

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34316

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07342

研究課題名(和文) 全能性幹細胞の維持・分化において遺伝子発現量調節を担う協同的なPIWIの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of cooperative function of PIWI proteins in gene regulation during self-renewal and differentiation of planarian pluripotent stem cells

研究代表者

鹿島 誠 (Kashima, Makoto)

龍谷大学・龍谷大学 食と農の総合研究所・博士研究員

研究者番号：10780562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアの全能性幹細胞の制御には、PIWIタンパク質(PiwiBとPiwiC)が重要であるが、その具体的な機序に関しては、不明であった。申請者は、先行研究で、PiwiBが転移因子に加えて、複数の機能性タンパク質コード遺伝子を制御していることを解明した。また、PiwiCがアンチセンス鎖を介して、PiwiBによる転移因子の抑制に寄与していることも解明していた。

本研究では、PiwiCがアンチセンス鎖からのPiwiBの標的認識に関わるsmall RNAの産生に関わっていることを示唆する別の結果を得た。また、PiwiC依存的にPiwiBが抑制する遺伝子を特定するために、RNA-Seqを行った。

研究成果の概要(英文)：PIWI family proteins (PiwiB and PiwiC) are known to be important for the regulation of adult pluripotent stem cells in planarian. The mechanisms of the regulation by them remains elusive. Our previous researches revealed that PiwiB repress transposons and several functional protein coding genes, and that PiwiC and an antisense RNA of a transposon is involved in the repression of a transposon by PiwiB.

In this research, we got a results suggesting that PiwiC is involved in the production of PiwiB-interacting piRNAs from antisense RNA. Furthermore, I conducted RNA-Seq to indentify PiwiC-dependent target genes of PiwiB.

研究分野：発生生物学

キーワード：プラナリア 全能性幹細胞 PIWI piRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、プラナリアを初めとする無脊椎動物の成体多・全能性幹細胞においても *piwi* の発現が報告されてきており、成体幹細胞システムにおける PIWI の重要性が示唆されている (Juliano et al., 2011)。PIWI タンパク質とガイド RNA である piRNA から構成される PIWI-piRNA 複合体は配列特異的に標的遺伝子を抑制する。生殖細胞においては、PIWI の主な標的は転移因子であり、PIWI はゲノム統合性を守ることに寄与している (Siomi et al., 2011)。一方で、成体幹細胞システムにおける PIWI の標的遺伝子や分子的な機能に関してはほとんど明らかになっていなかった。申請者らは、全能性幹細胞における PIWI の役割を明らかにすることを目指して、プラナリアの全能性幹細胞で発現する *piwi* 遺伝子に注目し、その機能解析を行ってきた。

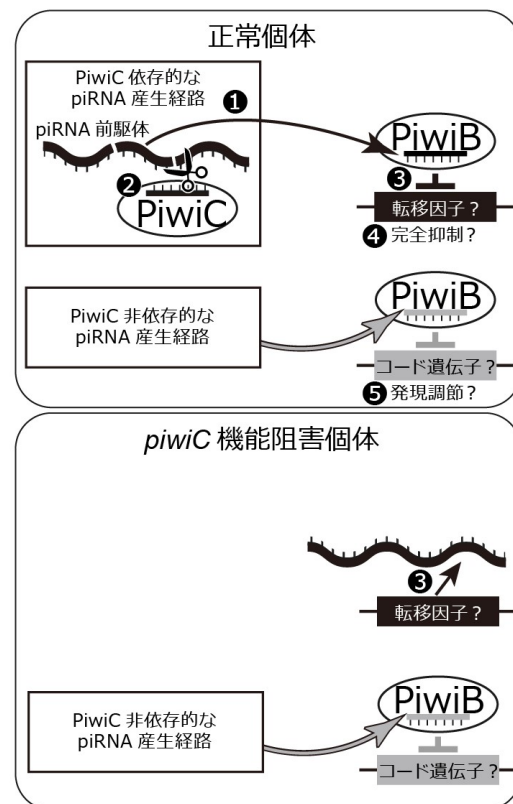
プラナリアの全能性幹細胞には二種類の細胞質局在型 PIWI と一種類の核局在型 PIWI が存在している (Shibata et al., 2016)。そのうち、核に局在する PiwiB と細胞質に局在する PiwiC の遺伝子機能阻害は、再生不全や機能阻害後後期での新生細胞の消失を引き起こす (Palakodeti et al., 2008; Shibata et al., 2016)。PiwiB は、全能性幹細胞で産生された後に、全能性幹細胞の細胞分化過程を通じて、核内で維持される (Shibata et al., 2016)。そして、分化過程で転移因子を完全に抑制する (Shibata et al., 2016)。一方、PiwiC は、標的遺伝子のアンチセンス鎖を介して、PiwiB が標的とする転移因子の抑制に関与している (Kashima et al., 2016)。これらの知見と、他の生物の知見から、申請者は、「PiwiC がアンチセンス鎖からアンチセンス piRNA を産生し、PiwiB による転移因子の抑制に寄与している」という仮説をたてるに至った。

