

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03439

研究課題名（和文）小分子RNAによるトランスポゾン転写抑制機構の解析

研究課題名（英文）Transcriptional silencing of transposable elements by small RNAs

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） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを含む真核生物の生殖細胞では、トランスポゾンの転移と増殖を制御するため、配列情報をもつ小分子RNA（piRNA）とPiwiの複合体によりトランスポゾンの転写反応を抑制している。Piwi-piRNA複合体によりリクルートされたPanx-Nxf2複合体が転写抑制を引き起こすことがわかっているが、その詳細な分子機構はわかっていない。本研究では、Piwi-piRNA複合体によってトランスポゾンの新生RNA上へリクルートされたPanx-Nxf2複合体は、SUMO修飾を受けることでトランスポゾンの転写を抑制していることが明らかとし、SUMO分子がトランスポゾン制御の中核をなす可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凝縮したクロマチン構造（ヘテロクロマチン）によって抑制されているというトランスポゾン制御の従来モデルに対し、ヘテロクロマチン非依存的な抑制機構の解明は進んでいない。本研究では、翻訳後修飾の一つであるSUMO修飾が、トランスポゾン転写反応抑制機構の要であることを示唆している。トランスポゾンの脱抑制は生殖機能、つまり次世代継承の破綻を意味する。本研究で明らかとなった生殖組織におけるトランスポゾン制御のメカニズムは、生殖医療の発展に向けた基盤情報となるだろう。

研究成果の概要（英文）：In the germline of eukaryotes, including humans, small RNA molecules called piRNA, and the Piwi complex, suppress the transcription of transposable elements (TEs) to control their transposition. The Piwi-piRNA complex recruits the Panx-Nxf2 complex, which causes transcriptional repression, but the detailed molecular mechanism remains elusive. Here, we found that the Panx-Nxf2 complex recruited onto a nascent mRNA of TEs by the Piwi-piRNA complex inhibits transcription of TEs by undergoing SUMO modification, indicating that SUMO molecules may play a central role in TE control.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：トランスポゾン 生殖細胞 転写共役抑制 小分子RNA SUMO

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、転移によりゲノム配列と構造を変えることでゲノム進化の原動力となってきた。一方、その無秩序な増殖はゲノム恒常性維持の脅威となる。そこで次世代に遺伝情報を安定的に継承するため、私たちの細胞はトランスポゾンの増殖を抑制する仕組みを備えている。近年、アルゴノートである PIWI タンパク質と PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる 20~30 塩基長の非コード RNA の複合体が、生殖細胞におけるトランスポゾン抑制の中核をなすことが明らかとなった (reviewed in Iwasaki YW *et al.*, *Annu Rev Biochem* 2015)。PIWI 遺伝子に変異を持つショウジョウバエは、卵巣の発生異常により不妊となる。ショウジョウバエ PIWI タンパク質のひとつである Piwi と piRNA の複合体は、細胞核内に移行し、piRNA の配列情報と相補的なトランスポゾンの新生 RNA 鎖に結合する。図 1A にあるように、Piwi-piRNA 複合体は認識したトランスポゾンの周辺にメチル化ヒストン H3 (H3K9me3) を特徴とする高度に凝集したヘテロクロマチンを形成することで転写反応を抑制する (Sienski G *et al.*, *Cell* 2012)。大規模な遺伝学的スクリーニングが行われた結果、トランスポゾン抑制に関わる因子群が多数同定されている (Czech B *et al.*, *Molecular Cell* 2013, Muerdter F *et al.*, *Molecular Cell* 2013, Handler D *et al.*, *Molecular Cell* 2013)。各スクリーニングで上位にランクされた Panx は、Piwi-piRNA 複合体と相互作用し、ヘテロクロマチン形成に関与することが示された。また、Panx によるヘテロクロマチン化にはヒストンメチル基転移酵素 Eggless/SETDB1 が必要であることが遺伝学的に証明された (Yu *et al.*, *Science* 2015, Sienski G *et al.*, *Genes Dev* 2015)。Eggless はコファクター Wde との相互作用により核内に留まり、Ubc2 によるモノユビキチン化で制御される (Osumi K and Murano K *et al.*, *EMBO Rep* 2019)。また、H3K9me3 に加えてリンカーヒストン H1 もヘテロクロマチン化、つまりクロマチンの凝集に重要である (Iwasaki YW and Murano K *et al.*, *Molecular Cell* 2016, Murano K *et al.*, *Methods in Mol Biol* 2018)。Panx は Piwi-piRNA と Eggless を仲介する因子と考えられたため、我々は Panx に対するモノクローナル抗体を独自に作製した。その抗体を用いて、Panx 複合体を精製し、質量分析によ

って Nxf2 (Nuclear RNA export factor 2) を同定した。Nxf2 の機能を解析するため、Piwi-piRNA 経路を保持する培養細胞 OSC に人工係留レポーターシステムを構築した (図 1B)。この実験系を用いて lambdaN-Nxf2 を新生 mRNA へ係留したところ、当初の予想に反して、ヘテロクロマチンを形成する前にトランスポゾンの転写反応を抑制することを見出した (Murano K *et al.*, *EMBO J* 2019)。

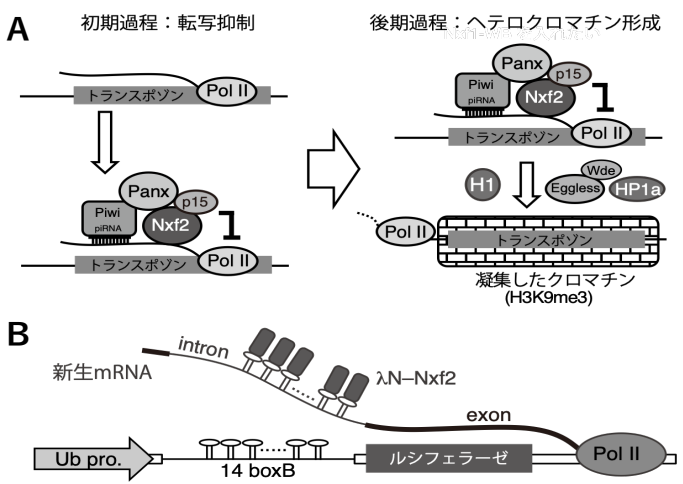


図1. Piwi-piRNA経路によるトランスポゾンの二段階抑制モデル
A. トランスポゾンの二段階抑制モデル。Panx-Nxf2-p15複合体はPiwi-piRNAによって標的トランスポゾンに係留され、Pol IIによる転写反応を抑制する。その後H3K9メチル化酵素EgglessやHP1a, H1の作用によってヘテロクロマチンが形成され、抑制状態が維持される。
B. 新生鎖RNAにタンパク質を係留するシステム。λN融合タンパク質はboxB RNAに結合する。

2. 研究の目的

Panx-Nxf2 複合体の解析から、Piwi-piRNA 経路によるトランスポゾンの抑制機構は少なくとも二段階からなることが明らかとなった (図 1A)。初期過程では Piwi-piRNA 複合体によりリクルートされた Panx-Nxf2 複合体が転写抑制を引き起こし、その後、トランスポゾン周辺に高度に凝集したヘテロクロマチンが形成されることで抑制状態を維持していると考えられる (図 1A)。しかし、初期過程の Panx-Nxf2 複合体による転写抑制機構は分かっていない。また、後期過程で Egless-Wde をはじめとするヘテロクロマチン構成因子をトランスポゾン周辺へリクルートするメカニズムも不明である。本研究では、Panx-Nxf2 複合体によるトランスポゾンの転写反応抑制機構の解明を通して、Piwi-piRNA 経路による生殖ゲノム恒常性維持の全体像を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究成果により、Piwi-piRNA 経路によるトランスポゾンの転写抑制は、少なくとも二段階に分けられることが分かった。特に初期段階での転写抑制機構に焦点をあて、Piwi-piRNA 複合体によって新生 mRNA 上へリクルートされた Panx-Nxf2 複合体が標的とする因子の探索を目指した。ショウジョウバエ卵巣由来の体細胞である培養細胞 Ovarian Somatic Cell (OSC) にドキシサイクリンで lambdaN-Nxf2 と lambdaN-Panx を発現誘導可能な細胞株を構築した。誘導発現された lambdaN-Nxf2/Panx は、boxB RNA 配列をイントロンに含むレポーター遺伝子の新生 mRNA 上へ係留され、転写反応を阻害した (Takeuchi C and Murano K et al., *Methods in Mol Biol* 2022)。本実験系を用いて新生 mRNA 上における Nxf2-Panx 複合体の相互作用因子を免疫沈降法と質量分析法により探索した。

