

塩見 美喜子

慶應義塾大学 医学部・准教授

RNA サイレンシングが司る遺伝子情報制御

§1. 研究実施体制

(1)「塩見」グループ

① 研究代表者: 塩見 美喜子 (慶應義塾大学医学部、准教授)

② 研究項目

本研究全般(詳細は研究実施内容にあり)

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究の概要

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。RNA サイレンシング研究はここ10年余りで飛躍的に進み、これが発生・分化や代謝、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制御していることが明らかになってきた。しかし、その分子機構には不明な点が多く残されている。RNA サイレンシングを疾患治療等へと応用する試みが盛んに進められている現在、RNA サイレンシングの分子機構、およびその他の生体分子機構との関連性を、正しく、深く理解する事は不可欠である。我々は、主にショウジョウバエをモデル生物として RNA サイレンシングの包括的な理解を目指している。平成23年度は主に、①ショウジョウバエ piRNA 生合成因子 Maelstrom の機能解析、②ショウジョウバエ精巣内 piRNA 生合成因子の解析、③OSC 細胞における primary piRNA 生合成の解析、④カイコ卵巣由来 BmN4 を用いた piRNA 因子の解析、⑤ショウジョウバエ piRNA 生合成因子 Krimper の機能解析、⑥RNAi 機構における D2 body の機能とその形成機構の解析、⑦細胞ストレス(熱ショック)依存的に起こる RNA サイレンシングの解析、に焦点を当て研究をすすめた。①、②、⑦に関しては、研究成果を論文にまとめて発表した。

研究進捗状況

①ショウジョウバエ **piRNA 生合成因子 Maelstrom (Mael)** の機能解析: Mael は piRNA 因子として知られるが、その分子機能は不明である。Mael モノクローナル抗体を用いて卵巣より Mael 複合体を精製した後、結合因子を同定した。その結果、Centrosomin や γ Tubulin など MTOC 因子が得られた。Mael は α Tubulin や γ Tubulin と centrosome において共局在する事も判明した。Mael 変異体卵巣では MTOC が異所的に観察され、centrosome の移動にも支障がみられた。Oocyte の決定もおかしくなり、egg chamber の融合もみられた。生体軸決定の異常は Chk2 との二重変異によって影響を受けなかったことから、Mael は MTOC 形成の重要因子であり、Mael 機能は Chk2 や DNA 損傷シグナル機構とは独立しているといえる。この研究成果は論文として発表済みである (原著論文①)。

②ショウジョウバエ精巣内 **piRNA 生合成因子の解析**: 生殖細胞の piRNA 生合成は核膜周辺に位置する顆粒体 nuage で行われると考えられている。piRNA 因子の多くは nuage に局在し、特定の piRNA 因子の欠損では piRNA の減少と共に nuage の消失がみられる。これまでの解析によって卵巣 nuage への piRNA 因子の局在にはヒエラルキーが見出されている。このヒエラルキーに性差があるか検討したところ、Krimper の局在に関して差がみられた。この結果は卵巣、精巣における Krimper 機能の違いを示唆する (原著論文②)。Krimper の分子機能の詳細は今だ不明であるが、我々はその解析を現在進めている (以下⑤参照)。

③OSC 細胞 **primary piRNA 生合成の解析**: OSC において flamenco piRNA locus から転写される RNA 産物の局在を RNA FISH によって示す事に成功した。flam 転写産物は、顆粒体として検出されたため、flam body と命名した。flam body は Yb body の近傍に観察された。flam body の形成には Yb が必須である事も判明した。Yb は、Yb body の形成にも必要な因子である。現在、この相関を詳細に調べている。Traffic jam 遺伝子は、タンパク質と同時に piRNA を 3' UTR より生成する。この piRNA 生合成に cis 因子として働く領域の同定に成功した。この領域はヘアピン構造を取りうる。現在、この領域に結合するタンパク質因子の同定を試みている。

④カイク卵巣由来 **BmN4** を用いた **piRNA 因子の解析**: カイクは2種類の PIWI タンパク質、Siwi と BmAGO3 を発現する。これら PIWI に結合するタンパク質因子を同定したところ、Tudor や Qin、Vriteno、Spindle-E、Vasa などの因子が得られた。これら因子の詳細な機能は未だ不明であるため解析をすすめたところ、BmTudor は primary piRNA processing には必要ではないが amplification loop には必要、それに反して Vasa と Spindle-E は primary processing に必要であるとの結果を得た。現在、Vasa や Spindle-E の活性変異体を作成し、これら因子の piRNA 生合成機構における機能を詳細に明らかにしようと試みている。in vitro での amplification loop の再構築も平行して進めている。

⑤ショウジョウバエ **piRNA 生合成因子 Krimper** の機能解析: Krimper の piRNA 生合成機構における機能解析を進めた結果、Krimper はジメチル化 (sDMA) 修飾を受ける前の AGO3 に結合する事によって AGO3 の sDMA 修飾を促進し、amplification loop に入る前の AGO3 の下準備を潤滑に行う、そして piRNA 増幅機構を促進させる機能をもつ事が示唆された。修飾を受

けていない AGO3 と修飾された AGO3 との機能相違などを明らかにするため、未修飾 AGO3 に対する特異的抗体を現在作成中である。

⑥ D2 body の機能とその形成機構の解析: siRNA 生合成機構の中核的因子 Dicer2 と R2D2 は D2-body に局在する。R2D2 が無い条件下においては、Dicer2 は D2 body に局在せず、普段は結合しない AGO1 への結合能が上昇する。これによって siRNA が、通常 miRNA と特異的に結合する AGO1 へと load されてしまうと考えられた。現在、Dicer2 及び R2D2 の変異体を作製し、その詳細な解析を進めている。endo-siRNA 前駆体の同定も平行して進めている。

⑦ S2 細胞ストレス(熱ショック)依存的に発現する siRNA の解析 (Valerio Orlando 研究グループとの共同研究): ショウジョウバエ S2 細胞に熱ショックを与えると、熱ショックが上昇し、その他の遺伝子の発現が抑制される。この分子機構に関する解析を進めた。熱ショック前後における siRNA の配列を決定し、比較したところ、発現パターンが異なる siRNA が観察された。また、これら siRNA は核で、転写レベルで発現抑制の機能を発揮する事が示唆された (原著論文③)。

研究成果

今年度は主にショウジョウバエ(一部カイコ)の siRNA 及び piRNA の生合成機構及び機能に関して研究を行ったが、いずれも期待取り進み、成果を原著論文3報として報告する事が出来た。

今後の見通し

③、④、⑤、⑥に関しては平成24年度に研究をさらに発展させ、論文としてその成果を発表する予定である。さらに、最近、慶應内での共同研究としてマーモセット PIWI の研究を始めたので、これを展開する予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Sato K, Nishida KM, Shibuya A, Siomi MC and Siomi H. Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes Dev.* 25: 2361-2373. 2011
- 2) Nagao A, Sato K, Nishida KM, Siomi H and Siomi MC. Gender-specific hierarchy in nuage localization of PIWI-interacting RNA factors in *Drosophila*. *Front. Gene.* 2: 55. 2011
- 3) Cernilogar FM, Onorati MC, Kothe GO, Burroughs AM, Parsi KM, Breiling A, Sardo FL, Saxena A, Miyoshi K, Siomi H, Siomi MC, Carninci P, Gilmour DS, Corona DFV and Orlando V. Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature* 480: 391-395. 2011