

体細胞におけるヘテロクロマチン領域記憶の 分子装置の同定と機構に関する研究

Identification and characterization of molecular memories determining heterochromatin regions in somatic cells

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者 国立遺伝学研究所 齋藤 都暁 National Institute of Genetics Kuniaki Saito

Large fractions of many eukaryotic genomes consist of transposable elements (TEs). Their movement and accumulation contribute to the shaping of genomes; however, a mechanism is required to repress the expression and transposition of TEs to ensure the stable inheritance of genomic information. How animals defend their genomes against the enormous complexity of TEs remains one of the most intriguing questions in genome biology. PIWI-interacting RNAs (piRNAs) protect the genome against selfish genetic elements such as transposable elements by transcriptional and post-transcriptional silencing in animal gonads. However, it remains obscure how TEs are specifically recognized and silenced in somatic cells where piRNAs are not expressed. To identify the molecular traits for TE silencing in somatic cells, we focused on genes screened in *Drosophila* ovary. Among the candidate genes, we identified CG14438 essential for TE silencing in ovarian somatic cells (OSCs). CG14438-knockdown (KD) increases the expressions of retrotransposons, whereas it doesn't affect the abundance of piRNAs in OSC. The expression pattern of transposons from CG14438-KD OSC by mRNA-seq is similar to that from HP1a-KD. These results suggest that CG14438 is involved in the silencing of transposons, but not in the piRNA biogenesis. Our data suggest that CG14438 is a novel TE silencing factor in somatic cells and collaborate with HP1a rather than the piRNA pathway.

研究目的

ショウジョウバエのヘテロクロマチン領域の多くはレトロトランスポゾンやトランスポゾンに占められ、その発現は抑制状態にある。生殖細胞では PIWI サブファミリー蛋白質に結合する小分子 RNA (piRNA) がトランスポゾンの発現抑制シグナル、すなわち「ヘテロクロマチンメモリー」として機能し、世代間伝搬される。一方、体細胞でもレトロトランスポゾンの発現は抑制状態にあり、細胞分裂を経ても、娘細胞にはヘテロクロマチンメモリーが伝搬する。一方、体細胞では piRNA 及び Piwi ファミリータンパク質が発現しない。すなわち、一体どのような分子がヘテロクロマチン領域を規定するのか不明である。そこで、申請者は 2004 年の Sarah Elgin らの研究に着目した。ショウジョウバエでは Position

Effect Variegation(PEV)と呼ばれる斑入り位置効果現象が知られる。これは胚発生初期にヘテロクロマチン領域がクロマチン上の位置によって確率論的に決定され、それが細胞分裂後も長期にわたって維持される現象である。遺伝学的なスクリーニング解析から関連遺伝子が単離され、エピジェネティクス因子群が同定された。代表例としてヘテロクロマチンタンパク質 HP1a が挙げられるが、それとともに Piwi 遺伝子群が同定されている (Pal-Bhadra et al. 2004)。体細胞である眼では Piwi 遺伝子群や piRNA は発現していない。それにもかかわらず斑入り効果が認められるという事実は、体細胞では発生初期にヘテロクロマチン領域が規定され、それが細胞分裂を経ても維持されることを意味している。すなわち、ヘテロクロマチン領域の情報、すなわちヘテロクロマチ

ンメモリーが維持された、と言い換えることができる。本研究では生化学を駆使し、体細胞ヘテロクロマチンメモリーの実体を同定することを試みた。その結果、ヘテロクロマチンの形成・維持に重要な新規遺伝子を2つ同定することに成功した。そのうち1つに関して、Crispr/Cas9 システムを用いてノックアウトハエを作製した結果、胚発生初期において致死性を示した。

研究経過

ショウジョウバエ生殖細胞における RNAi スクリーニングによって 100 種以上のトランスポゾン制御因子が報告されている(Czech et al. 2013)。この中には piRNA 生合成因子群や、生殖細胞で特異的にトランスポゾンの抑制に機能する因子が多く含まれる。しかし、これらの因子で分子機能が解明されているものは少なく、今後の機能解明が待たれている。スクリーニングは生殖細胞で行われているが、得られた因子には体細胞で発現することが知られる遺伝子も多く存在しており、この中には、体細胞においてトランスポゾンの抑制に機能する因子が含まれることも期待される。今回、スクリーニングで取られた因子の中で CG14438(Candidate Gene 14438)遺伝子に着目した。CG14438 は mRNA レベルでは体細胞でも発現することが予測され、体細胞ヘテロクロマチンメモリーの実体候補になると予測した。個体レベルの解析では生化学的アプローチが困難であることから、トランスポゾンの抑制機構の解明において用いられている培養細胞 OSC(Ovarian Somatic Cell)を用いることとした(Saito et al. 2009)。CG14438 に対する siRNA を 6 種設計し、それぞれ OSC に導入した。ネガティブコントロールとして Luciferase (Luc) に対する siRNA を導入した。24 時間、48 時間後に細胞を回収し、全 RNA を取得した。DNaseI で Clean-up 後、逆転写反応を行い cDNA を得た。トランスポゾンに対するプライマーを用いて定量的 PCR を行い、リボソーム蛋白質をコードする RP49 遺伝子をコントロールとして相対定量を行った。ノックダウンし、トランスポゾンの 1 つ、*mdg1* の発現量を定量した。その結果、期待通り CG14438 遺伝子のノックダウンでトランスポゾンの発現が顕著に上昇することを見出した(Fig. 1)。

CG14438 遺伝子は 3313 アミノ酸残基からなる巨大蛋白質で、10 以上の Zn finger モチーフを有する。

また核移行シグナル(NLS)に類似する塩基性リッチな配列も存在していたことから、核内で働く因子で

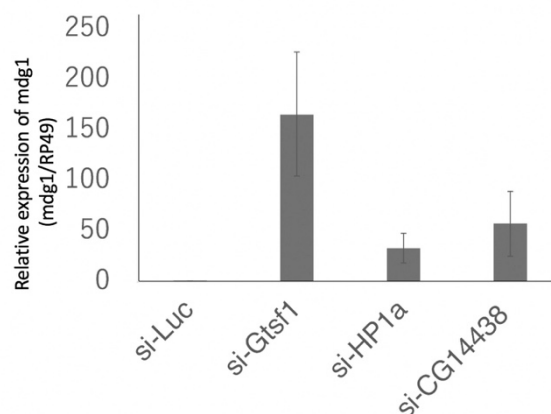


Fig. 1 Relative mRNA levels of *mdg1* transposon

あることが予測された。このように、CG14438 は核内で機能する因子であることが予測されたが、実際に piRNA 経路と関連するか否かについて検証することとした。はじめに、piRNA 生合成に関与するか検討するため piRNA の定量を行った。CG14438 ノックダウン細胞とコントロール細胞から全 RNA を抽出し、変性ポリアクリルアミドゲルで全 RNA を展開した。Hybond N+メンブレンに転写後、[gamma-32P]ATP でラベルしたオリグヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーション反応を行った。一晚、42 度で反応後、2xSSC, 0.1% SDS 溶液で洗浄した。メンブレンを乾燥後、BAS-2500 を用いて piRNA を検出した。その結果、CG14438 遺伝子をノックダウンしても piRNA 量に変動は認められなかった(Fig. 2)。すなわち、CG14438 は piRNA 生合成には関与せず、少なくとも piRNA 生合成以外の機能を介してトランスポゾンを抑制するものと予測された。

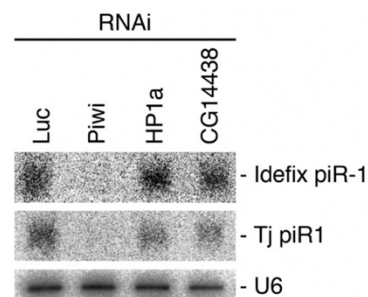
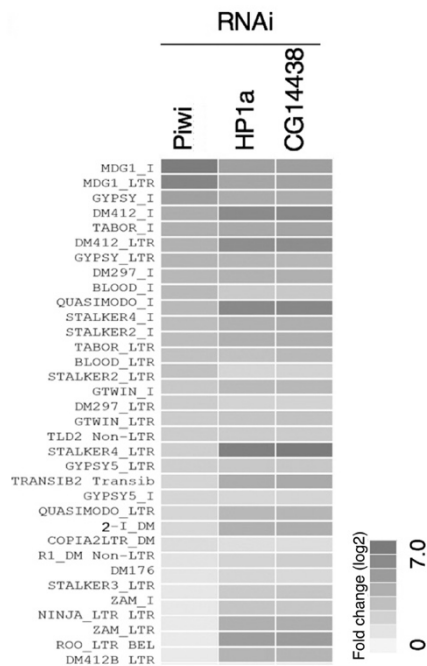


Fig. 2 Northern blot analysis of piRNAs

CG14438 と他のトランスポゾン抑制因子との比較を行うため、次世代シーケンサーによる mRNA-seq 解析を行った。コントロール細胞、ノックダウン細

胞からそれぞれ全 RNA を回収し、poly(A)配列を有する mRNA を取得した。HiSeq-2500 を用いて、それぞれ約 2,000 万リードを取得した。アダプター配列を除去し、ショウジョウバエトランスポゾンの参照配列にマッピングした。TPM、RPKM 値から発現量を算定し、コントロール細胞との相対的発現量を算出した。その結果、CG14438 は HP1a ノックダウン細胞と非常に類似したトランスポゾン種が脱抑制されることが明らかとなった (Fig. 3)。したがって CG14438 は HP1a と協調して働く因子ではないかと



期待された。

Fig. 3 mRNA-seq analysis of CG14438-KD cells

以上の解析から CG14438 ノックダウン細胞はヘテロクロマチン蛋白質 HP1a をノックダウンした細胞と類似したトランスポゾンの発現パターンとなることが分かった。したがって、HP1a と機能的に関連するのではないかと予測された。はじめに HP1a と CG14438 が物理的に相互作用する可能性を検証することとした。HP1a に対するモノクローナル抗体 (C1A9) を *Drosophila* Hybridoma bank から入手し、これを用いて免疫沈降解析を行うこととした。一方で、CG14438 を認識する抗体は存在しないことから、以前と同様の手法でマウスモノクローナル抗体を作製することとした (Iwasaki et al. 2016)。GST と N 末端側の CG14438 蛋白質との融合蛋白質を大腸菌で発現、精製し、抗原とした。複数回免疫後、マウスの血清が CG14438 蛋白質を認識するかどうかを検証した結

果、約 350kDa の位置にシグナルが認められた。RNAi でノックダウンした細胞では、このシグナルが消失すること、OSC で過剰発現させた蛋白質にも反応することから、免疫したマウスには抗 CG14438 抗体が存在することが強く示唆された。そこで、ミエロマ細胞とリンパ節由来細胞とのハイブリドーマを作製し、CG14438 を認識するマウスモノクローナル抗体の樹立を試みた。ELISA、Western Blot、を指標にスクリーニングした結果、目的とするモノクローナル抗体を得ることに成功した。そこで、この抗体を用いて、HP1a 免疫沈降物中に CG14438 が含まれるか否か検討した結果、HP1a 免疫沈降物中に CG14438 蛋白質を見出した。したがって、CG14438 は HP1a と相互作用し、トランスポゾンの発現を抑制する因子であると考えられた。

個体レベルにおいて CG14438 はトランスポゾンの制御因子として機能するか検討するため、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトショウジョウバエを作製することとした (Kondo & Ueda, 2013)。CG14438 に対する guideRNA を 3 カ所設定し、ノックアウトハエを作製したところ、胚発生致死の表現型を示すことが明らかとなった。これは HP1a ノックアウトハエと同様の表現型であることから、CG14438 は HP1a 同様に体細胞においてトランスポゾンの発現を抑制する因子であると期待された。

考察

本研究により、CG14438 が新たなトランスポゾン抑制因子の一つとして働くことがわかった。したがって、CG14438 は HP1a 同様に、体細胞ヘテロクロマチンメモリーの構成因子の一つであると考えられる。また、CG14438 ノックアウトハエは HP1a 同様に胚致死となることから生存に必須な遺伝子であると考えられた。また、CG14438 は HP1a と協調して働く因子であることも mRNA-seq 解析から期待された。HP1a は H3K9me3 と特異的に相互作用することから、CG14438 も抑制性ヒストンマークと相互作用し、レトロトランスポゾンの発現を抑制する可能性が高い。最近、海外のグループによって CG14438 遺伝子の機能解明について報告がなされた (Jankovics et al. 2018)。多くの結論において私たちが得たデータと類似した報告であった。その論文においても CG14438 の分子機能解明というところまでは到達しておらず、今後さらなる解明が必要だろうと考える。

CG14438は多数のZn-finger motifを有する巨大蛋白質である。ショウジョウバエ属では保存されているが、他の昆虫や哺乳類では相同蛋白質が見つからない。したがって、ショウジョウバエに特異的なヘテロクロマチンメモリーの構成因子である可能性が高い。一方、HP1aは種間で高度に保存された因子であることから、ショウジョウバエ以外の生物種では、CG14438とアミノ酸配列は異なるものの機能的相同性を有する遺伝子が存在する可能性もあり、今後の研究過程で明らかにしたいと考えている。

参考文献

1. 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*, 461, 1296-1299 (2009).
2. Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Chikka MR, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC: Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, 303, 669-672 (2004).
3. Czech B, Preall JB, McGinn J, Hannon GJ: A transcriptome-wide RNAi screen in the *Drosophila* ovary reveals factors of the germline piRNA pathway. *Mol. Cell*, 50, 749-761 (2013).
4. 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*, 63, 408-419 (2016).
5. Kondo S, Ueda R: Highly improved gene targeting

by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 195, 715-721 (2013).

6. Jankovics F, Bence M, Sinka R, Faragó A, Bodai L, Pettkó-Szandtner A, Ibrahim K, Takács Z, Szarka-Kovács AB, Erdélyi M: *Drosophila* small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation. *Development*, 145, dev170639 (2018).

研究の発表

口頭発表

1. 齋藤都暁 (2018)、小分子 RNA によるエピゲノム制御の分子機構、生殖エピゲノム成果報告シンポジウム、12月、京都
2. 齋藤都暁 (2018)、ショウジョウバエにおける新規トランスポゾン制御因子の同定と機能解明、日本分子生物学会、11月、横浜
3. 齋藤都暁 (2018)、ショウジョウバエレトロトランスポゾン抑制の分子機構、遺伝研集会、8月、三島
4. K. Saito (2018), Small RNA-mediated retrotransposon silencing in *Drosophila*, NIG international symposium, July, Mishima

誌上発表

1. Ichiyanagi K, Saito K. (2019) TE studies in Japan: the fourth Japanese meeting on host-transposon interactions. *Mob DNA*. 2019 doi: 10.1186/s13100-019-0154-7.