

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221003

研究課題名(和文) 霊長類を含む哺乳動物の生殖エピゲノム形成機構

研究課題名(英文) Molecular pathways leading to epigenome formation in mammalian germ cells

研究代表者

塩見 春彦 (SIOMI, HARUHIKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：60202107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 172,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類生殖エピゲノム形成機構の解析を行い、マウスゴノサイト期にメガベースサイズのクロマチン領域がダイナミックに変動することを見出しDAD (Differentially accessible domain) と名付けた。DADの形成に伴いその領域内のヒストンの修飾とDNAのメチル化が変化すること、さらに、DAD領域に存在する転移因子の転写が活性化されることを見出した。一方、ハムスターのPIWI遺伝子欠失個体(KOハムスター)の作製に成功した。PIWIL1 KO個体は雄雌共に不稔であった。これは、哺乳類におけるPIWI変異による雌不稔の初めての例であり、学術的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The PIWI-piRNA pathway is a conserved cellular pathway that represses transposable elements (TEs) and plays an important role in germline development. We have recently generated PIWI KO hamster (Syrian hamster; *Mesocricetus auratus*) in which three of its four distinct PIWIs are expressed in the ovary and found that PIWI KO female are sterile. We have also found novel chromatin domains termed DADs (Differentially Accessible Domains) which span more than mega bases, get transiently accessible in embryonic male germ cells right after the reprogramming event, and turn back to closed state during gonocyte. Interestingly, TEs located in DAD become activated during mid-gonocyte stages.

研究分野：複合領域

キーワード：生殖細胞 エピジェネティクス クロマチン トランスポゾン Piwi piRNA

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞特異的なArgonauteであるPiwiタンパク質は生殖細胞の形成とその維持・発生分化に必須の因子である。Piwiは少分子非コードRNAであるpiRNAと作動複合体を形成し、転移因子(トランスポゾン)の配列特異的なエピゲノム形成に関与する。この仕組みは種間で保存性が高いが、その分子機構は未だ不明であった。

2. 研究の目的

哺乳類核内Piwi-piRNA作動複合体(piRISC)の解析、霊長類特異的なPiwi/piRNAの解析、そして生殖細胞エピゲノムの動的変化の解析とあわせて、哺乳動物の生殖エピゲノム形成機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、精巣・卵巣及びそれらに由来する培養細胞を用いてpiRISCの機能解析を行った。マウス、マーモセット、ハムスター、そしてヒトPiwiタンパク質に対する抗体の作成し、これら抗体と最新の解析技術(HITS-CLIP, ChIP, 超高感度プロテオミクス, RNA-seq, ATAC-seq, nanoCAGE-seq等)を組み合わせて、piRISCとクロマチン修飾及び高次構造変化を繋ぐ因子を同定し、その機能解析を進めた。また、マウス胎児期精巣における生殖細胞エピゲノム及びクロマチン構造解析を進め、クロマチン構造の動的変化を解析した。一方、マウスではPIWIタンパク質が精巣でほぼ特異的に発現しており、卵巣では発現がほとんど見られない。しかし、最近のゲノム解析の進展から、ヒトを含む他の多くの哺乳類ではPIWIは卵巣・精巣どちらでも発現していることが明らかとなった。卵巣におけるPIWIの機能を理解するため、ハムスターをモデル動物として用い、PIWIを欠失した個体の作出を進め、個体の稔性や卵形成、さらに初期発生を解析した。

4. 研究成果

(1) 霊長類モデルとして近年よく用いられているマーモセット(*Callithrix jacchus*) 精巣に

おける小分子RNAの大規模配列解析を行い、新規miRNA 300種を含む約700種類のmiRNAを同定した。さらに、約11,000万リードの小分子RNAがpiRNAに相当し、しかも、これらの大半がPIWIタンパク質に1つであるMARWI(PIWIL1)と複合体(piRISC)を形成していることを明らかにした。これらpiRNAが転移因子のみならず偽遺伝子に由来していること、そして、それらの大半が元の親遺伝子に対してアンチセンスであることを見いだした。つまり、これらの結果は、元の親遺伝子のmRNA(センス)と相補的塩基対形成を通して、MARWI-piRISCが転移因子抑制のみならず、タンパク質をコードする遺伝子の発現制御にも関与している可能性を示唆する。また、マウスには存在せず霊長類を含む他の多くの哺乳類には存在する第4のPIWIであるPIWIL3の特異的な抗体を作成した。発現解析を行い、PIWIL3が霊長類(ヒトとマーモセット)においてこのPIWIが卵巣において特異的に発現していることを確認した。しかも、卵巣内で成長過程にある卵の細胞質にのみ発現していた。他のPIWI(PIWIL1, PIWIL2, PIWIL4)の内、PIWIL1, PIWIL2は卵巣と精巣いずれにおいても発現が確認できた。これらの成果はPIWIL1-3が卵形成に関与している可能性を示唆する。マーモセット卵巣における小分子RNAの大規模配列解析を行い、miRNAとpiRNAに相当する小分子RNAを同定した。

