The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウスPNLDC1のpiRNA産生における3’末端Trimmerとしての役割
Author(s)	西村, 徹
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61880
rights	© 2018 The Authors. Published under the terms of the CC BY 4.0 license. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

平成 29 年度　博士論文

マウス PNLDC1 の piRNA 産生における 3’末端 Trimmer としての役割

（Role of mouse PNLDC1 as Trimmer in piRNA production）

大阪大学大学院　生命機能研究科

時空生物学講座　病因解析学研究室

西村　徹

2017 年 3 月修了

Abstract

PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are 24-31 nucleotides germ specific small RNAs that bind to PIWI family proteins. piRNAs and PIWI family proteins are essential for the maintenance and development of germ cells, and repression of retrotransposons. In piRNA biogenesis, pre-piRNAs are synthesized from long single-stranded precursor transcripts by endonuclease and subsequently loaded onto PIWI family proteins. The pre-piRNAs are longer in length as compared to mature piRNAs and have a strong bias for uridine at the 1st position (1stU bias) of 5' end. Finally, the 3' ends of PIWI loaded pre-piRNAs are trimmed by a nuclease, known as Trimmer to yield mature piRNAs. Recently, poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1 (Pnldc1) was identified as Trimmer in silkworm. However, the biological significance of the piRNA trimming remains elusive. Thus, I generated *Pnldc1* mutant mice to investigate the roll of mouse PNLDC1 as Trimmer in piRNA 3' end trimming *in vivo* and its physiological significance. In this study, result shows that the *Pnldc1* mutant mice displayed spermatogenic arrest at meiotic and spermiogenic stages. Accumulation of long piRNAs was found in *Pnldc1* mutant testes as indicated in next-generation sequencing data. These long piRNAs contained the 1stU bias which was similar to the control's result. Furthermore, the repression of long interspersed nuclear element (LINE) retrotransposons by piRNA-dependent DNA methylation was impaired. In conclusion, the results suggested that the mouse PNLDC1 is essential for piRNA trimming, repression of retrotransposon expression, and spermatogenesis.

要旨

piRNA（PIWI-interacting RNA）は、PIWI ファミリータンパク質に結合する生殖細胞特異的な 24-31 塩基長の小分子 RNA である。piRNA 及び PIWI タンパク質は、雄性生殖細胞の維持・分化、及び、レトロトランスポゾンの発現抑制に必須であることが知られている。この piRNA の生合成過程ではまず、長い一本鎖の RNA が切断されることで成熟型より長い pre-piRNA が産生され、PIWI ファミリータンパク質に取り込まれる。取り込まれた pre-piRNA は 5'末端がウラシル(1stU)の特徴を持つ。その後、pre-piRNA はトリマーと呼ばれるヌクレアーゼタンパク質により 3'末端が削られ、成熟した piRNA となる。近年、カイコでエキソヌクレアーゼドメインを持つ PNLDC1（poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1）がトリマーとして機能している事が報告された。本研究では、そのマウスオルソログの生体内での機能解析、及び、piRNA の 3'末端成熟の生理的な意義を明らかにすることを目的とし、*Pnldc1* 欠損マウスを作製した。解析の結果、*Pnldc1* 欠損マウスの胎生期及び生後の精巣において、成熟型よりも長い piRNA が蓄積していること、その長い piRNA が 1stU の特徴を持つことを見出した。加えて、*Pnldc1* 欠損マウス精巣では LINE（long interspersed nuclear element）レトロトランスポゾンのゲノム DNA メチル化レベルの低下と、RNA の発現増加が観察された。また、この欠損マウスでは、減数分裂期の発生異常、及び、半数体で分化異常の二つの表現型が観察された。本研究により、マウス PNLDC1 が piRNA の 3'末端形成に重要なトリマーとして機能しており、piRNA の 3'末端成熟がレトロトランスポゾンの抑制と精子形成に必須であることが、明らかとなった。

目次

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・02

序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・05

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20

材料・手法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

結果の図・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39

業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・50

序論

遺伝子の発現を調節する小分子 RNA

多くの生物のゲノムが解読され、タンパク質をコードする遺伝子はヒトでは全体の 1.5%程度にしか満たず、ゲノムのほとんどがタンパク質をコードしていない非コード領域であることが解明された(Gregory, 2005)。生物の複雑性は、タンパク質をコードする遺伝子の数とは明瞭な相関が無く、むしろ非コード領域の割合と相関しており(Mattick, 2011)、高等生物である程ゲノム中の非コード RNA の数や種類が多いことが知られている。その中で、遺伝子の発現を調節する機能的な小分子 RNA が、Argonaute ファミリータンパク質と結合し、生物にとって重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

小分子 RNA は、21-23 塩基長の miRNA（micro RNA）、siRNA（small interfering RNA）及びそれより長い 24-31 塩基長の piRNA（PIWI-interacting RNA）の三種類に分類される（参考図 1）。miRNA は Argonaute ファミリーの Ago タンパク質と結合し、標的遺伝子の翻訳抑制と転写後制御を行い、細胞の発生や分化において重要な役割を果たす。また、siRNA は、哺乳類において、主に外来のウイルスなどの RNA が Dicer に分解されることによってのみ合成され、Ago タンパク質と結合して外来 RNA の発現抑制に寄与していると考えられてきた。その後、卵母細胞では内在のウイルスであるレトロトランスポゾン由来の RNA が siRNA となり、レトロトランスポゾンの発現抑制に必須の機能を果たすことが報告された(Watanabe et al., 2008)。一方、piRNA は Argonaute ファミリーの PIWI（P element induced wimpy testis）タンパク質と結合し、レトロトランスポゾン遺伝子の転写制御領域の DNA メチル化による転写抑制や、レトロトランスポゾン転写産物の転写後抑制により、発現抑制に働くことが知られている。

piRNA は、植物やトリパノソーマで発見された当初は、レトロトランスポゾンの配列を持つことから rasiRNA（repeat-associated small-interfering RNA）と呼ばれていた(Djikeng et al., 2001; Hamilton et al., 2002)。rasiRNA はショウジョウバエで生殖巣にお

いて高発現していることが報告され(Aravin et al., 2003)、後に rasiRNA が PIWI ファミリータンパク質と結合することが明らかとなったことがきっかけとなり、piRNA と名付けられた（Aravin et al., 2006; Girard et al., 2006; Grivna et al., 2006)。

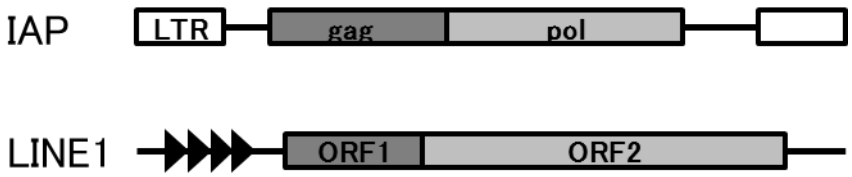
	miRNA（micro RNA）	siRNA（small interference RNA）	piRNA（Piwi interacting RNA）
長さ	21−23 nt	21−22 nt	24−31 nt
結合する Argonaute タンパク質	AGO	AGO	PIWI
機能	様々な遺伝子の制御（転写後制御）	レトロトランスポゾンの抑制（転写後制御）	レトロトランスポゾンの抑制（転写及び転写後制御）
発現	ユビキタス	卵母細胞	生殖巣特異的

参考図 1. 小分子 RNA の特徴

ゲノムを脅かすレトロトランスポゾン

トランスポゾン遺伝子はゲノム中を転移する反復配列で、DNA 型トランスポゾンと、RNA 型トランスポゾン（レトロトランスポゾン）に分けられる(Siomi et al., 2011)。DNA 型トランスポゾンがカットアンドペーストでゲノム中を転移するのに対し、レトロトランスポゾンは転写された後に逆転写されるコピーアンドペーストでゲノムに挿入されるため、その数を膨大に増やし、ゲノムに変異をもたらしてきた。レトロトランスポゾンの転移がもたらす変異は生物の進化に大きく寄与したと考えられているが、一方で生存に必須な遺伝子に変異をもたらし、細胞のがん化や個体の死を引き起こす可能性も示唆されている。そのため、生物はこれらの発現制御領域に DNA メチル化や抑制型ヒストン修飾を導入してゲノムをヘテロクロマチン化することで、レトロトランスポゾンの発現抑制を行うと考えられている。

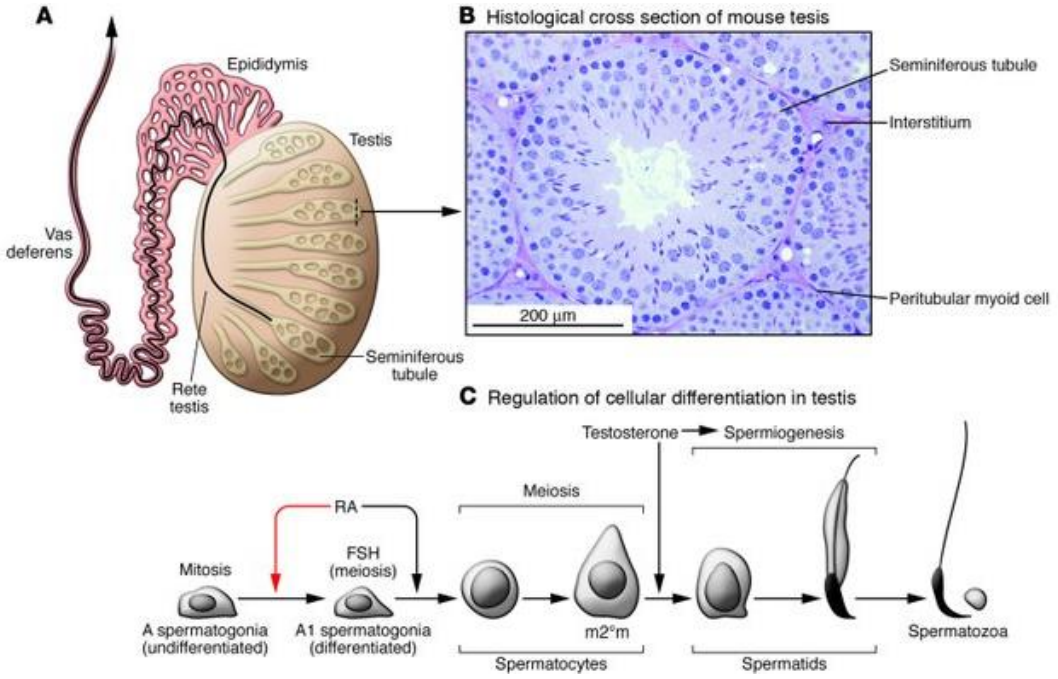
レトロトランスポゾンは、末端に長い反復配列 LTR（long terminal repeat）を持つ LTR 型レトロトランスポゾンと、非 LTR 型レトロトランスポゾンに分けられる。マウスでは、レトロトランスポゾンはマウスゲノムの約 30%を占め(Waterston et al., 2002)、変異を引き起こす可能性があるレトロトランスポゾンとして、LTR 型の IAP と非 LTR 型の LINE（long interspersed nuclear element）レトロトランスポゾンが知られている（参考図 2)。IAP は 5'末端の LTR 配列、LINE1 は 5'末端の繰り返し配列が転写制御領域として DNA メチル化による抑制を受けている。特に次世代へ遺伝情報が伝搬される生殖細胞では、レトロトランスポゾンの転移活性を抑制してその転移からゲノムを守るため、piRNA を利用した特異的な DNA メチル化機構が獲得されたと考えられている。



参考図 2. IAP 及び LINE1 の模式図

マウス雄性生殖細胞の分化過程

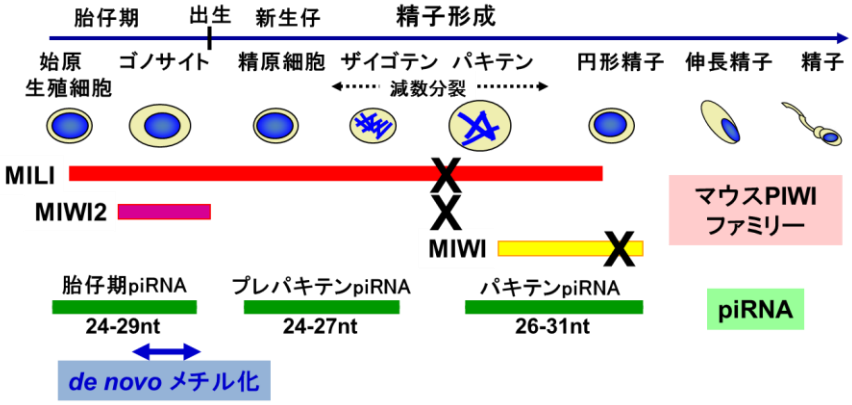
マウスの胎生期発生過程において、まず雄性生殖細胞の元となる始原生殖細胞が、精巣となる場所に移動してくる。そして、始原生殖細胞は胎生期 14 日齢前後でゴノサイトと呼ばれる細胞分裂を停止した状態となる。この時期までに生殖細胞では、DNA のメチル化が消去され、胎生期 16 日から出生までに精子特異的な DNA メチル化パターンが再確立される(Saitou et al., 2012)。この際、レトロトランスポゾン領域のメチル化も大部分が消去されるが、その後 piRNA を利用した再獲得（*de novo* DNA メチル化）が起こる。ゴノサイトは、出生後に精細管と呼ばれる管の基底膜に接着し、精原細胞と呼ばれる細胞集団となる。精原細胞には精子幹細胞が含まれており、自己複製を続けることで精子は半永続的に供給される。一部の精原細胞は、細胞分裂後に分化型精原細胞になり、減数分裂中の精母細胞を経て、半数体の円形精子に分化する。円形精子は更に、核の濃縮や尾の延長といった形態変化を経て、成熟した精子へと分化する。精子細胞は分化の進行に従って精細管の中心へ移動し、精巣上体で貯蔵される（(Hogarth and Griswold, 2010)、参考図 3)。



参考図 3. マウス生殖細胞の分化過程模式図(Hogarth and Griswold, 2010)

マウスの精子形成過程で発現する piRNA と PIWI タンパク質

piRNA（PIWI-interacting RNA）は、生殖細胞特異的な小分子 RNA であり、解析されたすべての生物種において、生殖細胞の維持・分化や妊孕性の獲得に必須である(Bohmert et al., 1998; Carmell et al., 2007; Cox et al., 1998; Moussian et al., 1998; Reddien et al., 2005; Tabara et al., 1999)。piRNA 結合タンパク質として、マウスでは三種類の PIWI ファミリータンパク質 MILI（Mouse PIWI Like）、MIWI（Mouse PIWI）、及び MIWI2 が存在する。胎生期精巣では MILI 及び MIWI2 が、出生後は、精原細胞から減数分裂初期においては MILI が、減数分裂パキテン期から円形精子においては MILI 及び MIWI が発現し、それぞれ、胎生期 piRNA、プレパキテン piRNA、パキテン piRNA と呼ばれる piRNA の生合成に関与している（参考図 4）。胎生期 piRNA と生後の piRNA の一部は、レトロトランスポゾン由来の配列を持ち、転写抑制及び転写後抑制によってレトロトランスポゾン RNA の発現抑制に寄与することが知られている。また、パキテン piRNA は大部分が piRNA クラスターと呼ばれるゲノム領域由来であり、相補的な標的 RNA を持たず、その機能は未解明な点が多く残されている(Deng and Lin, 2002; Di Giacomo et al., 2013; Girard et al., 2006; Grivna et al., 2006; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004; Kuramochi-Miyagawa et al., 2001; Reuter et al., 2011; Vourekas et al., 2012)。

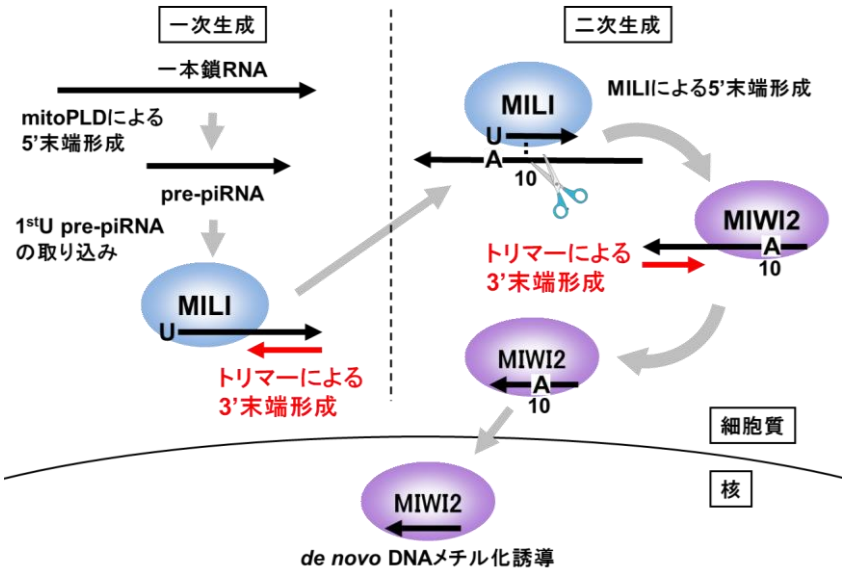


参考図 4. 雄性生殖細胞発生過程での PIWI ファミリータンパク質と piRNA の発生時期

de novo DNA メチル化の時期と欠損マウスにおける発生停止時期（×）を同時に示した。

piRNA 生合成

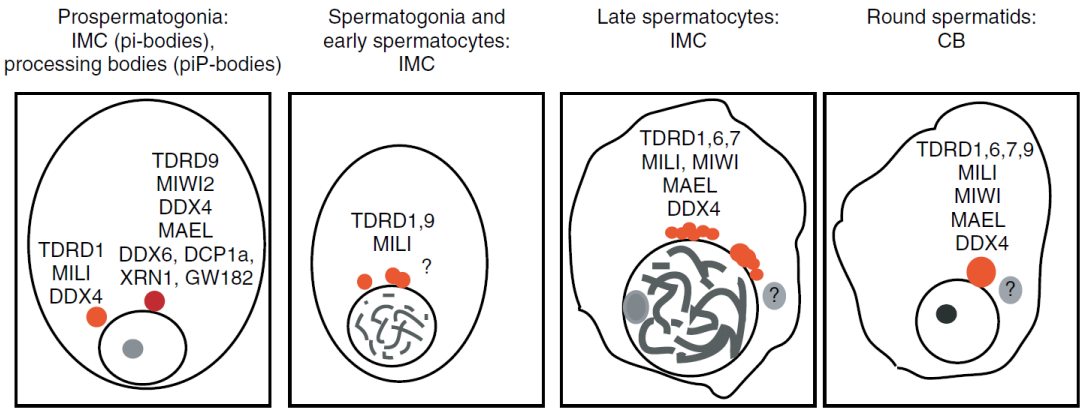
piRNA の生合成は一次生成と二次生成に分類され、PIWI タンパク質を含めた複数の RNA 分解酵素によって行われる（参考図 5）。マウス胎生期の一次生成では、前駆体となる長い一本鎖 RNA がミトコンドリア膜結合型の RNA 分解酵素である MitoPLD によって切断されることで、成熟した piRNA よりも若干長い pre-piRNA が産生される(Ipsaro et al., 2012; Nishimasu et al., 2012)。pre-piRNA は、その後 MILI と結合し、3'末端からエキソヌクレアーゼによって削られ（以下、トリミングと記載）、成熟 piRNA となる(Saxe et al., 2013)。一次生成の特徴として、MILI と結合する pre-piRNA 及び piRNA の 5'末端は、ウリジンに富んでおり、1stU バイアスと呼ばれる塩基の偏りが観察される。二次生成では、MILI が自身のスライサー活性によって結合 piRNA と相補的な RNA を切断し、産生された piRNA が MIWI2 あるいは MILI に受け渡される(De Fazio et al., 2011)。MILI による相補鎖 RNA の切断部位は MILI 結合 piRNA の 10 塩基目になるため、センス・アンチセンス鎖 piRNA に 10 塩基長（nt）の完全な相補配列が認められ（以下、10nt 重複と略記）、加えて 1stU に対応する形で、相補鎖 piRNA の 10 塩基目にはアデニンが多く観察される（以下、10thA と略記）。これら二つの特徴は二次生成の指標として知られている(Aravin et al., 2008; De Fazio et al., 2011)。MIWI2 に渡された piRNA は、MILI 結合 piRNA と同様に 3'末端がトリミングされ、その後 MIWI2-piRNA 複合体は核へ移行し、レトロトランスポゾン領域への DNA メチル化（de novo DNA メチル化）を誘導することでこれらの転写抑制に繋がると考えられている(Aravin et al., 2006; Aravin et al., 2008; Carmell et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008)。また、生後における piRNA 合成は一次生成が中心に行われる。



参考図 5. マウス胎生期 piRNA の生合成モデル

piRNA 生合成の場である生殖顆粒

piRNA 生合成は、生殖顆粒と呼ばれる RNA とタンパク質の複合体で構成される特徴的な構造体で行われていると考えられている(Aravin et al., 2009; Chuma et al., 2006; Kuramochi-Miyagawa et al., 2010; Shoji et al., 2009; Yabuta et al., 2011)。生殖顆粒は様々な動物の生殖細胞の細胞質に認められ、piRNA 生合成に関わるタンパク質が局在することが知られている（(Meikar et al., 2011)、参考図 6)。胎生期のゴノサイトには、MILI を含む胎生期 piRNA の一次生成に関わるタンパク質が局在する pi-body と、MIWI2 を含む二次生成に関わるタンパク質が局在する piP-body と呼ばれる生殖顆粒が存在する。pi-body は、電子顕微鏡による解析で二つのミトコンドリアの間に認められることから、IMC（Inter Mitochondrial Cement）とも呼ばれる。生後では MILI や MIWI が局在する IMC が観察される。また、円形精子の生殖顆粒はクロマトイドボディ（CB：Chromatid Body）と呼ばれ、RNA を安定化して貯蓄する場としての機能を持つと考えられている。生後の piRNA は主に減数分裂中に産生されると考えられていることから、CB よりも IMC が piRNA の産生場所として重要である可能性が高い。一方で、piRNA の多くが CB に集積していることから、CB は piRNA が機能を果たすために重要な場であることが提唱されている。



参考図 6. マウス雄性生殖細胞の分化段階において観察される生殖顆粒と、そこに含まれるタンパク質(Meikar et al., 2011)

piRNA の 3'末端トリミング

piRNA は精子形成に必須であると考えられており、piRNA の機能、生合成の過程や場など、様々な解析により明らかとなりつつあるが、不明な点は未だに多く残されている。その中で、本研究は piRNA3'末端のトリミングと、その生理的意義に着目した。カイコの培養細胞を用いた研究から、piRNA のトリミング活性が不溶性画分に存在し、膜画分に piRNA のトリミングを行う酵素が存在していることが示唆されていたが、その詳細は未解明なままであった(Kawaoka et al., 2011)。近年の研究から、カイコの培養細胞では、ミトコンドリア膜貫通ドメインをもつポリ A 特異的 RNA 分解酵素である Pnldc1（poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1）がトリマーとして機能しており、そのマウスホモログも試験管内でトリミング活性を有することが報告されている(Izumi et al., 2016)。そこで私は、マウスにおいて、Pnldc1 が piRNA のトリマーとして機能するか、さらにはトリミングが DNA メチル化の獲得や精子形成に必須であるかを明らかにすることを目的として、CRISPR/Cas9（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated proteins）システムを用いて遺伝子改変マウスを作製し、解析を行なった。

結果

Pnldc1 欠損マウスにおける精子形成異常

マウス PNLDC1 の生体内での機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを利用して *Pnldc1* 遺伝子変異マウスを作製した。PNLDC1 の機能に重要と考えられるヌクレアーゼドメインをコードしている第 3 エキソンに設計した sgRNA（single-guide RNA）と Cas9 mRNA を受精卵にインジェクションし、変異を導入した。その結果、11 塩基欠損（図 1A、1B）の変異体マウスが得られた。この 8 週齢 *Pnldc1* 欠損マウスは外見や体重に有意な差が認められなかったが（図 1C)、精巣は有意に萎縮していた（図 1D)。そこで、精巣のパラフィン切片を HE（Hematoxylin and eosin）染色した所、精子形成に明確な分化異常が観察された（図 1E 上)。さらに、成熟した精子の貯蓄場所である精巣上体に成熟精子が観察できなかったことから、*Pnldc1* 欠損の雄マウスは不妊であると考えられた（図 1E 下)。また、同じく *Pnldc1* のヌクレアーゼドメインをコードしている第 7 エキソンに設計した sgRNA で作製した約 800 塩基挿入が認められる変異マウスにおいても、同様の表現型を示したことから（図 2)、以下は 11 塩基欠損マウスを主として解析に用いた。

Pnldc1 欠損マウスが示す精子形成不全は、減数分裂期の異常と減数分裂を経た半数体の分化異常という 2 つの表現型が観察された（図 1F 左)。どちらが主要な表現型であるかを調べるために 2 個体の *Pnldc1* 欠損精巣の精細管を観察したところ、減数分裂で精子形成を停止している精細管と半数体の分化異常を示す精細管はほぼ同等数であることが分かった（図 1F 右)。この結果から、*Pnldc1* は減数分裂とその後の半数体の分化に必須である事が示唆された。

Pnldc1 依存的な胎生期 piRNA の成熟

胎生期 piRNA がほとんど合成されない *Mili* 欠損精巣や、piRNA を介した DNA メチル化が誘導されない *Miwi2* の欠損精巣では、減数分裂期において発生が停止することが報告

されている(Aravin et al., 2008; Carmell et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008)。*Pnldc1* 欠損精巣も減数分裂期での発生異常を示すため、胎生期 piRNA の生合成、及びレトロトランスポゾン領域の DNA メチル化の異常の有無を検証した。このために、piRNA 生合成が活発で、なおかつ *de novo* DNA メチル化活性の高い胎生期 16.5 日齢精巣を回収し、その小分子 RNA を次世代シーケンサーで解析した。まず、piRNA が多く含まれる 24 から 50 塩基長の RNA を抽出し、Refseq と Repeat Masker にマップされた piRNA 発現量の変化を調べた。その結果、*Pnldc1* 欠損精巣では、遺伝子領域や遺伝子間領域などの転写産物由来の piRNA に大きな変化は見られず、LTR、LINE 及び SINE（short interspersed nuclear element）レトロトランスポゾン由来の piRNA は、約 30%の減少が認められた（図 3A）。さらに、LTR および LINE レトロトランスポゾン piRNA についてセンス鎖とアンチセンス鎖に分けて発現量を調べた所、LINE 由来のアンチセンス鎖 piRNA が最も顕著に減少しており、約 50%程度にまで減少していた（図 3B）。次に、この LTR 及び LINE 由来の piRNA のトリミングが正常に起きているかを調べた。野生型の piRNA は大部分が 24-31 塩基長にトリミングされているのに対し、*Pnldc1* 欠損精巣ではそれよりも長い piRNA が多く蓄積していることが明らかとなった（図 3C）。次にこれらの長い piRNA が 1stU の特徴を有しているかを検証するために、24-31 塩基長と、それより長い 32-50 塩基長に分けて、LTR 型レトロトランスポゾンの IAP と、LINE 型レトロトランスポゾン L1Md の A タイプ（L1Md_A）及び Gf タイプ（L1Md_Gf）の 1stU の割合を調べた。その結果、*Pnldc1* 欠損精巣の 32-50 塩基長の piRNA は、成熟した piRNA と同程度の 1stU の比率を持つ事が明らかになった（図 3D）。さらに、*Pnldc1* 欠損精巣の piRNA をゲノムにマップし、3'末端とその下流の塩基の分布を観察した所、3'末端の 1 塩基下流に T の比率が高いという特徴を見出した（図 3E）。また、エキソンを始めとした、その他の piRNA においても、*Pnldc1* 欠損精巣で長い piRNA の蓄積が観察され、これらも高い比率で 1stU を持つことも見出した（data not shown）。以上の結果から、*Pnldc1* 欠損精巣では

胎生期 piRNA の 3'末端トリミングが正常に行われないことに加えて、レトロトランスポゾン piRNA は発現量の減少を示すことが明らかとなった。

胎生期 *Pnldc1* 欠損精巣で観察される二次生成 piRNA

次に、*Pnldc1* 欠損によるトリミングの異常が二次生成にどのように影響を与えるかを検証した。この目的のために、二次生成による増幅効率の指標である 10nt 重複の存在と、二次生成で産生される 10thA を持つ piRNA の発現量を解析した。この結果、*Pnldc1* 欠損精巣には、LTR 及び LINE 由来の piRNA に関して、野生型と同程度の割合で 10nt 重複が認められた（図 4A）。これは、一次生成 piRNA のトリミングに異常が生じても、MILI のスライサー活性による相補鎖の切断が行われることを示している。*Pnldc1* 欠損精巣において、IAP に関しては、長い piRNA が増加するが、その発現量としてはおいても大きな変化は無く（図 4B、4C）、二次生成により piRNA が十分に産生されていることが明らかとなった。一方で、L1Md_A と Gf に関しては 10thA の有無に関わらずアンチセンス鎖 piRNA の発現量が減少していた（図 4B、4C）。以上のことから、piRNA のトリミングは L1Md アンチセンス鎖 piRNA の二次生成に重要であるが、IAP 由来の piRNA の二次生成には大きな影響がない可能性が示唆された。

胎生期 *Pnldc1* 欠損精巣における MILI 及び MIWI2 の局在異常

piRNA の生合成に異常がある遺伝子改変マウスでは、piRNA 合成の場と考えられている生殖顆粒や、MIWI2 の核内移行に、異常が生じることが知られている(Aravin et al., 2008; Carmell et al., 2007; Frost et al., 2010; Kuramochi-Miyagawa et al., 2010; Meikar et al., 2010; Watanabe et al., 2011; Zheng et al., 2010)。そのため、*Pnldc1* 欠損精巣における piRNA のトリミング異常が、生殖顆粒の形成や MIWI2 の局在に影響を及ぼすのかを検証した。このためにまず、胎生期 16.5 日齢精巣の凍結切片を作製し、蛍光免疫染色法により、

MILI の局在を観察した。野生型雄性生殖細胞では、細胞質全体と特に蛍光強度の強いドット状の生殖顆粒として MILI タンパク質のシグナルが観察された。一方、*Pnldc1* 欠損細胞では、MILI タンパク質のシグナルは細胞質中で偏りが認められ、生殖顆粒の数が減少していた（図 5）。次に piRNA 依存的な核内移行を示す MIWI2 の局在を観察した所、*Pnldc1* 欠損の生殖細胞の核では、シグナルが弱くなっている事を見出した（図 5）。この結果から、*Pnldc1* は生殖顆粒の形成に寄与している事、また *Pnldc1* 欠損精巣では、核内の MIWI2 が減少していることが明らかとなった。

***Pnldc1* 欠損精巣における LINE1 プロモーターの DNA メチル化異常**

Pnldc1 欠損精巣において核の MIWI2 タンパク質のシグナルが減少していたことから、piRNA-MIWI2 依存的な DNA メチル化が正常に誘導されていない可能性が考えられた。これを検証するために、生後 10 日齢精巣から Ep-CAM 陽性生殖細胞を FACS（Flow Cytometry）で回収し、バイサルファイトシーケンシングを行った。この細胞集団は大多数が減数分裂前の精母細胞で、胎生期 16.5 日齢におけるレトロトランスポゾン領域の DNA メチル化状態を概ね反映している事が知られている(Kuramochi-Miyagawa et al., 2014)。まず、FACS による生殖細胞の精製度を確認するために、雄性生殖細胞では完全にメチル化されるが、体細胞では半分の 50%がメチル化される *H19* の DMR（Differentially methylated region）領域のメチル化状態を確認した（図 6A）。次に piRNA 依存的なメチル化を受ける IAP1d1、L1Md_A 及び L1Md_Gf のプロモーター領域を調べた。野生型では L1Md_A、L1Md_Gf 及び IAP1d1 は約 90%の高メチル化状態を示すのに対し、*Pnldc1* 欠損では A 及び Gf で約 70%程度にメチル化が低下していることを見出した。また、IAP1d1 では野生型同様に約 90%の高メチル化状態を示していた（図 6A）。この結果は第 7 エキソンの変異マウスにおいても同様であった（図 6B）。以上の結果から、*Pnldc1* は L1Md_A、L1Md_Gf の DNA メチル化には必要であるが、IAP1d1 の DNA メチル化に重要な役割を担

っていないことが明らかとなった。

生後 12 日齢 *Pnldc1* 欠損精巣における LINE1 レトロトランスポゾンの発現増加

Pnldc1 欠損マウス精巣において観察される LINE1 レトロトランスポゾンの DNA メチル化の減少は、これらの RNA の発現量の増加に繋がることが予想されるため、レトロトランスポゾンの発現を qPCR で調べた。その結果、*Pnldc1* 欠損マウス精巣において、L1Md_A 及び Gf の発現上昇が認められ、IAP1d1 についてはほとんど変化が観察されなかった（図 7）。このことから、*Pnldc1* は LINE 型レトロトランスポゾンの発現抑制に必須であることが明らかとなった。

出生後の Pnldc1 欠損雄性生殖細胞における MILI 及び MIWI の局在異常

Pnldc1 欠損により、胎生期 piRNA のトリミングに異常が生じたことから、PNLDC1 は生後の piRNA の成熟にも寄与している可能性が考えられた。そこで、まず *Pnldc1* 欠損精巣において、パキテン piRNA が合成される精母細胞及びそれらが集積している円形精子の生殖顆粒形成を調べるため、生殖顆粒に含まれる MILI、MIWI の局在を蛍光免疫染色により調べた。この結果、*Pnldc1* 欠損においてパキテン期以降の精母細胞では、MILI と MIWI いずれにおいても蛍光強度の強いドットが観察できず、piRNA 生合成の場である IMC の形成に異常が認められた（図 8）。一方で、*Pnldc1* 欠損の円形精子では、野生型と同様に RNA を貯蓄する場であるクロマトイドボディが観察できた（図 8）。以上のことから *Pnldc1* 欠損によりパキテン piRNA の生合成にも異常が生じている可能性が示唆された。

Pnldc1 依存的なパキテン及びプレパキテン piRNA の成熟

出生後の *Pnldc1* 欠損精巣における piRNA 生合成を調べるため、細胞集団の大部分がパキテン期を経た、生後 24 日齢精巣の piRNA の解析を行なった。電気泳動により小分子 RNA

の長さを調べた結果、コントロールでは約 30 塩基長に piRNA と一致するバンドが観察された。一方、*Pnldc1* 欠損精巣ではこれよりも少し長い 30-40 塩基長に複数のバンドが観察され（図 9A)、*Pnldc1* は生後においても piRNA のトリミングに重要な役割を担っている事が示唆された。

出生後の piRNA について発現量や長さを調べるため、生後 24 日齢精巣の小分子 RNA を次世代シーケンサーで解析した。*Pnldc1* 欠損精巣において、パキテン piRNA クラスター由来の piRNA 発現量が顕著に減少しており、一方でリピート、遺伝子及び遺伝子間領域由来の piRNA の発現量にはほとんど変化が見られなかった（図 9B)。piRNA クラスター由来のパキテン piRNA の長さを調べるため、塩基長毎の piRNA 発現量を調べた。その結果、コントロールでは 29-31 塩基長にピークが認められ、大部分が 32 塩基長以下の piRNA であるのに対し、*Pnldc1* 欠損精巣ではピークが 30-32 塩基長であり、コントロールではほとんど存在しない 33 塩基よりも長い piRNA が多く蓄積していることを見出した(図 9C)。さらに、*Pnldc1* 欠損精巣で産生される長い piRNA が、piRNA の特徴である 1stU を持つかどうかを、24-32 塩基長と、それよりも長い 33-50 塩基長に分けて調べた。その結果、33 から 50 塩基長の RNA においても非常に高い割合で 1stU を持つ事を見出した（図 9D)。次に、出生後の *Pnldc1* 欠損精巣の piRNA をゲノムにマップし、3'末端とその下流の塩基の分布を観察した所、胎生期と同様に 3'末端の 1 塩基下流に T の比率が高いことを見出した（図 9E)。またプレパキテン piRNA クラスター由来の piRNA（図 10A、 B）や他の領域の piRNA（data not shown）に関しても長い piRNA が蓄積していた。以上の結果より、*Pnldc1* は生後の piRNA 3'末端トリミングにも重要である事が明らかとなった。

考察

本研究により、*Pnldc1* 欠損精巣では、胎生期、生後のいずれにおいてもトリミングされていない未成熟な piRNA が蓄積し、精子形成不全が起きていることが確認された（図 1、2、3、9、10）。この結果から、精子形成にはトリミングが必須であると考えられる。実際、レトロトランスポゾンの DNA メチル化は、IAP1d1 には有意な変化は無いが、一方で LINE1 においては減少が認められた。（図 6）。加えて、クラスター由来のパキテン piRNA のトリミング不全と減数分裂後の分化異常が観察されることから（図 1、2、9）、パキテン piRNA もトリミングされることで役割を果たしている可能性が初めて示唆された。以上のことから、piRNA は、その役割を果たすためにトリミングを必要とするものと、そうでないものがあることが示された。

マウス piRNA の 3'末端形成

マウス PNLDC1 によるトリミングには TDRKH（Tudor and KH domain-containing protein）が必須であることが、先行研究の *in vitro* の実験により報告されている(Izumi et al., 2016)。また、*Tdrkh* 欠損マウス精巣においても、piRNA の 3'末端トリミングに異常が認められることが報告されている(Saxe et al., 2013)。さらに、*Tdrkh* 欠損マウス精巣で piRNA3'末端の 1 塩基下流に高頻度で U が観察される事が報告されており、未成熟な piRNA の 3'末端は mitoPLD によって切断されたままの状態であると考えられている(Han et al., 2015a; Mohn et al., 2015)。*Pnldc1* 欠損精巣においても、3'末端の 1 塩基下流のゲノムに T が多く観察されることから、RNA としては U が多く存在しており、同様の特徴が観察された（図 3E、9E）。本研究によって、マウス piRNA の 3'末端は、mitoPLD による切断が起こった後に、PNLDC1 が 3'末端トリマーとして機能し、成熟することが示唆された。

