

Title	マウス初期胚における小胞体輸送による転移因子の抑制機構
Sub Title	Silencing of transposable elements by vesicle transport in early mouse embryo
Author	村野, 健作(Murano, Kensaku)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	ゲノムの膨大な領域 (ヒトでは40%以上) を占める転移因子は、転移によりゲノム進化の原動力となってきた。一方、その無秩序な転移・増殖によりゲノム機能は破綻し、生命維持の脅威となる。ヒトを含む真核生物の初期胚発生では、受精直後にゲノムワイドなDNAメチル化の消去が起きる。それに伴い、ゲノムの17%を占める転移因子LINE-1は高発現する。しかし、LINE-1の転移を抑え、ゲノムの恒常性を維持しながら正常な発生を担保するメカニズムは不明な点が多い。我々は、LINE-1のコードするORF1タンパク質(ORF1p)が、マウス2細胞期胚の細胞膜上に粒状分布することを見出した。LINE-1 RNAはORF1pと複合体(L1 RNP)をとり、細胞核に移行し、ORF2タンパク質の逆転写酵素活性によってゲノムに挿入される。しかし、細胞膜上にL1 RNPがトラップされれば、細胞核に移行することはできない。そのため、L1 RNPを細胞膜上へ輸送し係留することがLINE-1の転移を抑制する機構の一つではないかと着想した。 抗ORF1p抗体を用いて免疫染色を行なったところ、ORF1pは4細胞期をピークに徐々に減少したことから、初期胚はORF1pを分解するシステムを備えていることを示唆する。ORF1pは細胞膜上に無数の粒状として観察され、その分布パターンは小胞体輸送に関与するRab5aおよびRab7aの分布と酷似していた。この小胞体輸送系はタンパク質分解装置であるリソソームへの輸送を担う。そこで、抗Rab5a抗体および抗Rab7a抗体を用いて免疫染色を行なったところ、Rab5aとRab7aはマウス初期胚の細胞膜上においてORF1pと共局在することが明らかとなった。次にRab5aをコードする人工合成mRNAを初期胚に注入し、過剰発現を行なったところ、ORF1pの粒状分布が消失した。過剰発現されたRab5aはORF1pの輸送を促進したと考えられる。以上の結果から、細胞膜上へ係留されたORF1pは小胞体を介してリソソームへ輸送・分解されることが示唆された。 The transposable elements, which occupy a vast portion of the genome (more than 40% in humans), have been a driving force behind genome evolution through transposition. On the other hand, the chaotic transposition and proliferation of these elements can lead to the malfunction of genome functions, posing a threat to the maintenance of life. In the early embryonic development of eukaryotic organisms, including humans, widespread erasure of DNA methylation occurs immediately after fertilization. In parallel with this process, the transposable element LINE-1, constituting 17% of the genome, is highly expressed. However, the mechanisms responsible for inhibiting LINE-1 transposition, maintaining genomic stability, and ensuring normal development remain elusive. Our study revealed that the ORF1 protein (ORF1p) encoded by LINE-1 exhibits a granular distribution on the cell membrane of mouse 2-cell stage embryos. LINE-1 RNA forms a complex with ORF1p (L1 RNP), translocates to the cell nucleus, and is inserted into the genome through the reverse transcriptase activity of the ORF2 protein. However, if L1 RNP is trapped on the plasma membrane, it cannot transition to the cell nucleus. Therefore, we hypothesized that anchoring L1 RNP on the plasma membrane could be a mechanism to suppress LINE-1 transposition. Immunostaining using anti-ORF1p antibodies revealed that ORF1p gradually decreased after reaching its peak at the 4-cell stage, suggesting that early embryos possess a system to degrade ORF1p. ORF1p was observed as numerous granules on the plasma membrane, and its distribution pattern closely resembled the distribution of Rab5a and Rab7a, which are involved in vesicle transport. This vesicle transport system facilitates cargo transport to the lysosome, a protein degradation organelle. Immunostaining with anti-Rab5a and anti-Rab7a antibodies confirmed the co-localization of Rab5a and Rab7a with ORF1p on the plasma membrane of early embryos. Furthermore, injecting synthetic mRNA encoding Rab5a into early embryos for overexpression resulted in the disappearance of the granular distribution of ORF1p. It suggests that the overexpression of Rab5a promoted the transport of ORF1p to the lysosome. Taken together, the vesicle transport and the lysosome-mediated degradation of ORF1p might safeguard the genome during pre-implantation embryogenesis.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230279

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.

2023年度 学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

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 (特B)
	氏名	村野 健作	氏名(英語)	Murano, Kensaku		
研究課題（日本語）						
マウス初期胚における小胞体輸送による転移因子の抑制機構						
研究課題（英訳）						
Silencing of transposable elements by vesicle transport in early mouse embryo						
1. 研究成果実績の概要						
ゲノムの膨大な領域（ヒトでは40%以上）を占める転移因子は、転移によりゲノム進化の原動力となってきた。一方、その無秩序な転移・増殖によりゲノム機能は破綻し、生命維持の脅威となる。ヒトを含む真核生物の初期胚発生では、受精直後にゲノムワイドなDNAメチル化の消去が起きる。それに伴い、ゲノムの17%を占める転移因子LINE-1は高発現する。しかし、LINE-1の転移を抑え、ゲノムの恒常性を維持しながら正常な発生を担保するメカニズムは不明な点が多い。我々は、LINE-1のコードするORF1タンパク質(ORF1p)が、マウス2細胞期胚の細胞膜上に粒状分布することを見出した。LINE-1 RNAはORF1pと複合体(L1 RNP)をとり、細胞核に移行し、ORF2タンパク質の逆転写酵素活性によってゲノムに挿入される。しかし、細胞膜上にL1 RNPがトラップされれば、細胞核に移行することはできない。そのため、L1 RNPを細胞膜上へ輸送し係留することがLINE-1の転移を抑制する機構の一つではないかと着想した。 抗ORF1p抗体を用いて免疫染色を行なったところ、ORF1pは4細胞期をピークに徐々に減少したことから、初期胚はORF1pを分解するシステムを備えていることを示唆する。ORF1pは細胞膜上に無数の粒状として観察され、その分布パターンは小胞体輸送に関与するRab5aおよびRab7aの分布と酷似していた。この小胞体輸送系はタンパク質分解装置であるリソソームへの輸送を担う。そこで、抗Rab5a抗体および抗Rab7a抗体を用いて免疫染色を行なったところ、Rab5aとRab7aはマウス初期胚の細胞膜上においてORF1pと共局在することが明らかとなった。次にRab5aをコードする人工合成mRNAを初期胚に注入し、過剰発現を行なったところ、ORF1pの粒状分布が消失した。過剰発現されたRab5aはORF1pの輸送を促進したと考えられる。以上の結果から、細胞膜上へ係留されたORF1pは小胞体を介してリソソームへ輸送・分解されることが示唆された。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
The transposable elements, which occupy a vast portion of the genome (more than 40% in humans), have been a driving force behind genome evolution through transposition. On the other hand, the chaotic transposition and proliferation of these elements can lead to the malfunction of genome functions, posing a threat to the maintenance of life. In the early embryonic development of eukaryotic organisms, including humans, widespread erasure of DNA methylation occurs immediately after fertilization. In parallel with this process, the transposable element LINE-1, constituting 17% of the genome, is highly expressed. However, the mechanisms responsible for inhibiting LINE-1 transposition, maintaining genomic stability, and ensuring normal development remain elusive. Our study revealed that the ORF1 protein (ORF1p) encoded by LINE-1 exhibits a granular distribution on the cell membrane of mouse 2-cell stage embryos. LINE-1 RNA forms a complex with ORF1p (L1 RNP), translocates to the cell nucleus, and is inserted into the genome through the reverse transcriptase activity of the ORF2 protein. However, if L1 RNP is trapped on the plasma membrane, it cannot transition to the cell nucleus. Therefore, we hypothesized that anchoring L1 RNP on the plasma membrane could be a mechanism to suppress LINE-1 transposition. Immunostaining using anti-ORF1p antibodies revealed that ORF1p gradually decreased after reaching its peak at the 4-cell stage, suggesting that early embryos possess a system to degrade ORF1p. ORF1p was observed as numerous granules on the plasma membrane, and its distribution pattern closely resembled the distribution of Rab5a and Rab7a, which are involved in vesicle transport. This vesicle transport system facilitates cargo transport to the lysosome, a protein degradation organelle. Immunostaining with anti-Rab5a and anti-Rab7a antibodies confirmed the co-localization of Rab5a and Rab7a with ORF1p on the plasma membrane of early embryos. Furthermore, injecting synthetic mRNA encoding Rab5a into early embryos for overexpression resulted in the disappearance of the granular distribution of ORF1p. It suggests that the overexpression of Rab5a promoted the transport of ORF1p to the lysosome. Taken together, the vesicle transport and the lysosome-mediated degradation of ORF1p might safeguard the genome during pre-implantation embryogenesis.						
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)			