| 41　レトロトランスポゾン制御と生殖機能不全の接点 | 齋藤　都暁 |
|---|---|

**【目的】**Piwi はショウジョウバエ生殖細胞の維持継承に必須な蛋白質であり、piRNA と呼ばれる小分子 RNA と複合体を形成しレトロトランスポゾンの発現を転写レベルで抑制する。しかし、レトロトランスポゾンの脱抑制がなぜ生殖機能不全を引き起こすかは不明である。近年、我々は Piwi がレトロトランスポゾンのみならず周囲領域のクロマチン状態やレトロトランスポゾンがイントロン内に挿入された遺伝子の発現も抑制することを発見した（Mol. Cell 2016）。すなわち、Piwi-piRNA 複合体は蛋白質コード遺伝子の発現も抑制し得ると言える。そこで本研究は、Piwi の消失による生殖機能不全はレトロトランスポゾンというよりも蛋白質コード遺伝子の発現異常によって引き起こされるという仮説をたて、これを検証することとした。近年、レトロトランスポゾンのゲノム内配置が蛋白質コード遺伝子の発現を制御する「足場」となることが報告されており、本研究が新たな生殖細胞形成機構の解明とその関連因子の同定につながることが期待される。

**【方法】**本研究は Piwi-piRNA 複合体がレトロトランスポゾンのみならず、タンパク質コード領域のエピゲノムを変化させ、これが生殖幹細胞の維持異常という表現型に直結しているという仮説をたてており、以下の 2 つのアプローチをとる。

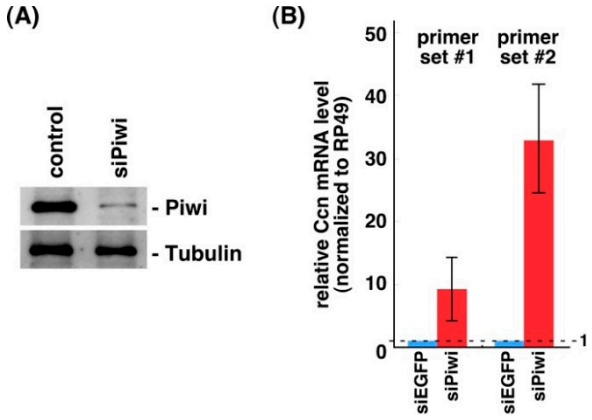
1. Piwi-piRNA 複合体が制御する標的タンパク質遺伝子の同定
2. レトロトランスポゾンの抑制機構解明からのアプローチ

1. の解析では個々の標的遺伝子候補から実際に Piwi-piRNA 複合体によって制御される遺伝子を絞り込む。一方、2. の解析では、新たなレトロトランスポゾン抑制因子を同定し、その中でレトロトランスポゾンのみを制御する蛋白質がないか探索する。もしそのような蛋白質が得られれば、実際に蛋白質コード遺伝子の制御と生殖細胞形成の直接的接点の証明になると考える。

**【結果】**1. 細胞外マトリックス結合蛋白質と予測される *ccn* 遺伝子が Piwi ノックダウン細胞で発現上昇することを見出した。2. 新規クロマチン制御因子として CG14438 遺伝子を見出した。CG14438 をノックダウンするとトランスポゾンの発現が上昇したが、piRNA 量に変動は認められなかった。CG14438 ノックダウン細胞では、転写レベルでレトロトランスポゾンの発現が減少していることを ChIP 解析で明らかにした。しかし、mRNA-seq 解析を行った結果、CG14438 はトランスポゾンのみならず、ccn も制御していたことから、当初目的としていたレトロトランスポゾン制御に特異的な因子ではないと結論づけた。

Ccn は細胞間相互作用に働く因子であり、生殖幹細胞とニッチの相互作用に機能する可能性が示唆されている。したがって、*ccn* 遺伝子を有力な Piwi の下流で働く蛋白質コード遺伝子の一つとして位置付け、その制御が実際に生殖細胞形成に必須であるかどうかを今後検討したい。

Piwi ノックダウン細胞における *ccn* 遺伝子の脱抑制



# 41. レトロトランスポゾン制御と生殖機能不全の接点

齋藤　都暁

*情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 系統生物研究センター 無脊椎動物遺伝研究室

Key words：レトロトランスポゾン，piRNA，エピジェネティクス，Piwi，生殖

## 緒　言

ゲノムプロジェクトの成果から、真核生物ゲノムの膨大な領域（ヒトでは 45%）がトランスポゾンもしくはレトロトランスポゾンに占められることが分かった。レトロトランスポゾンはゲノム内を転移する能力を持つ寄生性 DNA 因子であるが、これはゲノムから排除されず、世代を越えて保持される。しかし、レトロトランスポゾンの転移は、生物の次世代継承にとって脅威となるため、その発現は抑制されている。レトロトランスポゾンは多いもので数十万コピー存在し、その配列は塩基置換によって多様なバリエーションがある。従って、レトロトランスポゾンの発現を抑制するには、膨大な種類を認識することが可能な分子システムの存在が考えられる。2006 年、我々を含む複数の研究グループが、Piwi 蛋白質群と結合する piRNA と名付けた約 25 塩基長の小分子 RNA 群を発見した［1，2］。次世代型シーケンサーを用いた解析から、piRNA はレトロトランスポゾンの転写産物に由来し、膨大な種類数（現在報告されているもので数 10 万種類以上）が同定された。また、配列をゲノムにマッピングした結果、piRNA が大部分のレトロトランスポゾン領域をカバーすることが分かった。すなわち、piRNA は抑制を受ける全レトロトランスポゾンの断片化された配列情報である、と言える。Piwi 遺伝子群の変異体は、生殖幹細胞発生異常が起こり不稔となる［3］。piRNA の生合成変異ハエでは、各種レトロトランスポゾンの脱抑制が起こる［2］。以上の結果は、Piwi タンパク質は piRNA をガイド分子としてレトロトランスポゾンを認識し、その発現を抑制していることを示している。

これまでの解析から、Maelstrom、HP1a、CG3893 遺伝子などがトランスポゾン抑制に関わる因子群であることを明らかにしてきた。詳細な機能解明を行った結果、CG3893 は piRNA 生合成には関与しないこと、核局在蛋白質であること、Piwi 同様ショウジョウバエ雌の生殖能に必須であること、Piwi-piRNA 複合体と相互作用すること、CG3893 が持つ Zn-finger motif がトランスポゾンの抑制に必須であること、などを明らかにした［4］。さらに近年、Piwi に対するモノクローナル抗体を用いて、Piwi が相互作用する新たなクロマチン因子、リンカーヒストン H1 を発見した。人工 piRNA による任意領域のエピゲノム改変系を構築し、Piwi がリンカーヒストン H1 とクロマチンとの相互作用を正に制御することを見いだした。一方、ChIP-seq や ATAC-seq などのエピゲノム解析を行ったところ、Piwi-piRNA 複合体はトランスポゾン領域のクロマチン構造を配列特異的に制御するとともに、そのクロマチン構造の制御はトランスポゾン周囲領域へと拡がる（Spread する）ことを見出した。実際、mRNA-seq 解析を行ったところ、100 種以上の蛋白質コード遺伝子の発現が Piwi の機能消失に伴って上昇することを見出している［5］。

Piwi-piRNA 複合体が果たす生物学的重要性は明らかであるが、トランスポゾンの制御の破綻が一体どのようにして生殖機能不全につながるのか、その分子経路は未解明である。過剰に発現したレトロトランスポゾン mRNA が生殖機能不全を引き起こすという考えがある一方、近年、レトロトランスポゾンのゲノム内配置が周囲の蛋白質コード遺伝子の発現を制御する「足場」となることが報告されており、Piwi は直接的に生殖細胞形成に重要な蛋白質コード遺伝子を制御する可能性も出てきた。本研究は Piwi-piRNA 複合体がレトロトランスポゾンのみならず、その周囲領域のタンパク質コード領域のエピゲノムを変化させ、これが生殖幹細胞の維持異常という表現型に直結しているという仮説をたて検証することとした。

*現在の所属：情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 遺伝メカニズム研究系 無脊椎動物遺伝研究室

## 方　法

### 1.　培養細胞 OSC の維持と遺伝子導入

培養細胞 OSC の維持や遺伝子導入は以前の論文と同様に行った［6］。ノックダウンは Nucleofector 4D devise と 96 well shuttle システムを用いて行った。用いた siRNA 配列は以下の通りである。
siEGFP:5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT / 5'-ACUUCAGGGUCAGCUUGCCdTdT、siPiwi:5'-GCUCCCAGGCGUGAAGGUGdTdT /　5'- CACCUUCACGCCUGGGAGCdTdT、siCG14438:5'-GCUAAGGACGCGCUUCAAUdTdT /　5'- AUUGAAGCGCGUCCUUAGCdTdT。

### 2.　RT-qPCR、mRNA-seq 解析、ChIP 解析

培養細胞から ISOGEN によって全 RNA を単離した。DNase（NEB）処理後、エタノール沈殿で全 RNA を精製した。Superscript III を用いて逆転写し、cDNA とした。得られた cDNA を鋳型に定量的 PCR を行った（TAKARA PCR Thermal Cycler Dice）。得られたデータから RP49 遺伝子をインターナルコントロールとしてレトロトランスポゾンの発現量や *ccn* 遺伝子の発現量を相対定量した。mRNA-seq 解析は全 RNA を単離後、poly(A)+RNA を精製した後、NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina を用いてライブラリーを調整した。得られた NGS データを CLC Genomics Workbench を用いて発現量などのデータを解析した。ChIP 解析は岩崎らの方法に従い行った［5］。

## 結果および考察

### 1. OSC が制御する蛋白質コード遺伝子の同定

はじめに piRNA が抑制する標的蛋白質候補遺伝子を探索することとした。piRNA は 1 本鎖 RNA であり、標的は piRNA と相補的な mRNA をコードする遺伝子であることが報告されている。これまでの遺伝学的解析から Piwi は生殖細胞と卵巣性体細胞の空間配置を制御することが分かっており、この空間配置の制御には、細胞間接着分子、たとえば DECad や Fas3 が重要な役割を果たすことが報告されている［6］。実際 Piwi 変異ハエでは DECad の発現が上昇しており、細胞間接着分子の制御が生殖細胞形成における Piwi の重要な役割である可能性が高い。そこで、piRNA によって制御される細胞間接着分子候補を探索したところ、イントロン中にトランスポゾン配列を持つ遺伝子を一つ見出した。これは *ccn* と呼ばれる遺伝子で細胞外マトリックス結合蛋白質である。図 1 に示すように *ccn* 遺伝子では、piRNA がイントロン領域に集中的にマップされる。すなわち、piRNA は *ccn* mRNA のイントロンと相補的な配列である。従って Piwi-piRNA 複合体は、イントロンを含む転写途上の *ccn* mRNA と塩基対を形成することで、その発現を抑制することが予測された。

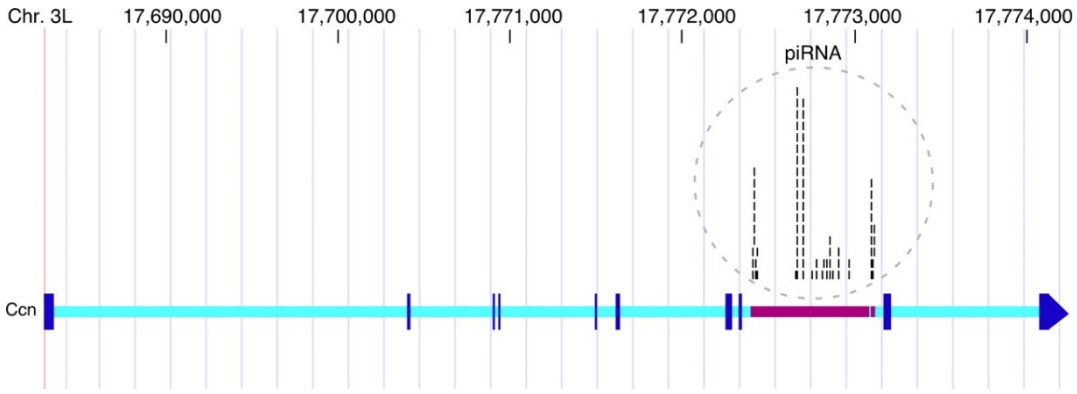



図 1.　*ccn* 遺伝子における piRNA マップ
OSC で得られた Piwi 結合 piRNA 群を黒の線（点線枠内）で示す（ただし、同一配列は 1 つの線に省略した）。計 837 の piRNA が ccn 領域にマップされた。*ccn* 遺伝子のエキソン（青太線）、イントロン（水色細線）、イントロンに含まれるレトロトランスポゾン配列（マゼンタ）をそれぞれ下部に示す。マップされた piRNA は、*ccn* 遺伝子の mRNA と相補的である。

以上の結果から、Piwi が *ccn* 遺伝子を標的とする可能性を実際に検証することとした。*piwi* 遺伝子の発現を RNAi 法を用いてノックダウンし、*ccn* mRNA の発現量を定量した。Western Blot 法を用いて解析した結果、ノックダウンの有効性を確認することができた（図 2A）。次に、mRNA を単離し、RT-qPCR 法によって *ccn* mRNA を定量した。その結果、Piwi ノックダウン細胞において *ccn* 遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった（図 2B）。すなわち *ccn* 遺伝子は Piwi-piRNA 経路の制御下にあることが強く示唆された。

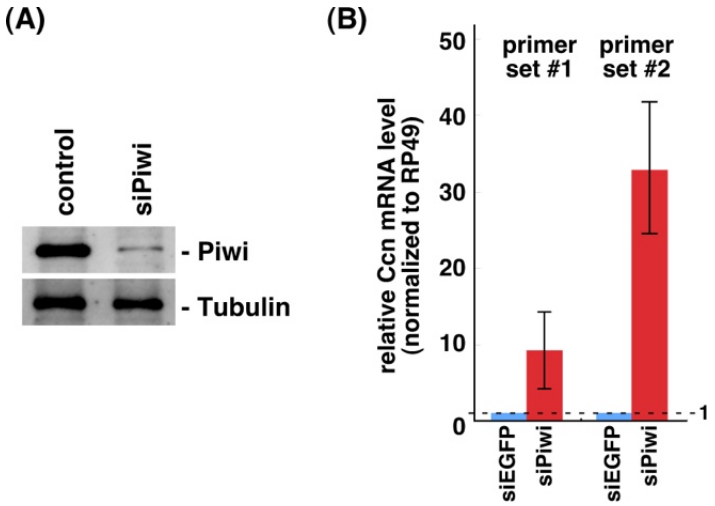



図 2. Piwi ノックダウン細胞における *ccn* 遺伝子の発現量

(A) Piwi に対する siRNA を OSC にトランスフェクションし、western blot 法で RNAi の効果を検証した。ネガティブコントロールとして EGFP に対する siRNA を使用した。

(B) *ccn* 遺伝子の mRNA を定量するため、*ccn* 遺伝子に対し 2 種類の primer set を設計し、RT-qPCR を行った。リボソーム蛋白質の一つである RP-49 を内部コントロールとして *ccn* mRNA の相対量を定量した。

したがって、細胞外マトリックス結合蛋白質と予測される *ccn* 遺伝子が Piwi ノックダウン細胞で発現上昇することが分かった。現在、この制御が実際に生殖細胞形成において重要か検討する実験をハエ個体で行っている。

**2．新規クロマチン制御因子 CG14438 の同定とその機能解明**

新規クロマチン制御因子の同定を試みた結果、CG14438 遺伝子がレトロトランスポゾンの抑制に必須であることを見いだした（図 3）。その脱抑制の効果は、Piwi やヘテロクロマチン因子 HP1a のノックダウンに匹敵しており、レトロトランスポゾン抑制因子として重要な役割を果たすと期待された。

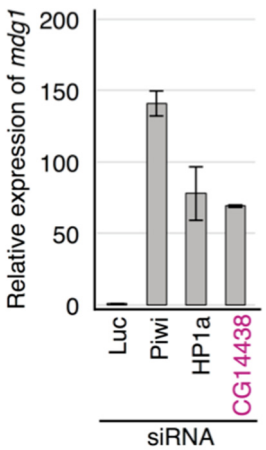



図 3. CG14438 ノックダウン細胞におけるレトロトランスポゾンの脱抑制

CG14438 は約 370kDa のタンパク質であり、C2H2 type の Zn-finger ドメインを有する。したがって、転写因子など核酸との相互作用が予測されるが、それ以外の機能は未知である。そこで、CG14438 遺伝子の機能を探るため、N 末端 200 アミノ酸残基と GST との融合タンパク質を大腸菌で発現、精製し、これを抗原としてモノクローナル抗体の作製を開始した。その結果、当初 370 kDa という巨大蛋白質を認識する抗体を得るのは難しいと予想していたが、特異的に CG14438 を認識する抗体が得られており、免疫沈降可能であることも確認した。現在、ChIP-qPCR 法を駆使して、CG14438 がクロマチンと直接相互作用する可能性を検討している。一方、mRNA-seq 解析を行った結果、CG14438 はトランスポゾンのみならず、ccn も制御していたことから、当初目的としていたレトロトランスポゾン制御に特異的な因子ではないと結論づけた。Ccn は細胞間相互作用に働く因子であり、生殖幹細胞とニッチの相互作用に機能する可能性が示唆されている。したがって、*ccn* 遺伝子を有力な Piwi の下流で働く蛋白質コード遺伝子の一つとして位置付け、その制御が実際に生殖細胞形成に必須であるかどうかを今後検討する予定である。

## 文　献


1) Saito K, Nishida KM, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome. Genes Dev. 2006 Aug 15;20(16):2214-22. DOI: 10.1101/gad.1454806
2) Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. Science. 2006 Jul 21;313(5785):320-4. DOI: 10.1126/science.1129333
3) Lin H, Spradling AC. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary. Development. 1997 Jun;124(12):2463-76. PMID: 9199372
4) Ohtani H, Iwasaki YW, Shibuya A, Siomi H, Siomi MC, Saito K. DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the Drosophila ovary. Genes Dev. 2013 Aug 1;27(15):1656-61. DOI: 10.1101/gad.221515.113
5) Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H, Saito K. Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. Mol Cell. 2016 Aug 4;63(3):408-19. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.06.008
6) Saito K, Inagaki S, Mituyama T, Kawamura Y, Ono Y, Sakota E, Kotani H, Asai K, Siomi H, Siomi MC. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila. Nature. 2009 Oct 29;461(7268):1296-9. DOI: 10.1038/nature08501