

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770191

研究課題名(和文)

生殖細胞特異的 piRNA の生合成機構

研究課題名(英文)

Mechanisms of the piRNA biogenesis in germ line cells

研究代表者

齋藤 都暁 (SAITO KUNIAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30423396

研究成果の概要(和文): piRNA と呼ばれる小分子 RNA は Piwi 蛋白質群と結合し、生殖細胞形成に必須の役割を果たす。本研究では、piRNA の生合成機構をモデル動物ショウジョウバエにおいて解析した。その結果、新規の piRNA 生合成因子を発見した。更に、その分子機能の詳細も明らかにした。従って、本研究の成果により、生殖細胞の特性の理解が進むと考える。

研究成果の概要(英文): piRNAs associating with Piwi family proteins are essential small RNAs for germ cell development. In this study, I investigated how piRNAs are produced in germ cells using *Drosophila melanogaster* as a model organism. As a result, I have identified novel piRNA biogenesis factors and characterized the molecular functions of them. Thus, this study will contribute to our understanding of the characters of germ line cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：生殖、生合成、piRNA、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

20～30塩基程度の小分子 RNA によって引き起こされる遺伝子発現抑制機構を RNA サイレンシングと呼ぶ。RNA サイレンシングにおける中核因子は Argonaute である。Argonaute は小分子 RNA と直接結合する事によってその塩基配列に従って標的 RNA を認識し、それに作用する事によって標的 RNA の発現を抑制する。ショウジョウバエは5種類の Argonaute タンパク質を発現する。AGO1 と AGO2 はほぼ全組織で恒常的に発現する一方、AGO3、Aubergine、Piwi は生殖細胞特異的に発現する(Brennecke et al. Cell 128:1089-1103)。これらショウジョウバエ Argonaute に結合する小分子 RNA はお互

い異なっており、さらには各 Argonaute が機能する RNA サイレンシング経路は独立して存在する事が示されている。私はこれまでショウジョウバエ Argonaute のうち、主に Piwi タンパク質に焦点をあて研究を進める事によって、Piwi が関わる RNA サイレンシング経路の存在を見出し、さらには本経路における必須、及び関連因子の同定およびそれらの機能解析を進めてきた。これら一連の研究を通して、Piwi は、レトロトランスポゾン由来の小分子 RNA である piRNA と結合する事によってレトロトランスポゾンの発現を抑制する因子である事、piRNA の生合成には Aubergine と AGO3 の Slicer 活性が関わる事、これら Slicer 活性依存的に piRNA

Amplification loop が成立し、様々な種類の、数多くの piRNA が生成される事、また piRNA は Pimet によって 3' 末端メチル化修飾を受ける事、などを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これまでの RNA サイレンシングに関する研究から、様々な生物種の生殖細胞においては、miRNA のみならず、内在性の siRNA (endogenous siRNA; esiRNA) や piRNA (PIWI-interacting RNA) といった小分子 RNA が多数発現している事が明らかになった。これら小分子 RNA は、塩基配列特異的に標的 RNA に作用する事によって、タンパク質をコードする遺伝子だけでなく、レトロトランスポゾンなどの発現を負に制御する事によって、生殖細胞のゲノムの品質管理を担う事が次第に示されてきている (Aravin et al. Science 318:761-764)。piRNA が無い条件下においては、生殖巣が正常に発生せず、卵子や精子形成に異常が来たり、種の保存は成立しない。piRNA の生合成経路に関しては、miRNA や esiRNA の生合成とは独立している事、また、5' 末端形成に関する報告はあるものの、未だ十分な知見が得られていない。本研究においてはショウジョウバエ piRNA の生合成経路に焦点をあて、その分子機構を包括的に理解する事を目指した。

3. 研究の方法

ショウジョウバエは遺伝学的・生化学的解析に秀でたモデル動物である。しかし、生殖巣は多くの性質の異なる細胞群から構成されているため、遺伝学的解析を行っても二次的な影響が排除できない。また、生化学的研究に必要な培養細胞系が確立されていなかった。そこで私はまず、ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞 (OSC と命名) を初年度に確立し報告した (Saito et al. Nature 2009)。OSC は piRNA や Piwi が発現し、非常にシンプルな実験系で機能解析ができる。更に、私は OSC において、高効率の RNAi やトランスフェクションによる過剰発現系を構築した。piRNA が発現する培養細胞で RNAi や過剰発現を遂行できる実験系は OSC 以外に例がなく、生化学的アプローチによって、これまで明らかにできなかった様々な問題点を迅速に解明できると考えた。具体的手法を以下に記載する。

(1) これまでに piRNA は長い前駆体 RNA として転写され、細胞質において短い RNA へとプロセシングされることを見いだしている。Piwi を RNAi によって発現抑制した場合、piRNA の量が顕著に減少することが報告されている。従って、piRNA の生合成因子の機能消失は、piRNA の減少が引き起こされると考

えられる。そこで、OSC において RNAi 法による遺伝子発現抑制を行い、piRNA の量が変動する遺伝子をスクリーニングする。piRNA の検出にはノザンプロット法を用い、RI ラベルしたプローブによって、全 RNA 中の piRNA 量を算定し、評価する。

(2) piRNA 生合成因子候補の機能を解明するため、アイソトープで標識した前駆体 RNA と、大腸菌を用いて精製した Piwi 蛋白質、そして OSC の抽出液を用いた in vitro の piRNA 生合成系を立ち上げる。この実験系をもとに piRNA 生合成に関わる因子の分子機能をスクロースグラジエント法やゲル濾過などの分画法や免疫沈降法などの生化学的実験系によって明らかにする。得られた因子に対するモノクローナル抗体を作製し、各因子の相互作用蛋白質や細胞内局在を解析し、piRNA 生合成経路における各因子の機能理解を目指す。piRNA と他の RNA 分子との違いを見分ける分子機構を検討するため、各因子が結合する RNA 配列や構造的特徴を解析する。解析には次世代型シーケンサーや RNA 分子の質量分析等の手法を用いる。

4. 研究成果

(1) 2006 年、茨城大学の仁木博士によって、ショウジョウバエ生殖巣由来の培養細胞 (fGS/OSS) が確立された (Niki et al., PNAS, 2006)。そこで、この培養細胞を譲り受け、独自に培養を行った。fGS/OSS は生殖幹細胞に性質の近い細胞と生殖巣を構成する体細胞から成る混合培養細胞系であるが、私はここから体細胞由来の細胞株を取得し、OSC と命名した。はじめに、OSC において piRNA 及び Piwi 蛋白質の発現を確認し、結合 piRNA の配列を次世代型シーケンサーで検討した。その結果、OSC においてもショウジョウバエ卵巣と同様にレトロトランスポゾンに由来する piRNA を見いだした。更に詳細に piRNA 配列を解析した結果、レトロトランスポゾンではなく、いくつかの蛋白質コード遺伝子の 3' UTR から piRNA が発現することを見いだした。特に大 Maf 転写因子のファミリーに属する traffic jam 遺伝子の 3' UTR から piRNA が多く作られることを見いだした。これまでの研究から、traffic jam は、Piwi 同様に、生殖巣の発生に必須な因子であることから、なんらかの機能的関連性があると考えられたことから、traffic jam 遺伝子の研究を開始した。その結果、traffic jam 蛋白質は、Piwi 遺伝子の発現に必須な転写因子であることを見いだした。すなわち、traffic jam は、Piwi 蛋白質の発現と、piRNA の供給という二つの分子メカニズムによって Piwi の機能制御を担うという経路の発見に至った (図 1)。また、zucchini と呼ばれる遺伝子が piRNA

の産生に重要であることを示した。以上の解析結果を論文として報告した (Saito et al., Nature, 2009)。以上の知見は、piRNA 経路の一端が解明できたという点において非常に重要であると考えられる。

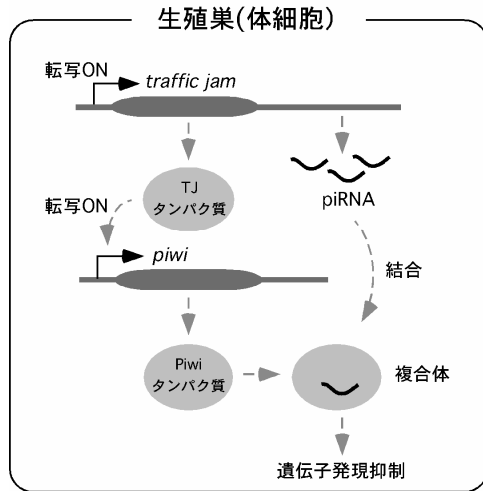


図 1: traffic jam による Piwi の機能制御

(2)OSC において RNAi による簡便な遺伝子ノックダウン実験系を開発した。Piwi のノックダウンによってレトロトランスポソンの発現が上昇したことから OSC を用いれば、piRNA によるレトロトランスポソン抑制機構の詳細を明らかにできると考えられた。そこで、私は、OSC を用いて、RNAi 法による生合成関連遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、RNA ヘリカーゼドメインをもつ armitage (armi) が piRNA 生合成に必須であることを見いだした。更に、独自に作製した Armi 抗体を用いて解析を進めることにより、Yb body (生殖幹細胞維持に必須な細胞質内顆粒状構造体) に Armi 蛋白質が局在すること、さらには Armi の Yb body への局在には Yb 蛋白質が必要であることを明らかにした。また、Armi 複合体には Yb、Piwi、そして piRNA 前駆体様 RNA が含まれる事も判明した。OSC にて armi あるいは yb をノックダウンした条件下では、Piwi は piRNA と結合しておらず、また、核へ移行しなくなる。piRNA 生合成に関わると以前報告されたヌクレアーゼ様遺伝子 zucchini をノックダウンした条件下では、Armi 複合体は piRNA 前駆体様 RNA を含むものの、成熟型 piRNA は Piwi に結合しない。また、Piwi の核への移行は阻害されており、Piwi は Yb body に繫留されていた。従って、Yb body は primary piRNA 生合成の場であり、しかも piRNA と結合した Piwi のみを核へ輸送させるチェックポイントであると考えられた。以上の解析から、piRNA 生合成機構に

おける Piwi 以外の蛋白質群の具体的役割を提案し、報告した (図 2, Saito et al., Genes & Dev. 2010)。

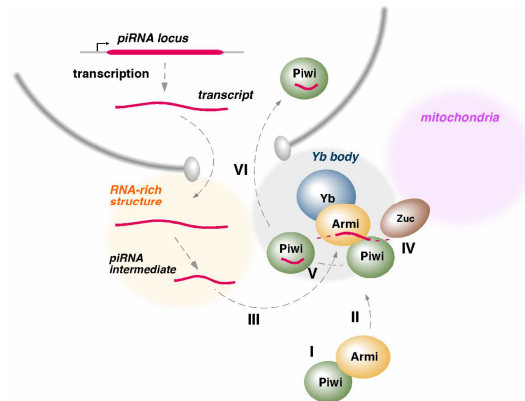


図 2: piRNA 生合成の分子機能モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Saito K. et al., Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. Genes & Dev., 査読有, 24, 2493-2498, 2010

Saito K. et al., A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. Nature, 査読有, 461, 1296-1299, 2009

[学会発表](計4件)

齋藤都暁、Yb body はショウジョウバエ Primary piRNA の生合成と Piwi の核移行を制御する、日本 RNA 学会、2010年7月27日、一橋記念講堂(東京都)

Saito K., New components of the primary processing pathway for Piwi-interacting piRNAs in *Drosophila*. Keystone symposia, 2010年1月17日, Keystone Resort (USA)

齋藤都暁、新規 mRNA 由来 piRNA の同定と大 Maf 因子 traffic jam によるショウジョウバエ Piwi の機能制御、日本 RNA 学会、2009年7月28日、朱鷺メッセ(新潟県)

齋藤都暁、piRNA の世代間伝搬が担う遺伝シグナル、日本エビジェネティクス研究会、2009年5月22日、学術総合センター(東京都)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 都暁 (SAITO KUNIAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30423396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし