

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II
Sub Title	Totipotency regulatory network in mouse early embryos shaped by an endogenous retrovirus-related gene, Refee II
Author	小林, 美栄(Kobayashi-Ishihara, Mie)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2022
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本プロジェクトの目的は内在性レトロウイルス関連遺伝子、Refeeの機能を理解することにより、初期胚の全能性制御のメカニズムを明らかにすることである。特に2年目の本年は①Refee結合RNAがどのように制御されるのか、②Refeeノックダウン(KD)胚はなぜ発生できなくなるのかを追及した。</p> <p>①では、申請者はRefee結合RNAである、マウス内在性レトロウイルスL(MERVL) RNAに着目して実験を行った。MERVL RNAのFISH、およびMERVL Gagタンパク質やRefeeの免疫染色法を併用して2細胞期中期胚のMERVL RNAの挙動を追った。この結果、Refee KD胚ではコントロールKD胚と比べ、MERVL RNA、Gagタンパク質の発現量が有意に減少していた。これら発現量はRefeeの発現量と相関した。さらに、Refee KD胚ではMERVL RNAが核内に蓄積している傾向が有意に観察された。</p> <p>②を検討するため、Refee KD胚の2細胞期中期・後期、4細胞期胚をそれぞれ回収し、RNA-seqを行った。Refee KD胚のコントロールKD胚のトランスクリプトームを比較すると、Refee KD胚でRNAレベルが有意に低下する遺伝子が多く見られた。そこには①で観察された通り、MERVL RNAも含まれていた。これらの遺伝子と以前iCLIP-seq解析で得たRefee結合RNA配列を比較してみると、MERVL以外の共通性は認められなかった。さらにRNAレベルが低下する遺伝子には、2細胞期後期に胚性ゲノム活性化(ZGA)に伴って発現上昇する遺伝子が多く有意に濃縮されており、RefeeはZGAを惹起する因子であると示された。</p> <p>哺乳類の全能性期細胞、つまり受精卵~初期胚では父方と母方のゲノムが合体して新たなゲノムが構築される。これを踏まえると、Refeeは全能性において、できたての胚性ゲノムを正常に機能させるための因子と言えよう。メカニズムとしてはRNAの核外輸送によりターゲットRNAの発現量を促進する作用が示唆されたが、その機能とZGAがどうリンクしているのかを今後明らかにしていきたい。</p> <p>This project aims to understand the mechanisms of totipotency regulation in mouse early embryos by exploring the functions of Refee, one of the endogenous virus-related genes. In this year, the grantee especially studied 1) how the Refee binding RNAs are regulated, and 2) why Refee knockdown(KD) embryos show arrested features at the 2- to 4-cell embryonic stage.</p> <p>In study 1), the grantee tested one of the Refee binding targets, mouse endogenous retrovirus L (MERVL) RNA, by MERVL RNA-FISH with immunostaining against MERVL Gag and Refee using middle 2 cell embryos. Refee KD embryos resulted in suppressed levels of MERVL RNA and Gag protein. These suppressions showed significant correlations with the expression level of Refee. Furthermore, the MERVL RNA was dominantly distributed in the nucleus of Refee KD embryos.</p> <p>In study 2), the grantee conducted RNA-seq of Refee KD embryos in middle 2 cell-, late 2 cell-, or 4 cell-stage, respectively. Comparative analysis of the transcriptome signature between Refee- and control-KD embryos showed expressions of various genes, including MERVL, were downregulated in Refee KD embryos. Those genes were enriched to a gene set transcribed after major zygotic genome activation (ZGA) at the late 2 cell stage. Mere overlap was observed except MERVL between the downregulated genes and the Refee binding RNAs identified by the previous iCLIP-seq. Nonetheless, the data demonstrates that Refee is one of the inducers for major ZGA.</p> <p>Totipotency is a cell potency to differentiate into all the tissue including the placenta. As mammalian totipotent cells (i.e. zygote~early embryo) experience an assembly of maternal and paternal genome, Refee likely grants this nascent zygotic genome functional transcription. Mechanistically, Refee may enhance the RNA levels by its activity in nuclear RNA export, although a link between this mechanism and the ZGA induction should be studied further.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210276

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	300 (A) 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 II						
研究課題 (英訳)						
Totipotency regulatory network in mouse early embryos shaped by an endogenous retrovirus-related gene, Refee II						
1. 研究成果実績の概要						
<p>本プロジェクトの目的は内在性レトロウイルス関連遺伝子、Refee の機能を理解することにより、初期胚の全能性制御のメカニズムを明らかにすることである。特に 2 年目の本年は①Refee 結合 RNA がどのように制御されるのか、②Refee ノックダウン(KD)胚はなぜ発生できなくなるのかを追及した。</p> <p>①では、申請者は Refee 結合 RNA である、マウス内在性レトロウイルス L(MERVL) RNA に着目して実験を行った。MERVL RNA の FISH、および MERVL Gag タンパク質や Refee の免疫染色法を併用して 2 細胞期中期胚の MERVL RNA の挙動を追った。この結果、Refee KD 胚ではコントロール KD 胚と比べ、MERVL RNA、Gag タンパク質の発現量が有意に減少していた。これら発現量は Refee の発現量と相関した。さらに、Refee KD 胚では MERVL RNA が核内に蓄積している傾向が有意に観察された。</p> <p>②を検討するため、Refee KD 胚の 2 細胞期中期・後期、4 細胞期胚をそれぞれ回収し、RNA-seq を行った。Refee KD 胚のコントロール KD 胚のトランスクリプトームを比較すると、Refee KD 胚で RNA レベルが有意に低下する遺伝子が多く見られた。そこには①で観察された通り、MERVL RNA も含まれていた。これらの遺伝子と以前 iCLIP-seq 解析で得た Refee 結合 RNA 配列を比較してみると、MERVL 以外の共通性は認められなかった。さらに RNA レベルが低下する遺伝子には、2 細胞期後期に胚性ゲノム活性化(ZGA)に伴って発現上昇する遺伝子が有意に濃縮されており、Refee は ZGA を惹起する因子であると示された。</p> <p>哺乳類の全能性期細胞、つまり受精卵~初期胚では父方と母方のゲノムが合体して新たなゲノムが構築される。これを踏まえると、Refee は全能性において、できたての胚性ゲノムを正常に機能させるための因子と言えよう。メカニズムとしては RNA の核外輸送によりターゲット RNA の発現量を促進する作用が示唆されたが、その機能と ZGA がどうリンクしているのかを今後明らかにしていきたい。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>This project aims to understand the mechanisms of totipotency regulation in mouse early embryos by exploring the functions of Refee, one of the endogenous virus-related genes. In this year, the grantee especially studied 1) how the Refee binding RNAs are regulated, and 2) why Refee knockdown(KD) embryos show arrested features at the 2- to 4-cell embryonic stage.</p> <p>In study 1), the grantee tested one of the Refee binding targets, mouse endogenous retrovirus L (MERVL) RNA, by MERVL RNA-FISH with immunostaining against MERVL Gag and Refee using middle 2 cell embryos. Refee KD embryos resulted in suppressed levels of MERVL RNA and Gag protein. These suppressions showed significant correlations with the expression level of Refee. Furthermore, the MERVL RNA was dominantly distributed in the nucleus of Refee KD embryos.</p> <p>In study 2), the grantee conducted RNA-seq of Refee KD embryos in middle 2 cell-, late 2 cell-, or 4 cell-stage, respectively. Comparative analysis of the transcriptome signature between Refee- and control-KD embryos showed expressions of various genes, including MERVL, were downregulated in Refee KD embryos. Those genes were enriched to a gene set transcribed after major zygotic genome activation (ZGA) at the late 2 cell stage. Mere overlap was observed except MERVL between the downregulated genes and the Refee binding RNAs identified by the previous iCLIP-seq. Nonetheless, the data demonstrates that Refee is one of the inducers for major ZGA.</p> <p>Totipotency is a cell potency to differentiate into all the tissue including the placenta. As mammalian totipotent cells (i.e. zygote~early embryo) experience an assembly of maternal and paternal genome, Refee likely grants this nascent zygotic genome functional transcription. Mechanistically, Refee may enhance the RNA levels by its activity in nuclear RNA export, although a link between this mechanism and the ZGA induction should be studied further.</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)			
小林 美栄	宿主因子によるレトロウイルスの転写後制御の解明	日本レトロウイルス学キャンプ、熊本	2021 年 8 月 27 日			
小林 美栄	REFEE, A NUCLEAR RNA BINDING PROTEIN, REGULATES EARLY DEVELOPMENT IN MICE	ISSCR Tokyo symposium	2021 年 10 月 28 日			
小林 美栄	マウス全能性制御における Refee の転写後調節のインパクト	第 44 回日本分子生物学会学術集会	2021 年 12 月 3 日			