

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16141

研究課題名（和文）雄性生殖細胞におけるエピゲノムの成立機構と、その次世代に及ぼす影響

研究課題名（英文）The study of epigenetic mechanism in male germ cells and its effect on the next generation.

研究代表者

北 加奈子（KITA, Kanako）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60813631

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題において、PIWIファミリータンパク質の1つであるMIWI2と機能的関連を有するタンパクとして同定したMORC3（microorchidia 3）の胎仔期精巣での機能解析を行った。生殖細胞特異的Morc3コンディショナルノックアウトマウスの胎仔期精巣を用いた解析により、MORC3は、piRNA生産経路の最初の段階である、piRNA前駆体の転写機構に関与し、レトロトランスポゾン領域のde novo DNAのメチル化の獲得機構に関与している事が分かった。また、この変異雄マウスでは妊孕性の低下が認められた。この研究成果をScientific Reports誌に申請者を筆頭著者として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外において非コードRNAおよびエピゲノム成立の研究は急進展している。本研究課題において、PIWIファミリーを中心にそれに関与するタンパク複合体の機能解析を行うことは、雄性生殖細胞における非コード小分子RNAを介したエピゲノム成立機構の解明に大きく貢献できるものである。近年、生殖細胞のエピゲノム異常による不妊が広く知られてきているが、Morc3もヒトの雄性不妊の原因遺伝子の1つである可能性が高い。この分野は、ヒトを用いた研究が困難であるため、マウスを用いた基礎研究こそが医学の進展に貢献できるものである。

研究成果の概要（英文）：In this research project, I analyzed the function of MORC3 (microorchidia 3), which I identified as a protein functionally related to MIWI2, one of the PIWI family proteins, in fetal testis. Using fetal testes from germ cell-specific Morc3-conditional knockout mice, I found that MORC3 is involved in the transcription of piRNA precursors, the first step in the piRNA production pathway, and in the acquisition of de novo DNA methylation in the retrotransposon region. And the loss of MORC3 leads to subfertility of the male mice from the standpoint of pregnancy rate. The result of this study has been published in Scientific Reports.

研究分野：生殖生物学

キーワード：エピジェネティクス de novo DNAメチル化 レトロトランスポゾン PIWIファミリータンパク マウス精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は遺伝情報を次世代に受け継ぐことができる唯一の細胞であり、その発生過程では、DNAメチル化にダイナミックな変化が生じる。雄性生殖細胞では、胎生 10.5-13.5 日の始原生殖細胞の時期にゲノム全体に DNA 脱メチル化が生じ、その後、ゴノサイトと呼ばれる胎生 15.5-18.5 日の時期に DNA メチル化が新たに獲得される。レトロトランスポゾン遺伝子の発現は、この *de novo* DNA メチル化によりサイレンシングをうける。

これまでに、ゴノサイトの時期において、(1) piRNA と呼ばれる生殖細胞特異的な非コード小分子 RNA が多量に発現していること、(2) piRNA の多くはレトロトランスポゾン由来であること、(3) piRNA 産生に重要な機能を有する MILI と MIWI2 というマウス PIWI ファミリータンパクが発現していること、など、申請者の研究を含む種々の研究から、piRNA は精子形成におけるレトロトランスポゾン領域の *de novo* DNA メチル化に重要な機能を有することが明らかにされてきた (図 1A)。また、胎仔期精巣において、MIWI2 は主に核内に局在するが、piRNA の産生されない変異マウスでは、MIWI2 が細胞質にしか存在しないことも報告されている (図 1B)。これらを総合して、piRNA を結合した MIWI2 が核内に移行し、piRNA をガイドとして piRNA-MIWI2 複合体がレトロトランスポゾン領域にリクルートされ、*de novo* DNA メチル化の獲得に機能していると考えられている。

申請者は、この分子機構を解明するために、MIWI2 と機能的関連を有するタンパクの探索を試み、MIWI2 に結合するタンパクとして MORC3 (microrchidia 3) を同定した。Morc ファミリー遺伝子の一つである MORC3 は、ユビキタスに発現しており、遺伝子の転写抑制機構に関与する分子である。しかし、胎仔期精巣での MORC3 の機能及び、MORC3 を含む piRNA-MIWI2 複合体の *de novo* DNA メチル化における作用機序は、生物学的に極めて重要であるにも関わらず、未だに詳細は不明のままであった。

2. 研究の目的

多細胞生物におけるいろいろな種類の細胞の発生・分化は、エピゲノム修飾による制御機構によって独自性を獲得する過程と捉えることができる。その分子機構は非常に重要であるが、同時に複雑であり、未知の点が数多く残されている。本研究では、生殖細胞の分化という、生物学・生命科学の分野において非常に重要な課題について、マウス胎仔期雄性生殖細胞における MIWI2 の機能解明を軸に、レトロトランスポゾン遺伝子の *de novo* DNA メチル化機構の解明を中心としたエピゲノム成立機構についての研究を展開することとした。

