

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成24年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

仲野 徹

大阪大学大学院・生命機能研究科・教授

エピゲノム成立の分子メカニズム解明と制御

§1. 研究実施体制

(1)「仲野」グループ

- ① 研究代表者： 仲野 徹（大阪大学大学院・生命機能研究科、教授）
- ② 研究項目
 - ・生殖細胞におけるエピゲノム状態確立の分子機構
 - ・DNA 脱メチル化によるエピゲノム状態の確立

(2)「中村」グループ

- ① 主たる共同研究者： 中村肇伸（長浜バイオ大学バイオサイエンス研究科、講師）
- ② 研究項目
 - ・DNA 脱メチル化によるエピゲノム状態の確立

§2. 研究実施内容

(文献番号は(3-1)に対応する)

<生殖細胞におけるエピゲノム状態確立の分子機構>

piRNA は生殖細胞特異的な小分子 RNA であり、レトロトランスポゾン遺伝子の *de novo* DNA メチル化を制御することにより、エピゲノム状態確立に深く関与している。piRNA 生合成過程において、PIWI ファミリーが酵素として重要な機能を有していることが知られており、マウスでは、胎生期雄性生殖細胞において、MILI および MIWI2 が機能している。しかし、その生合成過程については、不明な点も数多くのおされている。

胎生期雄性生殖細胞において piRNA 生合成過程の研究があまり進んでいない理由の一つに、少数しか存在しない細胞を集めることの困難さがあげられる。この問題を克服するため、雄性生殖

幹細胞に由来する培養細胞である Germline stem cell (GS 細胞) を利用する方法を考案した。

野生型の GS 細胞、MILI を欠損する GS 細胞を用いて、センダイウイルスベクターによる遺伝子導入法を組み合わせることにより、種々の検討をおこなった結果、GS 細胞は、piRNA 合成経路の初期段階を解析するのに適していることが明らかとなった。

piRNA の生合成には、MILI および MIWI2 のみならず、多くのタンパクが関与しており、それらのタンパクが複合体を形成していると考えられている。そこで、この実験系を用いて、MILI に結合するタンパクの同定を試みた。その結果、ミトコンドリア外膜に存在する、脂質代謝に関与する酵素 GPAT2 (Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2) と MILI が結合することを見いだした。

詳細な検討をおこなったところ、GPAT2 は piRNA の生合成に重要な役割を有していることを明らかにした。また、GPAT2 の酵素活性は piRNA 生合成に不要であることも見いだした。この結果は、GPAT2 が酵素としてではなく、ミトコンドリア外膜に MILI をはじめとする piRNA 生合成タンパク複合体のアンカーとして機能していることを示唆しており、さらなる解析を進めている。この一連の研究は、CREST に支援を受けた研究として、RNA 誌への掲載が決まっている (文献 1)

<DNA 脱メチル化によるエピゲノム状態の確立>

がん細胞において、ゲノム全体の低メチル化とプロモーター領域の高メチル化が生じることが知られている。しかし、このような DNA メチル化状態はすでにがん化した細胞の解析によるものであり、DNA の低メチル化状態が発がんにどのように機能するのかはよくわかっていない。一方、これまでに、DNA メチル化制御に関与するタンパクである Stella の機能解析から、NIH3T3 細胞に Stella を過剰発現させることにより、ゲノムの低メチル化が誘導され、移植可能な腫瘍が形成されることを見いだしている。

本年度の研究では、Stella を過剰発現させた NIH3T3 細胞の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、Stella を発現した NIH3T3 細胞では、がん遺伝子の中で唯一 c-Jun 遺伝子の発現が有意に上昇していた。そこで、Stella による NIH3T3 細胞のトランスフォーメーションが c-Jun 遺伝子の発現誘導を介しているかどうかを調べるために、Stella を発現した NIH3T3 細胞において c-Jun 遺伝子のノックダウンを行った。その結果、c-Jun をノックダウンしても Stella によりトランスフォームした細胞の形態、増殖に変化は認められなかった。このことから、Stella を介した NIH3T3 細胞のトランスフォーメーションは、c-Jun 遺伝子の発現が上昇したためではなく、ゲノム全体のメチル化が低下することにより誘導された可能性が示唆された。この研究については、現在、投稿準備中である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Itou D, Kimura T, Nakano T. “GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells” *RNA*, (in press)