

研究報告書

「small RNA とエピジェネティック制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：宮川 さとみ

1. 研究のねらい

RNAサイレンシングとは、small RNA(以下、小分子 RNA と表記)を介した遺伝子発現抑制機構であり、転写後抑制と転写抑制とが存在する。哺乳類において、小分子 RNA が、転写後抑制に重要な役割を担っていることはよく知られているが、転写抑制における機能は不明であった。しかし、我々は、マウス PIWI ファミリーが、piRNA (Piwi interacting RNA) とよばれる小分子 RNA を介して DNA のメチル化を制御し転写を抑制する、という新たなエピジェネティック遺伝子発現制御機構を見出した。本研究では、その成果を展開させ、小分子 RNA を介する遺伝子抑制機構、すなわちエピジェネティックな転写抑制機構の分子メカニズムの解明をおこなう。また、遺伝子欠損マウスや、欠損マウス由来の germ line stem cell (GS 細胞)を用いて、piRNA の生合成経路の解明をおこなう。

2. 研究成果

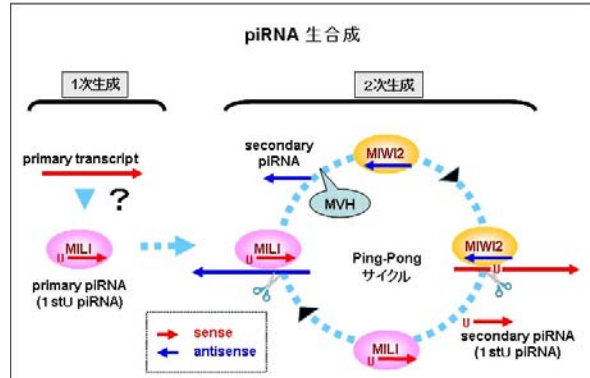
piRNA は、生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA である。piRNA は、哺乳類の胎生期においては、幼弱な雄性生殖細胞(ゴノサイト)で発現しており、遺伝子の DNA メチル化を介して、レトロトランスポソンの発現を抑制すると考えられている。胎仔期のゴノサイトにおける piRNA 生合成には MILI (Miwi like) および MIWI2 (Mouse Piwi 2) といったマウス PIWI ファミリー蛋白が関与しているが、その過程には不明な点がたくさん残されている。本研究期間内では、遺伝子欠損マウスや GS 細胞を用いて、マウスの piRNA 生合成に関する以下の知見を得た。

【1】 piRNA 産生とレトロトランスポソンの発現抑制における MVH の機能

VASA は、生殖細胞特異的に発現している DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼで、さまざまな生物において生殖細胞の発生・分化に必須であることが知られている。そのマウスホモログ MVH (mouse vasa homologue) は胎仔期から成体の生殖細胞で発現し、欠損オスマウスは精子形成が減数分裂初期で停止し不妊であることが知られていた。通常、レトロトランスポソンは胎仔期の精子形成過程において、その制御領域に DNA メチル化が獲得される。しかし、MVH 欠損マウスにおいてはその *de novo* DNA メチル化が低下し、レトロトランスポソン遺伝子の発現が上昇していた。これらの MVH 欠損マウスでみとめられた表現型は、MILI 欠損マウスおよび MIWI2 欠損マウスの表現型と酷似していた。また、胎仔期の精巣には、MILI および MIWI2 に結合する piRNA が存在しており、その piRNA の多くはレトロトランスポソンに対する配列を持つ。一方、MVH は piRNA とは結合しないが、欠損マウスにおいて piRNA の発現低下がみとめられた。

胎生期の雄性生殖細胞であるゴノサイトでは、レトロトランスポソンに対する piRNA は、一次生成過程 (primary processing) と二次生成過程 (secondary processing) によって産生される。まず一次生成過程により、レトロトランスポソン由来の転写産物から 5' 末端の塩基がウラシル

であるpiRNA (1stU piRNA) が切り出されMILIに結合する。二次生成過程では、MILIのRNA切断活性 (slicer活性) によって、piRNAと相補的なRNAが、piRNAの5'側から10番目の位置で切断される。その結果、10番目のヌクレオチドがアデニンであるpiRNA (10thA piRNA) が産生され、そのpiRNAがMIWI2に取り込まれる。MVH欠損マウスのゴノサイトでは、MILIに結合するpiRNAは存在していたが、MIWI2に結合するpiRNAは認められなかった。しかし、次世代シーケンサーによるpiRNAの網羅的解析の結果より、10thA piRNAの割合がコントロールと同様に高かったことから、二次生成のMILIのslicer活性によるRNAの切断は生じていると考えられた。以上の結果より、MVHはpiRNAの二次生成過程の初期の段階において機能することを明らかにした。

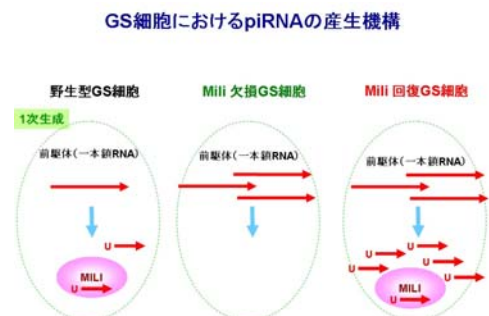


生殖細胞には古くより、ミトコンドリアとミトコンドリアの間に、inter-mitochondrial cement (IMC)と呼ばれる電子密度の高い顆粒が存在することが知られている。この IMC には、MILI および MVH が局在することが知られており、それぞれの欠損マウスにおいては、この IMC が消失していた。また、IMC は piRNA 産生のもととされていることから、MVH は piRNA 産生のもとである IMC の形成においても重要な役割を有している。

以上の結果は、“MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons” *Genes Dev.* 23, (24): 887-892 (2010) に報告した。

【2】GS 細胞を用いた piRNA 生合成経路の解析

Germline Stem Cell (GS細胞) は出生直後の精巣から樹立できる細胞株であり、その性質は精巣の精原細胞に相当する精巢性幹細胞である。本研究では、MILI欠損マウス由来のGS細胞を樹立し、MILIによるpiRNA産生機構の解析をおこなった。MILIを欠損する精巣では、レトロトランスポゾンに対するpiRNAの発現が障害され、レトロトランスポゾン遺伝子の転写調節領域におけるDNAメチル化が低下し、その転写産物の発現が上昇している。MILI欠損GS細胞を解析したところ、MILIを欠損するマウスと同様にLTRタイプのレトロトランスポゾンであるIAP遺伝子のDNAメチル化が低下しており、その転写産物の発現上昇が認められた。次にセンダイウイルスベクターを用いて、MILI欠損GS細胞にMili遺伝子を導入し、MILIの発現を回復させた細胞株 (MILI回復GS細胞) を樹立した。MILIの発現回復によって、IAP遺伝子のDNAメチル化とその発現抑制は回復できなかったが、MILI結合piRNAの発現は顕著に上昇した。

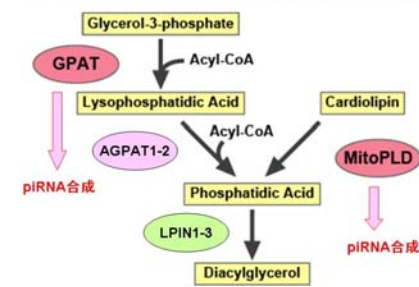


そこで、MILI回復GS細胞において発現する小分子RNAの網羅的解析をおこなったところ、piRNAの産生量が野生型に比較して約3倍に上昇しており、さらに、一次生成の結果産生されたと考えられる 1stU piRNA、特に、IAPレトロトランスポゾンに対する配列をもつ 1stU piRNAが

20 倍以上に増加していることが明らかになった。一方で、二次生成機構の結果生成される 10thA piRNAは野生型においてもMILI回復GS細胞においてもほとんど認められなかった。以上の結果は、GS細胞は、二次生成機構によるpiRNA産生はほとんど生じておらず、一次生成機構のみによってpiRNAを産出していること、および、MILIが一次生成機構においても重要な役割を担っていることを示している。同時に、MILI回復GS細胞は、哺乳類のpiRNAの1次生成機構を解析する上で、非常に有用な細胞であることが明らかとなった。

このGS細胞を材料として抗MILI抗体を用いて免疫沈降を行い、ミトコンドリアの外膜に存在するGPAT2(glycerol-3-phosphate acyltransferase 2)をMILI結合タンパクとして同定した。グルセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(GPAT)はグリセロ脂質合成の初期及び律速段階を触媒する脂質代謝酵素であり、GPAT2は精巣で非常に発現が高いことが知られていた。GS細胞におけるGPAT2の発現をノックダウンしたところ、piRNAの発現がMILI欠損GS細胞と同程度にまで低下したことから、GPAT2はpiRNAの一次生成に必須の分子であることが明らかとなった。これまでに、他のミトコンドリア外膜タンパクであり、脂質代謝に関わるMitoPLDがpiRNA合成に必須のタンパクであるとして報告されている(Watanabe et.al. *Dev Cell*. 23(3):364-75(2011))ことから、piRNA合成には脂質代謝、あるいはミトコンドリアへの局在が重要であると考えられた。

ミトコンドリアにおける脂質代謝とpiRNA合成



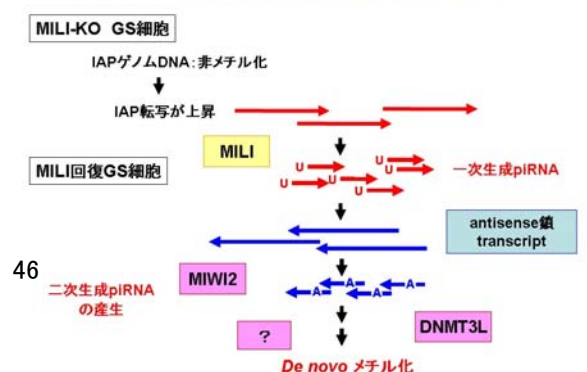
以上の結果は、“GPAT2, a Mitochondrial Acyltransferase, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells”(Shiromoto Y, et al.)として現在、投稿中である。

3. 今後の展開

小分子 RNA を介する遺伝子発現抑制機構の解析は、この 10 年余で飛躍的な進歩を遂げてきた。我々は、哺乳類において、piRNA の産生がレトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化に重要であり、RNA ヘリカーゼである MVH が piRNA の二次生成機構に関与していること、さらには、ミトコンドリアに存在する脂質代謝酵素である GPAT2 が piRNA 一次生成に関与していることを明らかにしてきた。しかし、哺乳類における詳細な piRNA の産生機構や、piRNA がどのようにして DNA メチル化を生じさせるのか、など、未解明な部分が多く、その詳細な分子メカニズムはこれからの課題である。

これまで、マウスにおける piRNA の生合成経路は、種々の遺伝子欠損マウスにおける piRNA の網羅的解析の結果と、ショウジョウバエでの生化学的解析の結果とを総合して間接的に推測されてきたにすぎない。これは、マウス個体から均一な生殖細胞を単離することが困難であること、piRNA を発現する哺乳類の細胞株が知られていなかったことなどにより、生化学的な実験が不可能に近かったためである。今回、GS 細胞において piRNA が発現していること、センダイウイルスベクターを用いることにより、効率よく同時に複数の遺伝子を GS 細胞に導入可能であること、を見いだしている。したがって、この実験系を

De novo メチル化の再構成系ができるか？



駆使することにより、piRNA の生成機構の解析を一気に進め、現時点でほとんど不明な哺乳類の piRNA 生成の分子機構の全容解明が可能ではないかと考えている。また、GS 細胞では、piRNA 生成過程の1次生成と2次生成とを分離して解析できることがわかってきたため、1 次生成過程の全貌を明らかにできるのではないかと考えている。さらに、GS 細胞への遺伝子導入により、2次生成によるpiRNA 合成の再構成、さらには、DNA のメチル化を誘導することができれば、現在ブラックボックスとなっている piRNA を介した新たな DNA メチル化獲得のメカニズムの解析にも一石を投じることができる。

4. 自己評価

哺乳類の小分子 RNA がエピジェネティックな抑制機構に関与する可能性を示したことから、本研究では、その成果を発展させ、piRNA を介した DNA メチル化機構を明らかにすることを目標にしてきた。残念ながらその目標に達することはできなかったが、一方で哺乳類の piRNA 生成過程の解明に GS 細胞株を用いた系を導入し、一次生成に必須の分子の同定をおこなうことができた。今後、その細胞系を用いて DNA メチル化を誘導する系を作り上げることができれば、piRNA を介する DNA メチル化を生化学的に解析することができる。今回、GS 細胞、特に MILI 回復 GS 細胞を樹立したことは、哺乳類の piRNA を解析するための有効なツールとして、意義深いと考えている。

5. 研究総括の見解

本研究者は、マウス PIWI ファミリーが小分子 RNA である piRNA を介し、DNA のメチル化を制御し転写を抑制するという、新たなエピジェネティック遺伝子発現制御機構を見出した。本研究は、この成果を基盤とし、小分子 RNA による転写抑制機構の分子メカニズムの解明を目指した。DNA メチル化機構を明らかにすることは出来なかったが、研究の過程で作製した、遺伝子欠損マウスや、欠損マウス由来の GS 細胞を用いて、piRNA の生合成経路の解明を行い、一次生成に GPAT2 が必須の分子であることを示したことは、高く評価出来る。本研究の中で樹立した細胞系は、今後の解析に有効に機能すると期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, Tanaka T, Nakatsuji N, Kimura T, Nakano T. Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. *Genes to Cells*. 14(10):1155–1165 (2009)
2. 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, and Nakano T. MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons *Genes Dev*. 23, (24): 887–892 (2010)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表(口頭・シンポジウム等)

DNA methylation of retrotransposon genes is important for meiotic synapsis in spermatogenesis

宮川-倉持さとみ、木村 透、仲野 徹

第 34 回日本分子生物学会年会 シンポジウム『Mobile elements and its biological functions』(2011.12.16 横浜)

piRNA生合成におけるMVHの役割

宮川-倉持さとみ、渡部聡朗、高松加奈、中馬新一郎、後藤健吾、小島-北加奈子、城本悠助、伊藤大介、木村 透、野瀬俊明、佐々木裕之、仲野 徹

第 12 回日本RNA学会年会(2010.7.27-29 東京)

Molecular Function of MVH on piRNA Production in Fetal Male Germ Cells

The 19th CDB Meeting 'RNA Sciences in Cell and Developmental Biology' (2010.5.12 神戸理研)

small RNA とエピジェネティック制御

第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム(2009.10.22 神戸)

招待講演・セミナー等

piRNA: its production and possible functions

2010 SDB and JSDB Joint Meeting (2010.8.5 Albuquerque, USA)

small RNAとレトロエレメント抑制

千里ライフサイエンスセミナー エピジェネティクス:ゲノムを管理し活用する戦略(2009.4.17 大阪 千里ライフサイエンスセンター)

small RNA とエピジェネティック制御

第 41 回ケムバイオシンポジウム 次世代医療: microRNA と cancer stem cells(2009.3.5 東工大)

小分子 RNA とエピジェネティック制御

東大医科研セミナー (2009.05.13 東京大学・医科学研究研)