

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 21 年度博士課程進学
氏名 河岡慎平
指導教員名 勝間進

論文題目

Studies on piRNA-based defense system against transposons in germ line cells
(生殖細胞ゲノムを護る小分子 RNA に関する研究)

真核生物のゲノムには、ゲノムを自由に飛び回ることのできるトランスポゾンと呼ばれる一群の転移因子が存在する。トランスポゾンの転移はしばしば、宿主ゲノムにとって甚大な負の効果をもたらすことがある。特に、生殖細胞における転移は、負の効果が次世代へと受け継がれてしまう可能性があるため、とりわけ危険である。動物の生殖細胞には、トランスポゾンの活性を適切に調節するための対トランスポゾン防御システムが存在する。その中核をなすのが、PIWI サブファミリータンパク質群とそれらに結合する小分子 RNA、PIWI-interacting RNA (piRNA) である。PIWI サブファミリータンパク質は核酸切断活性を持つことが知られている。また、piRNA は 23-30 塩基長の小分子 RNA であり、その多くはトランスポゾンに対して相補的な配列を持つ。piRNA は、自身の配列に相補的であるトランスポゾン mRNA に結合パートナーである PIWI タンパク質を導き、トランスポゾン mRNA の切断を誘導することで、トランスポゾンの抑制に寄与していると考えられている。

他の小分子 RNA である small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) と比較して、piRNA 経路には未だ不明な点が多い。piRNA の多くは

トランスポゾン mRNA に相補的な配列を持つが、タンパク質コード遺伝子に対してはそうではない。それでは、piRNA 経路はどのようにしてトランスポズンをトランスポゾンであると認識しているのだろうか？また、二本鎖中間体を経てつくられる siRNA や miRNA とは異なり、piRNA は一本鎖のままつくられることが示唆されている。しかしながら、piRNA がつくられるしくみはほとんど明らかになっていない。一方、piRNA 経路がトランスポゾン抑制以外の生命現象に関与しているのかどうか、という興味深い問題も存在する。本博士論文では、カイコという非モデル生物を活用して、これらの問題にアプローチした。

1. piRNA 研究モデルとしての BmN4 細胞

siRNA や miRNA の研究には、キイロショウジョウバエの S2 細胞やヒトの HeLa 細胞といった培養細胞が活躍してきた。しかしながら、2009 年まで、piRNA 経路を発現するような培養細胞は知られていなかった。著者らの研究によって、カイコゲノムにはふたつの PIWI サブファミリータンパク質、Silkworm Piwi (Siwi) と *Bombyx mori* Argonaute3 (BmAgo3) がコードされていること、また、カイコの卵巣には piRNA が大量に発現していることが明らかとなっていた。そこで、カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞が piRNA 経路を保持した培養細胞であるかどうかを検討した。Siwi、BmAgo3 に対するポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、BmN4 細胞は内在性の Siwi、BmAgo3 を発現する培養細胞であることが明らかとなった。また、Siwi には 1 番目の塩基が U である piRNA (1U piRNA)、BmAgo3 には 10 番目の塩基が A である piRNA (10A piRNA) が選択的に結合していることが判明した。以上の結果から、BmN4 細胞は piRNA 経路を完全なカタチで有する培養細胞であることが証明された。本研究は、そのような性質を持つ培養細胞の存在を証明した初めての報告である。

2. piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構

piRNA 経路がどのようにトランスポズンを認識しているのかを明らかにするために、GFP 遺伝子をトランスポゾンと誤認するようなシステムを構築することを試みた。まず、ピューロマイシン耐性遺伝子と GFP 遺伝子を有するトランスジーンカセットを *piggyBac* トランスポゼースを用いて BmN4 ゲノム中にマルチコピー挿入した。続いて、ピューロマイシンによる薬剤選抜を行い、安定発現細胞を作出した。さらに、これを限外希釈培養することで、固有のト

ランスジェニックゲノムを持つクローナルラインを 8 ライン樹立した。ジェのミック PCR により、これら 8 ラインすべてが少なくとも 1 コピーの GFP 遺伝子を有することを確認したが、8 ラインのうち 7 ラインが、GFP タンパク質を発現しないことが明らかとなった。これら 7 ラインでは、GFP に対するサイレンシングが起こっている可能性が考えられたので、ノザンブロットにより GFP 由来配列と相補的な piRNA(GFP piRNA)の検出を試みた。その結果、GFP に対するサイレンシングが観察された 7 ラインのうち 3 ラインで、GFP piRNA が発現していることが判明した。大規模シーケンスの結果から、これら 3 ラインでは、内在性のプロモータから GFP に対して相補的な piRNA (antisense GFP piRNA)がつくられることにより、ベクターから転写された GFP mRNA を分解している、と考えられた。つぎに、これら 3 ラインでのみ antisense GFP piRNA がつくられるのは何故か、という問いに答えるために、antisense GFP RNA の転写開始点を網羅的に決定した。その結果、これら 3 ラインでのみ、内在性 piRNA を大量に産生する piRNA クラスタ内にトランスジーンが挿入されていること、およびクラスタ内に存在する内在性の転写開始点によって antisense GFP RNA が転写され、antisense GFP RNA をつくりだしていることが判明した。すなわち、piRNA クラスタへの挿入とそれに続くアクティブな転写が、piRNA 経路のよるトランスポゾン認識の最初のステップであることが明らかとなった。

3. piRNA がつくられるしくみ

次に、BmN4 細胞から調製したタンパク質抽出物(ライセート)を用いて in vitro で piRNA 生合成を再現し、その性状を明らかにした。先述の通り、カイコの PIWI サブファミリータンパク質である Siwi は、1 番目の塩基が U である piRNA(1U piRNA)と選択的に結合する(1U bias)。Flag タグを付加した Siwi (Flag-Siwi)を発現するライセートに対して 1 番目の塩基が U/A/G/C である RNA を混合し、抗 Flag 抗体による免疫沈降実験を行った結果、Flag-Siwi は 1U RNA と選択的に結合することが明らかとなった。すなわち、in vitro で Siwi の 1U bias を再現することに成功した。本実験に用いる RNA オリゴの長さを成熟型 piRNA の長さである 23-30 塩基より長くしても、Siwi の 1U RNA に対する選択性に変化は認められなかった。以上の結果と、piRNA は一本鎖のままつくられるという既往研究の結果から、まず、1U で成熟型の piRNA よりも長い RNA が Siwi に取り込まれ、しかるのちに余分な 3'末端が削り込まれることによって成熟型 piRNA が完成

する、という仮説をたてた。このことを検証するために、1Uで50塩基の合成オリゴ(1U-50 RNA)と Siwi の複合体を調製し、50塩基の RNA を 23-30塩基の長さに削り込むような活性(トリミング活性)を探索した。その結果、1,000×g の遠心でペレットに沈むような非常に重い画分にトリミング活性が存在することが判明した。一方、piRNA の 3'末端には 2'-O-メチル化修飾が施されることが知られているが、本実験の結果、2'-O-メチル化はトリミング反応と共役していること、2'-O-メチル化自体は piRNA の長さの規定に関与しないことが明らかとなった。

4. カイコ雌性決定 W 染色体と piRNA

カイコの性は W 染色体の有無に強力に依存し、W 染色体が 1 コピーでもあれば雌性が決定される。よって、W 染色体上には雌性決定遺伝子である *Fem* が座乗する、と考えられてきた。ところが現在まで、*Fem* は同定されておらず、それどころか、単一のタンパク質コード遺伝子、転写物さえも見つかっていない。一方、BAC ライブラリなどを用いた配列解析から、W 染色体上には膨大な量のトランスポゾン配列が存在することが分かっている。このような背景から、W 染色体の全長配列の決定は非常に困難であり、その断片配列しか得られていないのが現状である。本研究では、W 染色体が piRNA のソースである、という仮説を立て、大規模な piRNA トランスクリプトーム解析を行った。まず、精巣および卵巣由来の piRNA ライブラリを構築し、その性状を比較した。その結果、精巣よりも卵巣で 2 倍以上多く発現するような piRNA (female-enriched piRNA) が大量に見つかった。また BAC 配列や一塩基多型を利用したインフォマティクス解析により、female-enriched piRNA の大部分は W 染色体に由来することが明らかとなった。さらに、W 染色体に関連した変異をもつカイコ系統の piRNA を網羅的に解析することで、W 染色体の性決定領域に偏って存在する female-enriched piRNA を多数同定した。本研究は W 染色体由来の転写物を同定した初めての研究である。

以上を要するに、本博士論文は、カイコをモデルとして piRNA 経路に関する重要な未解決問題にアプローチし、piRNA によるトランスポゾン認識機構、piRNA 生合成経路の大枠を明らかにし、トランスポゾンに富んだ雌性決定染色体である W 染色体に由来する転写物をはじめ同定したものである。