

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25503003

研究課題名(和文) エピジェネティック修飾と分子シャペロンによるレトロトランスポソンの制御機構

研究課題名(英文) Regulation of retrotransposons by epigenetic modifications and molecular chaperons

研究代表者

一柳 健司 (Ichiyangi, Kenji)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70401560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス雄性生殖細胞の各発生ステージにおけるレトロトランスポソンの制御機構を理解するため、Pld6 およびDnmt3L変異体におけるレトロトランスポソンのDNAメチル化レベルと発現レベルを大規模シーケンサーで網羅的に解析し、発生初期の生殖細胞ではpiRNA(小分子RNAの一種)に依存したmRNA切断機構が重要である一方、減数分裂期ではDNAメチル化による転写制御が重要になることを明らかにした。また、分子シャペロンHsp90の変異体の解析から、この分子はpiRNA生合成過程においてpiRNA依存的RNase(PIWIタンパク質群)へのpiRNAのローディングを介助していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of retrotransposon regulation during the development of male germ cells in mice, we analyzed the levels of DNA methylation and RNA expression of a large number of retrotransposons in Pld6 and Dnmt3L mutant germ cells by deep sequencing. We revealed that the post-transcriptional silencing mechanism via piRNA-dependent mRNA cleavage plays a primary role in early germ cells called prospermatogonia, whereas the transcriptional silencing mechanism via DNA methylation later becomes a primary mechanism in spermatocytes executing meiosis. We also revealed, by genetic studies on Hsp90-alpha knockout mice, that Hsp90-alpha plays an important role in the step where piRNAs become loaded onto the piRNA-dependent RNases (i.e., PIWI-family proteins) in prospermatogonia.

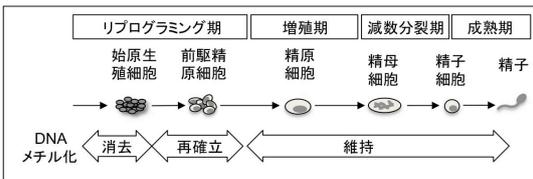
研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 転移因子 生殖細胞 DNAメチル化 piRNA 熱ショックタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) レトロトランスポゾン(LINE, SINE, LTR) 因子に大別される一群の転移因子で、その転移は突然変異を引き起こす。特に次世代へゲノム情報を伝える生殖細胞ではその影響は甚大である。そこで、宿主はレトロトランスポゾンを抑制する機構をもっている。マウス生殖細胞ではレトロトランスポゾンの転写活性はDNAメチル化などのエピジェネティックな機構で制御されており、その破綻は精子形成不全を起こす。さらにLINEの一つであるL1のDNAメチル化には生殖細胞特異的な小分子RNA (piRNA) が関与することが知られている。しかし、このような解析は、数百にのぼる多くのレトロトランスポゾンのうちの代表的な2種 (L1およびLTR因子の一つであるIAP) でのみ解析されてきた。従って、piRNAとDNAメチル化の関係性が一般的なものかどうかは不明であった。さらに、雄性生殖細胞はリプログラミング期、増殖期、減数分裂期、精子成熟期の順に発生ステージが進むが(図1)、各ステージでどのようなエピジェネティック制御が重要であるかということも不明であり、断片的な知見があるのみであった。

(2) HSP90はタンパク質の機能や品質維持に関わる分子シャペロンである。ショウジョウバエのhsp90がPIWIタンパク質のリン酸化を介してpiRNA合成に関与することが報告されていたが、哺乳類では遺伝学的な研究が行われていなかった。哺乳類ではHSP90αとHSP90βの二つの遺伝子が存在することが一因であったと思われる。申請者らはHSP90αのノックアウトマウスが不妊になることを見だし、組織免疫学的な解析から減数分裂期で発生が止まることを明らかにしていた。これらの表現型はDNAメチル化酵素やpiRNA合成系の遺伝子の変異マウスと類似しており、HSP90αがpiRNA合成に関与することを示唆していた。



(図1) 哺乳類の雄性生殖細胞の形成過程

2. 研究の目的

(1) いくつかの生殖細胞形成ステージでDNAメチル化の異常やpiRNA合成異常によって、レトロトランスポゾンのDNAメチル化やRNA発現がどのようになるのかを解析し、レトロトランスポゾンの制御システムの全体像を明らかにすることを目的とした。

(2) HSP90がどのようにレトロトランスポゾンのエピジェネティック制御に関わっているのかを遺伝学的な解析から明らかにすることを目的とした。

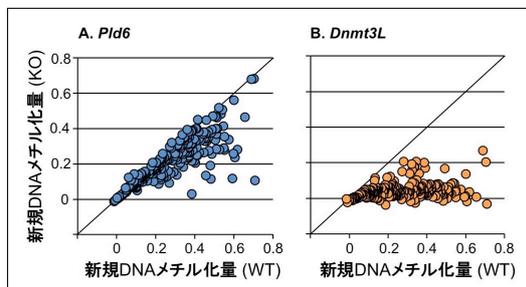
3. 研究の方法

(1) 生殖細胞形成過程のリプログラミング期(前駆精原細胞)における新規DNAメチル化が不完全なDnmt3Lノックアウト(KO)マウス、その時期にpiRNAを合成できないPld6 KOマウス、およびそれらの二重変異体を用いて、網羅的なDNAメチル化解析(Whole Genome Bisulfite Shotgun sequencing, WGBS)を行った。この解析には野生型ではリプログラミング(大規模な新規DNAメチル化)が完全に終了している生後7日目の増殖期の細胞(精原細胞)を精製して用いた。また、リプログラミング期、増殖期、および減数分裂期(精母細胞)において、レトロトランスポゾンの発現量を解析した。

(2) リプログラミング期の細胞が含まれる胎生16.5日の精巣からRNAを抽出し、全小分子RNAを大規模シーケンサーで解析した。また減数分裂期の細胞を生後1ヶ月齢の精巣からFACSで精製し、小分子RNAおよびmRNAを大規模シーケンサーで解析した。さらに、この時期の細胞を用いてDNAメチル化レベルの変化の有無をバイサルファイトPCR法にて検証した。

4. 研究成果

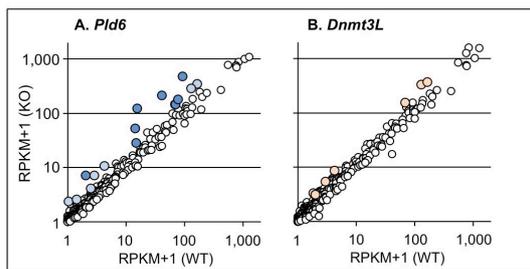
(1-1) WGBS解析の結果、piRNAを合成できないPld6 KO変異体でも大部分のレトロトランスポゾンがメチル化されていた(図2A)。一方、L1やMMERGLNはメチル化が大幅に低下していた。従って、L1に関してはpiRNAによるメチル化誘導が見られるものの、ほとんどのレトロトランスポゾンはpiRNA非依存的にメチル化されていることが明らかになった。一方、Dnmt3L KO変異体では大部分のレトロトランスポゾンがメチル化されていなかった(図2B)。レトロトランスポゾン以外のゲノム領域についてはDnmt3L変異体では野生型マウスの約半分にメチル化レベルが低下していたが、低下の度合いはAT含量の多い領域(レトロトランスポゾンが多い領域でもある)で顕著であった。



(図2) 変異体における新規DNAメチル化導入の影響

(1-2) 前駆精原細胞が含まれる出生直後の精巣からRNAを抽出してpolyA(+)精製し、RNAシーケンシングによって、レトロトランスポゾンの発現量を解析した。興味深いことに、Pld6変異体ではいくつかのレトロトランスポゾンの発現上昇が認められたが、一方、Dnmt3L変異体ではどのレトロトランスポゾ

ンもほとんど発現上昇がなかった (図3)。従って、前駆精原細胞では DNA メチル化によるレトロトランスポゾンのサイレンシング機構は機能していないと考えられる。次に、出生直後の精巣で新生 RNA をラベルしてレトロトランスポゾン発現量を比較解析したところ、*Pld6* KO 精巣で発現上昇しているのは転写レベルの上昇ではなく、転写後の mRNA 安定化が主な原因であった。従って、これまで考えられていた piRNA→DNA メチル化→転写抑制という図式は一般化できないばかりか、前駆精原細胞ではそのようなサイレンシング機構は無いということが分かった。

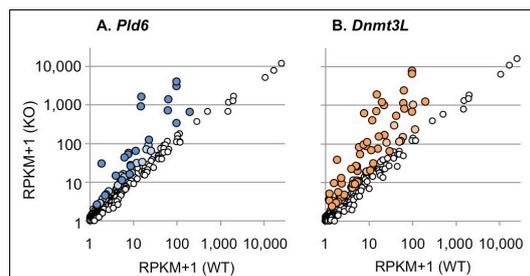


(図3) 前駆精原細胞におけるレトロトランスポゾンの発現量

(1-3) 3 週齢の精巣から精母細胞 (正確にはレプトテン期とザイゴテン期の精母細胞) を FACS で精製し、同様に mRNA シーケンシング解析を行ったところ、*Pld6* 変異体では L1 および MMERGLN (共に DNA メチル化が低下していた) の発現が数十から百倍程度、大きく上昇していた。*Dnmt3L* 変異体では、これらの因子に加えて IAP や MMERVK などのレトロトランスポゾンの発現も上昇していた (図4)。これらの因子について精原細胞での発現量を調べたところ、どちらの変異体でも大きな上昇は見られなかった。従って、DNA メチル化低下の影響は減数分裂期直前までは大きくないが、減数分裂期に入ると急激に増大することが分かった。このことは、当初、転写後レベルで piRNA によって制御されていたものが、減数分裂期に転写レベルで DNA メチル化によって制御されるように制御システムがスイッチすることを意味している。おそらく、精原細胞までは DNA メチル化がなかったとしても、ヒストン修飾によって転写が制御されているのではないかと思われるが、減数分裂初期から大規模なヒストンバリエーションの交換が行われるので、それ以降では DNA メチル化の有無がより重要になるであろう。

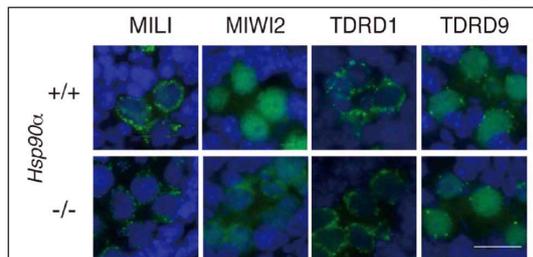
(1-4) 精母細胞での mRNA シーケンシング解析の結果、*Pld6* 変異体および *Dnmt3L* 変異体において、それぞれ 19 個および 91 個の遺伝子も発現上昇していることを明らかにした。興味深いことに、それらの多く (13 個および 37 個) は上流配列やイントロン内にあるレトロトランスポゾン (L1 や IAP など) から転写されて発現上昇したものであった。従って、生殖細胞で正しく DNA メチル化を導入することは、次世代へ受け渡すゲノムの

正確性を確保するのみならず、精母細胞でのトランスクリプトームの正確性にも重要で



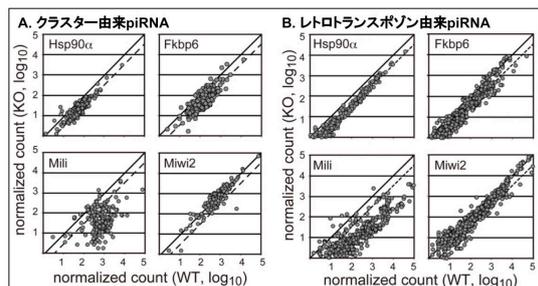
(図4) 精母細胞におけるレトロトランスポゾンの発現量
あることが明らかとなった。

(2-1) *Hsp90aa1* (*HSP90α* をコードする遺伝子) の変異体マウスの胎生期精巣を免疫染色して解析したところ、piRNA 結合タンパク質のひとつである MIWI2 が核に移行していないことを明らかにした (図5)。一方、野生型では MIWI2 と結合している TRDR9 は核に移行していた。これらのタンパク質の結合には MIWI2 のアルギニンのメチル化が重要であることが示唆されていたので、変異体での MIWI2 アルギニンメチル化レベルを免疫沈降とウェスタンブロッティングで確認したが、野生型と変わらなかった。また、MILI や TRDR1 といったタンパク質の局在も変化



(図5) *Hsp90* 変異体における piRNA 関連タンパク質の局在
していなかった。

(2-2) MIWI2 の核移行には piRNA と結合することも重要だと考えられていたので、次に *Hsp90aa1* 変異体の胎生期精巣の小分子 RNA を大規模シーケンサーで解析したところ、miRNA には変化がなかったが、piRNA が約 3 分の 1 程度に低下していることが分かった (図6)。piRNA はクラスター由来の一次 piRNA もレトロトランスポゾン由来の二次 piRNA も同程度に低下していたが、レトロトランスポゾン由来 piRNA では ping-pong サイクルと呼ばれる増幅経路の特徴が見られた。これらのことから、一次



(図6) *Hsp90* および各種変異体における piRNA 存在量

piRNA の合成自体か、その産物の安定性が影響を受けているものと思われる。MIWI2 に piRNA がロードされているかどうか検出を試みたが、抗体がうまく機能せず、野生型でも結合を検出できなかった。しかし、昆虫細胞では piRNA のローディングに HSP90 が必要との報告があるので、哺乳類でも同様の機構が存在している可能性が高い。今後、MIWI2 や MILI への piRNA ローディングに関して確定的な実験結果を得る必要がある。

(2-3) 胎生期精巣での L1 タンパク質の発現をウェスタンブロットイングおよび免疫染色によって調べたところ、Hsp90aa1 変異体では著しく(10倍以上)発現が上昇していた。一方、RNA レベルでは発現上昇が見られず、また L1 の DNA メチル化も正常であったので、Hsp90aa1 による L1 の制御は転写後レベルのものであると考えられる。一方、精母細胞での発現量を RNA シーケンシングによって調べたところ、L1 を含めてどのレトロトランスポゾンも大きな発現上昇はなかった。この結果は、前項のように、精母細胞では piRNA による RNA 切断制御よりも DNA メチル化による転写抑制の方がドミナントに機能していることとも一致する。

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 2 件)

Hayashi, M., Maehara, K., Harada, A., Semba, Y., Kudo, K., Takahashi, H., Oki, S., Meno, C., Ichiyanagi, K., Akashi, K. & Ohkawa, Y. (2016) Chd5 regulates MuERV-L/MERVL expression in mouse embryonic stem cells via H3K27me3 modification and histone H3.1/H3.2. **J. Cell. Biochem.** 117, 780-792

Ichiyanagi, T., Ichiyanagi, K., Ogawa, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chuma, S., Sasaki, H. & Udono, H. (2014) HSP90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. **Nucl. Acids Res.** 42, 11903-11911

[学会発表] (計 7 件)

井上晃太、福田溪、一柳健司、佐々木裕之「マウス雄性生殖細胞でのレトロトランスポゾン制御における DNA メチル化と piRNA の役割」 2013 年 9 月 19 日 第 85 回日本遺伝学会

Ichiyanagi, K. 「Epigenome evolution in primates」 2014 年 8 月 22 日 第 16 回日本進化学会シンポジウム

一柳健司「SINE レトロトランスポゾンのエピジェネティック制御と機能」 2014 年 9 月

18 日 第 86 回日本遺伝学会ワークショップ
Inoue K., Ichiyanagi K., Fukuda K., Glinka M., Sasaki H. 「Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons in developing male germ cells in mice.」 2015 年 6 月 14 日 FASEB meeting “Mammalian Mobile Genetic Elements”

一柳健司、一柳朋子、小川阿弥子、宮川さとみ、中野徹、中馬新一郎、佐々木裕之、鶴殿平一郎「熱ショックタンパク質はマウス雄性生殖細胞においてレトロトランスポズンを制御する」 2015 年 9 月 26 日 第 87 回日本遺伝学会

Ichiyanagi K. 「Epigenome evolution in primates」 2015 年 12 月 2 日 第 38 回日本分子生物学会ワークショップ

[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：なし

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・准教授

研究者番号：70401560

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし