

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659135

研究課題名(和文)人為的DNAメチル化導入法の開発と応用

研究課題名(英文)Artificial induction of DNA methylation

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：人工zinc finger融合タンパクと小分子RNAという二つのアプローチにより、DNAメチル化の人為的制御が可能であると考え、新しい方法論の確立をめざした。本研究では、人工Zinc FingerタンパクとMIWI2融合タンパクによる生殖細胞での新規DNAメチル化導入、および、小分子RNAを用いた、二本鎖DNAと一本鎖RNAからなる三重鎖(Triplex)形成による培養細胞での新規DNAメチル化導入、についての研究をおこなった。残念ながら、の方法論は失敗に終わったが、はシステムの確立に成功し、現在、胎生期の雄性生殖細胞におけるMIWI2の機能解析をおこなっている。

研究成果の概要(英文)：We planned to establish two novel strategies to introduce artificial DNA methylation using zinc finger fusion proteins and small RNAs. One is the introduction of de novo DNA methylation in embryonic male germ cells by using the fusion protein of zinc finger protein and MIWI2 protein. The other is the introduction of DNA methylation in culture cells by using the triplex nucleic acids consisting of two DNA strands and one RNA strand. Although, unfortunately, the latter experiment did not work, we succeeded in establishing the latter one. Following the success, we are currently analyzing the function of MIWI2 in the embryonic male germ cells.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：DNAメチル化 遺伝子発現制御 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、生殖細胞特異的な小分子 RNA である piRNA (piwi-interacting RNA) の研究を精力的に展開し、piRNA というサブクラスの小分子 RNA が存在すること、piRNA の生合成にはマウス PIWI ファミリーである MILI や MIWI2 が必須であること、などを報告してきた (Aravin et al, *Nature*, 2005、Kuramochi-Miyagawa et al, *Genes Dev*, 2008 and 2010 など)

本研究では、piRNA の生合成過程ならびにレトロトランスポゾン遺伝子のメチル化についての我々の研究成果、すなわち、雄性生殖細胞で *de novo* DNA メチル化が生じる段階において、レトロトランスポゾンに対応する piRNA が大量に存在すること、piRNA 産生の低下している遺伝子ターゲティングマウスではレトロトランスポゾン遺伝子に DNA メチル化が生じないこと、piRNA に結合した MIWI2 が核内に移行すること、などから、生殖細胞における DNA メチル化には MIWI2 が関与している、また、その塩基配列特異性を規定するのは piRNA である、という作業仮説をたてた。

本研究は、上記の作業仮説に基づき、二つの人為的 DNA メチル化導入法、人工 Zinc Finger タンパクと MIWI2 融合タンパクによる生殖細胞での新規 DNA メチル化導入、および、小分子 RNA を用いた、二本鎖 DNA と一本鎖 RNA からなる三重鎖 (Triplex) 形成による培養細胞での新規 DNA メチル化導入、についての研究を展開する。さらに、この二つの実験システムによる DNA メチル化の分子機構についての解析をおこなう。

2. 研究の目的

胎生期の雄性生殖細胞の細胞質で産生された piRNA は、MIWI2 タンパクと結合したまま核内に移行する。そして、塩基配列特異的に piRNA がゲノム上の特定の場所に移行し、Dnmt3 を含む *de novo* DNA メチル化に必要なタンパク群をリクルートし、最終的に DNA のメチル化が生じると考えられている。Dnmt3 を含む *de novo* DNA メチル化に必要なタンパク群のリクルートには、piRNA と piRNA に結合した MIWI2 の両者が必要であるという可能性、と、MIWI2 は piRNA の核移行に必要であるが DNA メチル化そのものには不要であり、piRNA と DNA が形成する Triplex の形成のみで十分であるという可能性、が考えられる。本研究計画の一つの目的は、これら二つの可能性について、人為的 DNA メチル化誘導システムを確立しながら検証をすすめることにある。詳細は次項にゆずるが、前者については、レトロトランスポゾン認識する zinc finger と MIWI2 を融合させたタンパクを、胎生期の雄性生殖細胞において発現するトランスジェニックマウスを作製し、ゲノム上のレトロトランスポゾン遺

伝子にメチル化を誘導する。後者については、外来性に小分子 RNA などを導入することにより DNA メチル化を誘導する方法を確立する。

もう一つの目的は、どのように *de novo* DNA メチル化が進行するのかを明らかにすることである。上記二つの DNA メチル化誘導法において、どのような分子機構を介して Dnmt3 がリクルートされ、最終的に DNA のメチル化が生じるのかを明らかにする。また、zinc finger が認識する部位、あるいは、Triplex が形成された部位から、DNA のメチル化がどのようにして周囲の領域に波及していくのか、の解析をおこなう。

3. 研究の方法

人為的に塩基配列特異的な DNA メチル化を導入するための方法論として、人工デザイン zinc finger-MIWI2 融合タンパク (ZF-MIWI2) と、DNA 二重鎖と小分子 RNA による Triplex 形成、という二つの研究戦略をとる。は、ZF-MIWI2 を未分化な雄性生殖細胞で発現させる *in vivo* の実験システム、そして、は、培養細胞 (3T3 細胞) への外来性小分子 RNA 導入という *in vitro* の実験システムによる研究である。