(2) 哺乳類生殖エピゲノム形成機構におけるPIWI-piRNA複合体の機能解析を行うため、様々な生殖組織由来培養細胞におけるPIWIの発現を調べたが、生化学が可能なレベルでの発現を確認することができなかった。また、PIWIの発現が報告されている細胞株やiPS細胞も試みたが、これら論文に記載された発現は確認できなかった。そこで、独自に細胞株の作成に着手し、様々な方法を試したが、現在まで有用な細胞株は樹立できていない。このため、piRISC核内複合体の機能解析を進めるため、ショウジョウバエおよびカイコの生殖組織由来培養細胞(OSC

細胞と BmN4 細胞)をモデル系として解析を進めた。その結果、ショウジョウバエ piRISC 核内複合体構成成分としてリンカーヒストン H1、さらに Panoramix と mRNA 核外輸送因子である NXF2 を同定した。H1 は PIWI の標的クロマチンへの結合を介して標的クロマチンの凝縮、つまり、ヘテロクロマチン化を誘導し、標的遺伝子(転移因子)の転写レベルでの抑制に関与していることを明らかにした(図1)。一方、Panoramix と NXF2 の2因子は相互作用と通してお互いの安定性に寄与しており、また、Piwi-piRNA 核内複合体による標的トランスポゾンの転写レベルの抑制に直接関与していることを明らかにした。現在、マウス NXF2 に対する抗体の作製を進めている。一方、カイコでは PIWI-piRNA 複合体による核内サイレンシングは存在しない(または極めて弱い)ことを明らかにした。

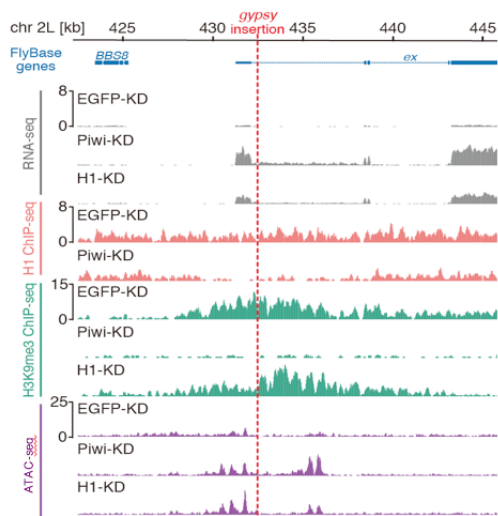


図1: Piwi 標的転移因子 (*gypsy*) クロマチン部位における Piwi 及び H1 の効果。RNAi により Piwi または H1 の発現を低下させた場合 (knock-down/KD) のクロマチンの修飾及び凝縮程度を解析した。EGFP-KD はコントロール。

(3) マウス精子形成過程におけるクロマチン構造変化を ATAC-seq 法を用いて行い、ゴノサイト時期におけるメガベースサイズのゲノム領域のクロマチン凝集と弛緩が経時的にダイナミックに変動することを見出した。このような領域を

DAD (differentially accessible domain) と名付けた。具体的には、DAD 領域は E13.5 期において閉じているが E17.5 期において開いた構造を取り、また、ゴノサイト期の終盤には閉じることが判明した。各種ヒストン修飾の解析から、ヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27me3, H3K9me3) 変化のダイナミクスは DAD 形成のダイナミクスと正または負の関係にあることも明らかにした。したがって、これらの結果は、DAD が facultative heterochromatin (条件的ヘテロクロマチン) であることを示唆している。また、nanoCAGE-seq 解析の結果、興味深いことに、DAD 領域に存在する転移因子は E13.5 期では転写が抑制されている、E17.5 期では発現していることが明らかとなった。この発現パターンはゲノムの他の領域に存在する転移因子とは全く異なる挙動である。さらに、DMA メチル化解析 (バイサルファイトシーケンス法) の結果、ゴノサイト期における DAD 領域の DNA メチル化は他のゲノム領域に比べ、遅いという結果を得、つまり、これはゴノサイト期の DNA メチル化は二段階で起こることを示唆する。

(4) ハムスター (*Mesocricetus auratus*) の PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 タンパク質に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、それを用い、ハムスター卵巣より、それぞれが形成する piRISC 複合体を精製した。それぞれの複合体に含まれる piRNA の配列解析の結果、これら PIWI タンパク質が結合している piRNA のサイズが大きく異なること、しかしその大半がゲノムの同じ領域に由来していることを見出した。一方、ハムスターはその卵や初期胚が光毒性を示すことから、胚操作が極めて難しく(つまり、卵への核酸のインジェクションや卵の移植をすべて暗室で行う必要があるため)、そのゲノム改変の成例は少ない。私達は CRISPR-Cas9 法を用いて、ハムスターの PIWIL1 及び PIWIL3 遺伝子に欠失を導入した動物個体 (KO ハムスター) を作製することに成功した。PIWIL1 KO ハムスター

は雄雌共に不稔であった。これは、哺乳類における PIWI 変異による雌不稔の初めての例であり、学術的な意義を大きい。一方、PIWIL3 KO ハムスター雌は妊娠率と産仔数共に低いことを見出した。また、PIWIL3 KO ハムスター卵の紡錘体は形態異常を示すこと、さらに、受精後、初期胚の発生異常(半数以上が2細胞胚で停止)が見られた。

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 27 件)

1. Nishida, KM., Sakakibara, K., Iwasaki, YW., Yamada, H., Murakami, R., Murota, Y., Kawamura, T., Kodama, T., Siomi, H., and Siomi, MC. 2018. Hierarchical roles of mitochondrial PAPI and Zucchini in Bombyx germline piRNA biogenesis. *Nature* **555**: 260-264. doi:10.1038/nature25788

(査読あり)

2. Hasuwa, H., and Siomi, H. 2017. Mobile elements control stem cell potency. *Science* **355**: 581-582.

3. Iwasaki, YW., Ishino, K., and Siomi, H. 2017. Deep sequencing and high-throughput analysis of PIWI-associated small RNAs.

Methods **126**: 66-75. DOI

10.1016/j.ymeth.2017.05.020

(査読あり)

4. Matsumoto, N., Nishimasu, H., Sakakibara, K., Nishida, KM., Hirano, T., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, MC., and Nureki, O. 2016. Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA. *Cell*

167: 484-497. DOI

10.1016/j.cell.2016.09.002.

(査読あり)

5. Sumiyoshi, T., Sato, K., Yamamoto, H., Iwasaki, YW., Siomi, H., and Siomi, MC. 2016. Loss of l(3)mbt leads to acquisition of the ping-pong cycle in *Drosophila* ovarian somatic cells. *Genes & Development* **30**: 1617-1622.

(査読あり)

6. Iwasaki, YW., Murano, K., Ishizu, H., Shibuya, A., Iyoda, Y., Siomi, MC., Siomi, H., and Saito, K. 2016. Piwi modulates chromatin accessibility by regulating multiple factors including histone H1 to repress transposons. *Mol Cell* **63**: 408-419.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.008>

7. Shibata, N., Kashima, M., Ishiko, T., Nishimura, O., Rouhana, L., Misaki, K., Yonemura, S., Saito, K., Siomi, H., Siomi, MC., and Agata, K. 2016. Inheritance of a nuclear PIWI from pluripotent stem cells by somatic descendants ensures differentiation by silencing transposons in planarian. *Dev Cell* **37**: 226-237.

(査読あり)

8. Lin, ZYC., Hikabe, O., Suzuki, S., Hirano, T., Siomi, H., Sasaki, E., Imamura, M., and Okano, H. 2016. Sphere formation culture of testicular germ cells in the common marmoset, a small New-world monkey. *Primates* **57**: 129-135. DOI 10.1007/s10329-015-0500-4.

(査読あり)

9. Parrish, N.F., Fujino, K., Shiromoto, Y., Iwasaki, Y.W., Ha, H., Xing, J., Makino, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Siomi, H., Honda, T., and Tomonaga, K. 2015. piRNA

derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* **21**: 1691-1703.

(査読あり)

10. Ishizu, H., Iwasaki, Y.W., Hirakata, S., Ozaki, H., Iwasaki, W., [Siomi, H.](#), and Siomi, M.C. 2015. Somatic primary piRNA biogenesis driven by cis-acting RNA elements and trans-acting Yb. *Cell Reports* **12**: 426-440.

(査読あり)

11. Sato, K., Iwasaki, Y.W., Shibuya, A., Carninci, C., Tsuchizawa, Y., Ishizu, H., Siomi, M.C., and [Siomi, H.](#) 2015. Krimper enforces an antisense bias on piRNA pools by binding AGO3 in the *Drosophila* germline. *Molecular Cell* **59**: 553-563.

(査読あり)

12. Yamanaka, S., and [Siomi, H.](#) 2015. Misprocessed tRNA response targets piRNA clusters. *EMBO J.* **34**: 2988-2989.

(査読あり)

13. [Siomi, H.](#), and Siomi, M.C. 2015. Phased piRNAs tackle transposons. *Science* **348**: 756-757.

14. Hirano, T., and [Siomi, H.](#) 2015. Small RNA-directed chromatin modification: Transgenic systems producing artificial piRNAs in germ cells. *Curr Biol.* **25**: R280-R283.

15. Iwasaki, Y.W., Siomi, M.C. and [Siomi, H.](#) 2015. PIWI-interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem.* **84**:405-433. PMID:25747396.

(査読あり)

16. Lin, ZYC., Hirano, T., Shibata, S., Seki, N.M., Kitajima, R., Sedohara, A., Siomi, M.C., Sasaki, E., [Siomi, H.](#), Imamura, M., Okano, H. 2015. Gene expression ontogeny of spermatogenesis in the marmoset uncovers primate characteristics during testicular development. *Developmental Biology* **400**: 43-58.

(査読あり)

17. Hirano, T., Iwasaki, Y.W., Lin, ZYC., Imamura, M., Seki, N.M., Sasaki, E., Saito, K., Okano, H., Siomi, M.C., and [Siomi, H.](#) 2014. Small RNA profiling and characterization of piRNA clusters in the adult testes of the common marmoset, a model primate. *RNA* **20**: 1223-1237.

(査読あり)

18. Yamanaka, S., and [Siomi, H.](#) 2014. diRNA-Ago2-RAD51 complexes at double-strand break sites. *Cell Research* **24**:511-512.

19. Yamanaka, S., Siomi, M.C. and [Siomi, H.](#) 2014. piRNA clusters and open chromatin structure. *Mobile DNA* **5**:22 DOI: 10.1186/1759-8753-5-22.

(査読あり)

20. Murota, Y., Ishizu, H., Nakagawa, S., Iwasaki, Y.W., Shibata, S., Kamatani, M.K., Saito, K., Okano, H., [Siomi, H.](#) and Siomi, M.C. 2014. Yb integrates piRNA intermediates and processing factors into perinuclear bodies to enhance piRISC assembly. *Cell Reports* **8**: 103-113.

(査読あり)

21. Nishida, KM., Iwasaki, YW., Murota, Y., Nagao, A., Mannen, T., Kato, Y., Siomi, H., and Siomi, MC. 2014. Respective functions of two distinct Piwi complexes assembled during piRNA biogenesis in insect germ cells. *Cell Reports* **10**: 193-203.

(査読あり)

[学会発表] (計 52 件)

1. H. Siomi. "Understanding of how Piwi represses transposable elements in the nucleus" Keynote lecture, The World of Regulatory RNAs, 2015
2. H. Siomi, Ishizu, H., Iwasaki, Y.W., and Siomi, M.C. "piRNA biogenesis in Drosophila ovarian somatic cells." RNA Biology, CSH-Asia Conference, 2014
3. H. Siomi, Hirano, T., Iwasaki, Y.W., and Siomi, M.C. "piRNAs in the adult testes in the common marmoset." Symposium on RNA Biology, ComBio2014, 2014
4. H. Siomi. "Small RNAs in the adult testes of common marmoset, a model primate." Keystone Symposia, RNA Silencing, 2014
5. H. Siomi, Hirano T, Iwasaki YW, Seki NM, and Siomi MC. "piRNAs in common marmoset." FASEB meeting on Mobile DNA in Mammalian Genomes, 2013

[図書] (計 2 件)

1. Hirano, T., Hasuwa, H., and Siomi, H. 2017. Identification of mouse piRNA pathway components using anti-MIWI2 antibodies. *Methods in Mol Biol* **1463**: pp205-216 (ed., M. Buszczak) ISBN 978-1-4939-4015-8. Springer

2. Murano, K., Iwasaki, YW., and Siomi, H. 2017. Profiling open chromatin structure in the Ovarian Somatic Cells using ATAC-seq. *Methods in Mol Biol* **1680**: pp165-177 (ed., K. Okamura & K. Nakanishi). Springer

[その他]
ホームページ:
<http://siomilab.med.keio.ac.jp/>

[学術講演]

1. H. Siomi. "Mammalian Piwi-piRNA pathways and chromatin reprogramming in early germline development", Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore, 2017
2. H. Siomi. "Transposons silencing by the Piwi-piRNA pathway in fly and mammals," Institute of Zoology, CAS, Beijing, China, 2017
3. H. Siomi. "RNA silencing pathways." Opening lecture, Current Methods in RNP Analysis (Graduate research course), University of Regensburg, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 春彦 (SIOMI, Haruhiko)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号: 60202107

(2) 研究協力者

蓮輪 英毅 (HASUWA, Hidetoshi)
岩崎 由香 (IWASAKI, Yuka)
山中 総一郎 (YAMANAKA, Soichiro)
村野 健作 (MURANO, Kensaku)