

研究終了報告書

「ヘテロクロマチン形成高次構造体の解明と制御」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:岩崎由香

1. 研究のねらい

ヘテロクロマチンは、ゲノムの安定性の維持や機能発現に重要な役割を果たすことが知られており、その形成不全が癌をはじめとした様々な疾患の原因となっていることも明らかになっている [Janssen et al. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2018)]。近年、ヘテロクロマチンの機能を「構造体」の観点から明らかにしようという研究が進んでいる。数十年前まで、ヘテロクロマチンは転写因子などが DNA に到達できないほど高密度に凝縮された構造体をとっており、遺伝子発現は常に抑制されていると考えられてきた [Yaniv et al. *PNAS* (1986)]。しかしながら近年の研究成果から、ヘテロクロマチンは動的な構造体であり、比較的大きな分子はヘテロクロマチンとユークロマチンの双方を行き来することも明らかになっている [Hihara et al. *Cell Rep* (2012)]。加えて、必須遺伝子のなかにもヘテロクロマチンにコードされ転写されるものが報告されるなど [Marsano et al. *Trends Genet* (2019)]、ヘテロクロマチンはこれまでに考えられてきた以上に複雑な制御をもって、遺伝子発現ネットワークの維持に寄与している可能性が示唆されてきた。では、このような複雑な制御を担うヘテロクロマチンはどのような構造体により形作られ、機能しているのだろうか？

本研究は、研究者がこれまで研究対象としてきた小分子 RNA を介したヘテロクロマチン形成に着目する [Iwasaki et al. *Annu Rev Biochem* (2015) 等]。小分子 RNA の一種である piRNA は、転写がアクティブなトランスポゾンを中心にヘテロクロマチンを形成することが研究者のこれまでの研究成果等により明らかになっている。これをモデルとして、ヘテロクロマチン形成のための機能構造体の構成および動的な作用メカニズムの詳細を明らかにする。さらに、得られた知見を応用することで、ヘテロクロマチン形成の再構成を目指す。また、発展的には、小分子 RNA に限らず、トランスポゾンを標的としたヘテロクロマチン形成機構を幅広く理解する。これらを統合して、ヘテロクロマチン構造形成を理解すると同時に、その制御を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

転写の ON/OFF を司るヘテロクロマチン構造が実際には動的な高次構造体を形成することが明らかになりつつある。その一方で、ヘテロクロマチン構造がどのような段階を経て形成されるかを時系列的に捉えることは難しい。小分子 RNA は、可逆的なヘテロクロマチン形成を介して遺伝子発現制御を行うことが、研究代表者を含む世界中の研究者の研究成果により明らかになっている。これをモデルとして用いることで、動的なヘテロクロマチン構造形成メカニズムを理解し、さらにこのメカニズムの理解を起点として人工的にヘテロクロマチン形成を制御する方法を開発してきた。本研究では、「ヘテロクロマチン形成高次構造体の構成と機能様式の理解」並びに「ヘテロクロマチン形成の制御と再構成」の 2 点に取り組んできた。1 点目に関しては、小分子 RNA を中心とした複合体の構成要素、並びにこの複合体が段階的にヘテロクロマチン

構造を形成する様子を理解することができた [Iwasaki et al. *EMBOJ* (2021)]。さらに、新たなモデル生物としてハムスターを用いた解析結果から、世界に先駆けて小分子 RNA による制御が正常な卵子形成に必須の役割を果たすことを示した [Hasuwa et al. *Nat Cell Biol* (2021)]。2 点目に関しては、レポーター上に小分子 RNA を介したヘテロクロマチン形成を再構築する系を構築することができた [Iwasaki et al. *EMBOJ* (2021)]。現在この系を哺乳類細胞に応用することで、未だ知見の少ない哺乳類における小分子 RNA を介したヘテロクロマチン形成の詳細な機能メカニズムを明らかにすることを目指している。これらに加えて、小分子 RNA を用いたヘテロクロマチン構造の人工的制御に向けて、小分子 RNA による標的ゲノム領域認識ルールを明らかにした(論文準備中)。ここで得られた知見と人工 piRNA 発現システム [Ishizu et al. *Cell Rep* (2015)]を組み合わせて、任意のゲノム領域のヘテロクロマチン形成が生命システムに及ぼすインパクトを明らかにしていきたい。さらに発展的な展開として、小分子 RNA 以外のメカニズムによるトランスポゾンの転写抑制機構を解明してきた [Takeuchi et al. *NAR* (2022)]。これらの研究成果を受けて、ヘテロクロマチン形成の理解と制御を加速することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「ヘテロクロマチン形成高次構造体の構成と機能様式の理解」

