

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062004

研究課題名（和文）マウス生殖系列細胞における生殖顆粒構造の分子機能解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of germinal granules/nuage in the mouse germline

研究代表者 中辻 憲夫 (NORIO NAKATSUJI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：80237312

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、遺伝学、遺伝子、動物、バイオテクノロジー

1. 研究計画の概要

生殖細胞はゲノム情報を次世代に伝達し、個体発生の起点となる細胞系譜である。その発生分化プロセスではゲノム再プログラム化、個体発生能の獲得維持、DNA 組換え等重要な生命現象が起こる。一方、生殖細胞に顕著に観察される構造的特徴に生殖顆粒 RNP が挙げられる。同構造は世代、種を越えて広く生殖細胞に観察される事から生殖系列の特性に重要な役割を担うと考えられる。しかし生殖顆粒の機能研究は特に哺乳類において殆ど進んでいない。研究代表者らは哺乳類生殖顆粒の構成蛋白質群をコードする *Tdrd* 遺伝子ファミリーの同定、遺伝子改変マウス作成、表現型解析を行い、生殖顆粒の形成異常を示す複数の変異マウスを得た。本研究計画はこれら生殖顆粒の変異系統を実験材料の基盤として包括的なオミクス解析を重点に進め、生殖顆粒の生成異常に伴う細胞内の分子経路の特異的変動の解明を目指す。生殖顆粒の分子レベルでの機能研究を発展、展開する事で、同構造が担う重要な生物学的機能を明らかにすると共に、生体内に存在する新たな分子システムの同定を目指す。

2. 研究の進捗状況

マウス生殖顆粒の特異的な構成分子をコードする *tudor* 関連 *Tdrd* 遺伝子群の機能解析を進めた。*Tdrd1*、6、7、9ノックアウトマウスを作製した所、これら遺伝子のホモ欠損個体はいずれも雄生殖細胞の分化過程に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1、9 はマウス *piwi* ファミリー MILI、MIWI2 と相互作用し、胎仔期前精原細胞において piRNA 生合成経路を介してレトロトランスポゾン *LINE-1* の RNA、エピゲノムレベルでの抑制成立に機能する事が明らかとなった。

精原幹細胞での *LINE-1* 制御の破綻は減数分裂期で同レトロトランスポゾンの過剰発現を招き、ゲノム DNA 障害等による広範な細胞死を誘起する。一方、TDRD6、7 は精子細胞の半数体成熟過程で働く。両遺伝子改変マウスは共に chromatoid body の形成不全が観察されるが、この内 *Tdrd7* 遺伝子改変マウスは chromatoid body と体細胞でも保存される processing body の RNP 融合がブロックされる事が分かった。雄生殖細胞の発生分化を通じて様々な RNP 複合体の消長を詳細に調べた結果、初期 chromatoid body は inter-mitochondrial cement とほぼ同じ分子構成に加えて stress granule に対応する構成蛋白質群を持ち、減数分裂の過程で processing body と RNP 融合を行い、更に精子形成期に aggresome に相似する特性を示す事が明らかとなった。*Tdrd6* 遺伝子改変マウスではこの aggresome に相当する時期に chromatoid body の形態異常が起こる。更に *Tdrd6*、*Tdrd7* のダブルノックアウト実験により両 *Tdrd* メンバーが協調して初期 chromatoid body の成立に必須である事が明らかとなった。即ち、*Tdrd6/Tdrd7* ダブルノックアウト、*Tdrd7* ノックアウト、*Tdrd6* ノックアウトの順に発生段階を追って chromatoid body に異なった異常をこれらの結果から *Tdrd* 遺伝子群がマウス生殖顆粒の master regulators である事が明らかになると共に、雄生殖細胞の様々な分化段階で生殖顆粒に異常を示す一連の貴重な変異個体群を得る事が出来た。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。当初計画では研究期間の前半で (1) 哺乳類 *tudor* 遺伝

子群の遺伝学的解析を進め、(2) その結果と材料を基に生殖顆粒の包括的な蛋白質、RNAの解析、を展開するものとした。現在(1)は完了し、主な研究は生殖顆粒に異常を示す変異系統の網羅的なオミクス、パスウェイ解析へ移行し当初の計画に沿って進行している。

4. 今後の研究の推進方策

生殖顆粒は生殖細胞の細胞質に特徴的に観察される機能未解明の蛋白質-RNA複合体である。本計画研究では研究代表者らが作出した生殖顆粒に異常を示す遺伝子改変マウス系統群を用いて、生殖細胞の発生分化過程を通じた包括的なプロテオーム、トランスクリプトーム解析を行い、生殖顆粒の異常に伴って特異的に変動する細胞内の分子経路を同定する。得られたパスウェイについて特に RNA、蛋白質制御に関する因子に焦点を絞り、個体レベルの遺伝学的解析から分子生物学、生化学的アプローチを用いて生殖顆粒が生殖細胞で担う特異的な機能を明らかにすると共に、生殖細胞内に存在する新たな分子システムの同定を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 17 件)

(1) Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, and Nakano T: MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev.* 2010, 24, 887-892.

(2) Reuter, M, Chuma, S, Tanaka, T, Franz, T, Stark, A, and Pillai, RS: Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009, 16, 639-646.

(3) Shoji, M, Tanaka, T, Hosokawa, M, Reuter, M, Stark, A, Kato, Y, Kondoh, G, Okawa, K, Chujo, T, Suzuki, T, Hata, K, Martin, SL, Noce, T, Kuramochi-Miyagawa, S, Nakano, T, Sasaki, H, Pillai, RS, Nakatsuji, N, and Chuma, S: The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev. Cell.* 2009, 17, 775-787.

(4) Vagin, VV, Wohlschlegel, J, Qu, J,

Jonsson, Z, Huang, X, Chuma, S, Girard, A, Sachidanandam, R, Hannon, GJ, and Aravin, AA: Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev.* 2009, 23, 1749-1762.

(5) Kanatsu-Shinohara, M, Takehashi, M, Takashima, S, Lee, J, Morimoto, H, Chuma, S, Raducanu, A, Nakatsuji, N, Fässler, R, and Shinohara, T: Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell.* 2008, 3, 533-542.

(全て査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

(1) Takashi Tanaka, Mihoko Hosokawa, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma: The roles of tudor genes in mammalian spermatogenesis. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009.12.9-12 横浜)

(2) Shinichiro Chuma: Ultrastructural characteristic of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline. 15th European testis workshop with NAFA annual meeting (2008.5.2-6 Naantali, Finland)

(3) Shinichiro Chuma: Protein and RNA assembly of germinal granules/nuage in the germline. World Congress on Reproductive Biology (2008.5.24-25 Hawaii, USA)

(4) Shinichiro Chuma: Mammalian germ cells and germinal granules/nuage. Germ cell-soma interactions in gonadal development and germ cell tumors (workshops "current trends in biomedicine") (2008.10.20-22, Baeza, Spain)

(5) Shoji, M, Tanaka, T, Hosokawa, M, Kitamura, K, Kato, Y, Kondoh, G, Okawa, K, Chujo, T, Suzuki, T, Hata, K, Kuramochi-Miyagawa, S, Nakano, T, Sasaki, H, Chuma, S, Nakatsuji, N: Role of TDRD9 in male meiosis and regulatory pathway of transposon RNA and DNA methylation. Germ Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (2008.10.1-5 Cold spring harbor, USA)