

京都大学	博士 (医科 学)	氏 名	田 中 敬
論文題目	The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline (TDRD9-MIWI2 複合体はマウス雄性生殖細胞における piRNA を介したレトロトランスポゾン抑制に必要である)		
(論文内容の要旨) 生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞系列であり、個体発生の起点となる細胞系列である。そのため、生殖細胞の分化プロセスにおけるゲノム情報防御機構は個体や種の維持のために重要な役割を果たす。 Tudor domain-containing (Tdrd) 遺伝子群、tudor ファミリーはショウジョウバエから哺乳類まで保存されている遺伝子群であり、その中には生殖細胞特異的な発現を示すものが多くみられる。当論文は tudor ファミリーの中で生殖細胞特異的な発現を示す新規の遺伝子である Tdrd9 遺伝子を単離同定し、同遺伝子改変マウスの作製によりその機能の解析を報告するものである。 Tdrd9 遺伝子は ATPase/DExH 型のヘリケースをコードする。Tdrd9 の機能を解析するため同遺伝子改変マウスを作成したところ、精母細胞における第一減数分裂の染色体対合に異常を示し、雄性不妊であった。またさらに、改変マウスの雄性生殖細胞では Line-1 レトロトランスポゾンの発現が上昇していた。 生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの制御はゲノム情報の防御に必須であり、通常レトロトランスポゾンのプロモーター領域はメチル化を受けることでその発現が抑制されている。この DNA メチル化によるレトロトランスポゾンの抑制に重要な役割を果たす蛋白質として、生殖細胞特異的な発現を示す Argonaute サブファミリー、piwi 蛋白質がある。マウスの piwi 蛋白質である MILI, MIWI2 はレトロトランスポゾンやそれ以外の転写産物から ping-pong プロセッシングと呼ばれる feed-forward 機構で piwi-interacting small RNAs (piRNAs) と呼ばれるクラスの small RNA を産生しており、これら piRNA 経路は胎児の前精原細胞において起こる de novo DNA メチル化によるレトロトランスポゾンの抑制に必要であることが報告されていた。このことから Tdrd9 遺伝子改変マウスの生殖細胞において DNA メチル化や piRNA について解析してみると、Line-1 プロモーター領域の DNA 脱メチル化が観察された。また改変マウスの精母細胞では piRNA は産生されるもののプロファイルに異常が見られ、Line-1 mRNA の sense 鎖由来の piRNA が増加していた。 Tudor ドメインはジメチルアルギニンを認識するドメインであるが、piwi タンパク質にはこのジメチルアルギニン領域が保存されており、実際マウス MILI と別の tudor ファミリーである TDRD1 は相互作用して piRNA 経路に機能することが報告されている。前精原細胞において MILI は TDRD1 蛋白質と共に intermitochondrial cement と呼ばれる構造に局在するのに対し、MIWI2 は核と processing body と呼ばれる顆粒に観察される。TDRD9 の局在を調べると MIWI2 と共局在しており、培養細胞での過剰発現実験でも TDRD9 と MIWI2 の相互作用が観察された。また Tdrd9 遺伝子改変マウスの前精原細胞では piRNA 全体の量や MILI と結合するレトロトランスポゾンの sense 鎖由来 piRNA の量には変化がなかったが、MIWI2 と結合するレトロトランスポゾンの antisense 鎖由来の piRNA が減少していた。そして MIWI2 蛋白質と同様、TDRD9 蛋白質の局在は Mili, Tdrd1 遺伝子によって制御されていた。 以上の結果より、TDRD9 は MIWI2 の機能的な相互作用因子として同定された。哺乳類生殖細胞の piRNA 経路においては TDRD1-MILI, TDRD9-MIWI2 という二つの複合体が協調して、非冗長的に働いていることが分かった。			

(論文審査の結果の要旨)

Tdrd 遺伝子群は生殖細胞で特徴的に発現し、生殖顆粒構造の構成蛋白質をコードする。哺乳類生殖顆粒は雄生殖細胞で顕著に観察され、*Tdrd* 遺伝子群は精子形成に重要であると考えられるが、その詳細な機能は不明であった。本論文は新たに同定したマウス *Tdrd9* 遺伝子が雄生殖細胞の発生及びレトロトランスポゾン抑制に重要な役割を持つ事を示す。生殖細胞のレトロトランスポゾン制御機構では低分子 RNA の piRNA 及び *Piwi* 遺伝子 *Mili*, *Miwi2* が中核を担うが、TDRD9 は MIWI2 と協調して piRNA を生合成する事でレトロトランスポゾンを抑制し、次世代に伝達される生殖細胞ゲノムを保護する事が明らかになった。

Tdrd9 遺伝子欠損マウスの雄性生殖細胞では piRNA 産生異常とそれに伴う DNA メチル化の大幅な低下によりレトロトランスポゾン *LINE-1* の発現が異常に増加し、その結果 DNA が損傷され減数分裂期に広範な細胞死が起こる。TDRD9 は MIWI2 と RNP 複合体を形成し、同じく piRNA 経路に重要な TDRD1-MILI 複合体と互いに相補的に働くフィードフォワード機構を構成して piRNA を生合成する事が示唆された。以上より生殖細胞には二つの TDRD-PIWI 複合体が協調して働き、piRNA 産生及び DNA メチル化によるエピジェネティクス制御によりレトロトランスポゾンを抑制する重要な機構が存在する事が明らかになった。

本研究の成果は生殖細胞のゲノム保護機構を解明し基礎生物学的に重要であると共に男性不妊症の研究等の生殖医療への応用に繋がる可能性もある。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 1 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降