

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：24770167
研究課題名(和文)小分子RNAによるDNAメチル化機構

研究課題名(英文)small RNA mediated DNA methylation

研究代表者

永森 一平 (Ippei, Nagamori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20624729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：レトロトランスポゾン(RETROTRANSPOSON)はゲノムDNAの40%前後を占めており、DNAのメチル化を介したこれらの発現抑制が哺乳類において必須であることが広く知られている。雄性生殖細胞の分化過程において、ゲノム全体のDNAのメチル化が一旦消去され、再度レトロトランスポゾン領域など、特定の部位特異的にメチル化が導入される。この部位特異性の規定に寄与している遺伝子として、MiliとMiwi2と遺伝子が同定されているが、その詳細な分子機構は明らかにされていなかった。私は本課題において、MILI、MIWI2がどのようにレトロトランスポゾン特異的にDNAのメチル化を導入しているか、の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Retrotransposon occupies approximately 40% of genome DNA, and it is widely known that DNA methylation mediated retrotransposon repressions are critical for mammal. During male germ cell differentiation, DNA methylation is globally erased, followed by obtaining DNA methylation at site specific manner, including Retrotransposon. Since DNA methylation causes gene repression, site specificity of DNA methylation is critical, however, it remains elusive how site specificity of DNA methylation is determined. By genetic analysis, Mili and Miwi2 were identified as important genes for to determine site specificity for DNA methylation, however, the precise molecular mechanisms are largely unknown. In this project, I have reported how MILI and MIWI2 contribute to site specificity of DNA methylation for retrotransposon

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物

キーワード：DNAメチル化 PIWI MILI MIWI2 piRNA レトロトランスポゾン 核膜

1. 研究開始当初の背景

レトロトランスポゾン(RET)はゲノム中の約40%を占めており、これらの発現を抑制することは、多くの生物種において必須である。哺乳類におけるレトロトランスポゾン抑制機構の一つとして、DNAのメチル化が必須の役割を担っていることが知られている。体細胞では、DNAメチル化が一旦樹立されると安定に維持されるが、胎生期における雄性生殖細胞では、ゲノム全体のグローバルな脱メチル化が起こり、引き続いてレトロトランスポゾン領域など、部位特異的にDNAのメチル化が獲得される。この様に、雄性生殖細胞では、特異的なDNAメチル制御機構が存在しているが、どのようにして、レトロトランスポゾン領域特異的にDNAのメチル化が導入されているか、その分子機構はほとんど明らかになっていない。

近年、遺伝学的な解析から、申請者の所属する研究室から、生殖細胞特異的な発現を示す二つの遺伝子、*Mili*、*Miwi2*欠損マウスでは、一部のレトロトランスポゾン領域特異的にDNAのメチル化に異常を示すことが報告された。MILI、MIWI2タンパク質は低分子RNA(piRNA)をガイドとして利用していること、これらのpiRNAは*Mili*、*Miwi2*欠損マウスでメチル化に異常が起こるレトロトランスポゾン由来のRNAが大部分を占めることなどから、DNAメチル化の部位特異性の規定に、MILI、MIWI2とpiRNAが寄与していると考えられている。

piRNAの産生機構として、遺伝学的な解析と次世代シーケンサーを用いた包括的な解析の組み合わせから、下記の様なモデルが提唱されている。

1、未同定の長鎖piRNA前駆体からMILIを含む複合体によって、piRNAが産生される(一次生成)。このとき産生されるpiRNAは1stUの比率が高い。

2、一次生成によって産生されたpiRNAと相補的な配列を持つRNAが、MILI-piRNA複合体によって切断され、MIWI2に受け渡される。このとき産生されるpiRNAは1stUに対応する形で10thAの比率が高い。更にMIWI2-piRNA複合体が相補的な配列を持つRNAを切断し、MILIに受け渡すことにより、piRNAを増幅する(二次生成)。

3、piRNAを受け渡されたMIWI2のみが核内に移行でき、レトロトランスポゾン領域のDNAメチル化に寄与している。

上記の様に、piRNAの産生過程において、MILI-piRNA複合体とMIWI2-piRNA複合体の二種類の複合体が形成されるが、これま

での解析から、MIWI2-piRNA複合体のみが核内に移行していると考えられている。しかしながら、*Miwi2*欠損マウスでは正常だが、*Mili*欠損マウスでのみメチル化に異常のある領域が報告された(Watanabe 2011 Science)。このことから、我々はMIWI2-piRNAのみならず、MILI-piRNA複合体も核内に移行し、メチル化の部位特異性の規定に寄与している、という仮説を立てた。この様に、これまで考えられてきた、piRNAの産生はMILIとMIWI2の両者が、DNAのメチル化はMIWI2-piRNAのみが寄与している、というモデルでは説明できない現象が報告されつつあり、未解明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、生殖細胞特異的な現象である部位特異的なDNAメチル化導入機構を明らかにすることを目的とし、この過程に寄与していると考えられているMIWI2-piRNA複合体と、これまでDNAのメチル化には直接寄与しないと考えられてきたMILI-piRNA複合体がどのように部位特異的なDNAのメチル化の導入の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

MIWI2と同様にMILIも核内に移行しているか、を検証するために生化学的手法によって、胎仔期精巣におけるMILIの局在を観察する。同時にMIWI2の局在も観察し、MILIの局在と比較した。更にMILI、MIWI2の局在におけるRNAの役割を検証するために、RNase処理した胎仔期精巣から生化学的な分画を行った。

Mili、*Miwi2*欠損精巣において、DNAメチル化異常を示すレトロトランスポゾンを包括的に同定するために、PBAT(Post-Bisulfite adaptor tagging)法を行った。(この実験は東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの小林久人准教授との共同研究として行った。)piRNAの標的の大部分はトランスポゾンであることから、本研究においては、トランスポゾン領域のみに着目し、包括的な解析を行った。

4. 研究成果

生化学的手法によって、胎仔期精巣を細胞質、クロマチン、核質、核マトリクスの4種類に分画した。MIWI2は細胞質に加えて、核内のクロマチンと核マトリクスへの局在を確認できた。このMIWI2の核内移行は*Mili*欠損精巣において完全に阻害されていた。この結果はこれまでの報告と一致していることから、この生化学的な分画の信頼性を表している。MIWI2の核内移行に加えて、我々の仮説通り、MILIの核内移行(クロマチンと核マトリクスへの局在)も確認できた。MILIの核内移行は、*Miwi2*の欠損精巣にお

いても観察されたことから、MILI-piRNA 複合体は、*Miwi2* 欠損生殖細胞においても、核内で何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

piRNA が産生されない *Mili* 欠損精巣では、MIWI2 の核内移行が消失することから、少なくとも MIWI2 は piRNA を介して、その局在が制御されている可能性が高い。そこで、MIWI2、および MILI の局在における RNase 感受性を検証した。この目的のために、一本鎖 RNA 特異的に切断する RNase A、あるいは RNA/DNA ヘテロ二本差を特異的に切断する RNase H の 2 種類の RNase で処理後に、同様に分画した。その結果、MILI、MIWI2 の両者ともに RNase A 処理によって、核マトリクスへの局在が完全に阻害されたが、RNase H 処理では影響がなかった。このことから、少なくとも部分的に一本鎖 RNA を含む nascent RNA を標的として、MILI-piRNA、MIWI2-piRNA 複合体がレトロトランスポゾン領域に結合している可能性が考えられる。注目すべきことに、この結果は MILI/MIWI2-piRNA 経路による DNA メチル化導入と核マトリクスの関連性を示唆している。

Mili、*Miwi2* 欠損マウスにおいて、DNA のメチル化に異常のあるトランスポソンを包括的に同定するために、Oct-GFP の蛍光を指標にして、生後 10 日齢の精巣から生殖細胞を精製した。精製した生殖細胞から DNA を抽出し、PBAT 法と次世代シーケンサーを用いて、メチル化解析を行った。その結果、*Mili*、*Miwi2* 欠損生殖細胞の両者で共通して、DNA メチル化が減少しているトランスポソンと、*Mili* 欠損生殖細胞でのみメチル化の減少しているトランスポソンを見出した。

これまでの報告と一致して、*Mili*、*Miwi2* 欠損生殖細胞の両者で DNA のメチル化に異常があったトランスポソンとして、Line1 を同定した。Line1 は全長約 6kb の non-LTR 型レトロトランスポソンであり、転写制御領域を含む 5'UTR、1-2 個の ORF、3'UTR から成る。これらの中で、*Mili*、*Miwi2* 欠損生殖細胞でメチル化に異常がある領域は 5'UTR に限定されていた。更に胎仔期精巣で発現している piRNA をトランスポソンにマッピングした所、これまでの報告と一致して、Line1 の 5'UTR に有意に多くマップされた。このことから、piRNA によってリクルートされる Line1 内の 5'UTR を中心に DNA のメチル化が導入されていることが示唆された。

Line1 レトロトランスポソンには複数のタイプがあり、これらの ORF の保存度は非常に高いが、5'UTR 領域の保存度は低い。これまでの先行研究では、*Mili*、*Miwi2* 欠損精巣でメチル化に異常のある Line1 として、L1MdTf と L1MdA タイプが報告されている。更にこれらの二つのタイプの Line1 にはそれ

ぞれ 3、7 個のサブタイプ (L1MdTf-I ~ III と L1MdA-I ~ VII) が存在し、piRNA の制御化で DNA のメチル化が導入されるものと、そうでないものがあった。

続いて、Line1 サブタイプ毎に *Mili*、*Miwi2* 欠損精巣における DNA メチル化の減少幅と野生型胎仔精巣における piRNA の発現を比較することによって、piRNA と MILI、MIWI2 依存的な DNA メチル化導入の関連性をより詳細に検証した。この結果、*Mili*、*Miwi2* 欠損生殖細胞において、DNA メチル化の減少幅が大きいものほど、野生型における piRNA の発現量が高いことを見出した。このことから piRNA がガイドとして MIWI2 複合体をリクルートできるレトロトランスポゾン領域に、部位特異的に DNA のメチル化を導入していることを示している。

Mili、*Miwi2* 欠損生殖細胞の両者でメチル化に異常のある領域 (Line1) に加えて、*Miwi2* 欠損マウスでメチル化に異常がないが、*Mili* 欠損生殖細胞特異的にメチル化異常のあるレトロトランスポソンを同定した。*Mili*、*Miwi2* 欠損生殖細胞の両者でメチル化異常が観察されたトランスポソンは non-LTR 型の Line1 のみであった一方で、*Mili* 欠損生殖細胞特異的にメチル化異常のあったトランスポソンは LTR 型に限定されていた。

これらのことから、MIWI2-piRNA 複合体は non-LTR 型のレトロトランスポソンである Line1 ファミリーを主な標的とし、MILI-piRNA 複合体は LTR 型のトランスポソンを主な標的としている可能性が示唆された。今後はこの研究を展開することによって、胎仔期精巣における DNA メチル化の部位特異性が規定される分子機構とその意義を明らかにしていきたい。

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 1 件)

Ubiquitin meets PIWI protein. Nagamori I, Nakano T, Asian J. Androl., 2013 **3**: 354-5

〔学会発表〕(計 件)

該当なし

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

該当なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

該当なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(永森 一平)

研究者番号：20624729

(2) 研究分担者

(該当なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(該当なし)

研究者番号：