

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04817

研究課題名(和文) 生殖細胞形成過程におけるレトロトランスポゾン制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulatory network for retrotransposon silencing during germ cell development

研究代表者

一柳 健司 (Ichiyangi, Kenji)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70401560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス生殖細胞でのレトロトランスポゾン制御機構を理解するため、野生型マウス、Dnmt3L KOマウス、Pld6 KOマウスの前駆精原細胞、精原細胞、精母細胞を回収し、strand-specific mRNA-seqによってレトロトランスポゾンの発現量を網羅的に調べた。その結果、マウス生殖細胞でのレトロトランスポゾン制御は、発生に伴ってpiRNA依存型からDNA依存型に徐々に変化することが明らかとなった。さらに、ChIP-seqを用いて精原細胞でヒストン修飾状態を調べたところ、DNAメチル化低下に伴って、H3K9me3が減少、H3K4me3が上昇していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、レトロトランスポゾン制御機構はある時点で転換するというよりは、徐々に変化していくことが明らかになった。したがって、レトロトランスポゾンを取り巻くクロマチン状況も徐々に経時的に変化していくものと思われる。今後は、そのクロマチン修飾の経時変化をとらえる必要がある。さらに、本研究からはもう一つ重要な発見が得られた。それは、DNAメチル化によってヒストン修飾が影響を受けるということである。ヒストンのメチル化がDNAのメチル化に影響を与える例は多くても、その逆は報告がなく、新しいエピジェネティック制御の相互作用のあり方である。

研究成果の概要(英文)：Regulation of the transposable activity of millions of copies of retrotransposons is important for maintaining the genomic integrity. We have revealed that DNA methylation is an important epigenetic modification to transcriptionally silence the retrotransposons and that piRNAs play an important role in post-transcriptional silencing of retrotransposons. Interestingly, in the early stage of germ cell development (prospematogonia), piRNAs play a dominant role, whereas DNA methylation becomes more important in the later stage (spermatocytes). We investigated retrotransposon expression by strand-specific mRNA-seq of prospematogonia, spermatogonia, and spermatocytes of wild-type, Dnmt3L, and Pld6 mutant mice. The results showed that the shift from the piRNA-centered to DNA methylation-centered regulatory systems occurs gradually during development. Moreover, ChIP-seq analysis of spermatogonia revealed that H3K9me3 modification at retrotransposons depends on DNA methylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：レトロトランスポゾン エピジェネティクス 哺乳類 生殖細胞

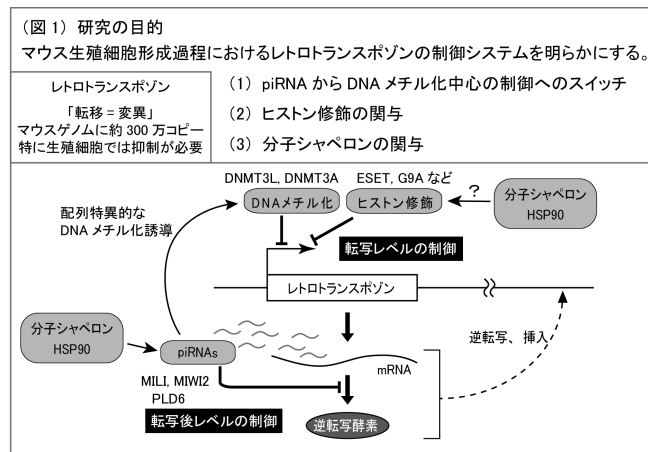
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1)ゲノムに数百万コピー(哺乳類の場合)も存在するレトロトランスポソンの転移活性を制御することは、ゲノムを安定に保つために重要であり、特に次世代にゲノムを伝承する生殖細胞ではレトロトランスポソンの高発現が不妊と関連していることが知られている。我々はマウス生殖細胞でのレトロトランスポソンの制御には DNA メチル化による転写レベルでのエピジェネティック制御と piRNA (小分子 RNA の一種) による転写後レベルの制御が重要であることを明らかにしてきた (図 1)。しかも、piRNA は DNA メチル化やヒストン H3K9me3 化を誘導し、H3K9me3 は DNA メチル化の維持に関わるなどの相互制御ネットワークを構成している。
- (2)興味深いことに、哺乳類の生殖細胞では DNA メチル化レベルがダイナミックに増減する。精子形成過程では、一旦、胎児期の始原生殖細胞で DNA メチル化レベルが激減し、その後再び上昇する(エピジェネティック・リプログラミング)。出生後、DNA メチル化レベルは維持され、精原細胞(精子幹細胞)として増殖しながら、一部が精母細胞となり減数分裂を行って最終的に精子になる。我々は DNA メチル化が起こらない *Dnmt3L* ノックアウト(KO)マウスや piRNA が合成できない *Pld6* KO マウスを用いて、リプログラミング期(前駆精原細胞)では piRNA が、減数分裂期(精母細胞)では DNA メチル化がレトロトランスポソン制御に非常に重要であることを明らかにした。これは精子形成の過程で制御システムが大きく転換することを意味している。しかし、転換の正確な時期は不明であり、なぜ転換するのかも未解明である。

2. 研究の目的

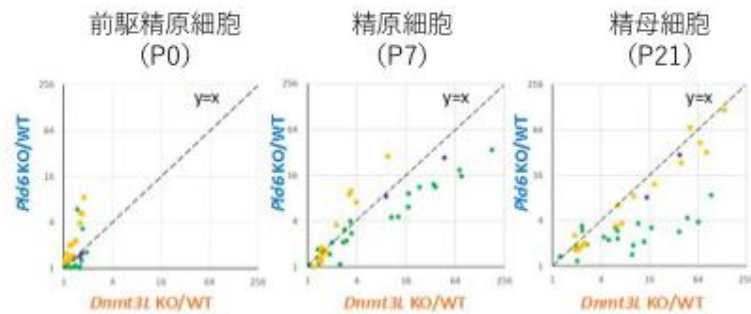
- (1)本研究では、これらの KO マウスを用いて、各発生段階の生殖細胞を解析し、まず、どの発生段階で制御様式が転換するのかを明らかにすることを目的とした。ヒストン修飾については生殖細胞でのレトロトランスポソン制御に関わるのかどうか不明な点が多いので、遺伝学的な解析を行って関与を検証することとし、マウス生殖細胞形成過程におけるレトロトランスポソンの制御システムを理解することを目的とした。



3. 研究の方法

- (1)野生型マウス、*Dnmt3L* KO マウス、*Pld6* KO マウスの生後 0 日齢 (P0) の精巢 (前駆精原細胞)、P7 の精原細胞、P21 のレプトテン / ザイゴテン期の精母細胞を回収し、strand-specific mRNA-seq を行い、レトロトランスポソンの発現量を調べた (図 2)。P0 では、*Dnmt3L* ノックアウトによって DNA メチル化異常があるにもかかわらず、レトロトランスポソン影響はほとんど見られず、一方、piRNA 欠損となる *Pld6* KO マウスでは L1 の発現上昇が見られた。P21 では *Pld6* KO マウスでは L1 の他に MMRGLN、IAP、MERVK といったレトロトランスポソンの発現上昇が見られた。*Dnmt3L* KO マウスでもこれらのレトロトランスポソンの発現が上昇し、しかも、その上昇度は *Pld6*

KO マウスよりも高いものであった。前駆精原細胞と精母細胞の中間的な発生段階にある精原細胞では、*Pld6*、*Dnmt3L* KO マウスで L1 が同程度上昇していたが、その程度は P0 とあまり変わらな



(図2) 各ステージでのレトロトランスポソンの発現量
縦軸は*Pld6* ノックアウトでの上昇度、横軸は*Dnmt3L* ノックアウトでの上昇度
黄色のプロットはL1を、緑はIAP、紫はMMERGLNを示す。

った。IAP の発現も両 KO マウスで上昇しており、その程度は P0 よりも高く、また *Pld6* KO マウスと *Dnmt3L* KO マウスではあまり変わらなかった。これらのことから、精原細胞ではDNAメチル化やpiRNAのL1抑制の役割は精母細胞と比べるとかなり小さく、別の機構で抑制されていると考えられた。IAPの抑制はP0ではほとんどDNAメチル化やpiRNAに依存していなかったが、精原細胞になるとどちらにも依存したものに变化した。ただし、精母細胞に比べるとDNAメチル化への依存度は低いことがわかった。総じて、発生のある時点で一気にpiRNA依存型からDNA依存型に変化するのではなく、徐々にDNAメチル化へ依存していくことが明らかとなった。現在、P3、P5の精原細胞やプレプトテン期の精母細胞を回収して発現解析を行っているところである。

- (2)次に精原細胞からクロマチンを回収し、H3K4me3とH3K9me3のChIP-seqを行った。その結果、*Pld6* KO マウスと *Dnmt3L* KO マウスともに、L1のプロモーター上ではH3K9me3が減少し、代わってH3K4me3が増加していることを明らかにした。この傾向はIAPのLTRプロモーターでも見られた。これまでに、H3K9me3がpiRNAに依存してL1プロモーター上に集積することが知られていおり、*Pld6* ノックアウトのデータはその知見と一致する。一方、DNAメチル化の減少によって、H3K9me3やH3K4me3の蓄積量が変化するというのは、これまでに報告がなく、これらの修飾の維持にはDNAメチル化が必要であることを世界で初めて示した研究であると言える（投稿準備中）。
- (3)H3K9me3の役割を調べるため、*Setdb1*の生殖細胞特異的KOマウスを作成し、その表現型を組織学的に調べたところ、第一減数分裂パキテン期で発生を停止していることを明らかにした。現在、サイゴテン期およびパキテン期の精母細胞をFACSで分離し、レトロトランスポソン発現、ヒストン修飾およびDNAメチル化への影響を調査している。
- (4)IAPレトロトランスポソンはDNAメチル化による制御を受けていて、ゲノムにある1万コピーは全体的には高メチル化されているが、一方、コピーによってメチル化状態が異なることが知られていた。しかし、どのコピーが低メチル化しているのかといったことは不明であったので、IAPに絞ってゲノム網羅的にメチル化状態を調べるTEPBAT法を開発し、精子や体細胞におけるDNAメチル化状態を解析した。TEPBATは原理的には全ゲノムバイサルファイトショットガンシーケンシングに似ているが、途中でIAPを含む配列だけを濃縮する点が異なる。解析の結果、精子特異的に低メチル化するコピーを同定でき、これらが特定のサブファミリーに属し、ソロLTR型で、生殖細胞で発現している転写因子の結合モチーフをもつことを明らかにした。

4 . 研究成果

- (1)本研究によって、レトロトランスポゾン制御機構はある時点で転換するというよりは、徐々に変化していくことが明らかになった。したがって、レトロトランスポゾンを取り巻くクロマチン状況も徐々に経時的に変化していくものと思われる。今後は、そのクロマチン修飾の経時変化をとらえる必要がある。
- (2)本研究からはもう一つ重要な発見が得られた。それは、DNA メチル化によってヒストン修飾が影響を受けるということである。DNA メチル化によるヒストン脱アセチル化の促進を除けば、ヒストン修飾が DNA メチル化に影響を与える例は多くても、その逆はほとんどない。したがって、これは新しい発見である。
- (3)これまで、piRNA の合成不全によって、L1 レトロトランスポゾンの DNA 低メチル化と H3K9me3 の低下が報告されており、piRNA によって H3K9me3 の導入がガイドされるというモデルが提唱されている。しかし、本研究の結果では DNA メチル化の低下のみ (piRNA 合成は正常) でも H3K9me3 が低下することを示したので、このモデルが必ずしも正しくない可能性が出てきた。piRNA がヒストンや DNA の修飾状態にどのような作用をしているのか、定説に一石を投じる結果となった。
- (4)ほとんど同じ塩基配列を持つ IAP のコピー間で DNA メチル化状態が異なることはエピゲノムの制御機構の観点から興味深い。本研究では DNA メチル化差が転写因子の結合配列の有無というジェネティックな違いを反映していることが明らかとなった。これは、ゲノム情報がエピゲノムのあり方に大きな影響を与えていることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Shimosuga K., Fukuda K., Sasaki H., and Ichiyanagi K.* Locus-specific hypomethylation of the mouse IAP retrotransposon is associated with transcription factor-binding sites. *Mob DNA* 8, 20 (2017)
- (2) Inoue K., Ichiyanagi K.*, Fukuda K., Glinka M., and Sasaki H.* Switching of dominant retrotransposon silencing strategies from posttranscriptional to transcriptional mechanisms during male germ-cell development in mice. *PLoS Genet* 13, e1006926 (2017)
- (3) Fukuda K., Inoguchi Y., Ichiyanagi K.*, Ichiyanagi T., Go Y., Nagano M., Yanagawa Y., Takaesu N., Ohkawa Y., Imai H., and Sasaki H.* Evolution of the sperm methylome of primates is associated with retrotransposon insertions and genome instability. *Hum Mol Genet* 26, 3508-3519 (2017)

〔学会発表〕(計7件) は発表者

- (1) 下須賀健一、福田溪、佐々木裕之、一柳健司 「マウス精子における IAP レトロトランスポゾンのローカス特異的な低メチル化は転写因子結合部位と関連する」日本分子生物学会年会ワークショップ (2018 年 11 月、横浜)
- (2) 杉本大空、一柳健司 「マウス雄性生殖細胞発生過程におけるレトロトランスポゾン制御機構の経時的変化」日本分子生物学会年会 (2018 年 11 月、横浜)(ポスター発表)
- (3) Kenji Ichiyanagi “Epigenetic regulation of retrotransposons in mouse male germ cells” Annual meeting of Korean Society of Molecular and Cellular Biology (2018 年 9 月、ソウル)

- (4) Ken-ichi Shimosuga, Kenji Ichiyanagi “Comprehensive DNA methylation analysis reveals subfamily-specific hypomethylation of the mouse IAP retrotransposon and its association with transcription factor-binding sites” 日本遺伝学会年会 (2017年9月、岡山)
- (5) Kenji Ichiyanagi “Evolution of the sperm methylome of primates is associated with retrotransposon insertions and genome instability” 2nd Japan-Korea international symposium for transposable elements (2017年6月、東京)
- (6) 福田溪、一柳健司 「霊長類のエピゲノム進化におけるシス制御配列やトランスポゾン配列の役割」日本分子生物学会年会シンポジウム (2016年12月、神戸)
- (7) 井上晃太、一柳健司、マイケルグリーンカ、佐々木裕之 「PTGS から TGS へ：マウス雄性生殖細胞形成過程におけるエピジェティックなレトロトランスポゾン制御機構の転換」日本遺伝学会年会 (2016年9月、三島)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ
<http://nuagr2.agr.nagoya-u.ac.jp/~ged/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：井上晃太

ローマ字氏名：Kota Inoue

研究協力者氏名：下須賀健一
ローマ字氏名：Ken-ichi Shimosuga
研究協力者氏名：杉本大空
ローマ字氏名：Hirotaka Sugimoto
研究協力者氏名：福田溪
ローマ字氏名：Kei Fukuda
研究協力者氏名：マイケル グリンカ
ローマ字氏名：Michael Glinka
研究協力者氏名：川瀬雅貴
ローマ字氏名：Masaki Kawase
研究協力者氏名：一柳朋子
ローマ字氏名：Tomoko Ichiyonagi
研究協力者氏名：佐々木裕之
ローマ字氏名：Hiroyuki Sasaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。