

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658221

研究課題名（和文）

哺乳類のメス生殖細胞における piRNA/PIWI の機能解析を目指した挑戦的研究

研究課題名（英文） Challenging research for functional analyses of piRNA/PIWI in mammalian female germ cells

研究代表者

内藤 邦彦 (Naito Kunihiko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20188858

研究成果の概要（和文）：ブタ卵には少なくとも PIWIL1 と PIWIL2 の 2 種の PIWI mRNA が存在し、これらのタンパク質発現を抑制すると高 cAMP 濃度で減数分裂が再開されることから、PIWI の卵巣内卵の減数分裂停止への生理的関与が示唆された。この PIWI 機能は cyclin B の蓄積抑制を介しており、cyclin B mRNA 量および翻訳制御に働く Aurora A や CPEB に変化が無いことから cyclin B 分解系の APC 機能への関与が考えられる。

研究成果の概要（英文）：At least two PIWI mRNA, PIWIL1 and PIWIL2, are present in porcine oocytes and the inhibition of these protein expression results in the meiotic resumption of oocytes under a high cAMP concentration, suggesting the physiological involvement of PIWI in the meiotic arrest of porcine ovarian oocytes. This PIWI function is mediated by the inhibition of cyclin B accumulation and might affect on the APC function, which works on the cyclin B degradation, as no differences are detected in the translational regulations, such as cyclin B mRNA level, Aurora A and CPEB status.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：繁殖、卵成熟、PIWI、piRNA

1. 研究開始当初の背景

哺乳類ゲノムの 40%以上は転移因子によって占められ、特にレトロトランスポゾン (TE) は宿主ゲノム中に自身のコピーを増殖させ、宿主ゲノムを傷つける寄生遺伝子として脅威である。生殖細胞は遺伝情報を次世代に伝達する細胞であり TE が活性化しないよう厳密に制御する必要がある。この防御機構の 1 つが RNA サイレンシングであり、オスの生殖細胞では、この制御に体細胞と異なる独自の低分子 RNA である PIWI-interacting RNA (piRNA) と PIWI ファミリータンパク質の関与が明らかとなってきた。

piRNA/PIWI の研究は哺乳類ではマウスで報告されているだけであり、マウスの PIWI には MILI、MIWI、MIWI2 の 3 種類が知られ、いずれもオスの生殖細胞でそれぞれ異なる

時期に発現が確認されている。これらの PIWI 遺伝子の欠損マウスでは、オス生殖細胞内の TE の増加と生殖細胞のアポトーシスによる不妊が報告されており、piRNA/PIWI による TE 抑制の重要性が示されている。

一方メスの生殖細胞では、MILI は存在するものの MILI 欠損メスマウスは妊性があると報告されており、また、MIWI と MIWI2 は存在しないと報告され、これらの欠損マウスではメスでの詳細な記述は無い。この様に哺乳類の piRNA/PIWI の機能についてはオスで主に働いているとされ、メスではあたかも機能していないかのように捉えられ、十分な検討がなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、これまで十分に解析されてい

ないメス生殖細胞においても、TE の抑制に piRNA/PIWI が機能を果たしているのではないかとの仮定のもとに、卵の減数分裂過程における piRNA/PIWI の機能を詳細に解析することを主たる目的とする。具体的には、対象とするブタ卵の減数分裂過程において、PIWI の発現抑制という逆遺伝学的手法を用いて、減数分裂の進行状況および細胞内因子の変化を分子レベルで検討し、寄生遺伝子の脅威に対する piRNA/PIWI の役割を解析する。

3. 研究の方法

屠場より購入したブタ卵巣よりブタ未成熟卵を採取した。このブタ卵の total RNA より RT-PCR を用いてマウス MILI および MIWI のブタ相同タンパク質である pigPIWI like-1 および like-2 (それぞれ PIWIL1, PIWIL2)、および miRNA や siRNA など PIWI とは別の TE 抑制機構に働く低分子 RNA の産生に関与する DICER の部分配列をクローニングした。これらの cDNA はキャピラリーシーケンサーにより配列を確認した。

次にこれらを、アンチセンス(as)RNA の in vitro 合成用に、T7 および SP6 プロモーターを持つ pGEM-TEasy プラスミドに組み込んでベクターを構築した。これを用いて PIWIL1, PIWIL2 および DICER の asRNA を in vitro 合成してマイクロマンピュレータでブタ未成熟卵の細胞質へ顕微注入してタンパク質の発現抑制を行った。RNA の注入に際しては緑色蛍光タンパク質(EGFP)の mRNA も同時に注入し、EGFP の蛍光を、顕微注入、卵の生存性の指標とした。

未成熟卵は成熟培地(TYH+20%卵胞液+1IU/ml PMSG)中で 48 時間体外成熟し、減数分裂過程への機能を解析した。なお成熟過程には母性因子のタンパク質の存在が予想されるため、PIWI および DICER タンパク質の欠損状態を作り出すために asRNA を注入してから dbcAMP (3mM)で減数分裂を抑制した状態で 48 時間以上培養し、内因性の因子を枯渇させた後に培養に供する実験も試みた。それぞれの因子単独抑制に加え PIWIL1 と PIWIL2 の asRNA を共注入し全 PIWI を欠失させたもの、さらにこれに DICER の asRNA も加え全ての RNA サイレンシング機構を完全抑制する実験も行った。

以上の処理を施した卵について減数分裂の進行を核相観察により検討し成熟率およびその時間的推移を詳細に解析した。分子レベルの解析としては MPF サブユニット(Cdc2, Cyclin B1, B2)、およびこれらの産生に関与する Aurora A や CPEB の状態変動を、抗体を用いた免疫プロットで調べた。また実際に piRNA/PIWI が TE を抑制しているかを調べるため、ブタの LINE および LTR トランスポゾンの 1 種である IAP の配列を RT-PCR で検

出し、これらの TE 量の変化も検討した。

4. 研究成果

(1)ブタ PIWIL1, PIWIL2, DICER のクローニング、および減数分裂過程の mRNA の存在

卵胞から採取直後のブタ卵母細胞の totalRNA を用い PIWI サブファミリータンパク質である PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 および DICER について PCR を行った結果、PIWIL3 においては如何なるバンドも検出されなかったが、他は全てシングルバンドが得られた。また減数分裂の各ステージの卵より得た totalRNA を用いて RT-PCR を行った結果、PIWIL1 および PIWIL2 の mRNA が減数分裂過程を通じて存在していることが明らかとなった。PIWI についてマウスおよびヒトの相同タンパクとのアミノ酸配列と比較したところ、全長配列でマウスとは 84%、ヒトとは 86%という高い相同性を示した。また、PAZ ドメインおよび PIWI ドメイン部分について同様に比較したところ、PAZ ドメインではマウス、ヒトともに 92%、PIWI ドメインではマウスとは 90%、ヒトとは 91%という相同性を示し、Pwili2 がブタにおいても高度に保存されていることが明らかとなった

(2)各 asRNA 単独の注入がブタ卵の減数分裂過程に及ぼす影響

PIWIL1, PIWIL2, DICER の各 asRNA の抑制効果を RT-PCR によって検証した。各 asRNA 注入卵の total RNA を用い各標的遺伝子に対する PCR を行った結果、いずれの遺伝子についても AS 注入区ではバンドが確認できなかった。このことから、作成した三種類の asRNA によって標的とする内在性 mRNA が大幅に減少することが確認でき、asRNA が十分な発現抑制効果を持つことが考えられた。

採卵直後のブタ卵に各 asRNA を注入し、体外培養 12、18、24 時間後の卵の核相観察を行った。マウスでの実験結果から PIWI を抑制しても特に変化が起らないことも考えられたが、予想に反して、PIWIL1、PIWIL2、DICER のいずれの asRNA 注入卵でも培養 18 時間の減数分裂再開(GVBD)率が対照と比較して有意に高く、培養 24 時間では GVBD 率に差はないものの MII 到達率が対照と比較して有意に高い値を示した。また、免疫ブロッキングでそのときのタンパク質発現を調べたところ、減数分裂再開に伴い増加することが知られる Cyclin B の蓄積が、対照と比較して早期に起こっていることが確認できた。これらのことから、ノックアウトしても大きな変化が見られなかったマウスとは異なり、ブタ卵で PIWI を抑制すると減数分裂の再開が早期に誘起されることが示された。一方、asRNA 注入卵で早期に減数分裂の再開を起こした卵について、これらは正常な MI や MII

の核相を示しており、減数分裂再開以降の卵成熟過程の進行に大きな影響は見られなかった。このことから、PIWI および DICER の抑制は卵の減数分裂再開の時期を早めるが、その後の卵成熟過程には影響を及ぼさないことが示唆された (図 1)。

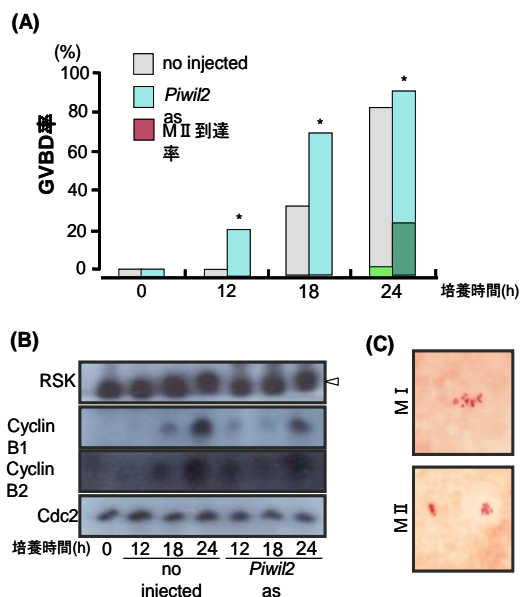


図 1 PIWIL1 抑制による減数分裂への影響

(3) asRNA の共注入がブタ卵の減数分裂過程に及ぼす影響

PIWI と DICER、また PIWI 同士の間には補償作用が働いている可能性が考えられた。そこで PIWIL2、DICER の 2 種類、または PIWIL1、PIWIL2、DICER の 3 種類全てを同時に抑制すれば、補償機能がなくなることで減数分裂過程により劇的な影響が出るのではないかと考え、上記の二つの場合について減数分裂の経時的变化を調べた。その結果、それぞれの asRNA を単独で注入するのに比べて培養 18 時間での GVBD 率が高まる傾向にあったが、卵は全て正常な核相を示していた。これらのことから、PIWI と DICER の同時抑制によって減数分裂再開の早期化傾向は強まるが、同時に抑制することによって新たな影響が表れるわけではないことが示唆された。

(4) 3mM dbcAMP 添加培地で培養時における asRNA 注入の影響

成熟過程には母性因子のタンパク質の存在が予想されるため、PIWI および DICER タンパク質の欠損状態を作り出すためには asRNA を注入してから減数分裂を抑制した状態で培養し、内因性の因子を枯渇させる必要がある。通常、卵胞内では cAMP 濃度が高く保たれることによって卵の減数分裂停止が維持されており、減数分裂の再開は cAMP の濃度低下が引き金となって起こることが

知られている。そこで、卵胞内と同じく cAMP が高濃度で存在する条件下で各 asRNA を注入して 48 時間培養後、核相観察を行った。その結果、対照の無処理卵では GVBD 率が 3.3% であるのに対し、PIWIL1 の asRNA 注入卵では 52.9%、PIWIL2 asRNA 注入卵では 62.9%、DICER asRNA 注入卵では 37.0% と、減数分裂停止を維持できずに再開してしまうものが顕著に高い値を示した。このことから、PIWI、DICER は卵巣の卵胞内に存在する卵の減数分裂を第一分裂前期で停止させておくために生理的に機能していることが示唆された (図 2)。

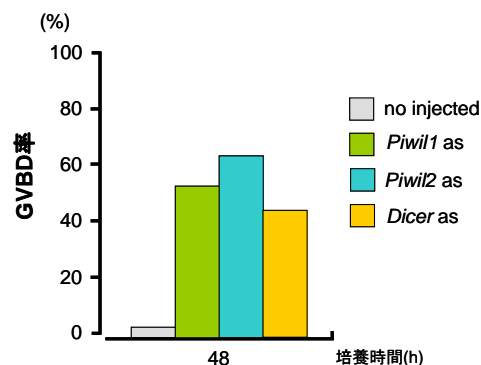


図 2 3mM dbcAMP 添加培地での PIWI 抑制効果

(5) ブタ卵における PIWI と DICER の作用機序の検討

ブタ卵では、Cyclin B の過剰発現により Cyclin B 発現を早期に導くと減数分裂再開の早期化がおこることがわかっている。前述の PIWI、DICER の抑制卵でも Cyclin B の発現が早期に起こっていたが、前述の実験からでは Cyclin B 発現が減数分裂の再開の原因なのかあるいは早期に GVBD が起こった結果なのかの判断はできなかった。そこでこの点を明らかにするために、GVBD を阻害した状態で PIWI を抑制し、cyclin B の量の変化を調べた。GVBD の阻害は減数分裂を誘起する MPF の触媒サブユニットである Cdc2 の阻害剤として知られるロスコビチンを用いて行った。

採卵直後のブタ卵に各 asRNA を注入し、ロスコビチン添加培地で 12、24 時間培養した。その結果、ロスコビチンの添加によって対照区、asRNA 注入区ともに減数分裂再開がほぼ完全に抑えられていた。この卵を用いて Cyclin B1 と Cyclin B2 の免疫ブロッティングを行った結果、対照区ではどちらもバンドが検出できなかったのに対して、asRNA 注入区ではいずれの asRNA の場合でも培養 12 時間からこれらのタンパク質の蓄積が観察された。このことから PIWIL1、PIWIL2、DICER の抑制卵で見られた Cyclin B の増加は GVBD の結果ではなく、これが原因となって GVBD が誘起されることが示唆された。

(6)PIWI、DICERr 抑制卵における Cyclin B 蓄積量増加機構の検討

各 asRNA 注入卵でみられた Cyclin B 量の増加が mRNA 量の増加によるものなのかを調べるため、培養 12 時間の卵母細胞を用いて半定量 RT-PCR を行った。その結果、いずれの asRNA 注入卵においても、Cyclin B1、B2 ともに mRNA 量の増加はみられなかった。このことから、asRNA 注入による Cyclin B の増加は mRNA の量とは無関係に起こることが示唆された。

そこで、この現象が Cyclin B 翻訳関連因子として知られる Aurora-A と CPEB を介しているかどうかを、免疫ブロッティングによって調べた。採卵直後のブタ卵に各 asRNA を注入し、ロスコピチン添加培地で 12、24 時間培養した後に免疫ブロッティングを行った結果、CPEB のリン酸化シフトアップは検出されず CPEB の活性は低く抑えられていた。また CPEB をリン酸化するとされる Aurora-A に関しても量的な変動は見られず、これらの結果から asRNA 注入によって起こる Cyclin B 合成は Aurora-A と CPEB を介さず行われていることが示唆された(図 3)。

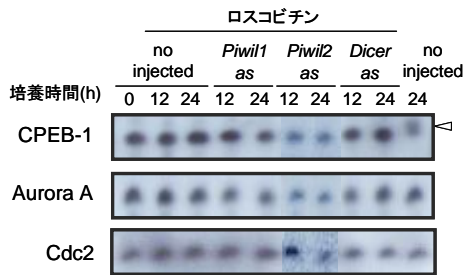


図 3 PIWI 抑制の Aurora A と CPEB への影響

以上、検討してきた機構はいずれも cyclin B の合成に関与するものである。一方、cyclin B の分解にはユビキチンリガーゼの APC が関与し、この活性が抑制されると cyclin B が増加し GVBD が促進されることが当研究室の以前の報告で明らかとなっている。今回の研究では APC の機能までは踏み込んでいないが、cyclin B 合成系に変化がないことから、cyclin B 分解系が抑制されている可能性があり、今後 APC 活性について調べていく必要がある。

(7)PIWI および DICER 抑制がブタ TE 量に及ぼす影響

今回抑制した PIWIL1、PIWIL2、DICER は piRNA と siRNA を介した TE 抑制に機能することが知られている。そこで最後に今回の asRNA 注入によって見られた変化が TE 抑制機構が破綻し TE が多量に発現したために起こった現象かを確認することにした。各 asRNA

を注入し成熟培地で 12 時間培養した卵母細胞を用いて、TE の一種である LTR トランスポゾンと LINE1 について半定量 RT-PCR を行った。LTR トランスポゾンとしては、これを構成する遺伝子の一つである Gag の配列を用い、LINE1 としては今回 RT-PCR によりブタ特異的配列を確認した部分配列を用いた。半定量 RT-PCR の結果、予想に反して、採取直後の卵母細胞、対照の無処理卵、各 asRNA 注入卵の間で Gag 及び LINE1 転写産物の量に変化はみられなかった。このことから、今回の PIWI、DICER の機能が TE 抑制機能を介したのかを確認することは出来なかったが、TE には他にも SINE など多くの種類が存在するため、今後さらに別の TE についても検討する必要がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

山田祐子・西村鷹則・藤井渉・加納聖・杉浦幸二・内藤邦彦：ブタ未成熟卵における PIWI の存在と GV 維持機能：第 114 回日本畜産学会：2011 年 8 月 26 日 (優秀発表賞受賞)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/iden/ouyouuiden/theme/naito/hassei/histone/histone.htm#5>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 邦彦 (Naito Kunihiko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20188858