

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02421

研究課題名(和文)小分子RNAによるクロマチン制御を介した生殖ゲノム維持機構の全体像

研究課題名(英文)Germline genome integrity maintained by small RNA-mediated chromatin regulation

研究代表者

岩崎 由香 (IWASAKI, Yuka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：80612647

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)：PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる小分子非コードRNAは、PIWIタンパク質群と複合体を形成してトランスポゾン配列を選択的に抑制することで、生殖組織の正常な発生を担保する。PIWI遺伝子欠損個体におけるトランスポゾン抑制能の消失は長期的には確かに転移の蓄積によるゲノムの不安定化を引き起こすと考えられるものの、ではなぜ、短期的にも培養細胞の死滅や不妊という重大な表現型をもたらすのだろうか？本研究では、培養細胞並びに個体を用いた実験により、Piwi-piRNAの機能不全が引き起こすエピゲノム変化を明らかにし、これが不妊の表現型に繋がる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Piwi-piRNA複合体はトランスポゾンの発現を抑制する際にダイナミックなクロマチン高次構造変化を伴うことを明らかにした。このことから、PIWI-piRNAによるトランスポゾンの転移抑制が不妊を回避するために必要であろうという従来のモデルに対し、PIWI-piRNA複合体が誘導するクロマチン構造がトランスポゾンの抑制と不妊の回避の両方に必須の役割を果たしている可能性を示唆することができた。これは将来的に不妊症が引き起こされる機構の科学的説明などにつながる知見であると考えている。

研究成果の概要(英文)：PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are germline-specific small RNAs that form effector complexes with PIWI proteins to preserve genomic integrity by repressing transposable elements. Using both cultured cell line system and Drosophila mutants, we showed that Piwi-piRNA complexes promote epigenetic and chromatin architectural changes, leading to the sterility phenotype.

研究分野：ゲノム生物学、RNA生物学、分子生物学

キーワード：転写制御 エピゲノム制御 ゲノム高次構造 非コードRNA RNAサイレンシング 小分子RNA 生殖組織 不妊

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノムはトランスポゾンの無秩序増殖の脅威から自己防衛しつつ、生存に必要な遺伝子群の発現を確保している。近年、この自己防衛に PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる 20-30 塩基長の小分子非コード RNA を中心とした RNA サイレンシングが主要な役割を果たすことが示唆された [review in Iwasaki et al. *Annu Rev Biochem* (2015)]。piRNA は主にトランスポゾンに由来し、PIWI タンパク質群と複合体を形成してトランスポゾン配列を選択的に抑制することで、生殖組織の正常な発生を担保する [Vagin et al. *Science* (2006)]。一方で、ショウジョウバエ *PIWI* 遺伝子や piRNA 生合成関連遺伝子の変異個体では、生殖幹細胞発生異常が起こり、不妊となる [Lin et al. *Development* (1997)]。PIWI 遺伝子欠損個体におけるトランスポゾン抑制能の消失は長期的には確かにゲノムの維持と伝達を阻害すると考えられるものの、ではなぜ、短期的にも生殖幹細胞発生異常や不妊という重大な表現型をもたらすのだろうか？

ショウジョウバエ PIWI タンパク質の一種である Piwi と piRNA の複合体は核内で標的トランスポゾンの新生 RNA に結合し、標的トランスポゾンの転写をクロマチンの修飾を介して制御することが知られている [Sienski et al. *Cell* (2012); Ohtani et al. *Genes Dev* (2013)]。また、これまでに、Piwi-piRNA による転写制御の実態は、リンカーヒストン H1 等複数の因子の誘導を伴うクロマチン構造の変動によるものであることを明らかにした [Iwasaki et al. *Mol Cell* (2016)]。これらのことから、piRNA のヘテロクロマチン形成因子としての機能が、PIWI 遺伝子欠損個体におけるトランスポゾン抑制能の消失と不妊表現型を統一的に説明する分子メカニズムである可能性について着想した。

2. 研究の目的

本研究では、piRNA が誘導するヘテロクロマチンの特徴とそれらの形成・維持機構の解明を通して、PIWI-piRNA による生殖ゲノム維持機構の全体像を解明する。研究代表者のこれまでの研究成果および予備検討データから、Piwi-piRNA 複合体はトランスポゾンの発現を抑制する際にダイナミックなクロマチン高次構造変化を伴うことが示唆されている。このことから、PIWI-piRNA によるトランスポゾンの転移抑制が不妊を回避するために必要であろうという従来のモデルに対し、PIWI-piRNA 複合体が誘導するクロマチン構造こそがトランスポゾンの抑制と不妊の回避の両方をもたらしているという新たなモデルを検討する。

これまで、発生制御はヒストン修飾等のエピゲノムやトランスクリプトームの変化から議論されてきたが、上記の *PIWI* の欠損が引き起こす不妊など、これらの解析から説明出来ない表現型もある。本研究では、クロマチン高次構造という新たな視点を取り入れ、エピゲノム・トランスクリプトーム変化と併せて解析することにより、ゲノムに起こる変化の階層性や表現型を説明する上で鍵となる制御を理解する。加えて、本研究結果から、複数の新規 Piwi-piRNA 機能関連因子の同定を含め、Piwi-piRNA によるサイレンシング機構の根本的な解明が期待される。また、近年、長鎖非コード RNA がゲノムの三次構造を規定する例が報告されているが [Giorgetti et al. *Nature* (2016) 等]、小分子 RNA によるクロマチン高次構造制御については知見が乏しい。本研究結果から、小分子非コード RNA によるゲノム高次構造制御とその分子機構を明らかにしたい。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞 (Ovarian Somatic Cell; OSC) は、Piwi-piRNA によるトランスポゾンの発現抑制機構を観察し、容易に生化学的解析を行うことができる培養細胞株である [Niki et al. *PNAS* (2006); Saito et al. *Nature* (2009)]。本研究では、OSC を用いて独自に開発した実験系を駆使することで、Piwi-piRNA の機能メカニズムを明らかにした。さらに OSC を用いて得られた結果をショウジョウバエ個体を用いた系で検証することで、同定された分子メカニズムの表現型への寄与を解析した。

(1) piRNA 生合成因子の抗体作成、並びにそれを用いた免疫沈降と質量分析により、新規関連因子を同定し、機能解析を行った。まず、質量分析から得られた候補因子が piRNA 標的トランスポゾン抑制に関与するかを、ノックダウン実験と定量的 PCR 法により解析した。さらに、候補因子に対する抗体を作成し、免疫沈降実験、ChIP 実験、CLIP 実験等を行い、相互作用因子、相互作用様式、相互作用 DNA/RNA 領域の同定などを進めた。候補因子の作用機序を明らかにした後に個体を用いた検証実験を行い、不妊の表現型の確認と同定された機能メカニズムの不妊への寄与を明らかにした。

(2) クロマチンの三次構造を網羅的に計測できる手法として Hi-C 解析 [Lieberman-Aiden et al. *Science* (2009)] が挙げられる。Piwi 遺伝子をノックダウンした OSC や *piwi* 欠損ショウジョウバエ個体を用いた Hi-C データを取得し、Piwi-piRNA 標的トランスポゾン領域を中心にどのようなゲノム構造変化が起こるかを明らかにした。さらに核ラミナタンパク質の DamID 解析を中心に、細胞内局在への影響も検討した。これらに加え、取得済みの ChIP-seq 解析、並びに RNA-seq 解析の結果を統合し [Iwasaki et al. *Mol Cell* (2016)]、Piwi-piRNA が誘導する核内構造変化とエピゲノム変化をゲノムワイドに解析した。

4. 研究成果

(1) Piwi-piRNA によるエピゲノム制御がショウジョウバエ生殖ゲノム維持に必須であると考えられているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。そこで新規因子の同定からこの問いにアプローチした。Piwi-piRNA のヘテロクロマチン形成に必須とされている因子 Panoramix (Panx) に対する抗体を作成し、これを用いた免疫沈降実験により新たに Nuclear export factor 2 (Nxf2)-p15/Nxt1 が Panx および Piwi と複合体を形成することを明らかにした。またレポーターを用いた実験系により、Nxf2 を強制的にレポーターの新生 RNA に係留した結果、サイレンシングを引き起こすことができた。さらに ChIP-seq 解析より、この複合体は piRNA 標的クロマチン領域のヒストン修飾を制御することが明らかとなった。これらの結果について、ショウジョウバエ個体を用いた実験系で検証した。Nxf2 ノックダウン個体を用いて解析を行った結果、Nxf2 のノックダウンに伴い Panx の安定性が大きく低下し (図 1A)、不妊の表現型を示した (図 1B)。さらに上記レポーターシステムを個体に導入した結果、Nxf2 および Panx の係留により、レポーターがサイレンシングされることを確認した (図 1C)。これらの結果から、Panx-Nxf2 によりエピゲノム制御は piRNA による不妊の表現型に寄与することが明らかとなった [Murano and Iwasaki et al. *EMBOJ* (2019)]。

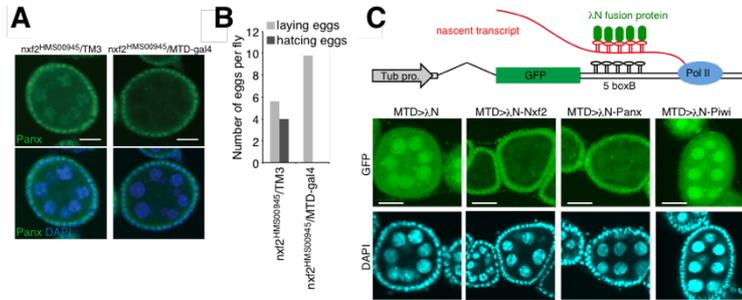


図1: Nxf2-Panxの機能不全ショウジョウバエは不妊の表現型を示す

(2) Piwi-piRNA がヒストン修飾をはじめとした局所的なエピゲノム変化に影響することが明らかとなる一方で、ゲノム高次構造に及ぼす影響については不明である。そこで OSC を用いた Hi-C 解析を行った結果、Piwi ノックダウン条件下では、Piwi-piRNA に制御されるトランスポゾンが挿入されているゲノム領域特異的に短距離間相互作用の減少 (TAD 内相互作用頻度の減少) と長距離間相互作用頻度の増加が確認された (図 2A)。さらに、核ラミナ DamID-seq 解析および Oligo-FISH 解析の結果、Piwi-piRNA 標的トランスポゾンをコードするクロマチン領域について、Piwi ノックダウンに伴い核ラミナとの相互作用が減少することを明らかにした。これらの結果は、Piwi-piRNA によるトランスポゾンの抑制は、局所的な転写抑制にとどまらず、標的トランスポゾンを中心とした核内での空間的な配置やゲノム三次元構造の制御を伴うダイナミックな核内構造体形成であることを示唆する。さらに *piwi* 個体を用いた Hi-C 解析の結果、OSC で観察された高次構造の変化と同様に短距離間相互作用の減少と長距離間相互作用の増加が確認された (図 2B)。個体で観察されたこれらの構造変化は OSC のものよりも強く、これはゲノム構造形成が発生段階で構築されるという報告もあることから [Szabo et al. *Sci Adv* (2019)]、個体でより強く表現型がみられるものであると考えている。本研究成果について、現在論文を投稿している [Iwasaki et al. *in revision*]。

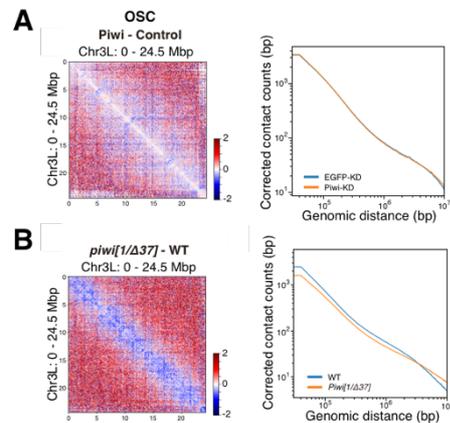


図2: *piwi*欠損個体のゲノム高次構造変化

(3) 上記の解析では、ショウジョウバエ卵巣およびショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞 (OSC) をモデルとして用いて、詳細な分子メカニズムの解析を進めてきた。このなかで重要な疑問として、ショウジョウバエで観察される不妊の表現型やそれを引き起こす作用機序が哺乳類でも保存されるか?が挙げられる。この疑問を解明すべく、哺乳類の新たなモデル生物としてハムスターを用いた解析を進めた。これまでの先行研究では、主にマウスをモデル生物として piRNA の機能解析は行われており、その研究成果から、哺乳類卵巣において PIWI タンパク質や piRNA の発現は非常に低く、PIWI タンパク質を欠損した雌個体においても不妊の表現型は確認されないとされてきた。しかしながら、マウス以外の哺乳動物の卵巣では PIWI タンパク質と piRNA の発現が確認できる。ハムスター卵巣を用いた解析結果から、ハムスターでは時期特異的に PIWI タンパク質が発現しており、トランスポゾンを標的とする piRNA が産生されていることを明らかにした [Ishino et al. *NAR* (2021)]。この結果を受けて、*PIWI* 遺伝子のノックアウトハムスター個体を作成した結果、不妊の表現型が確認された。この原因を解明すべく、*PIWI* ノックアウト個体を用いた small RNA-seq および RNA-seq 解析を行った結果、哺乳類卵巣においても *PIWI* ノックアウト個体では、piRNA 標的トランスポゾンの脱抑制が起こることが明らかとなった。加えて、methyl-seq 解析を行うことで、一部のゲノム領域の DNA メチル化への影響を明らかにすることができた。この研究成果について、現在論文を投稿している [Hasuwa et al. *in revision*]。

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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Murano Kensaku, Iwasaki Yuka W, Ishizu Hirotsugu, Mashiko Akane, Shibuya Aoi, Kondo Shu, Adachi Shungo, Suzuki Saori, Saito Kuniaki, Natsume Tohru, Siomi Mikiko C, Siomi Haruhiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Nuclear RNA export factor variant initiates piRNA guided co transcriptional silencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e102870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019102870	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 Nishida Kazumichi M, Sakakibara Kazuhiro, Iwasaki Yuka W, Yamada Hiromi, Murakami Ryo, Murota Yukiko, Kawamura Takeshi, Kodama Tatsuhiko, Siomi Haruhiko, Siomi Mikiko C	4. 巻 555
2. 論文標題 Hierarchical roles of mitochondrial Papi and Zucchini in Bombyx germline piRNA biogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 260 ~ 264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/nature25788	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 Ishino Kyoko, Hasuwa Hidetoshi, Yoshimura Jun, Iwasaki Yuka W, Nishihara Hidenori, Seki Naomi M, Hirano Takamasa, Tsuchiya Marie, Ishizaki Hinako, Masuda Harumi, Kuramoto Tae, Saito Kuniaki, Sakakibara Yasubumi, Toyoda Atsushi, Itoh Takehiko, Siomi Mikiko C, Morishita Shinichi, Siomi Haruhiko	4. 巻 49
2. 論文標題 Hamster PIWI proteins bind to piRNAs with stage-specific size variations during oocyte maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2700 ~ 2720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab059	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 Takeuchi Chikara, Murano Kensaku, Ishikawa Mitsuru, Okano Hideyuki, Iwasaki Yuka W	4. 巻 In press
2. 論文標題 Generation of stable Drosophila ovarian somatic cell lines using the piggyBac system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	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） なし	査読の有無 無
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 Hitoshi Ohtani, Iwasaki Yuka W	4. 巻 In press
2. 論文標題 Rewiring of chromatin state and gene expression by transposable elements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	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) なし	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17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Impact of Piwi-piRNA mediated transcriptional silencing on nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎由香, 塩見春彦
2. 発表標題 ショウジョウバエPiwi-piRNAが制御する核内高次構造
3. 学会等名 RNAi研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 International Symposium for Female Researchers in Chromatin Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 14th Asia Epigenome Meeting (AEM) / 3rd Taipei Epigenetics and Chromatin Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 Keystone Symposia: Small Regulatory RNAs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference - Small Regulatory RNAs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki, Haruhiko Siomi
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing-coupled changes of nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience - RNA Neobiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎由香
2. 発表標題 Piwi-piRNAによるトランスポゾン抑制はNxf2を介した転写制御とヘテロクロマチン形成により引き起こされる
3. 学会等名 転移因子研究会 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Nuclear RNA export factor variant triggers Piwi-piRNA-mediated co-transcriptional silencing
3. 学会等名 2nd JAJ (Joint Australia-Japan/Japan-Australia Joint) RNA meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎由香、村野健作、益子あかね、渋谷あおい、塩見春彦
2. 発表標題 Piwi-piRNAによるトランスポゾン抑制はNxf2を介した転写制御とヘテロクロマチン形成により引き起こされる
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎由香、村野健作、益子あかね、渋谷あおい、塩見春彦
2. 発表標題 Piwi-piRNA silencing is triggered by Nxf2 mediated transcriptional regulation prior to heterochromatin formation
3. 学会等名 第二回慶應ライフサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Piwi-piRNA mediated silencing induces step-wise nuclear architectural changes
3. 学会等名 JSDB/APDBN Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Nuclear architectural changes during the establishment of Piwi-piRNA mediated silencing
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 Regulation of non-coding genome: Transposable element silencing by PIWI-piRNAs
3. 学会等名 ASMI BioInfo Summer 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka W. Iwasaki
2. 発表標題 The impact of Piwi-piRNA mediated transcriptional silencing on Nuclear architecture in Drosophila
3. 学会等名 Chromosome Dynamics Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
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