispersed throughout the mammalian genome. Appropriate regulation of these elements is indispensable for the survival of the embryos/fetuses. In this study, using the mouse system, I found that the application of the IL17, one of the interleukin family members, to the cells could repress their transcription. Furthermore, I identified an IL17D receptor responsible for the immobilization of the transposable elements and the downstream signaling pathways as well. In the absence of IL17D signaling pathways, apoptosis signals are concomitantly upregulated, thereby cells with low quality are removed for supporting the proper embryonic development.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：レトロトランスポゾン 転移因子 インターロイキン 全能性 多能性

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の初期胚においては、細胞に全能性/多能性を賦活するために、生殖細胞型に特化していたクロマチン修飾を大転換するいわゆるゲノムリプログラミングが起こる。受精直後、生殖細胞型に特化していたクロマチン修飾が大転換し、これに伴い、遺伝子サイレンシングが一時的に解除される。この際、ゲノムに紛れ込んでいるウイルス由来の転移因子も活性化するというリスクを負うが、そのリスクからゲノムを守るべき機構については全くと言って良い程不明である。レトロトランスポゾン様配列の活性化は、全能性の維持に重要なことが示唆されており、一方で、新たに転移現象を起こして、必須遺伝子中にペーストされた場合には細胞が致死するため、その制御は厳密である必要がある。本課題開始前、予備実験として、このリスクに対処しうる液性因子としてインターロイキン類(IL17D)を同定していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス初期胚発生におけるインターロイキン類がもたらすゲノムワイドな効果を明らかにすることで、全能性獲得に伴う転移因子の一時的活性化と再不活性化の機構を解明し、制御の自在化を目指すこととした。免疫関連遺伝子が、シグナル伝達と転写制御を介した細胞増殖制御と免疫反応に関与する以外にも、「ゲノム免疫」に寄与すると考え、新分野を開拓できると考えた。

### 3. 研究の方法

i) まず、IL17D をノックダウンすることで、トランスクリプトームを取得し、制御下の遺伝子及び転移性因子の情報を網羅することとした。

ii) i)の結果を基礎として、IL17D シグナルカスケードに位置する多数の分子候補についてノックダウン実験を行い、免疫組織化学とウェスタンブロットにより細胞の生存率と各種タンパクリン酸化状況をモニターした。加えて、クロマチン免疫沈降実験により、一次標的遺伝子を同定することで、IL17D シグナルがゲノムにまで到達するメカニズムの実態を調べた。

### 4. 研究成果

i) まず、胚盤胞期のトランスクリプトーム解析を行ったところ、IL17D の活性低下に伴って、レトロトランスポゾンの活性化、特にMERBL と IAPez ファミリーに属する RNA 断片が3倍以上上昇することが分かった。雌性発生胚にもみられる現象であり、IL17D による胚の正常なエピゲノム獲得がレトロトランスポゾン制御に重要であることが示唆され

た。

ii) 免疫組織化学の結果、IL17D ノックダウンにより細胞がアポトーシスすること、及び、リコンビナント IL17D 添加による回復を確認できた。アポトーシスに至る過程では、候補因子について、in vitro にて 10 種の shRNA によるノックダウンを行った。その結果、1) IL17D リコンビナントタンパク質培養液添加の効果を伝達するには IL17RD が必須であることを明らかにした。また、関与する細胞内シグナル伝達経路の詳細を解析し、2) IL17D によるアポトーシス抑制/細胞生存促進現象の発現は、NF-kappaB 経路を活性化すると同時に MAPK 経路を抑制することで達成されていることが分かった。この際の標的遺伝子には抗アポトーシスに機能する Xiap などが含まれていた。一方、転移因子の制御に機能する標的遺伝子の同定も進めた。マウス初期胚においては NF-kappaB 経路の活性化 (RelA/p65 の核への局在) は 2 細胞期に阻害されており、転移因子の活性化が認められるが、IL17D ノックダウンにより転移因子の活性化が過剰になってしまう。IL17D が RelA を介して標的とするクロマチン関連因子の発現を変化させることで、転移因子の適切な一時的活性化と再不活性化を担っている可能性を考え、ChIP-seq 解析による全標的遺伝子の網羅的取得を行った。その結果、3) RelA はヒストン脱アセチル化酵素、脱メチル化酵素遺伝子、及び、クロマチンリモデリング因子である CBX5 を標的に含むことが明らかになった。

以上より、全能性の獲得に適切な転移因子活性化レベルを保つには IL17D が必須であり、胚を構成する細胞の一部が過剰な転移因子の活性化を起こしてしまった場合には、並行したアポトーシス経路が働くことで、細胞を除去し、胚の品質を一定に保つような経路が備わっていることが考えられた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

