

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370074

研究課題名(和文) マウス piRNA の生合成経路の解明

研究課題名(英文) piRNA biogenesis pathway in mouse spermatogenesis

研究代表者

宮川 さとみ (Miyagawa, Satomi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師(常勤)

研究者番号：90291153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内には小さなRNA(小分子RNA)が数多く存在し、遺伝子やタンパクの発現を調節している。piRNA (PIWI interacting RNA) は、生殖系列の細胞で発現している25～31塩基の小分子RNAであり、ゲノム上の繰り返し配列(レトロトランスポゾン遺伝子)の発現を抑制している。本研究では、遺伝子改変マウスやマウスの精巣由来の細胞株を用いて、ミトコンドリアの外膜に存在するGPAT2タンパクや、MVH (mouse VASA homologue) と呼ばれるタンパクの酵素活性が、piRNAの生合成や精子形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：piRNA (PIWI interacting RNA) is a germ cell-specific small RNA in whose biogenesis PIWI (P element wimpy testis) family proteins play crucial roles. MILI (mouse Piwi like), one of the mouse PIWI family members, is indispensable for the piRNA production, DNA methylation of retrotransposons through the piRNA, and spermatogenesis. To analyze the molecular function of MILI in piRNA biogenesis, we utilized germline stem cells (GS cells), which are derived from testicular stem cells and possess spermatogonial phenotype. We found that glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (GPAT2), a mitochondrial outer membrane protein for lysophosphatidic acid, bound to MILI and that gene knockdown of GPAT2 brought about the impaired piRNA production in GS cells. GPAT2 is not only one of the MILI bound proteins but also a protein essential for the primary piRNA biogenesis. In addition, MVH (mouse vasa homologues) helicase activity is also indispensable for piRNA production and spermatogenesis.

研究分野：発生分子生物学

キーワード：piRNA 小分子RNA 精子形成 レトロトランスポゾン ミトコンドリア 生殖顆粒

1. 研究開始当初の背景

piRNA (PIWI interacting RNA) は、siRNA (small interfering RNA) や miRNA (micro RNA) よりもサイズが長い 25~31 塩基の小分子 RNA である。piRNA は、その産生に PIWI ファミリータンパクが機能すること、生殖系列の細胞で発現すること、PIWI ファミリー分子とともにレトロトランスポゾン遺伝子の発現抑制に深く関与すること、などが知られている。欠損マウスの解析から、MILI (mouse PIWI like) や MIWI2 (mouse PIWI 2) が piRNA の生合成や維持に必要であること、また、制御領域における DNA のメチル化を介したレトロトランスポゾンの抑制にも piRNA が必須であることを明らかにしてきた (Kuramochi-Miyagawa et al. Genes & Dev. 22, 908-917. 2008)。

piRNA の生合成過程は 1 次生成と 2 次生成から成りたっており、1 次生成には MILI が、2 次生成には MILI と MIWI2 が関与していると考えられている。我々は、生殖細胞特異的に発現している RNA ヘリカーゼ MVH (mouse VASA homologue) が piRNA の 2 次生成過程の初期に関与することも明らかにした (Kuramochi-Miyagawa et al. Genes & Dev. 23, 887-892. 2010)。

一方、精巢性幹細胞に相当する細胞株 GS (germline stem) 細胞を MILI 欠損マウスの精巢から樹立している。さらに、その MILI 欠損 GS 細胞に *Mili* 遺伝子を導入し MILI の発現を回復させた『MILI 回復 GS 細胞』が piRNA 合成過程の解析に有用であると考え、研究を進めている。これまでの解析により、MILI 回復 GS 細胞では、piRNA の産生が亢進していること、そして、その piRNA 産生には ping-pong サイクルは関与しておらず、1 次生成によってのみおこなわれていること、がわかってきている。

2. 研究の目的

(1) piRNA 生合成過程の解析: piRNA の生合成過程は 1 次生成と 2 次生成が並存するため、ある分子が 1 次生成と 2 次生成のそれぞれにどの程度関与しているかを解析するのは非常に困難である。しかし、これまでの予備的解析により、MILI 回復 GS 細胞においては、2 次生成がおこなわれていないこと、さらに、piRNA の産生が野生型よりも亢進していることから、この細胞は、1 次生成の分子機構を解析するために最適の系であることがわかってきた。そこで、本研究では、MILI 回復 GS 細胞を用いて、1 次生成に関与する分子の同定をおこない、その分子メカニズムを明らかにする。

