

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770009

研究課題名（和文）

マウス生殖細胞形成における SINE 配列の DNA メチル化ダイナミクスと機能制御

研究課題名（英文）

Regulation of DNA methylation at SINEs during mouse male germ-cell development

研究代表者

一柳健司（ICHIYANAGI KENJI）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70401560

研究成果の概要（和文）：本研究では SINE と呼ばれるレトロトランスポゾンの生殖細胞形成過程における制御機構を明らかにする目的で、マウス雄性生殖細胞の各発生段階における B1 および B2 SINE の DNA メチル化状態を解析した。その結果、SINE は始原生殖細胞で脱メチル化を受け、前駆精原細胞において新たにメチル化され、その後精子に至るまでの過程ではあまり変動はなかった。一方、遺伝子の転写開始点近傍の SINE は生殖細胞では低メチル化状態にあり、遺伝子発現制御に関わっていた。ノックアウトマウスの解析から、piRNA（生殖細胞特異的低分子 RNA）は SINE の DNA メチル化に関与せず、*Dnmt3l* 変異の影響も小さかった。従って、SINE の DNA メチル化制御様式は LINE や内在性レトロウイルスのそれとはかなり異なる。一方、DNA メチル化は *Dnmt3a* に依存していたが、興味深いことに依存度は染色体ドメインごとに異なり、核内での 3 次元的な位置が影響していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To elucidate regulation of SINE retrotransposons during mammalian germ-cell development, DNA methylation states of mouse B1 and B2 SINE were studied. This study revealed (1) SINEs become demethylated in primordial germ cells, then re-methylated in fetal prospermatogonia, (2) after birth, they keep methylated during spermatogenesis, (3) SINE copies neighboring transcription start sites are involved in regulation of the gene expression, (4) the germ cell-specific small RNAs (piRNAs) are dispensable for SINE methylation and regulation, and (5) SINE methylation depends on *Dnmt3a* with varied dependencies according to their genomic and nuclear locations. Thus, the regulation of SINE methylation differs significantly from those of LINEs and endogenous retroviruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム機能・発現、エピジェネティック制御

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化は哺乳類における主要なエピジェネティック修飾の一つで、遺伝子発現制御やトランスポゾン抑制に重要な役割を担っている。一方、哺乳類の生殖細胞の形成過程では DNA メチル化情報が一旦消去され、再び書き込まれる。レトロトランスポゾンは通常 DNA メチル化によって抑制されているが、生殖細胞形成初期に脱メチル化されるので、その後すみやかに再メチル化される必要がある。レトロトランスポゾンは内在性レトロウイルス (ERV)、LINE、SINE の 3 種に大別されるが、生殖細胞での制御機構の研究は前者 2 つに限られていた。SINE は短い配列で (100~300 bp)、RNA ポリメラーゼ III によって転写され、遺伝子領域に多い等、ERV や LINE とは異なった一大ファミリーを構成するレトロトランスポゾンであるが、制御機構の詳細はほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

そこで、マウス雄性生殖細胞の形成過程において、SINE がどのように制御されているのかを理解するため、遺伝学的な方法を用いて B1 および B2 SINE (マウスで活性のある SINE) の DNA メチル化状態、発現状態を解析した。

3. 研究の方法

(1) 約 60 カ所の B1 配列および約 50 カ所の B2 配列をゲノム内から選び、それぞれのローカスに対して特異的な PCR プライマーを作成して、前駆精原細胞、精原細胞、精母細胞、精子細胞、精子、及び肝臓における DNA メチル化状態をバイサルファイト法にて解析した。細胞は必要に応じてセルソーティングによって精巢から精製した。さらに、B1 配列全体のメチル化状態を解析できるプライマーも設計し、上記細胞に加えて、始原生殖細胞、卵子、初期胚 (プラストシスト) におけるメチル化状態を調べた。

(2) 前駆精原細胞における piRNA の種類を文献から再解析し、B1 および B2 に由来する piRNA を同定し、さらに piRNA が合成されない *Pld6* や *Mili* ノックアウトマウスでの B1 や B2 のメチル化状態を調べた。

(3) DNA メチル化酵素遺伝子 (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Dnmt3l*) の生殖細胞特異的ノックアウトマウスを作製し、精原細胞における B1 メチル化状態を調べた。

(4) 遺伝子の転写開始点近傍にある B1 について、B1 自体のメチル化、遺伝子プロモーターのメチル化、および遺伝子の発現量を精

原細胞や肝臓などで調べた。

(5) 出生直後の前駆精原細胞において、非 CG 配列のメチル化が観察されたので、非 CG メチル化量について生後 7 日目までのタイムコースを調べた。また、ヘアピン・バイサルファイト法によって、非 CG 配列のメチル化が DNA 二重鎖の両方にあるのか、片鎖のみであるのかを調べた。

4. 研究成果

(1) 調べた B1 及び B2 ローカスのうち、約 8 割のローカスはどの細胞においても高メチル化状態であった。B1 全体のメチル化レベルは始原生殖細胞で低く、出生直後の前駆精原細胞で高かった。胎生期の前駆精原細胞において、*de novo* にメチル化されていることが分かった。また、卵子やプラストシストでのメチル化レベルは非常に低かった。一方、精原細胞でも一部のローカスでは低メチル化状態にあり、そのローカス数は体細胞よりも有意に多かった。減数分裂期に入るとさらに低メチル化ローカスが増えることも分かった。これらの結果と精巢、卵子やプラストシストでは B1 が高発現していることを考えると SINE 配列の転写制御には DNA メチル化が関与していると考えられる。生殖細胞で低メチル化しているローカスの特徴を調べ、遺伝子の転写開始点から 1kb 以内のコピーが多いことを明らかにした。

(2) 前駆精原細胞で産生される piRNA を解析したところ、B1 や B2 配列に由来する多くの piRNA が存在することを明らかにした。しかしながら、そのような piRNA が産生できない *Pld6* や *Mili* のノックアウトマウスでも、B1 や B2 は野生型と変わらないレベルにまでメチル化されており、SINE メチル化には piRNA が不要でないことが分かった。

(3) ノックアウトマウスの精原細胞の解析を行ったところ、B1 のメチル化には *Dnmt3b* の変異はほとんど影響しなかった。*Dnmt3l* 変異はやや影響が見られたが、LINE や ERV のような極度のメチル化異常は観察されなかった。一方、*Dnmt3a* 変異は有意に B1 配列の低メチル化を引き起こした。しかし、その影響度はローカスによって異なり、LINE 密度が高く SINE 密度が低いゲノム領域にあるローカスほど変異の影響を強く受けていた。また、ゲノムインプリンティング領域でも同様の傾向が見られた。SINE 特異的なプローブと LINE 特異的なプローブを用いて、*in situ* 蛍光ハイブリダイゼーションを行った結果、LINE に富む領域は核膜近傍に集積していることを明らかにした。従って、核膜周辺に位置するローカスほど *Dnmt3a* 変異の影響が強い。この結果は、生殖細胞での DNA のメチル

化パターンの創成・制御には核内3次元配置が重要であることを示している。

(4) ゲノム解析から、精巣特異的な遺伝子の転写開始点の近傍には SINE が多く存在することを明らかにした。遺伝子の転写開始点近傍の SINE は生殖細胞で特異的に低メチル化する。そこで、転写開始点近傍の SINE が遺伝子発現制御に影響があるかどうかを精原細胞と肝臓での B1 メチル化レベルおよび遺伝子発現レベルを比較することで検討した。その結果、B1 のメチル化レベルと遺伝子発現レベルが負の相関を示すことが分かった。このことは、SINE が転写開始点近傍に挿入されるとその遺伝子の体細胞での発現が抑えられ、生殖細胞特異的な発現になりうることを示している。

(5) 前駆精原細胞での B1 配列のメチル化状態を調べていると、多くの非 CpG 配列がメチル化されていることに気づいた。このような非 CpG メチル化が細胞分裂を経て伝達されるかどうか調べたところ、伝達されずに徐々に減っていくことを明らかにした。さらにヘアピン・パイサルファイト法を用いて解析したところ、CAG/CTG 二重鎖上のシトシンは両鎖ともが対称的にメチル化されているわけではないことが分かった。従って、非 CpG メチル化の半保存的な伝達機構はなく (CpG メチル化にはある) DNA 複製のたびに減る修飾であることが分かった。近年、多能性幹細胞における非 CpG メチル化が盛んに研究されているが、本研究の成果は、非 CpG メチル化は DNA メチル化酵素活性の亢進による結果であって、多能性との相関は低いことを示唆している。

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3件)

(1) Ichiyanagi, K. (2012) Inhibition of MspI cleavage activity by hydroxymethylation of the CpG site: A concern for DNA modification studies using restriction endonucleases. *Epigenetics* 7, 131-136

(2) Ichiyanagi, K., Li, Y., Watanabe, T., Ichiyanagi, T., Fukuda, K., Kitayama, J., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Yabuta, Y., Seki, Y., Saitou, M., and Sasaki, H. (2011) Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. *Genome Res.* 21, 2058-2066

(3) Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K.,

Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P.J., Toyoda, A., Gotoh, K., Hiura, H., Arima, T., Fujiyama, A., Sado, T., Shibata, T., Nakano, T., Lin, H., Ichiyanagi, K., Soloway, P.D. and Sasaki, H. (2011) Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. *Science* 332, 848-852

[学会発表](計10件)

(1) Ichiyanagi, K., Li, Y., Ichiyanagi, T., Hirafuku, K., and Sasaki H. (2012) Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse SINEs during male germ cell development. 3rd international conference "Genomic impact of eukaryotic transposable elements", CA, U.S.A.

(2) Ichiyanagi, K., Li, Y., Watanabe, T., Fukuda, K., Kitayama, J., Seki, Y., Yabuta, Y., Yamamoto, Y., Ichiyanagi, T., and Sasaki H. (2011) Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposon during male germ cell development. Gordon Research Conference, MA, U.S.A.

(3) 一柳健司 (2011) SINE 配列から見たマウス生殖細胞のエピゲノム制御機構 第84回日本生化学会 京都 (招待講演)

(4) 一柳健司 (2011) マウス生殖細胞における SINE 配列と宿主エピゲノムの相互作用 第83回日本遺伝学会 京都 (WS オーガナイザー兼講演者)

[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

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/lab/e-pigenome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 健司 (ICHIYANAGI KENJI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70401560

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし