

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790225

研究課題名（和文） レトロトランスポゾンの抑制に関与する新規遺伝子 Cue110 の機能解析

研究課題名（英文） Functional Analysis of a novel gene, Cue110, involved in retrotransposon suppression

研究代表者 能村 卓慈（YOSHIMURA TAKUJI）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10506231

研究成果の概要（和文）：

マウス胎児期精巣における生殖細胞では、レトロトランスポゾンという変異原が発現するため、それが生体の設計図であるゲノムを傷つけてしまうのを防御する機構が存在する。本研究では、その機構において *Cue110* 遺伝子産物が他の関連遺伝子産物と相互作用して重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In mouse germ cells of prenatal testis, there is a mechanism to protect own genome, a plan of the living body, from mutagens called as retrotransposons, which express from own genome and damage it. In the current study, I revealed that a product encoded by a *Cue110* gene associates with other related gene products, and plays important role for the defencing mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：生殖細胞、レトロトランスポゾン、piRNA、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、生殖細胞の分化の過程においてゲノム全体の DNA メチル化が大きく変化する。マウスの精子形成過程では、E10.5～13.5 の生殖細胞においてゲノムの脱メチル化が起こり、E15.5～18.5 においてメチル化の再獲得が生じる。この時期に、piRNA pathway と呼ばれるレトロトランスポゾン抑制機構

が存在する。レトロトランスポゾンは、転写・逆転写を介してゲノム上の別の場所に転移することができる DNA 配列であり、真核生物種のゲノムに普遍的に存在する。特に生殖細胞における piRNA pathway は、次世代ゲノムの安定性を確保するために必須な防御機構である。piRNA pathway は、特定のゲノム領域に由来する primary piRNA やレトロトランスポゾン mRNA 由来の piRNA が processing

および増幅系 (sense, antisense piRNA が相補性を利用して増幅される過程) を経て、核へ輸送され、piRNA 配列と相同なレトロトランスポゾン領域を最終的にメチル化する過程であると考えられている (Aravin et al., Genes Dev. 22, 970-975, 2008)。この過程のどこかで異常が起こるとレトロトランスポゾンの抑制不全が起こる。

我々は、体細胞で発現せず、ES 細胞・生殖組織で発現する遺伝子をスクリーニングし、それらを *Cue* 遺伝子群とした。このうちの一つであるマウス *Cue110* 遺伝子は、進化的に *C. elegans*, *Drosophila* から保存され、新規遺伝子ファミリー *UPF0224* に属する。他の種を含めて、このファミリー遺伝子の中で機能解析されたものは無かった。また、マウス *Cue110* 遺伝子がコードするタンパク質は、RNA との結合活性を有する Zn-finger ドメイン (CHHC type) を持ち、その発現は生殖細胞に限局していた。具体的には、マウス *Cue110* mRNA は、体細胞では発現せず、E13.5 から生殖細胞で発現を開始し、成獣精巣及び卵巣にまで、その発現は持続していた。マウス CUE110 タンパク質は、胎仔前精原細胞、精母細胞、および円形精子細胞の細胞質において顆粒状に局在した (Yoshimura et al., Gene Expr. Patterns 8, 27-35, 2007; Yoshimura et al., Dev. Biol. 335, 216-227, 2009)。

生体内におけるマウス *Cue110* 遺伝子の機能を調べるために、*Cue110*^{-/-}マウスを作製した。^{-/-}マウスは、^{+/-}マウス雌雄の交雑でメンデルの法則に従って生まれ、正常に発育するものの、雄性不妊を示した。*Cue110*^{-/-}マウスの精巣は、野生型のものとは著明な萎縮を認め、組織学的な解析から、減数分裂初期の精子形成に障害を有することが分かった。マーカータンパク質を用いた詳細な解析では、*Cue110*^{-/-}マウスの精巣における減数分裂期の生殖細胞は、ザイゴテン期以降への進行を認めなかった (Yoshimura et al., Dev. Biol. 335, 216-227, 2009)。このように、マウス *Cue110* 遺伝子は、雄の減数分裂の正常な進行にとって必須な役割を担っている。また、*Gtsf1*^{-/-}マウス成獣精巣では、RTP の発現が上昇し、そのプロモーターにお

ける CpG のメチル化レベルが低下していた (Yoshimura et al., Dev. Biol. 335, 216-227, 2009)。それ故、*Gtsf1* は、精巣におけるレトロトランスポゾン抑制機構に必須な遺伝子の一つである。

2. 研究の目的

レトロトランスポゾンは、逆転写を介して、ゲノム上のある部位から他の部位に転移することのできる多種多様な DNA 配列であり、あらゆる生物種に普遍的に存在する。特に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は、次世代ゲノムの安定性を確保するために必須な防御機構である。本研究では新規遺伝子 *Cue110* とレトロトランスポゾン発現抑制に関与する因子群との関係を明らかにし、雄生殖細胞におけるレトロトランスポゾン発現抑制機構の中で *Cue110* が果たす役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

レトロトランスポゾン抑制機構は、primary piRNA の転写に始まり、primary piRNA は細胞質へ輸送され、processing および増幅系 (sense, antisense piRNA が相補性を利用して増幅される MILI が関与する過程) を経て、核へ輸送され (MIWI2 が関与する過程)、piRNA 配列と相同な領域を最終的にメチル化する過程であると考えられている

(Aravin et al., Genes Dev. 22, 970-975, 2008)。この過程のどこかで異常が起こるとレトロトランスポゾンの抑制が効かなくなると考えられる。本研究では、CUE110 タンパク質がこの過程の中のどこで働いているのかを知るために、まず *Cue110*^{+/-}および^{-/-}マウスの精巣において、piRNA の発現量および組成の変化、関連タンパク質の発現および局在変化を調べた。それと同時に、CUE110 タンパク質と直接相互作用する因子を調べた。

1) CUE110 タンパク質が局在する細胞質構造体 Nuage はタンパク質と RNA の複合体であり、分子どうしがお互いに直接相互作用して機能し、piRNA の増幅や processing を行つて

いると考えられる。そのため、一つの構成因子の欠失が系全体あるいは他のタンパク質の局在パターンに影響を与える。実際に nuage に局在してレトロトランスポゾンの抑制機構に関係するいくつかのタンパク質は、その欠失により、他のタンパク質局在に影響を与えることが知られている。これらの観察はタンパク質どうしの機能的なつながりの深さを知る上で重要である。同様に、CUE110 欠失によって細胞内局在パターンが変化するタンパク質が存在する可能性が考えられるので、*Cue110*^{-/-} E16.5~18.5 精巣組織に対し、nuage 局在タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を施行した。

2) これまでの報告では、レトロトランスポゾン抑制機構に関わるタンパク質は、nuage に共局在し、関連タンパク質間で結合パートナーをもつ。精巣タンパク質から CUE110 抗体と免疫沈降するタンパク質を分画、単離し、質量分析装置を用いて、結合タンパク質の候補を同定した。結合タンパク質の候補は、細胞培養系で Myc や Flag タグ付きのタンパク質を発現させ、その結合を確認した。

3) MILI および MIWI2 は piRNA の processing および増幅系の中心メンバーで、piRNA と直接結合する。MILI と結合する TDRD1、および MIWI2 と結合する TDRD9 の欠失により、MILI に結合する piRNA の組成が変化すると報告されている。同様に、CUE110 の欠失により piRNA の組成が変化するかどうかを調べるために、*Cue110*^{-/-}マウスの精巣および野生型精巣における MILI に結合する piRNA の配列を deep sequencing した。

4. 研究成果

CUE110 タンパク質がレトロトランスポゾン抑制機構の中で果たす分子メカニズムの解析で、主に次の3つの成果を得た。

1) レトロトランスポゾンの抑制に関わる nuage 局在タンパク質の CUE110 タンパク質欠失に伴う局在変化

CUE110 タンパク質欠失に伴い、pi-body と呼ばれる顆粒に局在するタンパク質の局在は変化しなかったが、piP-body と呼ばれる顆粒に局在するタンパク質、MIWI2、TDRD9、MAEL の正常な局在が失われていた。これは、CUE110 タンパク質は piP-body の機能に深く関わり、MIWI2、TDRD9、MAEL が正常に機能するために重要である可能性を強く示唆している。

2) CUE110 タンパク質と直接相互作用するタンパク質の同定

免疫沈降法と質量分析法を用いて、CUE110 と相互作用するタンパク質として、TDRD9 と HSPA2 を同定した。この2つのタンパク質は、それぞれの欠失したノックアウトマウスにおいて、CUE110 タンパク質が欠失した場合と非常に類似した表現型を示すため、CUE110 タンパク質の機能と深く関わる可能性が高い。

3) CUE110 の欠失が piRNA 発現に影響を及ぼすか否か、及ぼすならばその変化はどのようなものか

CUE110^{-/-}および^{+/-}マウスの E17.5 精巣から RNA を抽出し、Small RNAs の Deep sequencing を行った。その結果、MILI に結合する piRNA に変化はないものの、MIWI2 に結合する piRNA は減少または消失している可能性が示唆された。この結果を追認するために、*CUE110*^{-/-}および^{+/-}マウスの E17.5 精巣から、免疫沈降法により MIWI2 に結合する piRNA を精製し、2 者の比較を行っている。この結果は、CUE110 は piRNA を MILI から MIWI2 へ受け渡す際に必須な役割を果たしている可能性を示している。2) の結果と合わせて考察すると、CUE110 は TDRD9 を介して MIWI2 の機能に影響を与えている可能性が考えられた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

能村卓慈、精巣におけるレトロトランスポゾン発現抑制に関与するマウス *Cue110* 遺伝子

の機能解析、日本分子生物学会、2011 年 12
月 13 日、神奈川県横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能村 卓慈 (YOSHIMURA TAKUJI)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10506231

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：