

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20612

研究課題名（和文）哺乳類受精卵で発現するトランスポゾン由来キメラmRNAの新規翻訳領域の網羅的探索

研究課題名（英文）Comprehensive search for novel translational regions of transposon-derived chimeric mRNAs expressed in mammalian embryos

研究代表者

本多 慎之介（Honda, Shinnosuke）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60964484

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）：oxford nanopore社のロングリードシーケンサーであるMinIONを用いてマウスおよびウシの胚性ゲノム活性化（ZGA）の時期の受精卵の高カバレッジロングリードRNA-seqを行った。高クオリティのトランスポゾン由来キメラmRNAライブラリーを作成するため、受精卵は200個ずつ2区画回収し、それぞれ十分なデータを取得済みである。低分子翻訳阻害剤とペアリードシーケンスを用いたGTICT-seqの開発は、ヒト培養細胞であるHEK293Tを用いて翻訳開始領域付近のcDNA断片を作成し、次世代シーケンサーによる解析を行っている。これらのデータは近日学術論文として発表する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類受精卵で高発現するトランスポゾンは、受精卵の発生や細胞分化に寄与しているという報告もあるが、大部分の機能は未解明のままである。我々は受精して生命が始まった直後の細胞に焦点を当ててトランスポゾンの機能を網羅的に探索している。研究期間中に論文発表には至らなかったが、すでに新たな翻訳開始領域の網羅的解析手法であるGTICT-seq手法を開発するとともに、トランスポゾン由来キメラmRNAのライブラリー作成も終了している。これらのデータは今後の哺乳類受精卵の特殊な細胞特性を知る上で大いに役立つとともに、本研究で開発した手法はトランスポゾンを研究する上で有用な解析スキームになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：High coverage long-read RNA-seq of mouse and bovine embryos during zygotic genome activation (ZGA) was performed using MinION, a long-read sequencer from oxford nanopore. To generate a high-quality transposon-derived chimeric mRNA library, 200 embryos were collected in two biological replicates. We already obtained sufficient data from this experiment. For the establishment of GTICT-seq using small molecule translation inhibitors and paired read sequencing, cDNA fragments just after the translation initiation region were generated using HEK293T, and now we are analyzing this cDNA using next-generation sequencers. These data will soon be published as a journal article.

研究分野：生殖生物学分野

キーワード：トランスポゾン 受精卵 胚性ゲノムの活性化 キメラ転写産物 哺乳類 進化 GTICT-seq ロングリードシーケンス

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

DNA トランスポゾンやレトロトランスポゾンを含むトランスポゾンはゲノム上を転移する配列であり、哺乳類ゲノムの約 40% を占める。トランスポゾンの活性化は重要な遺伝子の破壊や近傍遺伝子の攪乱を引き起こすため、癌細胞や生殖細胞などを除いて発現が抑制されている。哺乳類の受精卵では胎盤組織が分化する直前に一部のトランスポゾンが発現しており (Macfarlan ら、2012 年)、胚性幹細胞 (ES 細胞) でこれらのトランスポゾンを活性化させると胎盤組織への分化能を獲得するが (Yang ら、2020 年)、その仕組みは未だ解明されていない。また、これらのトランスポゾンは転写される際に下流に存在する宿主の遺伝子を巻き込んでキメラ mRNA を生成する。キメラ mRNA の多くは 5' 末端の配列が変化しているため翻訳開始コドンも移動すると考えられるが、キメラ mRNA の翻訳領域に関する報告は少ない。

トランスポゾンはゲノム上に多数存在するため、ショートリードシーケンスを用いた従来の RNA-seq では転写産物の網羅的解析は難しい。また、キメラ mRNA はスプライシングを行うことが知られており (Huang ら、2017 年)、完全長ライブラリーは未だ構築されていない。

申請者は、マウス受精卵でキメラ mRNA として発現する遺伝子の一つで、ヒストンアルギニン残基をメチル化する酵素である *Prmt6* が、トランスポゾン由来の配列に存在する翻訳開始コドンを用いて N 末端側に伸長したキメラタンパク質 (PRMT6^{MT2B2}) を翻訳することを発見した。また、PRMT6^{MT2B2} と通常の PRMT6 タンパク質とはメチル化特異性が異なり、PRMT6^{MT2B2} のみが受精卵の胎児と胎盤の細胞分化を制御することも解明した。この研究から、キメラ mRNA から翻訳される未知の配列のタンパク質は、哺乳類のみが持つ胎盤組織への分化を理解する上で重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類受精卵で発現するトランスポゾンとのキメラ mRNA の翻訳領域を網羅的に探索し、受精卵の細胞分化に重要な新規タンパク質配列を同定することである。

3. 研究の方法

まず、マウスおよびウシ受精卵を用いて高カバレッジのロングリード RNA-seq を行い、通常の RNA-seq では困難であったキメラ mRNA の完全長ライブラリーの構築を行う (図 1、下部)。

次に、キメラ mRNA の翻訳開始コドンおよび翻訳領域を同定する。トランスポゾンはゲノム上に多数存在するため、翻訳開始コドン付近のみをターゲットにした通常の解析手法では遺伝子座を区別することができない。申請者はキメラ mRNA の新規翻訳領域を特定するため、GTI-seq 法 (Lee ら、2012 年) と LACE-seq 法 (Su ら、2021 年) を組み合わせたアプローチ (Global Translation Initiation on Chimeric Transcripts sequence: GTICT-seq 法) を考案した (図 2)。GTI-seq とは低分子の翻訳阻害剤である LTM を用いてリボソームを翻訳開始コドンに停留させ、翻訳開始コドンの位置を特定する手法である。また、mRNA 上に RNA 結合タンパク質が存在するとそこで逆転写反応が停止することがわかっている (図 2、中部)。本研究では LTM 処理した細胞からリボソーム RNA 複合体を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写した後、ペアエンドの次世代シーケンサー解析を行うことで翻訳開始コドンおよびその下流の翻訳領域を同定する。

新規翻訳領域を持つキメラ mRNA について、マウス受精卵に Cas9 および gRNA を導入することでキメラ mRNA を転写するトランスポゾンをロックアウトした受精卵を作成する。作成した受精卵は胚盤胞期まで体外培養を行い、発生や細胞分化への影響を確認する。

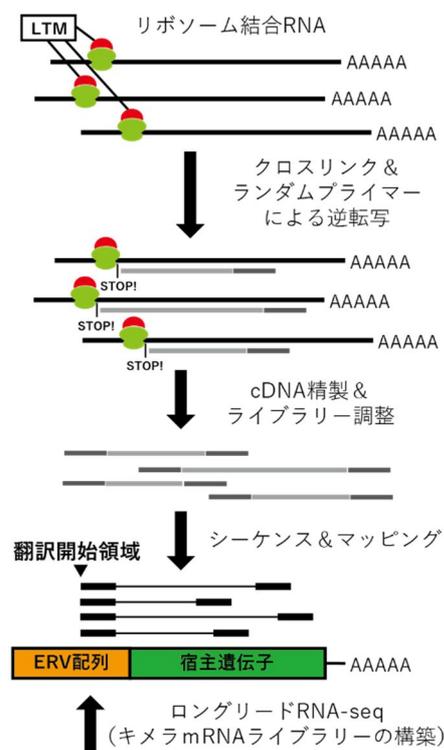


図 1 GTICT-seq および
ロングリードシーケンス

4. 研究成果

oxford nanopore 社のロングリードシーケンサーである MinION を用いてマウスおよびウシの胚性ゲノム活性化 (ZGA) の時期の受精卵の高カバレッジロングリード RNA-seq を行った。高クオリティのトランスポゾン由来キメラ mRNA ライブラリーを作成するため、受精卵は 200 個ずつ 2 区画回収し、それぞれ十分なデータを取得済みである。マウスおよびウシそれぞれのデータを解析したところ、すでに報告されているトランスポゾン-宿主遺伝子のキメラ mRNA を再検出することができた (図 2、3)。また、これらデータを解析することで新たなキメラ mRNA や新規遺伝子も多数検出している。

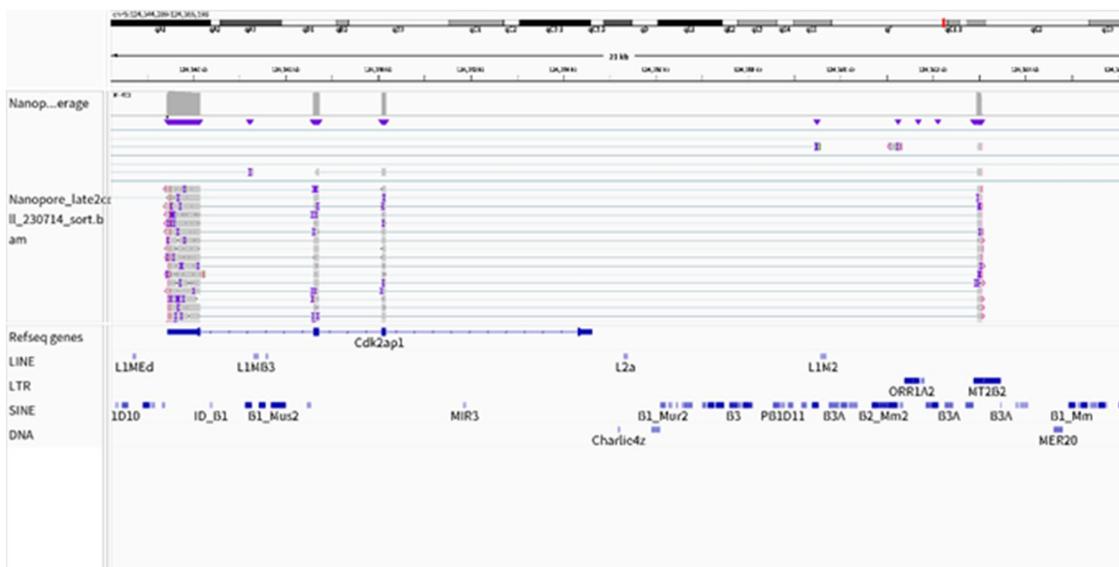


図 2 マウス受精卵におけるトランスポゾン由来キメラ mRNA

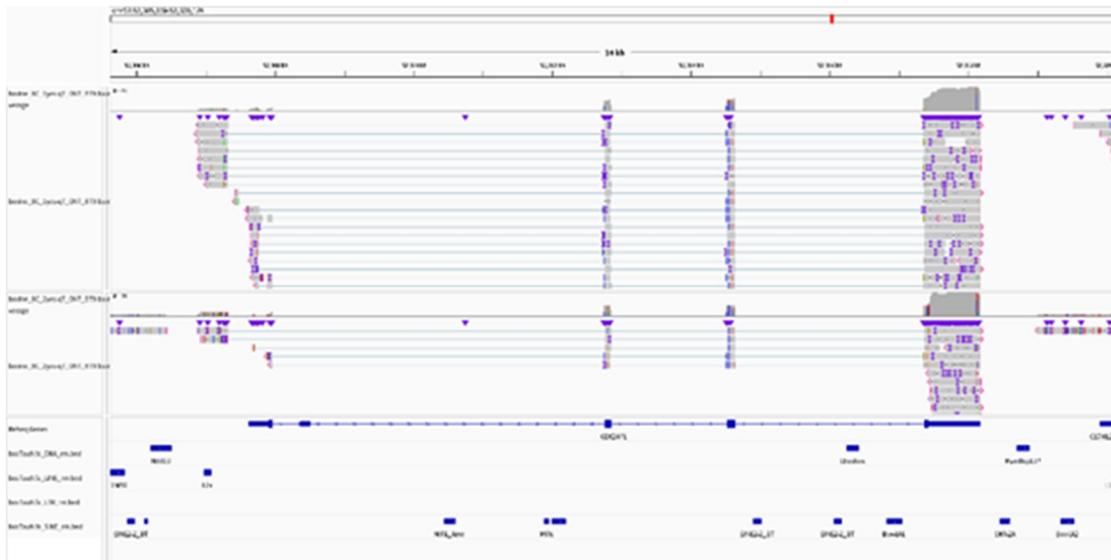


図 3 ウシ受精卵におけるトランスポゾン由来キメラ mRNA

低分子翻訳阻害剤とペアリードシーケンスを用いた GTICT-seq の開発は、ヒト培養細胞である HEK293T を用いて翻訳開始領域付近の cDNA 断片を作成し、次世代シーケンサーによる解析を行っている。これらのデータは近日学術論文として発表する予定である。

また、これまでのトランスポゾンに着目した一連のデータ解析において、マウス受精卵の 2 細胞期後期に *Pcgf5* という遺伝子がトランスポゾン的一种である MERVL 由来のキメラ mRNA として転写されていることを同定している。この遺伝子について、siRNA による遺伝子抑制や CRISPR システムによる遺伝子ノックアウトを行っており、これまでの解析から、*Pcgf5* はマウス ZGA 期ではほとんど MERVL 配列から転写され、*Pcgf5* の抑制は発生遅延または胚性致死を引き起こすことがわかっている。本データは国際学会において発表しており、近日学術論文としても発表予定

である。

哺乳類受精卵で高発現するトランスポゾン、受精卵の発生や細胞分化に寄与しているという報告 (Modzelewski ら、2021 年; Honda ら、2024 年) もあるが、大部分の機能は未解明のままである。我々は受精して生命が始まった直後の細胞に焦点を当ててトランスポゾンの機能を網羅的に探索している。研究期間中に論文発表には至らなかったが、すでに新たな翻訳開始領域の網羅的解析手法である GTICT-seq 手法を開発するとともに、トランスポゾン由来キメラ転写産物のライブラリー作成も終了している。これらのデータは今後の哺乳類受精卵の特殊な細胞特性を知る上で大いに役立つとともに、本研究で開発した手法はトランスポゾン研究する上で有用な解析スキームになると考えられる。

<引用文献>

Macfarlan, T. S., Gifford, W. D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H. M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., & Pfaff, S. L. (2012 年). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, *487*(7405), 57-63.

<https://doi.org/10.1038/nature11244>

Yang, F., Huang, X., Zang, R., Chen, J., Fidalgo, M., Sanchez-Priego, C., Yang, J., Caichen, A., Ma, F., Macfarlan, T., Wang, H., Gao, S., Zhou, H., & Wang, J. (2020 年). DUX-miR-344-ZMYM2-Mediated Activation of MERVL LTRs Induces a Totipotent 2C-like State. *Cell Stem Cell*, *26*(2), 234-250.e7.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.004>

Huang, Y., Kim, J. K., Do, D. V., Lee, C., Penfold, C. A., Zylicz, J. J., Marioni, J. C., Hackett, J. A., & Surani, M. A. (2017 年). Stella modulates transcriptional and endogenous retrovirus programs during maternal-to-zygotic transition. *eLife*, *6*, e22345.

<https://doi.org/10.7554/eLife.22345>

Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S.-X., Shen, B., & Qian, S.-B. (2012 年). Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(37).

<https://doi.org/10.1073/pnas.1207846109>

Su, R., Fan, L.-H., Cao, C., Wang, L., Du, Z., Cai, Z., Ouyang, Y.-C., Wang, Y., Zhou, Q., Wu, L., Zhang, N., Zhu, X., Lei, W.-L., Zhao, H., Tian, Y., He, S., Wong, C. C. L., Sun, Q.-Y., & Xue, Y. (2021 年). Global profiling of RNA-binding protein target sites by LACE-seq. *Nature Cell Biology*, *23*(6), 664-675.

<https://doi.org/10.1038/s41556-021-00696-9>

Modzelewski, A. J., Shao, W., Chen, J., Lee, A., Qi, X., Noon, M., Tjokro, K., Sales, G., Biton, A., Anand, A., Speed, T. P., Xuan, Z., Wang, T., Risso, D., & He, L. (2021 年). A mouse-specific retrotransposon drives a conserved Cdk2ap1 isoform essential for development. *Cell*, *184*(22), 5541-5558.e22.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.021>

Honda, S., Hatamura, M., Kunimoto, Y., Ikeda, S., & Minami, N. (2024 年). Chimeric PRMT6 protein produced by an endogenous retrovirus promoter regulates cell fate decision in mouse preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, *110*(4), 698-710.

<https://doi.org/10.1093/biolre/ioae002>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Shinnosuke, Hatamura Maho, Kunimoto Yuri, Ikeda Shuntaro, Minami Naojiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Chimeric PRMT6 protein produced by an endogenous retrovirus promoter regulates cell fate decision in mouse preimplantation embryos	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 698 ~ 710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioae002	査読の有無 有
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 YAMAMOTO Takuto, HONDA Shinnosuke, IDEGUCHI Issei, SUEMATSU Motoki, IKEDA Shuntaro, MINAMI Naojiro	4. 巻 69
2. 論文標題 A more accurate analysis of maternal effect genes by siRNA electroporation into mouse oocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 118 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-122	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinnosuke Honda, Shuntaro Ikeda, Naojiro Minami
2. 発表標題 ERVL-PRMT6 chimeric protein regulates cell fate decision in mouse preimplantation embryos
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本多慎之介、池田俊太郎、南直治郎
2. 発表標題 マウス着床前胚で発現するMERVLとPRMT6のキメラタンパク質は細胞分化を制御する
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 本多慎之介、池田俊太郎、南直治郎
2. 発表標題 マウス初期胚発生におけるType Iアルギニンメチル化酵素間の補完作用に関する研究
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増子聖士、南直治郎、池田俊太郎、本多慎之介
2. 発表標題 マウス内在性レトロウイルスが転写を制御するPcgf5の初期胚発生過程での機能解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Mashiko, Naojiro Minami, Shuntaro Ikeda, Shinnosuke Honda
2. 発表標題 Pcgf5 transcribed from endogenous retroviral element plays a critical role in early mouse embryos
3. 学会等名 The 5th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
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
---------	---------