\*: 研究代表者が責任著者

1. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. Orié Hikabe, Nobuhiko Hamazaki, Go Nagamatsu, Yayoi Obata, Yuji Hirao, Norio Hamada, So Shimamoto, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima, Mitinori Saitou, Katsuhiko Hayashi. Nature, 539: 299 (2016) (査読あり)

2. Manipulation of promoter-associated noncoding RNAs in mouse early embryos for

controlling sequence-specific epigenetic status. Nobuhiko Hamazaki, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura\*. *Methods in Molecular Biology*, 1543: 271 (2017) (査読あり)

3. Detection of bidirectional promoter-derived lncRNAs from small-scale samples using pre-amplification-free directional RNA-seq method. Nobuhiko Hamazaki, Kinichi Nakashima, Katsuhiko Hayashi, Takuya Imamura\*. *Methods in Molecular Biology*, 1605: 83 (2017) (査読あり)

4. Evolutionary acquisition of promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) repertoires diversifies species-dependent gene activation mechanisms in mammals. Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Takao Oishi, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura\*. *BMC Genomics*, 18:285 (2017) <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3662-1> (open access) (査読あり)

5. DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multilineage competence in neural stem/progenitor cells. Tsukasa Sanosaka#, Takuya Imamura#\*, Nobuhiko Hamazaki, MuhChyi Chai, Katsuhide Igarashi, Maky Ideta-Otsuka, Fumihito Miura, Takashi Ito, Nobuyuki Fujii, Kazuho Ikeo, Kinichi Nakashima. *Cell Reports*, 20:2992 (2017) [http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(17\)31228-7](http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(17)31228-7) (open access) (#equal contribution) (査読あり)

6. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration. Tomonori Kameda, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima. *Cell and Tissue Research*, 371:189 (2018) (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1. 小野田孝太、佐藤弘明、浜崎伸彦、中嶋秀行、東村博子、前多敬一郎、中島欽一、今村拓也 : マウス性的二型核内の細胞でみられるアンドロジェン依存的な DNA メチル化レベルの変化  
第 10 回日本エピジェネティクス研究会 2016 年

2. 藤本雄一、亀田朋典、小野田孝太、吉良潤一、中島欽一、今村拓也 : ヒト ES/iPS 細胞から神経幹細胞への誘導とその分化過程

におけるノンコーディング RNA (pancRNA) を介した特異的遺伝子活性化  
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

3. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : マウス海馬ニューロンは神経活動依存的に DNA メチロームを変動し、脱メチル化を介して遺伝子発現応答を高速化する  
第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会 2017 年

4. 今村拓也、山本直樹、阿形清和、中島欽一 : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells  
第 43 回内藤コンファレンス (国際学会) 2017 年

5. 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一 : Neuronal activity-dependent DNA methylation changes in the naive hippocampal neurons accelerate gene expression responses to the following stimuli  
The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (国際学会) 2017 年

6. 本田瑞季、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一 : Mechanism underlying developmental stage dependent changes in neural stem cells responsiveness to Bone Morphogenetic Proteins  
The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (国際学会) 2017 年

7. 今村拓也、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : DNA methylome analysis identifies transcription factor-based epigenomic signatures of multi-lineage competence in neural stem/progenitor cells  
The 72nd Fujihara Seminar Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (国際学会) 2017 年

8. 今村拓也、佐野坂司、浜崎伸彦、Chai Muh Chyi、五十嵐勝秀、大塚まき、三浦史仁、伊藤隆司、藤井信之、池尾一穂、中島欽一 : DNA methylomes identify transcription factor-based epigenomic signatures for timed acquisition of differentiation competence in neural stem/progenitor

cells towards neuronal and glia lineages  
4th World Congress of Reproductive Biology  
(国際学会) 2017年

9. 今村拓也 : ニューロンにおけるエピゲノム制御とその破綻  
第44回日本毒性学会学術大会(招待講演)  
2017年

10. Takuya IMAMURA : Regulation of non-coding RNA contributes to the complete cessation of cell proliferation of neuron-like cells  
France Japan Epigenetics Workshop 2017 (国際学会) 2017年

11. 今村拓也 : 長鎖 ncRNA によるほ乳類エピゲノム制御  
ConBio2017 2017年

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

研究代表者ホームページ  
<http://scb.wp.med.kyushu-u.ac.jp/imamura/>

ほ乳類神経幹細胞が変化するメカニズムを明らかに(九州大学プレスリリース)  
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/171>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 拓也 (IMAMURA, Takuya)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 90390682

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者  
なし ( )