

## 論文の内容の要旨

論文題目 短鎖 RNA 結合タンパクである PIWIL4 の機能解析

指導教員 長瀬隆英教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

安藝直美

エピジェネティクスとは、ゲノムに書かれた遺伝情報を変更することなく、個体発生や細胞分化の過程において、遺伝子発現を制御する可逆的な現象をいう。具体的には、DNA のメチル化や、ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化などの修飾が挙げられる。エピジェネティクスは、生涯を通じて保存され、配偶子形成の際に更新され、細胞の分化に伴って変化することが知られている。また、加齢や癌などの疾患に伴い異常を生じ、特に多段階の発癌のプロセスにおいて、エピジェネティクスの異常に伴う転写制御の破綻は重大な役割を果たしている。この中でもヒストン修飾の異常に始まるクロマチン構造の変化および DNA メチル化の異常は既に癌組織や細胞株においてその転写抑制への寄与が明らかになっており、この二つのプロセスの関係の解明は、癌の治療や予防において今後きわ

めて重要になると考えられる。

また、最近になり、エピジェネティクスに関与する因子として、20-30塩基長の短鎖RNAが注目されてきている。これらは、核内で、mRNA内の特定の配列を認識し結合することで、mRNAの切断やタンパクへの翻訳の抑制、ヘテロクロマチンの修飾、トランスポゾン  
の制御等を行っている。短鎖RNAは、植物で初めて発見され、その生成機序や相互作用するタンパクの違いにより、いくつかの種類に分類することができ、これまでに動植物で  
microRNA (miRNA)、small-interfering RNA (siRNA)、trans-acting siRNA (tasiRNA)、small-scan  
RNA (scnRNA)、repeat-associated siRNA (rasiRNA)、Piwi-interacting RNA (piRNA) などの短  
鎖 non-coding RNA が報告されている。エピジェネティクスの分野は、その経路における中  
心タンパクについては未だ不明の点が多いが、核内で短鎖RNAにより修飾される経路であ  
ることが判明してから、徐々にその機構が明らかにされつつあり、今回、我々は PIWI と  
いうタンパクに着目してその機能解析を行った。

PIWI とは、P-element induced wimpy testis の略であり、1997年、ショウジョウバエの  
mutagenesis スクリーニングの際に生殖幹細胞で発見された遺伝子である。その後、ショウ  
ジョウバエの PIWI 変異体では、生殖幹細胞の再生に障害が見られたことが報告され、PIWI  
が生殖幹細胞の非対称性分化や維持に関与していることが示唆された。また、PIWI は精巢  
のみに特異的に発現しており、PIWI 欠損株では不妊となることから、精子形成に関与して  
いると考えられた。さらに、PIWI は Argonaute (Ago) のサブファミリーであり、ショウジョ

ウバエの PIWI 変異体では、精巣における rasiRNA (repeat-associated siRNA) およびトランスポゾンが増加が見られることが報告され、PIWI は Ago と同様、短鎖 RNA と結合することでトランスポゾンの発現抑制に関与していることが示唆された。

PIWI は、多種にわたる生物で認められており、ヒトでは、4 種類の PIWI ホモログ (PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3, PIWIL4) が、マウスでは 3 種類 (MIWI, MILI, MIWI2) が同定されている。MIWI (PIWIL1 のマウスホモログ) と MILI (PIWIL2 のマウスホモログ) は、30 塩基長の短鎖 RNA と複合体を作ることが報告され、この短鎖 RNA は PIWI interacting RNA (piRNA) と命名された。PIWI は Ago に比較して、解明されていない点が多いが、piRNA の発見により、徐々にその機能が明らかにされつつある。

我々は、全てのヒト PIWI ホモログが核移行シグナルをもち、かつ核に局在し、PIWIL4 の強制発現により、DNA メチル化を伴わないヒストン H3K9 のメチル化を介して、癌抑制遺伝子の p16INK4a 遺伝子の発現が低下することを以前に報告した。また、これまでは PIWI は生殖細胞のみに発現しているとされていたが、我々の報告により、ヒト PIWI ホモログのうち、PIWIL4 に関しては精巣以外の組織でも幅広く発現していることが明らかになった。そこで、今回、PIWIL4 に焦点をあて、その機能解析をすべく実験を行った。

まず、yeast two hybrid 法により、PIWIL4 と相互作用するタンパクの同定を行い、そのタンパクの機能から逆に PIWIL4 の機能を類推することにした。その結果、Krueppel-related zinc finger protein や JAZF zinc finger 1 などの DNA 結合タンパクと、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger domain

containing 1 や calcium binding protein P22、IQ motif containing F1 などのシグナル伝達に関わるタンパクが同定された。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger domain containing 1 と Krueppel-related zinc finger protein に関しては、NCBI による推定分子量よりも各々11kDa ほど重かったため、今後、質量分析器にかける方針であるが、calcium binding protein P22、IQ motif containing F1、JAZF zinc finger 1 に関しては、免疫共沈降法にても PIWIL4 との相互作用が確認できた。

Krueppel-related zinc finger protein と JAZF zinc finger1 は、ジンクフィンガーをもつ DNA 結合タンパクであり、転写因子としての作用をもつ。PIWIL4 が核内に局在し、かつ核移行シグナルをもつことは我々が以前に報告しており、これらのことから、PIWIL4 によるクロマチン修飾は、上記 DNA 結合タンパクを介して行われることが示唆された。また、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger domain containing 1 (NHE1) は、細胞膜や細胞内小器官膜を通じてナトリウムイオンと水素イオンを対向輸送する電氣的に中性な輸送体であり、細胞内 pH の維持や細胞内容量のホメオスターシスの維持に関与している。NHE1 は、同じく yeast two hybrid 法にて PIWIL4 との相互作用が認められた calcium binding protein P22 (calcineurin B homologous protein ; CHP) のようなカルシウムシグナル伝達に関わるタンパクにより活性が制御されており、CHP 結合部位が欠損している NHE1 では、ナトリウムイオンと水素イオンの対向輸送の活性が低下することから、この部位が NHE1 のイオン交換に必須であると考えられている。この CHP は、カルシウムイオンやカルモジュリンに依存的なセリン・スレオニンリン酸化酵素の一種であり、小胞内輸送や、カルシニューリンリン酸化酵素の抑制や、微

小管との相互作用などの働きがある。カルモジュリンは、カルシウムイオンのセンサーであり、カルシニューリンなどのタンパクホスファターゼを活性化するシグナル伝達物質の一種で、翻訳後の修飾に関与している。今回、yeast two hybrid 法により同定された IQ motif containing F1 は、このカルモジュリンやカルモジュリン関連タンパクと結合することが報告されている。

以上から、PIWIL4 によるヒストン H3K9 のメチル化は、細胞内 pH や容量の変化等の NHE1 を介するシグナルや、CHP や IQ motif containing F1 による細胞内カルシウムシグナル伝達を介して行われ、また DNA 結合タンパクと相互作用することにより行われることが示唆された。

次に、我々は、PIWIL4 による p16INK4a locus のヒストン H3K9 のメチル化に関与するメチル化酵素について調べた。残念ながら yeast two hybrid 法では、PIWIL4 と相互作用する酵素は検出できなかったが、免疫共沈降法の結果、SUV39H1, EHMT1, SETDB1 が PIWIL4 と相互作用していることが示唆され、少なくともこれら 3 種類の酵素が、PIWIL4 による p16INK4a locus のヒストン H3K9 のメチル化に関与している可能性が考えられた。また、HEK293t 細胞では、C1ORF59 という piRNA メチル化酵素のヒトホモログが見られなかったことから、体細胞において PIWIL4 がクロマチン修飾する際には、piRNA ではなく、3' リボースの 2 位がメチル化されていない他の短鎖 RNA を用いている可能性が示唆された。この短鎖 RNA の同定については、現在、pull-down assay を試みているところであり、今後

の結果が待たれる。

以上まとめると、PIWIL4は、DNAのメチル化に先駆けてp16INK4a locusのヒストンH3K9のメチル化を行っており、体細胞では核内へ piRNA とは異なる短鎖 RNA を輸送することにより行われることが分かった。また、この修飾は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger を介した細胞外シグナルや、カルシニューリンやカルモジュリンなどによる細胞内カルシウムシグナル伝達を通じて行われ、DNA 結合タンパクを要することが示唆された。PIWIL4 は、このような経路でクロマチン修飾をすることにより、転写制御を破綻させ、細胞の癌化における初期変化に関与している可能性があり、この機序の解明により、癌の治療や予防につながるものが期待できると考えられる。