

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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010-2011

課題番号：22770210

研究課題名（和文）生殖幹細胞 tudor-piwi 複合体を介する small RNA-エピゲノム制御

研究課題名（英文）Small RNA and epigenetic control of the tudor-piwi pathway in the germline

研究代表者

中馬 新一郎 (CHUMA SHINICHIRO)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20378889

研究成果の概要（和文）：*piwi* および *tudor* 遺伝子は生殖細胞に特徴的な piRNA 産生に機能し、レトロトランスポゾン活性の抑制に必要である。本研究ではマウス *tudo-piwi* 複合体の解析により新たに同定された複数の因子の解析を進め、生殖幹細胞における RNA、エピゲノムレベルのレトロトランスポゾン抑制に重要な役割を担う分子機構を明らかにした。Piwi スライサー活性変異体の解析を通じて同活性の生理機能と piRNA 生成に重要な基質 RNA の相補性ルールを明らかにした。生殖幹細胞株を用いた *piwi* 経路の培養実験系の解析を共同研究を通じて進めると共に同細胞株のマルチオミクス解析を行った。これらの研究は生殖細胞ゲノムをトランスポゾンから保護する分子メカニズムの解明に大きく寄与する成果である。

研究成果の概要（英文）：The *piwi-tudor* pathway is essential for piRNA biogenesis and it acts to suppress retrotransposons in the germline. In this study, we carried out mass spec and high throughput sequencing analyses of the *piwi-tudor* complex and identified novel factors that function to control retrotransposons in germline stem cells at RNA and epigenetic levels. Genetic and biochemical analyses of a mutant of a mouse *piwi* revealed (1) an essential and physiological role of the *piwi* slicer activity in the germline and (2) a complementarity dependent rule required for the slicer activity mediated piRNA biogenesis. In a collaborative work, we characterized *piwi* pathway operation in an established cell line of spermatogonia and carried out multi-omics analyses. These results provide novel insights into key mechanisms that protect the germline genome from transposon activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、ゲノム、RNA

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は遺伝情報を次世代に伝え、個体発生の起点となる細胞系譜であり、そのゲノム DNA は発生分化プロセスを通じて安定に維持、継承される必要が有る。高等生物ゲノムの大部分はトランスポゾンもしくは類縁配列が占め（哺乳類では全ゲノムの約 40-50%）、これらトランスポゾン配列はゲノムサイズの拡大やクロマチン構造の進化等に寄与する一方、その転移活性は遺伝情報を破壊し DNA 障害を誘起する事から、生殖系列では特に厳密にコントロールされる必要がある。研究代表者はマウス生殖顆粒の構成蛋白質をコードする *tudor* 遺伝子群 *Tdrd1*, *6*, *7*, *9* を同定し遺伝子改変マウスを作製した所、いずれも雄生殖細胞の分化過程に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1, TDRD9 は argonaute サブファミリーに属する piwi 蛋白質 MILI, MIWI2 と遺伝的、物理的に相互作用し、LINE1 等のレトロトランスポゾン活性を抑制する事が明らかとなった。MILI, MIWI2 はレトロトランスポゾンのセンスおよびアンチセンス配列を持つ RNA から primary および secondary piRNA を産生する feed-forward サイクルで中心的な役割を担う。TDRD1, TDRD9 はこの piRNA 生成過程に機能的に必要であり、TDRD1-MILI および TDRD9-MIWI2 はそれぞれ独立した RNP 複合体を形成する。興味深い事に *Tdrd1*, *Tdrd9*, *Mili*, *Miwi2* 遺伝子改変マウスはいずれもレトロトランスポゾン RNA が抑制されるだけではなく、ゲノム DNA 中のレトロトランスポゾン制御領域の de novo CpG メチル化が成立しない。分裂酵母や植物では small non-coding RNA が相補鎖認識を通じてクロマチンリモデリング因子等

をゲノム標的配列にガイドしヘテロクロマチン形成もしくは維持に働く事が明らかとなっている。しかし動物細胞、特に哺乳類では内在性 small RNA によるエピゲノム制御システムは殆ど実証されていない。本研究計画は生殖細胞ゲノムをレトロトランスポゾン活性から保護する tudor-piwi 経路の詳細な解析を進め、動物細胞において small RNA とエピゲノム制御を繋ぐ分子基盤の解明に貢献する事を目指す。

2. 研究の目的

tudor および *piwi* 遺伝子は生殖系列に特徴的な piwi 結合 small RNA (piRNA) 産生に機能し、レトロトランスポゾンの RNA 制御および de novo DNA メチル化に必要である。TDRD1 と MILI, TDRD9 と MIWI2 蛋白質は各々異なった RNP 複合体を形成し、これら tudor-piwi 複合体の相互作用が piRNA のセンス、アンチセンス鎖の feed-forward 生成サイクルに働く事が示唆されている。しかし tudor-piwi 複合体の詳細な分子構成、生化学機能および piRNA 経路とエピゲノム制御に関わる分子基盤は明らかになっていない。本研究計画では生殖細胞の tudor-piwi 複合体の包括的解析を進め、新たな機能分子の同定と解析を進める事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画ではマウス tudor-piwi 複合体の構成分子同定と機能解析および tudor-piwi 経路を介するエピゲノム制御について研究を進める。具体的には(1) tudor-piwi 複合体の包括的プロテオミクスと piRNA の次世代シークエンス解析、(2) tudor-piwi 複合体の slicer 活性検出と in vitro piRNA 生合成の

再構成、(3) 樹立生殖幹細胞株を用いた piRNA 経路の培養実験系の構築、を行う。研究の過程で得られた機能未知遺伝子群についてはノックアウトマウスの作出、収集とトランスポゾン制御、piRNA 生合成、エピジェネティクス制御、piwi-tudor 複合体の解析と生化学アッセイを中心に研究を進め、生殖細胞のゲノム保護機構に関わる piRNA 経路の新たな機能分子の同定と分子パスウェイを理解する事を目指す。

4. 研究成果

本研究ではマウス tudor-piwi 複合体の解析により新たに同定された複数の因子の遺伝学的、生化学的解析を進め、生殖幹細胞における RNA、エピゲノムレベルでのレトロトランスポゾン抑制に重要な役割を担う新規遺伝子群を明らかにした。特に RNP 複合体の形成から精原幹細胞のエピゲノム制御に繋がる重要な経路で働く新たな因子を同定した。Piwi スライサー活性変異体の解析を通じて同活性の生殖細胞分化における生理機能を明らかにすると共に、合成 RNA 基質と精製 PIWI 複合体を用いて piRNA 生成に重要な piRNA-target RNA の相補性ルールを明らかにした。また生殖幹細胞株を用いた piwi 経路研究の為に培養実験系の特性解析を共同研究を通じて進めると共に同細胞株のマルチオミクス解析を行った。また dara driven 型研究と併行して candidate gene approach により tudor-piwi 複合体とエピゲノム制御の連携を示唆する分子経路の予備的データを得た。これらの結果は生殖細胞ゲノムをトランスポゾンから保護する piwi-small RNA システムの全体像の解明に大きく寄与する研究成果である。

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 7 件)

全て査読有り

- 1: Pillai RS, Chuma S. piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Dev Growth Differ*. 2012 Jan 6. doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01320.x.
- 2: Morozumi Y, Ino R, Takaku M, Hosokawa M, Chuma S, Kurumizaka H. Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMC1-mediated homologous pairing. *Nucleic Acids Res*. 2012 Apr;40(7):3031-41.
- 3: Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, Antony C, Sachidanandam R, Pillai RS. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*. 2011 Nov 27;480(7376):264-7. doi: 10.1038/nature10672.
- 4: Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, Kitamura K, Yamanaka H, Kondoh G, Okawa K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sachidanandam R, Hannon GJ, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 28;108(26):10579-84.
- 5: Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce

T, Nakano T, Nakatsuji N, Lin H, Sasaki H. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. Dev Cell. 2011 Mar 15;20(3):364-75.

6: Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, Saitou M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. J Cell Biol. 2011 Mar 7;192(5):781-95.

7: 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. 2010 May;24(9):887-92.

[学会発表] (計 3 件)

1:Shinichiro Chuma. Mammalian tudor related genes in the male germline. 44th Meeting of SSR (7.31-8.4.2011, Portland)

2:Shinichiro Chuma. Germline tudor genes, germinal granules and spermatogenesis in mice. CSHA conference (10.11-15.2011, Suzhou, China)

3:Shinichiro Chuma. Germline tudor family genes, retrotransposon silencing and spermatogenesis in mice. 日本分子生物学会 第 34 回年会 (12.16.2011、横浜)

[図書] (計 0 件)

該当無し

[産業財産権]

該当無し

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc01/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中馬 新一郎 (CHUMA SHINICHIRO)
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号: 20378889