PNLDC1 はカイコとマウスでは piRNA トリマーとして機能しているが、ショウジョウバエにはその類似遺伝子は存在しないため、異なるタンパク質が piRNA のトリミングを行

っていることが示唆されていた。近年、miRNA のトリマーとして知られていた 3'-5'エキソヌクレアーゼである Nibbler がショウジョウバエの piRNA トリマーであることが報告された(Hayashi et al., 2016)。PNLDC1 はポリ A 特異的 RNA 分解酵素であるのに対して、Nibbler は DEDD 型エキソヌクレアーゼである。マウスやカイコとショウジョウバエは進化の過程において異なる RNA 分解酵素を用いて piRNA のトリミング能を獲得したと推測される。実際に *Pnldc1* 欠損マウスの精巣と同様に、*Nibbler* 欠損ショウジョウバエの卵巣においても、piRNA の 3'末端の 1 塩基下流にはウラシルが多く存在し、トリミングが起こらない場合、mitoPLD が 3'末端に切断されたままとなるという共通点も確認された。

***Pnldc1* 欠損マウス精巣における胎生期 piRNA の生合成と *de novo* DNA メチル化**

主に一次生成によって合成されるエキソン、5'UTR、及び、3'UTR にマップされる piRNA の発現量は、*Pnldc1* 欠損マウスの胎生期精巣においても大きな差は認められなかった（図 3A)。すなわち一次生成のみによって産生される piRNA（pre-piRNA）の発現量は、PNLDC1 による 3'末端のトリミングに非依存的であると考えられる。一方、*Pnldc1* 欠損マウス精巣において、一次生成と二次生成によって産生されるレトロトランスポゾン由来の piRNA は発現量が減少しているが（図 3B、3C）、10nt 重複の割合は野生型と同様に観察された（図 4）。このことは、MILI のスライサー活性による転写産物の切断は、piRNA の長さの影響を受けずに行われることを示唆している。また、IAP に関しては、1^{st}U 及び 10^{th}A を持つ piRNA 発現量に変化は認められない。一方で、L1Md_A 及び Gf に関しては、10^{th}A の有無に関わらず長いアンチセンス鎖 piRNA が減少していた（図 4B、4C)。以上のことから、*Pnldc1* 欠損マウス精巣では、二次生成による piRNA の産生量が低下するものとしないものが存在することが明らかとなったが、この原因は不明である。

二次生成によって産生された piRNA は MIWI2 に取り込まれ、核移行することが知られているが、*Pnldc1* 欠損マウス精巣では核に局在する MIWI2 が減少していた（図 5)。この

原因としては、(1) MIWI2 の発現量が低下している、(2) トリミングされていない未成熟な piRNA と結合した MIWI2 は結合 piRNA とともに分解される、という可能性が考えられる。このうち MIWI2 の分解がより可能性が高いと考えられる。その理由として、piRNA のトリミングに異常が起きる *Tdrkh* 欠損精巣においても、MIWI2 の発現量の減少が確認されていること、伸長精子細胞において、MIWI は一部の piRNA と結合することで、ポリユビキチン化を介した分解が誘導されること(Zhao et al., 2013)、などが挙げられる。いずれにおいても、この詳細は今後の解析が待たれるが、piRNA のトリミング不全は、MIWI2 の核内移行の減少と LINE1 の DNA メチル化レベルの低下、及び LINE1 RNA の増加に繋がっていると考えられる。

***Pnldc1* 依存的なパキテン piRNA の合成とその機能**

パキテン piRNA の生合成に必須の遺伝子である *Miwi*、*Rnf17* の変異マウスでは、減数分裂後の半数体の分化異常が生じることから(Deng and Lin, 2002; Wasik et al., 2015)、パキテン piRNA は精子形成に必須であると考えられている。パキテン piRNA の大部分は標的 RNA が存在しないと考えられてきたが、近年の報告で、一部のパキテン piRNA は MIWI とともに相補的な配列を持つ mRNA や長鎖非コード RNA を標的とし、その分解を誘導することが報告された(Goh et al., 2015; Watanabe et al., 2015; Zhang et al., 2015)。PNLDC1 によるパキテン piRNA のトリミングがこれらの MIWI 依存的な標的 RNA の分解にも寄与している可能性が考えられる。パキテン piRNA はその機能が不明なものが大部分であるが、*Pnldc1* 欠損マウスの解析を進めることによって、トリミングの役割が明らかになることが期待される。

材料・手法

受精卵へインジェクションする sgRNA 発現ベクター構築

Pnldc1 エキソン 3 またはエキソン 7 を認識するオリゴ（表 1）のセンス鎖・アンチセンス鎖をそれぞれ 250pmol/ml となるように混ぜ、ヒートブロックで 5 分間 95℃加熱。ヒートブロックの電源を切り、常温に下がるまで放置し、センス鎖とアンチセンス鎖をアニーリングさせた。pBlueScript-SK(+)II-T7-gRNA を制限酵素 BbsI で 37℃1h 処理後、直鎖状したプラスミドとアニーリングしたオリゴを Ligation high（東洋紡）でライゲーションし、DH5αに形質転換を行い、コロニーを得た。コロニーを各々10 個ずつ 2ml LB 培地中で 8 時間 37℃インキュベートし、核酸自動分離装置（クラボウ）を用いてプラスミド DNA を抽出した。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（サーモフィッシャー）と M13 Primer P8 ユニバーサルプライマー（表 2）を用いて目的領域を増幅し、エタノール沈殿で精製した。Hi-Di ホルムアミド（サーモフィッシャー）に増幅したサンプルを溶解し、3 分間 99.9℃で加熱後、サンガーシーケンサー（アプライド）で配列を解読した。

In Vitro Transcription

Pnldc1 エキソン 3 またはエキソン 7 を認識するオリゴを挿入した pBlueScript-SKII を制限酵素 XbaI で 37℃、O/N 処理し、直鎖状にした。Pnldc1 エキソン 3 と 7 をターゲットした sgRNA 及び Cas9 mRNA を得るため、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit（Ambion）を用いて In vitro transcription を行った。Cas9 mRNA には poly A を付与した。反応後、Nuc Away kit（サーモフィッシャー）を用いて夾雑物を除いた。

CRISPR/Cas9 システムを用いた *Pnldc1* 欠損マウスの作製

雄 C57BL6J の精巣上体から精子を採取し、ミネラルオイル（ナカライ）で覆った HTF 培地（101.6mM 塩化ナトリウム、4.69mM 塩化カリウム、2.03mM 塩化カルシウム二水

和物、0.37mM リン酸二水素カリウム、0.2mM 硫酸マグネシウム七水和物、25mM 炭酸水素ナトリウム, 2.78mM D-グルコース, 0.34mM ピルビン酸ナトリウム, 0.34%乳酸ナトリウム 60%, 5mg ストレプトマイシン, 7.5mg ベンジルペニシリン, 0.0004%フェノールレッド, 0.4%ウシ血清アルブミン（BSA)）の 400μl ドロップ中で、2 時間 37℃でインキュベート。約 63 時間前に 7.5IU の PMSG（あすかアニマルヘルス）注射と、約 15 時間前に 7.5IU の hCG（あすかアニマルヘルス）注射を行った雌 C57BL6NCr の卵管膨大部から未受精卵を摘出。新しい 400μl HTF 培地中に 50 個の未受精卵と 100cell/μl の濃度で精子を入れ、37℃インキュベータ中で 3 時間の培養によって、人工授精させた。培養後ヒアルロニダーゼ（シグマ）を添加し、2 分 37℃インキュベートにより卵丘細胞を除いたのち、受精卵をミネラルオイルで覆った k-som 培地（94.47mM 塩化ナトリウム, 2.55mM 塩化カリウム, 1.7mM 塩化カルシウム二水和物, 0.37mM リン酸二水素カリウム, 0.2mM 硫酸マグネシウム七水和物, 25mM 炭酸水素ナトリウム, 0.22mM D-グルコース, 1.03mM L-グルタミン, 0.2mM ピルビン酸ナトリウム, 0.145%乳酸ナトリウム 60%, 5mg ストレプトマイシン, 8mg ベンジルペニシリン, 99μM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム, 0.3%BSA）の 10μl ドロップへ移動させた。実態顕微鏡の明視野で雌雄前核が見えるまで受精卵を発生させ、Cas9 mRNA（50ng/μl）と sgRNA（25ng/μl）を混ぜた Nuclease Free Water をインジェクションし、k-som 培地中で 2 細胞期まで 37℃でインキュベート。医学系研究科動物施設の生殖工学ユニットに依頼し、2 細胞期胚を偽妊娠 ICR マウスに移植し、産仔を得た。それぞれ設計したプライマー（表 3）で産仔から得たゲノムを増幅し、欠損が入っている個体を得た。増幅したゲノムの配列をサンガーシーケンサーで読むことで、欠損パターンを確認した。

パラフィン切片作製

精巣をブアン固定液（シグマ）に浸し、16 時間 4℃振とうして固定した。その後、固定

液を PBS に置換し、30 分間常温での振とうを、2 回行った。引き続き 70%、80%、90%エタノールへの置換を各 1 回、99.5%エタノールへの置換を 3 回、キシレンへの置換を 3 回行った。それぞれ置換の度に 30 分間常温で振とうした。最後に 60℃で溶かしたパラフィン（paraplast X-TRA、シグマ）に置換し、60℃1 時間での振とうを 2 回行った後に、包埋した。切片は回転式ミクロトーム（カールツァイス）で 7μm に薄切して作製し、40℃の水で伸展後、スライドガラス上に載せ、16 時間 42℃で乾燥させた。

エマトキシリン・エオシン染色

常温で行い、各手順において特に記載が無い場合は 30 秒間浸した。切片をキシレンに 3 回浸し、脱パラフィンを行う。その後 99.5%、90%、85%、70%、50%、PBS と浸し、マイヤーヘマトキシリン溶液（シグマ）に浸して 10 分間染色する。その後 10 分間流水水洗を行い、80%エタノールに 20 秒間浸した後、エオジン・フロキシン B 液（1%エオシン Y : 1%フロキシン B : 99.5%エタノール : 酢酸 = 20 : 2 : 156 : 1）で 30 秒間染色した。次に、80%エタノールに 20 秒浸した。最後に、99.5%エタノールとキシレンに各 2 回ずつ浸した後、エンテラン（メルク）を用いてカバーガラスで切片を封入した。観察は BZ-X710（キーエンス）で行った。

RNA 抽出・精製

精巣から ISOGEN（ニッポン・ジーン）を用いて RNA 抽出した。その後、TURBO DNase（サーモフィッシャー）で処理し、フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿により、RNA を精製した。

small RNA-seq

TruSeq Small RNA Library Prep Kit（イルミナ）を用いて、小分子 RNA に 3'アダプタ

と 5'アダプタを付与し、逆転写後、PCR による増幅を行った。その後 PAGE で cDNA を展開し、20-50 塩基長相当の small RNA 由来の cDNA を切り出し精製でライブラリを調整した。ペアエンドで Illumina Hiseq を用いてライブラリの配列を解析した。この項目の実験操作は北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。

NGS 解析

配列データからアダプタを除去し、miRNA を 20-24 塩基長、piRNA を 24-50 塩基長として、解析ツール Pipipes(Han et al., 2015b)を用いて解析を行なった。また、IAP と L1Md_A 及び Gf 由来 piRNA の 1stU の解析は、IAP（M17551）、L1MdA（M13002）及び L1MdGf（D84391）のコンセンサス配列にマップ（配列のミスマッチは 2 塩基許容）された配列をそれぞれ由来の piRNA として用いた。

凍結切片作製

精巣を 2%PFA/PBS 液に浸し、4℃で振とう。胎生期精巣は 1 時間固定、8 週齢精巣は精巣の膜に 27 ゲージ注射針（テルモ）で穴を複数空け、2 時間固定。その後、PBS に置換し、1 時間 4℃で振とう。次に、10%スクロース/PBS に置換し、1 時間 4℃で振とうした後、さらに 20%スクロース/PBS に置換した。精巣が液中で沈むようになるまで 4℃で振とうした後、10%スクロース+OTC コンパウンド（サクラ）/PBS で置換し、16 時間 4℃で振とうした。OTC コンパウンドで精巣を包埋し、クライオスタット（ライカ）で 8μm に薄切し、スライドガラス上に切片を載せた。風乾させた後、-80℃で保存した。

蛍光免疫染色

切片を PBST（0.05% Tween/PBS）で三回洗浄した後、0.5% TritonX-100/PBS に 30 分間常温で浸漬。MILI 及び MIWI2 抗体染色の際には抗原賦活化を行った。10mM クエン酸

ナトリウム緩衝液（1.8mM クエン酸水溶液, 8.2mM クエン酸ナトリウム水溶液）中に切片を浸漬し、オートクレーブ（トミー精工）による高温高圧を 20 分間 121℃の条件で行い、抗原を賦活化した。温度が 100℃以下に下がった後に室温に取り出し、30 分間常温に静置した。ブロッキング液（10%正常ヤギ血清、3%ウシ血清アルブミン/PBS）を切片にのせ、1 時間常温でブロッキングした。その後、ブロッキング液で希釈した 1 次抗体（抗 MILI 抗体（#2071、CST）400 倍希釈、抗 MIWI2 抗体（ab21869、abcam）200 倍希釈、抗 MIWI 抗体（#2079、CST）200 倍希釈）を切片にのせ、16 時間 4℃で反応させた。PBST で三回洗浄し、ブロッキング液で希釈した 2 次抗体 Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488（抗 MILI 抗体に対して 400 倍希釈、抗 MIWI2、MIWI 抗体に対して 500 倍希釈）（A11008、サーモフィッシャー）を切片にのせ、遮光下で 1 時間常温に置いて反応させた。PBST で三回洗浄し、1μg/ml 4′, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）/PBS を切片にのせ、5 分間常温で DNA を染色した。PBS で 3 回切片を洗浄した後、封入剤（Fluoromount-G、Southern Biotech）で封入した。画像の取得は共焦点顕微鏡 FV1000-D（IX）倒立型（オリンパス）で行った。

生殖細胞のソーティング

脱膜した精巣を 1.5ml チューブに入れ、PBS で 2 回洗浄した。500μl ハンクス平衡塩溶液（Ca、Mg、フェノールレッド含有）（HBSS）（ナカライ）に置換し、0.5mg Collagenase B（ロシュ）と 10μg DNase（DP212、フナコシ）を加え、20 分間 37℃でインキュベート。HBSS で 2 回洗浄し、500μl 0.25%トリプシン（サーモフィッシャー）を添加し、10 分間 37℃でインキュベート。その後、500μl FCS（サーモフィッシャー）/DMEM を加え、さらに 0.2mg DNase I を添加し 5 分間 37℃でインキュベート。HBSS で 2 回洗浄し、300μl 5% BSA/PBS に置換。1μg PE anti mouse CD326（Ep-CAM） antibody（BioLegend）を添加し、遮光して 2 時間 4℃で抗体反応。HBSS で 2 回洗浄し、700μl 5% BSA/PBS に置換

後、細胞をセルストレイナー（ファルコン）で細胞をフィルトレーションして細胞を単離した。ソーティングは FACS AriaII（ベクトン・ディッキンソン）で行った。

バイサルファイトシーケンシング

DNeasy Blood & Tissue kit（QIAGEN）を用いて FACS で回収した細胞から DNA を抽出し、EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kit（QIAGEN）を用いて DNA をバイサルファイト処理した。Epi Taq 酵素とプライマー（表 4）を用いてバイサルファイト処理後の DNA を PCR 増幅し、電気泳動で展開後、目的産物を Gel Extraction kit（QIAGEN）を用いて精製した。H19、IAP1d1、L1MdGf は、1st PCR と 2nd PCR で二回の増幅を行った。次に、目的産物を pGEM-T easy（プロメガ）にライゲーションし、大腸菌 DH5αに形質転換した。コロニーを各々20 個ずつ得、2ml LB 培地中で 8 時間 37℃インキュベートした。核酸自動分離装置（クラボウ）を用いてプラスミドを抽出し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（サーモフィッシャー）と T7 ユニバーサルプライマー（表 2）を用いて目的領域を増幅し、エタノール沈殿で精製した。Hi-Di ホルムアミド（サーモフィッシャー）に増幅したサンプルを溶解し、3 分間 99.9℃で加熱後、サンガーシーケンサー（アプライド）で配列を解読した。

逆転写反応と qPCR

ThermoScript™ RT-PCR system（サーモフィッシャー）により精製した RNA を逆転写し、cDNA を得た。CFX384 TouchTM リアルタイム PCR 解析システム（バイオ・ラッド）を解析に用い、THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix（東洋紡）で qPCR を行った。プライマーは表 5 に示した。

RNA 電気泳動

DNase 処理済みの RNA を 4M 尿素入り 15%変性ゲル（和光純薬）にアプライし、TBE バッファー（500mM トリス塩基、485mM ホウ酸、20mM EDTA）を泳動バッファーとして電気泳動を行った。泳動像の撮影は、3μl Sybr Gold Nucleic Acid Gel Stain（サーモフィッシャー）を添加した 30ml TBE バッファーにゲルを 10 分間常温で浸して染色した後、ゲル撮影装置 FAS-IV（日本ジェネティクス）で行った。

表 1、sgRNA 作製用オリゴ塩基配列

sgRNA オリゴ	配列
Exon3 Sense	5'-AGGGTCTTCAGATACCACTCAGA-3'
Exon3 Antisense	5'-AAACTCTGAGTGGTATCTGAAGAC-3'
Exon7 sense	5'-AGGGCGATGCCAGGCAGAGTCATC-3'
Exon7 Antisense	5'-AAACGATGACTCTGCCTGGCATCG-3'

表 2、ユニバーサルプライマー塩基配列

ユニバーサルプライマー	配列
M13 P8	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

表 3、ジェノタイピングプライマー塩基配列

ジェノタイピング用プライマー	配列	アニーリング温度
Exon3 Forward	5'-CCTTGCCTATGCAGTGAGATG-3'	60℃
Exon3 Reverse	5'-CGCCAAAGCTGGTTTTACCTAC-3'	
Exon7 Forward	5'-AGTCACAGCGTTGAAAGCAC-3'	60℃
Exon7 Reverse	5'-GGCACACAGGAAAGAGAATCTG-3'	

表 4、バイサルファイトシーケンシングプライマー塩基配列

バイサルファイト PCR プライマー	配列	アニーリング温度	サイクル数
1st PCR			
H19 Forward	5'-GAGTATTTAGGAGGTATAAGAATT-3'	56℃	x30
H19 Reverse	5'-ATCAAAAACTAACATAAACCCCT-3'		
L1MdA Forward	5'-TTATTTTGATAGTAGAGTT-3'	52℃	x40
L1MdA Reverse	5'-CRAACCAAACTCCTAACAA-3'		
L1MdGf Forward	5'-GTTAGAGAATTTGATAGTTTTTGGAATAGG-3'	56℃	x10
L1MdGf Reverse	5'-CCAAAACAAAACCTTTCTCAAACACTATAT-3'		
IAP1d1 Forward	5'-GTTTGTAATGGTGGGAGAT-3'	50℃	x30
IAP1d1 Reverse	5'-ATTCTAAAATAAAATATCCCTCC-3'		
2st PCR			
H19 Forward	5'-GTAAGGAGATTATGTTTATTTTTGG-3'	56℃	x30
H19 Reverse	5'-CCTCATTAATCCCATAACTAT-3'		
L1MdGf Forward	5'-TAGGAAATTAGTTTGAATAGGTGAGAGGT-3'	56℃	x30
L1MdGf Reverse	5'-TCAAACACTATATTACTTTAACAATTCCCA-3'		
IAP1d1 Forward	5'-AAATAAATTGTGGGAAGT-3'	51℃	x30
IAP1d1 Reverse	5'-CAAAAAAAACACCACAAACCAAAAT-3'		

表 5、qPCR プライマー塩基配列

qPCR プライマー	配列	アニーリング温度
Actb F	5'-CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT-3'	60℃
Actb R	5'-CGTCACACTTCATGATGGAATTGA-3'	
IAP 1d1 F	5'-AACGCTGCTGCTTTAACTCC-3'	60℃
IAP 1d1 R	5'-ATTGTTCCCTCACTGGCAAA-3'	
LINE1A type F	5'-CAGCTGAGTCGCCTGACAC-3'	60℃
LINE1A type R	5'-CTCTCCTTAGTTTCAGTGG-3'	
LINE1Gf type F	5'-CTGTACCACCTGGGAACTGC-3'	60℃
LINE1Gf type R	5'-TGCTGGCAAGCTCTCTTACA-3'	

謝辞

本研究をおこなうに当たりまして、総括的な研究の方針や進め方についてご指導を頂いた仲野徹教授を始めとし、実験の手技・手法について懇切丁寧にアドバイスを頂いた宮川さとみ特任講師及び永森一平助教、受精卵への RNA インジェクションなど欠損マウス作製に関して助力を頂いた中谷庸寿元助教・現 Helmholtz Institutes 研究員、研究室内の雑務や試薬整理・ラボ環境整備をおこなって頂いた秘書の今泉真由子氏および浅田徳子氏、そして常日頃から叱咤激励を頂いている病因解析学研究室の皆様方には、この紙面をお借りして厚く御礼申し上げます。

参考文献

Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T.*, et al.* (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. Nature *442*, 203-207.

Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The Small RNA Profile during Drosophila melanogaster Development. Developmental Cell *5*, 337-350.

Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. Mol Cell *31*, 785-799.

Aravin, A.A., van der Heijden, G.W., Castaneda, J., Vagin, V.V., Hannon, G.J., and Bortvin, A. (2009). Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. PLoS Genet *5*, e1000764.

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. EMBO J *17*, 170-180.

Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. Dev Cell *12*, 503-514.

Chuma, S., Hosokawa, M., Kitamura, K., Kasai, S., Fujioka, M., Hiyoshi, M., Takamune, K., Noce, T., and Nakatsuji, N. (2006). Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 15894-15899.

Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., and Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. Genes Dev *12*, 3715-3727.

De Fazio, S., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Abreu-Goodger, C., Sankar, A., Funaya, C., Antony, C., Moreira, P.N., Enright, A.J., and O'Carroll, D. (2011). The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. Nature *480*, 259-263.

Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. Dev Cell *2*, 819-830.

Di Giacomo, M., Comazzetto, S., Saini, H., De Fazio, S., Carrieri, C., Morgan, M., Vasiliauskaite, L., Benes, V., Enright, A.J., and O'Carroll, D. (2013). Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis. Mol Cell *50*, 601-608.

Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2001). RNA interference in Trypanosoma

brucei: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. RNA *7*, 1522-1530.

Frost, R.J., Hamra, F.K., Richardson, J.A., Qi, X., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2010). MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 11847-11852.

Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., and Carmell, M.A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. Nature *442*, 199-202.

Goh, W.S., Falciatori, I., Tam, O.H., Burgess, R., Meikar, O., Kotaja, N., Hammell, M., and Hannon, G.J. (2015). piRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. Genes Dev *29*, 1032-1044.

Gregory, T.R. (2005). Synergy between sequence and size in large-scale genomics. Nat Rev Genet *6*, 699-708.

Grivna, S.T., Beyret, E., Wang, Z., and Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. Genes Dev *20*, 1709-1714.

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J *21*, 4671-4679.

Han, B.W., Wang, W., Li, C., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2015a). Noncoding RNA. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. Science *348*, 817-821.

Han, B.W., Wang, W., Zamore, P.D., and Weng, Z. (2015b). piPipes: a set of pipelines for piRNA and transposon analysis via small RNA-seq, RNA-seq, degradome- and CAGE-seq, ChIP-seq and genomic DNA sequencing. Bioinformatics *31*, 593-595.

Hayashi, R., Schnabl, J., Handler, D., Mohn, F., Ameres, S.L., and Brennecke, J. (2016). Genetic and mechanistic diversity of piRNA 3'-end formation. Nature *539*, 588-592.

Hogarth, C.A., and Griswold, M.D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. J Clin Invest *120*, 956-962.

Ipsaro, J.J., Haase, A.D., Knott, S.R., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2012). The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. Nature *491*, 279-283.

Izumi, N., Shoji, K., Sakaguchi, Y., Honda, S., Kirino, Y., Suzuki, T., Katsuma, S., and Tomari, Y. (2016). Identification and Functional Analysis of the Pre-piRNA 3' Trimmer in Silkworms. Cell *164*, 962-973.

Kawaoka, S., Izumi, N., Katsuma, S., and Tomari, Y. (2011). 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. Mol Cell *43*, 1015-1022.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W.*, et al.* (2004). Mili, a mammalian member of piwi family

gene, is essential for spermatogenesis. Development *131*, 839-849.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., and Nakano, T. (2001). Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. Mech Dev *108*, 121-133.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kita-Kojima, K., Shiromoto, Y., Ito, D., Koshima, H., and Nakano, T. (2014). DNA methylation in mouse testes. Methods Mol Biol *1093*, 97-109.

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K., Shiromoto, Y., Asada, N., Toyoda, A., Fujiyama, A., *et al.* (2010). MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. Genes Dev *24*, 887-892.

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., *et al.* (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. Genes Dev *22*, 908-917.

Mattick, J.S. (2011). The central role of RNA in human development and cognition. FEBS Lett *585*, 1600-1616.

Meikar, O., Da Ros, M., Korhonen, H., and Kotaja, N. (2011). Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. Reproduction *142*, 195-209.

Meikar, O., Da Ros, M., Liljenback, H., Toppari, J., and Kotaja, N. (2010). Accumulation of piRNAs in the chromatoid bodies purified by a novel isolation protocol. Exp Cell Res *316*, 1567-1575.

Mohn, F., Handler, D., and Brennecke, J. (2015). Noncoding RNA. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis. Science *348*, 812-817.

Mouse Genome Sequencing, C., Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature *420*, 520-562.

Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G., and Laux, T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. EMBO J *17*, 1799-1809.

Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M.K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., *et al.* (2012). Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. Nature *491*, 284-287.

Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C., and Sanchez Alvarado, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. Science *310*, 1327-1330.

Reuter, M., Berninger, P., Chuma, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C., Antony, C.,

Sachidanandam, R., and Pillai, R.S. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. Nature *480*, 264-267.

Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. Development *139*, 15-31.

Saxe, J.P., Chen, M., Zhao, H., and Lin, H. (2013). Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. EMBO J *32*, 1869-1885.

Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T.*, et al.* (2009). The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. Dev Cell *17*, 775-787.

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., and Aravin, A.A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. Nat Rev Mol Cell Biol *12*, 246-258.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans. Cell *99*, 123-132.

Vourekas, A., Zheng, Q., Alexiou, P., Maragkakis, M., Kirino, Y., Gregory, B.D., and Mourelatos, Z. (2012). Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. Nat Struct Mol Biol *19*, 773-781.

Wasik, K.A., Tam, O.H., Knott, S.R., Falciatori, I., Hammell, M., Vagin, V.V., and Hannon, G.J. (2015). RNF17 blocks promiscuous activity of PIWI proteins in mouse testes. Genes Dev *29*, 1403-1415.

Watanabe, T., Cheng, E.C., Zhong, M., and Lin, H. (2015). Retrotransposons and pseudogenes regulate mRNAs and lncRNAs via the piRNA pathway in the germline. Genome Res *25*, 368-380.

Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T.*, et al.* (2011). MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. Dev Cell *20*, 364-375.

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T.*, et al.* (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. Nature *453*, 539-543.

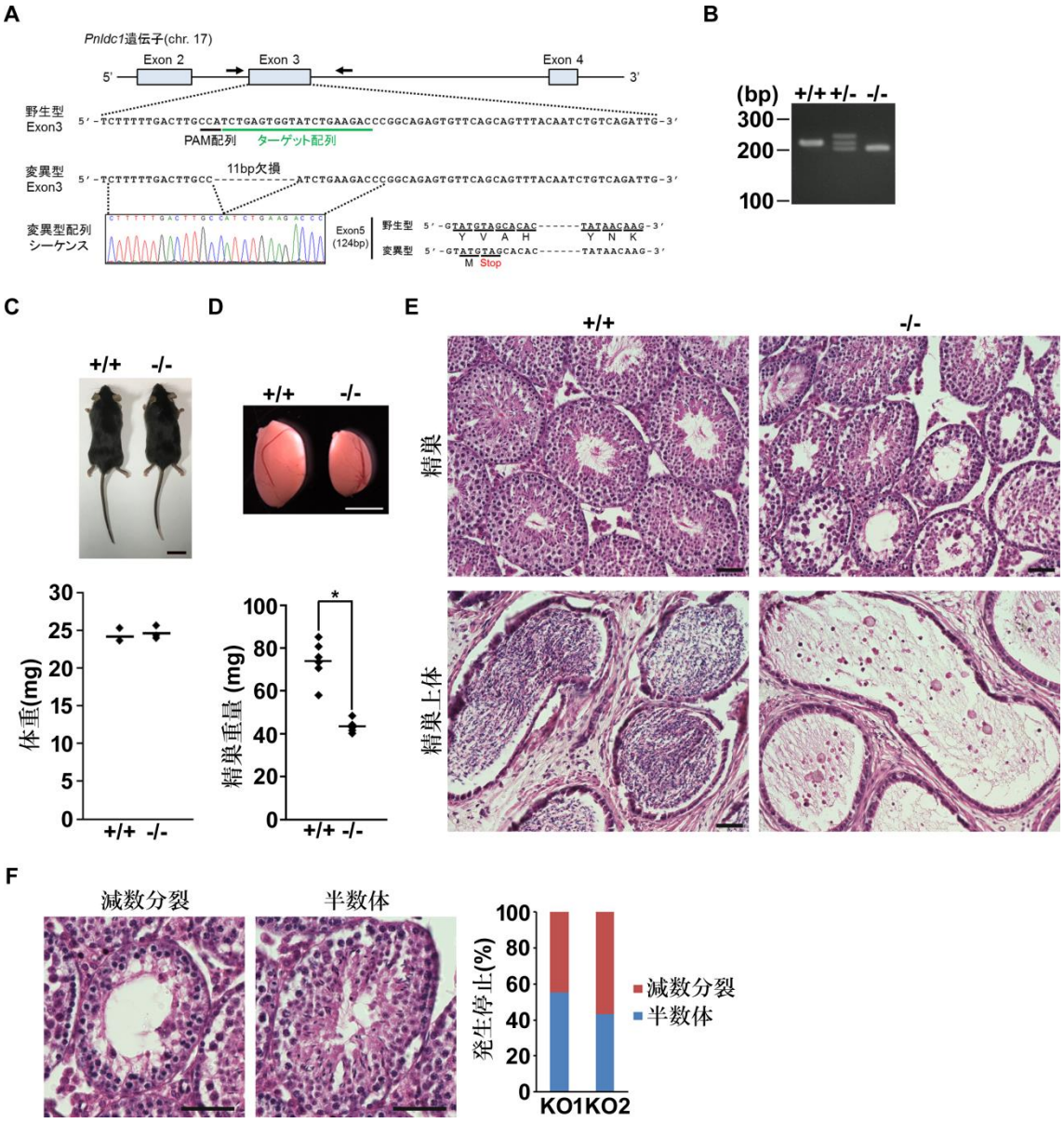
Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoto, K., Chuma, S., and Saitou, M. (2011). TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. J Cell Biol *192*, 781-795.

Zhang, P., Kang, J.Y., Gou, L.T., Wang, J., Xue, Y., Skogerboe, G., Dai, P., Huang, D.W., Chen, R., Fu, X.D.*, et al.* (2015). MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in

mouse testes. Cell Res *25*, 193-207.

Zhao, S., Gou, L.T., Zhang, M., Zu, L.D., Hua, M.M., Hua, Y., Shi, H.J., Li, Y., Li, J., Li, D.*, et al.* (2013). piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis. Dev Cell *24*, 13-25.

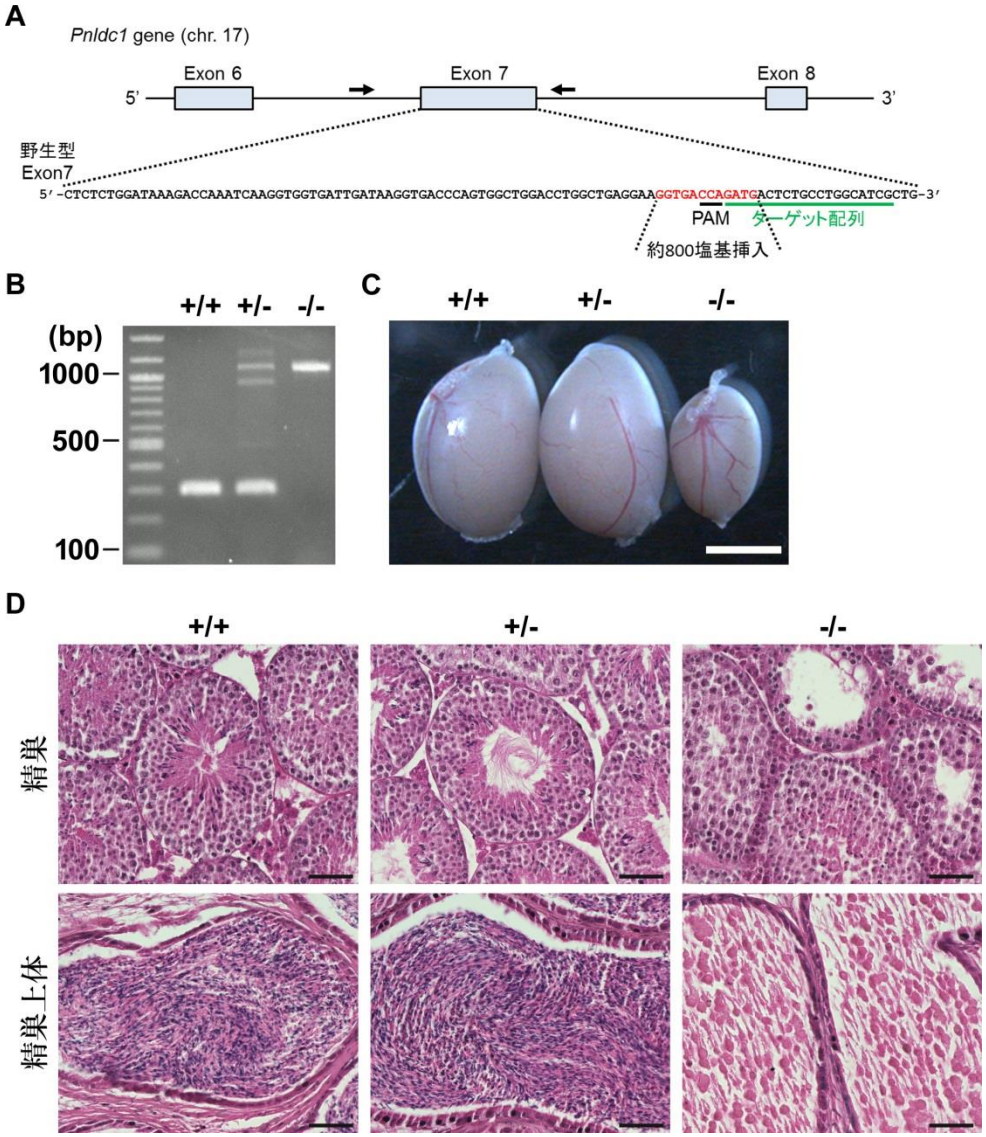
Zheng, K., Xiol, J., Reuter, M., Eckardt, S., Leu, N.A., McLaughlin, K.J., Stark, A., Sachidanandam, R., Pillai, R.S., and Wang, P.J. (2010). Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 11841-11846.



<u>図 1. *Pnldc1* 遺伝子の第 3 エキソンを 11 塩基欠損したマウスにおける精子形成不全</u>

（A）Cas9/sgRNA でターゲットした領域（緑下線部）、*Pnldc1* 欠損マウスの変異箇所、及び、欠損を確認したシーケンス結果と欠損マウスにおける *Pnldc1* mRNA の終止コドンの位置。矢印はジェノタイピング用プライマーの位置を示す。（B）PCR によるジェノタイピングの結果。(C) 8 週齢野生型及び *Pnldc1* 欠損マウスの外観（上）及びその重量（下）。(D) 8 週齢野生型及び *Pnldc1* 欠損マウス精巣の外観（上）及びその重量（下）。p = 0.00028。（Scale bar = 2mm）（E）8 週齢の野生型、及び *Pnldc1* 欠損マウス精巣（上）と精巣上体

（下）の HE 染色像（Scale bar = 50μm）。（F）減数分裂異常及び形態形成異常を示す精細管の代表図（Scale bar = 50μm）（左）と *Pnldc1* 欠損マウス精巣 2 個体の精子形成異常の比率（右）。



<u>図 2. *Pnldc1* 遺伝子の第 7 エキソンに約 800 塩基の挿入のあるマウスの精子形成不全</u>

（A）Cas9/sgRNA でターゲットした領域（緑下線部）とその周辺の概略図と *Pnldc1* 欠損マウスの変異箇所。矢印はジェノタイピング用プライマーの位置を示す。（B）PCR によるジェノタイピングの結果。（C）8 週齢の野生型、*Pnldc1* ヘテロ欠損、及び、*Pnldc1* 欠損マウス精巣の外観。（Scale bar = 2mm）（D）8 週齢の野生型、*Pnldc1* ヘテロ欠損、及び、*Pnldc1* 欠損マウス精巣（上）と精巣上体（下）の HE 染色像（Scale bar = 50μm）。

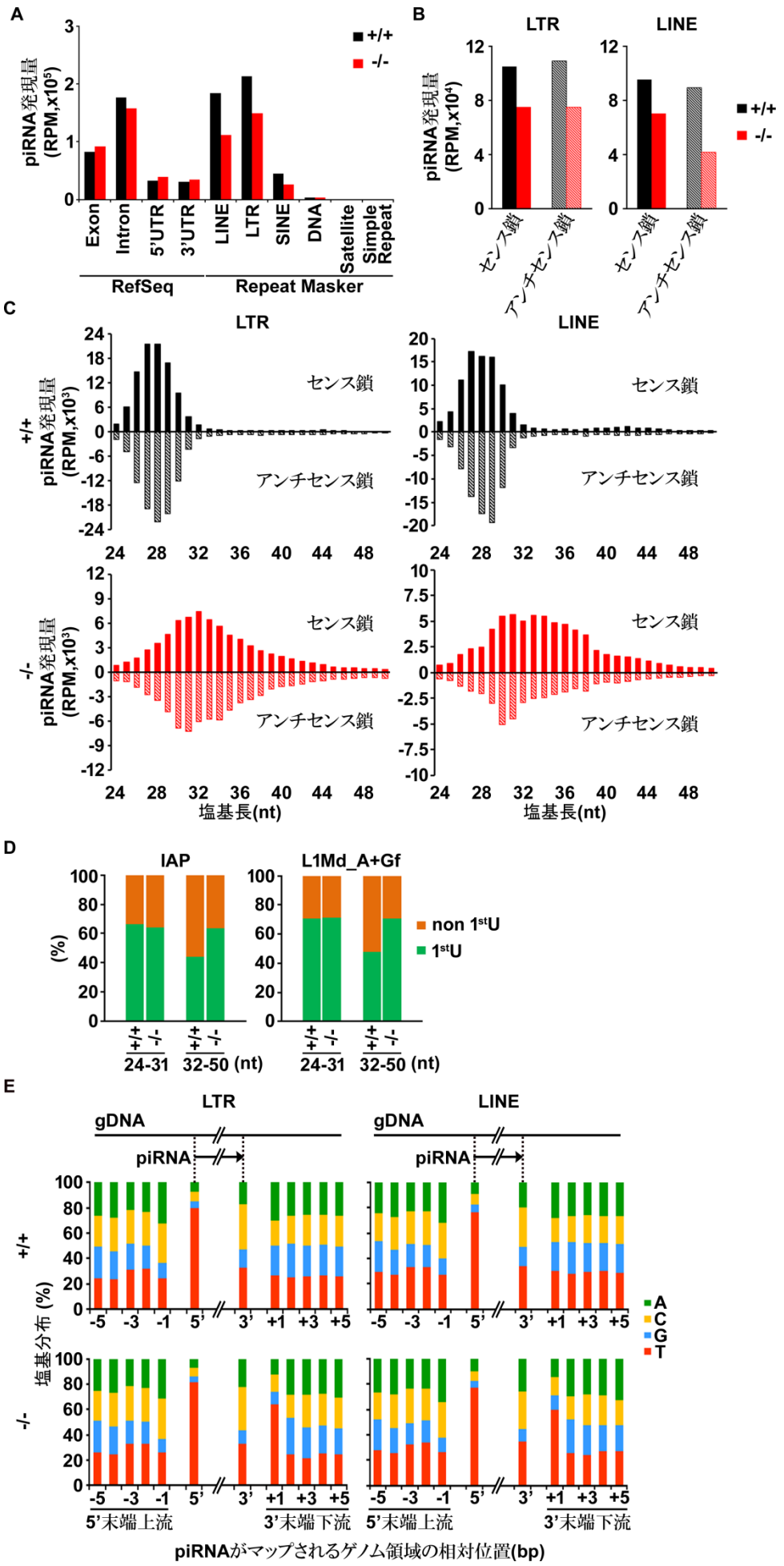

A
piRNA発現量 (RPM,x10³)
+/+
-/-
Exon
Intron
5'UTR
3'UTR
LINE
LTR
SINE
DNA
Satellite
Simple Repeat
RefSeq
Repeat Masker
B
LTR
LINE
piRNA発現量 (RPM,x10⁴)
センス鎖
アンチセンス鎖
C
+/+ piRNA発現量 (RPM,x10³)
-/- piRNA発現量 (RPM,x10³)
塩基長(nt)
D
IAP
L1Md_A+Gf
(%)
non 1stU
1stU
24-31
32-50 (nt)
E
gDNA
piRNA
塩基分布 (%)
A
C
G
T
5'末端上流
3'末端下流
piRNAがマップされるゲノム領域の相対位置(bp)

図 3. 胎生期 16.5 日齢 *Pnldc1* 欠損精巣における pre-piRNA の蓄積

（A）遺伝子領域及びリピート配列に由来する piRNA の発現量。（B）LTR 及び LINE 由来のセンス鎖・アンチセンス鎖 piRNA それぞれの発現量。（C）各塩基長の piRNA 発現量。（D）LTR 型レトロトランスポゾン IAP、及び、LINE 型レトロトランスポゾン A タイプと Gf タイプのコンセンサス配列にマップされる RNA を 24-31 塩基長と 32-50 塩基長のグループに分類し、各グループの RNA5'末端のウラシル（1stU）の比率。（E）ゲノムにユニークヒットする出生後 24 日齢 piRNA の上流と下流のゲノム配列の塩基分布。Pnldc1 欠損精では piRNA の 3'末端の下流の塩基がチミンに偏っている。（左）LTR 由来の piRNA。（右）LINE 由来の piRNA。gDNA；genome DNA

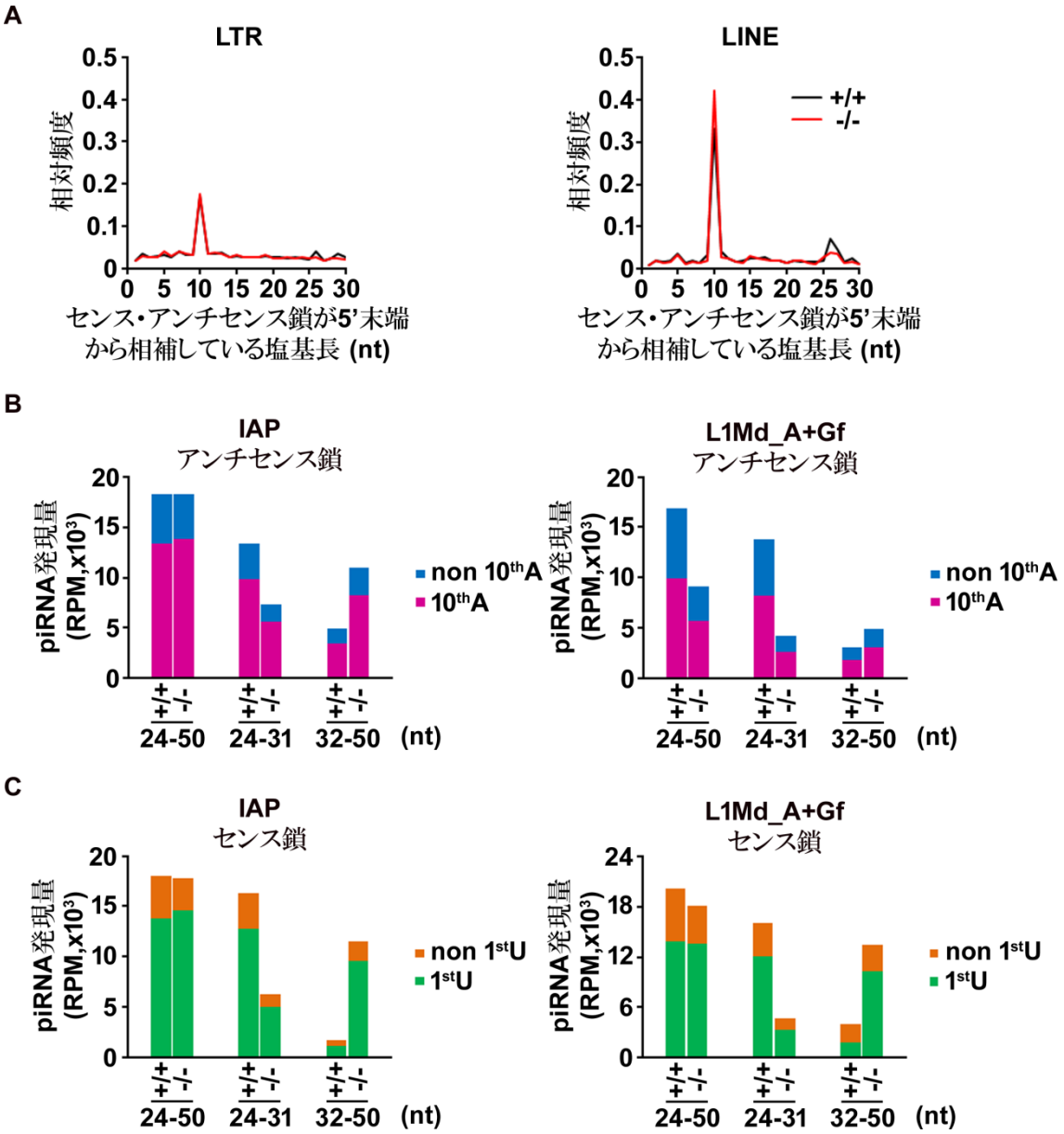


図 4. 胎生期 16.5 日齢 *Pnldc1* 欠損精巣における piRNA の二次生成

(A) LTR 及び LINE のコンセンサス配列にマップされたセンス鎖とアンチセンス鎖 piRNA の 5'末端が相補する塩基長の算出結果。(B) LTR 型レトロトランスポゾン IAP (M17551)、及び、LINE 型レトロトランスポゾン A (M13002) タイプと Gf タイプ (D84391) の配列にマップされる 24-50 塩基長のアンチセンス鎖 RNA を、24-31 塩基長と 32-50 塩基長のグループに分類。各グループの 10thA piRNA の発現量を示す。(C) IAP、LINE1 の A タイプ及び Gf タイプの配列にマップされる 24-50 塩基長のセンス鎖 RNA を、24-31 塩基長と 32-50 塩基長のグループに分類。各グループの 1thU piRNA の発現量を示す。

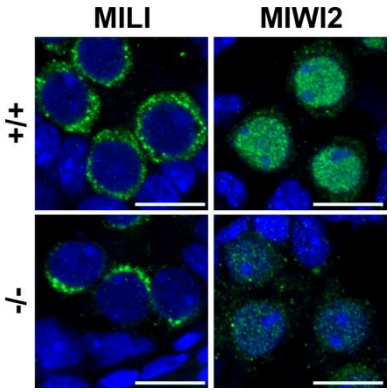


図 5. *Pnldc1* 欠損精巣における MILI 及び MIWI2 の局在異常

胎生期 16.5 日齢野生型及び *Pnldc1* 欠損マウスにおける MILI 及び MIWI2 の免疫染色像（Scale bar = 10μm）。

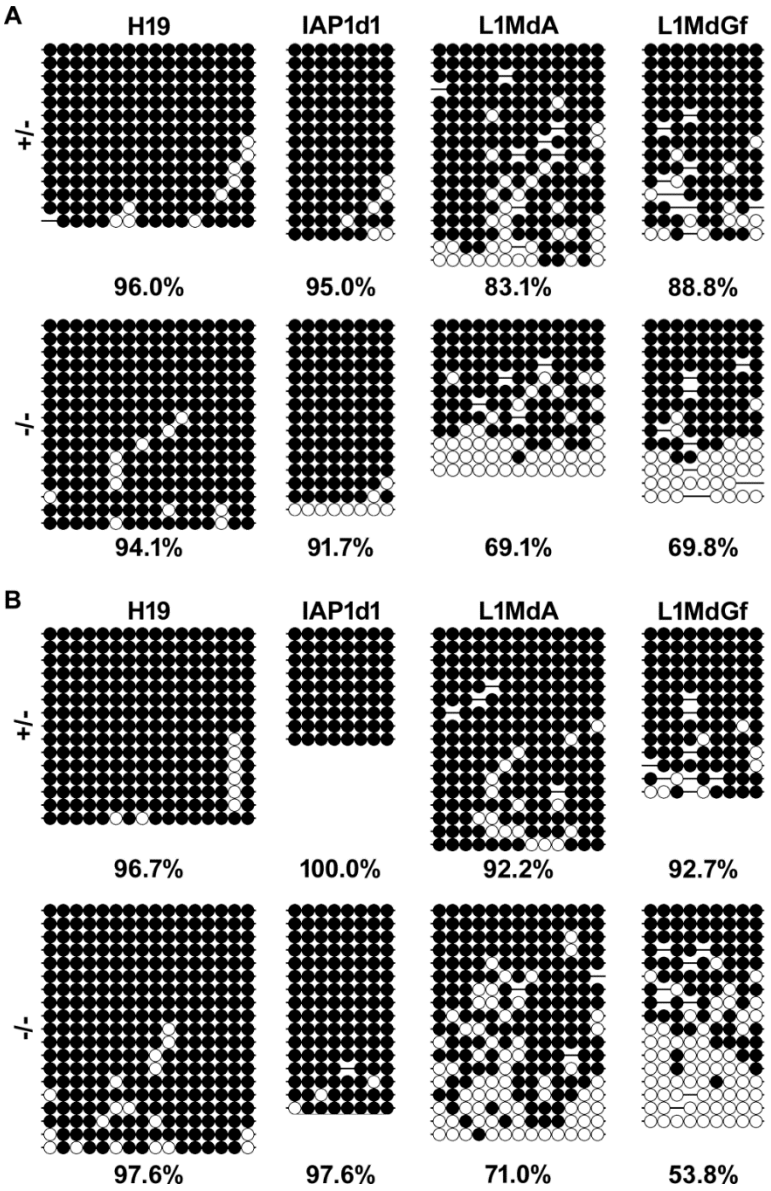


図 6. *Pnldc1* 欠損精巣における DNA メチル化異常

生後 10 日齢コントロール及び *Pnldc1* 欠損精巣から回収した Ep-CAM 陽性の生殖細胞における IAP1d1 及び LINE1 プロモーター領域の DNA メチル化状態。（A）エキソン 3 を 11 塩基欠損したマウス。（B）エキソン 7 に 約 800 塩基挿入されたマウス。（QUMA による解析 ：identity > 90%、converted >90%）

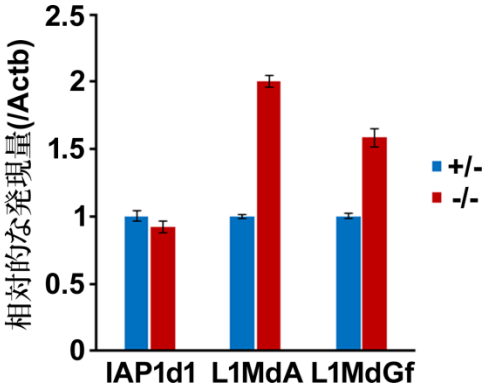


図 7. *Pnldc1* 欠損精巣における LINE1 の発現増加

生後 12 日齢コントロール及び *Pnldc1* 欠損精巣におけるレトロトランスポゾン RNA の発現量。エラーバーはテクニカルトリプリケート。(n=1)

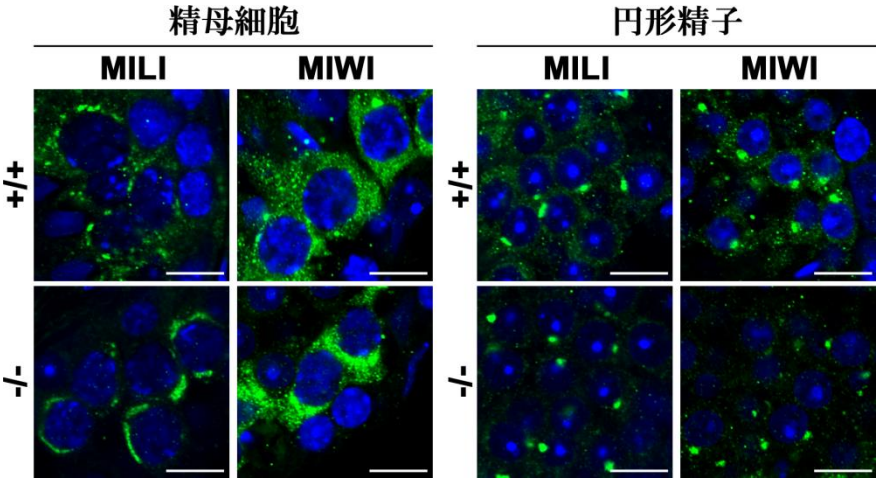


図 8. *Pnldc1* 欠損成体精巣における MILI 及び MIWI の局在異常

8 週齢野生型及び *Pnldc1* 欠損マウス精巣の精母細胞及び円形精子における MILI 及び MIWI の免疫染色像（Scale bar = 10μm）。

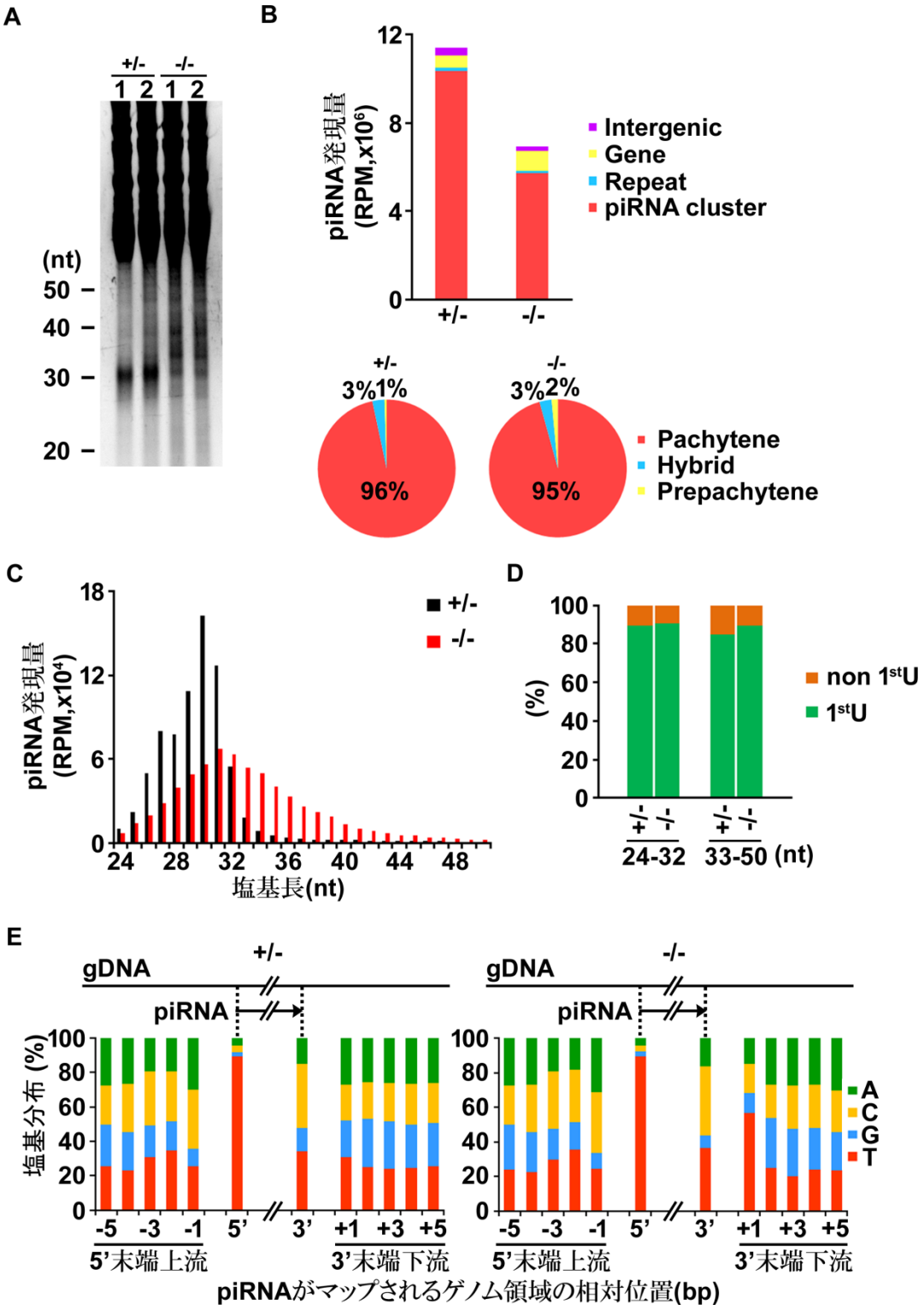

A
+/-
-/-
1 2 1 2
(nt)
50
40
30
20
B
piRNA発現量
(RPM,x10⁶)
12
8
4
0
+/-
-/-
Intergenic
Gene
Repeat
piRNA cluster
+/-
3%1%
96%
-/-
3%2%
95%
Pachytene
Hybrid
Prepachytene
C
piRNA発現量
(RPM,x10⁴)
18
12
6
0
24 28 32 36 40 44 48
塩基長(nt)
+/-
-/-
D
100
80
60
40
20
0
(%)
+/- -/- +/- -/-
24-32 33-50 (nt)
non 1stU
1stU
E
gDNA
+/-
piRNA
gDNA
-/-
piRNA
塩基分布 (%)
100
80
60
40
20
0
-5 -3 -1 5' 3' +1 +3 +5
5'末端上流
3'末端下流
A
C
G
T
piRNAがマップされるゲノム領域の相対位置(bp)

図 9. 生後 24 日齢 *Pnldc1* 欠損精巣におけるパキテン pre-piRNA の蓄積

（A）生後 24 日齢コントロール及び *Pnldc1* 欠損精巣の total small RNA 電気泳動像。（B-D）生後 24 日齢コントロール及び *Pnldc1* 欠損精巣中の小分子 RNA 解析。（B）24-50 塩基長小分子 RNA の各分類の発現量（上）と各 piRNA クラスターの比率（下）。（C）パキテン piRNA クラスター由来の piRNA の各塩基長の発現量。（D）パキテン piRNA クラスターにマップされる RNA を 24-32 塩基長と 33-50 塩基長のグループに分類し、その 5'末端のウラシル（1stU）の比率。（E）ゲノムにユニークヒットする胎生期 16 日齢 piRNA の上流と下流のゲノム配列の塩基分布。Pnldc1 欠損精では piRNA の 3' 末端の下流の塩基がチミンに偏っている。gDNA；genome DNA

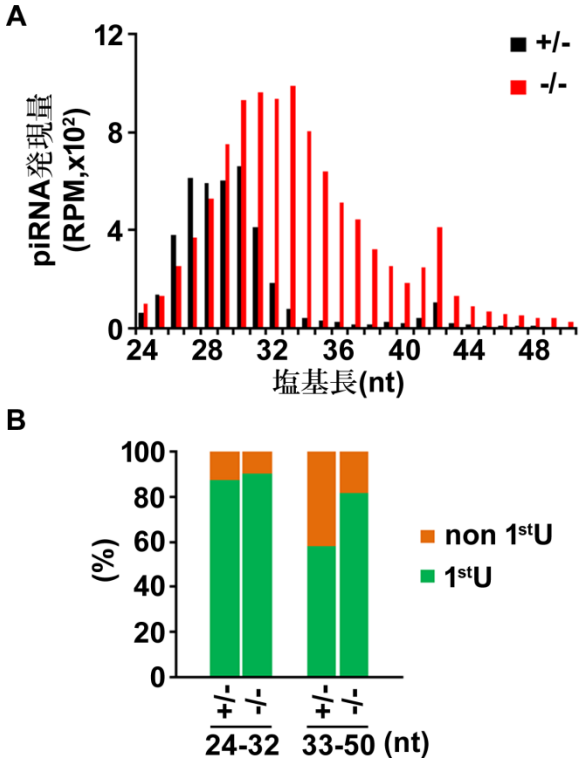


図 10. 生後 24 日齢 *Pnldc1* 欠損精巣におけるプレパキテン pre-piRNA の蓄積

（A）プレパキテン piRNA クラスター由来の piRNA の各塩基長の発現量。（B）プレパキテン piRNA クラスターにマップされる RNA を 24-32 塩基長と 33-50 塩基長のグループに分類し、その 5'末端のウラシル（1stU）の比率。

業績

＜発表＞

・Mouse PIWI regulates LIN28A expression at translational level in neonatal testis

西村徹、永森一平、仲野徹
大阪大学生命機能研究科　第 6 回学生主催若手合宿研究交流会

2012 年 7 月 31 日

・Research for new roles of PIWI proteins in mouse testis

西村徹、永森一平、仲野徹
大阪大学生命機能研究科　第 7 回学生主催若手合宿研究交流会

2013 年 7 月 29 日

・Search for MILI binding proteins in mice male germ cells.

西村徹、永森一平、仲野徹
大阪大学生命機能研究科　第 8 回学生主催若手合宿研究交流会

2014 年 7 月 9 日

・精原細胞における RNA 核外輸送機構の解析

西村徹、永森一平、城本悠助、宮川さとみ、片平じゅん、仲野徹
1. 新学術領域研究　生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御　若手勉強会 2015

2015 年 7 月 22 日

2. 大阪大学医学系研究科　第5回若手研究フォーラム

2015年9月15日

・マウスPNLDC1のpiRNA産生における3'末端 Trimmerとしての役割

西村徹、永森一平、宮川さとみ、泉奈津子、泊幸秀、仲野徹
第39回日本分子生物学会年会
2016 年 11 月 30 日

＜発表論文＞

（共著）

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

Itou D, Shiromoto Y, Shin-ya Y, Ishii C, Nishimura T, Ogonuki N, Ogura A, Kuramochi-Miyagawa, Nakano T

Current Biol, 25:901-906, 2015

主たる寄与：トランスジェニックマウスのコンストラクト作製。トランスジェニックマウスからの生殖細胞の回収。

・Comprehensive DNA methylation analysis of retrotransposons in male germ cells

Nagamori I, Kobayashi H, Shiromoto Y, Nishimura T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T

Cell Rep, 12:1541-7, 2015

主たる寄与：論文で用いた NGS 解析の基盤構築、及び、一部の解析。