

令和元年9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：2015～2017

課題番号：15H04699

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) Analysis of mouse piRNA biosynthesis pathway

研究代表者

宮川 さとみ (Miyagawa, Satomi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90291153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：piRNA(piwi interacting RNA)は、生殖系列の細胞で主に発現している25～31塩基の小分子RNAであり、精子形成過程において重要な役割を果たしている。piRNAは前駆体となる1本鎖の長いRNAから、切断や修飾を受けて成熟した分子となる。本研究では、piRNAの生合成に関する分子の遺伝子改変マウスを作製して解析をおこない、GPAT2(glycerol-3-phosphate acyltransferase 2)とPNLDC1がpiRNAの生合成と精子形成に必須の分子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生殖細胞に存在し、piRNAの生合成にかかわる分子の生体内における役割を、欠損マウスを作製して解析したものである。PNLDC1欠損マウスの解析では、piRNAが数塩基削られること(トリミング)による成熟化が、精子形成にどのような影響があるかを明らかにした重要な研究である。また、ミトコンドリア外膜タンパクであるGPAT2は、piRNAの生合成に必須であるだけでなく、雄性生殖幹細胞の増殖にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：piRNAs are germ cell-specific small RNAs essential for retrotransposon gene silencing and male germ cell development. We generated GPAT2-deficient and PNLDC1-deficient mice. Each deficient mice showed the complete loss of piRNAs in GPAT2-deficient, and accumulation of longer piRNAs in PNLDC1-deficient, suggesting PNLDC1 as a candidate pre-piRNA trimming enzyme in mice, respectively. Apoptosis of pachytene spermatocytes was observed in GPAT2-deficient testis. In addition, apoptosis of spermatogonia at the neonatal stage, which was not observed in other piRNA impaired mice. These data show that GPAT2 plays a critical role in preventing apoptosis in spermatogonia, as well as piRNA production. On the other hand, male germ cells in the PNLDC1-mutant mouse lines showed two types of apoptosis, at the meiotic and post-meiotic stages. These abnormalities can be attributed to the trimming deficiency in both embryonic and postnatal piRNA production.

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 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 (small RNA) である。piRNA は、生殖系列の細胞で発現し、その産生や機能発現に PIWI ファミリータンパクが機能している。我々は、欠損マウスの解析から、マウス PIWI ファミリータンパクである MILI や MIWI2 が piRNA の産生に必要であること、また、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、前駆体と考えられている一本鎖 RNA が Dicer 非依存的に切断され、PIWI ファミリータンパクに結合し産生される。我々は、これまでに MILI に結合するタンパクとして、ミトコンドリア外膜に存在し、脂質代謝に関与する酵素とされている GPAT2 を同定した。GS 細胞 (germ stem cell) を用いた GPAT2 遺伝子のノックダウン実験、および、その変異体を用いたレスキュー実験から、脂質代謝活性とは無関係に、piRNA 産生に重要な役割を果たすことを明らかにした。この結果から、GPAT2 は、おそらく MILI を含むタンパク複合体をミトコンドリア外膜にリクルートすることにより、piRNA 産生に重要な役割を果たすと考えた (Shiromoto et al. RNA 19, 803-810. 2014)。

## 2. 研究の目的

piRNA はミトコンドリア近傍に存在する pi-body および piP-body と呼ばれる生殖顆粒に多く存在することから、これらの生殖顆粒が piRNA 合成の「場」である可能性が高いと考えられている。piRNA の生合成過程は、前駆体と考えられている一本鎖 RNA から、マウスでは MILI に結合した 5'末端がウラシルである piRNA (1stU piRNA) が産生される。しかし、前駆体の実体や RNA の切断機構など、分子メカニズムの多くは不明のまま残されている。ミトコンドリア外膜タンパクであり、GS 細胞において piRNA の生合成に関与する GPAT2 の生体内での役割を明らかにするために、GPAT2 欠損マウスを作製し解析をおこなう。

また、piRNA 生合成過程において、piRNA は、前駆体である長い転写産物から成熟型よりも少し長い Pre-piRNA が産生され、PIWI に取り込まれたのち、3'末端から削られて成熟した piRNA になると考えられている。この 3'末端を削るタンパク質は Trimmer と呼ばれており実態が不明であったが、最近カイコで PARN 様のヌクレアーゼドメインと膜貫通ドメインを持つ PNLDC1 (poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1) タンパク質である事が報告された。そこで本研究では、そのマウスオルソログであるマウス PNLDC1 タンパク質の生体内での機能と piRNA の成熟における役割を解明する事を目的とし、解析を行う。

これらの欠損マウスの解析を通して、哺乳類の piRNA の生合成過程を明らかにする。

## 3. 研究の方法

哺乳類における piRNA 生合成過程、および、生体内での役割を明らかにするため、GPAT2 と PNLDC1 の分子機能について、変異マウスを用いた研究を展開する。

(1) GPAT2 欠損マウスの解析: GPAT2 変異マウスを用いて、精子形成の停止する時期を HE 染色や抗体染色、TUNEL アッセイ等により明らかにする。胎生期や生後の精巣における piRNA の発現量や長さや種類を大規模解析により解析する。胎生期の精巣における piRNA の標的であるレトロトランスポゾン遺伝子 LINE1 および IAP の DNA メチル化と、生後のレトロトランスポゾン遺伝子の発現を調べ、サイレンシングの程度を調べる。その他、欠損マウスにおける表現型を解析し、piRNA 産生における GPAT2 の生体内での役割を総合的に考察する。

(2) PNLDC1 欠損マウスの作製と解析: PNLDC1 変異マウスを用いて、精子形成の停止する時期を HE 染色や抗体染色、TUNEL アッセイ等により明らかにする。胎生期および生後の精巣における piRNA の発現量や長さや種類を大規模解析により解析する。特に、piRNA の長さに関しては、通常よりも長い可能性を考慮し、NGS 解析のサンプルは長さの幅を大きくとって解析する。piRNA の大規模解析は、トータル RNA による解析だけでなく、MILI、MIWI2 あるいは、MIWI で免疫沈降したサンプルを用いて、それぞれの PIWI 結合 piRNA を調べる。胎生期の精巣における piRNA の標的であるレトロトランスポゾン遺伝子 LINE1 および IAP の DNA メチル化と、生後のレトロトランスポゾン遺伝子の発現を調べ、サイレンシングの程度を調べる。その他、欠損マウスにおける表現型を解析し、piRNA 産生における PNLDC1 の生体内での役割を総合的に考察する。

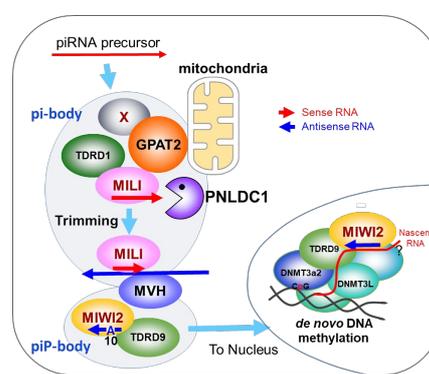


図1 マウス piRNA 生合成過程

## 4. 研究成果

### (1) GPAT2 欠損マウスの解析

GPAT2 は胎生期から生後の精巣で発現しており、GPAT2 欠損マウスの雄マウスでは、精子形成に異常が生じ不妊となった。生後2週齢の精巣を用いて TUNEL アッセイを行なうと、精細管中でアポトーシスが生じていた。また、GPAT2 欠損マウスにおいては、抗 SCP3 抗体で染色される太いナプトネマ構造が観察されないことから、パキテン期直前にアポトーシスにより精子形成が停止していると考えられた。

GPAT2 はミトコンドリアに存在するタンパクであり、MILI と同様に胎生期から発現していることから、胎生期の精巣における GPAT2、および piRNA 産生にかかわることが知られている分子の、発現や局在を調べた。E16.5 の精巣の雄性生殖細胞であるゴノサイトにおいて GPAT2 は細胞質に顆粒状に染色され、MILI や TDRD1 (Tudor domain protein1) と共局在を示した。しかし MILI や TDRD1 の不均一な染色は、GPAT2 欠損細胞においてもみとめられたことから、GPAT2 の発現が MILI や TDRD1 の局在には影響を与えないと考えられた。一方で、MVH/DDX4 の顆粒状の局在は、GPAT2 欠損マウスで、弱くなっている傾向がみとめられた。さらに、電子顕微鏡観察において、通常では IMC (Inter mitochondrial cement) とよばれる電子密度の高い顆粒状の構造がミトコンドリア間で確認されるが、GPAT2 欠損マウスのゴノサイトでは IMC は消失していた。IMC の消失は、MILI や TDRD1 や MVH の欠損マウスでもみとめられている。また、GPAT2 はミトコンドリアの外膜タンパク質として知られている TOM20 と共局在することや、ミトコンドリア画分における低温での proK 処理で、GPAT2 タンパクが認識されなくなることから、piRNA 合成にかかわるミトコンドリアの外膜タンパクであることを明らかにした。

次に、胎生期マウスの精巣から抽出した RNA を用いて小分子 RNA の大規模解析をおこなった。その結果、25-30 塩基の小分子 RNA の数は GPAT2 欠損マウスで極端に減少していた(図2)。胎生期の精巣における piRNA は、レトロトランスポゾンの配列をもち、IAP (intracisternal A particle) と LINE1 (long interspersed nuclear element) の piRNA においては、センス鎖で 1stU (5'末端がウラシル)、アンチセンス鎖に 10thA (10 番目の配列がアラニン) の特徴を多くもつ。しかし、GPAT2 欠損マウスの胎生期の精巣においては、その傾向は全くみとめられなかった。以上のことから、GPAT2 は piRNA の産生に必須の分子であるといえる。

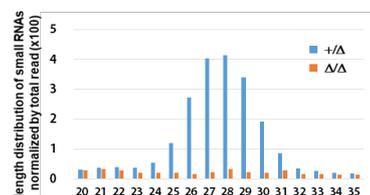


図2 胎生期 piRNA の長さの分布

胎生期の piRNA の標的はレトロトランスポゾン IAP と LINE1 のゲノム DNA メチル化であると考えられている。GPAT2 欠損マウスを Oct4/GFP トランスジェニックマウスと交配し、生後0-1日の精巣よりソーティングにより生殖細胞を単離した。抽出したゲノム DNA を用いて、IAP と LINE1 のメチル化をバイサルファイト法により調べた結果、通常は獲得されているこれらのレトロトランスポゾンの DNA メチル化は、GPAT2 欠損マウス由来の生殖細胞では、ほとんど獲得されていなかった。また、生後2週齢の精巣から抽出した RNA を用いたノーザンブロッティングの結果、IAP と LINE1 の発現が GPAT2 欠損マウスで上昇していた。以上の結果は、GPAT2 欠損マウスにおいては、piRNA が産生されず、通常抑制されている IAP と LINE1 の発現抑制が解除された結果であるといえる。

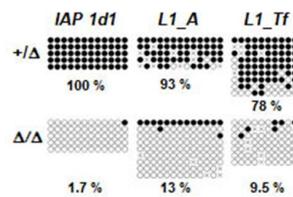


図3 レトロトランスポゾン DNA のメチル化

これまでに報告されている胎生期 piRNA 産生にかかわる他の遺伝子 (Mili, Miwi2, Mvh など) の欠損マウスにおいても、精子形成の減数分裂初期のパキテン期に apoptosis を生じる。GPAT2 欠損マウスも予想通り、同様の表現型を示していた。

しかし、詳細な解析の結果、出生後2日目では生殖細胞数に変化はみとめられなかったが、生後5日において GPAT2 欠損マウスにおける生殖細胞数の減少が明らかとなった(図4)。この生殖細胞の減少は、MILI 欠損マウスではみとめられなかったことから、MILI 非依存的な piRNA、もしくは piRNA 非依存な機能が GPAT2 には存在することを示している。

精子形成過程においては、胎生期精巣のゴノサイトから、出生直後までは細胞増殖が停止しているが、生後2日目に細胞増殖が再開される。GPAT2 欠損マウスでは、アポトーシスが生後3日の精巣で生じていた。AKT は、アポトーシスの抑制や細胞増殖の進行に関与することが知られていることから GPAT2 欠損精巣での精子形成停止に AKT の活性化が関与している可能性が考えられた。

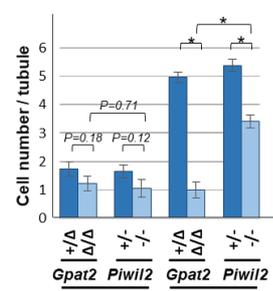


図4 精細管当たりの MVH 陽性細胞数

( 2 ) PNLDC1 欠損マウスの解析

CRISPR/Cas9 システムを用い、アミノ酸配列より機能的に保存されていると考えられる Exon3 または Exon7 を標的とした変異マウスを作製した。その結果、いずれの欠損マウスにおいても、野生型と比較して精巣が明らかに萎縮しており、組織切片の観察からは同様の表現型を示した。いずれの欠損マウスにおいても、減数分裂期と、伸長精子の形成異常の 2 種類の形態異常が認められた。また、精巣上体には成熟精子を観察できず、雄性不妊であった。

胎生期、および、出生後 24 日齢の精巣から抽出した RNA を用いて、次世代シーケンサーによる小分子 RNA 解析を行ったところ、PNLDC1 欠損精巣において、成熟型よりも長い piRNA が蓄積していること、その長い piRNA においても 1stU の特徴を持つことを見出した。さらに、piRNA をゲノムにマッピングして配列を比較したところ、PNLDC1 欠損精巣の piRNA は、3'末端が削られていない未成熟な Pre-piRNA である事を見出した。この結果は、既報のカイコ Trimmer の解析結果と一致しており、マウス PNLDC1 も Pre-piRNA の 3'末端成熟に寄与する Trimmer であると考えられた。

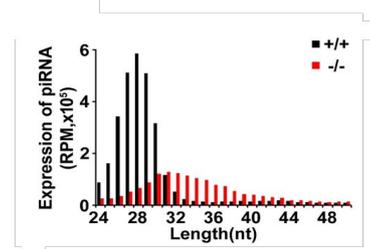


図 5 胎生期 piRNA の長さの分布

胎生期の精巣における piRNA は、レトロトランスポゾン IAP と LINE1 の配列を有し、センス鎖に 1stU、アンチセンス鎖に 10thA の特徴をもつ。PNLDC1 欠損マウスの胎生期の精巣においては、LINE1 の piRNA においてアンチセンス鎖の 10thA piRNA の減少が顕著にみとめられた。

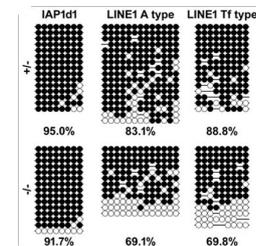


図 6 レトロトランスポゾン DNA のメチル化

加えて、PNLDC1 欠損マウス精巣では LINE レトロトランスポゾンのゲノム DNA メチル化レベルの低下 (図 6) と、生後の精巣において LINE1 RNA の発現増加が観察された。一方、IAP の DNA メチル化の程度と IAP 転写産物の発現量は、コントロールマウスとの差がみとめられなかった。

成体精巣における piRNA は、精原細胞や減数分裂初期で発現しているプレパキテン piRNA とパキテン期や円形精子細胞で発現しているパキテン piRNA に分類される。MILI と MIWI の発現時期から、プレパキテン piRNA は MILI に、パキテン piRNA は MILI および MIWI に結合する。PNLDC1 欠損マウスの成体精巣においては、MIWI タンパク質の量が顕著に低下していた。また、MIWI に結合する piRNA の量も顕著に減少していた (図 7)。欠損マウスにおける Miwi 転写量の低下はほとんどみとめられなかったことから、転写後の翻訳量の低下、あるいは、MIWI タンパクの安定性の低下が原因であると考えられる。結果的に MIWI、あるいは、piRNA/MIWI の機能低下により、MIWI 欠損マウスと同様の表現型が、PNLDC1 欠損マウスにおいてもみとめられたと考えられる。

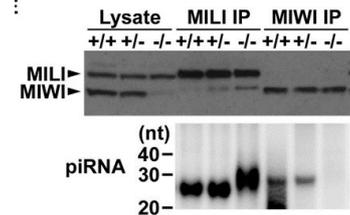


図 7 MILI・MIWI の発現と結合 piRNA

以上のように、PNLDC1 欠損マウスにおける組織学的な形態異常は、減数分裂期と半数体の二つの時期に観察された。これらの形態異常や精子形成停止時期は、それぞれ MILI 欠損マウス、および、MIWI 欠損マウスの精子形成停止時期と同じであることから、マウス PNLDC1 が piRNA の 3'末端形成に重要なトリマーとして機能しており、piRNA の 3'末端成熟がレトロトランスポゾンの抑制と精子形成に必須であることが、明らかとなった。

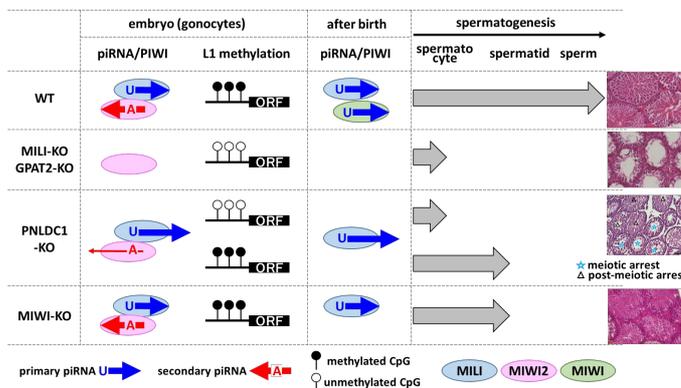


図 8 piRNA の生合成と精子形成

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Chuma S, Arakawa T, Nishimura T, Hasuwa H, Tachibana T, Ikawa M, Nakano T.

GPAT2 is required for piRNA biogenesis, transposon silencing, and maintenance of spermatogonia in mice.

Biol Reprod. (査読有) Apr 5.2019, pii: ioz056. doi: 10.1093/biolre/ioz056.

Nishimura T, Nagamori I, Nakatani T, Izumi N, Tomari Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano PNLDC1, mouse pre-piRNA Trimmer, is required for meiotic and post-meiotic male germ cell development.

EMBO Rep (査読有) 2018, Mar;19(3). pii: e44957. doi: 10.15252/embr.201744957.

Nagamori I, Kobayashi H, Nishimura T, Yamagishi R, Katahira J, Kuramochi-Miyagawa S, Kono T, Nakano T.

Relationship between PIWIL4-Mediated H3K4me2 Demethylation and piRNA-Dependent DNA Methylation.

Cell Rep. (査読有) 2018 Oct 9;25(2):350-356. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.017.

Yoshimura T, Watanabe T, Kuramochi-Miyagawa S, Takemoto N, Shiromoto Y, Kudo A, Kanai-Azuma M, Tashiro F, Miyazaki S, Katanaya A, Chuma S, Miyazaki JI.

Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis.

EMBO Rep. (査読有) 2018 Apr;19(4). pii: e42054. doi: 10.15252/embr.201642054.

Kabayama Y, Toh H, Katanaya A, Sakurai T, Chuma S, Kuramochi-Miyagawa S, Saga Y, Nakano T, Sasaki H.

Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes.

Nucleic Acids Res. (査読有) 2017 May 19;45(9):5387-5398. doi: 10.1093/nar/gkx027.

Kojima-Kita K, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Akazawa T, Inoue N, Nakano T.

MIWI2 as an Effector of DNA Methylation and Gene Silencing in Embryonic Male Germ Cells.

Cell Rep. (査読有) 2016 Sep 13;16(11):2819-2828. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.027.

### 〔学会発表〕(計 1 件)

宮川さとみ、西村徹、永森一平、泉奈津子、泊幸秀、仲野徹  
マウス piRNA トリマーPNLDC1 の機能解析、(ポスター)  
第 19 回日本 RNA 学会年会、2017/7/19、富山

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

城本 悠助 SHIROMOTO, Yusuke

西村 徹 NISHIMURA, Tohru

永森 一平 NAGAMORI, Ippei

浅田 徳子 ASADA, Noriko

仲野 徹 NAKANO, Toru

泊 幸秀 TOMARI, Yukihide (東京大学 分子生物学研究所)

泉 奈津子 IZUMI, Natsuko (東京大学 分子生物学研究所)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。