4. 研究成果

Piwi-piRNA 経路によるトランスポゾンの抑制機構は少なくとも二段階からなり、Panx-Nxf2 複合体による初期段階の転写抑制反応は、ヘテロクロマチン構成因子であるリンカーヒストン H1 や HP1a に非依存的であることがわかってきている。そこで、まず初めに培養細胞 OSC に構築し

た lambdaN-Nxf2/Panx の誘導発現人工係留レポーターシステムの H1 や HP1a に対する依存性を評価した。siRNA を用いて H1 や HP1a を発現抑制し、ドキシサイクリンの添加により lambdaN-Nxf2/Panx の発現を誘導したところ、コントロールと遜色なくレポーター遺伝子が抑制された (図 2)。構築した誘導発現人工係留レポーターシステムは期待通りに機能することを確認した。誘導発現させた lambdaN-Nxf2/Panx は HA タグを保持している。抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、質量分析法により相互作用因子を探索した。その結果、これまで報告されている Nxt1 や ctp の他に Small ubiquitin-like modifiers (SUMO) タンパク質 (10 kDa) が検出された (図 3A)。SUMO

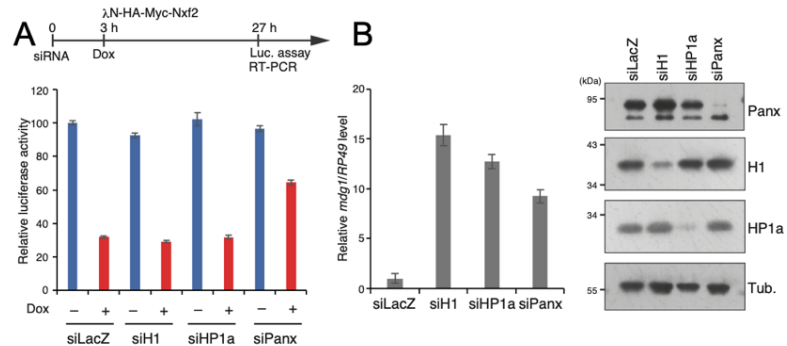


図2. H1とHP1a非依存的なレポーター遺伝子の転写抑制

A. ドキシサイクリン(Dox)添加によって発現誘導されたlambdaN-HA-Myc-Nxf2は、ルシフェラーゼ遺伝子の転写反応を抑制した。H1とHP1aの発現抑制にも関わらず、転写反応は抑制される。
B. 一方、レトロトランスポゾンのひとつmdg1は、H1とHP1aの発現抑制によって脱抑制される。

タンパク質は、タンパク質分解に関与するユビキチンタンパク質に似た修飾分子であり、基質タンパク質に共有結合することによって幅広い生物学的プロセスに関与することが知られている。
lambdaN-Nxf2 の係留による

ルシフェラーゼ遺伝子の抑制効果は SUMO ノックダウンにより解除された(図 3B)。SUMO 修飾の E3 酵素である Su(var)2-10 が Piwi-piRNA 経路に関わることが報告されている(Ninova M et al., *Mol Cell* 2020)。Su(var)2-10 を発現抑制したところ、Nxf2 の係留によるレポーター遺伝子のサイレンシング効果が打ち消された。SUMO 修飾予測プログラム GPS-SUMO を用いると、Panx の 5 つのリジン残基が SUMO 修飾を受けることが予測された。また、Brennecke らの研究グループから Panx が SUMO 修飾を受けることが報告された(Andreev VI et al., *Nat Str Mol Biol* 2022)。そこで、5ヶ所のリジン残基をアルギニン残基に置換した lambdaN-Panx5KR 変異体を作製したところ、レポーター遺伝子の抑制活性を失っていた。さらに詳細な解析から、Panx の 6, 10, 86, 88 番目の 4 つのリジン残基が Panx-Nxf2 複合体による初期段階の転写抑制反応に重要であることが明らかとなった。以上の結果から、Piwi-piRNA 複合体によってレトロトランスポゾン上へリクルートされた Panx-Nxf2 複合体は、Su(var)2-10 により SUMO 修飾を受けることでトランスポゾンの転写を抑制していることが示唆された。また、RNA-seq 法を用いた網羅的解析から、SUMO の発現抑制で脱抑制されるトランスポゾンは広範囲におよび、Piwi-piRNA 経路が標的とするトランスポゾンだけではないことがわかってきた。すなわち、よりグローバルなトランスポゾン抑制機構として SUMO 修飾が機能することを示唆している。

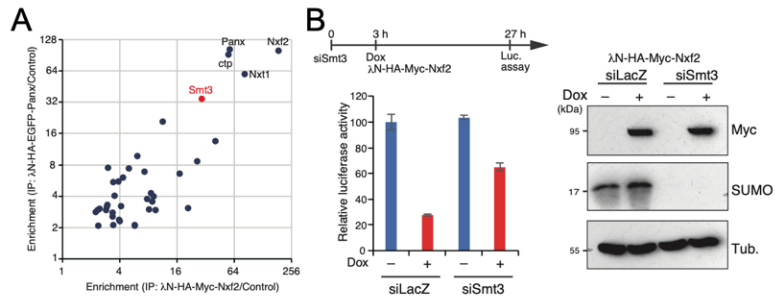


図3. Panx-Nxf2複合体による転写抑制反応にSUMOタンパク質が必須
A. ドキシサイクリン(Dox)添加によって発現誘導されたlambdaN-HA-Myc-Nxf2とlambdaN-HA-EGFP-Panxを免疫沈降法により精製し、質量分析をしたところSUMOタンパク質を同定した。
B. SUMOタンパク質の発現抑制は、転写反応抑制反応を阻害した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 -
1. 著者名 Murano K, Guo Y, Siomi H	4. 巻 49
2. 論文標題 The emergence of SARS-CoV2 variants threatens to decrease the efficacy of neutralizing antibodies and vaccines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Society Transactions	6. 最初と最後の頁 2879-2890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BST20210859	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Takeuchi C, Murano K, Ishikawa M, Okano H, Iwasaki YW	4. 巻 2509
2. 論文標題 Generation of stable Drosophila ovarian somatic cell lines using piggyBac system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 143-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2380-0_9	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Mise-Omata S, Ikeda M, Takeshita M, Uwamino Y, Wakui M, Arai T, Yoshifuji A, Murano K, Siomi H, Nakagawara K, Ohyagi M, Ando M, Hasegawa N, Saya H, Murata M, Fukunaga K, Namkoong H, Lu X, Yamasaki S, Yoshimura A	4. 巻 209
2. 論文標題 Memory B cells and memory T cells induced by SARS-CoV-2 booster vaccination or infection show different dynamics and responsiveness to the Omicron variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200525	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Li TD, Murano K, Kitano T, Guo Y, Negishi L, Siomi H	4. 巻 8
2. 論文標題 TDP-43 safeguards the embryo genome from L1 retrotransposition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabq3806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abq3806	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sakashita A, Kitano T, Ishizu H, Guo Y, Masuda H, Ariura M, Murano K, Siomi H	4. 巻 55
2. 論文標題 Transcription of MERVL retrotransposons is required for preimplantation embryo development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 484-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-023-01324-y	査読の有無 有
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 5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 Li TD, Murano K, Kitano T, Guo Y, Negishi L, Siomi H
2 . 発表標題 TDP-43 safeguards the embryo genome from L1 retrotransposition
3 . 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Guo Y, Kitano T, Murano K, Li TD, Sakashita A, Ishizu H, Sato M, Siomi H
2 . 発表標題 Obox4 secures zygotic genome activation upon loss of Dux
3 . 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Li TD, Guo Y, Murano K, Siomi H
2 . 発表標題 TDP-43 safeguards embryo genome from L1 retrotransposition
3 . 学会等名 The 27th Annual meeting of the RNA society (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Guo Y, Kitano T, Murano K, Li TD, Sakashita A, Ishizu H, Sato M, Siomi H
2 . 発表標題 Obox4 secures zygotic genome activation upon loss of Dux
3 . 学会等名 EMBO workshop (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1. 発表者名 Kitano T, Sakashita A, Ishizu H, Guo Y, Masuda H, Ariura M, Murano K, Siomi H
2. 発表標題 Transcription of murine endogenous retrovirus MERVL is required for progression of development in early preimplantation embryos
3. 学会等名 EMBO workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村野健作
2. 発表標題 TDP-43 safeguards embryo genome from L1 retrotransposition
3. 学会等名 新学術領域全能性プログラム 第18回 論文徹底解説セミナー
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 真栄城正寿, 渡慶次学, 岡田悠斗, 村野健作	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-025776	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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			
オーストリア	Medical Univ. of Vienna			
インド	Multidisciplinary Center			
中国	IgGENE社, Hong Kong			