3. 研究の方法

(1) 雄性生殖細胞における MIWI2 と MORC3 の機能的関連についての解析

MORC3 と piRNA-MIWI2 複合体との機能的関係を調べるために、生殖細胞特異的 *Morc3* コンデ

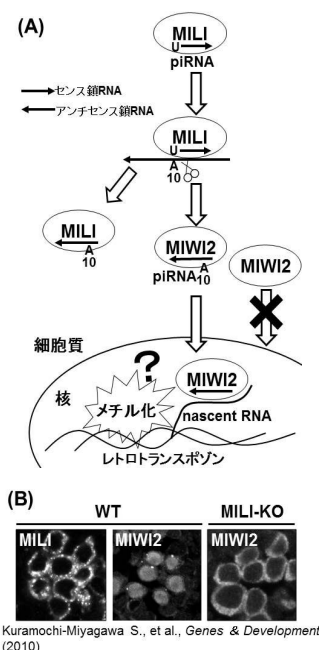


図1.胎仔期精巣内でのpiRNA産生機構と*de novo* DNAメチル化

ィショナルノックアウトマウスを用いて、雄性生殖細胞における DNA メチル化状態を解析し、MIWI2 に結合する piRNA 産生への影響を解明した。更に、その精子に由来する胚の発生を詳細に調べることにより、MORC3 の胎仔期精巣における *de novo* DNA メチル化への関与だけでなく、エピゲノム異常の次世代への影響についても明らかにしたいと考えた。

MORC3 タンパクはユビキタスに発現すること、また、*Morc3* 欠損マウスは出生直後に死亡すること、から、生殖細胞特異的な MORC3 の機能解析を行うために、*Morc3* 遺伝子に loxP を挿入してある *Morc3*(F1/F1) マウス、および、胎仔期または生後の生殖細胞特異的に Cre タンパクを発現する Tnap-Cre マウスを交配し、生殖細胞特異的 *Morc3* コンディショナルノックアウトマウス [*Morc3*(F1/F1), Tnap-Cre] を作製した。

予備的成果より、胎生 14.5-18.5 日齢の精巣において、MORC3 は生殖細胞でのみ核内に局在することを見出している。また、MORC3 はヒストン H3 のリジン残基 (K4) のメチル化を認識し結合するドメインを有することもわかっているので、MORC3 に対する抗体を用いた ChIP 法により胎仔期精巣における MORC3 のゲノム上の局在位置を明らかにした。

予備的成果より、レトロトランスポゾンである *Line-1* の制御領域の DNA のメチル化が、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスの雄性生殖細胞において低下していることをバイサルファイトシーケンス法により明らかにしていること、また、同様の結果を、メチル化感受性制限酵素を用いたザンプロット法によっても確認していることから、MORC3 が *Line-1* 制御領域における *de novo* DNA メチル化の獲得に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えた。そこで、胎仔期の精巣における *de novo* DNA のメチル化において、MORC3 がどの程度寄与しているのかを明らかにした。具体的には、野生型マウス、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスの雄性生殖細胞を採取し、DNA のメチル化異常がどの領域で生じているのか、また、どの程度異常が生じているのかを複数のレトロトランスポゾン領域における、バイサルファイトシーケンス法により解析し、比較した。同時に、各々の精巣から RNA を調整し、ノザンプロット法を用いて DNA のメチル化異常が顕著に認められた遺伝子の転写量を解析した。

一方、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスでは、*Miwi2* 欠損マウスでみられるような減数分裂期での精子形成の停止が認められず、精巣の重量・精巣上体尾部に存在する精子数には、野生型と比較して違いは認められなかった。しかし、交配テストを行った結果、*Morc3* コンディショナルノックアウト雄マウスでは、妊孕性が低い傾向が認められた。前述のように、*Morc3* コンディショナルノックアウト雄マウスの精子においては、*Line-1* 制御領域における DNA メチル化の低下が顕著であった。これらの予備的成果は、*Line-1* 制御領域における DNA メチル化レベルと妊孕性に何らかの関係性があることを示している。そこで、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスから採取した精子の胚発生への影響を調べるために、野生型マウスの卵子との体外受精を行い、胚の発生異常が生じる時期を経時的に調べた。

MIWI2 複合体を構成する種々のタンパクを欠損するマウスにおいて、piRNA の量、とりわけ、MIWI2 に結合する piRNA の量が野生型に比べて有意に低下していることが報告されている。そこで、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスにおいても MIWI2 に結合する piRNA 産生に影響があるかどうかを、piRNA assay 及び deep sequence 法を用いて調べた。その結果、piRNA の総生産量が半分程度に減少していること、更に、MILI 及び MIWI2 に結合している piRNA 量がどちらも同程度減少していることなどが明らかになった。そこで、次に、piRNA 産生機構の最初のステップである piRNA 前駆体の転写機構について調べた。これにより、MORC3 が piRNA 産生機構のどの過程に関与しているかを

明らかにすることにした。

(2) 胎仔期生殖細胞における *de novo* DNA メチル化機構に関わる分子の探索と機能解析

胎仔期精巣における MIWI2 の機能を解明するため、MIWI2 に結合する分子、及び MIWI2 の標的ゲノム領域に結合する分子を同定、解析した。

MIWI2 が発現する段階の胎仔期雄性生殖細胞の数は非常に少ないため、実験材料の収集に相当な時間と経費がかかる。また、MIWI2 は細胞質と核内の両方に存在するが、核内の MIWI2 のみを認識する優れた抗体が存在しない。そこで、上述のような *Line-1* レトロトランスポゾン制御領域に結合する ZF-MIWI2 融合タンパクを胎仔期精巣で発現する TG マウスを用いた研究を遂行した。融合タンパクには、Flag タグと核内移行シグナルを付加してあるので、この TG マウスの胎仔期精巣を実験材料に、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降と質量分析を行い、胎仔期生殖細胞において MIWI2 に結合する核内タンパクの同定を試みた (図 2)。

この方法では、ZFタンパクが標的ゲノム領域と結合するため、MIWI2に結合するタンパクだけでなく、そのゲノム領域に結合するタンパク複合体も網羅的に解析することができるので、*de novo* DNAメチル化機構に関わる分子の探索に非常に有効である。この方法で、MIWI2との結合タンパクとして新たにCNOT1(CCR4-NOT transcription complex subunit 1)を同定し、CNOT1の胎仔期雄性生殖細胞における機能解析を行う為に、生殖細胞特異的Cnot1コンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を開始した。生殖細胞特異的Cnot1コンディショナルノックアウトマウスを作製するために、共同研究先である、山本雅先生(沖縄科学技術大学院大学(OIST))より、Cnot1(F1/F1)マウスの譲渡を受け、そのマウスと、Tnap-Creマウスとを交配し、コンディショナルノックアウトマウス[Cnot1(F1/F1), Tnap-Cre]を作製し、種々の実験を行った。CNOT1はMIWI2結合タンパクであることから、レトロトランスポゾン領域の *de novo* DNAメチル化機構に関わる分子である可能性が推測された為、*Cnot1*コンディショナルノックアウト胎仔期雄性生殖細胞を用いて、レトロトランスポゾン領域の DNAのメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法を用いて調べた。また、piRNAの総産生量及び、MILI結合またはMIWI2結合piRNAをsmall RNA シーケンス法を用いて調べた。一方で、*Cnot1*コンディショナルノックアウトマウスの交配テストを行い、妊孕性を調べた。

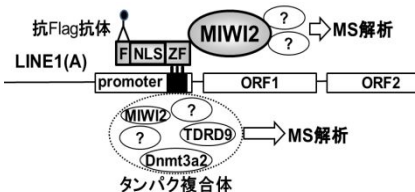


図2. ZF-MIWI2 TGマウスの胎仔期精巣を用いた *de novo* DNAメチル化機構に関わる分子の探索

4. 研究成果

(1) 雄性生殖細胞における MIWI2 と MORC3 の機能的関連についての解析

MIWI2 結合タンパクとして同定した MORC3 の生殖細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製し、種々の解析を行った。

Morc3 コンディショナルノックアウトマウスの雄性生殖細胞では、レトロトランスポゾンである *Line-1* (A-type 及び TF-type) の制御領域の DNA のメチル化が低下していること、piRNA の総生産量が半分程度に減少していること、更に、MILI 及び MIWI2 に結合している piRNA 量が減少していることなどが明らかになった。これらのことから、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスで認められる piRNA 産生量の低下、及びそれによる MILI 及び MIWI2 に結合する piRNA 量の減少が、胎仔期精巣におけるレトロトランスポゾン領域の *de novo* DNA のメチル化の低下に影響し、*Line-1*

の発現上昇を引き起こしている事が示唆された。*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスにおいて、piRNA 量の減少が認められたことから、胎仔期 piRNA クラスター領域から転写される piRNA 前駆体の転写レベルを、野生型と *Morc3* コンディショナルノックアウトマウスの胎仔期精巣を実験材料に、RT-qPCR 法を用いて調べた。その結果、*Morc3* コンディショナルノックアウト精巣では、piRNA 前駆体の転写量が野生型と比べて有意に減少している事が分かった。更に、MORC3 に対する抗体を用いた ChIP 法により、胎仔期精巣において、piRNA 前駆体の転写領域である piRNA クラスター領域に MORC3 が局在していることも明らかになった。

一方で、*Morc3* コンディショナルノックアウト雄マウスでは、妊孕性が低い傾向が認められたことから、*Morc3* コンディショナルノックアウトマウスから採取した精子の胚発生への影響を調べるために、野生型マウスの卵子との体外受精を行い、胚の発生異常が生じる時期を経時的に調べたが、技術的に未熟な問題もあり、正確な結果を得ることができなかつた。

これらの結果から、MORC3は、piRNAクラスター領域に局在し、piRNA生産経路の最初の段階である、piRNA前駆体の転写機構に関与することで、piRNA依存的な*de novo* DNAメチル化機構における役割を担っていることが分かった(図3)。以上の研究成果をScientific Reports誌に申請者を筆頭著者として発表した。

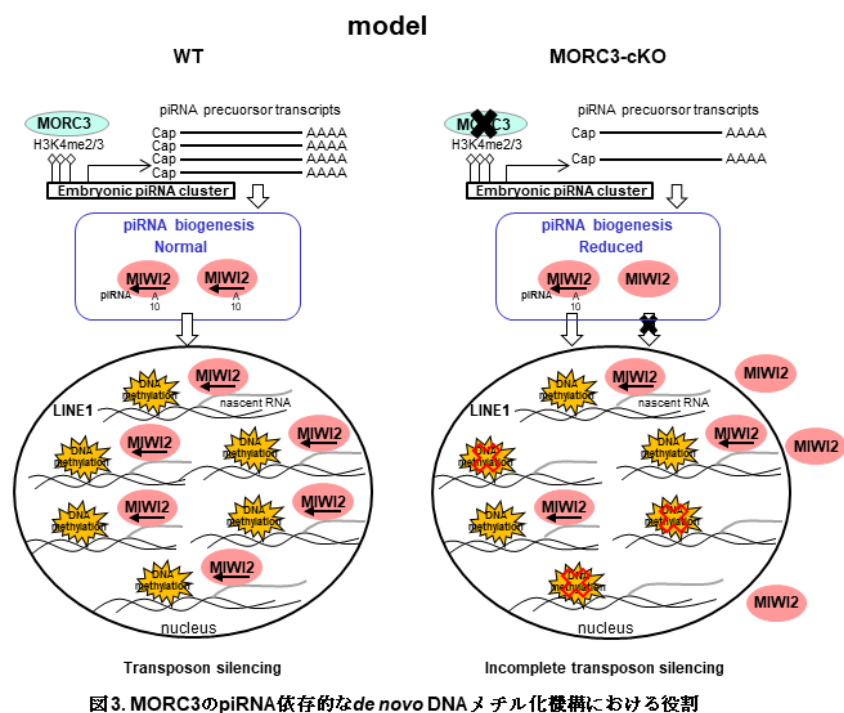


図3. MORC3のpiRNA依存的な*de novo* DNAメチル化機構における役割

(2) 胎仔期生殖細胞における *de novo* DNAメチル化機構に関わる分子の探索と機能解析

MIWI2 との結合タンパクとして新たに CNOT1(CCR4-NOT transcription complex subunit 1)を同定し、CNOT1 の胎仔期雄性生殖細胞における機能解析を行う為に、生殖細胞特異的 *Cnot1* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、種々の解析を行った。

CNOT1はMIWI2結合タンパクであることから、レトロトランスポゾン領域の*de novo* DNAメチル化機構に関わる分子である可能性が推測されたため、*Cnot1*コンディショナルノックアウトマウスの雄性生殖細胞を用いて、レトロトランスポゾン領域の DNAのメチル化状態をバイサルファイトシークエンス法を用いて調べたところ、*Line-1*の制御領域のDNAのメチル化が低下していることが分かった。また、small RNA シークエンスの解析結果より、piRNAの総生産量が著しく減少していること、更に、MILIに結合しているpiRNA量が有意に減少していることなどが明らかになった。

一方で、*Cnot1*コンディショナルノックアウト雄マウスは野生型と比較して、精子数が有意に少ない、交配テストの結果から不妊である、ことが認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kojima-Kita Kanako, Kuramochi-Miyagawa Satomi, Nakayama Manabu, Miyata Haruhiko, Jacobsen Steven E., Ikawa Masahito, Koseki Haruhiko, Nakano Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 MORC3, a novel MIWI2 association partner, as an epigenetic regulator of piRNA dependent transposon silencing in male germ cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20472-20490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98940-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California		