(2) MVH の分子機能解析: MVH 欠損マウスの解析から、MVH は piRNA の 2 次生成の初期に重要であること、piRNA 合成の「場」と考えられている pi-body と呼ばれる生殖顆粒の形成に必須であることを明らかにしてきた。MVH はヘリカーゼドメインを有して

いるが、piRNA 産生、および pi-body の構築にヘリカーゼ活性が必要かどうかは不明である。そこで、ヘリカーゼ活性のない MVH (MVH helicase dead = MVH-HD) を発現するマウスを作製し、MVH の機能構造連関を明らかにする。

3. 研究の方法

哺乳類における piRNA 生合成過程を明らかにするため、MILI と MVH の分子機能について、マウス GS 細胞や遺伝子改変マウスを用いた研究を展開する。

(1) piRNA 生合成過程の解析: 『MILI 回復 GS 細胞』では、レトロトランスポゾンの発現抑制は回復しなかったが、piRNA 生成が亢進し、さらにその piRNA は 1 次生成のみで産生されていることが明らかとなった。この細胞を用いて、生化学的なアッセイをおこない、MILI の 1 次生成における機能を解析する。また、MILI 抗体や FLAG-tag 抗体を用いて、MILI 結合タンパク質を同定し、MILI を介する piRNA 生合成過程を明らかにする。

(2) MVH の分子機能解析: ヘリカーゼ活性のない MVH (MVH-HD) を MILI プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックマウスを作製し、MVH-KO マウスと交配し、MVH-HD のみを発現するマウス作製し、MVH がどのような分子機構で piRNA 産生に寄与しているかを明らかにする。さらに、MVH 欠損マウスや MVH 変異マウス由来の GS 細胞を樹立して、1 次生成過程における MVH の機能や、ヘリカーゼとしての MVH の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1-1) GS 細胞を用いた piRNA 生合成過程の解析:

これまでに、GS 細胞が piRNA の 1 次生成分子機構の解析にきわめて有用なツールであることを見い出していた。そこで、MILI と協調して piRNA の 1 次生成に関与する因子を同定するため、GS 細胞における MILI 結合タンパクの探索をおこなった。その結果、グリセロール-3-リン酸にアシル基を付加し、リゾホスファチジン酸を産生するミトコンドリア膜酵素である GPAT2 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 2) を同定することができた。MILI 回復 GS 細胞において GPAT2 をノックダウンしたところ、piRNA の 1 次生成が著しく障害されていた。さらに、アシル基転移活性ドメインに変異を導入した GPAT2 を、GPAT2 ノックダウン GS 細胞に導入したところ、変異体においても MILI 結合 piRNA が産生されていた (Fig1)。すなわち、GPAT2 の酵素活性は piRNA 産生と無関係であるといえる。以上の結果から、MILI 結合タンパクである GPAT2 が piRNA の 1 次生成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

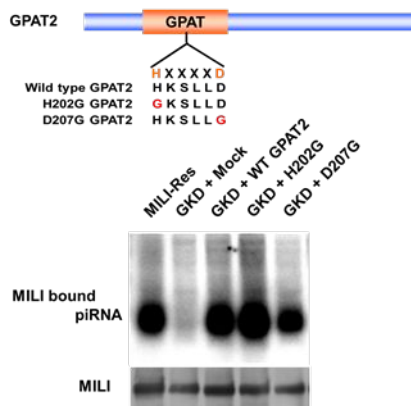


Fig1 :GPAT2 の酵素活性は piRNA 産生に必要な: GPAT ドメインの HXXXXD モチーフのアミノ酸残基の変異体を作成し、GPAT2 ノックダウン GS 細胞に発現させた。MILI 結合 piRNA の解析をおこなったところ、変異体においても野生型の GPAT2 と同様に MILI 結合 piRNA が確認された。

(1-2) GPAT2 ノックアウトマウスの解析:

生体内における GPAT2 の役割を明らかにするために、GPAT2 ノックアウト (GPAT2-KO) マウスを作製し、解析をおこなってきた。GPAT2-KO マウスの胎仔期精巣における小分子 RNA の解析を deep シークエンスによって解析した結果、piRNA はほとんど産生されておらず、MILI-KO マウスと比較しても低レベルであった。このことから、GPAT2 は piRNA の産生には不可欠の分子であることが、KO マウスを用いた結果からも明らかになった。さらに、生後の精巣においては、精子形成初期にアポトーシスが生じており不妊になることが明らかになった。

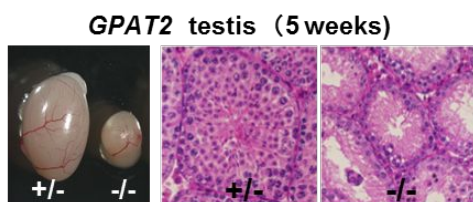


Fig2 :GPAT2 マウス(5W)の精巣と HE 染色像

(2) MVH の変異体マウスを用いた piRNA 生合成過程と MVH の分子機能解析:

生殖細胞特異的に発現する RNA ヘリカーゼである MVH は、piRNA の生合成に重要な役割を果たしている。今回、ヘリカーゼ活性に必要なアミノ酸の置換によりヘリカーゼ活性 Null の変異体 (MVH-HD) に、FLAG-tag を付加した Tg マウスを作製した。このマウスを MVH 欠損マウスに交配して、MVH-HD のみを発現するマウスを作製して解析をおこなった。その結果、レトロトランスポゾン LINE1 や IAP の配列をもつ 1 次生成 piRNA は KO と比較して増加していたが、2 次生成 piRNA は KO マウスと同様に低下していた。

一方、MVH-KO マウスで認められた生殖顆粒の消失は MVH-HD マウスではみとめられず、正常であった。以上のことから、これまで報告してきた piRNA 生合成における MVH の 2 つの役割、piRNA の合成の場である生殖顆粒形成に重要、2 次生成 piRNA の合成に重要、のうち、MVH のヘリカーゼ活性は、2 次生成の産生には必要であるが、生殖顆粒形成には必要ないことが明らかとなった。この結果は、MVH 欠損マウスでは不明であった、MVH の 2 つの機能を、ヘリカーゼ活性の有無で分けることができた点で重要な結果であるといえる。

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 10 件)

1. Comprehensive DNA Methylation Analysis of Retrotransposons in Male Germ Cells.

Nagamori I, Kobayashi H, Shiromoto Y, Nishimura T, Kuramochi-Miyagawa S, Kono T, *Nakano T.

Cell Rep. 2015 Sep 8;12(10):1541-1547.

2. Reply to Shoji and Katsuma.

*Kuramochi-Miyagawa S, *Nakano T.

Curr Biol. 2015 Aug 17;25(16):R710.

3. piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals.

*Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T, *Tomonaga K.

RNA. 2015 Oct;21(10):1691-1703.

4. Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells.

Itou D, Shiromoto Y, Yukiho SY, Ishii C, Nishimura T, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Fujihara Y, *Kuramochi-Miyagawa S, *Nakano T.

Curr Biol. 2015 Mar 30;25(7):901-6.

5. HSP90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse.

Ichiyanagi T, Ichiyanagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, *Udono H.

Nucleic Acids Res. 2014 Oct 29;42(19):11903-11911.

6. DNA methylation in mouse testes.

*Kuramochi-Miyagawa S, Kita-Kojima K, Shiromoto Y, Ito D, Koshima H, Nakano T.

Methods Mol Biol. 2014 :1093, p97-109

7. The nuage mediates retrotransposon

silencing in mouse primordial ovarian follicles.

*Lim AK, Lorthongpanich C, Chew TG, Tan CW, Shue YT, Balu S, Gounko N, Kuramochi-Miyagawa S, Matzuk MM, Chuma S, Messerschmidt DM, Solter D, *Knowles BB.

Development. 2013 ;140 (18):3819-25.

8. GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cell.

Shiromoto Y, *Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Itou D, Kimura T, and *Nakano T.

RNA. 2013 Jun;19(6):803-10. 19: 1-8.

9. Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus.

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.

Genome Res. 2013 Feb;23(2):292-299.

10. Identification of MIWI-associated Poly(A) RNAs by immunoprecipitation with an anti-MIWI monoclonal antibody Nishibu T, Hayashida Y, Tani S, Kurono S, Kojima-Kita K, Ukekawa R, Kurokawa T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Inoue K, *Honda S.

BioScience Trends. 2012 Oct;6(5):248-61.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 有性生殖細胞における人為的 piRNA を介した DNA メチル化の誘導 (ポスター)

宮川さとみ, 伊藤大介, 城本悠助, 仲野徹
第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2015.5.25 東京 一ツ橋学術総合センター)

2. 有性生殖細胞における人為的 piRNA を介した DNA メチル化の誘導 (口頭)

伊藤大介, 城本悠助, 宮川さとみ, 仲野徹
生殖エピゲノム若手勉強会 2014 (2014.7.16-18 ウィンク愛知)

3. 有性生殖細胞における人為的 piRNA を介した DNA メチル化の誘導 (口頭)

伊藤大介, 城本悠助, 宮川さとみ, 仲野徹
第 16 回日本 RNA 学会年会 (2014.7.23-25 茨城 つくばグランドホテル)

4. ミトコンドリア外膜タンパク GPAT2 の piRNA 産生における機能 (ポスター)

城本悠助, 宮川さとみ, 仲野徹,
第 36 回日本分子生物学会 (2013.12.3 神戸)

5. MVH ヘリカーゼ活性は LINE-1 レトロトランスポゾンの抑制に必須である (ポスター)

伊藤大介, 宮川さとみ, 仲野徹

第 36 回日本分子生物学会 (2013.12.3 神戸)
6. 雄性生殖細胞における piRNA 依存的遺伝子サイレンシングの人為的誘導 (ポスター)

新屋幸穂, 伊藤大介, 宮川さとみ, 仲野徹

第 36 回日本分子生物学会 (2013.12.3 神戸)
7. 人為的 piRNA 産生を介した DNA メチル化の操作

伊藤大介, 宮川さとみ, 城本悠助, 仲野徹
第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2013.5.31 奈良)

8. マウス精巣における人為的 piRNA 産生を介した DNA メチル化制御 (ポスター)

伊藤大介, 宮川さとみ, 城本悠助, 仲野徹
第 35 回日本分子生物学会年会 (2012.12.14 福岡市 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

9. De novo DNA methylation by artificially produced piRNA in murine testis (ポスター)

Daisuke Itou, Yusuke Shiromoto, Satomi Kuramochi-Miyagawa, and Toru Nakano.

Epigenetics and Chromatin in Cold Spring Harbor Laboratory meeting (2012.9.12 Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA)

10. GPAT2, a mitochondrial acyltransferase, in piRNA biogenesis in germline stem cells. (ポスター)

Yusuke Shiromoto, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Akito Daiba, Shinichiro Chuma,

Ami Katanaya, Akiko Katsumata, Ken Nishimura, Shota Nakamura, Teruo

Yasunaga and Toru Nakano
REGULATORY & NON-CODING RNAs in

Cold Spring Harbor Laboratory meeting (2012.8.30 Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA)

11. 精子幹細胞を用いた piRNA 産生機構の解析 (口頭)

城本悠助, 宮川さとみ, 他 4 名
特定領域生殖サイクル若手勉強会 (2012.7.25 宮城県仙台市 秋保リゾート ホテルク

レセント)

12. 精子幹細胞を用いた piRNA 産生機構の解析 (ポスター)

城本悠助, 宮川さとみ, 他 6 名
NGS 現場の会 第二回研究会 (2012.5.24 大

阪府吹田市ホテル阪急エキスポパーク)

13. マウス精巣における piRNA を介した配列特異的な DNA メチル化誘導システム (ポスター)

伊藤大介, 宮川さとみ, 城本悠助, 仲野徹

第 6 回 日本エピジェネティクス研究会年会 (2012.5.15 東京 一ツ橋学術総合センター)

〔図書〕(計 1 件)

1. 哺乳動物における piRNA 経路を介した人為的エピゲノム制御

宮川さとみ
細胞工学 2015 Vol.34 No.9 p857-861

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

宮川 さとみ (MIYAGAWA SATOMI)

大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：90291153

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし