



Title	GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells
Author(s)	城本, 悠助
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34216
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	城本 悠助
論文題名 Title	GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells (精子幹細胞を用いたpiRNA産生におけるGPAT2の機能解析)
論文内容の要旨 〔目 的〕 近年、小分子RNAが遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。小分子RNAにはmiRNA (micro RNA)、siRNA (short interfering RNA)、piRNA (PIWI interacting RNA) が存在し、それぞれ発現部位や塩基長、結合するタンパクに違いがある。piRNAは生殖細胞特異的に発現する25~31塩基長の小分子RNAであり、遺伝子発現抑制に関与する。PIWI (P element induced wimpy testis) ファミリータンパクはpiRNAの生合成に寄与し、その産生過程は一次生成と二次生成に分けることができる。また、piRNAの産生はPIWIファミリータンパクのみでおこなわれるのではなく、他のいろいろなタンパクと複合体を形成し、相互作用することが必要である。piRNAの産生は、PIWIファミリータンパクが中心的な酵素として機能するが、その分子機構は非常に複雑であり、不明な点が多く残されている。これまでに当研究室ではマウスPIWIファミリーであるMILI (Mouse PIWI like) およびMIWI2 (Mouse PIWI 2) の機能解析がおこなってきた。これらのタンパクはマウスの胎生期雄性生殖細胞において機能するが、その細胞を純化するには多大な時間と手間が必要であった。そこでpiRNA産生機構を明らかにするため、生殖系列の培養細胞株であるGS細胞 (Germline Stem細胞) を用いた実験系を構築し、研究をおこなった。 〔方法ならびに成績〕 GS細胞をpiRNA研究に使用できるかどうかを明らかにするため、まず、次世代シーケンサーを用い、野生型GS細胞におけるpiRNA産生についての網羅的解析をおこなった。その結果、GS細胞ではpiRNAの二次生成はおこなわれていないが、一次生成は活発におこなわれていることがわかった。次にMILI欠損GS細胞におけるpiRNAの発現を解析したところ、MILI欠損マウスの精巣と同様に、piRNAの産生が著しく減少していた。そこで、MILIのpiRNA一次生成における役割を明らかにするために、センダイウイルスベクターを用いてMili遺伝子の再導入をおこないMILIの発現が回復したGS細胞を作製した。この『MILI回復GS細胞』においてpiRNAの産生を解析したところ、野生型より多量のpiRNAが発現していることがわかった。この結果から、一次生成におけるpiRNAの産生量はMILI依存的事であること、そして、GS細胞がpiRNAの一次生成分子機構の解析に極めて有用なツールであること、を示すことができた。 piRNAの産生には、多くのタンパクが複合体を形成して機能していると考えられている。そこで一次生成によるpiRNAの産生が亢進しているMILI回復GS細胞を用いて、MILI結合タンパクの探索をおこなった。その結果、ミトコンドリア外膜に存在し、脂質代謝に関与する酵素であるGPAT2 (Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2) を同定した。GPAT2がpiRNA産生において機能するかどうかを明らかにするため、レンチウイルスベクターを用い、GS細胞におけるGPAT2遺伝子の発現をノックダウンしたところ、piRNAの一次生成が著しく低下することがわかった。さらに、piRNA産生にGPAT2の酵素活性が必要かどうかを調べるため、酵素活性を有するドメインに変異を導入したGPAT2による機能レスキュー実験をおこなった。その結果、野生型GPAT2だけでなく、酵素活性欠損型GPAT2もpiRNAの産生が回復していたことから、piRNA産生にはGPAT2の酵素活性が不要であることが明らかになった。以上の結果から、GPAT2は、その脂質代謝活性とは無関係に、おそらくはMILIを含むタンパク複合体をミトコンドリア外膜にリクルートすることにより、piRNA一次生成に重要な役割を果たすことがわかった。 〔総 括〕 GS細胞を用いたpiRNAの解析系を確立し、さらにこの解析系を用いることにより、ミトコンドリア膜タンパクであるGPAT2がpiRNA産生に重要な役割を果たすことを明らかにした。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 城本 悠助

	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授 田口 徹
	副 査 大阪大学教授 高 島 成 二
	副 査 大阪大学准教授 河 原 行 郎

論文審査の結果の要旨

piRNAは雄性生殖細胞において産生される小分子RNAであり、レトロトランスポゾン遺伝子の発現抑制に機能する。piRNAの産生は一次生成と二次生成に分けられるが、その産生機構は非常に複雑であり、不明な点が多く残されている。

本研究では、精子幹細胞においてpiRNAが一次生成により産生されており、piRNA産生機構の解析に有用であること、また精子幹細胞を用いた解析から、ミトコンドリア外膜タンパクであるGPAT2がpiRNA一次生成に必須のタンパクであることを明らかにした。

これらの結果は、piRNA産生機構の解明だけでなく、今後のpiRNAの研究に非常に貢献するものである。よって、本研究が学位に値するものと認める。