

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02379

研究課題名(和文) ショウジョウバエpiRNAによるクロマチン制御の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for piRNA-mediated chromatin regulation in Drosophila

研究代表者

齋藤 都暁 (Saito, Kuniaki)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・教授

研究者番号：30423396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：主要なトランスポソンの1種であるレトロトランスポソンはゲノム内で増殖し得る遺伝因子であり、生物進化の過程でゲノムサイズや多様性の増大に寄与してきた。その一方で、レトロトランスポソンの無秩序増殖は宿主細胞や個体にとって脅威となるため、ヘテロクロマチン化やRNA干渉といった機構を生物は獲得し、抑制状態を維持している。ヘテロクロマチン化には抑制性ヒストンマークなどが重要な役割を果たすが、その詳細な分子機構は不明である。本研究では、CG14438と呼ばれる新規レトロトランスポソン抑制因子を同定し、モデル動物ショウジョウバエのレトロトランスポソン抑制機構に迫った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は唯一次世代に伝えられる細胞であり、その安定的な次世代継承メカニズムの解明は学術的に意義があるとともに生殖医療などの分野に波及する可能性が高い。本研究はショウジョウバエをモデル動物として、生殖細胞の安定的な次世代継承に必要な新しい遺伝子の同定と機能解明が行われており、その意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Retrotransposons, a major class of transposable elements (TEs), are genetic elements that can move and amplify themselves within a genome. Retrotransposons contribute to increasing the content and diversity of genomes, while their uncontrolled spread can cause genomic instability that is deleterious to the host cell. To maintain genome integrity, control mechanisms have evolved including RNA interference and heterochromatinization. In the latter mechanism, repressive histone modifications and heterochromatin-associated proteins, such as heterochromatin protein 1a (HP1a) play critical roles in the transcriptional silencing of TEs. However, the mechanism by which numerous TEs are specifically recognized and silenced and the factors involved remain obscure. To explore the mechanisms of TE silencing, I focused on the uncharacterized candidate gene 14438 (CG14438), which was identified by RNAi-screening to be involved in TE silencing in the *D. melanogaster* ovary.

研究分野：分子生物学

キーワード：レトロトランスポソン ショウジョウバエ ヘテロクロマチン 生殖 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトの成果から、真核生物ゲノムの膨大な領域（ヒトでは45%）がトランスポゾンもしくはレトロトランスポゾンに占められることが分かっている。レトロトランスポゾンはゲノム内を転移する能力を持つ寄生性 DNA 因子であるが、これはゲノムから排除されず、世代を越えて保持される。しかし、レトロトランスポゾンの転移は、生物の次世代継承にとって脅威となるため、その発現は抑制されている。レトロトランスポゾンは多いもので数十万コピー存在し、その配列は塩基置換によって多様なバリエーションがある。従って、レトロトランスポゾンの発現を抑制するには、膨大な種類を認識することが可能な分子システムの存在が考えられる。2006年、私を含む複数の研究グループが、Piwi タンパク質群と結合する piRNA と名付けた約 25 塩基長の小分子 RNA 群を発見した (Saito et al. *Genes Dev* 2006)。次世代型シーケンサーを用いた解析から、piRNA はレトロトランスポゾンの転写産物に由来し、膨大な種類数（現在報告されているもので数 10 万種類以上）が同定された。また、配列をゲノムにマッピングした結果、piRNA が大部分のレトロトランスポゾン領域をカバーすることが分かった。すなわち、piRNA は抑制を受ける全レトロトランスポゾンの断片化された配列情報である、と言える。Piwi 遺伝子群の変異体は、レトロトランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞発生異常が起こり不稔となる。piRNA の生合成変異ハエでは、各種レトロトランスポゾンの脱抑制が起こる。以上の結果は、Piwi タンパク質は piRNA をガイド分子としてレトロトランスポゾンを認識し、その発現を抑制していることを示している。このように Piwi-piRNA 複合体が形成される機構、さらにその生物学的重要性は明らかである一方、如何にしてレトロトランスポゾンの発現抑制が達せられるか、その分子機構は不明な点が多い。これまで Piwi-piRNA 複合体によるレトロトランスポゾン抑制機構には、転写レベルの抑制機構が機能することが明らかになっている一方で、様々な補助因子が必要であることが示唆されており、未だその全体像は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究はショウジョウバエをモデル動物とし、レトロトランスポゾン抑制機構の全貌を明らかにすることを目的とし、(1)新規レトロトランスポゾン抑制因子の同定、(2)同定した因子の生化学的役割の解明、(3)既知のレトロトランスポゾン抑制機構との関連性と相違性の解明、(4)新しいレトロトランスポゾン抑制機構の提唱、を目指した。

3. 研究の方法

piRNA によるレトロトランスポゾン抑制機構を解析可能な卵巣性体細胞株 OSC (Ovarian Somatic Cell line) を活用し、新規レトロトランスポゾン抑制因子の同定を試みた。OSC では、RNAi 法による遺伝子ノックダウンや過剰発現系が確立されているため、これを主な研究材料として活用した。

4. 研究成果

(1)新規レトロトランスポゾン抑制因子の同定

培養細胞 OSC では siRNA を用いた簡便な遺伝子ノックダウン法が確立されている。そこで、siRNA を用いたレトロトランスポゾン抑制因子の探索を行ったところ、CG14438 と呼ばれる遺伝子がレトロトランスポゾンの抑制に必須であることを見出した。CG14438 に対する siRNA を 3 種設計し、そのそれぞれを OSC に導入し、48 時間後の細胞を回収した。細胞から全 RNA を抽出し、逆転写反応と定量的 PCR (RT-qPCR) を行った。その結果、いずれの siRNA 導入細胞でもレトロトランスポゾンの 1 つである *mdg1* の発現が数十倍まで上昇することを発見した (図 1)。レトロトランスポゾンの CG14438 遺伝子は 3313 アミノ酸残基からなる巨大タンパク質で、10 以上の Zn finger モチーフを有する。ノックダウンした結果、piRNA 生合成には関与しないこと、HP1a や Piwi などのタンパク質量に変動が認められないことを見出した。したがって、CG14438 は少なくとも piRNA 生合成以外の機能を持つことが推定された。さらに CG14438 の分子機能に迫るため、cDNA を取得し、過剰発現を試みた。しかし、いくつかのベクター系で発現を試みたものの、リコンビナントタンパク質の発現は実現できなかった。そこで、内在性のタンパク質を材料に機能解明を進めるため、マウスモノクローナル抗体の作製を行なった。その結果、Western Blotting による内在性タンパク質の検出が可能で高品質の抗体を得ることに成功した。次にこの抗体を用いて、RNAi によるノックダウンの効果を検証した。その結果、予測通り CG14438 に対する siRNA 導入細胞では CG14438 に相当するバンドが消失していた。すなわち、CG14438 遺伝子は OSC におけるレトロトランスポゾン抑制において必須であることが明らかとなった。

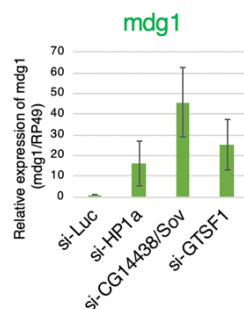


図 1. siRNA 導入した OSC におけるレトロトランスポゾン mRNA の定量解析データ

CG14438 に関する研究を実施する途上で、海外の研究グループがショウジョウバエ個体を用いた解析によって CG14438 遺伝子がレトロトランスポゾンの抑制に必須であることを論文報告した (Jankovics et al., 2018, *Development* 145 (23): dev170639)。この論文において、CG14438 遺伝子は 1995 年に見出されていた Small ovary (Sov) 遺伝子と同一であることが報告された。

しかし、この論文では、Sov がレトロトランスポソンの抑制に必須であるものの、その分子機構は明らかとなっていなかった。そのため、CG14438/Sov に関する研究を継続し分子機構に迫ることとした。

(2) 同定した因子の生化学的役割の解明

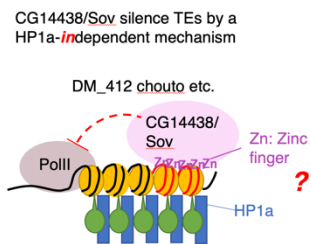
Sov は 3313 アミノ酸残基からなる巨大タンパク質なため、それを認識する抗体は得られていなかった。抗体は生化学的解析を行う上で有効なツールであることから、Sov に対するマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、Western Blotting による検出や免疫沈降解析が可能でモノクローナル抗体の取得に成功した。本抗体を用いて、Sov 相互作用タンパク質の同定を試みた結果、HP1a と呼ばれるヘテロクロマチン結合因子と共にいくつかの相互作用因子をこれまで発見した。一方で、HP1a に対する抗体を用いて免疫沈降した結果、Sov を見出すことに成功した。すなわち、Sov は HP1a と OSC 細胞内で相互作用することを確認できた。

(3) 既知のレトロトランスポソンの抑制機構との関連性と相違性の解明

Sov が HP1a と相互作用することが明らかとなったことから、両者は同一経路上の因子と期待された。そこで、Sov と HP1a それぞれをノックダウンした細胞においてレトロトランスポソンの発現がどのように変化するかを mRNA-seq 解析によって検討した (図 2)。その結果、Sov ノックダウンで発現が上昇するレトロトランスポソンは HP1a ノックダウンによっても上昇することが明らかとなった。すなわち、Sov と HP1a は同一経路上の因子であることが示唆された。しかし、さらに詳細な解析を行った結果、Sov と HP1a ノックダウンで挙動が一致しないトランスポソン種が存在することを見出した (図 2)。また、HP1a よりも Sov の方が、より広範なレトロトランスポソン種を抑制し得る可能性が示唆された。そこで mRNA-seq 解析結果をサポートするため、RT-qPCR によって各トランスポソンの発現量を比較検討した結果、mRNA-seq 解析同様に、いくつかのレトロトランスポソンの発現抑制は HP1a に依存しないもの Sov には依存することが明らかとなった。すなわち、HP1a と Sov はタンパク質間相互作用するものの、Sov については HP1a 非依存的に抑制するレトロトランスポソン種が存在することが明らかとなった。Sov は Zn-finger ドメインを有することから、HP1a とは独立に、直接いくつかのレトロトランスポソン種に結合し、その発現を抑制する可能性が示唆された (図 3)。今後はこの機能モデルを実証するため、作製した抗 Sov 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行うとともに、その HP1a 依存性を検証していく予定である。

	RNAi	
	Sov	HP1a
QUASIMODO_I Gypsy Drosophila	101.6021402	40.10195984
DM412_I Gypsy Drosophila	55.23861014	1.488861838
JOCKEY2 Jockey Drosophila	47.42121485	1.427363566
DM412_LTR Gypsy Drosophila	46.19332108	1.285539216
HELENA_RT Jockey Drosophila	44.0952381	48.65079365
Transib5 Transib Drosophila	33.53333333	26.1030303
GYP5Y_I Gypsy Drosophila	33.5251277	4.750995628
ZAM_I Gypsy Drosophila	24.12892828	7.706285254
Chouto_I Gypsy Drosophila	23.78787878	3.411255411
GYP5Y7_I Gypsy Drosophila	22.13131313	12.19191919
STALKER4_I Gypsy Drosophila	17.49818709	8.645153493
GYP5Y3_I Gypsy Drosophila	17.3271028	10.62616822
GYP5Y11_I Gypsy Drosophila	17.24031008	3.542635659
TABOR_I Gypsy Drosophila	17.15940821	3.843509064
FROGGER_I Copia Drosophila	16.4073285	18.24968044
DM297_I Gypsy Drosophila	15.87077479	7.301404924
G_DM Jockey Drosophila	15.61052632	3.757894737
GYP5Y5_I Gypsy Drosophila	14.19241983	4.623906706
ACCORD_I LTR	13.76830435	11.20380435
DOC5_DM Jockey Drosophila	13.64650284	3.258979206
QUASIMODO_LTR Gypsy Drosophila	13.00238009	2.959492628
INVADER2_LTR Gypsy Drosophila	11.53357866	2.819227231
ACCORD_LTR Gypsy Drosophila	10.45045045	8.93018018
DMRT1A R1 Drosophila	10.40643753	8.959629023
STALKER2_I Gypsy Drosophila	10.33110042	4.205919674
TIRANT_I Gypsy Drosophila	10.12790698	14.37209302
ZAM_LTR Gypsy Drosophila	9.660191956	1.794675503
BS Jockey Drosophila	8.848699764	1.611111111
MICROPIA_I LTR	7.715254237	5.498305085
GYP5Y_LTR Gypsy Drosophila	7.60963572	1.414137354

図 2. siRNA 導入した OSC におけるレトロトランスポソン mRNA-seq データの一部



Sov specifically binds to these TEs through the Zn-finger motif without the help of HP1a.

図 3. HP1a と Sov の機能モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるレトロトランスポソンの抑制とゲノム可塑性
3. 学会等名 日本遺伝学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける新規トランスポソン制御因子の同定と機能解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪谷紗来、三好啓太、齋藤都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエのトランスポソン抑制因子の同定と機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪谷紗来、三好啓太、齋藤都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエsmall ovary (sov)によるトランスポソン抑制機構
3. 学会等名 日本遺伝学会春季分科会
4. 発表年 2019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
---------	---------