PIWI-piRNA が形成するヘテロクロマチン高次構造体の理解

ショウジョウバエの PIWI サブファミリーのタンパク質の 1 つである Piwi は、核内に局在し、ヘテロクロマチン構造を形成することで転写レベルでの遺伝子発現を抑制することが知られている。研究者らはこれまでに、生化学的なアプローチにより Piwi-piRNA が標的トランスポゾン上にヘテロクロマチン構造を形成するために必要な複合体 (PPNp 複合体: Piwi-Panx-Nxf2-p15 複合体) を同定してきた [Murano et al. *EMBOJ* (2019)等]。さらにゲノムワイドなクロマチン状態やゲノム三次元構造解析をすすめることで、Piwi-piRNA が誘導するヘテロクロマチン状態の実態が核内構造のダイナミックな変化を伴うものであることを明らかにした [図 1]。これらの研究成果から、小分子 RNA をモデルに、ヘテロクロマチン構造の実態とゲノム状態へのインパクト、さらに責任因子の理解をすすめることができた(主な研究成果 3)。

哺乳類 PIWI-piRNA の機能不全がもたらす表現型の理解

PIWI-piRNA によるトランスポゾン抑制の機能不全がもたらす表現型については、ショウジョウバエでは雌雄ともに不妊が報告されていた。その一方で、哺乳類については不妊の表現型が観察されるのは雄のみであり、雌については PIWI-piRNA の機能は必須ではないと考えられてきた。RNA-seq データを用いて様々な生物種における PIWI 遺伝子の発現パターンを観察し

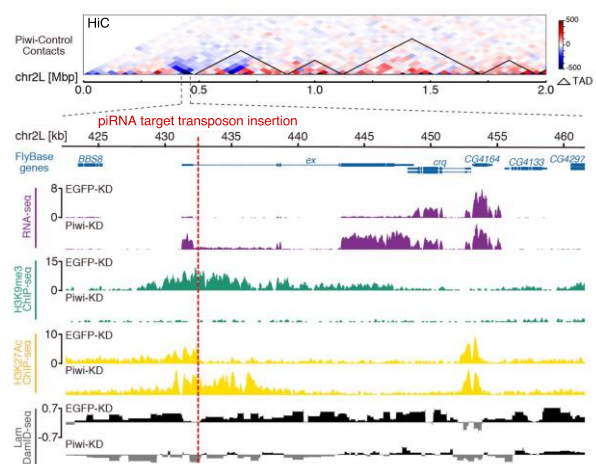


図1: Piwi-piRNAによる核内の核内構造体の制御
Piwi-piRNAは様々なヒストン修飾のみならず、ゲノム三次元構造 (Hi-C) や クロマチンの核内配置 (Lam DamID-seq) も制御し、トランスポゾン領域の発現を抑制する

た結果、*PIWI* 遺伝子の発現はマウス・ラットでは雌でほとんど観察されないが、ヒトをはじめとしたマウス・ラット以外の哺乳類では雌でも *PIWI* 遺伝子が発現することが明らかとなった。これを受けて、ハムスターを新たなモデルとして使用することで、とくに雌で *PIWI*-piRNA がもつ機能を解析した。その結果、ハムスターにおいて機能的な卵子形成には *PIWI* 遺伝子の発現が必要不可欠であることが明らかとなった(主な研究成果2)。その一方で、この表現型の原因が何によってもたらされているかについては今後明らかにしていくべき課題である。例えば、*PIWI* タンパク質の一種である *PIWIL3* の欠損個体では DNA のメチル化の低下が観察されるものの、これが表現型にどのように影響しているかは不明である。本研究からハムスターのモデル生物としての有用性が示されたことから、今後より詳細な機能メカニズム解析に適した実験系を構築し、哺乳類 *PIWI*-piRNA 経路がヘテロクロマチン形成をはじめとしたゲノム機能に及ぼすインパクトを明らかにしていきたい。

研究テーマ B「ヘテロクロマチン形成の制御と再構成」

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取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、第一段階として活性型ヒストン修飾の除去と PolII の抑制、核内配置の変化が起こり、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(主な研究成果3)。

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* をノックアウト(KO)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 関連因子の発現の誘導が観察された。その一方で、*Pcgf6*-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であると考えられる。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ている。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、候補因子の取得に成功した。現在、これら候補因

