

Title	初期胚発生と全能性制御におけるトランスポゾンの役割
Sub Title	Role of retrotransposons in early embryonic development and totipotency control
Author	村野, 健作(Murano, Kensaku)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2022
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>LINE-1はヒトゲノムの約17%を占め、ゲノム上に自分自身のコピーを増やしていく性質を持つレトロトランスポゾンである。初期胚発生過程においてLINE-1は高発現するが、その生物学的意義や、宿主への影響についての研究はまだ少ない。本研究では、LINE-1がコードするタンパク質L1ORF1pに対するモノクローナル抗体を作製した。2細胞期胚様ES細胞抽出液を用いて免疫沈降法により精製し、質量分析を行ったところL1ORF1pの相互作用因子としてTDP-43を同定した。初期胚発生においてTDP-43とLINE-1の挙動を探索するため、TDP-43の変異体を作製し、免疫沈降方法およびLINE-1転移活性測定系により、TDP-43のN末ドメインがL1ORF1pと直接相互作用し、C末ドメインがLINE-1の転移抑制に重要であることを見出した。また、TDP-43のN末欠損変異体を発現するマウスES細胞株において、LINE-1のコピー数が20%程度増加していることを見出した。また、L1ORF1pの発現上昇が認められた。以上の結果から、TDP-43はL1ORF1pとの相互作用を介してLINE-1の転移反応を抑制していることが明らかとなった。次にマウス初期胚発生において高発現するLINE-1の転移反応への影響を見るため、TDP-43に対するsiRNAをマウス受精卵に注入し、TDP-43の発現抑制実験を行なった。その結果、胚盤胞のサイズが小さくなったことから細胞増殖速度の低下が示唆されたものの、多能性マーカー遺伝子の発現量に目立った変動がないことから、TDP-43の発現抑制は受精卵の発育プログラムに対して影響を与えないことが示唆された。一方でTIP-seq法(Transposon insertion profiling by sequencing)を用いて、TDP-43発現抑制胚におけるLINE-1の新規挿入箇所の解析を行ったところ、LINE-1の新規挿入が数百箇所検出された。以上の結果からTDP-43は初期胚発生の過程で脱抑制されるLINE-1の転移活性を抑制し、ゲノム恒常性の維持に寄与していることが明らかとなった。</p> <p>Class I Long interspersed nuclear element (LINE-1 or L1) has occupied ~17% of the human genome as a non-LTR retrotransposon through expanding itself with a "copy and paste" fashion. Intact LINE-1 has two open reading frames (ORFs) that encode respect L1ORF1p and L1ORF2p proteins, which assemble with LINE-1 mRNA to form ribonucleoprotein (RNP) particles that are capable of retrotransposition. It is reported that LINE-1 is highly expressed during mammalian preimplantation embryogenesis (Grow, E.J. Nature Genetics, 2017). Bearing violent LINE-1 expression, the embryonic genome must have a mechanism repressing LINE-1 retrotransposition to protect its integrity, which remains poorly understood. Using two-cell-like (2C-like) mouse embryonic stem cells (mESCs), we identified that TDP-43 is a robust repressor to LINE-1 retrotransposition. Loss-of-function analysis of TDP-43 function domains suggested that the N-terminal and C-terminal disorder regions are essential for inhibiting LINE-1 retrotransposition. Moreover, we established mouse ES cell lines expressing TDP-43 lacking N-terminal domain. To examine LINE-1 copy number in the cell line, we performed quantitative PCR using primer sets targeting active LINE-1 subfamilies. Indeed, the copy number of active LINE-1 subfamilies were increased by around 20%. We next moved on to analyzing the further impact of TDP-43 knockdown (KD) in embryogenesis. TDP-43 KD in mouse embryos by injecting siRNA has little effect on preimplantation development. To quantitate the activity of LINE-1 retrotransposition, we carried out Transposon Insertion Profiling-sequencing (Tip-seq). After normalizing read counts, we found genomic LINE-1 copies were increased upon TDP-43 KD. Taken altogether, our results suggested that TDP-43 represses LINE-1 retrotransposition post-transcriptionally and keep host genome integrity during preimplantation embryogenesis.</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20210002-0056

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	専任講師	補助額	500	千円
	氏名	村野 健作	氏名 (英語)	Kensaku Murano			
研究課題 (日本語)							
初期胚発生と全能性制御におけるトランスポゾンの役割							
研究課題 (英訳)							
Role of retrotransposons in early embryonic development and totipotency control							
研究組織							
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position					
村野健作 (Kensaku Murano)		医学部・分子生物学教室・専任講師					
1. 研究成果実績の概要							
<p>LINE-1 はヒトゲノムの約 17%を占め、ゲノム上に自分自身のコピーを増やしていく性質を持つレトロトランスポゾンである。初期胚発生過程において LINE-1 は高発現するが、その生物学的意義や、宿主への影響についての研究はまだ少ない。本研究では、LINE-1 がコードするタンパク質 L1ORF1p に対するモノクローナル抗体を作製した。2 細胞期胚様 ES 細胞抽出液を用いて免疫沈降法により精製し、質量分析を行ったところ L1ORF1p の相互作用因子として TDP-43 を同定した。初期胚発生において TDP-43 と LINE-1 の挙動を探索するため、TDP-43 の変異体を作製し、免疫沈降方法および LINE-1 転移活性測定系により、TDP-43 の N 末ドメインが L1ORF1p と直接相互作用し、C 末ドメインが LINE-1 の転移抑制に重要であることを見出した。また、TDP-43 の N 末欠損変異体を発現するマウス ES 細胞株において、LINE-1 のコピー数が 20%程度増加していることを見出した。また、L1ORF1p の発現上昇が認められた。以上の結果から、TDP-43 は L1ORF1p との相互作用を介して LINE-1 の転移反応を抑制していることが明らかとなった。次にマウス初期胚発生において高発現する LINE-1 の転移反応への影響を見るため、TDP-43 に対する siRNA をマウス受精卵に注入し、TDP-43 の発現抑制実験を行なった。その結果、胚盤胞のサイズが小さくなったことから細胞増殖速度の低下が示唆されたものの、多能性マーカー遺伝子の発現量に目立った変動がないことから、TDP-43 の発現抑制は受精卵の発育プログラムに対して影響を与えないことが示唆された。一方で TIP-seq 法(Transposon insertion profiling by sequencing)を用いて、TDP-43 発現抑制胚における LINE-1 の新規挿入箇所の解析を行ったところ、LINE-1 の新規挿入が数百箇所検出された。以上の結果から TDP-43 は初期胚発生の過程で脱抑制される LINE-1 の転移活性を抑制し、ゲノム恒常性の維持に寄与していることが明らかとなった。</p>							
2. 研究成果実績の概要 (英訳)							
<p>Class I Long interspersed nuclear element (LINE-1 or L1) has occupied ~17% of the human genome as a non-LTR retrotransposon through expanding itself with a “copy and paste” fashion. Intact LINE-1 has two open reading frames (ORFs) that encode respect L1ORF1p and L1ORF2p proteins, which assemble with LINE-1 mRNA to form ribonucleoprotein (RNP) particles that are capable of retrotransposition. It is reported that LINE-1 is highly expressed during mammalian preimplantation embryogenesis (Grow, E.J. Nature Genetics, 2017). Bearing violent LINE-1 expression, the embryonic genome must have a mechanism repressing LINE-1 retrotransposition to protect its integrity, which remains poorly understood. Using two-cell-like (2C-like) mouse embryonic stem cells (mESCs), we identified that TDP-43 is a robust repressor to LINE-1 retrotransposition. Loss-of-function analysis of TDP-43 function domains suggested that the N-terminal and C-terminal disorder regions are essential for inhibiting LINE-1 retrotransposition. Moreover, we established mouse ES cell lines expressing TDP-43 lacking N-terminal domain. To examine LINE-1 copy number in the cell line, we performed quantitative PCR using primer sets targeting active LINE-1 subfamilies. Indeed, the copy number of active LINE-1 subfamilies were increased by around 20%. We next moved on to analyzing the further impact of TDP-43 knockdown (KD) in embryogenesis. TDP-43 KD in mouse embryos by injecting siRNA has little effect on preimplantation development. To quantitate the activity of LINE-1 retrotransposition, we carried out Transposon Insertion Profiling-sequencing (Tip-seq). After normalizing read counts, we found genomic LINE-1 copies were increased upon TDP-43 KD. Taken altogether, our results suggested that TDP-43 represses LINE-1 retrotransposition post-transcriptionally and keep host genome integrity during preimplantation embryogenesis.</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)				
Ten D. Li, Kensaku Murano, Haruhiko Siomi	Inhibition of LINE-1 retrotransposition by TDP-43 during embryogenesis	第 22 回日本 RNA 学会年会	2021 年 7 月				