

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03175

研究課題名（和文）ハムスターをモデルとした卵形成時におけるレトロトランスポゾン制御機構の解明

研究課題名（英文）PIWI-piRNA pathway analysis in female germ cell

研究代表者

蓮輪 英毅（HASUWA, HIDETOSHI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：50343249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳動物ではこれまで生殖細胞でのみ機能すると考えられてきたPIWI-piRNA経路について、遺伝子改変ゴールデンハムスターを用いることで以下のことを明らかにした。ヒトをはじめとする哺乳動物全般は雌でもPIWI-piRNA経路が機能しており、卵子で発現したPIWI遺伝子とpiRNAが初期発生に重要な機能を有している。これらのことはマウスを用いた研究では明らかにできなかったことであり、ヒト疾患モデルとしてのゴールデンハムスターの可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の生命科学研究はマウスを用いて行われているが、それらのすべてがヒトの疾病を反映するものでない。今回の研究成果は、ゴールデンハムスターを用いることでマウスでは実現できなかった研究成果を導き出したものである。そのため、単に雌におけるPIWI-piRNA経路についての新たな知見を得ただけではなく、生命科学・医学研究全般に新しいヒトモデル動物としてのゴールデンハムスターの可能性を示した学術的および社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：In mammals, the PIWI-piRNA pathway, which has been thought to function only in male germ cells, was elucidated to function in female by using genetically modified golden hamsters. We found the PIWI-piRNA pathway functions in all mammals, including humans, even in females, and the PIWI gene and piRNA expressed in oocytes have important functions in early development. These findings, which could not be clarified in studies using mice, showed the potential of golden hamsters as a human disease model.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゴールデンハムスター 生殖細胞 ゲノム編集 PIWI遺伝子

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類を代表とする真核生物のゲノム DNA には機能を持たないジャンク領域が大半を占めていると考えられてきた。ところが、ゲノム DNA のほとんどの領域から RNA が転写されており、ジャンクの半分を占めるレトロトランスポソンの多くが転写されていることが明らかになった。これらのレトロトランスポソンは転写 逆転写 転移というように、宿主の生殖細胞のゲノム上を飛び回ることによって新たな生命現象を作り出し生き物の進化に貢献してきた可能性がある。実際に胎盤を形成する哺乳動物には、レトロトランスポソンあるいはレトロウイルス由来の遺伝子が胎盤形成に必須であることが明らかになっている。一方で、活性化されたレトロトランスポソンによる無秩序な転移による遺伝子破壊は生命現象の破綻を導き、血友病、筋ジストロフィーなどの先天性疾患の原因ともなる。さらに、多くのがん組織においてもレトロトランスポソンの活性化が報告されており、発ガンの原因の1つと考えられている。そのため、レトロトランスポソンから生殖細胞ゲノムを防御する機構は生命を維持する上で不可欠であり、そのメカニズムを理解することも生命科学および医学研究に不可欠である。しかしながら、レトロトランスポソンを制御する分子メカニズムについては、不明な点が多く解決すべき課題が残されている。

哺乳類におけるレトロトランスポソンの不活性化機構として DNA メチル化による転写抑制と 20-30 塩基程度の小分子 RNA による翻訳抑制が知られている。マウスにおいては PIWI タンパク質と PIWI interacting RNA (piRNA) が生殖細胞におけるレトロトランスポソンの不活性化に中心的な機能を有していると考えられている。マウスでは、3種の Piwi 遺伝子 (Piwi1, Piwi2, Piwi4) が精巣特異的に発現し、それらを欠損したマウスでは piRNA がなくなると同時に、レトロトランスポソンの発現が亢進する。その結果、減数分裂期の精細胞に障害が生じ、不妊となる。これらの結果から、哺乳動物における PIWI-piRNA によるトランスポソンの制御は雄特有なものと考えられていた。

一方で、我々を含む複数のグループから、マウス・ラット以外の哺乳動物細胞では雄だけでなく雌の生殖細胞において PIWI-piRNA が強く発現していること、雌特異的に発現する PIWIL3 が存在することが明らかにされた。これらの結果から、マウス・ラットは例外であり、哺乳動物全般において PIWI-piRNA は、雌の生殖細胞でもレトロトランスポソンの活性を制御している可能性が示唆されていた。しかしながら、マウスでは解析できないために、その全容は不明であった。

2. 研究の目的

哺乳動物全般に保存された PIWI-piRNA 経路と生命現象の関係を理解するにはマウスでは不十分であるために、我々はゴールデンハムスターに着目した。ゴールデンハムスターはマウスとは異なりヒトと同様に4つの PIWI 遺伝子を持ち、雄だけでなく雌の生殖細胞でも強く発現している。また、卵子に発現する PIWI タンパク質が piRNA と結合していることが確認できたため、卵子で強く発現する PIWI 遺伝子を破壊した遺伝子改変ゴールデンハムスターを作製し解析することで、哺乳動物全般に保存された PIWI-piRNA の機能を明らかにすることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

現在は、ゲノム編集による遺伝子改変動物作製技術が大きく発展しているため、ゴールデンハムスターにも同様の技術を応用し PIWI1 および PIWIL3 欠損ゴールデンハムスターを樹立し、解析を行った。

1) PIWI 欠損ゴールデンハムスターの妊孕性の解析

PIWI 欠損ゴールデンハムスターを交配させ、交尾あたりの妊娠率、出生産仔数を算出することで妊孕性を解析した。

2) PIWI 欠損卵子の解析

卵巣切片による組織学的解析による卵子形成における PIWI 遺伝子の解析、並列型塩基配列解析による卵子 piRNA の配列解析、遺伝子発現解析、DNA メチル化解析を行い PIWI 欠損で変化した生命現象を解析した。

4. 研究成果

PIWIL1 はゴールデンハムスターの雌雄の生殖細胞で強く発現する PIWI 遺伝子である。PIWIL1 を欠損した雄のゴールデンハムスターはマウスと同様に減数分裂後の精細胞が精巣内では観察できず精子が作られず不妊であることが明らかになった。一方でマウスでは表現型がなかった雌においては、交尾しても妊娠せず完全に不妊であることを明らかにした。その詳細を解析すると、見かけ上は正常な卵子が作られ受精するが、2細胞期までしか発生できないことを明らかにした。これらの表現型は PIWIL1 欠損雌と野生型の雄の交配で見られることから、受精後の遺伝子型ではなく卵子の遺伝子型に依存した機能異常であり、卵子で発現する PIWIL1 に依存した表現型であることを明らかにした。加えて、分子レベルでの解析から PIWIL1 を欠損した卵子では piRNA の標的となるトランスポソンを含む多くの遺伝子発現が乱れていることを明らかにした。

PIWIL3 はマウスでは欠損した PIWI 遺伝子であり、雌の生殖細胞で強く発現している。PIWIL3 を欠損した雌のゴールデンハムスターを野生型の雄と交配させると、交尾あたりの妊娠率が4割程度減少し、妊娠が成立し出産した場合でも産仔数が減少することを明らかにした。PIWIL3 を欠損した卵子由来の胚発生を観察したところ、一部は正常に発生するが一部は胚発生を停止するものがあること、さらに一方の割球の発生が停止した3細胞、5細胞胚などの特徴的な異常発生胚が生じることを明らかにした。分子レベルでの異常を解析するために遺伝子発現解析を実施したが、PIWIL3 欠損卵子では遺伝子発現はほぼ変化がないことが明らかにした。そのため、DNA メチル化解析を実施したところ、PIWIL3 欠損卵子ではゲノムワイドな DNA メチル化が減少していることを明らかにした。

これらの結果から、ゴールデンハムスターの雌の生殖細胞で発現する PIWIL1 と PIWIL3 は受精後の胚発生に必須の機能を有していること、PIWIL1 は遺伝子発現、PIWIL3 は DNA メチル化といった異なる作用点で機能していることを明らかにした。これらの研究成果は *Nature Cell Biology* に報告した。同時に、チェコや中国のグループからも piRNA 生合成に関わる他の遺伝子の機能についても報告され、雌の生殖細胞における PIWI-piRNA 経路の重要性、我々の研究成果の正確性が示された。これらの研究成果は、これまでわからなかった雌の生殖細胞における PIWI-piRNA 経路の機能を明らかにした成果が評価され、掲載された雑誌で紹介記事書かれるなど大きなインパクトを与える結果となった。

本研究成果は哺乳動物全般に保存された卵子における PIWI-piRNA 経路の機能を明らかにすることを目的として、それを明らかにすることができたことである。一方で、雌で機能する PIWI-piRNA 経路が無いにもかかわらず正常な胚発生を起こすマウスが存在することも事実である。今後は PIWI 欠損ゴールデンハムスターとその表現型に類似したノックアウトマウスを比較することで、初期胚発生に必要な母性因子や生命現象が明らかにされることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishino Kyoko, Hasuwa Hidetoshi, Yoshimura Jun, Iwasaki Yuka W, Nishihara Hidenori, Seki Naomi M, Hirano Takamasa, Tsuchiya Marie, Ishizaki Hinako, Masuda Harumi, Kuramoto Tae, Saito Kuniaki, Sakakibara Yasubumi, Toyoda Atsushi, Itoh Takehiko, Siomi Mikiko C, Morishita Shinichi, Siomi Haruhiko	4. 巻 49
2. 論文標題 Hamster PIWI proteins bind to piRNAs with stage-specific size variations during oocyte maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2700 ~ 2720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasuwa Hidetoshi, Iwasaki Yuka W., Au Yeung Wan Kin, Ishino Kyoko, Masuda Harumi, Sasaki Hiroyuki, Siomi Haruhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-021-00745-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishino Kyoko, Hasuwa Hidetoshi, Yoshimura Jun, Iwasaki Yuka W, Nishihara Hidenori, Seki Naomi M, Hirano Takamasa, Tsuchiya Marie, Ishizaki Hinako, Masuda Harumi, Kuramoto Tae, Saito Kuniaki, Sakakibara Yasubumi, Toyoda Atsushi, Itoh Takehiko, Siomi Mikiko C, Morishita Shinichi, Siomi Haruhiko	4. 巻 49
2. 論文標題 Hamster PIWI proteins bind to piRNAs with stage-specific size variations during oocyte maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2700 ~ 2720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 運輸英毅
2. 発表標題 新しいヒト疾患モデル動物としての ゲノム編集ゴールデンハムスターの可能性
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 運輸英毅
2. 発表標題 「ゴールデンハムスターを用いることで明らかとなった母性PIWI-piRNA 経路の 必要性
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会「生殖の多様性」(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関