

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 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

研究成果の概要（和文）：200 字

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。本研究計画ではマウス生殖顆粒の構成分子の解析を進め TDRD1、9 は MILI、MIWI2 と相互作用し精原細胞で piRNA 経路を介してレトロトランスポゾンを抑制する事、TDRD6、7 は精子細胞の成熟と chromatoid body の RNP リモデリングに重要である事を明らかにすると共に tudor-piwi 経路の新たな構成分子の同定、解析を進めた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed tudor-domain containing genes, which encode for specific components of mammalian germinal granules. TDRD1 and TDRD9 cooperate with MILI and MIWI2 and function in retrotransposon silencing at RNA and epigenetic levels. Tdrd6 and 7 act in haploid spermiogenesis and establish chromatoid body architecture, which share common properties with processing bodies and stress granules. We also identified novel molecules that associate with the tudor-piwi pathway and analyzed their function in detail.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	20,000,000	0	20,000,000
2009 年度	20,000,000	0	20,000,000
2010 年度	20,000,000	0	20,000,000
2011 年度	20,000,000	0	20,000,000
2012 年度	20,000,000	0	20,000,000
総計	100,000,000	0	100,000,000

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. 研究開始当初の背景

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こと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。生殖顆粒はショウジョウバエ、線虫、両生類の予定生殖細胞では運命決定に関わる母性因子の蓄積、非対称分配の場として働くと考えられている。一方、哺乳類において生殖顆粒が明瞭に観察される雌雄生殖細胞では分化の方向が定まっており、同構造が担う機能は上述の動物種の初期発生で見られる非対称分配とは異なるものと考えられる。哺乳類生殖顆粒は長く機能未解明の構造であったが、近年 RNA を介した遺伝子発現制御の関連が示唆されて以来、国内外の多くの研究者の関心を集めている。本研究ではマウス生殖顆粒の包括的な分子レベルでのアプローチにより同構造の機能特性を明らかにすると共に、核、ミトコンドリア等生殖顆粒と密接に関連する他の細胞内コンパートメントとのクロストークや高次複合体の解析を通じて特異的な蛋白質、RNA 制御の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

本計画研究は研究代表者らの得たマウス生殖顆粒の分子プローブと変異個体を実験材料、手法の基盤として哺乳類生殖顆粒の分子機能解析を展開する事を目的とする。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。具体的には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ていることから、本研究で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トランスクリプトーム、プロテオーム解析を重点に進め、生殖顆粒の生成異常/*Tdrd* 遺伝子ファミリー機能欠損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。

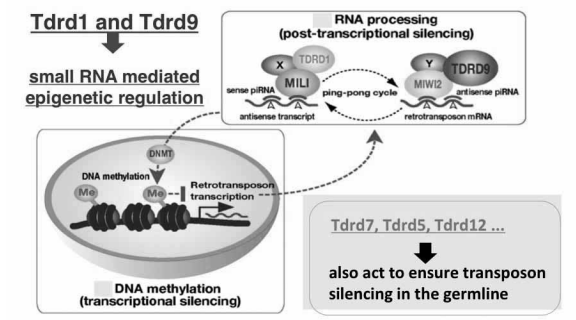
## 3. 研究の方法

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。具体的には各種 *Tdrd* 遺伝子改変マウスの内、inter-mitochondrial cement 変異個体の分子変動、chromatoid body 変異個体の分子変動、tudor-piwi 経路変異体の卵子細胞における分子応答、について詳細な遺伝学的機能の解析、生化学的活性の検出、マルチオミクス解析を進める。

#### 4. 研究成果

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。纏めると生殖顆粒の構成分子の解析を進め、TDRD1、9 は MILI、MIWI2 と相互作用し（前）精原細胞で piRNA 経路を介してレトロトランスポゾンを抑制する事、TDRD6、7 は精子細胞の成熟と chromatoid body の RNP リモデリングに重要であることを示した。また tudor-piwi 経路の新たな構成分子群を同定すると共に、遺伝学的、生化学的、マルチオミクス解析等によりその詳細な機能解析を進めた。



#### 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 24 件)  
全て査読有り

1 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, \*Nakano T. GPAT2, a Mitochondrial Acyltransferase, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells. RNA 19: 803-810

- (2013)
- 2 \*Chuma S, \*Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (in press)
- 3 Xiol J, Cora E, Kogelgruber R, Chuma S, Subramanian S, Hosokawa M, Reuter M, Yang Z, Berninger P, Palencia A, Benes V, Penninger J, Sachidanandam R, \*Pillai RS. A Role for Fkbp6 and the Chaperone Machinery in piRNA Amplification and Transposon Silencing. *Mol Cell* 47: 970-979 (2012)
- 4 \*Pillai RS, \*Chuma S. piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Dev Growth Differ* 54: 78-92 (2012)
- 5 Morozumi Y, Ino R, Takaku M, Hosokawa M, Chuma S, \*Kurumizaka H. Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMC1-mediated homologous pairing. *Nucleic Acids Res* 40: 3031-3041 (2012)
- 6 Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, Antony C, Sachidanandam R, \*Pillai RS. MIWI catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* 480: 264-267 (2011)
- 7 Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, Kitamura K, Yamanaka H, Kondoh G, Okawa K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sachidanandam R, Hannon GJ, Pillai RS, Nakatsuji N, \*Chuma S. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 10579-10584 (2011)
- 8 \*Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce T, Nakano T, Nakatsuji N, Lin H, \*Sasaki H. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell* 20: 364-375 (2011)
- 9 Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, \*Saitou M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *J Cell Biol* 192: 781-795 (2011)
- 10 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, \*Nakano T. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev* 24: 887-892 (2010)
- 11 Yamaji M, Tanaka T, Shigeta M, Chuma S, Saga Y, \*Saitou M. Functional reconstruction of NANOS3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of NANOS3. *Reproduction* 139: 381-393 (2010)
- 12 \*Chuma S, Pillai RS. Retrotransposon silencing by piRNAs: ping-pong players mark their sub-cellular boundaries. *PLoS Genet* 5: e1000770 (2009)
- 13 Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Takehashi M, \*Shinohara T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem

cells. PLoS One 4: e7909 (2009)

14 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, \*Chuma S. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. Dev Cell 17: 775-787 (2009)

15 Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, Tanaka T, Nakatsuji N, Kimura T, \*Nakano T. Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. Genes Cells 14: 1155-1165 (2009)

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

17 Reuter M, Chuma S, Tanaka T, Franz T, Stark A, \*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 16: 639-646 (2009)

18 Yamauchi K, Hasegawa K, Chuma S, Nakatsuji N, \*Suemori H. In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells. PLoS One 4: e5338 (2009)

19 Wang J, Saxe JP, Tanaka T, Chuma S,

\*Lin H. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. Curr Biol 19: 640-644 (2009)

20 Takashima S, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Okano M, Hata K, Suetake I, Nakatsuji N, Miyoshi H, Tajima S, Tanaka Y, Toyokuni S, Sasaki H, Kanatsu-Shinohara M, \*Shinohara T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. Biol Reprod 81: 155-164 (2009)

21 \*Chuma S, Hosokawa M, Tanaka T, Nakatsuji N. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. Mol Cell Endocrinol 306: 17-23 (2009)

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

23 Kanatsu-Shinohara M, Kato M, Takehashi M, Morimoto H, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Hirabayashi M, \*Shinohara T. Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. Biol Reprod 79: 1121-1128 (2008)

24 Kanatsu-Shinohara M, Muneto T, Lee J, Takenaka M, Chuma S, Nakatsuji N, Horiuchi T, \*Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from

hamster testes. Biol Reprod 78: 611-617  
(2008)

〔学会発表〕（計 5 件）

1 Chuma S. piRNAs in the testis: mammalian tudor genes and germinal granules. International Congress of Andrology, Australia, February, 2013

2 Chuma S. Mammalian tudor related genes in the male germline. 44th meeting of society for the study of reproduction, Portland, USA, July, 2011

3 Chuma S. Germline tudor genes, germinal granules and spermatogenesis in mice. Cold spring harbor asia conference “Developmental Control of Sex, Growth and Cellular Fate”, Suzhou, China, October, 2011

4 Chuma S. Ultrastructural characteristic of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline. 15th European testis workshop with NAFA annual meeting. Naantali, Finland, May, 2008

5 Chuma S. Protein and RNA assembly of germinal granules/nuage in the germline. World congress on reproductive biology. Hawaii, USA, May, 2008

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc01/index-j.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

中馬 新一郎 (SHINICHIRO CHUMA)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20378889