

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03188

研究課題名(和文) 内在性レトロウイルスを介した遺伝因子の個体内送受機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of intra-individual transduction via endogenous retroviruses

研究代表者

三好 啓太 (Miyoshi, Keita)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教

研究者番号：20423395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：様々な生物のゲノムに存在する転移因子(TE)はゲノム進化の推力であるとともに、ゲノム安定維持の脅威でもある。そのため、宿主により転移因子の発現は適正に制御されている。転移因子発現制御機構が欠失したショウジョウバエ変異体において、転移因子である内在性レトロウイルス(ERV)の一部が卵巣性体細胞内で過剰発現し、細胞外微粒子として生殖細胞へ伝播されていることが報告されている。正常な卵巣でもERVの発現が観察されることから、ERV細胞外微粒子を介した細胞間情報伝達機構の存在が期待される。本研究では、どのようにERV粒子が形成・伝播され、どのような生理的意味を持つのか、その包括的な理解を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では、エキソソームを代表とする細胞外小胞が分泌細胞由来の核酸やタンパク質を内包・伝播し、組織間や細胞間連携の役割を担うことが示されている。本研究対象であるERV粒子の形成・伝播機構は、未知の細胞間輸送機構研究の発展につながると期待できる。また、ERV粒子は内因性であることから受け手側細胞における免疫回避が考えられ、ERV粒子の性質は外因性ウイルスとは異なると考えられる。その違いの解明は、「自己と非自己の認識」という生物学的に非常に重要な問いの解明になる。

研究成果の概要(英文)：Transposable elements (TEs) in various genomes are both a driving force in the evolution of the genome and a threat to the stability of the genome. Therefore, the host appropriately regulates the expression of TEs. Interestingly, it has been reported that some ERV is overexpressed in follicle cells and transmitted to germ cells as extracellular particles in *Drosophila* mutants which does not have a regulatory mechanism for the expression of ERVs. Since some endogenous retrovirus expression is also observed in normal *Drosophila* ovaries, it is assumed that there is a mechanism for intercellular communication by ERVs through extracellular particles. This study aims to understand how ERV particles form, propagate, and have physiological significance.

研究分野：分子生物学

キーワード：レトロトランスポゾン 細胞外微粒子 piRNA

1. 研究開始当初の背景

多種の細胞で分泌される細胞外微粒子であるエクソソームなどの細胞外小胞は、直径 30nm ~1,000nm 程度の膜小胞であり、その大きさや由来によりエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体などに分類される。これらの細胞外小胞は分泌細胞由来の核酸やタンパク質を内包・伝播し、組織間や細胞間連携の役割を担う。エクソソームを介した mRNA と microRNA の細胞間移行の発見(Valadi et al. *Nature Cell Biol*, 2007)や腫瘍を促進するマイクロベシクルの発見(Skog et al. *Nature Cell Biol*, 2008)により、細胞外小胞の生理的重要性が示されるようになった。モデル生物ショウジョウバエにおいても細胞外小胞の移行がシナプス可塑性に関与すること(Ashley et al. *Cell*, 2018; Pastuzyn et al. *Cell*, 2018)や、卵巣性体細胞から生じた Endogenous Retrovirus (ERV)微粒子が次世代形成を担う卵母細胞に伝播することが示された(Chalvet et al. *EMBO J*, 1999)。

2. 研究の目的

近年の報告は、ゲノムによる ERV の発現を正に制御、もしくは発現を許容し利用する仕組みの存在を示唆している。例えば、マウス神経幹細胞において、ERV はゲノム多様性や ES 細胞の未分化性維持において重要な役割を果たす。ショウジョウバエにおいても ERV の生理的機能の存在が予測される。例えば、piRNA 前駆体をコードする flamenco 領域に変異を持つホモ変異体の母から生まれた子は、ERV である gypsy や ZAM のゲノムへの新規挿入増加が観察される(Prud'homme et al. *Genetics*, 1995, Desset et al. *Genetics*, 2003)。また、電子顕微鏡を用いた解析により、ERV にコードされた Gag タンパク質や Env タンパク質を含む微粒子による細胞間輸送経路を通して濾胞細胞から卵母細胞に伝播されることが示された。さらに、濾胞細胞特異的に ERV 抑制因子 Piwi を欠失させたショウジョウバエにおいては、70 世代を経ると ZAM や gtwin といった ERV のゲノム内コピー数が 10 倍に上昇する (Barckmann et al. *Nucleic Acids Res*, 2018)。これらの結果は、体細胞と生殖細胞間において ERV の情報伝達が行われ、伝播された ERV が受け手側細胞において機能的であることを示している。多種ある ERV の中で微粒子を形成する ERV の特徴や形成された微粒子の構成因子、さらには伝播様式の解明を目的とする。本研究による ERV 形成・伝播の基本原則の理解は、ERV 伝播の生理的意義やゲノム進化の理解を導く、生物学的重要事項であると考えられる。

3. 研究の方法

生殖細胞における ERV 微粒子の挙動の解明を目的とするが、ショウジョウバエ個体を用いた解析は非常に困難である。これまで、ERV 研究の問題は、その手法にあると考える。そこで、本研究では、当研究室で樹立された卵巣性体細胞 (濾胞細胞) 由来の培養細胞(Ovarian somatic cells, OSC)を利用する。培養細胞を利用する利点は、大量に ERV 画分を取得できることや生化学的な解析が可能となることである。「ERV 微粒子を放出する濾胞細胞」から独自で樹立した「OSC 培養細胞」を用いるアプローチは、非常に独自性が高い。

4. 研究成果

(1) 効率的な ERV 微粒子画分精製方法の確立

予備結果として、OSC 培養上清に約 80nm の微粒子が存在し、その画分には ERV mRNA が含まれることを明らかにした。この実験には、ERV 微粒子画分の画分にエクソソーム画分フィルター精製法を用いた。エクソソームは脂質二重膜に包まれた小胞であり、その大きさは直径

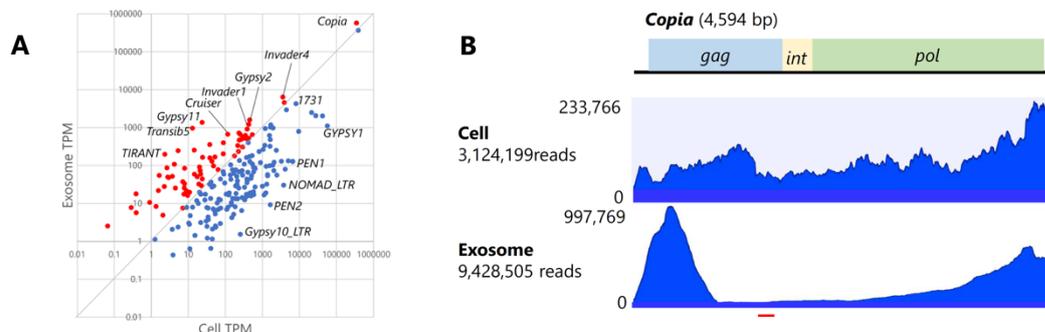


図 1. 細胞外 ERV 微粒子画分に含まれる ERV mRNA

(A) 多くの ERV mRNA が ERV 画分に含まれていた。(B) ERV 画分に含まれる Copia ERV mRNA は細胞内 Copia mRNA と大きさが異なる。

100nm と知られている。また、外来性エンベロープウイルス由来微粒子も直径 100nm 程度であり、非常に似ている。外来性エンベロープウイルス由来微粒子と ERV 微粒子も同様の大きさと考え、既報のエキソソーム精製法およびウイルス精製法を参考に、超遠心分離を改変した精製方法を確立した。

(2) ERV 微粒子画分に含まれる mRNA の解析

外来性レトロウイルスは、ゲノム RNA とそれにコードされる Gag、Pol および Env タンパク質により粒子を形成する。ERV も同様のタンパク質をコードすることから、これらにより微粒子形成が行われると予測される。そこで、細胞外に放出された ERV 画分に含まれる mRNA を解析した結果、数多くの ERV 由来 mRNA が非常に多く含まれることが明らかとなった (図 1A)。また、細胞内と ERV 微粒子画分に含まれる各 ERV mRNA のサイズを比較した。一部の ERV は、細胞内で発現する遺伝子をコードする全長 mRNA ではなく、一部を欠損した mRNA が微粒子画分に含まれていた (図 1B)。つまり、一部の ERV は選択的に微粒子に内包され、細胞外へ放出される可能性が示唆された。

(3) ERV タンパク質に対する抗体の作製

TE 由来タンパク質の細胞内外の動態や TE 顆粒体の精製や機能解析のため、ショウジョウバエ ERV である Gypsy および ZAM にコードされた Gag および Env タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製した。

Accession	Description	Total spectrum count
Q9W3M4	orion	4635
Q7KVT8	orion(isoformB)	3942
P23654	Nrt	717
P13607	Atpalpha	660
P04146	copia/Gag	474
Q9VB05	ALIX	467
⋮	⋮	⋮
Q967T3	cruiser/Gag	58
Q967T6	springer/Gag	44

■ Retrotransposon-derived protein

表 1. ERV 画分に含まれるタンパク質

(4) ERV 微粒子画分に含まれるタンパク質の解析

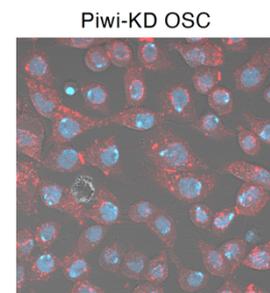
ERV 構成因子同定のため、ERV 微粒子画分に含まれるタンパク質を質量分析により同定した。期待されていた通り、ERV 由来のタンパク質が含まれていた (表 1)。また、自ら作製した抗体を用いた解析においても、その存在が確認された。この画分には、膜輸送系に関わる内在性タンパク質も取得されており、ERV 微粒子形成との関連が示唆される。

(5) ERV タンパク質と相互作用する宿主因子の同定

ERV にコードされたタンパク質に対する宿主由来の相互作用因子の同定を行った。具体的には、GST 融合 ERV タンパク質と OSC 細胞抽出液を用いた Pulldown アッセイおよび抗 Gypsy-Gag 抗体および抗 Gypsy-Env 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、Gypsy-Gag の相互作用因子とし、SUMO 修飾関連因子、細胞分裂関連因子、RNA 結合因子など、興味深い因子を同定した。

(6) ERV タンパク質の細胞内動態

ERV 由来タンパク質の動態を知るため、Piwi ノックダウン OSC 細胞における Gypsy-Gag および Gypsy-Env の細胞内局在性を観察した。これらは、細胞-細胞間境界面および細胞の末端部位の顆粒体に共局在していた (図 2)。Gypsy-Gag 相互作用因子として、細胞分裂やウイルス輸送関連因子が同定しており、ERV 微粒子の挙動は宿主細胞の機能に依存することが考えられる。



Gypsy-Gag
DAPI

図 2. Gag タンパク質の細胞内局在性

ERV 微粒子画分に存在する構成成分が明らかになった。さらに、宿主細胞因子と ERV 因子との相互作用が観察された。今後、宿主細胞の因子と ERV 因子が、どのように協調的に ERV 微粒子形成や伝播に関わるかを明らかにする。また、宿主 mRNA が ERV 微粒子に含まれている可能性も含め、ERV 微粒子による宿主細胞が利用する細胞間輸送機構としての機能にも注目する。

(7) ERV 制御に関わる遺伝子の同定とその利用

濾胞細胞 (体細胞) における ERV 発現に関わる因子として Lint-O を同定した。濾胞細胞と生殖細胞では ERV 抑制様式が異なる。Lint-O は、濾胞細胞において生殖細胞特異的な ERV 発現抑制機構を抑制する因子であることを明らかにした (EMBO Rep. 2022)。今後、ショウジョウバエ個体を用いた ERV 微粒子の挙動について解析を進める。Lint-O 変異体の濾胞細胞は、生殖細胞および体細胞で機能する二つの ERV 発現抑制機構を持ち合わせる。Lint-O 変異体では、ERV 微粒子の発現や輸送機能がほぼ完全に抑制されると期待されることから、本変異体を用いた ERV 微粒子の濾胞細胞-生殖細胞間の輸送機能の解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Hitomi, Matsuda Hitomi, Miyoshi Keita, Moritoh Mai, Yoshitane Hikari, Fukada Yoshitaka, Saito Kuniaki, Yamanaka Soichiro, Siomi Mikiko C	4. 巻 23
2. 論文標題 Lint-0 cooperates with L(3)mbt in target gene suppression to maintain homeostasis in fly ovary and brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202153813	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三好啓太
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるクロマチン構造変換因子を介したレトロトランスポゾン抑制機構
3. 学会等名 第5回 転移因子研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好啓太、山中総一郎、塩見美喜子、齋藤都暁
2. 発表標題 Drosophila Lint-0は体細胞において生殖細胞特異的遺伝子群の発現を抑制する
3. 学会等名 第44回 分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新垣 直宏, 三好 啓太, 石黒 啓一郎, 齋藤 都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエ卵巣性体細胞から放出されるレトロトランスポゾン由来ウイルス状粒子の解析
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keita Miyoshi, Hitomi Yamamoto-Matsuda, Mai Moritoh, Hikari Yoshitane, Yoshitaka Fukada, Kuniaki Saito, Soichiro Yamanaka, Mikiko C. Siom
2. 発表標題 Lint-0 cooperates with L(3)mbt in gene regulation to maintain homeostasis in Drosophila ovary and brain
3. 学会等名 第23回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立遺伝学研究所 無脊椎動物遺伝研究室 http://ksaitolab.org
--

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