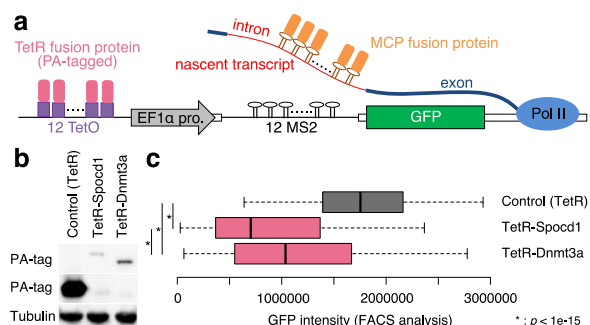


図2: マウスES細胞を用いたPPNp機能ホモログの係留 (a)ショウジョウバエPPNp係留システムをベースに、マウスES細胞を用いたPPNp機能ホモログ係留システムを構築した。TetR-TetOシステムを用いてDNAへの強制的な係留を行う(RNAへの係留は今後行う予定)。(b)TetRフュージョンのSpocd1およびDnmt3aを発現させた結果、(c)レポーターGFPの発現抑制が観察された。

子に対して検証実験をすすめている。

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、これまでに研究者らは人工的な 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 がど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 法は、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(論文執筆中)。

研究テーマ C「小分子 RNA を介さないメカニズムによるトランスポゾン抑制機構の理解」

体細胞における新たなトランスポゾン抑制機構の解明

本研究は、小分子 RNA を介したヘテロクロマチン形成を対象とした解析ではなく、「さきがけの先」を見越した研究成果である。小分子 RNA を介したヘテロクロマチン形成と対比するかたちでとくに piRNA が機能しない体細胞で起こる制御を解析対象とした。さきがけでの研究成果をうけて、今後はトランスポゾン抑制の機能的意義を明らかにしていきたい(詳細は「今後の展開」項目にて記載)。本解析結果はこれを見越して、piRNA 以外のマシナリーによるトランスポゾンの制御を対象とした新たな研究の方向性を展開するものである。

ショウジョウバエのテロメアは、HeT-A、TART、TAHRE という連続した非 LTR 型レトロトランスポゾンから構成され、これらのトランスポゾンの転移は、ショウジョウバエにおいてテロメア構造を維持するために不可欠であるとされている。その一方でこれらトランスポゾンはひとつひとつが数 kbp という長さをもつことから、これらが無作為に発現することはゲノムの不安定化につながる。したがって、これらテロメア構成レトロトランスポゾンの発現を調節するために、生殖細胞内では小分子 RNA を介したヘテロクロマチン形成が機能している。一方で、体細胞での調節メカニズムは不明である。本研究では、インシュレーターとして知られる Mod(mdg4)の機能未知スプライスバリエント Mod(mdg4)-N が、HeT-A の発現調節を担うことを明らかにした。Mod(mdg4)-N はサブテロメア配列に連続的に結合し、サブテロメア中のエンハンサーを阻害する。これにより、とくに体細胞におけるテロメア構成トランスポゾンの新たな制御モデルを明らかにすることができた(主な研究成果 1)。

3. 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(主な研究成果 2,3)。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(主な研究成果 3)、表現型に影響を及ぼす(代表論文 2)。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(主な研究成果 1)。これらを受けて、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制御機構の応答、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。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。

4. 自己評価

本研究では、小分子 RNA によるヘテロクロマチン形成をモデルに、動的な構造体であるヘテロクロマチンがどのような構成要素から成り立っているか？また、どのような段階を経て構成されるのか？を明らかにすることができた。さらに、ここで得られた知見をもとに、レポーターを用いてヘテロクロマチン形成を再構成することにも成功している。哺乳類メスで観察されるヘテロクロマチン形成不全が引き起こす発生不全の表現型に関しても、世界に先駆けて知見をえることができた。また将来的な発展を見据えて、小分子 RNA 以外の因子がどのようにトランスポゾンを抑制するのかを明らかにする研究成果も得ることができた。これらの成果は、ヘテロクロマチン形成に対する理解を加速したことに加えて、トランスポゾンがその制御メカニズムを受けてゲノム状態を形作る可能性を示唆するという意味でも重要な研究成果となった。以上のことから、研究を適切に進め、当初の研究目的は達成されたものと考えている。現段階では、特許取得等具体的な社会実装には結びついていないものの、現在進行中の人工的なヘテロクロマチン形成手法の開発、および哺乳類を用いたトランスポゾン抑制機構の理解をとおして、より社会実用的な波及効果が得られることを期待している。また、研究者はさきがけでの研究成果を受けて、理化学研究所生命医科学研究センターにて独立して研究室を主宰するポジションを得ることができた。今後は自身の主宰する研究チームで上記の研究を展開していきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文) 発表

研究期間累積件数: 7件 (原著論文)

1. Chikara Takeuchi, Moe Yokoshi, Shu Kondo, Aoi Shibuya, Kuniaki Saito, Takashi Fukaya, Haruhiko Siomi, Yuka W. Iwasaki. Mod(mdg4) variants repress telomeric retrotransposon HeT-A by blocking subtelomeric enhancers. *Nucleic Acids Research*. 2022, 50(20) 11580-11599

ショウジョウバエのテロメアは HeT-A をはじめとしたレトロトランスポゾンで構成されている。これらは生殖細胞で PIWI-piRNA 経路やヘテロクロマチンによって制御されるが、体細胞での制御機構は不明である。本研究では、インシュレーターとして知られる Mod(mdg4)のサプライズバリエーションが体細胞で HeT-A を制御することを明らかにした。Mod(mdg4)バリエーションはサブテロメアである TAS-R 繰り返し配列中のエンハンサー活性を阻害することで HeT-A の発現を抑制する。本研究により、体細胞で働く新たなトランスポゾン抑制メカニズムが解明された。

2. Hidetoshi Hasuwa, Yuka W. Iwasaki, Wan Kin Au Yeung, Kyoko Ishino, Harumi Masuda, Hiroyuki Sasaki, Haruhiko Siomi. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters. *Nature Cell Biology*. 2021, 23, 1002-1012

動物の生殖組織の正常な発生と機能には、トランスポゾン抑制能をもつ piRNA 経路が重要な役割を果たす。これまで哺乳類のモデルとして使用されてきたマウスについて、PIWI 遺伝子の欠損個体は、雄の不妊を引き起こすことが知られていた一方で、雌については表現型が認められず、卵巣で PIWI は機能をもたないと考えられてきた。本研究では、ゴールデンハムスターを新たなモデル生物として使用し、PIWI 遺伝子の欠損個体で機能的な卵母細胞の生成に欠陥があることを明らかにした。

3. Yuka W. Iwasaki, Sira Sriswasdi, Yasuha Kinugasa, Jun Adachi, Yasunori Horikoshi, Aoi Shibuya, Wataru Iwasaki, Satoshi Tashiro, Takeshi Tomonaga, Haruhiko Siomi. Piwi-piRNA complexes induce stepwise changes in nuclear architecture at target loci. *EMBO Journal*. 2021, 40(18) e108345

ショウジョウバエの Piwi は、ヘテロクロマチン形成により標的トランスポゾンの転写を抑制することが知られている。Lamin の DamID-seq を使用して、Piwi が標的トランスポゾンを核膜付近に係留することを明らかにした。さらに Piwi が欠失した細胞を用いた Hi-C 解析では、Piwi-piRNA ターゲット TE を含む領域で TAD 内の相互作用が減少し、TAD 間の相互作用が増加することを見出した。また、レポーター上に Piwi-piRNA による制御を再構成する実験系を用いることで、PIWI-piRNA による制御は、活性ヒストンマークの除去に続き、転写抑制、クロマチンの構造変化、H3K9me3 の付与を伴うヘテロクロマチン形成といった制御状態の変化が段階的に引き起こされることが明らかとなった。本研究により、piRNA による制御が核内のダイナミックな変動を伴う抑制機構であることが示された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(招待講演)

Yuka W. Iwasaki. “Co-transcriptional silencing and heterochromatin formation by nuclear PIWI-piRNA complex” Cold Spring Harbor Asia “RNA biology meeting” (Awaji, Japan) December 2022

Yuka W. Iwasaki. “Understanding and reconstructing small RNA-mediated heterochromatin formation” The 60th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan (Hakodate, Japan) September 2022

Yuka W. Iwasaki. “Understanding and reconstructing small RNA-mediated heterochromatin formation” Japan-UK Regulation through Chromatin Conference (Leicester, UK) August 2022

著作物

Editors: Nicholas F. Parrish, Yuka W. Iwasaki “piRNA: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology” Springer Nature, New York. May, 2022

その他

第 46 回日本分子生物学会年会にて、本さがけ領域の支援を受けたシンポジウムを開催した

Title: Dynamics of genome organization and transcription machineries in gene regulation

Organizers: Yuka W. Iwasaki (RIKEN), Takashi Fukaya (Univ of Tokyo)

また、関連サテライトミーティング「Architecture and Function of Biological Assemblies」を 2023 年 12 月 5 日、理研神戸オーデトリウムにて開催した