

氏名	池田晋也
学位(専攻分野の名称)	博士(バイオサイエンス)
学位記番号	甲第849号
学位授与の日付	令和4年3月20日
学位論文題目	レトロトランスポゾンが雌雄生殖細胞の機能に及ぼす影響
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 小川英彦 教授・博士(畜産学) 尾畑やよい 教授・博士(医学) 中澤敬信 客員教授・博士(理学) 宮戸健二*

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

雌雄配偶子の祖細胞である始原生殖細胞はマウスにおいて胎齢 7.25 日に体細胞の系譜から分離することで出現する。始原生殖細胞では多分化能を獲得するために、全ゲノムレベルで DNA の脱メチル化が行われるが、それに伴いレトロトランスポゾンが脱抑制してしまう。こうしたレトロトランスポゾンの脱抑制はゲノムの完全性を維持し、それを子孫細胞や次世代へ継承する上での脅威となりうる。雄性生殖系列において、レトロトランスポゾンは精子幹細胞の前駆細胞である周産期前精原細胞の段階において piRNA 経路により再抑制される。piRNA 経路は小分子 RNA である piRNA をガイドに DNA のメチル化を行うことでレトロトランスポゾンの抑制を担う。piRNA 経路の欠損は雄性生殖細胞系列において、レトロトランスポゾンの脱抑制と幼若期(2週齢)以降における第二減数分裂前(一次精母細胞)での発生停止を引き起こすことが知られている。このように周産期でのレトロトランスポゾンの抑制は出生後の正常な精子形成に必須の役割を持つ。しかしながら、piRNA 経路の欠損は前精原細胞に顕著な表現型異常を生じさせない。前精原細胞は、精子幹細胞、精母細胞、精子を含む雄性生殖細胞の根幹となる細胞であり、piRNA 経路の破綻によるレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞にどのような影響を及ぼし、後に精子形成不全に至らしめるのか理解する生物学定義は大きい。一方、雌性生殖系列においては piRNA による DNA メチル化を介したレトロトランスポゾンの抑制機構が働いていないことが報告されてきている。実際、前精原細胞と同時期の卵母細胞では DNA メチル化酵素は発現しておらず、また、piRNA 経路に属する遺伝子を欠損しても雌の妊孕性には影響を与えない。このことから、雌性生殖系列においては、前精原細胞では piRNA 経路により抑制される、レトロトランスポゾンの活性化がもたらす機能が許容されている可能性がある。あるいは DNA メチル化に

\*国立開発研究法人国立成育医療研究センター 再生医療センター細胞医療研究部生殖細胞機能研究室 室長

依存しない、レトロトランスポゾンを抑止する別の機構が存在する可能性が示唆される。

そこで本研究では、レトロトランスポゾンの活性化が初期の雌雄生殖細胞の機能に及ぼす影響を解明することを目的とし、まず第一に piRNA 経路のマスターレギュレーターである ankyrin repeats, SAM, and basic leucine zipper domain-containing 1 (*Asz1*) 遺伝子の欠損マウスを解析することとした。第二に、DNA メチル化に依存的なレトロトランスポゾンの抑制機構が存在しない初期雌性生殖系列において、レトロトランスポゾンが *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞と同様に活性化し、機能しているかを検証することとした。

## 【結果】

### 1. *Asz1* 欠損マウスの表現型

研究を進めるにあたり、*Asz1* 欠損マウスの表現型を詳細に解析した。3 週齢の精巣に対してウェスタンブロットを行ったところ、野生型とは対照的に *Asz1* 欠損マウスの精巣では ASZ1 タンパク質が検出されなかった。精巣の組織学的な解析を行った結果、*Asz1* 欠損マウスの精巣では、野生型の精巣で伸長精子細胞が出現する時期になってもそれらの細胞は見られず、精子形成が途中で停止していた。それに伴い、野生型の精巣と比較して *Asz1* 欠損マウスの精巣は萎縮していた。これらの表現型は過去に報告している *Asz1* 欠損マウスの表現型と一致していた。

次に、*Asz1* 欠損マウスにおける精子形成の停止時期を正確に把握するために、3 週齢精巣由来の精母細胞におけるシナプトネマ複合体に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、野生型では第一減数分裂前期を構成するレプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期とディプロテン期の全てのサブステージの精母細胞が確認されたのに対し、*Asz1* 欠損マウスでは最も減数分裂が進行している精母細胞はザイゴテン期に相当する精母細胞であり、相同染色体の対合が完了するパキテン期以降の精母細胞は確認されなかった。これらの表現型は、同じく piRNA 経路の構成遺伝子である *Mili* や *Miwi2* の欠損マウスでも報告されており、*Asz1* 欠損マウスにおいてもそれらの遺伝子と同様に piRNA 経路の機能不全が起きていることが示唆された。

### 2. *Asz1* 欠損マウス前精原細胞における MIWI2 の核内局在の消失

*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞においてはレトロトランスポゾン mRNA の分解と piRNA の産生を同時に担う MILI の発現が著しく発現低下することが知られている。その一方で、piRNA 依存的にレトロトランスポゾンへの DNA メチル化導入を担う MIWI2 の *Asz1* 欠損による挙動の変化は明らかになっていない。そこで、胎仔期前精原細胞における MIWI2 の発現を解析した。その結果、野生型の前精原細胞において MIWI2 は細胞質と核の両方に局在していたが、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では MIWI2 の核内局在が消失し、細胞質に

のみ局在していた。このことから、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では DNA メチル化導入の失敗により、全ゲノムレベルでレトロトランスポゾンの転写抑制が破綻していることが示唆された。このことを支持するように、前精原細胞においてレトロトランスポゾン LINE1 の発現が上昇していた。

### **3. piRNA 機構の破綻が前精原細胞の遺伝子発現に及ぼす影響**

これまでの結果から *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞ではレトロトランスポゾンの転写レベルおよび転写後レベルでの抑制機構が破綻していることが示唆された。次に *Asz1* 欠損が前精原細胞の遺伝子発現に与える影響を RNA-seq により解析した。想定される通り、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では LINE 型および LTR 型のレトロトランスポゾンが野生型に対して発現上昇していた。遺伝子については、それぞれ 275 と 216 の遺伝子が有意に発現上昇および発現低下していた。発現上昇遺伝子のうち、100 倍以上の著しい発現上昇比を示し、精子形成におけるアポトーシスへの関与が示唆されている *Apoh* 遺伝子に着目した。その結果、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞で発現上昇していた *Apoh* 遺伝子は、*Apoh* のイントロン上に存在するレトロトランスポゾン IAPLTR1\_Mm と *Apoh* の 4 番から 8 番エクソンが融合した異常なトランスクリプトバリエーションであることが明らかとなった（以降 *IAP-Apoh* と呼称する）。このことから、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では脱抑制したレトロトランスポゾンが新たな転写開始点を形成し、異常トランスクリプトバリエーションを産生することが示唆された。

### **4. 前精原細胞における異常な融合トランスクリプトの検出**

次に、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞で存在が示唆された異常な融合トランスクリプトの検出を試みた。その結果、32 の遺伝子について異常な融合トランスクリプトの発現が確認された。これら 32 遺伝子について野生型と *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞での発現パターンを元に階層的クラスタリング解析を行ったところ、大きく二つのグループに分けられることがわかった。一つ目のグループは、典型トランスクリプトが野生型と *Asz1* 欠損前精原細胞のどちらでも発現していないが、*Asz1* 欠損前精原細胞において異常な融合トランスクリプトが発現しており、発現が著しく上昇しているように見えるグループである。このグループには *IAP-Apoh* が含まれた。二つ目のグループは、典型トランスクリプトが両方の遺伝子型の前精原細胞で発現しているが、*Asz1* 欠損前精原細胞では典型トランスクリプトに加えて異常な融合トランスクリプトが発現しており、発現量を傘増ししているグループである。後者のグループは正常な精子形成に必要な *Fancd2* 遺伝子の異常な融合トランスクリプトである *IAP-Fancd2* が含まれた。検出された 32 の異常な融合トランスクリプトは、ほとんどが上流 1 kb 以内に 1 つ以上の LINE 型もしくは LTR 型のレトロトランスポゾンを含ん

でいた。以上のことから、*Asz1* 欠損前精原細胞において、異常な融合トランスクリプトにより遺伝子発現の恒常性が失われていることが明らかとなった。

## **5. *Asz1* 欠損前精原細胞における DNA メチル化**

続いて、異常な融合トランスクリプトの転写への関与が疑われるレトロトランスポソンの DNA メチル化解析を行った。その結果、*IAP-Apoh* と *IAP-Fancd2* の上流に存在するレトロトランスポソン *IAP* はどちらも野生型の前精原細胞では高メチル化であったのに対し、*Asz1* 欠損前精原細胞では高メチル化されたアレルを保持してはいるものの低メチル化傾向にあることがわかった。この二峰性の DNA メチル化パターンは 2 週齢の精巣生殖細胞においても確認された。これらの結果から、レトロトランスポソンの活性化および異常な融合トランスクリプトの転写は DNA メチル化不全により引き起こされていることが示唆された。

## **6. 新生仔卵母細胞における *IAP-Fancd2* の DNA メチル化非依存的な抑制**

レトロトランスポソンの DNA メチル化に重要な *MIWI2* は卵子形成においては発現しておらず、加えて新生仔卵母細胞では DNA メチル化酵素も発現しないことが知られている。しかしながら、qRT-PCR 解析の結果、レトロトランスポソン由来の異常な融合トランスクリプトの 1 つである *IAP-Fancd2* は *Asz1* 欠損前精原細胞に比べて発現が著しく低いことが示され、DNA メチル化に依存しない抑制機構が存在することが示唆された。そこで新生仔卵母細胞における抑制型ヒストン修飾に着目して解析を行った。その結果、野生型の新生仔卵母細胞では、*IAP-Fancd2* の転写開始点付近に抑制型ヒストン修飾の 1 つである *H3K9me2* の蓄積が確認された。この蓄積は胎齢 13.5 日の生殖細胞ですでに確認されたことから、初期の生殖細胞と卵母細胞において異常な融合トランスクリプトはヒストン修飾依存的に抑制されていることが示唆された。

### **【考察】**

piRNA 経路の欠失によるレトロトランスポソンの活性化が初期の雄性生殖細胞である前精原細胞そのものに与える影響については不明であったが、本研究により、レトロトランスポソンの活性化は前精原細胞においてレトロトランスポソン由来の異常な融合トランスクリプトの転写を引き起こすことが明らかとなった。*Asz1* 欠損前精原細胞において観察されたこの現象は、piRNA をガイドにレトロトランスポソンへの DNA のメチル化導入を担う *MIWI2* が機能不全となり、DNA メチル化を失って活性化したレトロトランスポソンのプロモーター活性により引き起こされたことが示唆された。実際、異常な融合トランスクリプトの転写への関与が疑われるレトロトランスポソンは *Asz1* 欠損前精原細胞において低メチル化傾向を示した。前精原細胞において DNA メチル化はレトロトランスポソンの制御に重

要ではなく、このような異常な融合トランスクリプトは存在しないと考えられてきた。しかしながら本研究により前精原細胞の時点でレトロトランスポゾンの活性化は異常な融合トランスクリプトの発現を誘起することで前精原細胞の遺伝子発現の完全性を乱すことが明らかとなり、piRNA 経路は前精原細胞においてこれらの抑制に重要な役割を担っていることが明らかとなった。さらに piRNA 経路は雄性生殖系列が不均一な遺伝子発現動態を示す集団になることを抑制する潜在的な機能があることが明らかとなった。

一方で、前精原細胞とは異なり、初期卵母細胞では DNA メチル化酵素が発現しないことが知られているが、*Fancd2* の異常な融合トランスクリプト (*IAP-Fancd2*) は初期卵母細胞で抑制されており、これには抑制型ヒストン修飾の 1 つである H3K9me2 の関与が示唆された。これらのことから、雌性生殖細胞ではレトロトランスポゾンの活性は piRNA 経路を介した DNA メチル化に非依存的な機構で抑制されており、レトロトランスポゾンによるトランスクリプトームへの影響は限定的であった。

## 審査報告概要

レトロトランスポゾンは生物に進化をもたらす一方、ゲノムの不安定性を招き種の存続を危うくする要因にもなりうる。そのため、レトロトランスポゾンは通常 piRNA、DNA メチル化あるいは抑制型ヒストン修飾などにより抑制されているが、レトロトランスポゾン抑制に必要なかつ十分な条件の全容は不明である。池田晋也氏は、piRNA 機構欠如によるレトロトランスポゾンの脱抑制が雌雄生殖細胞に及ぼす影響が明らかにした。piRNA 機構の主要因子である *Asz1* を欠損したマウスの前精原細胞においては、レトロトランスポゾンが活性化すること、またその領域の DNA メチル化が欠如していること、それによってレトロトランスポゾンからの転写産物とタンパク質をコードする遺伝子のエクソンが融合したキメラ転写産物が生じることを見出した。前精原細胞のレトロトランスポゾン抑制に DNA メチル化は重要でないと考えられてきたが、本研究により、piRNA 経路を介した DNA メチル化が不可欠であることが明らかとなった。一方、雌性生殖系列の非成長期卵母細胞においては、piRNA 経路の主要因子である MIWI2 や DNA メチル化酵素が発現していないが、H3K9me2 などのヒストン修飾によりレトロトランスポゾンが抑制されている可能性が示唆された。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査員一同は池田晋也氏に博士（バイオサイエンス）の学位を授与するに相応しいと判断した。