

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22620

研究課題名(和文) 培養細胞ゲノムと個体ゲノムの比較を通じたpiRNAクラスターの成立条件の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the conditions for the establishment of piRNA clusters through comparison of cultured cell genome and individual genomes

研究代表者

庄司 佳祐 (Shoji, Keisuke)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：30880116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：piRNAはゲノム中に存在する非自己因子であるトランスポゾンを選択的に抑制する。この際、piRNAクラスターと呼ばれるゲノム中の領域が一種の記憶装置として機能し、piRNAクラスター中のトランスポゾン断片からpiRNAを産生することでトランスポゾンの発現を抑制しているとされている。一方、現存する生物のゲノムを使った解析からは、“今現在” piRNAクラスターが存在することは分かるものの、どの様にして“新たに”成立するかは分からない。本研究では、種としては同一の、カイコ培養細胞ゲノム配列とカイコ個体ゲノム配列を比較することで、piRNAクラスターの“種”となりうる配列群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコ培養細胞にはtorimochiと呼ばれるpiRNAクラスターが存在することが判明している。この配列は外来配列を捕獲し、そこからpiRNAクラスターを作るとして同定された。本研究では、このtorimochiが実は単一の大きなトランスポゾンであったことを明らかにした。さらに、カイコ培養細胞とカイコ個体のゲノム情報の比較によって、培養細胞において最も活発に転移しているトランスポゾンであることがわかった。そこで、同様に培養細胞において活発に転移しているトランスポゾンを複数同定することに成功した。今後は、これらの配列がpiRNAクラスター成立条件の解明の足がかりになると考えている。

研究成果の概要(英文)：piRNAs selectively repress transposons, which are non-self elements in the genome. It is believed that regions in the genome called piRNA clusters function as a kind of storage of transposon fragments and suppress transposon expression by producing piRNAs from transposon fragments in the piRNA clusters. Although analyses of the genomes of existing organisms indicate that piRNA clusters exist "at present," it is not clear how they are newly established. In this study, by comparing the genome sequences of cultured silkworm cells and individual silkworms, we identified a set of sequences that could be the "seeds" of piRNA clusters.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA ゲノム カイコ BmN4 バイオインフォマティクス

## 1 . 研究開始当初の背景

ランスポズンは、ゲノム中に存在する利己的な転移因子であり、自身がコードする転移酵素を利用しゲノム中を飛び回り増殖する。また、ヒトゲノムでは五割程度を占める一方で、トランスポズンの転移が遺伝子領域に起きると当該遺伝子は破壊される。そのため、次代へと伝わる生殖細胞においてはトランスポズンの転移を特に抑制する必要がある、トランスポズン抑制機構の中核をなすのが piRNA と呼ばれる小分子 RNA である。

しかし、通常の遺伝子とトランスポズンは塩基配列という点では同じであり、トランスポズン特異的な抑制の実現には、トランスポズンのみを見分ける機構が必要である。それを実現するのが、piRNA クラスタと呼ばれるゲノム中の領域である。piRNA クラスタにはトランスポズンの断片が集積されており、この断片を元に piRNA を産生するため、配列特異的にトランスポズンを抑制できる。このように "今現存する piRNA クラスタがどのようなものか" はわかりつつある一方で "どのようにして新たに piRNA クラスタにトランスポズンの断片を集積し、そこから piRNA を作るようになるのか" という過程は不明である。最近 Molecular Cell 誌に発表された論文では、piRNA クラスタの保存性は高くなく、進化的に不安定であることが示された (Gebert et al., 2021)。このことは、裏を返せば piRNA クラスタは生まれては消えていくことを繰り返しているゲノム領域であることを意味する。

## 2 . 研究の目的

カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞は piRNA 研究でよく用いられている培養細胞である。その BmN4 細胞で発見された piRNA クラスタとして torimochi がある。本研究では、新規に transposon をトラップする torimochi の様な piRNA クラスタに着目したゲノムワイドな探索を行う。これにより、成長中の若い piRNA クラスタを網羅的に同定し、piRNA クラスタが新たにトランスポズンをトラップするための条件や、新たに piRNA クラスタになるための条件を一般化する。これらの達成を通じて、どのようにして新たな piRNA クラスタが成立し、成長していくのか、を明らかにする。

## 3 . 研究の方法

本研究では、torimochi の様に新規に transgene をトラップし、そこから piRNA を産生するような piRNA クラスタを網羅的に同定する。具体的には、GFP 陽性細胞に対して 新規に GFP 断片を転移させ、その転移先と piRNA 産生、GFP 発現量の対応を取得する (図 3)。 GFP の断片は GFP タンパク質にならないが、piRNA の材料となった場合、元々存在する GFP を in trans に抑制することが可能である。すると、転移させた配列の一部は piRNA クラスタに挿入され、GFP の断片に由来する piRNA の産生量に応じて GFP が抑制される。そこで、GFP の発現量を指標に FACS で細胞を回収し、long read シークエンサーを用いて GFP 抑制時に特異的な挿入箇所を同定し、さらにその際の piRNA の産生量を small RNA seq によって大規模に収集する。これらのデータを詳細に解析することで、新規の piRNA 産生に寄与するゲノム中の領域を網羅的に特定する。また、transgene に薬剤耐性遺伝子を導入することで、

piRNA を産生し易いゲノム中の領域 ( transgene があり、GFP 蛍光がない ) と、piRNA を産生しにくいゲノム中の領域 ( transgene があり、GFP 蛍光がある ) を別々に同定することができる。これによって、transgene が挿入されやすい場所と piRNA を産生しやすい場所を分けて議論することが可能になる。

次に、piRNA を産生しやすい領域と産生しにくい領域について、その違いを説明する特徴を、様々なデータベースを用いた横断的なバイオインフォマティクス解析によって明らかにする。これらの達成によって、新たに piRNA クラスターになりつつある配列の網羅的同定と、それらの特徴を一般化することで、どのようにして新たな piRNA クラスターが成立し、成長していくのか、を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

本研究では、この torimochi が実は単一の大きなトランスポゾンであったことを明らかにした。さらに、long-read シークエンサーを用いてカイコ培養細胞ゲノム配列を取得し、torimochi と同様に活発に転移しているトランスポゾン配列の網羅的な同定を試みた。その結果、torimochi が培養細胞において最も活発に転移しているトランスポゾンであることが判明した。さらに、torimochi と同様に培養細胞において活発に転移しているトランスポゾンを複数同定することに成功した。この成果は、piRNA クラスター成立条件の解明の足がかりになるような配列の同定に成功したと言える。以上の内容は論文投稿中である。

また、新たに外来配列を導入し、piRNA クラスターにトラップされたかどうかを判別するレポーターシステムの構築にも成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 漆 嘯、庄司 佳祐、泊 幸秀
2. 発表標題 カイコ培養細胞を用いたpiRNAクラスターの形成メカニズムの解明
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回大会（蚕糸・昆虫機能利用学術講演会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 漆 嘯、庄司 佳祐、泊 幸秀
2. 発表標題 カイコ培養細胞を用いたpiRNAクラスターの形成メカニズムの解明
3. 学会等名 RNA frontier meeting 2021
4. 発表年 2021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
---------	---------