様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ５ 月 １０ 日現在

機関番号：８２６７４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ０６５９６

研究課題名（和文）piRNAクラスターにおけるヘテロクロマチン依存的な転写活性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of heterochromatin-dependent transcriptional activation in piRNA clusters

研究代表者

佐藤　薫（Kaoru, Sato）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：２０５４８５０７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：piRNAは生殖組織特異的に産生される小分子RNAであり、生殖ゲノムの品質管理を担う。ショウジョウバエ卵巣ではDual-strandクラスターと呼ばれるpiRNAクラスターからpiRNAが産生され、その転写活性化にはRhiタンパク質が相互作用することが重要である。本研究では、その転写活性化の分子作用機序を明らかにするため、Rhiが発現してない培養細胞を用いたゼロベースでのゲノム条件下においてRhiおよび核内piRNA因子群を異所的に発現させた人工的な実験系を用いて、Rhi相互作用ゲノム部位の同定、および、Dual-strandクラスターの転写活性化に必要な遺伝子セットを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
piRNAは近年発見された新規の少分子RNAであり、生殖細胞ゲノムを保護する重要な機能を担う因子であり、piRNA産生に異常が生じると不稔となり、種の保存は成立しなくなる。piRNA研究には、大きくpiRNAの産生とトランスポゾン発現抑制機構に関する研究があり、本研究は前者に関連するものである。その中で、Dural-strandクラスターは生殖細胞piRNAの素となる前駆体RNAの産生の場であり、その中心因子であるRhiがどのような分子作用機序でそれらのゲノム領域を認識しているのかを明らかにした本研究は、学術的に重要な意義をもち、生殖機能を理解するうえでも社会的に非常に重要な研究成果である。

研究成果の概要（英文）：PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are a large group of small non-coding RNAs that are specifically produced in reproductive tissues to repress the expression of deleterious transposable elements and participate in the maintenance of germline genome integrity. In the Drosophila ovary, piRNAs are predominantly produced from piRNA clusters called dual-stranded piRNA clusters. Rhi plays an important role in their transcriptional activation. To elucidate the molecular machinery underlying Rhi-mediated transcriptional activation, this study used an engineered experimental system of cultured cells lacking Rhi expression. Ectopic expression of Rhi and nuclear piRNA factors resulted in the robust upregulation of dual-stread culsters. In addition, ChIP-seq experiments revealed the Rhi binding genomic sites of Rhi. Furthermore, the gene set required for the transcriptional activation of dual-strand clusters was identified.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：piRNA　Piwi　ヘテロクロマチン　ヒストン　エピジェネティクス　生殖細胞

※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。

１．研究開始当初の背景

PIWI-interacting RNA（piRNA）は生殖組織特異的に産生される小分子 RNA であり、PIWI タンパク質と特異的に結合する事によって機能する。その多くはゲノム上のトランスポゾンの相補配列に由来し、それらのゲノムへの侵略を防ぎ、宿主ゲノムの品質管理を行っている。piRNA 産生や抑制経路に異常が生じると、脱抑制されたトランスポゾンの転移による遺伝子の破壊や染色体の不安定化を引き起こし、減数分裂が進行せず、卵や精子が正常に形成されなくなり、種の保存は成立しなくなる。

piRNA は、piRNA クラスターと呼ばれるトランスポゾン断片が集積した「トランスポゾンの墓場」ともいえる特殊なゲノム領域から産生させる。piRNA クラスターは大きいもので数百 kb 以上のサイズを有する。piRNA の生合成過程では、まず、piRNA クラスターから一本鎖の長鎖ノンコーディング RNA（LncRNA）が転写され、その後、piRNA 因子と呼ばれる piRNA 生合成関連タンパク質群によって短くプロセシングされ、成熟型 piRNA となる。piRNA クラスターは、転写の違いから大きく 2 つのタイプに分類されており、一方向からのみ転写される Uni-strand クラスターと、両側から転写される Dual-strand クラスターがある。Uni-strand クラスターの転写様式はタンパク質コード遺伝子と類似する点が多く、プロモーターを有し、RNA ポリメラーゼ II（RNA PolII）によって転写され、5’キャップの付加、スプライシング、3’ポリ A 付加といった RNA プロセシングをうける。Dual-strand クラスターも RNA PolII によって転写されると考えられているが、Uni-strand クラスターとは異なり、明確な転写開始域がなく、さらに、クラスター全体は転写抑制型のヒストンマークである H3K9me3 に富んでいるため、エピゲノム学上は転写不活性状態のはずである。しかし、近年、遺伝学的なスクリーニングから発見された生殖細胞に特化した核内 piRNA 因子 Rhino (Rhi)の分子機能の解明により、その転写活性化機構が徐々に明らかになりつつある。Rhi はヘテロクロマチンタンパク質 HP1a のパラログであり、Dual-strand クラスターの H3K9me3 に特異的に相互作用する。しかし、HP1a とは異なり、ヘテロクロマチン化は誘導せず、特殊な基本転写開始複合体を誘導することで、転写を活性化する。Rhi は、Dual-strand クラスターにおいて Deadlock (Del)、Cutoff (Cuff)と三者複合体（RDC 複合体と呼ばれる）を形成し、RDC 複合体は Moonshiner (Moon)/TFIIA-S/Trf2 から構成される基本転写開始複合体を誘導し、RNA PolII による転写が行われる。この転写はプロモーターや DNA 配列に依存せず、Rhi による Dual-strand クラスター領域の H3K9me3 の認識に依存する非常にユニークな機構である。転写された前駆体 RNA は Cuff に捕捉されることでスプライシングやポリ A 付加が抑制され、その後、Nxf3-Nxt1-Boot-UAP56-TREX 複合体によって細胞質へ輸送される。細胞質の核膜近傍には Nuage と呼ばれる piRNA 産生場があり、Nuage において piRNA の成熟化が行われる。このような一連の大まかなモデルが提唱されているものの、その分子作用機序はほとんど明らかになっていない。さらに、そもそも Rhi がどのような仕組みで Dual-strand クラスターのゲノム領域を他の H3K9me3 リッチなゲノム領域と区別して相互作用しているのか、については不明な点が多い。

これまでの研究で、OSC においてがん遺伝子 *lethal (3) malignant brain tumor [l(3)mbt]*をノックアウトした培養細胞株「Δmbt-OSC」を CRISPR-Cas9 システムを用いて作出した。Δmbt-OSC では、本来発現していない Vasa や Aub、AGO3 といった生殖細胞特異的な piRNA 因子が発現し、生殖細胞様の piRNA が産生されていた（この産生経路はピンポン経路と呼ばれる）。Δmbt-OSC は生殖細胞での piRNA 生合成経路（ピンポン経路）を生化学的に分子レベルで解明できる優れた研究ツールとなっている一方、Rhi、Moon が OSC と同様に発現がみられず、Dual-strand クラスターが活性化していない。しかし、OSC やΔmbt-OSC では、Rhi 以外の RDC 構成因子や Moon 以外の転写因子の発現はみられており、Rhi、Moon を強制発現させれば、Dual-strand クラスターが活性すると予想し、実際に行ったところ、転写活性化がみられた。意外なことに、Dual-strand クラスターに特化した発現誘導も観察された。

２．研究の目的

本研究の目的は、Rhi が Dual-strand クラスターのゲノム領域とそれ以外の H3K9me3 リッチな領域を識別する分子機構および転写活性化機構を明らかにすることである。特に、Dual-strand クラスター活性化の最初のステップとなる Rhi による Dual-strand クラスターの認識についてはまったく研究が行われておらず、その機構の解明を行う本研究は学術的に独自性の高いものである。さらに、Dual-strand クラスターの転写や輸送についてはショウジョウバエ卵巣組織を用いた遺伝学的な解析をベースとした研究がすすめられているが、本研究は、これらとは異なり、もともと Rhi や Moon が発現していない体細胞由来培養細胞株において、つまり、ゼロベースのゲノム条件下において、どのように Rhi が Dual-strand クラスターを見つけるのか、さらに、どのように転写活性化を導くのか、それらの仕組みを明らかにできることである。先行研究として申請者は、Rhi と Moon をショウジョウバエ体細胞培養細胞 OSC においてプラスミド用いて強制発現させた場合に、Dual-strand クラスターの転写が活性化されることを発見しており、この結

果は、Rhi が Dual-strand クラスターとそうでないゲノム領域を区別できることを強く示唆する。

３．研究の方法

本研究では、OSC を用いて、①Rhi 相互作用ゲノム部位の同定、および、②Dual-strand クラスターの転写活性化に最低限必要な遺伝子セットを明らかにする。

①Rhi 相互作用ゲノム部位の同定

1. OSC において、Rhi を強制発現させ、Rhi のクロマチン IP を行い、次世代型シーケンサーを用いて Rhi 相互作用ゲノム部位の網羅的な同定を行う（ChIP-seq）。

2. ②-3 で明らかにした遺伝子セットを OSC での強制発現し、Rhi の ChIP-seq を行い、Rhi 相互作用ゲノム部位の変化を解析する。

②Dual-strand クラスターの転写活性化に最低限必要な遺伝子セットの同定

3.OSC において、Rhi、Moon をはじめ、既知の核内 piRNA 因子を強制発現させ、RT-qPCR により、Dual-strand クラスターの発現レベルを解析する。強制発現する因子の組み合わせを変えるとともに、RNAi によるノックダウン実験も組み合わせ、Dual-strand クラスターの活性化に最低限必要な遺伝子セットを明らかにする。また、それ以外の領域の発現レベルについても解析し、その転写活性化領域の特異性について明らかにする。

4.3 で明らかにした遺伝子セットを OSC での強制発現し、RNA-seq を行い、ゲノムワイドな発現レベルの変化を解析するとともに、転写活性化領域の特異性を明らかにする。

４．研究成果

まず、Rhi が発現してない培養細胞 OSC を用いて、Rhi タンパク質をプラスミドトランスフェクションにより強制発現させ、クロマチン免疫沈降（ChIP-seq）を行ったところ、有意な結合ピーク（シグナル）が観察されなかった。また、同一サンプルにおいて、転写抑制型ヒストン修飾である H3K9me3 ChIP を行ったところ、本来ピークがみられるようなゲノム領域でのシグナル強度が減少するという結果が得られた。これらの結果から、プラスミドトランスフェクションでの ChIP-seq を行った場合、シグナル強度が減少し、明確な結合シグナルが検出されず、解析が困難になると考えられた。

そこで、Rhi を安定的に発現する OSC 細胞株の作成を行った。Ty1 もしくは Flag タグを結合した Rhi を発現するいくつかのモノクローナル細胞を樹立し、Rhi の安定発現細胞株の樹立に成功した。続いて、Rhi の結合ゲノム領域を網羅的に明らかにするため、樹立した Flag-Rhi 安定発現 OSC を用いて、ChIP-seq を行った。その結果、代表的な Dual-strand クラスターである 42AB や 80F への Flag-Rhi の有意な結合は観察されなかった。

Rhi のタンパク質安定化や核内の Rhi 顆粒への局在には、Del や Cuff が関与することが報告されている。実際に、本研究では、Rhi は卵巣、OSC において核内顆粒状局在を示すが、Del を共発現させるとよりシャープな顆粒が形成されることも明らかにしている。これらの結果から、Rhi が安定して Dual-strand クラスターへ結合するには、それら制御因子が関与することが示唆された。そこで、Dual-strand クラスターを安定して転写活性化に必要な遺伝子セットの同定を行った。Dual-strand クラスターの発現には、Rhi、Del、Cuff の RDC 複合体に加えて、Moon/TRF2/TFIIA-S が関与するとされる。これまでの解析で、OSC と卵巣の RNA-seq データを比較したところ、OSC において Rhi と Moon の発現がほとんどみられず、それ以外のタンパク質については卵巣と同程度に発現していることが分かった。Rhi と Moon に加えて、Rhi の局在を促進する Del を共発現させた OSC を用いて、RT-qPCR ｙにより、Dual-strand クラスターの発現レベルを解析した結果、これら 3 つの因子が Dual-strand クラスターの発現レベルを上昇させることを明らかにした。続いて、Rhi, Del, Moon をプラスミド強制発現させた OSC を用いて、RNA-seq を行い、80F の 2 倍程度の発現レベルの上昇が観察された。42AB についてもマイルドな上昇が観察された。今後は、これら Rhi-Del-Moon を安定発現させた OSC 細胞株を作成し、Rhi の結合の解析を進めていく。

Rhi の認識するヒストン修飾についても解析も進めた。これまでに、Rhi は、転写抑制型ヒストン修飾である H3K9me3 に結合することが報告されている。本研究では、ヒストン組み換え Rhi タンパク質を用いて、親和性の高いヒストン修飾について、ペプチドアレイスクリーニング法を用いて解析した。その結果、H3K9me3 に加え、H3R2me2 や H3R8me2 といったヒストン修飾への強い親和性を明らかにした。さらに、Rhi は、H3R2me2 や H3R8me2 のみの単修飾ではなく、H3K9me3 と組み合わさった修飾へ結合することを明らかにした。また、予想に反し、転写活性形ヒストン修飾 H3K4me3 の同時にもった場合に、より結合しやすいことも明らかにし、Rhi はバイバレントな相反する 2 つのヒストン修飾を受けているクロマチン状態への結合しやすいことが示唆された。今後、Dual-strand クラスターにおける H3R2me2 や H3R8me2 や、それらの in vivo での Rhi の分子機能への役割、Dual-strand クラスターの発現レベル上昇への関与を解析していく。また、本研究では、転写のステップに着目するため、OSC を用いた解析を進めてきたが、Δmbt-OSC では輸送因子である Boot が異所的に発現しており、事実、ピンポン経路での piRNA 産生が観察されており、Δmbt-OSC を用いて、転写だけでなく輸送と細胞質での piRNA プロセシング機構の理解に向けた研究へも発展させていきたい。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計8件（うち査読付論文　8件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　8件）

１．著者名 Sato Kaoru、Takayama Ken-ichi、Hashimoto Makoto、Inoue Satoshi	４．巻 2
２．論文標題 Transcriptional and Post-Transcriptional Regulations of Amyloid-β Precursor Protein (APP) mRNA	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Frontiers in Aging	６．最初と最後の頁 721579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fragi.2021.721579	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 Onishi Ryo、Sato Kaoru、Murano Kensaku、Negishi Lumi、Siomi Haruhiko、Siomi Mikiko C.	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 eaaz7420
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 Mugat Bruno、Nicot Simon、Varela-Chavez Carolina、Jourdan Christophe、Sato Kaoru、Basyuk Eugenia、Juge Fran?ois、Siomi Mikiko C.、P?lisson Alain、Chambeyron S?verine	４．巻 11
２．論文標題 The Mi-2 nucleosome remodeler and the Rpd3 histone deacetylase are involved in piRNA-guided heterochromatin formation	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Nature Communications	６．最初と最後の頁 108-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16635-5	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 該当する

１．著者名 SATO Kaoru、SIOMI Mikiko C.	４．巻 96
２．論文標題 The piRNA pathway in Drosophila ovarian germ and somatic cells	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	６．最初と最後の頁 32～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.96.003	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 Sato Kaoru、Takayama Ken‐ichi、Inoue Satoshi	4．巻 24
2．論文標題 Stress granule‐mediated <scp>RNA</scp> regulatory mechanism in Alzheimer's disease	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6．最初と最後の頁 7〜14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ggi.14663	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 Sato Kaoru、Takayama Ken-ichi、Inoue Satoshi	4．巻 14
2．論文標題 Expression and function of estrogen receptors and estrogen-related receptors in the brain and their association with Alzheimer’s disease	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6．最初と最後の頁 1220150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2023.1220150	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 Sato Kaoru、Takayama Ken-ichi、Inoue Satoshi	4．巻 15
2．論文標題 Stress granules sequester Alzheimer’s disease-associated gene transcripts and regulate disease-related neuronal proteostasis	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Aging	6．最初と最後の頁 3984〜4011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.204737	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 Sato Kaoru、Takayama Ken-ichi、Inoue Satoshi	4．巻 15
2．論文標題 Role of piRNA biogenesis and its neuronal function in the development of neurodegenerative diseases	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6．最初と最後の頁 1157818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnagi.2023.1157818	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6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

1．発表者名
佐藤薫

2．発表標題
ストレス顆粒による神経細胞RNA代謝および認知症病態制御メカニズムの解明

3．学会等名
第12回老化機構チームセミナー

4．発表年
2022年

1．発表者名
佐藤薫、高山賢一、井上聡.

2．発表標題
ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞におけるeCLIP-seq法を用いたストレス顆粒中核因子G3BP1およびG3BP2結合RNAの網羅的解析

3．学会等名
MBSJ2022

4．発表年
2022年

1．発表者名
Sato Kaoru、Takayama Ken-ichi、Inoue Satoshi

2．発表標題
Stress granules sequester Alzheimer’s disease-associated gene transcripts in human neuronal cells.

3．学会等名
IAGG-Asia Oceania Regional Congress 2023 (IAGG-AOR2023)（国際学会）

4．発表年
2023年

1．発表者名
佐藤薫、高山賢一、井上聡.

2．発表標題
ヒト神経細胞におけるエストロゲン関連受容体による遺伝子転写制御および認知症発症メカニズムの解明

3．学会等名
第15回老化機構チームセミナー

4．発表年
2023年

１．発表者名 Sato K, ide K, Tanaka N.
２．発表標題 Evaluation of the impact of genetic diversity on PIWI-interacting RNA analysis.
３．学会等名 American Society of Human Genetics (ASHG) 2021 virtual meeting.（国際学会）
４．発表年 2021年

１．発表者名 佐藤薫、高山賢一、井上聡.
２．発表標題 ヒト神経細胞におけるエストロゲン関連受容体ERRα/ERRγによるアルツハイマー型認知症関連遺伝子転写制御機構の解明.
３．学会等名 ERRセミナー
４．発表年 2023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