

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 河岡 慎平

真核生物のゲノムには、ゲノムを自由に飛び回ることで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。しかしながら、piRNA は他の小分子 RNA である siRNA や miRNA と比較して、生合成メカニズム等未解明な点が多く残されている。本博士論文は、カイコという非モデル生物を活用して、piRNA フィールドにおける未解明問題にアプローチしたものである。

第 1 章では、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 経路を完全なかたち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。

第 2 章では、piRNA 経路がどのようにトランスポゾ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 BmN4 細胞を利用して構築し、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。これらを用いた詳細な実験の結果、piRNA クラスターへの外来遺伝子の挿入とそれに続くアクティブな転写が、piRNA 経路に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。

第 3 章では、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 生合成を再現することを試みた。その結果、1U で成熟型の piRNA よりも長い RNA (piRNA 前駆体) が Siwi に取り込まれ、その後、余分な 3' 末端が“トリマー”と呼ぶエ

キヌクレアーゼで削り込まれることによって成熟型 piRNA が完成することが判明した。また、piRNA の 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も明らかとなった。

第4章では、カイコの雌性決定染色体である 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。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結果、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はじめての研究である。

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て同定したものである。このように、本論文は学術上、応用上、重要な知見を明らかにしたものであり、審査委員一同は、博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。