

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 4 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：2021～2022

課題番号：21K20629

研究課題名(和文) piRNA clusterの転写を担う因子Rhinoの標的認識機構

研究課題名(英文) Target-recognition mechanism of Rhino, a factor responsible for transcription of piRNA clusters.

研究代表者

齋藤 絡 (SAITO, Raku)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：60907377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：HP1 familyタンパク質Rhinoはショウジョウバエ雌性生殖細胞においてpiRNA cluster(以下クラスター)の転写を担うが、Rhinoがどのようにしてゲノム中の特定箇所をクラスターとして樹立・維持・定義するのは不明な点が多い。本研究では生殖組織体細胞由来培養細胞を用いて、Rhinoがショウジョウバエにおいて報告のない新規ヒストン修飾Xと共局在すること、Xの修飾を担うと考えられる酵素のKDでRhinoの局在が減少すること、等を明らかにできた。XはRhinoのK9me3への結合を増強することでRhino recruitに関わっていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ショウジョウバエで報告例のないヒストン修飾XがRhinoと共局在することを見出すことができた。RhinoはpiRNA clusterを定義する因子だが、Rhinoがclusterをどのように樹立・維持・記憶するのは不明な点が多い。Xの機能と制御を解明することはclusterの定義システムの理解につながり、piRNA経路の源流部分を理解できると考えられる。Xの修飾に関わる遺伝子については既に候補が得ており、引き続き研究を行う。

研究成果の概要(英文)：HP1 family protein Rhino is responsible for transcription of dual-strand piRNA clusters in the Drosophila female germline. However, how Rhino establishes, maintains, and defines dual-strand piRNA clusters in the genome remains unclear. In this study, using germline-derived somatic cell cultures, I was able to show that Rhino co-localizes with a novel histone modification X, which has not been reported in Drosophila. The genomic localization of Rhino is reduced by KD of the enzyme thought to be responsible for X modification. X may be involved in Rhino recruit by enhancing Rhino binding to K9me3.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：piRNA cluster piRNA エビジェネティクス ヒストン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞における Transposable Element (TE)の転移は宿主ゲノムの破壊を引き起こす可能性があり、その制御は次世代に適切な遺伝情報を受け渡すのに重要である。ショウジョウバエ生殖組織で TE の増殖を抑制する機構の一つに piRNA がある。piRNA は生殖細胞で働く small RNA であり、piRNA cluster と呼ばれる転移活性を失った TE の集合領域から転写された RNA を前駆体として生成され、配列が相補的な TE の増殖を抑制する。piRNA cluster の転写には HP1 タンパク質のホモログ Rhino が関わるということが知られ、他の TE と piRNA cluster を区別して piRNA cluster だけに特異的に局在し、その転写を促す。しかしながら、Rhino が TE と piRNA cluster を区別して後者だけに選択的に局在するメカニズムは全く明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

piRNA 経路の最上流部分の仕組みの理解を目標として、Rhino の標的認識機構、すなわち「Rhino はどのように piRNA cluster にのみ特異的に局在するのか」を解明することを本研究の目的とした。

Rhino による piRNA cluster の転写・定義づけについて、これまでに主に 2 つのグループが研究をおこなってきた。William E. Theurkauf らは、Rhino の変異が piRNA の適切な産生を阻害することを報告すると<sup>[1]</sup>、Rhino がゲノム上で piRNA cluster に局在し、他因子と複合体を形成することを報告した<sup>[2]</sup>。Julius Brennecke らも複合体形成を報告し<sup>[3]</sup>、複合体が生殖細胞特異的に発現する転写因子を piRNA cluster にリクルートすることを示した<sup>[4]</sup>。Julius Brennecke らは本研究遂行中の 2022 年にも、Rhino が piRNA cluster に局在するための因子として Kipferl を同定し、Kipferl のもつ Zinc-Finger ドメインの配列嗜好性と Rhino 自身が持つ H3K9me3 への親和性が piRNA cluster への局在に重要であることを示した<sup>[5]</sup>。これらの Rhino の作用機序に関する報告によって、Rhino がゲノムの特定箇所を piRNA cluster として定義する仕組みや、Rhino による piRNA cluster の転写の仕組みが明らかにされつつある。

一方、Rhino が piRNA cluster に局在するためには maternally-inherited piRNA が必要であるとの報告がある<sup>[6]</sup>。これは、一度 piRNA cluster が形成されれば継代的に piRNA が遺伝し続けることで piRNA cluster の位置が記憶され続けることを意味する。一方、piRNA cluster となるゲノム箇所から最初の piRNA が生成される際に、どのようにして Rhino がそのゲノム箇所に局在できたのかについては全く明らかではない。この問いを解決することで、前述の目的を達成する。

## 3. 研究の方法

Rhino は HP1 タンパク質であり、H3K9me3 に結合することが先行研究で示されている。従って、Rhino が H3K9me3 だけでなく piRNA cluster に特有のクロマチンマークも標的とし、TE と piRNA cluster の H3K9me3 を区別しているのではないかと考えた。Rhino が標的とする piRNA cluster 上のクロマチンマークを同定するため、以下の方法をとった。

- ショウジョウバエ生殖組織由来培養細胞(以下 OSC)における核内 Rhino 局在様態の確認
- OSC における Rhino ゲノム局在箇所の同定
- Rhino 局在箇所特異的なクロマチンマークの探索
  - で同定されたマークの修飾遺伝子の探索
  - で同定された遺伝子 KD 時のクロマチンの変化の調査

## 4. 研究成果

OSC において Rhino を新規に発現させる際の発現条件の検討を行なった。検討の結果、Rhino を endogenous に発現させた場合、特定の発現量を超えると Rhino が核内で foci を形成することを発見した。Rhino が OSC 核内で foci を形成したことは、Rhino が OSC ゲノムの特定の箇所に特異的に局在していることを示しており、OSC が本研究計画を遂行する上で問題のない材料であることを示唆した。

ChIP 実験における固定や sonication 等の条件検討を行い、Rhino を適切に ChIP できる条件を見出した。この条件のもとで Rhino ChIP-seq を行った結果、OSC における Rhino 新規発現時のゲノム局在箇所を同定できた。Rhino は OSC においても piRNA クラスターの一部に局在しており、また OSC 特異的な局在箇所も同定することができた。

Rhino を用いたヒストンペプチドスクリーニングで得られた結果をもとに、2 で同定した Rhino 局在箇所に同所的に存在するヒストン修飾を ChIP-seq によって探索した。この結果、ショウジョウバエにおいて報告例のないヒストン修飾 X が Rhino 新規局在箇所と同所的に存在することを見出した。

で確認された Rhino と共局在するヒストン修飾について、候補となる複数の遺伝子を KD した。この結果、特定の遺伝子 Y の KD 下で Rhino foci が崩壊することを見出した。

Y の KD 下でクロマチンにどのような変化が生じているか調査した。この結果、Rhino 局在箇所では X が低下していたが、H3K9me3 には変化がなかった。

これらの結果は、Y がゲノム上で X の修飾を通して Rhino の H3K9me3 への結合を補助し、Rhino のゲノムの特定箇所への局在に機能する可能性を示唆している。この研究成果について、OSC における Rhino 局在箇所の特徴や生物学的意義を X の機能と制御から理解することを目指す研究を別の科研費で申請している。この続きとなる研究がまとめ次第、論文を投稿する予定である。

なお前述したように、本研究期間の間にも Rhino の piRNA cluster への局在に関して重要な知見が他の複数のグループから報告されている。Julius Brennecke らのグループは、ショウジョウバエ個体卵巣において一部の piRNA cluster への Rhino 局在に DNA 結合タンパク質である Kipferl が必要であることを示した。また Antoine Boivin らのグループは、ヒストン脱メチル化酵素 KDM3 の卵巣における KD によって Rhino の局在がゲノム上を spread していくことを報告した。これらの知見は本研究の成果と矛盾するものではないが、本研究と競争的なテーマであるため、学会発表等を含む成果報告は論文投稿後に行う予定である。

[1] Klattenhoff et al. *Cell* 138(6):1137-49. 2009.

[2] Mohn et al. *Cell*. 157(6):1364-1379. 2014.

[3] Zhang et al. *Cell*. 157(6):1353-1363. 2014.

[4] Andersen et al. *Nature*. 549(7670):54-59. 2017.

[5] Baumgartner et al. *eLife*. 11:e80067. 2022.

[6] Le Thomas et al. *Genes Dev*. 28(15):1667-80. 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田博和, 平形樹生, 齋藤絡, 塩見美喜子
2. 発表標題 piRNAクラスターの選択性に関わる因子群の核局在と顆粒形成
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------