

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 安藝 直美

本研究は、短鎖 RNA と結合し、エピジェネティクスに関与していると考えられるタンパクである PIWIL4 の機能を解析するため、yeast two hybrid 法や、ヒト胎児腎由来上皮細胞 (HEK293t) を用いた強制発現系による免疫共沈降法等を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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明らかにした。また、Human Total RNA Survey Panel を用いて RT-PCR をした結果、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、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判明した。

2. 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。

3. 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。PIWIL4 を HEK293t 細胞に強制発現した後に核抽出を行い、免疫共沈降法を施行した結果、SUV39H1、EHMT1、SETDB1 が PIWIL4 と相互作用していることが示唆され、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。

4. HEK293t 細胞から RNA 抽出を行い、RT-PCR をした結果、同細胞には、C1ORF59 という piRNA メチル化酵素のヒトホモログは認めなかった。このことから、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。

以上、本論文は、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示した。そして、この現象は、PIWIL4 が、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger を介した細胞外シグナルや細胞内カルシウムシグナル伝達を通じて、piRNA とは異なる短鎖 RNA を核内へ輸送することに起因する可能性が考えられた。また、その過程で、DNA 結合タンパクや SUV39H1, EHMT1, SETDB1 などのヒストン H3K9 メチル化酵素との結合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ことを期待できると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。