OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effects of transgene insertion locus and copy number on endogenous Dnmt3L gene silencing by antisense transgene derived piRNAs
Author(s)	李, 世弼
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85274
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　李世弼　）	
論文題名	Effects of transgene insertion locus and copy number on endogenous *Dnmt3L* gene silencing by antisense transgene derived piRNAs (アンチセンストランスジーン由来piRNAによる内在性Dnmt3L遺伝子のサイレンシングにおけるトランスジーン挿入部位とコピー数の影響)

論文内容の要旨

PIWI-interacting RNA (piRNA) is a class of small RNAs regulated by PIWI (Argonaute subfamily), which are abundantly expressed in germline cells. piRNAs contribute to both post-transcriptional gene silencing (PTGS) and methylation-mediated transcriptional gene silencing (TGS). These piRNAs are synthesized from sense and anti-sense RNA containing transposable elements transcribed from piRNA clusters, and piRNA-mediated silencing of retrotransposon genes is essential for spermatogenesis progression. In a previous study, we found that the sole occurrence of sense and anti-sense RNA against a specific gene is sufficient to mimic the natural piRNA system. Namely, *Miwi2* promoter-driven anti-sense *Dnmt3L*-expressing transgenic mice (Tg-*Miwi2*p-as*Dnmt3L*) exhibited a DNMT3L-deficient phenotype caused by piRNA mediated epigenetic silencing in the embryonic germ cells. However, It was not determined whether the production of *Dnmt3L* piRNA was derived from the *Miwi2* promoter-driven transgene or from a transgene inserted onto the piRNA cluster. Therefore, whole-genome sequencing was conducted to clarify the transgene insertion loci. Two transgene insertion loci (18qB3 and 18qE1) were identified on chromosome 18 in Tg-as*Dnmt3L* mice, and both were recognized as weak piRNA clusters. Mice that exclusively carried transgenes in a single locus were then isolated via crossbreeding. DNMT3L was silenced and spermatogenesis was severely impaired in the mice carrying the transgene at the 18qB3 locus (B3). In contrast, the spermatogenesis of the mice bearing the transgene at the 18qE1 locus (E1) was normal. Small RNA-seq data revealed that the number of piRNA corresponding to *Dnmt3L* were higher in the B3 than in the E1. Additionally, the B3 exhibited high copy numbers of the transgene, whereas the opposite was true for the E1. Moreover, the endogenous *Dnmt3L* promoter was not methylated in the studied Tg mice. Taken together, these findings indicate that artificial piRNA-mediated *Dnmt3L* silencing was caused by PTGS and was more dependent on transgene copy number rather than transgene insertion locus.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　　李 世 弼　　）	
	（職）	氏　　名
論文審査担当者	主 査　　教 授	仲野　徹
	副 査　　教 授	甲斐　歳恵
	副 査　　教 授	佐々木　洋
	副 査　　教 授	八木　健

論文審査の結果の要旨

生殖細胞特異的な小分子RNAであるPIWI-interacting RNA（piRNA）は、精子形成に必須である。先行研究（Itou et.al. Curr.Biol. 2015）では、Miwi2プロモーターの制御下でアンチセンス-Dnmt3Lを発現させたトランスジェニックマウス（Tg-Miwi2P-asDnmt3L）が、piRNAを介したDNMT3Lのサイレンシングを示すことが報告されていた。トランスジーンの挿入部位を全ゲノム配列決定によって調べたところ、2ヶ所（18qB3および18qE1）に挿入されていることを見出した。18qB3遺伝子座に導入遺伝子を保有するマウスでは精子形成が著しく損なわれ、Dnmt3Lに対応するpiRNAが多く、トランスジーンのコピー数が40-50程度検出された。一方、18qE1遺伝子座に導入遺伝子を持つマウスの精子形成は正常で、piRNAも少なく、コピー数は10程度であった。さらに、Tgマウスでは内因性のDnmt3Lプロモーターがメチル化されていなかったことから、内在性Dnmt3Lのpost-transcriptional gene silencing (PTGS) が示唆された。これらの結果は、当該分野においての重要な知見であるとともに、新規の遺伝子サイレンシング機構としても応用が期待できる。以上により、本研究は学位授与に値するものと認める。