

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03421

研究課題名(和文) 雄性生殖細胞の発生分化におけるDNAメチル化制御

研究課題名(英文) DNA methylation in male germ cell development

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞特異的な小分子非コードRNAについて、ミトコンドリア外膜の酵素であるGPAT2が、piRNA産生に必須のタンパク質であるMILIに結合すること、また、その欠損がpiRNAの産生異常ならびに新生仔期における精原細胞のアポトーシスを引き起こすこと。核タンパク質であるMORC3が、piRNA依存的なレトロトランスポゾンの転写抑制に必須なMIWI2タンパク質に結合すること、また、その欠損がpiRNA産生を低下させること。トランスジーンを導入による人為的piRNA産生システムによるpiRNA依存性の遺伝子発現の抑制は、その挿入部位のみでなくコピー数に依存すること。などを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポゾン遺伝子は哺乳類ゲノムのおよそ40%をも占めることから、生物学的に重要な意義を持っていると考えられる。一方、その発現は遺伝子変異を引き起こすという潜在的な悪影響があるため厳密に制御されている。とりわけ、生殖細胞における発現は大きな影響があるためか、非コード小分子RNAであるpiRNAによる抑制という特殊な分子メカニズムが存在している。そのpiRNAの産生および遺伝子発現制御機構は極めて複雑であり、その全貌はいまだに未解明である。本研究は、申請者らのこれまでの研究を発展させ、当該分野の進歩に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We have studied the molecular mechanism of piRNA production, a germ cell-specific small noncoding RNA, and the regulation of gene expression by piRNA. As results, we found that (1) glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (GPAT2), an enzyme of the mitochondrial outer membrane, binds to MILI, a protein essential for piRNA production, and its deficient mice causes abnormal piRNA production and spermatogonial apoptosis in the neonatal period. (2) MORC3, a nuclear protein presumably involved in gene expression regulation, binds to MIWI2 protein, which is essential for transcriptional repression of piRNA-dependent retrotransposons, and testis specific MORC3 deficient mice results in decreased piRNA production. (3) The suppression of piRNA-dependent gene expression by the artificial piRNA production system using anti-sense Dnmt3L transgene depends not only on its insertional site but also on its copy number.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 非コードRNA 精子形成 転写調節 転写後調節

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は受精後すぐにゲノムワイドな消去をうける。そして、発生に伴い、細胞系列特異的なメチル化パターンが確立されていく。すべての体細胞では、終末分化へと向かって次第に DNA メチル化が蓄積し続けるのに対し、生殖細胞だけは状況が異なっている。というのは、未分化な生殖細胞である始原生殖細胞の段階において、それまでに受けた DNA メチル化が一旦消去され、その後再度、新規に DNA メチル化 - *de novo* DNA メチル化 - が生じるためである。

レトロトランスポゾン（逆転写子）は哺乳類ゲノムの 40% をも占める遺伝子群である。レトロトランスポゾンは進化の原動力になったのではないかと考えられているが、その活性化は、挿入突然変異を引き起こす可能性があるために、DNA のメチル化により強く抑制されている。レトロトランスポゾン遺伝子も他の遺伝子と同じように、生殖細胞の発生過程において、DNA の脱メチル化から *de novo* メチル化をうける。我々のグループは、その分子メカニズムには、他の遺伝子と同じものだけでなく、piRNA 依存的なものがあることを発見した。

この研究領域は、ショウジョウバエ PIWI が生殖幹細胞の維持に関与すると 1998 年に報告されて以来、世界的に激しい競争がおこなわれ、piRNA 産生過程や piRNA の *de novo* DNA メチル化における役割が次々と明らかにされてきた。piRNA 依存的な DNA メチル化については、我々の研究などにより、マウス PIWI ファミリータンパクのひとつである MIWI2 が重要な機能を有していることが明らかになった。しかし、その詳細な分子機構は不明のままである。また、piRNA の産生機構は非常に複雑で、少なくとも 20~30 種類ものタンパクが関与するが、それらの相互関係や、生合成におけるミトコンドリアの関与などはよくわかっていない。

このように、遺伝情報を次世代に伝える唯一の細胞である生殖細胞のゲノム維持において極めて重要な位置を占めるレトロトランスポゾンの発現制御という現象は、生命科学における非常に重要なテーマであるにもかかわらず、その制御機構の詳細は未解明のまま残されている。そこで、piRNA がどのようにして *de novo* DNA メチル化を誘導するかについての分子機構と piRNA の産生機構の解明をめざした研究、さらには、DNA メチル化に異常のある精子の発生に及ぼす影響の研究を展開することを目的に本研究を提案する。

2. 研究の目的

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、DNA メチル化とヒストン修飾から成り立っている。いずれも、発生・分化に伴って大きく変化するが、とりわけ、初期胚および生殖細胞の発生・分化においてダイナミックに変化することが知られている。我々の研究室では、初期胚および生殖細胞の DNA メチル化制御についての研究をおこなってきた。本研究では、その成果に基づき、piRNA による遺伝子発現制御機構、および、piRNA の生合成を中心に、マウス雄性生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの発現抑制機構についての研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) piRNA 産生および piRNA 依存的な遺伝子発現制御に関与するタンパク質の機能解析

これまでに、piRNA 産生および piRNA 依存的な遺伝子発現抑制において機能するタンパク質を同定し、その機能解析をおこなってきた。その延長として、piRNA 産生および piRNA 依存的な遺伝子発現抑制に重要な機能を有するタンパク質である MIWI2 に結合するタンパク質の探索をおこなう。そのために、すでに作製してある MIWI2 を含む融合タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを利用した。また、この方法によって同定されたタンパク質については、その欠損マウスなどを用いることにより、piRNA 産生ならびに piRNA 依存的な遺伝

子発現抑制における機能を解析する。

我々がすでに報告していた、MIWI2 と同様に piRNA 産生および piRNA 依存的遺伝子発現抑制に必須なタンパク質である MILI に結合しリゾフォスファチン酸の代謝に関与するミトコンドリア外膜の酵素である GPAT2 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 2) を欠損するマウスを作製し、GPAT2 の piRNA 産生および piRNA 依存的遺伝子発現抑制における機能を解析する。

(2) 人為的 piRNA 産生システムを用いた piRNA 依存的遺伝子発現抑制の解析

我々は、センス鎖とアンチセンス鎖を胎生期の雄性生殖細胞に発現させることにより人為的に piRNA を産生させ、DNA メチル化による遺伝子発現抑制を誘導できること、および、胎生期雄性生殖細胞において発現して piRNA 依存的 DNA メチル化に必須である Dnmt3L 遺伝子のアンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウスを作製することにより、Dnmt3L の piRNA 依存的な発現抑制を誘導できること、を報告してきた (Itou D et al, Curr Biol 2015)。

上記 のトランスジェニックマウスにおいて、piRNA の産生がどのようにおこなわれているのか、また、その分子メカニズムがどのようなになっているのかを、トランスジーン挿入部位、コピー数などの解析から明らかにする。

4. 研究成果

(1) GPAT2 欠損マウスにおける piRNA 産生異常と精子形成の異常

GPAT2 欠損マウスは、LTR 型レトロトランスポゾンである IAP および non-LTR 型レトロトランスポゾンである Line-1 いずれの piRNA 産生が低下し、それにより引き起こされる遺伝子サイレンシングが抑制されていた。また、パキテン期における精原細胞にアポトーシスが生じて赴任になることも明らかになった。

これらの表現型は、piRNA 産生に異常を来す MILI 欠損マウスとほぼ同様であった。しかし、GPAT2 欠損マウスは、さらに新生仔期における精原細胞のアポトーシスも認められた。このことは GPAT2 が piRNA 産生だけでなく、おそらく脂質代謝を介しても精子形成に機能することを示唆している。この成果は *Biology of Reproduction* 誌に報告した。

(2) MIWI2 結合タンパク質としての MORC3 の同定とその機能解析

MIWI2 を含む融合タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを用いることにより、MIWI2 タンパク質に結合するタンパク質として、遺伝子発現調節に関与する核内タンパク質である MORC3 を同定した。雄性生殖細胞特異的に MORC3 を欠損するマウスを作製、解析したところ、胎生期生殖細胞において、レトロトランスポゾン遺伝子の発現が抑制されていることを明らかにした。また、そのマウスでは、piRNA 前駆体の転写産物の減少が認められた。これらの結果から、MORC3 は piRNA 産生の一次段階において重要な役割を有していること、さらに、その欠損マウスでは、piRNA 産生が結果として減少するために piRNA の産生量が低下し、レトロトランスポゾン遺伝子の de novo DNA メチル化が抑制されるがわかった。この結果は、piRNA 産生の初期段階に MORC3 が制御因子として機能することを示している。しかし残念ながら、その分子機構が MIWI2 との結合と何らかの関係があるかどうかは不明なまま残された。また、この成果を *Scientific Report* 誌に報告した。

(3) 人為的 piRNA 産生システムを用いた piRNA 依存的遺伝子発現抑制の解析

Dnmt3L 遺伝子のアンチセンス鎖を発現するトランスジェニックマウスのトランスジーン挿入部位を解析したところ、18番染色体上の二カ所 (B3領域とE1領域) に挿入されてお

り、これら二つの領域は弱いpiRNA産生能力のある領域であることがわかった。兄妹交配により、これらの挿入領域を片方だけ有するトランスジェニックマウスを作製し、それぞれのマウス、TG-BマウスとTG-Eマウスの解析をおこなった。

予想外のことに、TG-BマウスではDnmt3Lの発現抑制が生じ、精子形成に異常が見いだされたが、TG-Eマウスでは精子形成が正常であった。さらなる解析の結果、Dnmt3Lの発現抑制は、挿入されたトランスジーンの数に依存的事であることがわかった。さらに、Dnmt3Lの発現抑制は、DNAメチル化によるものではないことが明らかになった。これらの結果から、胎生期雄性生殖細胞におけるpiRNA依存的な遺伝子発現の抑制は、DNAメチル化ではなく、転写後抑制によるものであると示唆された。また、これらの成果は、RNA誌に論文発表をおこなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiromoto Yusuke, Kuramochi-Miyagawa Satomi, Nagamori Ippei, Chuma Shinichiro, Arakawa Tatsuhiko, Nishimura Toru, Hasuwa Hidetoshi, Tachibana Taro, Ikawa Masahito, Nakano Toru	4. 巻 101
2. 論文標題 GPAT2 is required for piRNA biogenesis, transposon silencing, and maintenance of spermatogonia in mice†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 248 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kojima-Kita Kanako, Kuramochi-Miyagawa Satomi, Nakayama Manabu, Miyata Haruhiko, Jacobsen Steven E., Ikawa Masahito, Koseki Haruhiko, Nakano Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 MORC3, a novel MIWI2 association partner, as an epigenetic regulator of piRNA dependent transposon silencing in male germ cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98940-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Lee SePil, Kuramochi-Miyagawa Satomi, Nagamori Ippei, Nakano Toru	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of transgene insertion loci and copy number on <i>Dnmt3L</i> gene silencing through antisense transgene-derived PIWI-interacting RNAs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 683 ~ 696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.078905.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------