

Title	内在性レトロウイルス関連遺伝子の機能から紐解く、初期胚の全能性制御ネットワーク
Sub Title	Totipotency regulatory network in mouse early embryos shaped by an endogenous retrovirus-related gene, Refee
Author	小林, 美栄(Kobayashi-Ishihara, Mie)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>研究代表者が独自に作製したRefee(2C-Alyref, Gm21312)に対するモノクローナル抗体を用いたRNA免疫沈降(iCLIP)によってRefeeはRNAと結合するタンパク質であることが実証された。また、Refeeに結合しているRNA配列の網羅的な探索にも成功した。この結果、RefeeはMERVL(マウス内在性レトロウイルス)やZscan4、自身のRNA(Refee RNA)に強く結合していた。さらに、これら標的RNAがどのように制御されるのかを検証するため、Venus蛍光タンパク質融合Refeeを薬剤で発現誘導できるES細胞を利用した。Refee発現誘導時には標的RNA遺伝子のタンパク質レベルが増加することがわかった。つまり、Refeeは特定のRNAに結合することでその翻訳レベルを促進していると考えられる。MERVLやZscan4もRefeeと同様に全能性期に特異的に発現する2C遺伝子である。特にZscan4は様々な遺伝子の転写因子であることから(Zang et al. NAR, 2019)、RefeeはZscan4の下流遺伝子の発現に間接的に影響を及ぼしていると期待でき、さらなる解析を進めている。次に、相同遺伝子であるAlyrefの機能報告から、RefeeがmRNAのメチルシトシン修飾(m5C)を認識するか否かを検討した。ES細胞におけるRNA修飾状態やm5C修飾部位予測データベースを用いてRefee結合部位の修飾レベルを予測したが、どれも低い結果であった。他のRNA修飾であるメチルアデノシン修飾(m6A)についても同様に検討した結果、一部のRefee結合部位はm6A修飾されている可能性が高いことがわかった。</p> <p>最後に、in vivoにおけるRefeeの機能インパクトを検討するため、マウス受精卵のRefeeをアンチセンスオリゴによりノックダウンする実験を行なった。この結果、ノックダウン胚では胚発生が全能性期(2~4細胞期)で停止してしまうことを見出した。つまりRefeeが全能性期胚に必須な因子であることを示唆しており、本研究でRefeeを取り巻く全能性制御機序を解き明かすことへの重要性が支持された。</p> <p>This project aims to elucidate a regulatory network in totipotency built by Refee (Gm21312), which is transcribed from Murine endogenous retrovirus-L (MERVL) promoter. First, the grantee attempted RNA immunoprecipitation (iCLIP) utilizing an anti-Refee antibody originally established in the one's laboratory. The experiment revealed an RNA binding activity of Refee and transcripts strongly bound with the protein; MERVL, Refee itself, and Zscan4 RNAs. The identified targets here were all belonging to genes expressing specifically in totipotent cells. To speculate what happens on the transcripts through the interaction, the grantee generated ES cells inducible to express Refee fused with Venus fluorescent protein. The Refee induction led those targeted genes upregulated in protein levels. This result indicates Refee can enhance the translation of the selected transcripts. Also, Refee could indirectly affect downstream gene-expressions of Zscan4, as Zscan4 is known as a transcription factor for various genes (Zang et al. NAR, 2019).</p> <p>Next, the grantee examined if Refee recognizes 5-methylcytosine (m5C) modification of the transcripts. For this, the grantee predicted m5C sites in the Refee binding region based on mRNA modification profile in ES cell. However, the sequences hardly had m5C predicted. Instead, a portion of the binding sites highly likely bears 6-methyladenosine (m6A) modification.</p> <p>Last, the grantee conducted a knockdown of Refee in mouse zygotes to test the impact of Refee's function in vivo. The antisense oligonucleotide knockdown disabled zygotes to differentiate further than 2-4 cell embryonic stages. This result indicates that Refee is essential for early embryogenesis, and hence supports the importance of this project to reveal a mechanism of totipotency regulation.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200302">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200302</a>

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	500(特B)千円
	氏名	小林 美栄	氏名(英語)	Mie Kobayashi-Ishihara		
研究課題(日本語)						
内在性レトロウイルス関連遺伝子の機能から紐解く、初期胚の全能性制御ネットワーク						
研究課題(英訳)						
Totipotency regulatory network in mouse early embryos shaped by an endogenous retrovirus-related gene, Refee						
1. 研究成果実績の概要						
<p>研究代表者が独自に作製した Refee(2C-Alyref, Gm21312)に対するモノクローナル抗体を用いた RNA 免疫沈降(iCLIP)によって Refee は RNA と結合するタンパク質であることが実証された。また、Refee に結合している RNA 配列の網羅的な探索にも成功した。この結果、Refee は MERVL(マウス内在性レトロウイルス)や Zscan4、自身の RNA(Refee RNA)に強く結合していた。さらに、これら標的 RNA がどのように制御されるのかを検証するため、Venus 蛍光タンパク質融合 Refee を薬剤で発現誘導できる ES 細胞を利用した。Refee 発現誘導時には標的 RNA 遺伝子のタンパク質レベルが増加することがわかった。つまり、Refee は特定の RNA に結合することでその翻訳レベルを促進していると考えられる。MERVL や Zscan4 も Refee と同様に全能性期に特異的に発現する 2C 遺伝子である。特に Zscan4 は様々な遺伝子の転写因子であることから(Zang et al. NAR, 2019)、Refee は Zscan4 の下流遺伝子の発現に間接的に影響を及ぼしていると期待でき、さらなる解析を進めている。</p> <p>次に、相同遺伝子である Alyref の機能報告から、Refee が mRNA のメチルシトシン修飾(m5C)を認識するか否かを検討した。ES 細胞における RNA 修飾様態や m5C 修飾部位予測データベースを用いて Refee 結合部位の修飾レベルを予測したが、どれも低い結果であった。他の RNA 修飾であるメチルアデノシン修飾(m6A)についても同様に検討した結果、一部の Refee 結合部位は m6A 修飾されている可能性が高いことがわかった。</p> <p>最後に、in vivo における Refee の機能インパクトを検討するため、マウス受精卵の Refee をアンチセンスオリゴによりノックダウンする実験を行なった。この結果、ノックダウン胚では胚発生が全能性期(2~4 細胞期)で停止してしまうことを見出した。つまり Refee が全能性期胚に必須な因子であることを示唆しており、本研究で Refee を取り巻く全能性制御機序を解き明かすことへの重要性が支持された。</p>						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
<p>This project aims to elucidate a regulatory network in totipotency built by Refee (Gm31312), which is transcribed from Murine endogenous retrovirus-L (MERVL) promoter. First, the grantee attempted RNA immunoprecipitation (iCLIP) utilizing an anti-Refee antibody originally established in the one's laboratory. The experiment revealed an RNA binding activity of Refee and transcripts strongly bound with the protein; MERVL, Refee itself, and Zscan4 RNAs. The identified targets here were all belonging to genes expressing specifically in totipotent cells. To speculate what happens on the transcripts through the interaction, the grantee generated ES cells inducible to express Refee fused with Venus fluorescent protein. The Refee induction led those targeted genes upregulated in protein levels. This result indicates Refee can enhance the translation of the selected transcripts. Also, Refee could indirectly affect downstream gene-expressions of Zscan4, as Zscan4 is known as a transcription factor for various genes (Zang et al. NAR, 2019).</p> <p>Next, the grantee examined if Refee recognizes 5-methylcytosine (m5C) modification of the transcripts. For this, the grantee predicted m5C sites in the Refee binding region based on mRNA modification profile in ES cell. However, the sequences hardly had m5C predicted. Instead, a portion of the binding sites highly likely bears 6-methyladenosine (m6A) modification.</p> <p>Last, the grantee conducted a knockdown of Refee in mouse zygotes to test the impact of Refee's function in vivo. The antisense oligonucleotide knockdown disabled zygotes to differentiate further than 2-4 cell embryonic stages. This result indicates that Refee is essential for early embryogenesis, and hence supports the importance of this project to reveal a mechanism of totipotency regulation.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			