

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15152

研究課題名(和文)生殖細胞で発現するPIWI-piRNAによるオス性分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of sex differentiation by Piwi-piRNA system expressed in germ cells

研究代表者

山本 耕裕 (Yamamoto, Yasuhiro)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20613558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PIWI変異体メダカならびに網羅的解析からメダカ性分化におけるPIWI-piRNAシステムの役割を解析した。Piwi11変異体の一部では、二次性徴を示さないこと、性ホルモンレベルが優位に低いことを明らかにした。Piwi11変異体の生殖腺ではftz-f1陽性細胞の数が減少し、性分化関連遺伝子の発現が確認されないことを示した。配偶子における小分子RNAの網羅的解析を行った。piRNAの特徴が認められ、Piwi11変異体の生殖細胞でのみ発現上昇する候補遺伝子を単離した。これらの結果から、Piwi11変異体では標的遺伝子の発現抑制が解除され、生殖腺における性分化の破綻につながると予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコや柿ではPiwi-piRNAによる性分化制御機構が明らかになっている。魚類やほ乳類においてもPIWIの変異体の表現型解析から、性分化におけるPiwi-piRNAの役割が示唆されてきた。本研究により、生殖細胞で特異的に発現するpiRNAが生殖腺体細胞のステロイド産生を制御しており、個体の二次性徴に関わることを示した。本研究は「piRNAが標的遺伝子の発現制御を介して、性ホルモンを調節する」全く新しい知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand the role of PIWI-piRNA system in medaka sex differentiation, we analyzed the PIWI mutant medaka and whole genome analysis of small RNAs. Some Piwi11 mutants showed no secondary sex characteristics and predominantly low sex hormone levels. The number of ftz-f1 positive cells was decreased in the gonads of Piwi11 mutants, and expression of sexual differentiation-related genes was not confirmed in the gonads of Piwi11 mutants. In NGS analysis of small RNAs in gametes, we identified a candidate genes of Piwi11 target whose expression was elevated only in germ cells of the Piwi11 mutant. From these results, it was expected that the Piwi11 mutant could not suppress the expression of the target genes, leading to the failure of sexual differentiation in the gonad.

研究分野：性分化

キーワード：性分化 PIWI-piRNA

## 1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物では、生殖腺体細胞で発現する性決定遺伝子の有無により性別が決まることが明らかになっている。メダカにおいても遺伝的に性が決定され、Y染色体上の性決定遺伝子(*Dmy*)が生殖腺体細胞で発現することにより、オスへと性分化することが明らかになっている(Matsuda et al. 2002, Nature)。すなわち、生殖細胞ならびに二次性徴の表現系は体細胞からのシグナル依存的に分化すると考えられている。しかしながら、性分化は生殖腺体細胞からのシグナルのみで制御されるものではなく、生殖細胞の存在が性分化に関わることを、メダカを用いて報告された(Kurokawa et al. 2007, PNAS; Morinaga et al 2007 PNAS)。生殖細胞が過剰に増殖したメダカや生殖細胞を著しく減少したメダカでは染色体による遺伝的な性と二次性徴の表現系が一致しないこと、すなわち生殖細胞はメス型の性分化に大きく関わるということが明らかになった。これら一連の研究より、生殖細胞依存的な性分化制御の重要性を示した。

## 2. 研究の目的

研究代表者は自らの研究背景からエピジェネティックな発現調節機構であり、生殖細胞で特異的に発現する piRNA が性分化制御に関わる可能性を検証するため、piRNA と相互作用する *Piwi* 遺伝子を欠損するメダカを作成した。*Piwi1* を欠損した個体では、生殖細胞が著しく少ないにも関わらず、二次性徴の表現系を示さないことが明らかになり、*Piwi* が脊椎動物においても性分化に関わるということが示唆された。*Piwi* は piRNA を介して標的遺伝子を抑制すると理解されていることから、*Piwi* 変異個体の生殖細胞では piRNA による遺伝子発現抑制機構が破綻したために、二次性徴の発現が抑制されているものと予想した。これら一連の結果から、生殖細胞では PIWI-piRNA により制御される二次性徴の抑制因子が存在し、これらの抑制因子により二次性徴の発現が制御され得ると予想している。そのため、PIWI-piRNA により制御される二次性徴の抑制因子を同定することにより、生殖細胞が制御する性分化制御機構を分子レベルで解明することを目的とする。

本研究では、以下2点の解析を行うことで、生殖細胞で発現し PIWI-piRNA により制御される二次性徴の抑制因子の同定を行い、性分化制御機構を分子レベルでの解明を目指す。

(1) *Piwi* 変異体の生殖腺において、生殖細胞数や性分化関連遺伝子の発現パターンに影響が現れる発生段階を組織学的解析および発現解析から明らかにする。

(2) 網羅的解析から雌雄配偶子形成で共通する piRNA の発現プロファイルを比較し、同定した piRNA と相同な配列を有する標的遺伝子を探索し、これらの標的遺伝子が *Piwi* 変異体の生殖細胞で発現上昇するかを発現解析により明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) *Piwi* 変異体の生殖腺における組織学的解析

メダカにおいて *Piwi* 遺伝子は *Piwi1* と *Piwi2* の2つが存在する。これら2つの遺伝子を欠損したメダカを CRISPR/Cas9 により作製した。ほ乳類では *Piwi* は3つ存在し、精子形成で働くタイミングがそれぞれ異なることが明らかになっている。これらの報告から、メダカにおいても *Piwi1* と *Piwi2* が機能するタイミングが異なる可能性が考えられるため、それぞれの *Piwi* 変異体における生殖細胞数と性分化関連遺伝子の発現を解析し、*Piwi1* と *Piwi2* が生殖細胞で働く時期、分化段階を特定した。

*Piwi1* 変異体の一部では明瞭な二次性徴を示さなかったため、ELISA および MAS による性ステロイドホルモンを計測した。更に、*Piwi1* 変異体ステロイドホルモンの産生細胞を検出するため、Ftz-f1 トランスジェニックメダカを用いて可視化を行なった。

(2) *Piwi1* 変異体で発現上昇する遺伝子の探索

メダカ配偶子形成における piRNA の網羅的解析のため、雌雄配偶子より small RNA ライブラリを作製し、これらのライブラリを次世代シーケンサーにより解析する。シーケンス結果をメダカゲノムにマッピングする。研究代表者はメダカゲノムプロジェクトで使用された Hd-rR とは異なる、OK-Cab というメダカ純系種を実験に用いており、一塩基多系(SNP)や塩基の挿入、欠損(Indel)の存在により、マッピング効率の低下が予想される。これらの問題を解決するため、OK-Cab によるリシーケンスを行い、SNP や Indel を OK-Cab に変換したリファレンスゲノムを作製し、マッピング率を向上させた。

(3) piRNA の標的遺伝子の探索

*Piwi* は piRNA を介して標的遺伝子を抑制すると理解されているため、(2)の解析より同定された piRNA と相同な配列を有する標的遺伝子を探索することで、*Piwi* 欠損個体の表現系に関わる候補遺伝子を選別した。*Piwi* 欠損個体において標的遺伝子の発現を in situ hybridization により解析し、生殖細胞において発現上昇が見られた遺伝子を piRNA により制御される候補遺伝子として同定した。

## 4. 研究成果

(1) *Piwi* の発現パターンと *Piwi* 変異体の表現型  
 メダカ *Piwi* の発現を *in situ hybridization* により解析したところ、*Piwi1* と *Piwi2* どちらも他の動物種と同様に生殖細胞特異的であることを示した。また、どちらも幹細胞タイプから減数分裂した生殖細胞まで発現していることが明らかになった。変異体を CRISPR/Cas9 により作製したところ、*Piwi1* と *Piwi2* どちらも雌雄共に不稔であり、孵化後 10 日前後から生殖細胞数が減少することを示した。また、生殖腺体細胞の局在を解析するため、*Sox9b* トランスジェニックメダカを用いて可視化を行なった。*Piwi1* 変異体では生殖細胞の減少に伴って、*Sox9b* 陽性細胞数が減少することが明らかになった (図 1)。

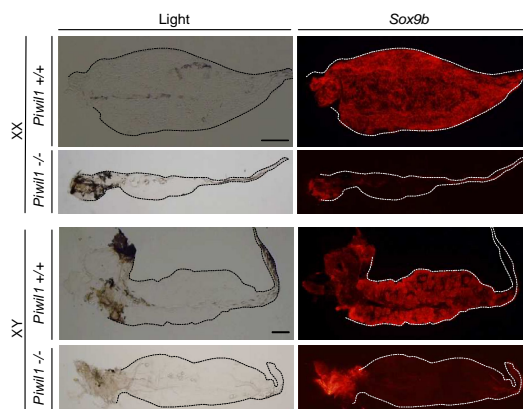


図 1. *Sox9b* 陽性細胞の局在

(2) *Piwi* 変異体の二次性徴における表現型  
 メダカではヒレの形状により雌雄二次性徴を区別することが可能である。*Piwi* 変異体の一部では雌雄どちらの場合でも、明瞭な二次性徴を示さないことが明らかになった (図 2)。この表現型は *Piwi2* 変異体では見慣れないことから、*Piwi* 変異体のみでみられた。生殖腺の構造を HE 染色により解析したところ、*Piwi* 変異体では生殖細胞やステロイド産生細胞が失われており、環状のシンプルな構造であることが分かった。一方、*Piwi2* 変異体では生殖細胞は失っているが、ステロイド産生細胞と思われる細胞群が存在した。次に、ELISA と MAS により魚類の主要なアンドロゲンである 11kt とエストロゲン濃度を解析したところ、*Piwi* 変異体ではどちらのステロイドホルモンにおいてもコントロールに比べて優位に低いことが明らかになった。更に、*Piwi1* 変異体ステロイドホルモンの産生細胞を検出するため、*Ftz-f1* トランスジェニックメダカを用いて可視化を行なったところ、*Piwi* 変異体では *Ftz-f1* 陽性細胞の局在が明らかに減少していることを示した。これらの結果から、*Piwi* 変異体の生殖腺ではステロイド産生細胞の数が減少することにより、性ホルモンレベルが低下し、二次性徴の欠如を導くことが示唆された。

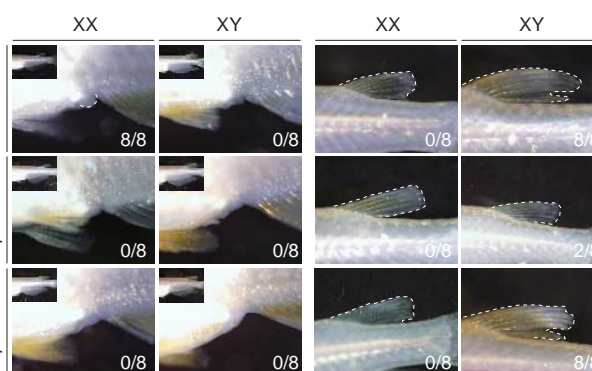


図 2. *Piwi* 変異体における二次性徴

### (3) piRNA の標的遺伝子の探索

卵巣、精巣からライブラリを作製し、次世代シーケンサーにより解析を行った。得られた配列は、これまでの報告と同様に piRNA の特徴的な長さを示した (図 3)。卵巣、精巣で共通する小分子 RNA を抽出し、GO 解析を行ったところ、ある遺伝子群が優位に同定された。これらの遺伝子群を *in situ hybridization* により発現解析を行ったところ、*Piwi* 変異体の生殖細胞でのみ発現する遺伝子を単離することに成功した。興味深いことに、この候補遺伝子はこれまでにステロイド産生細胞の抑制に関わる遺伝子の調節因子であることが報告されている。そのため、これら抑制因子の発現を *in situ hybridization* により解析したところ、*Piwi* 変異体の生殖腺において発現上昇が確認された。これら一連の結果から、*Piwi* 変異体では PIWI-piRNA による遺伝子抑制が解除されたために、生殖細胞での標的遺伝子の発現が上昇し、ステロイド産生細胞の抑制が導かれたと予想している。

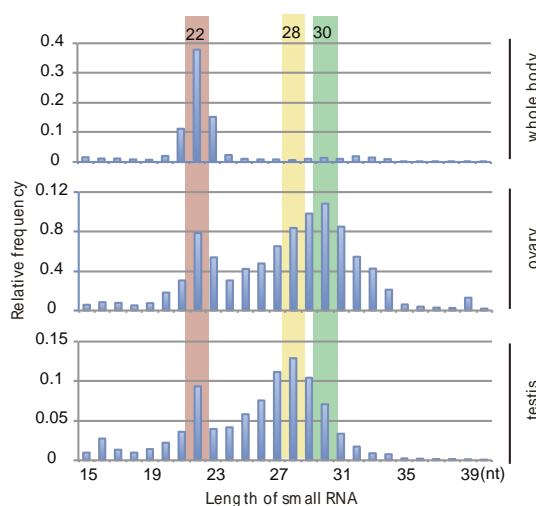


図 3. メダカ卵巣、精巣における小分子 RNA のサイズ分画

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii Kensuke, Nakajo Koichi, Egashira Yoshihiro, Yamamoto Yasuhiro, Kitada Kazuya, Taniguchi Kohei, Kawai Masaru, Tomiyama Hideki, Kawakami Koichi, Uchiyama Kazuhisa, Ono Fumihito	4. 巻 30
2. 論文標題 Gastrointestinal Neurons Expressing HCN4 Regulate Retrograde Peristalsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2879 ~ 2888.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.024	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zempo B, Yamamoto, Y., Williams, T., Ono	4. 巻 6
2. 論文標題 Synaptic silencing of fast muscle is compensated by rewired innervation of slow muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 1126/sciadv.aax8382	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本耕裕
2. 発表標題 トランスポゾンの抑制におけるメダカPIWIの役割
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本耕裕・大竹規仁・齋藤大介・西村俊哉・田中実
2. 発表標題 メダカ配偶子において雌雄差を示すpiRNAの網羅的同定
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----