

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月23日現在

霊長類を含む哺乳動物の生殖エピゲノム形成機構

Molecular pathways leading to epigenome formation
in mammalian germ cells

課題番号：25221003

塩見 春彦 (Siomi Haruhiko)

慶應義塾大学・医学部・教授



研究の概要

生殖細胞における転移因子の抑制にはPiwi-piRNA複合体によるクロマチン修飾が関与しているが、その分子機構は不明である。哺乳類 Piwi-piRNA 複合体の機能解析を通じた生殖細胞におけるエピゲノム形成機構の理解は転移因子抑制機構のみならず、遺伝子発現制御機構の進化の解明に大きく寄与することが期待される

研究分野：エピジェネティクス、ゲノム科学、RNA生物学

キーワード：生殖細胞、転移因子、エピゲノム、小分子RNA、PIWI

1. 研究開始当初の背景

近年、小分子RNAが鍵となる遺伝子発現抑制機構が動植物で次々に明らかとなってきた。これら小分子RNAはArgonauteタンパク質と作動複合体(RNA induced silencing complex: RISC)を形成することで、このタンパク質を標的遺伝子にガイドする配列特異性決定因子として機能し、遺伝子発現制御に関与する(Siomi & Siomi, *Nature* 2009)。RISC複合体による遺伝子発現抑制機構を一般にRNAサイレンシングと呼ぶ。RNAサイレンシングはヘテロクロマチン化やDNAメチル化による転写レベルの抑制とmRNAの切断・分解や翻訳抑制による転写後レベルの抑制に分類され、ゲノムの保全(品質管理)や遺伝子の発現制御に関与する。ショウジョウバエPiwiは生殖幹細胞の自己新生に必須の因子であり、一方、マウスPiwi相同タンパク質も精子形成に必須である。いずれの場合も小分子RNAであるpiRNAとpiRISCを形成し、核内において転移因子の配列特異的なエピゲノム形成を誘導することで生殖ゲノムを保全する。しかし、piRISCによるクロマチン修飾の分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

Piwiによる生殖エピゲノム形成機構の理解が遅れている決定的な理由は、生化学的な解析が極めて困難なことによる。本研究では、哺乳類組織および培養細胞を用いて、核内piRISCの機能解析を行い、それらの成果をとおして、哺乳類、特に霊長類の生殖細胞エピゲノム形成機構の解明を目指す。一方、その

知見を用いて人工的に生殖細胞エピゲノムの改変を可能にする技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

モデル系としてマウス、ハムスター、コモンマーモセット、そしてヒト(組織と培養細胞)を用いる。具体的な目標として、以下の3課題に重点的に取り組む。

・PIWI-piRNA核内複合体の同定及びその機能解析：標的クロマチン上の“機能性piRISC複合体”を同定するために、新規のクロマチン精製法を開発する。

・霊長類特異的なpiRISCの解析とその標的遺伝子探索：霊長類(主にコモンマーモセット)のpiRNAの生成機構と標的遺伝子の探索、特に転移因子以外の標的の同定を通して、霊長類piRISC複合体の機能を理解する。

・人工的に生殖細胞エピゲノムの改変を可能にする技術の開発：我々はショウジョウバエを用いて、その下流配列からpiRNAの産生を促すシス配列が存在することを明らかにした。このようなシス配列を霊長類やマウスのゲノムでも見出し、それを用いて、配列特異的にエピゲノム修飾を誘導できる系を構築する。

4. これまでの成果

・特定のクロマチン領域を単離精製できる系の確立を目指し、CRISPR/Cas9系を改変したChIP法を開発した。これは核酸切断活性を失活した変異型Cas9にタグを付加し、さらに、標的クロマチン領域にデザインしたガイド

RNA (gRNA) を用いることで特定クロマチン領域を精製する方法である。精製したクロマチンは直接質量分析に供与し、コントロール分画と比較すること (quantitative proteomic analysis) で特異的または優先的に特定クロマチン領域に結合する因子を同定するものである。

・霊長類 (コモンマーモセット) の piRISC 複合体の解析を世界に先駆けて行った。piRNA 配列解析をそれぞれの転移因子のサブファミリーにまで拡張、これらサブファミリーのゲノムの特定領域 (“piRNA クラスター”) への挿入の有無と挿入の方向性が piRNA の量と方向性 (センス・アンチセンス) を決めることを見出した。さらに piRNA の中には偽遺伝子由来のものが多数存在し、これらが機能性の親遺伝子を制御している可能性を見出した。

・マウス piRNA の詳細なマッピングを行い、幾つかの piRNA 合成を誘導するシス配列の候補を得た。この配列を精巣特異的に発現するプロモーターにより発現し、さらにその下流に標的遺伝子の断片を逆方向に結合させた合成 DNA を持つトランスジェニックマウスの作製を現在進めている。

5. 今後の計画

CRISPR/Cas9 系を改変した特定のクロマチン領域を単離精製できる系を開発した。これを用いて PIWI 依存的にヘテロクロマチン化される転移因子領域に濃縮、または特異的に結合する因子を同定する。一方、この手法を使うためには Cas9/gRNA の細胞へのインジェクションまたはトランスフェクションが必要であるため、その対象として培養細胞が適材である。マウスとヒトの精巣、卵巣由来の培養細胞を可能な限り収集し、その PIWI の発現を検討したが、いずれも発現は認められなかった。したがって、独自に細胞株を作成する必要に迫られ、まず、マウス精巣において、PIWI が発現する細胞 (パキテン期以降の精子形成細胞等) を DsRed で可視化できる PIWI-promoter-DsRed トランスジェニックマウスを作製した。現在、このマウスの精巣より DsRed 陽性細胞を単離し、細胞株の樹立を目指している。生殖細胞の PIWI 依存的エピゲノム形成を解析できる培養細胞はこの分野の全ての研究者が望んでいるものであり、細胞の樹立は大きなチャレンジではあるが、インパクトは極めて大きい。

一方、piRISC 複合体の哺乳類卵巣における機能は未開の分野である。マウスは PIWI/piRNA が精巣でしか発現しておらず、したがって、PIWI KO の表現型は精巣でしか見られない (精子形成不全とその結果としての

雄性不稔) ためである。ヒトを含む他の多くの哺乳類では PIWI 遺伝子が 4 種類存在するがマウスでは 3 種類のみである。一方、ハムスターはヒトと同様、4 種類の PIWI 遺伝子を有し、その内の 2 種類は卵巣での発現が認められる (RNA-seq データ解析結果)。そこで現在、これら卵巣で発現している PIWI の KO ハムスターを CRISPR/Cas9 法を用いて進めている。

哺乳類のそれぞれの PIWI に結合する piRNA の情報解析を系統的に進めていく。現在、転移因子に由来しない piRNA が多数存在すること、それらの多くがタンパク質をコードする遺伝子のイントロンと snRNA (U1~6) に由来していることを見出している。今後、その機能解析、特にスプライシングへの関与を進める。

下流の piRNA の産生を促すシス配列を精巣特異的に発現するプロモーター (MILI 遺伝子) により発現し、さらにその下流に標的遺伝子 (protamine2 と Ace) の断片を逆方向に結合させた合成 DNA を持つトランスジェニックマウスの作製を進めていく。(標的遺伝子と相補的な、つまり、アンチセンス) piRNA が産生される場合、生まれてくる雄のエピゲノム解析を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Parrish, N.F., et al. 2015. piRNA derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* **21**: 1691-1703.
2. Iwasaki, YW, Siomi, MC and Siomi, H. 2015. PIWI-interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem.* **84**:405-433.
4. Hirano, T., et al. 2014. Small RNA 3profiling and characterization of piRNA clusters in the adult testes of the common marmoset, a model primate. *RNA* **20**: 1223-1237.
4. Yamanaka, S., Siomi, MC. and Siomi, H. 2014. piRNA clusters and open chromatin structure. *Mobile DNA* **5**:22 DOI: 10.1186/1759-8753-5-22.

ホームページ等

塩見ラボ website:

<http://siomilab.med.keio.ac.jp/>