

令和元年5月22日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02509

研究課題名(和文) 『エピジェネティック遺伝』の人為的誘導と解析

研究課題名(英文) Development of Experimental System and Analysis of Transgenerational Epigenetic Inheritance

研究代表者

仲野 徹 (Nakano, Toru)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00172370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,600,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック修飾は一般的には遺伝しないが、特定の条件では親から子へと伝達されることが知られている。ヒストン修飾の変異を誘導するトランスジェニックマウスや生殖細胞特異的に発現する小分子非コードRNAであるpiRNA (PIWI interacting RNA) の人為的制御法などを用いて、そのシステム構築と分子機構の解析に挑戦した。残念ながら、ヒストン修飾の変異誘導によるトランスジェニックマウスの作出はうまくいかなかった。しかし、piRNAの人為的制御により、雄性生殖細胞にDNAメチル化異常が生じるマウスの解析をおこなうことができた。また、その基礎となるpiRNA産生機構の解析をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック遺伝は、疾患が親から子へと伝達されるメカニズムのひとつとして注目され始めている。そういった現象が存在することは明かであるが、解析に適したシステムがあまりないために、大きな興味を抱かれているにもかかわらず、その研究は遅れ気味である。我々が作出し解析をおこないつつある。雄性生殖細胞のDNAメチル化に異常が生じるマウスは、エピジェネティック遺伝の解析に大きなインパクトを与える可能性があることを明らかにすることができた。今後、親から子へと伝達されるDNAメチル化異常が、マウス個体にどのような影響をおよぼすかを明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic modification is not inherited in general. However, it has been reported that the modification is inherited from parents to progenies. In this study, we tried to analyze such inheritance by using two strategies. One is transgenic mice in which histone modification is altered, and the other is the system using artificial regulation of germ cell specific small RNAs, piRNAs (PIWI interacting RNAs). Unfortunately, the former strategy does not work by some unknown reasons. In contrast, the latter strategy has enabled us to analyze the mice in which abnormalities of DNA methylation took place in their male germ cells. Meanwhile, we have carried out the molecular mechanisms of piRNA production, which underlie the DNA methylation of male germ cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 生殖細胞 遺伝子発現制御 精子形成 非コードRNA DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス制御は、主として DNA のメチル化とヒストン修飾によっておこなわれる、塩基配列の変化をともしない遺伝子発現制御である。基本的には、個体内における発生や分化にともなう制御機構であるが、近年、エピジェネティックな状態が世代を超えて遺伝するという、『エピジェネティック遺伝』が存在することを示唆する研究がいくつか報告され、獲得形質の遺伝という観点から大きな脚光を浴びている。しかし、エピジェネティック遺伝という現象自体は確実視されているものの、その分子機構は不明なまま残されている。

2. 研究の目的

我々の研究室では、生殖細胞特異的な小分子 RNA である piRNA (piwi interacting RNA) の産生機構、および、piRNA による遺伝子発現制御機構についての研究を精力的におこなってきた。その成果として、piRNA を人為的に誘導することにより、精子形成過程において DNA メチル化を制御する『人為的 piRNA 産生誘導による DNA メチル化を介した遺伝子発現抑制法』という独創的な方法論を確立することができた。

本研究では、その方法や従来のトランスジェニックマウスの方法を駆使することにより、精子形成過程において、人為的に DNA のメチル化やヒストン修飾の異常を誘導する。そして、そのように人為的に誘導されたエピジェネティック変異が、子の代の発生・分化に影響を与えるかどうかの解析をおこなう。このように、本研究は、自らが開発した独創的な方法論などを駆使することにより、エピジェネティック遺伝がほんとうに成立するのかどうか、また、その成立の分子機構に DNA メチル化やヒストン修飾がどのように関与するか、などを明らかにするものである。

3. 研究の方法

我々はこれまでの研究成果に基づき、胎生期の雄性生殖細胞にアンチセンス RNA を発現させることにより、piRNA を人為的に誘導し、特定の遺伝子のプロモーター領域に *de novo* DNA メチル化を誘導する方法論を確立した。すでに、この方法は、EGFP トランスジーン、および、胎生期生殖細胞で発現する内在性遺伝子において利用可能なことを明らかにしている。この方法を用いて、(1) EGFP をマーカーに用いたエピジェネティック遺伝の解析、(2) インプリンティング遺伝子におけるエピジェネティック遺伝の成立、(3) 精子のヒストン修飾に関与する遺伝子におけるエピジェネティック遺伝、という三つのシステムにおいて、遺伝子特異的なエピジェネティック遺伝という現象が本当に存在するのかどうか、また、存在するのであれば、どのような異常がひきおこされるのか、を明らかにしていく。さらに、(4) ヒストン修飾に異常のある精子を産生するトランスジェニックマウスを作成し、エピジェネティック状態に異常のある精子が初期胚において遺伝子発現異常を誘導できるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) EGFP をマーカーに用いたエピジェネティック遺伝の解析

Oct4 プロモーターにより EGFP が制御されるトランスジェニックマウスでは、初期胚ならびに未分化な雄性生殖細胞において EGFP が発現する。そのマウスにおいて、人為的に piRNA を産生させるため、胎生期の雄性生殖細胞においてのみ発現する MIWI2 のプロモーターにより EGFP のアンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウスを作成し、交配した。

このダブルトランスジェニックマウスでは、胎生期雄性生殖細胞において、EGFP に対する piRNA が出現し、EGFP 遺伝子ならびにそのプロモーター領域に高度な DNA のメチル化が誘

導され、結果的に、遺伝子発現が抑制されることを見出した。

次に、DNA メチル化に関与する遺伝子である DNMT3L 遺伝子に対する piRNA を産生するトランスジェニックマウスを作成し、その表現型の解析をおこなった。

その結果、DNMT3L アンチセンスを発現する二つのトランスジェニックマウスラインのうち、一方のラインでは、アンチセンス鎖を発現するトランスジーンが二ヶ所に挿入されていることが明らかになった。交配により、その二ヶ所のトランスジーンのうち片側のみを有するトランスジェニックマウスを作成し、詳細な解析をおこなった。

その結果、人為的 piRNA 抑制は、トランスジーンのコピー数に依存するが、挿入部位が piRNA クラスターであるかどうかには依存しないことが明らかになった。この結果は、従来の定説に反するものである。

また、二つのラインのうちの片方は、DNA メチル化に異常のある精子を産生することを見出した。このトランスジェニックマウスを用いた交配により、精子における DNA メチル化異常が子孫の表現型に異常を来すかどうかの解析をおこなう実験を計画し、現在遂行中である。

また、この現象の詳細を明らかにするには、piRNA の産生機構や、piRNA による DNA メチル化機構を明らかにする必要があると考え、PNLDC1 遺伝子および GPAT2 遺伝子の piRNA 産生機構における詳細な解析をおこなった。その結果、PNLDC1 は、piRNA 産生のトリマーとして機能することがわかった。

また、レトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化の網羅的解析をおこない、レトロトランスポゾン遺伝子のメチル化と piRNA 産生の相関関係や、piRNA の産生に関与する MIWI2 が、産生機構のみではなく、レトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化に、ヒストン修飾を介して関与することを明らかにした。

(2) インプリンティング遺伝子におけるエピジェネティック遺伝の成立

インプリント遺伝子とは、一対ある遺伝子のうち、卵子に由来する遺伝子のみ、あるいは、精子に由来する遺伝子のみが発現する遺伝子であり、その発現制御は DNA のメチル化に大きく依存している。卵子形成過程において DNA がメチル化を受け、発現が抑制されるインプリント遺伝子が母性インプリント遺伝子、逆に、精子形成過程において DNA がメチル化を受けるインプリント遺伝子が父性インプリント遺伝子である。

インプリント遺伝子の DNA メチル化は、受精後すぐのグローバルな DNA 脱メチル化を免れる。したがって、受精後の発生過程において、卵子に由来する母性インプリント遺伝子は DNA メチル化のために発現せず、精子に由来する母性インプリント遺伝子のみが発現する。

そこで、我々が開発した人為的 piRNA 産生誘導による DNA メチル化制御法を用いて、精子形成では DNA のメチル化を受けない母性インプリント遺伝子である Peg10 と Snrpn の DNA メチル化異常の誘導を試みた。

十分に成功する見込みのある研究として開始したが、何らかの理由により、実験目的に合致するトランスジェニックマウスの作出にいたらず、本研究テーマは途中年度で中止を余儀なくされた。

(3) 精子のヒストン修飾に関与する遺伝子におけるエピジェネティック遺伝

ヒストン修飾遺伝子の発現を、piRNA 依存的な DNA メチル化誘導法を用いて抑制することにより、ヒストン修飾が異常な精子を産生することを目的に、トランスジェニックマウスの作成を計画した。

実際には piRNA 依存的な DNA メチル化誘導法によりヒストン H3K4 のメチル化に関与する MLL1 遺伝子の発現が抑制されるマウス、およびジメチルヒストン H3K9 を特異的に脱メ

チル化する酵素である jhdm2 を精子形成過程において発現するマウスの作成を試みた。

残念ながら、前者のマウスでは明確な表現が認められず、後者のマウスは作出することができなかった。これらの結果をうけて、この実験計画は中止した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件) 全て査読あり

1. Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Chuma S, Arakawa T, Nishimura T, Hasuwa H, Tachibana T, Ikawa M, Nakano T. GPAT2 is required for piRNA biogenesis, transposon silencing, and maintenance of spermatogonia in mice. *Biol Reprod*, in press, 2019
2. Nishimura T, Nagamori I, Nakatani T, Izumi N, Tomari Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T. PNLDC1, mouse pre-piRNA Trimmer, is required for meiotic and post-meiotic male germ cell development *EMBO Rep*, e44957, 2018
3. Nagamori I, Kobayashi H, Nishimura T, Yamagishi R, Katahira J, Kuramochi-Miyagawa S, Kono T, Nakano T. Relationship between PIWIL4-mediated H3K4me2 demethylation and piRNA-dependent DNA methylation *Cell Rep*, 25: 350-356, 2018
4. Kojima-Kita K, Kuramochi- Miyagawa S, Nagamori I, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Akazawa T, Inoue N, Nakano T. MIWI2 as an effector of DNA methylation and gene silencing in embryonic male germ cells. *Cell Rep*, 16:2819-2828, 2016
5. Nagamori I, Kobayashi H, Shiromoto Y, Nishimura T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T. Comprehensive DNA methylation analysis of retrotransposons in male germ cells *Cell Rep*, 12:1541-7, 2015
6. Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T, Tomonaga K. piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA*, 21:1691-703, 2015
7. Ito D, Shiromoto Y, Shin-ya Y, Ishii C, Nishimura T, Ogonuki N, Ogura A, Kuramochi-Miyagawa, Nakano T. Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells. *Current Biol*, 25: 901-906, 2015

〔学会発表〕(計 7件)

1. 仲野 徹
エピジェネティクスとは何か?、第25回日本時間生物学会学術大会、特別講演
2018年10月20日 長崎
2. 仲野 徹
小児白血病がんエピジェネティクス、第40回近畿小児血液・がん研究会、特別講演
2018年2月16日 大阪
3. 仲野 徹
エピジェネティクスとは何か、第59回日本小児血液・がん学会、特別講演
2017年11月9日 松山
4. 仲野 徹
エピジェネティクス入門、第36回日本臨床運動療法学会、特別講演
2017年9月2日 大阪

5. 仲野 徹

エピジェネティクス入門、第104回日本泌尿器科学会総会、特別講演

2016年4月23日 仙台

6. 仲野 徹

DNA methylation and gene silencing of retrotransposons by piRNA in embryonic male germ cells,
Copnferences Jacques Monod DNA methylation and Demethylation

2015年11月17日 フランス

7. 仲野 徹

エピジェネティクス研究・私史、エピジェネティクス研究会、次期会長講演

2015年5月25日 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/nakano/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。