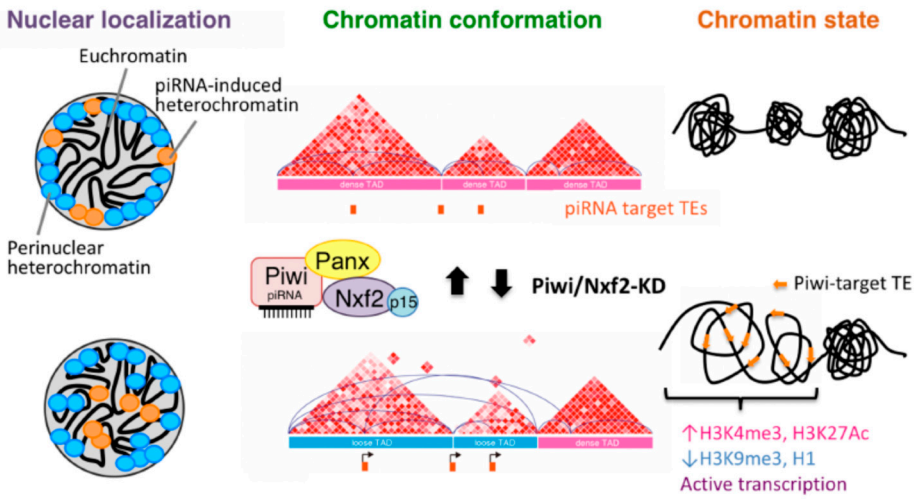
191　非コードRNAと転移因子が制御するゲノム三次元構造	岩崎　由香

【目的】真核生物ゲノムはトランスポゾンの無秩序増殖の脅威から自己防衛しつつ、生存に必須な遺伝子群の発現を確保している。近年、この自己防衛に PIWI-interacting RNA（piRNA）と呼ばれる 20〜30 塩基長の非コード小分子 RNA を中心とした RNA サイレンシングが主要な役割を果たすことが示唆された。piRNA は主にトランスポゾンに由来し、PIWI タンパク質群と複合体を形成する。*PIWI* 遺伝子変異個体では、トランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞発生異常が起こり、不稔となる。以上のことから、PIWI-piRNA 複合体はトランスポゾンを選択的に抑制することが示唆される。ショウジョウバエ PIWI タンパク質の一種である Piwi は核に局在し、piRNA と複合体を形成することにより、標的トランスポゾンとその周辺ゲノム領域に抑制性ヒストン修飾を付加し、転写を制御する。これまでに、Piwi-piRNA 複合体による転写制御の実態は、リンカーヒストン H1 等複数の因子の誘導を伴うクロマチン構造の変動によることを明らかにした。さらに、この制御が PolII の抑制を介した転写制御とヘテロクロマチン形成の二段階からなることを示した。これらのことから、piRNA は新たなエピゲノム因子として機能すると考えられる。本研究では、piRNA が標的トランスポゾン領域のヘテロクロマチン形成に伴うゲノムワイドな影響の解明を目指す。

【方法】ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞（Ovarian Somatic Cell：OSC）を用いて Piwi ノックダウン条件下において Hi-C 解析を行い、Piwi による制御が阻害された際のゲノムの三次元構造の変化を解析した。さらに、同条件下で Lamin DamID-seq 解析および Oligo-FISH 解析を行い、転写制御の際に観察される核内での位置関係を明らかにした。これらに加えて、ヒストン修飾などを ChIP-seq 解析、遺伝子発現量を RNA-seq 解析で網羅的に同定することで、piRNA の制御に伴うエピゲノム変化の全体像を明らかにした。

【結果】Hi-C 解析の結果、Piwi ノックダウン条件下では、Piwi-piRNA に制御されるトランスポゾンが挿入されているゲノム領域特異的に TAD 内相互作用頻度の減少と長距離間相互作用頻度の増加が確認された。さらに、Lamin DamID-seq 解析および Oligo-FISH 解析の結果、Piwi-piRNA 標的トランスポゾンをコードするクロマチン領域について、Piwi ノックダウンに伴い核ラミナとの相互作用が減少することを明らかにした。これらの結果は、Piwi-piRNA によるトランスポゾンの抑制は、局所的な転写抑制にとどまらず、標的トランスポゾンを中心とした核内での空間的な配置やゲノム三次元構造の制御を伴うダイナミックな核内構造体形成であることを示唆する。

Piwi-piRNA は様々な階層でのエピゲノム制御を介してトランスポゾンを抑制する



191. 非コードRNAと転移因子が制御するゲノム三次元構造

岩崎　由香

慶應義塾大学医学部 分子生物学教室

Key words：非コードRNA，転移因子，転写制御，クロマチン状態，ゲノム構造

緒　言

真核生物ゲノムはトランスポゾンの無秩序増殖の脅威から自己防衛しつつ、生存に必須な遺伝子群の発現を確保している。近年、この自己防衛にPIWI-interacting RNA（piRNA）と呼ばれる20〜30塩基長の非コード小分子RNAを中心としたRNAサイレンシングが主要な役割を果たすことが示唆された［1，2］。piRNAは主にトランスポゾンに由来し、PIWIタンパク質群と複合体を形成する。*PIWI*遺伝子変異個体では、トランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞発生異常が起こり、不稔となる。以上のことから、PIWI-piRNA複合体はトランスポゾンを選択的に抑制することが示唆される。ショウジョウバエPIWIタンパク質の一種であるPiwiは核に局在し、piRNAと複合体を形成することにより、標的トランスポゾンとその周辺ゲノム領域に抑制性ヒストン修飾を付加し、転写を制御する［3，4］。我々はこれまでに、Piwi-piRNA複合体による転写制御の実態は、リンカーヒストンH1等複数の因子の誘導を伴うクロマチン構造の変動によることを明らかにした［5］。さらに、この制御がPolIIの抑制を介した転写制御とヘテロクロマチン形成の二段階からなることを示した［6］。これらのことから、piRNAは新たなエピゲノム因子として機能すると考えられるが、標的トランスポゾン領域のヘテロクロマチン形成に伴うゲノムワイドな影響は未解明である。本研究では、Piwi-piRNAによるトランスポゾン抑制が引き起こす核内高次構造変化を網羅的に同定する。

方　法

1. 材料

本研究では、マルチオミクス解析と顕微鏡観察を用いた複合的解析により、Piwi-piRNAが引き起こす核内制御を明らかにした。この解析を行うにあたり、我々が所属する研究室で確立されたショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞（Ovarian Somatic Cell：OSC）を使用した。OSCは、Piwi-piRNAによるトランスポゾンの発現抑制機構を観察し、容易に生化学的解析を行うことができる培養細胞株である［7］。

2. シーケンシング解析を用いた核内動態変化の網羅的解析

OSCを用いてPiwiノックダウン条件下においてHi-C解析［8］を行い、Piwiによる制御が阻害された際のゲノムの三次元構造の変化を解析した。さらに、同条件下でLamin DamID-seq解析［9］を行い、転写制御の際に観察される核内での位置関係を明らかにした。これらに加えて、ヒストン修飾などをChIP-seq解析、遺伝子発現量をRNA-seq解析で網羅的に同定することで、piRNAの制御に伴うエピゲノム変化の全体像を明らかにした。

3. 顕微鏡観察を用いたPiwi-piRNAが制御する核内位置関係の解析

核内位置関係の変化を検証するために、レポーター上にPiwi-piRNAによるサイレンシングを再構成する系を利用した（図2A）。この系では、Piwiと複合体を形成し、ヘテロクロマチン形成を開始する因子であるNxf2［6］のλNフュージョンタンパク質を発現させ、これをレポーター上のboxB配列に強制的にテザリングすることができる。λN-Nxf2を発現させ、レポーターの核内での位置関係をOligo-FISH解析［10］により観察することで、Piwi-piRNA制御を再構成したレポーター上でも核内配置の変化が観察されるかを検討した。

結　果

1. Piwi-piRNA が誘導する核内動態変化

Hi-C 解析をはじめとしたシーケンス解析結果を組み合わせ、Piwi-piRNA が誘導する核内動態変化を網羅的に明らかにした（図 1）。Hi-C 解析の結果、Piwi ノックダウン条件下では、Piwi-piRNA に制御されるトランスポゾンが挿入されているゲノム領域特異的に TAD 内相互作用頻度の減少と TAD 間相互作用並びに長距離間相互作用頻度の増加が確認された。さらに、Lamin DamID-seq 解析の結果、Piwi-piRNA 標的トランスポゾンをコードするクロマチン領域について、Piwi ノックダウンに伴い核ラミナとの相互作用が減少する傾向が明らかとなった。これらに加え、ChIP-seq データ解析から、抑制性ヒストン修飾である H3K9me3 や H1 については、Piwi ノックダウンに伴う減少を、活性化ヒストン修飾である H3K27Ac や H3K4me3 については、逆に上昇を観察した。また、RNA-seq データ解析から、トランスポゾン挿入領域周辺の遺伝子の RNA 量についても、これらのクロマチン変化と相関するかたちで Piwi ノックダウンに伴う増加を確認した。

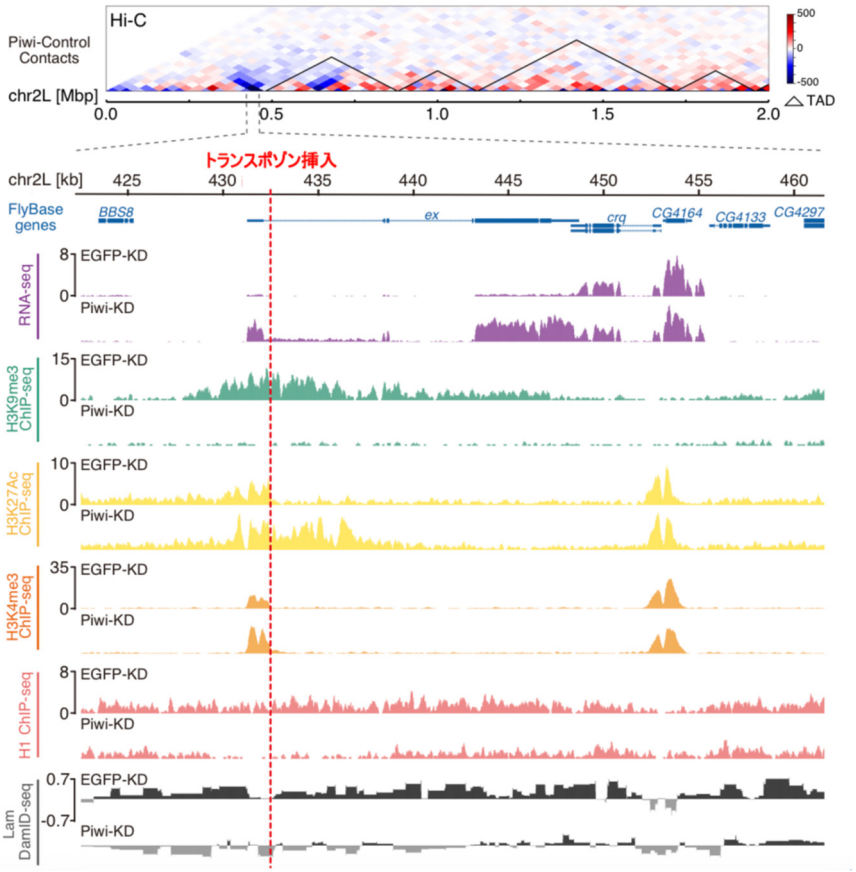


図 1. piRNA 標的トランスポゾン挿入領域のクロマチン状態とゲノム構造

Piwi のノックダウンに伴い、piRNA 標的トランスポゾン挿入領域を中心に、ゲノム三次元構造、ヒストン修飾、核ラミナ相互作用の変化が観察された。

2. Piwi-piRNA が制御する核内位置関係の変化

Lamin DamID-seq 解析（図 1）の結果、piRNA 標的ゲノム領域について、Piwi ノックダウンに伴い Lamin との相互作用が減少していることが明らかになった。Lamin は核膜付近に局在することから、Lamin との相互作用の減少は、piRNA 標的ゲノム領域が核膜付近から核内部へ移動していることを示唆する。これを Oligo-FISH 解析をもちいたイメージング技術により、検証した。

まず、図 1 に示す piRNA 標的ゲノム領域（トランスポゾン挿入領域）に対するプローブを設計し、これを用いた Oligo-FISH 解析を行った。Piwi ノックダウンに伴いこのゲノム領域の局在がどのように変化するか解析した結果、核膜からの距離が有意に増加した。この解析結果をさらにレポーターを用いた人工的な piRNA 制御の再構成システムを用いて検証した（図 2A）。レポーター遺伝子（Luciferase）に piRNA 経路の必須因子である Nxf2 を強制的にテザリングした際に、レポーターの核内局在を先と同様に Oligo-FISH 解析により観察した。その結果、Nxf2 をテザリングした細胞について、レポーターの局在が核膜付近で確認された（図 2B）。この解析結果からも、piRNA は標的遺伝子を制御する際にその核内配置を変化させるということが明らかになった。

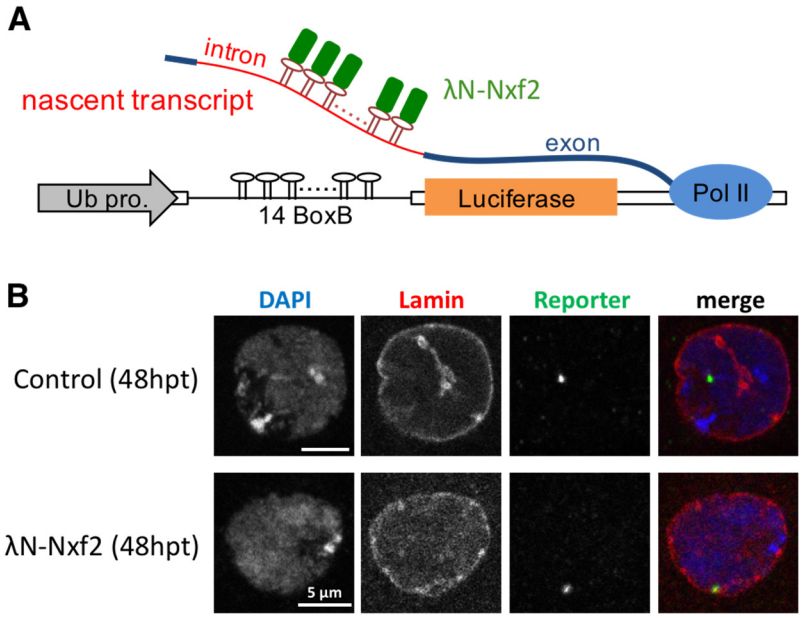


図 2. Piwi-piRNA 因子の人工的なテザリングにより標的ゲノム領域の核内配置が変化する

A) テザリング実験の概念図。新たに同定した Piwi-piRNA 経路制御因子である Nxf2 を、λN を用いて強制的にレポーター遺伝子にテザリングする。これにより、Piwi-piRNA による転写制御を人工的に再構成している。

B) 図 A のテザリング実験系を用いて Nxf2 をテザリングした際に観察されるレポーター領域の核内配置の変化を Olig-FISH 実験により観察した。

考　察

本研究より得られたデータは、Piwi-piRNA によるトランスポゾンの抑制は、局所的な転写抑制にとどまらず、標的トランスポゾンを中心とした核内での空間的な配置やゲノム三次元構造の制御を伴うダイナミックな核内構造体形成であることを示唆する。

卵巣で機能する Piwi-piRNA 複合体の一部は、卵にディポジットされることにより、ゲノム配列情報非依存的に piRNA によるサイレンシングを次世代に継承できることが知られている。このことから、本研究で明らかになった Piwi-piRNA が誘導するクロマチン状態とその形成機構は、未だ原理や分子機構がほとんど明らかになっていない、複数世代にわたるクロマチン状態の継承の理解に繋がることが期待される。近年、RNA 結合タンパク質や哺乳類 L1 トランスポゾンが引き起こすゲノム高次構造変化やクロマチン凝集状態の変化が、ゲノムの安定性や発生に大きく影響するという報告もある。このことから、本研究で解明した核内のダイナミックな制御が、Piwi-piRNA の機能不全で観察されるゲノム不安定化や生殖細胞の発生不全、不妊といった表現型の説明に繋がることも期待される。また、本研究対

象である PIWI タンパク質と piRNA は、ヒトを含む霊長類まで広く保存されており、マウス PIWI-piRNA 複合体もショウジョウバエと同様に核内の転写制御を担うことが示唆されている。実際に我々は、ハムスターをモデル生物として哺乳類を対象とした PIWI-piRNA 機能解析も進めている。したがって、本研究で得られた知見が幅広い生物種で保存される根幹的なエピゲノム制御の理解に貢献することも期待される。

共同研究者

本研究は、東京大学大学院理学系研究科の Sira Sriswasdi 博士、岩崎渉博士、広島大学原爆放射線医科学研究所の衣笠泰葉博士、堀越保則博士、田代聡博士、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所の足立淳博士、朝長毅博士との共同研究である。

文　献

1) Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. Nature reviews Molecular cell biology. 2011;12(4):246-58. Epub 2011/03/24. doi: 10.1038/nrm3089. PubMed PMID: 21427766.
2) Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. Annu Rev Biochem. 2015;84:405-33. Epub 2015/03/10. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034258. PubMed PMID: 25747396.
3) Sienski G, Donertas D, Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. Cell. 2012;151(5):964-80. Epub 2012/11/20. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.040. PubMed PMID: 23159368; PubMed Central PMCID: PMCPMC3504300.
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 & development. 2013;27(15):1656-61. Epub 2013/08/06. doi: 10.1101/gad.221515.113. PubMed PMID: 23913921; PubMed Central PMCID: PMCPMC3744724.
5) Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, et al. Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. Mol Cell. 2016;63(3):408-19. Epub 2016/07/19. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.008. PubMed PMID: 27425411.
6) Murano K, Iwasaki YW, Ishizu H, Mashiko A, Shibuya A, Kondo S, et al. Nuclear RNA export factor variant initiates piRNA-guided co-transcriptional silencing. The EMBO journal. 2019;38(17):e102870. Epub 2019/08/02. doi: 10.15252/embj.2019102870. PubMed PMID: 31368590; PubMed Central PMCID: PMCPMC6717896.
7) Saito K, Inagaki S, Mituyama T, Kawamura Y, Ono Y, Sakota E, et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila. Nature. 2009;461(7268):1296-9. Epub 2009/10/09. doi: 10.1038/nature08501. PubMed PMID: 19812547.
8) Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. Science (New York, NY). 2009;326(5950):289-93. Epub 2009/10/10. doi: 10.1126/science.1181369. PubMed PMID: 19815776; PubMed Central PMCID: PMCPMC2858594.
9) Pickersgill H, Kalverda B, de Wit E, Talhout W, Fornerod M, van Steensel B. Characterization of the Drosophila melanogaster genome at the nuclear lamina. Nature genetics. 2006;38(9):1005-14. Epub 2006/08/01. doi: 10.1038/ng1852. PubMed PMID: 16878134.

10) Beliveau BJ, Boettiger AN, Avendano MS, Jungmann R, McCole RB, Joyce EF, et al. Single-molecule super-resolution imaging of chromosomes and in situ haplotype visualization using Oligopaint FISH probes. Nature communications. 2015;6:7147. Epub 2015/05/13. doi: 10.1038/ncomms8147. PubMed PMID: 25962338; PubMed Central PMCID: PMCPMC4430122.