

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870032

研究課題名（和文）

RNAサイレンシング因子による微小管・中心体形成機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis on a possible link between piRNA biogenesis and microtubule organization

研究代表者

佐藤 薫 (SATO KAORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20548507

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、RNAサイレンシングに関わる *maelstrom* (*mael*) 遺伝子の微小管・中心体形成における分子機能を明らかにすることである。当研究室で作成した抗 Mael モノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により、 γ Tubulin タンパク質を新たな Mael 結合分子として同定した。また、*mael* 変異体では γ Tubulin の局在に異常が生じており、*mael* が γ Tubulin と相互作用し、その局在などを制御する因子として機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

A research goal of this study is to clarify a molecular function of the *maelstrom* (*mael*) gene, which is involved in RNA silencing, in microtubule and centrosome organization. By the immunoprecipitation method using an anti Mael monoclonal antibody, I identified Tubulin protein as novel Mael associating factor. In addition, abnormality we observed an abnormal localization of Tubulin in the *mael* mutant egg chambers. These results suggest that *mael* plays an essential role for egg development via consistently possibly regulating proper microtubule and centrosome organization by physically associating with peri-centriolar proteins during *Drosophila* oogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	970,000	291,000	1,261,000
2010年度	710,000	213,000	923,000
総計	1,680,000	504,000	2,184,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：RNAサイレンシング、微小管、中心体、ショウジョウバエ、生殖細胞、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

20 から 30 塩基長の小分子 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。その代表例は RNA干渉 (RNA interference、RNAi) である。

RNAi の発見以来、RNAサイレンシングに関する基礎研究は飛躍的に進み、この機構が発生や代謝、ウイルス感染防御といった、生命に欠かせない多くの現象を遺伝子発現レベルで制御していることが明らかになってき

た (Siomi and Siomi. Nature. 2009. 457: 396-404)。RNA サイレンシングにおいて中核的な役割を担う因子は Argonaute タンパク質であり、これらは生殖細胞特異的に発現する PIWI サブファミリーとほぼ全組織で恒常的に発現する AGO サブファミリーに分類される。

PIWI サブファミリーは、piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる 24~ 29 塩基長の小分子 RNA と結合する事によって機能する。piRNA の多くは、ゲノム上の転移因子 (Transposable element; TE) 特にレトロトランスポゾンに由来し、PIWI サブファミリータンパク質と piRNA が特異的に結合する事によって、生殖細胞系において TE などの遺伝子発現を抑制し、それらのゲノムへの侵略を防ぐ、つまりゲノムの品質管理機構において機能する因子である事が明らかになってきた。piRNA 生合成機構のおおまかなモデルとして、piRNA-PIWI サブファミリータンパク質複合体が TE 転写産物を切断し、その切断産物がそのまま piRNA になるといった「ping-pong model」が提唱されている (Gunawardane et al. Science. 2007. 315:1587-90; Brennecke et al. Cell. 2007. 128:1089-103) が、今なお、piRNA 生合成とそれが機能する際の分子機構に関しては不明な点が多く残されている。

piRNA に関する研究の過程で、ショウジョウバエ卵巣において piRNA 量が著しく減少するといった、piRNA の生合成に異常のみられる変異体が多数見いだされている。興味深いことに、それらの変異体の多くでは、卵母細胞における微小管や中心体形成の異常など、単に TE の発現抑制では説明が困難な現象がみられている。これらの中で唯一、maelstrom (mael) 遺伝子は、微小管形成や中心体の複製・維持に係るいくつかのタンパク質と物理的に相互作用していることがこれまでの当研究室における研究で明らかになっている。また、mael 変異体の卵巣では、卵形成に重要な微小管構造である Microtubule Organizing Center (MTOC) が異所的に局在することで、前後の極性形成異常とそれに続く背腹軸の形成異常といった Spindle (Spn) クラス変異体に共通してみられるような異常がみられており (Clegg et al. Dev Genes Evol. 2001. 211:44-8; Seth et al. Development. 2003. 130:859-871)、本研究室の先行研究において、実際に、Mael が微小管形成や中心体形成に関わる因子と相互作用しているという結果は、それらの事実とよく一致する。ショウジョウバエ卵形成において、中心体は保育細胞から微小管に沿って卵母細胞へと運ばれることから、Mael は微小管、中心体関連因子と物理的に相互作用する事によって、その形成及び維持、局在に

おいて機能すると考えられる。しかし、Mael が微小管形成・中心体局在に機能することと piRNA 生合成に機能することが、どのように関連しているのかはまだ明らかになっていない。本研究では、このような異常を示すショウジョウバエ mael 変異体を用いて、piRNA 生合成と微小管・中心体形成とを結びつけている制御機構を明らかにしたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Mael がどのような分子と相互作用し、piRNA の生合成、および微小管・中心体形成とどのような分子機構によって関わっているのかを明らかにすることである。特に、以下の二点について明らかにする。

1) Mael 結合分子の同定と各 Mael 結合分子のショウジョウバエ変異体における piRNA 量の変化

現在、当研究室では、mael の piRNA 生合成への作用機序を探るために、ショウジョウバエ卵巣細胞内において Mael がどのような因子と相互作用しているのか、抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降実験と質量分析 (MS) 解析により Mael 結合分子の同定を進めている。しかし、まだ同定していない Mael 結合分子が複数残されており、本研究ではまず、これらの同定を行う。さらに、Msp1 や Cnn と併せ、同定された遺伝子のショウジョウバエ変異体において、piRNA 量に異常がみられるかものを枚挙する。

2) 上記 1) において piRNA 量に異常がみられる Mael 結合分子、および既知の piRNA 生合成因子 (Aub など) のショウジョウバエ変異体卵母細胞における微小管、中心体局在パターン

Mael 変異体卵巣では、piRNA 生成に異常がみられるとともに、微小管・中心体形成にも異常がみられる。1) において枚挙した遺伝子の変異体の卵巣における微小管・中心体形成の状態を解析する。これにより、piRNA 生合成に係る遺伝子が微小管・中心体形成とどのように関連しているのか明らかにする。

3. 研究の方法

1) Mael 結合分子の同定と各 Mael 結合分子のショウジョウバエ変異体における piRNA 量の変化

現在、当研究室では、mael の piRNA 生合成への作用機序を探るために、ショウジョウバエ卵巣細胞内において Mael がどのような因子と相互作用しているのか、抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降実験と質量分析 (MS) 解析により Mael 結合分子の同定を進めている。しかし、まだ同定していない Mael 結合分子が複数残されており、本研究ではまず、これら

の同定を行う。さらに、Msps や Cnn と併せ、同定された遺伝子のショウジョウバエ変異体において、piRNA 量に異常がみられるかものを枚挙する。

2) 上記 1)において piRNA 量に異常がみられる Mael 結合分子、および既知の piRNA 生合成因子(Aub など)のショウジョウバエ変異体卵母細胞における微小管、中心体局在パターン

Mael 変異体卵巣では、piRNA 生成に異常がみられるとともに、微小管・中心体形成にも異常がみられる。1)において枚挙した遺伝子の変異体の卵巣における微小管・中心体形成の状態を解析する。これにより、piRNA 生合成に係る遺伝子が微小管・中心体形成とどのように関連しているのか明らかにする。

4. 研究成果

1) Mael 結合分子の同定と各 Mael 結合分子のショウジョウバエ変異体における piRNA 量の変化

・当研究室で作成した抗 Mael モノクローナル抗体を用いて、免疫沈降法により、ショウジョウバエ卵巣において、Mael と相互作用する分子を単離・同定した。同定した分子で、かつ、抗体が利用可能なものについて、Mael との相互作用を調べ、実際に Mael と物理的に相互作用していることを確認した。その中で、Tubulin タンパク質が新たな Mael 結合分子として同定できた。Tubulin 変異体が入手困難なため、当研究室で Tubulin 変異体の作出を試みている。

2) 上記 1)において piRNA 量に異常がみられる Mael 結合分子、および既知の piRNA 生合成因子(Aub など)のショウジョウバエ変異体卵母細胞における微小管、中心体局在パターン

・まず、免疫染色法により、mael 変異体卵巣において、微小管・中心体の局在異常を発生過程の早期から遅期において観察したところ、Tubulin 変異体の卵巣と非常によく似た表現型が観察された。また、mael 変異体では Tubulin の局在に異常が生じており、mael が Tubulin と相互作用し、その局在などを制御する因子として機能していることが示唆される。Tubulin 変異体の作出し、卵巣での piRNA 量を調べる予定である。

piRNA が制御するトランスポゾン、その多くが、宿主ゲノムへ転移することで宿主の遺伝子を破壊してしまうことがあるが、TE の中にはショウジョウバエやカイコのテロメア構造のように、宿主ゲノムに有益なものとして使われるようになったものもある。また、近年、真核生物の細胞分裂の際に染色体の娘細胞への正確な分配に重要な役割を果たしているセントロメアはトランスポゾンが蓄積している領域であることが明らか

となってきており、一見関連性の低いと思われる piRNA 生合成機構と真核生物の細胞分裂における染色体分配機構は密接に関連しているのではないかと考えられる。トランスポゾンを制御する piRNA の生合成に必要とされる mael が実際に Tubulin などの微小管や中心体の形成に重要な因子と相互作用し、その局在を制御していることは、piRNA の機能と真核生物の主要な細胞分裂装置は密接に関連していることを示唆している。これまで piRNA 生合成と微小管・中心体形成とを結び付けるような研究はなく、Mael を中心として piRNA 生合成と微小管・中心体形成の両者に着目して解析を進めることで、これまで不明であった両者の接点を明らかにできる可能性が非常に高いと考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1)

発表者名: 佐藤 薫

発表 標 題: Maelstrom interacts with protein components of MTOC and is required for proper segregation of egg chambers in Drosophila ovary

学会名: Keystone Symposia Mechanism and Biology of Silencing -

発表年月日: 2011 年 03 月 20 ~ 25 日

発表場所: Monterey, California

2)

発表者名: 佐藤 薫

発表 標 題: ショウジョウバエ卵巣における piRNA 生合成関連遺伝子 maelstrom の機能解析

学会名: 第 12 回 RNA 学会年会

発表年月日: 2010 年 07 月 27 ~ 29 日

発表場所: 一橋記念講堂

3)

発表者名: 佐藤 薫

発表 標 題: A possible link between piRNA biogenesis and microtubule organization in Drosophila ovaries

学会名: 19th CDB Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology

発表年月日: 2010 年 5 月 10 ~ 12 日

発表場所: Kobe, RIKEN CDB

4)

発表者名: 佐藤 薫

発表標題: A possible link between piRNA biogenesis and microtubule organization in Drosophila ovaries

学会名: 2010 Keystone symposia・RNA silencing: Mechanism, biology and Application

発表年月日: 2010年1月14-19日

発表場所: Keystone, Colorado, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/dmb/sindex.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 薫 (SATO KAORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20548507

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし