

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249018

研究課題名(和文)生殖細胞特異的小分子RNAの生合成と機能発現

研究課題名(英文)Biogenesis and function of germ cell specific small RNA

研究代表者

仲野 徹(Nakano, Toru)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00172370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞特異的な非コード小分子RNAであるpiRNA(piwi-interacting RNA)の生合成の分子基盤の解析、ならびに、その機能発現についての研究をおこなった。前者としては、ミトコンドリア外膜上の脂質代謝酵素であるGPAT2(glycerol-3-phosphate acyltransferase 2)がpiRNAの産生に必須であること、および、レトロトランスポゾン以外の遺伝子に対するpiRNAを人為的に誘導できることを明らかにした。また、後者については、人為的に誘導したpiRNAにより、生殖細胞にDNAメチル化を生じさせることが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：piRNAs are germ cell specific non-coding small RNAs, which play crucial roles on gene silencing of retrotransposons in embryonic male germ cells. We carried out the analyses on the molecular mechanisms of piRNA biogenesis and the functional properties of the piRNAs, and obtained the following results. First, GPAT2 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 2), a mitochondria outer-membrane protein with the enzymatic activity of lipid metabolism, was essential for the production of piRNAs. Second, piRNA other than retrotransposon-related ones was successfully produced in transgenic mouse model. Third, the artificially introduced non-retrotransposon piRNAs gave rise to DNA methylation and subsequent gene silencing in the male germ cells. These results provide new insights in the characteristics of piRNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードRNA 遺伝子発現 DNAメチル化 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

非コード RNA の多彩な機能が脚光を浴びており、20~30 ヌクレオチド (nt) 長の小分子 RNA も、転写調節や転写後調節において重要な機能を有することが明らかになってきている。小分子 RNA には、miRNA (micro RNA)、siRNA (short interference RNA) および piRNA (piwi-interacting RNA) が存在し、ほ乳類では miRNA と piRNA が主要な小分子 RNA である。しかし、これら二つの小分子 RNA には、サイズ、組織分布、機能、生合成経路などに大きな違いがある。piRNA は、雄性生殖細胞特異的に存在する小分子 RNA であり、我々を含む複数のグループが、2006 年にその存在を報告した。miRNA は、RNA を切断する Dicer 依存的に産生され、その長さが 21~25nt であり、転写後調節に機能する。それに対して、piRNA は Dicer 非依存的に産生され、長さが 26~31nt であり、転写抑制に機能する、など、多くの違いが報告されている。

piRNA の生合成は、一次生成と、MILI (mouse Piwi-like) および MIWI2 (mouse Piwi-2) が寄与する「ping-pong 増幅サイクル」と名付けられた二次生成とにわけることができる。我々は、piRNA に結合するマウス PIWI ファミリータンパクである MILI および MIWI2 について種々の解析をおこない、これらの遺伝子欠損マウスでは、精子形成に異常が生じて不妊になることを見いだした。さらに、これらのマウスでは、piRNA の産生が著しく低下していることも明らかにした。

一方、胎生期の雄性生殖細胞において、レトロトランスポゾン遺伝子の DNA に新たなメチル化が生じる (*de novo* DNA メチル化) ことが知られている。その時期に一致して、レトロトランスポゾン遺伝子に対応する piRNA が大量に存在していること、また、MILI および MIWI2 欠損マウスでは、その piRNA 産生が著しく低下しているだけでなく、レトロトランスポゾン遺伝子の *de novo* DNA メチル化が生じないことも明らかにした。さらに、マウス PIWI ファミリーの機能解析と並行して、生殖細胞特異的な RNA ヘリカーゼである MVH (mouse yasa homologue) の解析もおこない、MVH 欠損マウスにおいても piRNA の生合成経路に異常があり、ping-pong サイクルの最初の段階で piRNA 合成が停止することを明らかにした。

これらの成果は、ほ乳類における piRNA の合成および piRNA の機能について、世界のトップをいく研究として高く評価されており、*Nature* や *Genes & Development* をはじめとする一流誌に発表してきた。本研究では、我々のこれまでの研究成果をさらに展開し、piRNA の生合成過程ならびに piRNA による *de novo* DNA メチル化機構を明らかにしていく。

