

## 自己評価報告書

平成 23 年 3 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062007

研究課題名（和文）精子形成におけるエピジェネティック制御と small RNA

研究課題名（英文）Epigenetic Regulation and Small RNA in Spermatogenesis

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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：DNA メチル化、small RNA、精子形成、エピジェネティック制御、幹細胞

## 1. 研究計画の概要

精子形成において、マウス PIWI ファミリーが、どのように生殖細胞特異的な small RNA である piRNA の産生に関与しているのか、その piRNA がどのような機能を有しているのか、さらに、その機能発現機構はどのようなものであるか、を解析することにより、エピジェネティックな遺伝子発現制御にどのように関与しているかを明らかにするものである。

## 2. 研究の進捗状況

以下のように、マウスの PIWI ファミリーと MVH についてという二つのテーマにおいて研究を精力的におこない、十分な研究の展開があった。

## (1) マウス PIWI ファミリー-MILI と MIWI2 の piRNA 産生と機能発現についての解析

マウス PIWI ファミリー-MILI (mouse piwi-like) の遺伝子ターゲティングマウスを解析したところ、精子形成は、減数分裂のパキテン期においてアポトーシスが生じ不妊になっているだけでなく、IAP、Line-1 といったレトロトランスポゾン遺伝子の発現が亢進していることを見いだした。これらレトロトランスポゾン遺伝子は、正常マウスではプロモーター領域の DNA メチル化により発現抑制をうけているが、MILI 欠損マウスでは、メチル化に障害のあることが明らかとなった。

DNA メチル化は、胎生期の雄性生殖細胞において新規に獲得される (*de novo* DNA メチル化) ことが知られているが、MILI 欠損マウスでは、その *de novo* DNA メチル化が正常に進行していないことが明らかとなった。

また、*de novo* DNA メチル化が生じる時期

のマウス雄性生殖細胞において発現する piRNA の塩基配列を網羅的に解析したところ、その多くがレトロトランスポゾン遺伝子に対応するものであった。これらの結果から、MILI は胎生期の雄性生殖細胞において、レトロトランスポゾンに対する piRNA の産生に関与していること、また、おそらくは、その piRNA が何らかの分子機構によって DNA の *de novo* DNA メチル化に関与していること、が明らかとなった。

さらに、もう一つのマウス PIWI ファミリー遺伝子である MIWI2 (mouse piwi 2) の欠損マウスを解析したところ、ほぼ、MILI 欠損マウスと同じ表現型を呈したことから、MIWI2 も MILI と協同して、piRNA の産生に関与することを示した。

## (2) MVH (mouse vasa homologue) の piRNA 産生における機能解析

Vasa はショウジョウバエにおける生殖細胞の発生に必須なタンパクであり、その発現は、多くの生物種において保存されている。マウスにおける vasa ホモログである MVH は、精子形成に必須であることが知られていたが、どのような分子機序によって精子産生に関与しているかは不明であった。

MVH 欠損マウスの解析をおこなったところ、MILI 欠損マウスおよび MVH 欠損マウスと極めて類似しており、piRNA の産生異常、レトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化の低下、ならびに、発現亢進が認められた。

さらに詳細な解析をおこなったところ、piRNA の一次生成と二次生成のうち、二次生成の初期段階で産生異常が生じていることが明らかとなった。

他にも、協同研究などにより、MILI の細胞

内局在の解析、内因性 siRNA の機能解析、MILI の精子幹細胞維持における機能解析、TDRD9 の機能解析、MitoPLD の機能解析などをおこない、国際誌に発表することができた。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) 研究の進捗状況に記載のとおり、マウス PIWI ファミリー遺伝子の機能解析では、高インパクトファクター雑誌である *Genes & Development* に発表することができた。また、他の班員との共同研究のいくつかも、同様に、国際的な評価の高い雑誌に発表することができた。これらの成果から、過去3年間の達成度は十分なものであったと判断している。

また、MVH の機能解析においては、当初予定をはるかに上回る結果であり、これも、十分な成果をあげ、高インパクトファクター雑誌である *Genes & Development* に発表することができた。以上を合わせ「当初の計画以上に進展している」と判断している。

### 4. 今後の研究の推進方策

上記の通り、着実に研究成果をあげていることから、今後も、これらの研究を進展させていく。マウス PIWI ファミリーおよび MVH の機能解析を継続するのみでなく、DNA メチル化がどのような分子機序によって獲得されるのかといった新しいテーマにも挑戦していきたい。

### 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20件) すべて査読有

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, Nakano T.

MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons

*Genes Dev*, 24:887-892, 2010

② Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Lin H. MILI, a piRNA binding protein, is required for germline stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation.

*J Biol Chem*, 284:6507-6519, 2009

③ Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo, Suzuki T, Hata K, Martin S, 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

④ Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri T, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T

DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes.

*Genes Dev*, 22:918-30, 2008 他16編

[学会発表] (計30件)

① Nakano T Regulation of Stem Cell Systems by PI3K/Akt Signaling  
The 5<sup>th</sup> Nikko International Symposium : Stem Cells and Cancer, Tochigi, October 25, 2008

他29件