Osaka University Knowledge Archive

Title	Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells
Author(s)	伊藤, 大介
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52241
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕

Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells

雄性生殖細胞における人為的piRNA産生を介したDNAメチル化の誘導

学位申請者　　伊藤　大介

現在、非コードRNAの多彩な機能が脚光を浴びており、長さ20-30塩基長程度の小分子RNAが転写調節や転写後調節に重要な役割を果たしていることが知られている。piRNA（PIWI-interacting RNA）は、生殖細胞特異的に発現する長さ25-31塩基程度の小分子RNAであり、転移因子であるレトロトランスポゾンの抑制に関与している。申請者が所属する研究室では、胎仔期の雄性生殖細胞においてマウスPIWIタンパク質であるMILI（Mouse PIWI like）およびMIWI2（Mouse PIWI2）が、センスとアンチセンス鎖のRNAを鋳型とし、piRNAを産生していることを報告してきた。また、小分子RNAの網羅的解析から、piRNAの大部分がレトロトランスポゾンに対する配列を持つこと、およびpiRNAのゲノムマッピング解析から、piRNAはpiRNAクラスターと呼ばれるレトロトランスポゾン遺伝子に富んだ領域に由来することが明らかになった。以上のことから、piRNA産生にはクラスターから転写されたレトロトランスポゾンRNAが必要であると考えられてきた。しかしながら、このような転写産物が実際にpiRNA産生に不可欠であるかは明らかになっていなかった。また、piRNAを欠損した遺伝子改変マウスの胎仔期雄性生殖細胞では、レトロトランスポゾンにDNAメチル化が獲得されないことから、piRNAはDNAのメチル化に重要な役割を有していると推測されていた。しかし、これまでにその直接的な証拠はなく、詳細な分子メカニズムは全く不明であった。申請者はこれらの問題点を解決すべく、単純ではあるが独創的な発想に基づく新しい人為的piRNA産生システムの構築を試みた。

胎仔期piRNAの産生メカニズムは、大きく一次生成と二次生成という2つのステップに分けられる。一次生成とは、レトロトランスポゾン由来の長い転写産物が切断され、MILIタンパクに取り込まれる過程を指す。一方で二次生成とは、MILIおよびMIWI2タンパクが共同してセンスとアンチセンス鎖のRNAから効率よくpiRNAを産生するステップである。これまでの先行研究から、piRNA生合成が進行するためには、クラスターから転写されたレトロトランスポゾンRNAが必要であると考えられてきた。この常識的な考えに反し、申請者はセンスとアンチセンスの転写産物が存在しさえすれば、どのようなRNAからでもpiRNA産生が誘導できるのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、申請者は以下に示す通り、EGFPの発現を指標とした実験系を考案した。

Oct4-EGFPマウスは、胎仔期の生殖細胞を含む、未分化な細胞でEGFPを発現するトランスジェニックマウスである。このEGFPに対してアンチセンス鎖を胎仔期精巣で特異的に発現するトランスジェニックマウス（Miwi2-asEGFPマウス）を作製し、これら両者を交配させてダブルトランスジェニックマウス（dTgマウス）を作製した。このdTgマウスの胎仔期精巣では、piRNA産生が起こる時期にセンス・アンチセンスのEGFP鎖が発現する。仮説通りに、EGFPのセンスとアンチセンス鎖の発現によって人為的にpiRNA産生が誘導されれば、EGFPの発現がDNAメチル化を介して抑制されると予想できる。

dTgマウスの生後2週齢精巣では、Oct4-EGFPマウスと比較してEGFPの顕著な発現低下が認められた。バイサルファイトシークエンス解析の結果から、dTgマウスの雄性生殖細胞におけるOct4-EGFP遺伝子は高メチル化状態であることが明らかになった。piRNAの生合成が起こらないMILIまたはMIWI2欠損状態のdTgマウスでは、EGFP遺伝子の発現抑制、およびDNAメチル化の誘導は認められなかった。さらに、dTgマウス胎仔期精巣における小分子RNAの網羅的解析から、EGFP遺伝子に対する小分子RNAが多数産生されていること、そしてこれらの小分子RNAの多くがpiRNAとして重要な特徴（25-31塩基長、1st Uと10th Aの偏り）を有することが判明した。以上の結果から、単純なセンスとアンチセンス鎖の発現によって、EGFP遺伝子からpiRNAを人為的に産生できることが明らかになった。

この人為的piRNA産生システムが内在性遺伝子に対して使用できれば、精子形成過程において発現する遺伝子をDNAメチル化の誘導によって抑制する新しい方法論が確立されると考えられる。そこで上記と同様のプロモーターを用いて、精子形成に必須の遺伝子であるDnmt3L（DNA methyltransferase-like 3）に対してアンチセンス鎖を胎仔期精巣特異的に発現するトランスジェニックマウス（Miwi2-asDnmt3Lマウス）を作製した。その理由は、1）Dnmt3L遺伝子はpiRNA産生の時期に高発現していること、2）Dnmt3L遺伝子を欠損したマウスの表現型がすでに報告されているため、システムの評価がきわめて容易であること、の2つである。

Miwi2-asDnmt3Lマウスの生後5週齢精巣は、Dnmt3L欠損マウスと同様、野生型と比較して有意に小さかった。またウエスタンブロット解析により、Miwi2-asDnmt3Lマウスの胎仔期精巣では、DNMT3Lタンパクが劇的に減少していることが判明した。これらの結果と一致して、このマウスの雄性生殖細胞における内在性Dnmt3Lプロモーター領域は、高メチル化状態であることが認められた。そして小分子RNAの網羅的解析から、このマウスの胎仔期精巣では、Dnmt3Lに対するpiRNAが野生型と比較して顕著に多く存在していることが明らかになった。以上の結果から、胎仔期精巣におけるアンチセンス鎖の発現によって、内在性の遺伝子からでもpiRNA産生を誘導できる事が示された。

piRNA産生は非常に複雑なプロセスを経ておこなわれており、上記のとおりpiRNAクラスターからの転写産物が必要と考えられてきた。しかしながら申請者の研究成果から、単純なセンスとアンチセンス鎖の発現さえあれば、piRNAが人為的に産生されることが実証された。この結論は従来までのpiRNA産生の常識を覆すものであり、そのインパクトはきわめて大きいと考えられる。このシステムの完成により、piRNA生合成や、今まで解析が困難であったpiRNAを介するDNAのメチル化について新しい角度から解析をおこなうことが可能になり、従来の理解とは異なる知見を得る事ができるのではないかと期待できる。

この人為的piRNA産生システムは、時期特異的な遺伝子ノックダウンのみならず、近年注目されているエピジェネティック遺伝の研究にも応用できると考えられる。エピジェネティック遺伝とは、DNAメチル化に代表されるエピゲノムの変異が生殖細胞を通じて遺伝し、次世代の表現型に影響を与える現象のことをいう。しかしながら、現在のところ適切な実験系が存在しないため現象論が先行しており、生殖細胞におけるDNAメチル化異常と次世代の表現型との因果関係、およびその詳細なメカニズムは不明のままである。本研究によって確立された人為的piRNAによるDNAメチル化誘導システムを駆使することで、この重要な問題に対して答えることができる可能性が非常に高く、今後きわめてオリジナリティーの高い研究が展開できると期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　伊藤　大介　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	教授	仲野　徹
副 査	教授	平岡　泰
副 査	教授	八木　健

論文審査の結果の要旨

P element-induced wimpy testis (PIWI)-interacting RNAs (piRNA)は、生殖細胞特異的に発現する、進化的によく保存された小分子RNAの一種である。マウスの精子形成過程において、piRNAはレトロトランスポゾン遺伝子のde novo DNAメチル化に関与している。従来まで、piRNA生合成にはレトロトランスポゾン領域から転写されたクラスター由来のRNAが必要と考えられてきた。この通説に反し、申請者は単純なセンスとアンチセンス鎖の発現により、人為的にpiRNAを誘導し、目的遺伝子にDNAのメチル化を誘導するシステムを確立した。この研究成果は、piRNAの産生メカニズムに新しい知見を与えるのみならず、エピジェネティック遺伝という、近年脚光を浴びている生命現象を研究する上で非常に有用な方法論になりうると大きく期待されるものである。以上を鑑み、申請者の研究内容は、学位授与に相応しいものと認める。