2. 研究の目的

piRNA の網羅的な解析、および、そのゲノム上での存在領域の解析などから、piRNA の一次生成には、非常に長い一本鎖 RNA である primary transcript が必要であろうと推測されているが、その実体は不明である。また、種々の状況証拠から、piRNA は DNA メチル化を介して遺伝子サイレンシングをおこなうと考えられているが、その分子機構も、現時点においては全く不明である。そこで、下記のような四つの研究テーマを展開することにより、piRNA の合成過程について、特にほとんどわかっていない一次生成過程を中心に解析するとともに、piRNA がどのような分子機構で *de novo* DNA メチル化をもたらすのかを明らかにする。

<人為的 piRNA 産生システムを用いた

de novo DNA メチル化機構の解析 >

piRNA の一次生成は、非常に長い一本鎖 RNA から開始されると推測されているが、その実体は不明であり、分子機構の解析は極めて困難である。この問題点を克服するために、人為的に piRNA 合成を誘導するモデルシステムを構築しつつある。後述のように、このモデルシステムは、センスおよびアンチセンス EGFP 遺伝子を胎生期の雄性生殖細胞において同時に発現させ、EGFP に対する piRNA 合成と、その piRNA を介した EGFP 遺伝子の *de novo* DNA メチル化を誘導するものである。この独創的なシステム (Artificial piRNA of EGFP induction system: APE システム) を用いて、piRNA 合成経路を明らかにする。

また、この方法論が、トランスジーンのみでなく、内在性の遺伝子にも適用できるかどうかを明らかにする。

<GS 細胞 (Germline Stem Cell、生殖幹細胞) を用いた一次生成機構の解析 >

GS 細胞は、精子幹細胞の性質を有したまま培養できる生殖系列の幹細胞である。これまでに、MILI 欠損マウスから GS 細胞を樹立し、解析をおこなってきた。また、MILI 欠損 GS 細胞に MILI を発現させて、その表現型がどのように変化するかについての解析も開始している。これらの予備的研究から、GS 細胞では、piRNA の一次生成のみがおこなわれていること、また、その過程において MILI が重要な役割を果たしていること、がわかってきている。この基礎データを元に、piRNA の一次生成経路を明らかにしていく。

3. 研究の方法

<人為的 piRNA 産生システムを用いた

de novo DNA メチル化機構の解析 >

APE システムを確立するため、DNA の *de novo* メチル化が生じる時期の雄性生殖細胞で特異的に発現する MIWI2 遺伝子のプロモーターによって EGFP のアンチセンス鎖を

発現するトランスジェニックマウスを作成した。このEGFP アンチセンストランスジェニックマウスと、胎生期の雄性生殖細胞においてEGFPを発現するOct4-EGFPトランスジェニックマウスの交配をおこない、ダブルトランスジェニックマウスの作成をおこなった。

このダブルトランスジェニックマウスにおけるEGFPの発現を解析した。また、そのバックグラウンドをpiRNAの産生に異常のあるMILI欠損やMIWI欠損にすることにより、EGFPの発現がどうなるかをしらべた。さらに、EGFPアンチセンストランスジェニックマウスならびにダブルトランスジェニックマウスにおけるpiRNAの網羅的解析や、それぞれにおけるEGFP遺伝子のDNAメチル化状態の解析もおこなった。

内在性の遺伝子に対してもAPEシステムと同様の戦略が適用できるかどうかをしらべるため、胎生期の雄性生殖細胞における*de novo* DNAメチル化に必須なタンパクであるDNMT3L (DNA methyl transferase 3L) の遺伝子のアンチセンス鎖をMiwi2プロモーターの制御下に発現するトランスジェニックマウスを作成した。

EGFPのダブルトランスジェニックマウスの場合と同様、Dnmt3lのプロモーター領域にDNAメチル化が生じているか、Dnmt3lに対応するpiRNAが産生されているか、などの解析をおこなった

<GS細胞 (Germline Stem Cell、生殖幹細胞) を用いた一次生成機構の解析>
MILIを欠損するGS細胞を作成し、そのGS細胞におけるpiRNAの産生を解析した。研究成果の項に記述のとおり、MILI欠損GS細胞では、piRNAの一次産生において大きな異常が認められたため、GS細胞においてMILIと結合するタンパクの探索をおこなった。

MILIと結合するタンパクとして、ミトコンドリアの外膜に存在する、脂質の代謝に関連する酵素活性を持つとされるGPAT2 (Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 2) を同定したので、GS細胞のpiRNA産生におけるGPAT2の機能解析をおこなった。

4. 研究成果

<人為的piRNA産生システムを用いた*de novo* DNAメチル化機構の解析>

Oct4-EGFPトランスジェニックマウスにおいて認められるEGFPの蛍光は、ダブルトランスジェニックでは発現が抑制されていることが明らかになった。この遺伝子発現抑制がpiRNA依存的かどうかを明らかにするため、piRNA産生に異常があるMILIおよびMIWI2欠損状態におけるEGFPの発現を解析した。

その結果、MILIあるいはMIWI2の欠損、すなわち、piRNAの発現に異常がある場合には、ダブルトランスジェニックによる発

現抑制が認められないことが明らかになった。この結果から、胎生期の雄性生殖細胞における、EGFPアンチセンスによる発現抑制はpiRNA依存的であると結論した。また、ダブルトランスジェニックマウスでは、EGFP遺伝子にDNAメチル化が認められることを見いだした。さらに、ダブルトランスジェニックマウスにおいて、EGFPに対応するpiRNAが多数発現していることも明らかにした。

以上のように、EGFPトランスジーンを用いた人為的piRNA誘導システムであるAPEシステムを確立できたため、この方法論が内在性の遺伝子に適用できるかどうかの解析を開始した。

Miwi2プロモーターで制御されるDnmt3lのアンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウスでは、DNMT3L欠損マウスと同様に、パキテ期において雄性生殖細胞がアポトーシスで死滅し、不妊になることが明らかになった。このマウスでは、正常マウスでは認められないDnmt3lに対するpiRNAが大量に存在していた。また、Dnmt3l遺伝子の制御領域において、DNAメチル化が顕著に増加していた。この結果から、胎生期の雄性生殖細胞において発現している遺伝子であれば、人為的piRNA産生ならびに、piRNAに起因する遺伝子発現抑制が可能であることを明らかにできた。

<GS細胞 (Germline Stem Cell、生殖幹細胞) を用いた一次生成機構の解析>
MILIを欠損するGS細胞を作成したところ、piRNAの産生が顕著に低下していることが明らかとなった。この実験系を確立するため、レンチウイルスやセンダイウイルスを用いて、MILI欠損GS細胞においてMILIの発現を回復させ、piRNA産生が正常化することを確認した。

GS細胞においてMILIがpiRNA産生に必須であることが明らかになったので、MILIと結合するタンパクの探索をおこない、GPAT2を同定することができた。GPAT2がMILIと結合するだけでなく、piRNAの産生に関与しているかどうかを明らかにするため、GS細胞においてGPAT2のノックダウンをおこなったところ、piRNAの一次産生に異常が生じることがわかった。以上から、GPAT2もpiRNAの一次産生に関与するタンパクであることが明らかになった。

GPAT2は脂質の代謝に関与する酵素活性を有するとされているので、その酵素活性が必要かどうかについて、酵素活性を欠損するGPAT2を作成して解析をおこなった。その結果、GPAT2の酵素活性はpiRNA産生には不要であること、すなわち、GPAT2は、おそらく、ミトコンドリアの外膜上で、MILIをはじめとするpiRNA産生に必要なタンパクのアンカーとして機能するであろうことがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 17 件）

1. Liu YJ, Nakamura T, Nakano T.
Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis.
Biol Rep, 86:1-8, 2012
2. Ohishi K, Nakano T.
A forward genetic screen to study mammalian RNA interference - essential role of RNase IIIa domain of Dicer1 in 3' strand cleavage of dsRNA in vivo.
FEBS J, 279:832-43, 2012
3. Nakamura T, Liu YU, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T.
PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos
Nature, 486: 415-9, 2012
4. Nishibu T, Hayashida Y, Tani S, Kurono S, Kojima-Kita K, Ukekawa R, Kurokawa T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Inoue K, Honda S. .
Identification for MIWI-associated poly(A) RNAs by immunoprecipitation with an anti-MIWI monoclonal antibody
Bioscience Trends, 6:248-261, 2012
5. Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki SO, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, Suzuki A.
Cancer susceptibility and embryonic lethality in *Mob^{1a/1b}* double-mutant mice
J Clin Inv, 122:4505-4518, 2012
6. Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Ito D, Kimura T, Nakano T.
GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells
RNA, 19:803-810, 2013
7. Yamamoto Y, Watanabe T, Hoki Y, Shirane K, Li Y, Ichiiyanagi K, Kuramochi-Miyagawa S, Toyoda A, Fujiyama A, Oginuma M, Suzuki H, Sado T, Nakano T, Sasaki H.
Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus.
Genome Res. 2013
8. Nakashima H, Kimura T, Kaga Y, Nakatani T, Seki Y, Nakamura T, Nakano T.
Effects of Dppa3 on DNA methylation dynamics during primordial germ cell development
Biol Rep, 88:1-9, (Journal Cover) 2013
9. Chuma S, Nakano T.
piRNA and spermatogenesis in mice
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 368:20110338, 2013
10. Kuramochi-Miyagawa S, Kita-Kojima K, Shiromoto Y, Ito D, Koshima H, Nakano T.
DNA methylation in mouse testes
Methods Mol Biol. 1093:97-109, 2014
11. Kimura T, Kaga Y, Ohta H, Odamoto M, Sekita Y, Li K, Yamano N, Fujiwara K, Isotani A, Sasaki N, Toyoda M, Hayashi K, Okabe M, Shinohara T, Saitou M, Nakano T.
Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition
Stem Cells, 32:2668-78, 2014
12. Ichiiyanagi T, Ichiiyanagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Udono H.
HSP90a plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse
Nucl Acid Res, 42: 11903-11, 2014
13. Funaki S, Nakamura T, Nakatani T, Umehara H, Nakashima H, Nakano T.
Inhibition of maintenance DNA methylation by Stella
BBRC, 453: 455-60, 2014
14. Matsui Y, Takehara A, Tokitake Y, Ikeda M, Obara Y, Morita-Fujimura Y, Kimura T, Nakano T.
The majority of early PGCs acquire pluripotency by AKT activation.
Development, 141: 1-11, 2014
15. Kimura T, Kaga Y, Sekita Y, Fujiwara K, Nakatani T, Odamoto M, Funaki S, Ikawa M, Abe K, Nakano T.
Pluripotent stem cells derived from mouse primordial germ cells by small molecule compounds
Stem Cells, 33:45-55, 2015
16. Ito D, Shiromoto Y, Shin-ya Y, Ishii C, Nishimura T, Ogonuki N, Ogura A, Kuramochi-Miyagawa, Nakano T.
Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells.
Current Biol, 25: 901-906, 2015
17. Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda M, Nakashima H, Hori M, Sekita Y, Arakawa T, Nakamura T, Nakano T.
Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced γ H2AX accumulation.
EMBO Rep, 16:582-589, 2015

〔学会発表〕(計9件)

1. DNA methylation in development and transformation
Toru Nakano
The 22nd HCS and The 4th JARI Joint International Symposium, Aug 2012, Hiroshima, Japan
2. DNA methylation in development and transformation
Toru Nakano
Japan Cancer Association, Sept 2012, Osaka, Japan
3. piRNA and spermatogenesis
Toru Nakano
International Congress of Andrology 2013, Feb 2013, Melbourne, Australia
4. DNAメチル化と発生・発がん
仲野 徹
日本病理学会シンポジウム、平成25年6月、東京
5. Artificial induction of germ cell specific gene silencing through piRNA pathway
The 8th Annual Conference of Asia Epigenome Alliance, Nov 2013, Taipei, Taiwan
6. Artificial induction of germ cell specific gene silencing through piRNA pathway
Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013, Nov 2013, Tokyo, Japan
7. PIWI-interacting RNA and gene silencing in male germ cells, JST PREST International Symposium : Small RNAs in mammals, Feb 2014, Tokyo, Japan
8. piRNA biosynthesis and gene silencing, The 7th Asia Pacific Organization Congress and Asian Society of Cell Biology Workshop, Feb 2014, Singapore
9. Gene silencing of male germ cells by piRNA
Annual meeting of Society for the Study of Reproduction, Symposium, July 2014, Grand Rapids, USA

〔図書〕(計1件)

『エピジェネティクス - 新しい生命像をさぐる』 仲野 徹 岩波新書 2014

〔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

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/nakano/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲野 徹 (NAKANO Toru)

大阪大学大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：00172370

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし