

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 26 年 5 月 20 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 RNAs 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：172370

研究成果の概要（和文）：

マウス PIWI ファミリー遺伝子である MILI (mouse piwi like) および MIWI2 (mouse piwi2) の機能解析をおこない、これらの分子が、piRNA (PIWI interacting RNA) と呼ばれる生殖細胞特異的な non-coding 小分子 RNA の産生、および、piRNA を介したレトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化に必須であることを見いだした。また、MVH など、他の遺伝子の piRNA 産生における機能も明らかにした。さらに、GS (germline stem) 細胞を用いた piRNA 産生解析システムを構築し、ミトコンドリア外膜のタンパクである glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (GPAT2) が piRNA 産生に必須であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the molecular functions of two mouse PIWI family members, MILI (mouse piwi like) and MIWI2 (mouse piwi 2) and revealed that these two proteins were crucial for the biogenesis of germ cell specific small RNAs, piRNAs (piwi interacting RNA). We also exhibited that MILI and MIWI2 played pivotal roles in *de novo* DNA methylation of retrotransposon genes in embryonic male germ cells presumably through piRNA. In addition, we showed the molecular functions of MVH (mouse vasa homologue), a germ cell specific RNA helicase and glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (GPAT2) in piRNA-genesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	22,500,000	0	22,500,000
2009 年度	22,500,000	0	22,500,000
2010 年度	22,500,000	0	22,500,000
2011 年度	22,500,000	0	22,500,000
2012 年度	22,500,000	0	22,500,000
総計	112,500,000	0	112,500,000

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：遺伝子発現制御、小分子 RNA、非コード RNA、エピジェネティクス、piRNA、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

精子の産生は、典型的な幹細胞システムの一つであると同時に、形態的にも遺伝子発現制御においても、極めて劇的な変化を伴う細胞分化過程である。ショウジョウバエや線虫においては、遺伝学的な手法から、幹細胞維持や精子形成に必要な分子が同定されてきているが、哺乳類においては不明な点が多く残されている。我々はショウジョウバエの生殖幹細胞やプラナリアの再生に必須な PIWI ファミリーに着目して研究を展開してきた。マウスには三つの PIWI ファミリー分子 (MIWI, MILI, MIWI2) が存在する。我々は、特に、MILI について詳細な解析をおこなってきた。MILI 欠損マウスは、精子形成の減数分裂において分化を停止しアポトーシスにより死滅するために不妊になることを明らかにしている (Kuramochi-Miyagawa et al, *Development* 2003)。一方、ショウジョウバエなどの研究から、PIWI ファミリーは、small RNA のプロセッシングに関与していることが報告されており、我々は米国のグループと共同で、piRNA (piwi interacting RNA) という、従来とは別のカテゴリーに分類される small RNA が MILI に結合することを明らかにした (Aravin A et al. *Nature* 442,203-7, 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、上記の成果をさらに発展させ、精子形成において、マウス PIWI ファミリーが、どのように 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、PIWI ファミリーの、精子形成におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにする。また、生殖細胞特異的な RNA ヘリカーゼである MVH (mouse vasa homologue) の piRNA 産生における機能を解析する。さらに、精子産生の幹細胞に匹敵する培養細胞である GS (germline stem) 細胞を用いた piRNA 産生機構の解析をおこなう。

3. 研究の方法

マウス PIWI ファミリーの機能解析および、MVH の機能解析、ともに、それぞれの遺伝子破壊マウスを用いた解析をおこなった。それらのマウスにおける piRNA の産生については、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析、バイサルファイト法を用いた DNA メチル化の解析などをおこなった。また、MILI

を欠損する GS 細胞とセンダイウイルスを用いた実験系を確立し、piRNA 産生機構の解析をおこなった。

4. 研究成果

<マウス PIWI ファミリーと piRNA>

MILI および MIWI2 の遺伝子破壊マウス、いずれにおいても、胎生期の雄性生殖細胞において Line-1 と IAP という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が明らかになった。通常、レトロトランスポゾンの遺伝子発現はそのプロモーター領域の DNA メチル化によることが知られている。MILI および MIWI2 の遺伝子破壊マウスにおいては、その DNA メチル化が低下することによって遺伝子発現の抑制が阻害されていることがわかった。

また、時系列的な詳細な解析をおこなったところ、維持 DNA メチル化ではなく、*de novo* DNA メチル化の段階においてすでに異常が認められることがわかった。これらの結果から、MILI および MIWI2 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遺伝子の *de novo* DNA メチル化に重要な役割を有していることが明らかになった。

de novo DNA メチル化の分化段階における piRNA の網羅的解析をおこなったところ、レトロトランスポゾンの塩基配列に対応する piRNA が大半を占めることが明らかになった。また、MILI 欠損マウスおよび MIWI2 欠損マウスでは、piRNA の産生が著しく阻害されていることが明らかとなった。

他にも piRNA 産生に障害のある遺伝子欠損マウスが報告されているが、いずれにおいても、レトロトランスポゾン遺伝子の *de novo* DNA メチル化が障害されていることが示されている。これらの結果とあわせて、MILI および MIWI2 欠損マウスでは、piRNA の産生に異常があり、その結果としてレトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化に異常が生じて発現が亢進していると結論づけた。

piRNA が DNA メチル化に関与している状況証拠は多数あげられているが、直接的な証明はなされておらず、現在、その研究をおこなっている。

<MVH の piRNA 産生における機能解析>

MVH は、ショウジョウバエからほ乳類まで進化的に保存された RNA ヘリカーゼである。その欠損マウスには精子形成の異常が認められることが以前から報告されていた。

その精子産生異常が MILI 欠損マウスと非常に類似していることから、MVH 欠損マウス

スにおけるレトロトランスポゾンの発現を解析したところ、予想通り亢進していた。また、そのプロモーター領域の DNA メチル化に異常があることも明らかになった。

piRNA の産生は一次産生機構と二次産生機構に分けることができる。二次産生機構は ping-pong 増幅サイクルとも呼ばれ、一次産生機構において MILI に結合する piRNA が産生され、ついで、その piRNA を鋳型にして MIWI2 に結合する piRNA が産生される過程である。

MILI も MIWI2 も piRNA に結合するが、MVH 欠損マウスでは、MILI に結合する piRNA は存在するが、MIWI2 に結合する piRNA は存在しなかった。また、MVH を欠損する胎仔の雄性生殖細胞における piRNA を網羅的に解析したところ、二次産生機構が機能していないことが明らかになった。以上から、MVH は二次産生機構において、piRNA の MIWI2 へのトランスファーにおいて機能することが明らかになった。

また、MVH 欠損マウスでは、piRNA 産生の場合である inter mitochondrial cement (IMC) の形成に異常があることがわかった。この結果は、MVH は、MIWI2 結合 piRNA の産生だけでなく、IMC の形成にも機能することを示している。

現在、MVH のヘリカーゼ活性が piRNA の産生に必要なかどうか、あるいは、IMC の形成に必要なかどうか、の研究をおこないつつある。

<GS 細胞を用いた piRNA 産生の解析>

野生型の GS 細胞、MILI を欠損する GS 細胞、および、MILI 欠損 GS 細胞にセンダイウイルスベクターを用いて MILI の発現を回復させた細胞 (MILI リバータント GS 細胞)、を用いて piRNA 産生についての比較検討をおこなった。その結果、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、MILI を欠損させた場合は piRNA 産生が著しく阻害されることが明かとなった。

MILI は複数のタンパクと結合して機能することが知られているので、MILI リバータント GS 細胞を用いて、MILI に結合するタンパクの網羅的なプロテオーム解析をおこなった。その結果、GPAT2 という脂質代謝に関与するミトコンドリア外膜のタンパクを同定することができた。

GPAT2 をノックダウンした GS 細胞では piRNA の産生が障害されることから、GPAT2 は piRNA 産生に関与していることが明らかになった。次に、GPAT2 の酵素活性が piRNA 産生に必要なかどうかを解析したところ、酵素活性がない GPAT2 であっても piRNA 産生に十分であることがわかった。

これらの結果から、GPAT2 は、ミトコンド

リアの外膜において、なんらかの『足場』として機能し、piRNA の産生に関与しているという仮説をたて、研究を推進している。

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 18 件) すべて査読あり

1. 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) 10.1111/j.1742-4658.2012.08474.x.
2. Liu YJ, Nakamura T, Nakano T. “Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis” Biol Rep.86:1-8(2012) 10.1095/biolreprod.111.095018.
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.486:415-419(2012)10.1038/nature11093.
4. 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.23:292-299(2013)10.1101/gr.137224.112.
5. 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, Itou D, Kimura T, Nakano T. “GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells” RNA. 19:803-810(2013)10.1261/rna.038521.113.
6. Watanabe T, et al. “MitoPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline” Dev Cell.20:364-375 (2011) 10.1016/j.devcel.2011.01.005.

7. Watanabe T, et al. "Role for piRNAs and a novel non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrfl locus" *Science*. 332:848-852 (2011) 10.1126/science.1203919.
 8. Tanaka T, et al. "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) 10.1073/pnas.1015447108.
 9. Yamano N, Kimura T, Watanabe S, Shinohara T, Nakano T. "Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells .by Akt activation" *Biochem Biophys Res Commun*. 392:311-316(2010)
 10. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, Nakano T, et al. "MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons" *Genes Dev*. 24:887-892 (2010)
 11. Huang CL, Cheng JC, Kitajima K, Nakano T, Yeh CF, Chong KY, Tseng CP. "Disabled-2 is required for mesoderm differentiation of murine embryonic stem cells" *J Cell Physiol*. 225:92-105(2010)
 12. Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, et al. "MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons" *Genes and Development*. 24:887-892(2010)
 13. Yamano N, Nakano T, et al. "Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation" *Biochem Biophys Res Commun*. 392:311-316(2010)
 14. Kojima K, Nakano T, et al. "Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells" *Genes to Cells*.14:1155-1165(2009)
 15. Sakai E, Kitajima K, Sato A, Nakano T. "Increase of hematopoietic progenitor and suppression of endothelial gene expression by Runx1 expression during in vitro ES differentiation" *Experimental Hematology*. 37: 334-345(2009)
 16. Shoji M, Nakano T, et al. "The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline" *Developmental Cell*.17:775-787(2009)
 17. Yoshimura T, Nakano T, Miyazaki J, et al. "Gtsfl/Cue110. a gene encoding a protein with two copies of a CHHC Zn-finger motif. is involved in spermatogenesis and retrotransposon suppression in murine testes" *Developmental Biology*.335:216-227(2009)
 18. Unhavaithaya Y, Nakano T, Lin H, et al. "MILI. a piRNA binding protein. is required for germline stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation" *Journal of Biological Chemistry*.284:6507-6519 (2009)
- [学会発表] (計 12 件)
1. 仲野 徹: "DNA Methylation in Cell Differentiation and Transformation" Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Disease(2012.4.21) 上海・中国
 2. 仲野 徹: "piRNA and Spermatogenesis"2nd SKLRB Symposia(2012.5.7) 北京・中国
 3. 仲野 徹: "piRNA 産生システムの解析" 22nd HCS 4th JARI Joint International Symposium(2012.8.30) 広島市
 4. 仲野 徹: "piRNA 産生システムの解析" 特定領域研究 生殖サイクル 公開シンポジウム(2011.11.17) 大阪市
 5. 仲野 徹: "DNA methylation in Early Embryogenesis" Epigenetics:New horizons in Japan and Scandinavia(2010.9.6) ストックホルム・スウェーデン
 6. 仲野 徹: "幹細胞の未分化性とシグナル" 第 69 回日本癌学会(2010.9.23) 大阪市
 7. 仲野 徹: "細胞分化・がん化におけるエピジェネティクス制御" JDDW2010 (2010.10.15) 横浜市
 8. 仲野 徹: "DNA methylation control by PGC7/Stella" BMB 2010(2010.12.7) 神戸市

9. 仲野 徹: “DNA methylation in early embryogenesis” 日本発生生物学会 (2009.5.29) 新潟市
10. 仲野 徹: “DNA methylation in early embryogenesis” From Imprinting to the Epigenome(2009.9.4) ケンブリッジ・イギリス
11. 仲野 徹: “Epigenetic gene regulation and GATA factors” International Society of Experimental Hematology(2009.9.11) アテネ・ギリシャ
12. 仲野 徹: “発生・分化におけるエピジェネティクス制御” 日本免疫学会 (2009.12.3) 大阪市

[図書] (計 0 件)

[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

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

6. 研究組織

(1)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：172370

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし