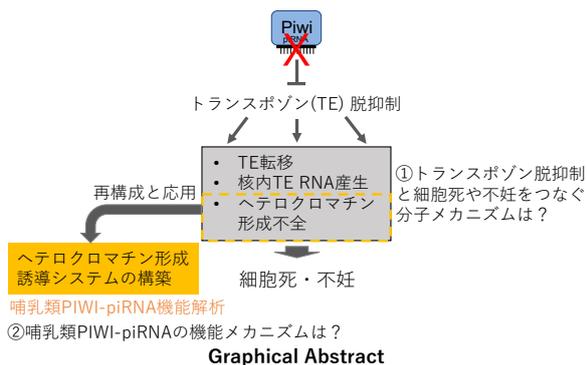


小分子 RNA を介したエピゲノム制御システムの開発

理化学研究所生命医科学研究センター非コードゲノム機能研究チーム

岩崎 由香

研究概要と研究目的



PIWIタンパク質と小分子非コードRNAであるPIWI-interacting RNA (piRNA)の複合体は、ゲノムの安定性維持と遺伝情報の伝達に極めて重要な役割を果たす。PIWI-piRNA複合体は生殖組織特異的に機能しトランスポゾン (Transposable element: TE) の発現を選択的に抑制する他、PIWI遺伝子をロックダウンした培養細胞は数日で死滅し、さらにPIWI遺伝子欠損個体は哺乳類を含む幅広い生物種において不妊の表現型を示す。PIWI遺伝子の欠損は長期的には確かにトランスポゾンの転移の蓄積によるゲノムの不安定化を引き起こすと考えられるものの、ではなぜ、短期的にも

培養細胞の死滅や不妊という重大な表現型をもたらすのか？申請者はこれまでに、PIWI-piRNA複合体によるトランスポゾン領域のヘテロクロマチン形成が、クロマチン構造のダイナミックな変化を伴うことを明らかにした[Iwasaki et al., *EMBOJ* (2021); Murano and Iwasaki et al., *EMBOJ* (2019)]。このことから、トランスポゾンはゲノムの「厄介者」であるだけではなく、ヘテロクロマチン形成を介したエピゲノム因子としての機能があり、その機能不全こそが不妊に繋がるのではないかと着想した。本研究では、(1) PIWI欠失個体においてエピゲノム状態の異常が不妊に繋がるメカニズムを解明し、(2) エピゲノム研究を加速させる「ヘテロクロマチン形成誘導システム」を哺乳類への応用を見据えて開発する[Graphical Abstract図]。

構成的ヘテロクロマチン形成を介してゲノムの安定性を維持するメカニズムとして、piRNAと呼ばれる20-30塩基長の小分子非コードRNAを中心としたRNAサイレンシングが知られている[Iwasaki et al. *Annu Rev Biochem* (2015)]。piRNAはPIWIタンパク質群と複合体を形成してトランスポゾン配列を選択的に抑制することで、生殖組織の正常な発生を担保する[Vagin et al. *Science* (2006)]。一方で、ショウジョウバエPIWI遺伝子やpiRNA生合成関連遺伝子の変異個体では、生殖幹細胞発生異常が起こり、不妊となる[Lin et al. *Development* (1997)など]。PIWI遺伝子の欠損がトランスポゾン抑制能の消失につながることは広く理解されてきたものの、なぜ、短期的にも生殖幹細胞発生異常や不妊という表現型をもたらすのかは未解明である。

ショウジョウバエPIWIタンパク質の一種であるPiwiとpiRNAの複合体は核内で標的トランスポゾンの新生RNAに結合し、標的トランスポゾンの転写をクロマチンの修飾を介して制御する[Sienski et al. *Cell* (2012); Ohtani et al. *Genes Dev* (2013)]。申請者は、Piwi-piRNA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ものであることや[Iwasaki et al. *Mol Cell* (2016)]、Piwi-piRNAによるヘテロクロマチン形成が、局所的なクロマチン状態のみならず、ゲノムの三次元構造を制御することを明らかにしてきた[Iwasaki et al., *EMBOJ* (2021)]。加えて、これらのエピゲノム変化をレポーター上に再構成することで、時系列的・空間的にPiwi-piRNAが引き起こすエピゲノム変化を記述することに成功した[Iwasaki et al., *EMBOJ* (2021); Murano and Iwasaki et al., *EMBOJ* (2019)]。以上より、piRNAの本質はヘテロクロマチン形成因子であり、これがトランスポゾン抑制と欠失個体における不妊表現型を統一的に説明する分子メカニズムである可能性を着想した。

さらに近年、申請者らは、PIWIタンパク質発現パターンがヒトに近い新たなモデル生物としてハムスターを用いることで、哺乳類雌におけるPIWI変異個体の不妊の表現型を世界に先駆けて報告した[研究業績4, 7]。ショウジョウバエと同様に、ハムスターでもトランスポゾンを標的とするpiRNAとPIWIタンパク質

との複合体の発現が観察される一方で、遺伝子発現変化やエピゲノム変化はトランスポゾンよりもタンパク質コード領域で顕著に観察された。また、マウスでは雄特異的にPIWI変異個体の不妊が観察されるが、piRNAの標的トランスポゾンを強制的に高発現させただけでは不妊の表現型は観察されないことが報告されている[Xu et al. *Biol Reproduct* (2008)]。これらのことから、PIWI-piRNAによるトランスポゾン発現や転移の制御よりも、ゲノム高次構造などエピゲノム制御を介したトランスポゾン以外のゲノム領域への影響が表現型にとって重要である可能性が示唆される。しかし、哺乳類雌PIWI-piRNAの変異が不妊の表現型を引き起こす分子メカニズムは全く不明である。これは、哺乳類PIWI-piRNAの発現は発生時期・組織特異的であり、PIWI-piRNAが機能する培養細胞が存在せず、生化学解析を行うために十分な材料が得られないことが大きな原因である。そこで申請者は、ショウジョウバエを用いて開発したヘテロクロマチン形成誘導システムを哺乳類に応用するというアプローチを着想した。このシステムが開発されれば、幅広い生物種で保存される根幹的なエピゲノム制御機構の理解への貢献も期待される。

研究成果

ショウジョウバエ培養細胞を用いたヘテロクロマチン形成マシナリーの係留実験

PIWI-piRNA作用複合体によるヘテロクロマチン形成を再構成することを目的として、レポーターに強制的にPPNp複合体の因子を係留する実験系を構築した。この実験系を用いてタイムポイントをとりながらヘテロクロマチン形成が起こるステップを観察していった結果、転写制御や核内コンパートメントの変化が段階的に起こることが明らかとなった。具体的には、まず転写抑制を行う第一段階として活性型ヒストン修飾の除去とPol IIの抑制、核内配置の変化が起こり、転写抑制状態維持のための第二段階として抑制性ヒストン修飾の付加をはじめとしたヘテロクロマチン形成とゲノム三次元構造の変化が起こっていることが明らかとなってきた[図1]。

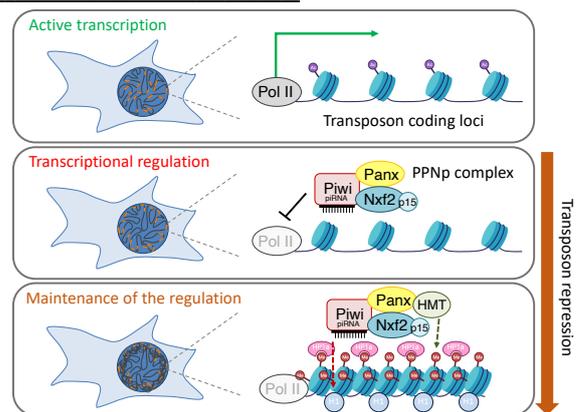


図1：ショウジョウバエPPNp複合体によるトランスポゾン抑制

哺乳類培養細胞を用いたヘテロクロマチン形成の再構成

PIWI-piRNAが機能する哺乳類培養細胞系の樹立に向けて、ポリコム関連タンパク質であるPcgf6およびDuxをノックアウトしたマウスES細胞を作成した。この細胞では、生殖組織でのみ強発現するPIWI-piRNA関連因子やトランスポゾンの発現の誘導が観察された。その一方で、Pcgf6/Dux-KOマウスES細胞ではpiRNAの産生を確認することはできなかった。これはMIWI2をはじめとしたいくつかの因子がPcgf6-KO mES細胞でも発現していないことが原因となっていると考えられる。この結果を受けて、ショウジョウバエの細胞系と同様に係留実験系を用いたヘテロクロマチン形成の再構成を目指す方向性にシフトし、マウスPIWI-piRNA経路にて中心的な役割を果たすことが知られているSPOCD1をレポーター上に係留する系を構築し、DNAに結合することで転写抑制を誘導することを新たに見出した[図2]。この発現制御の詳細をDNAメチル化修飾状況やヒストン修飾状況の解析を用いて評価した結果、従来のモデルとは異なる転写抑制様式をもってトランスポゾンが制御されていることが示唆された。さらに、免疫沈降と質量分析を用いた関連因子のスクリーニングをすすめた結果、新規候補因子の取得に成功した。興味深いことに、この因子のノックアウトマウスは不妊のみならず、胎性致死の表現型を示した。現在、この因子を中心にトランスポゾンの抑制と不妊や胎性致死との関連性の解析をすすめている。また、この因子を人工的に任意のゲノム配列に係留することで、トランスポゾンを抑制できるシステムを構築できる可能性についても検討している。

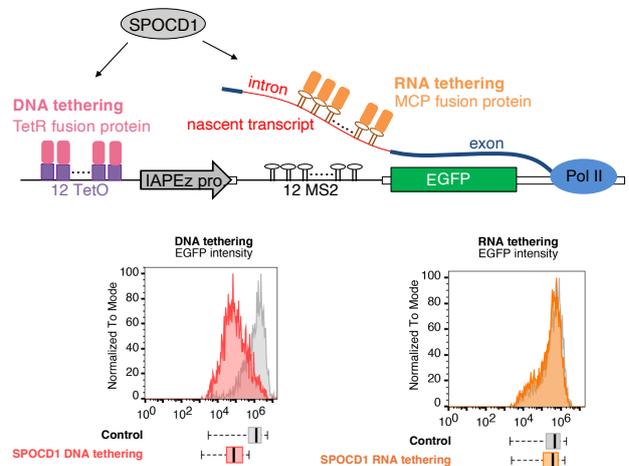


図2：マウスSPOCD1が誘導するDNA依存的転写抑制

piRNAを用いた人工的なヘテロクロマチン形成系の構築

任意のゲノム領域をヘテロクロマチン化できる培養細胞系の確立に向けて、これまでに人工的なpiRNA発現系の構築をすすめてきた [Ishizu et al. *Cell Rep* (2015)]。この先行研究では、piRNA産生の目印

になるエレメント配列を同定しており、この配列を発現ベクターに組み込むことで任意の配列をもつ人工piRNAを発現させることができる。piRNAを使用し、任意のゲノム領域をヘテロクロマチン化できる方法の開発にむけて、Piwi-piRNAが標的を認識する法則性について解析した。siRNAやCRISPR-Cas9のガイドRNAでもオフターゲット効果が度々問題になるため、実際にpiRNAを用いたヘテロクロマチン形成誘導系を実用化するためには、piRNAがこういった法則性をもってpiRNAが標的を認識するかを理解することが必須となる。そこで、CLASH法 [Helwak et al. Cell, 2013] を用いてpiRNAの標的ゲノム領域の直接的な同定を試みた。CLASHは、miRNAの標的遺伝子同定のために開発された方法で、標的RNAと結合した小分子RNAとをライゲーションしたキメラリードを作成し、これに対して次世代シーケンサを用いた配列決定を行うことで、直接相互作用する小分子RNAと標的RNAのペアを抽出できる。さらに、Piwiノックダウン条件下でロングリードシーケンサー (PacBio) を用いたRNA-seq解析を行うことで、細胞内でpiRNAの制御対象となるトランスポゾンと制御を免れるトランスポゾンの配列的特徴を解析した。その結果、piRNAはmiRNAとは異なり、標的遺伝子との完全一致の相補性をもって標的を認識していることが明らかとなった。さらに効果的にヘテロクロマチン形成を誘導するためには、標的の広範囲にわたるターゲティング、あるいは高い発現量のpiRNAが必要であることが見出された [図3; Ariura et al., Cell Reports, In press]。

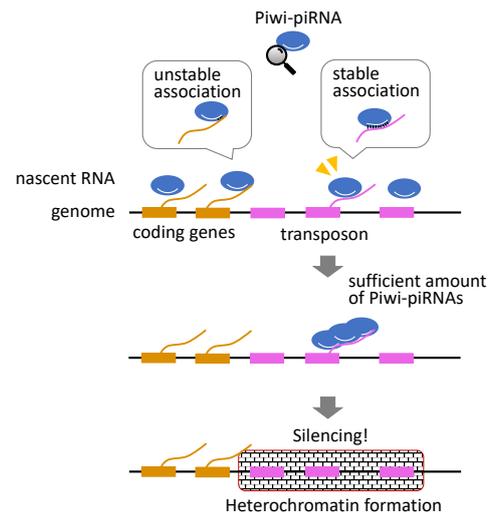


図3：ショウジョウバエpiRNAによる標的認識法則

今後の展開

本研究成果から、PIWI-piRNAを中心としたマシナリーが機能することによりトランスポゾン上にヘテロクロマチンが効果的に構築され、抑制が起こることが明らかとなった。さらに、これらの制御はトランスポゾンの転写を直接的に制御するのみならず、核内構造をダイナミックに改変し、クロマチン状態や遺伝子発現を変動させ、表現型に影響を及ぼす。トランスポゾンを中心としたヘテロクロマチン形成はPIWI-piRNAのみならず、生物の時期・組織・条件特異的に様々な機構により成り立つことも明らかになった。これらの研究成果を受けて、今後の展開としては、トランスポゾンとその抑制マシナリーがもたらすヘテロクロマチン形成を中心としたゲノム状態の変化に、どのような生理的意義があるかを明らかにする。

様々な環境刺激に応答してトランスポゾンの発現が上昇することが知られているが [Bourque et al. Genome Biol (2018)], その意義は不明である。これまでの研究成果を受け、環境刺激に際してトランスポゾンの発現とその抑制機構の相克がクロマチン状態をゲノムワイドに改変することで、環境刺激への柔軟な対応を可能にしているという仮説を着想した。一例として、内的環境刺激（生殖細胞発生）並びに外的環境刺激（ウイルス感染様刺激）条件下でトランスポゾンとその抑制メカニズムの発現が大きく変動することを研究者自身も見出している（未発表）。環境刺激に対するトランスポゾンとその抑制機構の応答、トランスポゾンとその抑制機構がクロマチン状態や遺伝子発現に及ぼす影響、表現型へのインパクトを体系的に解明する。これにより、ゲノム科学の最大の謎として残されている「生物は、トランスポゾンに代表される非コード領域をなぜゲノムの大部分を割いてまで保持しているのか？」に対する答えを見出していきたい。また、今後は将来的な医療応用や社会実装を見据えて、哺乳類を対象とした研究も展開していく。環境受容因子としてのトランスポゾンとその抑制機構がもたらすゲノム状態変化の重要性を示すことができれば、これを応用した新たなストレス状態の検知・評価法や治療方法の開発につながる可能性が期待できる。