また、PiwiB は、機能性タンパク質コード遺伝子を抑制し、発現量の調節を行う (Kashima et al., 2018)。興味深いことに、PiwiC は PiwiB の標的機

能性タンパク質コード遺伝子の制御には関わらないことを示唆する実験結果が得られている。このことから、PiwiB の標的遺伝子の抑制機構は、PiwiC 依存的な完全抑制と非依存的な発現調節に分けられると考えられた。*piwiC(RNAi)* 個体は、*piwiB(RNAi)* 個体よりも、遅く表現型が観察されるが、これは、PiwiC と PiwiB の機能の違い、すなわち標的遺伝子の違いに起因すると考えられる。そのため、PiwiC 依存的/非依存的な PiwiB による標的遺伝子の制御機構を理解することで、複数の PIWI による成体全能性幹細胞の制御機構の理解が深まることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、PiwiB と PiwiC、二種類の PIWI タンパク質がどのような役割を担い成体全能性幹細胞システムの制御に寄与しているのかの理解を目指し、下記の 5 つを目的とした。



① PiwiC による PiwiB 結合 piRNA 産生の検証

② PiwiC 結合 piRNA の配列決定

- ③ PiwiC 依存的な PiwiB 標的遺伝子の同定
- ④ ③の遺伝子が完全に抑制されるかの検証
- ⑤ PiwiC 依存的な PiwiB 標的遺伝子の同定

### 3. 研究の方法

- (1) PiwiC が PiwiB 結合 piRNA 産生に関与しているかを検証するために、*piwiC* RNAi 処理が、PiwiB 結合 piRNA の存在量に与える影響を調べた。そのために、コントロール RNAi 個体、*piwiC*(RNAi) 個体のそれぞれから、抗 PiwiB 抗体を用いて免疫沈降を行い、PiwiB 結合 piRNA を取得した。そして、piRNA-Seq ライブラリーを作成し、HiSeq 2500 による配列決定を行った。(目的①)
- (2) PiwiC 結合 piRNA の配列決定のために、抗 PiwiC 抗体を作成し、免疫沈降法による PiwiC 結合 piRNA の単離を試みた。また、アルギニンのメチル化を認識し、先行研究で PiwiC に結合することが知られている Y12 抗体を用いて(Kashima et al., 2016)、同様に免疫沈降を試みた。(目的②)
- (3) PiwiC 依存的あるいは PiwiC 非依存的な PiwiB 標的遺伝子の同定のために、*piwiB*(RNAi)個体や *piwiC*(RNAi)個体の比較トランスクリプトーム解析を行った。具体的には、各遺伝子の摂餌 RNAi 後 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 日目の継時的サンプリングを、3 反復行った。そして、RNA-Seq ライブラリーを作成し、HiSeq 2500 による配列決定を行い、全遺伝子の発現量を調べた(目的③④⑤)。

### 4. 研究成果

- (1) 今回新規に作成した抗 PiwiB 抗体を用いたところ、従来のセファロースビーズを用いた免疫沈降のプロトコールでは、piRNA を

特異的に単離することができなかった。そこで、非特異的な結合が少なく、また再現性も高いことで知られている Dynabeads を代替品として用いた。tRNA によるビーズのブロッキングなどの条件検討のすえ、安定的に PiwiB 結合 piRNA を単離できる免疫沈降プロトコールを確立することに成功した。

各 RNAi 個体から単離した PiwiB 結合 piRNA をシーケンスした結果、平均で 2763 万リードの piRNA を得た(3 条件 x4 反復)。各 RNAi 条件での発現量を比較した結果、一部の低発現 piRNA において、その発現量の低下が確認された(図 1)。しかし、それら piRNA の発現量は低く、統計的な有意性を得るには至っていない。今後は、同様のサンプルを読み足すことで、統計的な有意性が得られることが期待され、PiwiC が PiwiB 結合 piRNA の産生に関わっていることをより強く示唆できることが期待される。

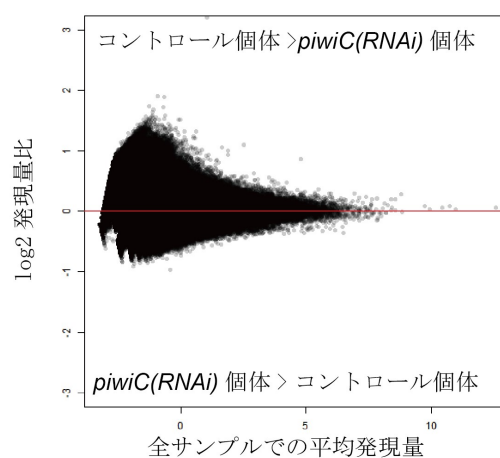


図 1 コントロール個体と *piwiC*(RNAi)個体における PiwiB 結合 piRNA の発現量比較の結果

また、*piwiB*(RNAi)個体内の PiwiB 結合 piRNA の piRNA-Seq も行った。*piwiB*(RNAi) 個体では、主に全能性幹細胞でのみ PiwiB タンパク質が消失することから、*piwiB*(RNAi)個体内の PiwiB 結合 piRNA は分化細胞内の piRNA であると考えられる。

*piwiB(RNAi)* 個体では、コントロール個体と比べて PiwiB 結合 piRNA は減少するものの、その組成に大きな変化はないことを明らかにし、PiwiB だけでなく、PiwiB-piRNA 複合体も、全能性幹細胞で形成された後、細胞分化の過程を経ても安定的に維持されることを示唆する結果を得ることができた。

- (2) 二種類の抗 PiwiC 抗体、及び Y12 抗体を用いた免疫沈降を行い、Y12 抗体でのみ、PiwiC の共沈が確認された。残念ながら、免疫沈降産物から PiwiC 結合 piRNA を取得することはできず、PiwiC 結合 piRNA の同定には至っていない。
- (3) 従来の oligo dT ビーズによる mRNA 精製では、ノンコーディング RNA や PiwiB が結合すると考えられる未成熟 mRNA をとらえることができない。そこで、申請者は rRNA に対するアンチセンスオリゴと RNaseH を組み合わせた rRNA 枯渇の系を、プラナリアで初めて確立した。また、試薬量の最適化などを通じて、通常キットを用いた場合の 1/10 のコストで、RNA-Seq ライブラリーの調製が可能な系を確立した。確立した系を用いて、計 72 サンプルの RNA-Seq をおこない、サンプルあたり平均 100 万リードの結果を得ることができた。リード数の不足から、統計的に有意に発現が変動している遺伝子の数が少なく、目的であった *piwiB(RNAi)* 個体と *piwiC(RNAi)* 個体間での発現変動遺伝子の比較には至っていない。
- (4) 既存の PiwiB 結合 piRNA のシーケンスデータ (Shibata et al., 2016) を再解析し、*piwiB(RNAi)* 個体における発現変動遺伝子の内、一致する piRNA が高密度で存在する遺伝子を、PiwiB-piRNA 複合体の標的遺伝子として同定した。そして、PiwiB-piRNA 複合体によって制御される、機能性タンパク質コード遺伝子の同定に関する論文を執筆し、*Development, growth &*

*differentiation* へ投稿、受理された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) “Searching for non-transposable targets of planarian nuclear PIWI in pluripotent stem cells and differentiated cells.”, Makoto Kashima, Kiyokazu Agata, Norito Shibata, *Development, Growth & Differentiation*, 60巻5号, 2018年5月, DOI: 10.1111/dgd.12536 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) “Inheritance of nuclear PIWI coordinates stepwise gene expression in the planarian pluripotent stem cell system.”, Makoto Kashima, Taisuke Ishiko, Osamu Nishimura, Labib Rouhana, Kazuyo Misaki, Shigenobu Yonemura, Kuniaki Saito, Haruhiko Siomi, Mikiko C. Siomi, Kiyokazu Agata and Norito Shibata, RNA フロンティアミーティング, 2017年11月
- (2) “Cytoplasmic PIWI is indispensable for transposon silencing conducted by nuclear PIWI in planarian pluripotent stem cell system”, Makoto Kashima, Kiyokazu Agata, Norito Shibata, 第 50 回日本発生生物学会年会, 2017年5月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

鹿島 誠 (KASHIMA Makoto)

龍谷大学・食と農の総合研究所・博士研究員

研究者番号: 10780562

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

宮田 淳美 (MIYATA Atsumi)

京都大学大学院・理学研究科・研修員

研究者番号: なし