

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20610002

研究課題名 (和文) 精巣幹細胞の維持機構と small RNA

研究課題名 (英文) Analysis of germ stem cells and small RNAs

研究代表者

宮川 さとみ (MIYAGAWA SATOMI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい教員

研究者番号：90291153

研究成果の概要 (和文)：

MILI はマウスの精子形成に必須のタンパクで、小分子 RNA である piRNA を介して遺伝子抑制に関わっている。MILI 欠損マウスの精巣より樹立した精巣性幹細胞株 (GS 細胞) は、マウス同様、piRNA の発現低下、レトロトランスポゾン IAP の DNA メチル化の低下と発現上昇がみとめられた。この MILI 欠損 GS 細胞に *Mili* 遺伝子を導入し MILI 回復 GS 細胞を樹立し、piRNA 合成や IAP の発現抑制における MILI の役割を解析した。

研究成果の概要 (英文)：

MILI which is essential molecule for spermatogenesis, is concerned with gene suppression through small RNAs (piRNAs). We established GS (Germline Stem) cell lines from the MILI deficient testes. We found that piRNA expression was reduced, DNA methylation of the IAP retrotransposon was impaired, and IAP transcripts were accumulated in the MILI deficient GS cells. We introduced MILI expression in the MILI deficient GS cells and rescued the MILI function in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：精子形成、小分子 RNA、piRNA、生殖幹細胞、レトロトランスポゾン、IAP、DNA メチル化、GS 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞とは自己複製能と分化能を兼ね備えた未分化な細胞であり、さまざまな遺伝子が幹細胞の未分化性維持に重要であることが報告されていた。PIWI ファミリーもそのひとつであり、生物種を超えて、幹細胞システムの維持に重要な分子であることが明らかになっていた。また、PIWI ファミリー分子は、

新しいカテゴリーの small RNA である Piwi interacting RNA (piRNA) と結合すること、その piRNA を介してレトロトランスポゾンの抑制に関わっていること、などが知られていた。

我々は、哺乳類においても PIWI ファミリーが幹細胞の維持に重要な役割を担っていることを期待し、そのマウス相同遺伝子の一

つである *Mili* (*miwi like*) 遺伝子を単離し、解析を続けてきた (Kuramochi- Miyagawa S. et al. *Mech Dev.* 108, 121-133, 2001)。MILI は、胎仔期の生殖巣における始原生殖細胞や、成体精巣での精原細胞から減数分裂初期の精母細胞において発現しており、MILI 欠損マウスを作製したところ、減数分裂初期の細胞でアポトーシスが生じ、精子形成が停止することが明らかとなった。しかし、組織学的な観察では、精巣幹細胞 (精原細胞) には異常が認められなかった (Kuramochi- Miyagawa S. et al. *Development.* 131, 839-849, 2004)。

ところが、長期にわたり MILI 欠損マウスを飼育すると、生後半年程度で精巣幹細胞が減少しはじめ、生後 1 年頃には生殖細胞が完全に消失することを見いだした。また、Germ stem cell (GS 細胞) 株を MILI 欠損マウスの新生仔の精巣から樹立してくる際、コントロールと比較し、形成される GS 細胞コロニーの数が少ないこともわかってきた。これらの予備的結果は、MILI が精巣幹細胞の維持に重要な機能を担っていること、すなわち、マウスの幹細胞維持においても PIWI ファミリーの遺伝子が必須であること、を強く示唆している。

一方、我々は、MILI 欠損マウスの精巣において、通常では抑制されているはずのレトロトランスポゾンやセントロメア領域の遺伝子の転写が上昇していることを見出していた。また、MILI 欠損マウスにおいてレトロトランスポゾン遺伝子の *de novo* メチル化が阻害されていること、MILI はレトロトランスポゾンに対する 27 塩基の piRNA に結合すること、さらに、その piRNA が MILI 欠損マウスには存在しないことも明らかにしていた。

以上の成果は、哺乳類の幹細胞維持機構にも RNA 干渉が関与している可能性、すなわち、MILI が、small RNA を介した RNA 干渉によって生殖幹細胞の維持に機能している可能性、を強く示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、精巣幹細胞維持における MILI の役割を、small RNA 制御の観点から解析していく。すなわち、マウス精巣幹細胞維持における MILI の機能について明らかにするために、small RNA の産生やレトロトランスポゾンの抑制機構におけるメカニズムを解析する。また、MILI の結合タンパクや結合 RNA の探索などをおこない、MILI による精巣幹細胞の維持機構だけでなく、幹細胞システムにおける PIWI ファミリーの進化的に保存された分子機構の全容を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

これまで、生殖細胞の性質を反映した培養細胞系はほとんど存在せず、遺伝子の過剰発

現やノックダウン、あるいは生殖幹細胞を大量に必要とする生化学的実験等を行うことは非常に困難である。それに比較して、GS 細胞は効率的な培養が可能であるため、十分な細胞を得て、生化学的解析を容易かつ迅速におこなうことが可能である。また、GS 細胞は増殖因子存在下で長期間培養することができ、遺伝子導入も可能であるという利点がある。GS 細胞は生後まもないマウスの精巣から単離・長期培養する細胞であり、精巣幹細胞に相当する細胞株である。変異マウスに由来する GS 細胞を実験材料として活用し、より効率的かつ多面的に解析をおこなう。

## 4. 研究成果

マウスの精子形成では、胎仔期において、レトロトランスポゾン遺伝子の転写調節領域に DNA メチル化が生じ、その結果、生後のレトロトランスポゾンの発現は抑制されている。GS 細胞は生後の精子幹細胞に相当する細胞であるので、野生型 GS 細胞では、レトロトランスポゾン IAP (intracisternal A particle) 遺伝子の転写調節領域は強いメチル化を受け、その結果、発現は抑制されている。しかし、欠損マウスの精巣より樹立した MILI 欠損 GS 細胞では、欠損マウスの雄性生殖細胞と同様に、IAP 遺伝子の転写調節領域のメチル化が著しく障害されており (図 1)、IAP 転写産物の蓄積が認められた。さらに、piRNA の産生量が低下してただけでなく、piRNA の産生のもととされている生殖細胞特異的な構造である生殖顆粒の形成にも異常が認められた。

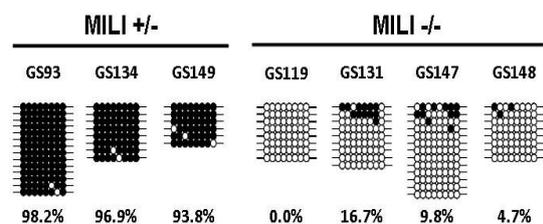


図 1: GS 細胞における IAP ゲノム DNA のメチル化

この MILI 欠損 GS 細胞の表現型が、*Mili* 遺伝子の導入により回復させることが可能かどうかを調べるために、センダイウイルスを用いた *Mili* 遺伝子導入をおこない、MILI 回復 GS 細胞を樹立した。センダイウイルスベクターには、MILI 遺伝子の他、GFP 遺伝子と薬剤耐性遺伝子を直列に組み込んだベクターを用い、GFP 蛍光を指標として発現を確認し、また、薬剤選択により MILI 安定発現株を樹立した。その結果、MILI の発現回復により生殖顆粒が形成されること、また、野生型よりもさらに大量の MILI 結合 piRNA が発現すること、が明らかになった。しかし、IAP

遺伝子の転写調節領域のDNAメチル化は低下したままであり、IAPの転写産物量にも変化は認められなかった。以上の結果は、生後の生殖幹細胞に相当するGS細胞では、MILIやpiRNAが存在してもDNAメチル化は生じず、胎仔期におけるMILIおよびpiRNAがIAPの発現抑制に重要であると結論づけることができた。

また、GS細胞におけるIAPに対応するpiRNAの産生機構を解析するために、大規模シークエンスをおこなった。その結果、piRNAの発現は全体では野生型と比較すると約3倍に増加しており、さらに、IAPに対するpiRNAは約20倍に増加していた。一般に、レトロトランスポゾンに対応するpiRNAの産生機構は、一次生成と二次生成とから成立している。一次生成では、センス鎖(+鎖)の一本鎖RNAと考えられているpiRNA前駆体から、5'末端がウラシルである(1<sup>st</sup> U) piRNAが産生される。二次生成は、ping-pongサイクルとも呼ばれ、5'末端から10番目の塩基がアデニンである(10<sup>th</sup> A) アンチセンス鎖(-鎖)のpiRNAが多く産生される。野生型GS細胞とMILI回復GS細胞におけるpiRNAを網羅的に解析したところ、一次生成によって産生されるセンス鎖の1<sup>st</sup> U piRNAが有意に増加していることが明らかとなった(図2)。このことから、MILI回復GS細胞においては、IAP転写産物からの一次生成によるpiRNAの産生が亢進していることを明らかにした。また、以上の結果は、一次産生機構のみが有意に生じているGS細胞は、未だ明らかになっていない哺乳類のpiRNAの一次産生機構を調べる上で、非常に有用な材料になると考えられる。

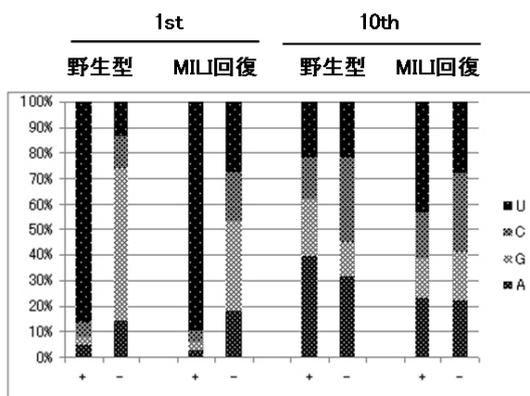


図2: IAPに対するpiRNAの1番目と10番目の塩基の割合

さらに、本研究では、センダイウイルスを用いた遺伝子導入法を利用した研究をおこなった。これまでの報告ではGS細胞への遺伝子導入にはリポフェクション法や、エレクトロポレーション法、あるいはレンチウイルス

による方法が用いられてきた。しかし、増殖の遅いGS細胞ではこれらの方法による遺伝子導入効率が著しく低いために、遺伝子導入した細胞を樹立し十分な数を得るまでに数ヶ月もの培養期間が必要になる。しかし、センダイウイルスを用いた遺伝子導入では、導入効率が極めて高く、数週間で導入細胞を樹立し、十分な細胞数を獲得することができた。また、センダイウイルスは複数の遺伝子を同時に導入できるという利点も有している。さらに、転写・複製が細胞質でおこなわれ、染色体へのウイルスゲノムの挿入がおこなわないため、GS細胞に変異を引き起こすことなく安定発現細胞株を樹立することができる。以上のように、GS細胞への遺伝子導入がこれまでよりも容易にできるようになり、我々の研究は、唯一ともいえる生殖幹細胞株であるGS細胞を用いた研究に道を開くものと確信している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, and Nakano T. (2010) MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons *Genes Dev.* 23, (24): 887-892.
2. Yoshimura T, Toyoda S, Kuramochi-Miyagawa S, Miyazaki T, Miyazaki S, Tashiro F, Yamato E, Nakano T, Miyazaki J. (2009) Gtsf1/Cue110, a gene encoding a protein with two copies of a CHHC Zn-finger motif, is involved in spermatogenesis and retrotransposon suppression in murine testes. *Developmental Biology.* 335(1):216-727
3. Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, Tanaka T, Nakatsuji N, Kimura T, Nakano T. (2009) Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. *Genes to Cells.* 14(10):1155-1165
4. Siomi MC, Kuramochi-Miyagawa S. (2009) RNA silencing in germlines—exquisite collaboration of Argonaute proteins with small RNAs for germline survival. *Current Opinion in Cell Biology.* 21(3):426-34,

[学会発表] (計 10 件)

1. **生殖幹細胞を用いたマウス PIWI ファミリーの機能解析**

城本悠助、宮川さとみ、西村健、仲野徹  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学年会 合同学会 (2010.12.7-10 神戸)

2. **精子形成における MVH の機能解析**

伊藤大介、宮川さとみ、仲野徹  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学年会 合同学会 (2010.12.7-10 神戸)

3. **Analysis of MILI function by GS cells**

城本悠助、宮川さとみ、西村健、仲野徹  
International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells  
(2010.11.22-24 九大)

4. **MVH in piRNA spermatogenesis**

伊藤大介、宮川さとみ、仲野徹  
International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells  
(2010.11.22-24 九大)

5. **piRNA: its production and possible functions**

Satomi Kuramochi-Miyagwa  
2010 SDB and JSDB Joint Meeting (2010.8.5 Albuquerque, USA)

6. **piRNA 生合成における MVH の役割**

宮川-倉持さとみ、渡部聡朗、高松加奈、中馬新一郎、後藤健吾、小島-北加奈子、城本悠助、伊藤大介、木村透、野瀬俊明、佐々木裕之、仲野徹  
第 12 回日本 RNA 学会年会 (2010.7.27-29 東京)

7. **Molecular Function of MVH on piRNA Production in Fetal Male Germ Cells**

Satomi Kuramochi-Miyagwa  
The 19th CDB Meeting 'RNA Sciences in Cell and Developmental Biology' (2010.5.12 神戸理研)

8. **small RNAs and gene silencing in spermatogenesis**

宮川(倉持)さとみ、後藤健吾、小島加奈子、高松可奈、勝俣明子、城本悠助、浅田徳子、木村透、野瀬俊明、仲野徹  
第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.12 横浜)

9. **Establishment and characterization of MILI deficient GS cells**

勝俣明子、宮川(倉持)さとみ、西村健、仲野徹  
第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.12 横浜)

10. **small RNA とエピジェネティック制御**

宮川(倉持)さとみ  
第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム

(2009.10.22 神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川さとみ (MIYAGAWA SATOMI)  
大阪大学・大学院生命機能研究科  
・招へい教員

研究者番号: 90291153

(2) 研究分担者

木村透 (KIMURA TOHRU)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授  
研究者番号: 50280962