4. 研究成果

<人工デザイン ZF-MIWI2 タンパクによる DNA メチル化導入法の開発とその利用>
Line-1 レトロトランスポゾン認識する zinc finger (ZF) タンパクを設計し、培養細胞において、まず、その結合能を確認した。その ZF タンパクと、胎生期の雄性生殖細胞における *de novo* DNA メチル化に関与するとされている MIWI2 遺伝子の融合タンパクをコードする ZF-MIWI2 融合遺伝子を作成した。ZF-MIWI2 遺伝子を胎生期の雄性生殖細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、実際に、その融合タンパクが Line-1 遺伝子領域に結合することを免疫沈降法によって確認した。

MILI を欠損するマウスは、piRNA を産生できないために、レトロトランスポゾン遺伝子に DNA メチル化が導入されず、レトロトランスポゾンの発現が亢進している。その MILI 欠損マウスと、ZF-MIWI2 トランスジェニックマウスを交配したところ、完全ではないが、DNA メチル化が導入され、レトロトランスポゾンの発現に抑制傾向が認められた。

この結果は、piRNA 非依存的に ZF-MIWI2 が DNA メチル化を誘導できること、すなわち、MIWI2 が DNA メチル化に重要な役割を持つことを示している。

現在、この成果を足がかりに、MIWI2 がどのようにして DNA メチル化を誘導するのか、の分子機構についての研究を積極的におこなっている。

<小分子 RNA による

Triplex 形成法の開発とその利用 >

RNA よりも DNA や RNA に対する結合親和性が高く、かつ、ヌクレアーゼ耐性を示す架橋構造を持った人工核酸である LNA (locked nucleic acid) を培養細胞に導入することにより、すでに triplex により DNA メチル化が誘導できることが報告されている EF1A プロモーターに DNA のメチル化を誘導できるかどうかを調べた。

残念ながら、種々の条件検討をおこなったが、DNA メチル化は誘導できず、この研究は中止とし、もうひとつのテーマに専念することとした。

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 6 件)

1. Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Itou D, Kimura T, Nakano T. "GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells" RNA. 19:803-810(2013) 0.1261/rna.038521.113.
2. Nakashima H, Kimura T, Kaga Y, Nakatani T, Seki Y, Nakamura T, Nakano T. "Effencts of Dppa3 on DNA methylation dynamics during primordial germ cell development" Biol Rep. 88:1-9(2013) 10.1095/biolreprod.112.105932
3. Ohishi K, Nakano T. "A forward genetic screen to study mammalian RNA interference - essential role of RNase IIIa domain of Dicer1 in 3' strand cleavage of dsRNA in vivo" FEBS J. 279:832-43(2012) 10.1111/j.1742-4658.2012.08474.x.
4. Liu YJ, Nakamura T, Nakano T. "Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis" Biol Rep. 86:1-8 (2012) 10.1095/biolreprod.111.095018.
5. Yamamoto Y, Watanabe T, Hoki Y, Shirane K, Li Y, Ichiiyanagi K, Kuramochi-Miyagawa S, Toyoda A, Fujiyama A, Oginuma M, Suzuki H, Sado T, Nakano T, Sasaki H. "Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus" Genome Res. 23: 292-299(2013) 10.1101/gr.137224.112.

6. Nakamura T, Liu YU, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. "PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos" Nature. 486:415-419(2012) 10.1038/nature11093.

[学会発表](計 8 件)

1. 仲野 徹: "PIWI-interacting RNA and Gene Silencing in Male Germ Cells" JST PREST International Symposium Small RNAs in Mammals (2014.2.21) 東京
2. 仲野 徹: "Artificial Induction of germ Cell Specific Gene Silencing through piRNA pathway" Small RNA s & Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 (2013.11.25) 東京大学 東京
3. 仲野 徹: "Artificial Induction of germ Cell Specific Gene Silencing through piRNA pathway" 8th Annual Conference of Asia Epigenome Alliance(2013.11.6) 台北・台湾
4. 仲野 徹: "Artificial Induction of germ Cell Specific Gene Silencing through piRNA pathway" Recent Advances in Stem Cell Biology(2013.11.4) 九州大学 博多市
5. 仲野 徹: "DNA メチル化と発生・発がん" 日本病理学会(2013.6.7) 札幌市
6. 仲野 徹: "piRNA 産生システムの解析" 22nd HCS 4th JARI Joint International Symposium(2012.8.30) 広島市
7. 仲野 徹: "piRNA and Spermatogenesis" 2nd SKLRB Symposia(2012.5.7) 北京・中国
8. 仲野 徹: "DNA Methylation in Cell Differentiation and Transformation" Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Disease(2012.4.21) 上海・中国

[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/researches.html>

6．研究組織

(1)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：172370

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし