

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20221008

研究課題名（和文） 転移因子と Argonaute の軍拡競争からゲノムの進化を探る

研究課題名（英文） Fathoming the evolution of gene regulation through an ‘arms race’ between transposons and Argonautes

研究代表者

塩見 春彦 (SIOMI HARUHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60202107

研究成果の概要（和文）：

「転移因子と RNA サイレンシング機構の間の‘軍拡競争’が複雑な遺伝子発現制御を可能にするゲノムの進化をもたらした」という仮説の検証をショウジョウバエを用いて行った。その結果、転移因子の抑制機構が体細胞では遺伝子の発現制御にも密接に関与していること、そして、生殖細胞では生殖幹細胞-体細胞相互作用や卵形成過程における軸形成に関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

To test the hypothesis that the arms race between transposable elements (TEs) and hosts leads to positive selection for cellular defense mechanisms, parts of which are co-opted for evolving new regulatory circuits, we have elucidated RNA silencing pathways in *Drosophila*. Our studies have revealed that RNA silencing pathways not only repress the expression of TEs but also regulate the expression of specific cellular genes, which in turn regulate important cellular processes including body axis formation and somatic niche-germline stem cell interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	44,100,000	13,230,000	57,330,000
2009 年度	40,000,000	12,000,000	52,000,000
2010 年度	32,000,000	9,600,000	41,600,000
2011 年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
2012 年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
総計	164,100,000	49,230,000	213,330,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム機能・RNA サイレンシング

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの場合、全体の 45%以上が転移因子 (transposable elements; TE) とその‘残骸’で占められている。このような TE は、最近まで、ジャンクや利己的 DNA と見なされ、宿主にとって中立的もの、またはむしろ害を

与えるものと捉えられてきた。しかし、近年のゲノム解析から、TE はエピジェネティックな制御下であり、この制御は近傍の宿主遺伝子にも影響を与えることが明らかになってきた結果、TEこそがゲノム進化の主役であり、宿主と TE との間の軍備拡張競争 (‘arms

race')の結果がゲノムを形づくって来たと考えられるようになってきた。この軍拡競争の宿主側の重要な‘武器’がRNAサイレンシング機構であり、その分子経路における鍵となる因子がArgonauteである。

2. 研究の目的

siRNAやmiRNAに代表される20~30塩基長の小分子RNAが関与する遺伝子発現抑制現象はRNAサイレンシングと呼ばれる。このような小分子RNAはその核酸の相補性を利用することで、作動複合体を標的遺伝子または標的染色体領域にターゲットするガイド分子として機能する。RNAサイレンシング機構は、元来、ウイルスやTEを不活化する生体防御機構として進化してきたと考えられている。本研究の目標は、TEとRNAサイレンシング機構の間の‘軍拡競争’の結果が複雑な遺伝子発現制御を進化させ、それらが特にArgonauteを中核とする「生命活動を支えるプログラム」に組み込まれてきたことを理解することにある。

3. 研究の方法

モデル系としてショウジョウバエを用い、以下の4課題に重点的に取り組んだ。

(1) TE由来の小分子RNA (piRNAや内在性siRNA)が宿主遺伝子の発現制御に関与している可能性についての検討。

RNAサイレンシングにおける作動複合体はRISC (RNA induced silencing complex)と呼ばれ、その中核は小分子RNAとArgonaute蛋白質から成る。ショウジョウバエにはArgonauteが5種類存在し、これらは発現様式の違いから2つのグループ、全ての組織で発現するAGO (AGO1, AGO2)と生殖系特異的なPIWI AGO3, Aub, Piwi)、に分類される。これらArgonauteそれぞれに対するモノクローナル抗体を作製し、それを用い、各蛋白質-小分子RNA複合体を精製し、それぞれに特異的に結合する小分子RNAの次世代シーケンサーによる解析を行った。得られた配列を用いてゲノム配列との相同検索を行い、宿主遺伝子と相同性の高いものを選び、その発現がRNAサイレンシング機構下にあるか、検討した。

(2) エピジェネティックなTE抑制機構とその宿主遺伝子発現制御への関与。

植物やショウジョウバエの遺伝学からTEはRNAサイレンシング機構を介したヘテロクロマチン化とDNAメチル化により抑制されていることが明らかになってきている。ショウジョウバエゲノムではその約20%がTEで占められ、各種TEがクラスターしている

染色体領域が見られる。一般にこれらの領域はヘテロクロマチン化されている。このようなヘテロクロマチン領域内には、実は多くの宿主遺伝子が点在している。これら遺伝子の発現が近傍のTEの発現と関連しているかを検討した。

(3) ‘TE抑制シグナル’が世代間に伝播されるメカニズム。

ショウジョウバエにおいて、染色体の‘記憶’ (ヘテロクロマチン化の領域特異性を規定するもの)が母から子孫に伝達され、次世代において発生の極めて早い時期にヘテロクロマチン化が確立されることが示されている。また、以前よりショウジョウバエではある種のトランスポゾンの抑制が母から子孫に伝達されていく現象が知られており、hybrid dysgenesisと呼ばれる。この世代間に伝わる抑制シグナルはcytotypeと呼ばれる。この染色体‘記憶’とcytotypeの実体がPIWIグループArgonaute蛋白質-小分子RNA複合体であることを検討した。

(4) RNAサイレンシング機構の幹細胞生物学への関与。

PIWIグループArgonaute蛋白質は生殖幹細胞形成/自己新生に必須である。これらArgonauteによるTE抑制機構と生殖幹細胞形成機構との接点を探るため、ショウジョウバエ卵巣における生殖幹細胞とその周辺存在する体細胞 (follicle cell)との相互作用にPIWI蛋白質が関与しているかを遺伝学を用いて検討した。

4. 研究成果

「転移因子とRNAサイレンシング機構の間の‘軍拡競争’が複雑な遺伝子発現制御を可能にするゲノムの進化をもたらした」という仮説の検証を行い、以下のことを明らかにした。

(1) ショウジョウバエArgonauteタンパク質であるAGO1, AGO2, AGO3, Aub, そしてPiwiに対する特異的なモノクローナル抗体をそれぞれ作成し、それらを用いて、免疫沈降法にてそれぞれの複合体を精製した。それら複合体に含まれるタンパク質と小分子RNAをそれぞれ質量分析法と次世代型シーケンサーにて解析した。AGO2複合体に含まれる小分子RNAの配列情報に基づき、生化学的遺伝学的な解析を行った結果、体細胞においてTEの抑制に関与する新規小分子RNA (endo-siRNA)を発見し、その生合成を明確にした。これは、ショウジョウバエにおいてTE抑制に関わるRNAサイレンシング経

路が体細胞と生殖細胞で異なることを示すものでもある。また、これらendo-siRNAがTEのみならず多くの活発に転写されている蛋白質コーディング遺伝子に由来していること、そして、それらの大半が遺伝子に対してアンチセンスであることを見いだした。これらの結果は、endo-siRNA-AGO2複合体が転移因子抑制のみならず、細胞の遺伝子の発現制御にも関与していることを示唆する。

(2)生殖細胞特異的なPiwi/Aub/AGO3-piRNA複合体の解析を進め、piRNAの配列情報に基づき、標的遺伝子候補（TE及び細胞の遺伝子）を探索し、それら遺伝子の発現抑制機構を、特に生殖細胞系体細胞の培養細胞であるOSC (ovarian somatic cells)を用いて進めた。OSCを用いたRNAiスクリーニングの系を立ち上げ、piRNA生合成及びTE抑制に関する遺伝子を現在までに10種類同定することに成功した。さらに、TE抑制機構には細胞質におけるTE転写産物の切断による転写後レベルの抑制と核における転写レベルの抑制が存在することを明らかにした。

Piwi/Aub/AGO3の内、Piwiのみが核に局在するが、この核移行の仕組みをPiwi相互作用タンパク質の解析により解明した。核内PiwiはTEを転写レベルで抑制するのみならず、それらTEの近傍に位置する遺伝子の発現も抑制していることを見いだした。

(3)OSC細胞においてPiwiと相互作用するpiRNAの配列解析から、一群のpiRNAが細胞接着因子であるFasIIIの発現を制御していることを見いだした。Piwi変異体ではFasIIIが過剰発現しており、この結果、卵巣形成の初期において、生殖幹細胞とその周辺の体細胞が混じり合わず、分離してしまい、したがって、卵巣の形成が異常となることが示唆された。つまり、Piwiは周辺体細胞の遺伝子発現をとおして、生殖幹細胞の正常な形成に関与していることが示唆された。

(4)生殖細胞ではpiRNAは一次プロセッシング経路で合成された後、ping-pong cycleと呼ばれる増幅経路によりその産生が増幅される。一方、OSC細胞においては一次プロセッシング経路のみが機能しており、piRNAの増幅は見られない。いずれの場合もsiRNAやmiRNAと異なり、Dicer非依存的に合成されることがわかっていたが、piRNA前駆体から成熟piRNAへのプロセスに関するRNA切断酵素は不明であった。RNAiスクリーニングにより、候補遺伝子としてZucchiniを同定した。構造解析と生化学的な解析により、ZucchiniがpiRNA前駆体を切断し、piRNAの

成熟化に直接関与するRNA切断酵素であることを見いだした。Zucchiniはミトコンドリア上に局在しており、ミトコンドリア表面がpiRNA合成の場であることを明らかにした。

(5)自ら作製したPiwiファミリータンパク質（AGO3, Aub, Piwi）それぞれに対するモノクローナル抗体を免疫染色に用いることで、AubとPiwiが卵形成過程で後極、そして生殖顆粒に局在し、直接、母親からその子孫に受け渡されることを明確にした。このことは、TE抑制シグナルがpiRNAの配列情報としてAub-, Piwi-piRNA複合体というカタチで母親から直接次世代に引き渡されることを示唆し、Hybrid dysgenesisの分子機構の解明に寄与した。

(6)ショウジョウバエ卵巣におけるTE抑制に関与するMaelの機能解析を進め、Maelが微小管形成中心（MTOC）構成因子と複合体を精製していることを見いだした。また、mael変異体ではMTOCが形成されないことがわかった。MTOCは卵形成過程における軸形成に必須である。これらの成果はTE抑制とMTOC形成（したがって、軸形成）が関連している可能性を示唆する。

以上のように、TE抑制機構が体細胞では遺伝子の発現制御にも密接に関与していること、そして、生殖細胞では生殖幹細胞-体細胞相互作用や軸形成に関与している可能性を示唆する結果を得た。

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 31 件 全件査読あり）

主要 10 論文：

1. Nishida, KM., Miyoshi, K., Ogino, A., Miyoshi, T., Siomi, H. and Siomi, MC. 2013. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Mol Cell* 49: 680-691.
2. Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, MK., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Bonnefond, L., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, MC., and Nureki, O. 2012. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491: 284-287.
3. Sato, K., Nishida, K.M., Shibuya, A., Siomi, M.C., and Siomi, H. 2011. Maelstrom coordinates microtubule organization

during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes & Development* **25**: 2361-2373.

4. Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., lo Sardo, F., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., Siomi, M.C., Carninci, P., Gilmour, D.S., Corona, D.F.V., and Orlando, V. 2011. Chromatin-associated RNAi components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature* **480**: 391-395.
5. Saito, K., Ishizu, H., Komai, M., Kotani, H., Kawamura, Y., Nishida, KM., Siomi, H., and Siomi, MC. 2010. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes & Development* **24**: 2493-2498.
6. Nagao, A., Mituyama, T., Huang, H., Chen, D., Siomi, MC., Siomi, H. 2010. Biogenesis pathways of piRNAs loaded onto AGO3 in the *Drosophila*. *RNA* **16**: 2503-2515.
7. Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. 2010. A direct role of Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nature Structural and Molecular Biology* **17**: 1024-1026.
8. Siomi, H., and Siomi, MC. 2009. On the road to reading the RNA interference code. *Nature* **457**: 396-404
9. Saito, K., Inagaki, S., Mituyama, T., Kawamura, Y., Ono, Y., Sakota, E., Kotani, H., Asai, K., Siomi H. and Siomi, MC. 2009. A regulatory circuit for *piwi* by *traffic jam*, a large Maf, in *Drosophila* gonadal somas. *Nature* **461**: 1296-1299.
10. Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, NT., Siomi MC. and Siomi, H. 2008. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. *Nature* **453**: 793-797.

[学会発表] (計 55 件)

主要 10 発表 :

1. H. Siomi. piRNA biogenesis in the *Drosophila* ovary. Cell Symposia: Functional RNAs, Sitges, Spain, December 2-4, 2012
2. H. Siomi. piRNA biogenesis in the *Drosophila* ovary. 63rd Fujihara Seminar, "A new horizon of retroposon research", Kyoto, July 31 - August 3, 2012
3. H. Siomi. Somatic piRNA biogenesis. The

3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases/The 7th Annual Conference of Asian Epigenome Alliance/Genome Medicine Workshop on Epigenetic (-moic)s in Diseases, Shanghai, China, April 19-22, 2012

4. H. Siomi. Maelstrom, a piRNA gene required for MTOC formation in the *Drosophila* oogenesis. CGC/CBG meeting Epigenetics and non-coding RNAs, Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, November 10, 11, 2011
5. H. Siomi. piRNA biogenesis in the *Drosophila* ovarian somatic cells. Memorial Sloan-Kettering Cancer Institute, New York, November 4, 2010
6. H. Siomi. piRNA biogenesis in the *Drosophila* ovary. The New York Academy of Sciences, " Piwi-interacting RNAs (piRNAs), the guardians of the germ-line stem cell genome - Biogenesis and Function-", New York, November 3, 2010
7. H. Siomi. Endo-siRNA production and somatic silencing of transposons. International symposium on Control of Gene Expression and Cancer, dedicated to the 20th anniversary of the Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, June 21-25, 2010
8. H. Siomi. How are piRNAs produced in the *Drosophila* ovary? "Bingzhi Forum" speaker at Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, June 15, 2010
9. H. Siomi. piRNA-mediated transposon silencing. Plenary Lecture, RNA Symposium 2010 (the 3rd RNA molecular Biology meeting of Taiwan), National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan February 8-9, 2010
10. H. Siomi. Biochemical characterizations of piRNA genesis. Genetics Seminar Program, Yale University School of Medicine, New Haven, January 12, 2010

[図書] (計 6 件)

主要 5 図書 :

1. Sato, K., and Siomi, H. 2012. PIWI proteins and their Slicer activity in piRNA biogenesis and transposon silencing. *The Enzymes Vol. 32: Part B: RNA endonucleases in RNAi and microRNA*

metabolism and their partners
pp137-162 (eds., F. Tamanoi, F. Guo,
and G. Chanfreau) Elsevier.

2. Miyoshi, K., Okada, T., Siomi, H. and
Siomi, MC. 2011. Biochemical analyses of
endogenous Argonaute complexes
immunopurified with anti-Argonaute
monoclonal antibodies. *Methods in
Molecular Biology* **725**, Argonaute
Proteins: Methods and Protocols (ed.,
Hobman TC & Duchaine TF) ISBN:
978-1-61779-045-4. pp29-43.

3. Saito, K., Miyoshi, K., Siomi, MC., and
Siomi, H. 2010. The key features of RNA
silencing. pp1-28. In *RNA Technologies and
Their Applications* (eds., V. Erdmann and
J. Barciszewski) Springer-Verlag Berlin
Heidelberg.

4. Siomi, MC., Nishida, KM., and Siomi, H.
2008. How to define targets for small guide
RNAs in RNA silencing: a biochemical
approach. *Methods in Enzymology* **449**:
345-355.

5. Miyoshi, K., Uejima, H., Nagami, T.,
Siomi, H., and Siomi, MC. 2008. *In vitro*
RNA cleavage assay for Argonaute-family
proteins. *Methods in Molecular Biology*
442: 29-43.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.siomilab.med.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 春彦 (SIOMI HARUHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60202107

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし