

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」
研究課題「RNA サイレンシングが司る
遺伝子情報制御」

研究終了報告書

研究期間 平成19年10月～平成25年3月

研究代表者:塩見 美喜子
(東京大学大学院理学系研究科、教授)

§ 1. 研究実施の概要

(1) 実施概要

生物の一個体を形成する細胞は全て同じ遺伝情報をもつが、個々の細胞における遺伝子発現は、時空間特異的に制御されており、この仕組みによって各細胞や組織の特異性、生体の複雑さが担保される。時空間特異的遺伝子発現の制御機構の一つとして「RNAサイレンシング」がある。RNAサイレンシングは、20~30塩基長のsmall non-coding RNAがトリガーとなる生体内分子機構で、酵母から動物、植物に至る多くの生物で保存されている。これまでの研究から、RNAサイレンシングは、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、その分子機構は未だ不明な点が多い。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た。特に、RNAサイレンシングを誘発するsmall non-coding RNAの生合成およびRNAサイレンシングの中核因子Argonauteの機能発現の解明に焦点をあて解析をすすめた。恒常的RNAサイレンシングに関する主な成果を以下にまとめる。

- ◆ 内在性siRNAの実体を明らかにした。RdRP活性をもたないショウジョウバエには内在性siRNAは無いと長い間考えられていたが、それを覆す結果をもたらした。
- ◆ RNAi機構はATPを必要とするが、どの段階で消費されるか不明であった。我々の解析から、AGO2へのsiRNAの取り込み時、つまりRISC形成時にはヒートショックタンパク質が必須で、それがATPを必要とするステップであることが示唆された。
- ◆ miRNA生合成機構因子LoquaciousをDicer1の機能性パートナーとして同定した。また、Loquaciousアイソフォームの機能の独立性を明確にした。
- ◆ ヒトmiRISCの解析を通して、miRNAには末端配列を異にするアイソフォームが存在すること、異なる5'末端を持つアイソフォームは独自の機能をもつことを証明した。ここ数年は特に、生殖細胞特異的なRNAサイレンシング機構を分子レベルで理解することに集中した。生殖細胞は、正しい遺伝情報を次世代へと継承するという大きな使命を担う。それを確固たるものとするべく、生殖組織は、トランスポゾンなど利己的な転移因子による損傷からゲノムを護り、生殖組織の発生・分化を正常に促す仕組みとして生殖組織特異的なサイレンシング機構を獲得した。しかし、その作用機序は不明な点を多く含む。そこで、生殖組織特異的に発現するArgonauteタンパク質であるPiwi、Aubergine、AGO3に焦点をあて解析をすすめ、これらが生殖組織特異的small non-coding RNAであるpiRNAとpiRISCを形成し、トランスに働くことによって核、あるいは細胞質で転移性因子などの発現を抑制することを明らかにしつつ、特にpiRNA生合成機構の理解を目指し、解析をすすめた。生殖組織特異的RNAサイレンシングに関する主な成果を以下に示す。
- ◆ ショウジョウバエ卵巣由来体細胞株OSCを独自に樹立し、RNAi法を駆使することによってArmitageやYbなど一次piRNA生合成因子を同定し、その機能解析をすすめた。一次piRNA生合成機構のモデルを提唱した。
- ◆ piRNAの3'末端の2'-O-メチル修飾に関わる因子Pimetを同定した。Pimetは植物miRNA3'末端の2'-O-メチル修飾に関わる因子HEN1の相同体であった。
- ◆ 生殖組織特異的ArgonauteはsDMA修飾を受ける。母性因子TudorがAub-sDMA、AGO3-sDMA修飾特異的に結合する因子であることを示し、TudorのpiRNA生合成経路における機能を明らかにした。
- ◆ 一次piRNA生合成因子ZucchiniのX線構造解析および生化学的な解析をすすめることによってZucchiniが第一次piRNA産生に必要なendonucleaseであることを明らかにした。

piRNA生合成、機能発現の全面的理解には至っておらず、よって今後も研究を続ける。

(2) 顕著な成果

1. Kawamura *et al. Nature* 2008

概要:線虫や植物と異なり、ショウジョウバエは二本鎖 RNA 合成酵素 RdRP をもたないため、内在性 RNAi 機構は存在しないと考えられていた。しかし、AGO2-RISCに含まれる small non-coding RNA、つまり内在性 siRNA を単離精製し、その実体を明らかにした事によって、ショウジョウバエ内在性 RNAi 機構の存在を証明した。

2. Saito *et al. Nature* 2009

概要:特定遺伝子の3' 非翻訳領域から産出される piRNA が Piwi と協調的に働くことによって特定遺伝子の発現を制御すること、またこの機能が生殖細胞発生・分化に必須であることを示した。一つの遺伝子から作られたタンパク質と piRNA という二分子が同じ分子経路で機能することを示した。

3. Nishimasu *et al. Nature* 2012

概要: piRNA 生合成因子として知られていたが機能が不明であった Zucchini の X 線構造解析を行い、そこから得られた知見を基に生化学的な解析をすすめることによって、Zucchini が第一次 piRNA 産生に必要な endonuclease であることを示した。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

ショウジョウバエは RNA サイレンシング中核因子 Argonaute タンパク質を5種類発現する (AGO1、AGO2、AGO3、Aubergine、Piwi)。本事業開始に先立って、我々は、AGO1 と AGO2 はお互い異なった種類の small non-coding RNA と結合し、独立したサイレンシング経路で機能することを示した (Okamura *et al.* 2004)。この事実を踏まえ、本事業においては、ショウジョウバエがもつ RNA サイレンシングを分子レベルで包括的に理解することを最終目的として、それを達成するために5種類の Argonaute 各々に焦点をあて解析をすすめることにした。

AGO1—AGO1 は microRNA (miRNA) と特異的に結合する Argonaute である。結合した miRNA の塩基配列に従って標的 mRNA に作用し、その翻訳を負に制御する。しかし、その作用機序や分子作動特性に関する知見は乏しいため、これを明らかにする。

研究項目: ①miRNA duplex の unwinding factor の単離精製と同定と解析; ②miRNA 成熟化反応の再構築系の確立; ③GW182 リン酸化部位およびリン酸化因子の同定と解析; ④AGO1/Dicer1 (processing phase) から AGO1/GW182 (effector phase) への変移の作用機序; ⑤miRISC に結合する標的 mRNA の単離精製と同定法の確立

AGO2—AGO2 は siRNA と特異的に結合する Argonaute であり、RNAi 機構において必須である。siRNA を介して標的 mRNA を切断する endonuclease は AGO2 である。RNAi に必須な AGO2 以外の因子を網羅的に同定し、RNAi を in vitro で再構築する。

研究項目: ①RLC 複合体因子の同定とリコンビナント作製; ②RNAi 再構築系の確立; ③RNAi 調節因子の同定と解析および哺乳動物相同体の探索; ④RNAi 調節因子の応用

Piwi、Aub、AGO3—本事業に先立って、我々は、これら生殖細胞特異的 Argonaute は piRNA (当初 rasiRNA と総称された) の研究を通して「piRNA 生合成モデル」を提唱していた。本事業においては piRNA 生合成、及び機能発現の全面的理解を目指す。

研究項目: ①精巣 AGO3 に結合する piRNA の配列解析; ②精巣 piRNA 生合成機構のモデル提唱; ③piRNA 生合成因子 Armitage および Spindle-E の機能解析; ④piRNAi の 3' 末端修飾因子の同定と解析; ⑤piRNA 応用系の開発

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

本研究をはじめた当初は、恒常的 RNA サイレンシング (AGO1、AGO2) と生殖組織特異的 RNA サイレンシング (Piwi、AGO3、Aubergine) を平行して進める予定であったが、後半は特に生殖細胞特異的 RNA サイレンシング機構に集中することにした。ショウジョウバエ卵巣由来体細胞株 OSC や各種モノクローナル抗体など、生化学的な解析をするために必要な材料を得ることができたからである。これらの材料は、すべて我々のグループで作成したものであり、国内外の関連研究者に先立って解析をすすめることができた点、有利にはたらい。

<中間報告で得た総合評価>

piRNA を含む small RNA の基本的な生成メカニズム及び機能に関して大きく進展している。生命現象の理解としても、small RNA を用いた技術基盤としても価値が高く、非常に順調に進捗していると評価出来る。より一般的な原理解明へ発展することを期待したい。発生や代謝、ウイルス感染防御、癌といった生命に欠かせない多くの現象が RNA サイレンシングによって制御されていることが明らかとなっており、この作用機序の解明が、ますます重要な基盤研究となりつつある。研究代表者が本分野の第一人者として、益々、この研究分野をリードする研究を進めることを期待する。

この様なポジティブな総合評価をいただいた後も、期待にこたえられる様に RNA サイレンシング研究を推進してきた。本事業後半は、特に、piRNA 研究に集中したが、競合する相手が大勢いる中、苦しみながらも領域の第一線に位置しつつ、複数の関連論文を発表することが出来たため満足している。残念ながら、本事業は今年度で終了するが、今後も益々、本分野をリードする研究を進めていきたい。

§ 3 研究実施体制

(1)「塩見」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
塩見 美喜子	東京大学大学院理学系 研究科	教授	H19.10～
石津 大嗣	東京大学大学院理学系 研究科	助教	H24.8～
齋藤 加奈	東京大学大学院理学系 研究科	学術支援職員	H24.4～
佐藤 薫	慶應義塾大学医学部	特任助教	H21.8～H21.9 H22.4～H24.3
駒井 太陽	慶應義塾大学医学部	研究員	H23.4～H24.3
西田 知訓	慶應義塾大学医学部	特任助教	H23.9～H24.3
	徳島大学大学院	D1	H19.10～H20.3
荻野 あきよ	横浜国立大学	M2	H22.10～H24.3
小谷 葉月	慶應義塾大学医学部	研究員	H20.10～H24.2
岡田 知子	慶應義塾大学医学部	研究員	H20.4～H23.2
萬年 太郎	慶應義塾大学医学部	特別研究助教	H20.4～H22.9
竹内 説子	慶應義塾大学医学部	研究員	H21.10～H22.3
長尾 章弘	徳島大学大学院	D4	H20.5～H22.3
稲垣 幸	慶應義塾大学医学部	特別研究助教	H20.4～H21.7
河村 佳紀	徳島大学大学院	D4	H20.5～H21.3
向井 あすか	徳島大学大学院	D4	H19.10～H20.3

② 研究項目

- ・ 提案した研究項目の全てを実施した。

§ 4 研究実施内容及び成果

「塩見」グループ

① 研究のねらい

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 interference (RNAi) である。RNAi の発見以来、RNA サイレンシング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制御していることが明らかになってきた。ある種の癌の様に、RNAi 関連分子の機能異常が発症原因として疑われる疾患も次第に見つかってきている。これらの結果は、我々がこれまでに培ってきた、生命を司るための遺伝子情報発現の仕組みに関する理解を大きく変えようとしている。しかし、RNA サイレンシングの分子機構に関しては、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す。

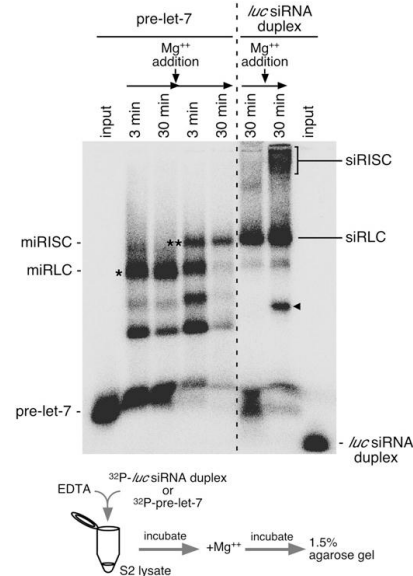
② 研究実施方法

スタートから平成20年3月までは徳島大学ゲノム機能研究センターにて実施
平成20年4月から平成24年3月までは慶応義塾大学医学部分子生物学教室にて実施
平成24年4月からは東京大学大学院理学研究科生物化学専攻にて実施

③ 当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況と得られた成果 <ショウジョウバエ AGO1/miRNA に関する研究>

Characterization of miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the

Drosophila miRNA pathway. AGO1 は標的 mRNA に作用する前後において結合因子を Dicer2 から GW182 へと変換する。しかし、この分子動態がどのような仕組みで行われるかは不明であった。当初、成熟型 miRNA の AGO1 への結合が Dicer1 からの AGO1 の解離を促すと考えられたが、miRNA 前駆体が存在しない条件下においても AGO1 は Dicer1 から解離する事がわかった。また、miRNA と結合しない AGO1 変異体が野生型 AGO1 に比べ、Dicer1 に強固に結合するという現象もみられなかった。よって、AGO1 は Dicer1 から miRNA 結合非依存的に解離する事ができるといえる。gel shift 解析により、miRLC と miRISC の可視化に成功した(右図)。siRNA で誘導される siRLC や siRISC 複合体と大きさ(ゲル内移動度)が違うため、構成因子が大きく異なると考えられた(K.Miyoshi et al. 2009)。



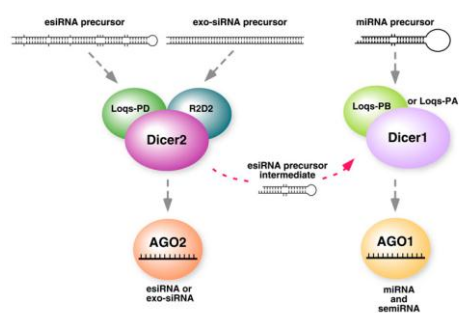
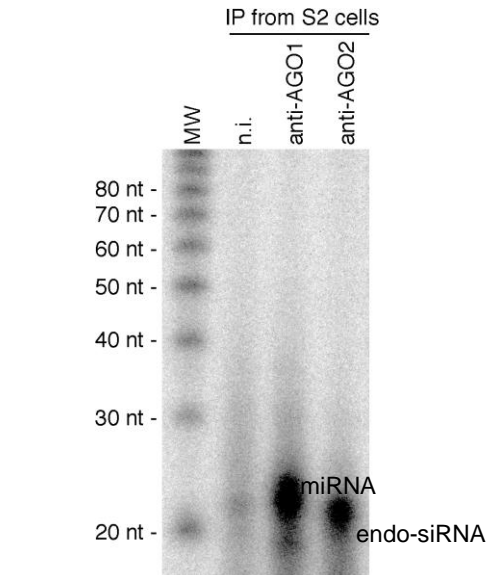
A role of La in miRNA duplex unwinding in Drosophila. 成熟した miRNA の AGO1 への受け渡し機構(miRNA loading)は ATP 依存的に起こるが、その詳細は不明である。miRNA loading 機構の各ステップにおける ATP 要求性を検討したところ、miRNA/miRNA* duplex の解きほぐし(unwinding)に ATP の加水分解が必要である事を示唆する結果が得られた。数種のクロマトグラフィーを駆使する事によって miRNA unwinding 活性を示す因子の精製を試みたところ、La が候補因子として得られた。La の要求性を検討する実験をすすめたが、今ひとつ RNAi の効率が期待できず(La が大量にあるため、RNAi が効きにくいと判断した)思う様な結果が得られなかった。現在では、miRNA loading には、熱ショックタンパク質が強く関わると考えられている。ATP の消費も熱ショックタンパク質によることが示唆されたている。

Purification and identification of mRNAs targeted by miRISC in vivo. これまでの研究から、AGO1/GW182/PABP 複合体には miRNA と同時に mRNA も含まれる事が判明した。この複合体に含まれる mRNA は、miRNA の真の標的であると考えられたため、これを cDNA に置換した後ライブラリーを作製し、塩基配列を決定する事にした。最近では、miRNA の真の標的を探索するために、CLIP や PAR-CLIP 等の手法が用いられるが、条件検討を念入りに行う必要がある。我々は、複数の GW182 抗体を有しているが、そのうちの一つは PABP タンパク質を共沈降する。この複合体には miRNA と共に、その標的 mRNA が含まれると考えられるため、この抗体を上手に利用することによって miRNA 標的遺伝子の同定を試みた。バックグラウンドの少ない、質のよいライブラリーを作製する事が本項目の達成には不可欠であるが、今なお、理想的な質

の高いライブラリーが得られていないため、さらなる検討を進める。この実験が上手くいけば、GW182 抗体が認識する抗原を同定し、それと同じ部位に反応するヒトやマウス GW182 抗体を作成したのち、同様の実験をすすめる。

<ショウジョウバエ AGO2/siRNA に関する研究>

Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. 線虫や植物と異なり、ショウジョウバエは二本鎖 RNA 合成酵素 RdRP をもたないため、内在性 RNAi 機構は存在しないと考えられていた。しかし、RNAi を施していない一般の S2 細胞から免疫沈降した AGO2 複合体には small non-coding RNA が含まれている、つまり siRNA で誘導しない場合でも AGO2 は内在性 siRNA と結合して内在性 RNAi を行っていることを示す。これら内在性 siRNA は S2 細胞で発現する miRNA よりも 1 塩基だけ短く、また、miRNA と異なり AGO1 には結合しないことも判った(右図)。これら内在性 siRNA の塩基配列を決定したところ、piRNA と同様に遺伝子間領域にある転移性因子を由来とすることが判った。これら内在性 siRNA の機能を阻害すると、転移性因子の発現量が上昇することから、piRNA と同様に RNA サイレncing を行うことによってゲノムを転移性因子に起因する損傷から護る機能を果たすことが示された (Kawamura et al. 2009)。

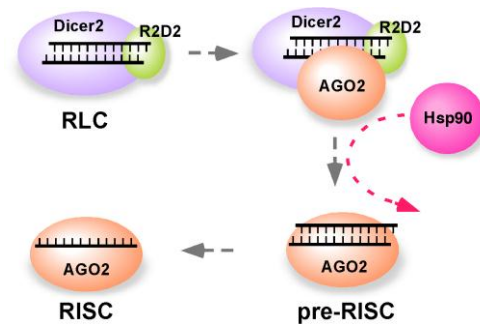


Functional molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and micro RNA biogenesis pathways in Drosophila.

内在性 siRNA は Dicer2 に依存した経路で産生され、AGO2 に特異的に結合する。前駆体からの内在性 siRNA 生合成には Dicer2 と共に miRNA 生合成因子 Loquacious (Loqs) が関わりとされていたが、その詳細は不明であった。我々は内在性 siRNA 生合成経路に関する解析を進めることによって、内在性 siRNA 生合成経路には Dicer2 と Loqs-PD アイソフォームが、miRNA 生合成経路には Dicer1 と Loqs-PB アイソフォームが機能する事を突き止めた(前頁図)。また、Dicer2 と Loqs-PD 複合体は R2D2 (外来性 siRNA を前駆体から産生する反応において機能する因子)と三量体を形成しうること、外来性 siRNA 生合成経路において Dicer2 活性を促進するのは R2D2 ではなく Loqs-PD であることを示した (K.Miyoshi et al. 2010)。

A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in Drosophila.

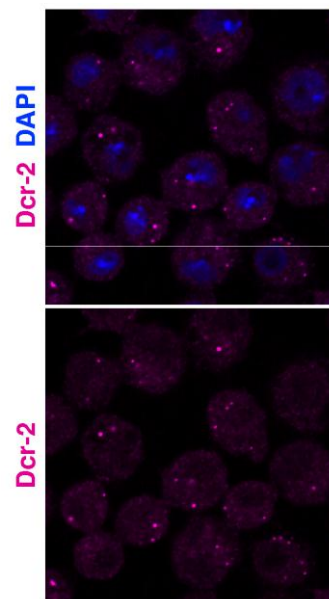
RNAi 経路においては ATP が必須である事が以前より判っていたが、ATP がどのステップにおいて必要とされるかは不明であった。我々は、RNAi においては、siRNA duplex が AGO2 タンパク質に結合 (loading) する段階で ATP が必要であることを突き止めた。これまでの解析から、AGO2 はヒートショックタンパク質 HSP90 と結合する能力が有る事が知られていた。



HSP90 の阻害剤を用いて種々の実験を進めたところ、HSP90 阻害剤存在下においては、siRNA duplex が AGO2 タンパク質に結合しなくなる事、しかし、siRNA が AGO2 と RISC を形成した後は、HSP90 の阻害剤はなんら影響を与えない事を突き止めた。Argonaute は siRNA duplex を RLC より受け取る。この反応が siRNA duplex の巻き戻し反応に必要である。これまでの Argonaute タンパク質の構造解析から、Argonaute は通常状態では、siRNA duplex と結合するために必要な空間を有していない事が判った。つまり、siRNA duplex と結合するためには、Argonaute タンパク質の構造変化が必要である事を意味する。HSP90 の阻害剤が Argonaute への siRNA duplex loading を阻害することから、HSP90 が ATP を消費する事によって、能動的に Argonaute の構造を変化させる事が、Argonaute への siRNA loading の直前に起こる必要がある事が判った(右上図) (T.Miyoshi et al. 2010)。

Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in Drosophila.

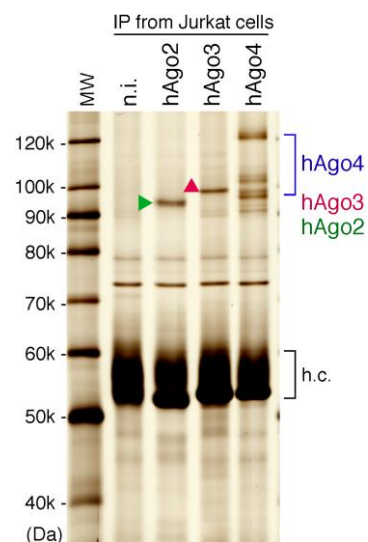
Dicer2 モノクローナル抗体でショウジョウバエ S2 細胞を染色したところ、Dicer2 が細胞質構造体に局在する事が判明した(右図)。Dicer2 の機能性パートナー因子 R2D2 も Dicer2 と共局在した。解析の結果、この構造体は P-body とも stress granule とも異なることが判明したため、D2 body と命名した。R2D2 をノックダウンした条件下では、Dicer2 は D2 body に局在しなくなる。これは、Dicer2 の D2 body への局在は R2D2 依存的であることを示す。Dicer2 をノックダウンした条件下では、R2D2 は不安定になり、western blotting で殆ど確認できなくなる要求性は異なるものの、Dicer2、R2D2 両者が D2 body の形成に必要であるといえる。R2D2 をノックダウンした条件下では exo-siRNA も endo-siRNA も AGO1、AGO2 と両方に結合するようになる。通常は、両者とも AGO2 のみと結合する。R2D2 は、Dicer2 を D2 body へ局在させることによって siRNA が AGO1 へ誤って結合してしまうことを防ぐ機能をもつ、つまりこの分子機構は miRNA の機能を維持する制御機構であると考えられた(Nishida et al. 2013)。



<ヒト Argonaute/miRNA に関する研究>

Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing.

これまでヒト Ago1 (hAgo1) から hAgo4 全てに対するモノクローナル抗体に成功した(右図)。これら抗体を用いて Jurkat 細胞の hAgo2 及び hAgo3 に結合する small non-coding RNA の同定を次世代シーケンス法によって行った。その結果、hAgo2 も hAgo3 も miRNA が大半を占める事が明らかになった。本解析を通して5種類の新規 miRNA が同定出来た。Jurkat 細胞より免疫沈降した hAgo2 と hAgo3 を用いて標的 RNA 切断反応を行ったところ、hAgo2 にはその活性があるものの、hAgo3 には標的を切断する能力がない事が示された。hAgo2、hAgo3 抗体を用いて HeLa 細胞の免疫染色を行ったところ、P-body (processing body) への両者の局在を観察することが出来た。興味深い事に、Jurkat 細胞で hAgo2、hAgo3 に結合する miRNA には、種々の variant がある事が判明した。つまり、現在登録されている miRNA に比べ、5'末端にお

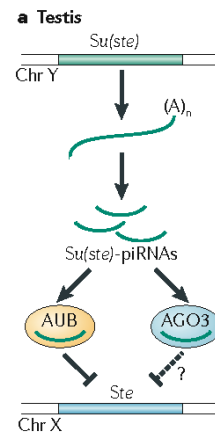
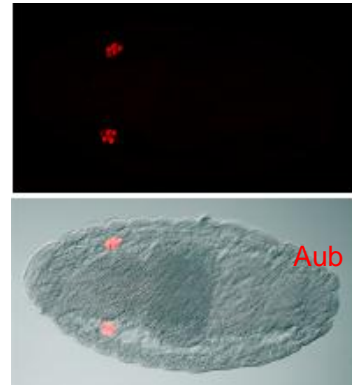


いて1、2塩基長いものや少ないものが発現している事が判明した。miRNAの5'末端側には、seed配列と呼ばれる部分があり、この配列が、標的のrecognitionに重要な役割を担う事が判っている。5'末端においてみられた1、2塩基の違いは、つまり、seed配列をかえるものであり、1種類のprecursorから異なるseed配列を持つ、異なる標的を認識するmiRNAが複数生じている事を強く示唆する(Azuma-Mukai et al. 2009)。

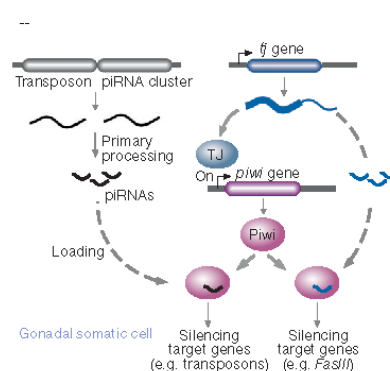
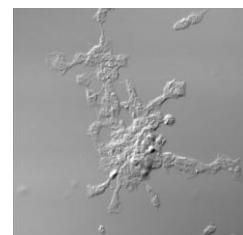
<生殖組織特異的 Argonaute に関する研究>

Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine-piRNA complexes in Drosophila male gonad. 生殖組織特異的 Argonaute を PIWI タンパク質と総称する。ショウジョウバエは3種類の PIWI タンパク質 (AGO3、Aubergine、Piwi) を発現する。3種類共、卵巣、精巣どちらでも発現する。

Aub モノクローナル抗体を作成した後(右図)、卵巣、精巣両者より Aub 複合体を単離精製し、Aub に結合する small non-coding RNA を同定したところ、その多くがトランスポゾンの配列をもつことが判明した。Aub には、AGO1 や AGO2 と同様に Slicer 活性がある事も明らかとなった。Aub 欠失型ショウジョウバエにおいては、トランスポゾンの発現が上昇することが知られている。つまり、Aub はトランスポゾンを由来とする small non-coding RNA との結合を介して、トランスポゾンを RNAi 様の反応によって制御する因子であるといえる。精巣では Casein Kinase II beta の相同体である *Stellate* が転写されるが、翻訳が起こり *Stellate* タンパク質が精巣で溜まると不稔を引き起こす。よってショウジョウバエ精巣は *Stellate* の発現を転写後に抑制する機構をもつ。以前の遺伝学的解析より、*Stellate* の発現抑制には *Suppressor of Stellate locus* を由来とする small non-coding RNA と Aub が関与することが示されていたが、その作用機序は不明であった。我々の解析から、Aub は *Suppressor of Stellate* を由来とする piRNA と結合し、*Stellate* mRNA を細胞質内で切断することによって *Stellate* の発現を抑制していることが示唆された(前頁図)(Nishida et al. 2007)。



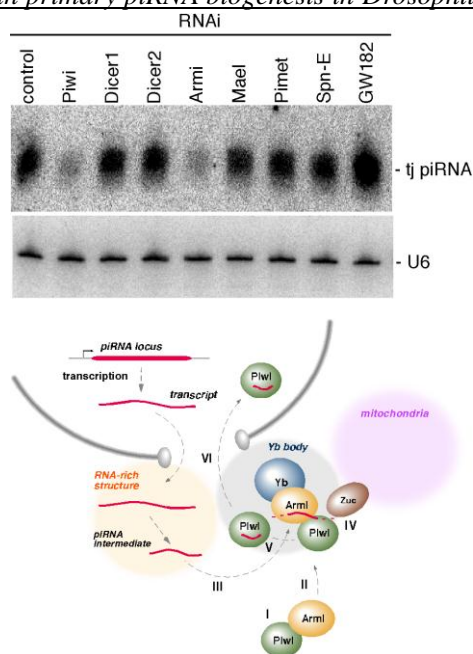
A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila. 我々は fGS/OSS 細胞株より OSC 細胞株を確立した(右写真)。fGS/OSS は元来ショウジョウバエ卵巣より確立された細胞株で生殖細胞と体細胞の両者を含むが、OSC は体細胞のみを含む。OSC は Aub、AGO3、Piwi のうち、Piwi のみ発現する。piRNA は amplification loop 経路と primary processing 経路によって生合成される。amplification loop 経路には Aub と AGO3 の Slicer (nuclease) 活性が関与する。OSC の Piwi は piRNA と結合した状態にある、つまり OSC では piRNA は Aub/AGO3 非依存的に primary processing 経路によってのみ生成される事になる。OSC-piRNA は *traffic jam (tj)* 遺伝子などの mRNA-3'UTR から発現する genic piRNA を多く含む。これら genic piRNA も Piwi と結合する。OSC では TJ タンパク質も発現する、つまり *tj* はタンパク質と piRNA の



両者を同時に産生する遺伝子であるといえる。TJ は、Large Maf Factor 転写因子であり、TJ がないと Piwi が発現しないことから Piwi の発現は TJ 転写因子によって正に制御されていることを示唆する。tj はタンパク質と piRNA の両者を発現することによって Piwi の機能を制御しているといえる(上図) (Saito et al. 2009)。

Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in Drosophila.

OSC 細胞において RNAi スクリーニングを行う事によって、Armitage 遺伝子が primary processing 機構必須因子の一つである事が判明した(上図)。Armitage 抗体を作成し、その生化学的解析をすすめたところ、Armitage は Yb body の構成因子であること、翻訳されたばかりの Piwi を Yb body へ局在させる因子であること、Yb body は primary piRNA 生合成の場であり、Piwi はそこではじめて成熟型 piRNA と結合すること、などが判った。変異を導入し Piwi の核局在を阻害するとトランスポゾンが脱抑制される。つまり、Piwi は核でのみサイレンシングを行う因子であるといえる。Piwi は piRNA と結合しないと核へ局在出来ないことも判明した。piRNA と結合しない Piwi が核に局在すると様々な必須因子の機能を阻害する、ひいてはサイレンシングを阻害すると考えられるが、これを防ぐための防御策であるといえる(下図)。Armitage/Yb/Piwi 複合体に含まれる RNA の配列解析をおこなうことによって、それらが piRNA intermediate であることも確認した(Saito et al. 2009)。



Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in Drosophila germlines.

PIWI タンパク質は sDMA (symmetrical dimethyl arginine) 修飾を受けていること、その修飾には PRMT5 メチルトランフェラーゼが関与することが報告された。Splicing 因子である Sm タンパク質も PRMT5 の基質であり、sDMA 修飾を受けた後に sDMA を介して SMN タンパク質と会合し、その会合が UsnRNA のリクルート、ひいては UsnRNP 複合体の形成を促すことが知られている。よって PIWI タンパク質も sDMA を介して何らかのタンパク質と会合し、それが piRNA との結合に大きく寄与しているのではないかと考えられた。sDMA 特異的に Aub と結合する因子を同定したところ、Tudor タンパク質が得られた。SMN と同様、Tudor も Tudor ドメインを持つという共通性を示す。Tudor-Aub 複合体には piRNA 前駆体が含まれる。また、Tudor が欠失した条件下では、Aub に結合する piRNA は Tudor 存在化のそれに比べてトランスポゾン由来の piRNA に限って質が異なる事が明らかとなった。Tudor は AGO3 が受ける sDMA を介して AGO3 とも結合する。Aub と AGO3 と Tudor による三者複合体も確認できた。よって Tudor タンパク質は Aub/AGO3 に同時に結合する事によって piRNA 生合成 (amplification loop) の場を提供し、さらに piRNA 前駆体のリクルートに寄与しているのではないかと考えられた(下図) (Nishida et al. 2009)。

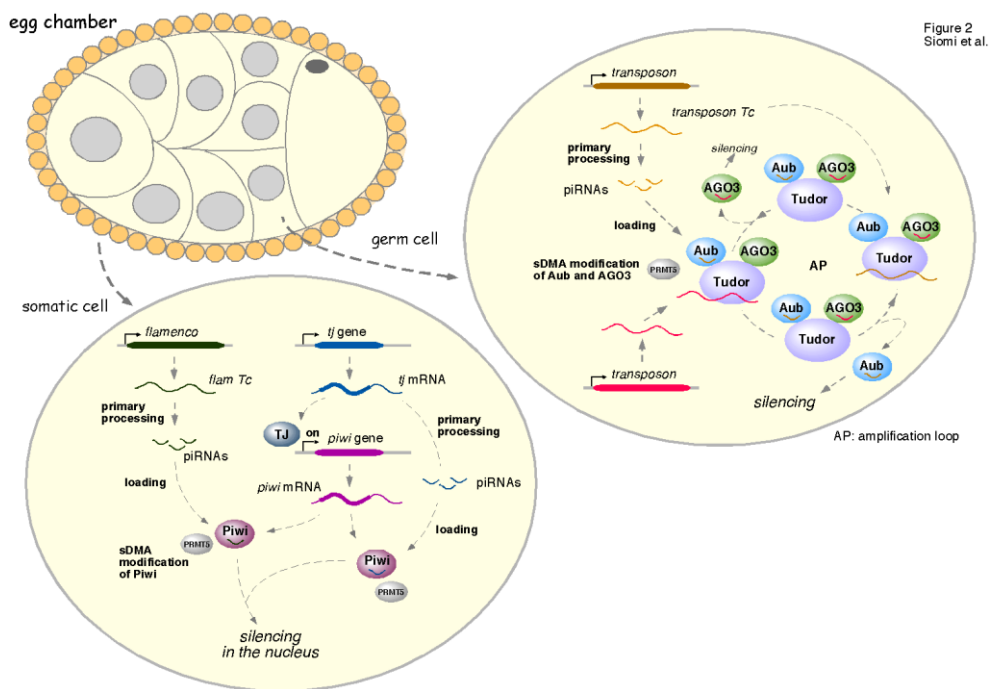
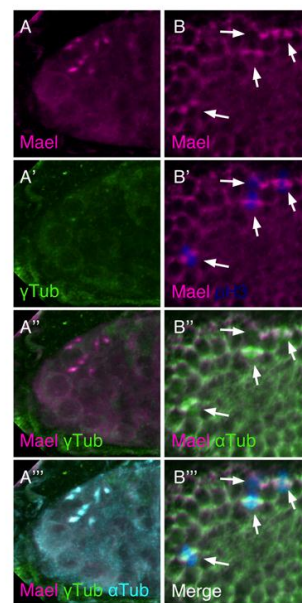


Figure 2
Siomi et al.

Biogenesis pathways of piRNAs loaded onto AGO3 in the *Drosophila* testis. 我々はこれまでショウジョウバエ卵巣内で AGO3 に結合する piRNA の解析を進める事によって、AGO3 にはトランスポゾン転写産物のセンス鎖由来の piRNA が多く含まれる事を見出した。この結果およびその他の結果から、卵巣の piRNA の生合成に関する amplification loop モデルを提唱した。しかし、このモデルが精巣の piRNA 生合成にもあてはまるかどうかは不明であった。そこで AGO3 抗体を用いて精巣 AGO3 を単離精製し、これに結合する small RNA の解析を進めた。平行して精巣内 Aub に結合する small RNA の解析も再度、規模を大きくして進めた。これらの塩基配列結果から、精巣においてもトランスポゾン由来の piRNA の多くは amplification loop によって生成される事、しかし *Suppressor of Stellate* など非トランスポゾンタイプの配列を前駆体とする piRNA は、多くの場合 primary processing 経路によって作られるという結果が得られた(Nagao et al. 2010)。

Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. Aub 変異体では piRNA の量が激減するが、これと同じ phenotype を示す遺伝子に Maelstrom がある。Maelstrom は Aub と共に nuage に局在する。よって、Maelstrom と Aub が共に piRNA の生合成に関わる可能性が示唆された。そこで Maelstrom に対するモノクローナル抗体を作成し、その抗体を用いて卵巣より Maelstrom 複合体を精製した後 Maelstrom 結合因子を同定した。その結果、Maelstrom 結合因子の多くが微小管形成や中心体形成に関わる因子であることが明らかになった(右図)。さらに、*maelstrom* 変異体卵巣では、それらの因子が異所的に局在することにより、中心体の配置・形成とそれに伴う微小管の分布に異常が生じていることが明らかとなった。これらの結果から、ショウジョウバエ卵巣にお



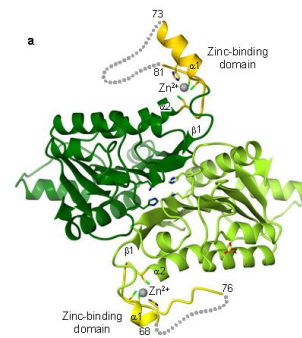
いて、*maelstrom* が中心体・微小管形成に関わる重要な因子として機能していることが示唆された。また、これらの結果は、中心体・微小管形成と piRNA 生合成とが密接に関連していることを示唆する (Sato et al. 2011)。

Gender-specific hierarchy in nuage localization of PIWI-interacting RNA factors in Drosophila. 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 (Nagao et al. 2010)。

Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in Drosophila. (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、熱ショックタンパク質が上昇し、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 (Cernilogar et al. 2011)。

Structure and function of Zucchini endonucleases in piRNA biogenesis. (濡木研究グループとの共同研究) Zucchini

は primary piRNA の生合成機構における必須因子であることは示されていたが、その機能は不明であった。Zucchini は Phospholilase D family のメンバーであるため、リン酸脂質を分解する酵素であるという説と、バクテリア nuclease である Nuc に高い相同性をしめすため、nuclease としての機能をもつという二つの説があった。大腸菌で発現させた Zucchini を結晶化し、X 線構造解析を行ったところ、タンパク質表面に Nuc と同様に核酸に結合するための細い溝があることが判明した。この溝は、Nuc のそれに比べると狭いため、Nuc が一本鎖、二本鎖両方の核酸を切断するのに反し、Zucchini は一本鎖の核酸のみ切断することが示唆された。大腸菌で発現させた Zucchini を用いて生化学的な解析をすすめることによって、実際に Zucchini には一本鎖 RNA を切断する活性があることを示すまでに至った。環状 RNA も基質にすることから、endonuclease であると結論付けた。Phospholilase D family メンバーは全て HKD モチーフを活性中心としてもつ。HKD モチーフに点変異をいれた Zucchini 変異体は、endonuclease 活性を示さなかったことから、コンタミではないと考えられた。OSC 細胞で Zucchini をノックダウンすると、成熟型 piRNA の合成量が減り、piRNA 前駆体が蓄積する。また、トランスポゾンが脱抑制する。この細胞に野生型 Zucchini を発現されると、表現型は回復するが、HKD 変異体では回復しないため、Zucchini を第一次 piRNA 産生に必要な endonuclease であると結論付けた。Zucchini はミトコンドリアの表面に位置する。Yb body もミトコンドリア近傍に形成される。これら位置関係の生理学的意義は不明であったが、現在では、primary piRNA 生合成の効率を保つためであると考えられる。 (Nishimasu et al. 2012)。



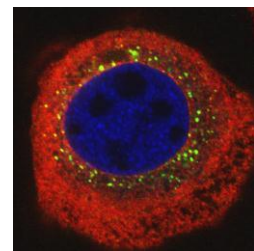
Functional analysis of Krimper in piRNA biogenesis in Drosophila. Krimper の piRNA 生合成機構における機能解析を進めた。Krimper はジメチル化 (sDMA) 修飾を受ける前の AGO3 に結合し、AGO3 の sDMA 修飾を促進する、ひいては piRNA 増幅機構を促進させる因子であることが判った。Aub が機能しない様な条件下、つまり Ping-Pong サイクルが動かず、secondary piRNA が作られない条件下では、AGO3 を krimper body に凝集させることによって AGO3 の

sDMA 修飾を抑える機能ももつことが判った。AGO3 機能の‘暴走’を抑える仕組みであると考えられる(論文リバイス中)。

Elucidation of primary piRNA biogenesis in OSC. 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、細胞質内の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 の近傍に観察される。*flam body* の形成には Yb が必須である事も判明した。現在、その詳細を解析している。Yb は、Yb body の形成にも必須な因子である。*flam* 変異体では *flam body* は観察出来なくなるが、Yb body は存在するため、*flam body* の形成は Yb body に依存するが、Yb body の形成には *flam body* は必要がないことが判明した。現在、*flam body* に局在するタンパク質因子の同定を試みている。

<カイク PIWI タンパク質に関する研究>

ショウジョウバエ OSC では生殖組織由来体細胞に特異的な primary piRNA の仕組みを分子レベルで追うことが可能であるが、生殖細胞特異的 primary piRNA および secondary piRNA を増幅する Ping-Pong サイクルの解析は不可能である。よってカイク生殖細胞株 BmN4 を用いて解析をすすめることにした。カイク生殖巣では2種類の PIWI タンパク質 (Siwi と BmAGO3) が発現する。ショウジョウバエ Piwi の相同体はない。Siwi と BmAGO3 に対するモノクローナル抗体を作製し、BmN4 より Siwi および BmAGO3 を免疫沈降によって得たところ、両者とも piRNA と結合していることが判った。塩基配列をくわしく解析したところ、SIWI にはトランスポゾンアンチセンス鎖由来の piRNA が、BmAGO3 にはセンス鎖由来の piRNA が結合しており、Ping-Pong サイクルの特徴もみられた。各々の PIWI に特異的に相互作用するタンパク質因子も得られたため、現在、その解析をすすめている。in vitro での amplification loop の再構築も平行して進めている。



§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 16件)

1. Nishida KM, Miyoshi K, Ogino A, Miyoshi T, Siomi H, Siomi MC. Roles of R2D2, a Cytoplasmic D2 Body Component, in the Endogenous siRNA Pathway in *Drosophila*. *Mol Cell*. 49: 680–691. 2013.
2. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC*, Nureki O*. Structure and function of Zucchini endonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491: 284-289. 2012 (* double corresponding)
3. Sato K, Nishida KM, Shibuya A, Siomi MC, Siomi H. Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes Dev*. 25: 2361-2373 2011
4. 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, Orlando V. Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature*. 480: 391-395 2011
5. Nagao A, Sato K, Nishida KM, Siomi H, Siomi MC. Gender-specific hierarchy in nuage localization of PIWI-interacting RNA factors in *Drosophila*. *Front. Gene*. 2:55 2011
6. Saito K, Ishizu H, Komai M, Kotani H, Kawamura Y, Nishida KM, Siomi H, Siomi MC. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*. 24: 2493-2498. 2010
7. Nagao A, Mitsuyama T, Huang H, Chen D, Siomi MC, Siomi H. Biogenesis pathways of piRNAs loaded onto AGO3 in the *Drosophila* testis. *RNA* 16: 2503-2515. 2010
8. Miyoshi T, Takeuchi A, Siomi H, Siomi MC. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 17: 1024-1026. 2010
9. Miyoshi K, Miyoshi T, Hartig J, Siomi H and Siomi MC. Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*. *RNA* 16: 506-515. 2010
10. Nishida KM, Okada TN, Kawamura T, Mituyama T, Kawamura Y, Inagaki S, Huang H, Chen D, Kodama T, Siomi H and Siomi MC. Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *EMBO J*. 28: 3820-3831. 2009
11. Saito K, Inagaki S, Mituyama T, Kawamura Y, Ono Y, Sakota E, Kotani H, Asai K, Siomi H and Siomi MC. A regulatory circuit for *piwi* by the large Maf gene *traffic jam* in *Drosophila*. *Nature* 461: 1296-1301. 2009
12. Miyoshi K, Okada TN, Siomi H and Siomi MC. Characterization of miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in *Drosophila* miRNA pathway. *RNA* 15: 1282-1291. 2009
13. Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC*, Siomi H*. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. *Nature* 453: 793-797. 2008 (*correspondences)
14. Azuma AM, Oguri H, Kin T, Qian ZR, Asai K, Siomi H Siomi MC. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 105: 7964-7969. 2008
15. Nishida KM, Saito K, Mori T, Kawamura Y, Okada TN, Inagaki S, Siomi H and Siomi MC. Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* 13:1911-1922. 2007
16. Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev*. 21: 1603-1608. 2007

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Miyoshi K, Ogino A, Siomi MC, Siomi H. Purification of dFMR1-Containing Complexes Using Tandem Affinity Purification. *Trinucleotide Repeat Protocols Methods in Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-62703-411-1_8. 2013
2. Ishizu H, Nagao A, Siomi H. Gatekeepers for Piwi—piRNA complexes to enter the nucleus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21: 484-490 2011
3. Siomi H, Siomi MC. Stress signaling etches heritable marks on chromatin. *Cell* 145: 1005-1007. 2011
4. Miyoshi K, Okada TN, Siomi H, Siomi MC. Biological analyzes of endogenous Argonaute complexes immunopurified with anti-Argonaute monoclonal antibodies. *Methods in Molecular Biology*. 725: 29-43. 2011
5. Siomi MC, Sato K, Pezic C, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 12: 246-258. 2011
6. Saito K, Siomi MC. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Dev. Cell* 19: 687-697. 2010
7. Saito K, Miyoshi K, Siomi MC, Siomi H. The key features of RNA silencing. *RNA Technologies and Their Applications* 1-28. 2010
8. Saito K, Miyoshi K, Siomi MC and Siomi H. The Key Features of RNA Silencing. *RNA Technologies and Their Applications, RNA Technologies*, DOI 10.1007/978-3-642-12168-51 2010
9. Siomi H and Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol. Cell.* 38: 323-332. 2010
10. Siomi MC, Mannen T and Siomi H. How does the Royal Family of Tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway? *Genes Dev.* 24: 636-646. 2010
11. Siomi MC, Miyoshi T, and Siomi H. piRNA-mediated silencing in *Drosophila* germlines. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21: 754-759. 2010
12. Siomi MC. piRNAs (PIWI-interacting RNA) *McGraw Hill 2010 Yearbook of Science & Technology* ISBN-13: 978-0071639286
13. Siomi MC. JOURNAL CLUB: A biologist praises a mouse model of autism inheritance. *Nature* 461: 451. 2009
14. Siomi H and Siomi MC. RISC hitches onto endosome trafficking. *Nat. Cell Biol.* 11: 1049-1051. 2009
15. Siomi MC. Short interfering RNA-mediated gene silencing; towards successful application in human patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 668-671. 2009
16. Siomi MC, Kuramochi-Miyagawa S. RNA silencing in germlines - exquisite collaboration of Argonaute proteins with small RNAs for germline survival. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 426-434. 2009
17. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 126-139. 2009
18. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code *Nature* 457: 396-404. 2009
19. Siomi MC, Nishida KM, Siomi H. How to define targets for small guide RNAs in RNA silencing: a biochemical approach. *Methods in Enzymology* 449: 345-355. RNA turnover in Eukaryotes: Analysis of Specialized and Quality Control RNA Decay Pathways. 2008
20. Siomi MC, Saito K, Siomi H. How selfish retrotransposons are silenced in *Drosophila* germline and somatic cells. *FEBS Lett.* 582: 2473-2478. 2008
21. Siomi H, Siomi MC. Interactions between transposable elements and Argonautes have (probably) been shaping the *Drosophila* genome throughout evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 181-187. 2008
22. Miyoshi K, Uejima H, Okada TN, Siomi H, Siomi MC. *In vitro* RNA Cleavage Assay for Argonaute-Family Proteins. *Methods in Molecular Biology* 442: 29-43. 2008

23. 石津大嗣、塩見美喜子、動く遺伝子からゲノムを守る小分子RNA (esiRNAおよび piRNA)の生合成と機能、実験のあゆみ 7月号「RNA医学・医療」、vol. 238(5)、p. 382-387. 2011
24. 長尾章弘、塩見美喜子、生殖細胞特異的RNAサイレンシングとレトロトランスポゾン抑制、Hormone Frontier in Gynecology 3月号、vol. 18(1)、p. 35-44. 2011三好啓太、塩見美喜子、第一章 RNA interference (RNAi)とmicro RNA (miRNA):概論RNA工学の基礎と応用、p. 30-40. 2010(「RNA工学の最前線 2005」の普及版の刊行)
25. 平野孝昌、塩見美喜子、ヒト細胞におけるmiRNA経路と代謝 生体の科学、vol. 61(4)、p. 302-307. 2010
26. 塩見美喜子、概論: 小分子RNAはどのように生命を操るのか? これまでの研究から明らかになったこと、実験医学 増刊「拡大・進展を続けるRNA研究の最先端」、塩見春彦、塩見美喜子ら/編、vol. 28(10)、p. 62-69. 2010
27. 三好啓太、塩見美喜子、第4章 遺伝子機能解析:RNAi WELCOME TO ゲノムワールド ゲノム創薬科学最前線、p. 163-183. 2009
28. 西田知訓、塩見美喜子、第5章 RNAバイオロジー:RNAによる遺伝子サイレンシング、分子生物学イラストレイテッド 改訂第3版、p. 152-158. 2009
29. 河村佳紀、塩見美喜子、第二章 核酸の機能性 :RNA 核酸医薬の最前線、p. 137-145. 2009
30. 齋藤都暁、塩見美喜子、small RNA群の機能 piRNAとendo-siRNA、細胞工学 2月号、vol.28(2)、p. 121-125. 2009
31. 萬年太郎、塩見美喜子、siRNAによる遺伝子発現抑制の基礎とそれに関する最新の知見、炎症と免疫 11月号、vol.16(6)、p. 2-11. 2008
32. Shao-Yao Ying, Donald C. Chang, Joseph D. Miller, Shi-Lung Lin(日本語訳:塩見美喜子)、遺伝子機能を調節するRNA遺伝子 microRNA実験プロトコール、p. 20 (原著)MICRORNA PROTOCOLS. 2008
33. Ranhui Duan, Peng Jin(日本語訳:塩見美喜子、石塚明)、脆弱X症候群原因タンパク質と相互作用するメッセンジャーRNAとmiRNAの同定、microRNA実験プロトコール、p. 247 (原著)MICRORNA PROTOCOLS. 2008
34. 石塚明、齋藤都暁、塩見美喜子、塩見春彦(日本語訳:塩見美喜子、石塚明)、ショウジョウバエS2細胞抽出液を用いたin vitro でのpre-miRNAプロセッシングアッセイ、microRNA実験プロトコール、p. 256 (原著)MICRORNA PROTOCOLS. 2008
35. Shi-Lung Lin, Donald C. Chang, Shao-Yao Ying(日本語訳:塩見美喜子)、遺伝子特異的なmicroRNAの単離と同定、microRNA実験プロトコール、p. 288 (原著)MICRORNA PROTOCOLS. 2008
36. Shi-Lung Lin, Shin-Ju E. Chang, Shao-Yao Ying (日本語訳:塩見美喜子)、イントロン性microRNAを発現する遺伝子導入動物モデル、microRNA実験プロトコール、p. 295 (原著)MICRORNA PROTOCOLS. 2008
37. 塩見美喜子、動物の内源性小分子RNA:piRNAを焦点として、RNA実験ノート 下 小分子RNAの解析からRNAiへの応用まで、p. 18-21. 2008
38. 三好啓太、ノーザンブロットによる小分子RNAの検出、RNA実験ノート 下 小分子RNAの解析からRNAiへの応用まで、p. 33-39. 2008
39. 塩見美喜子、岡田知子、ArgonauteファミリーメンバーのSlicer活性の解析、RNA実験ノート 下 小分子RNAの解析からRNAiへの応用まで、p. 84-91. 2008

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 39件、国際会議 26件)

1. 塩見美喜子(徳島大学)、「RNA silencing in *Drosophila* germlines」、23rd Ernst Klenk Symposium “Non-coding RNA”、ドイツ、平成19年10月2日
2. 塩見美喜子(徳島大学)、「RNA サイレンシング:分子とその機能」、WAKO ワークショップ「RNA ルネッサンス新しい生命理解と臨床への挑戦」、東京、平成19年11月16日
3. 塩見美喜子(徳島大学)、「Gene silencing mechanisms mediated by small RNAs and Argonautes in *Drosophila*」、JSBi 2007にてPlenary講演、東京、平成19年12月18日
4. 塩見美喜子(徳島大学)、「piRNA/rasiRNA: a novel class of functional non-coding RNAs」、International Symposium on Applied Genome 2007 (JSAG 2007)、東京、平成19年12月20日
5. 塩見美喜子(徳島大学)、「RNA サイレンシング機構と retrotransposon 発現抑制」、第4回慶應義塾先端科学技術シンポジウム「基礎・臨床一体医学の推進による学際的創薬研究の未来」、東京、平成20年2月6日
6. 塩見美喜子(徳島大学)、「RNA silencing occurring in *Drosophila* germline」、特定『生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク』キックオフ symposium、東京、平成20年3月4日
7. 塩見美喜子(徳島大学)、「ショウジョウバエレトロトランスポズンの RNA silencing 機構」、遺伝研研究会「集団ゲノミクスを考える:ゲノム非タンパク質コード領域の進化」、三島、平成20年3月12日
8. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「*Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells」、Seoul 大学招待セミナー、ソウル-韓国、平成20年5月7日
9. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「RNA silencing in *Drosophila*」、GCOE Program “Human Metabolomic Systems Biology” Summer School、東京、平成20年7月10日
10. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「*Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells」、20th International Congress of Genetics of the symposium「RNA machine」、ドイツ、平成20年7月15日
11. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「ショウジョウバエ生殖細胞におけるRNAサイレンシング」、12th Molecular Cardiovascular Conference、北海道、平成20年8月6日
12. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing」、Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、京都、平成20年9月10日
13. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「遺伝子発現を制御する内在性 small RNA の合成と作用機序」、第16回シンポジウム創薬薬理フォーラム、東京、平成20年9月19日
14. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「ヒト Argonaute の RNA silencing における機能解析」、東京大学先端科学技術研究センターセミナー、東京、平成20年10月3日
15. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing」、Academia SINICA にて招待セミナー、台北、平成20年10月23日
16. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing」、20th FAOBMB Taipei

- Conference Frontier in Life Sciences、台北、平成20年10月25日
17. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「RNA silencing in Drosophila germline cells」、東京大学分子生物学研究所セミナー、東京、平成20年11月6日
 18. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「How selfish retrotransposons are silenced in Drosophila germline and somatic cells」、九州大学 GCOE プログラム拠点(Stem Cells and Regenerative Medicine)、福岡、平成20年11月9日
 19. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Aub/AGO3-independent piRNA biogenesis in Drosophila germline cells」、BMB2008 Symposium、神戸、平成20年12月10日
 20. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Molecular mechanisms of RNA silencing in Drosophila」、Conferences Jacques Monod、フランス、平成21年4月6日
 21. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「RNA silencing in Drosophila germlines」、UT Southwestern Medical Center seminar、アメリカ、平成21年4月22日
 22. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA biogenesis systems in Drosophila germline cells」、Keystone Symposia、カナダ、平成21年4月28日
 23. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「microRNAs; biogenesis and functions」、岡山医療国際シンポジウム、岡山、平成21年5月17日
 24. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Molecular mechanisms of RNA silencing in Drosophila」、京都大学免疫ゲノム医学特別セミナー、京都、平成21年5月18日
 25. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「機能性 RNA はどのように生まれ、どの様に働くか？ーショウジョウバエの知見を基にー」、かずさ DNA 研究所セミナー、千葉、平成21年6月2日
 26. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Piwi-interacting RNA biogenesis pathways in Drosophila」、よこはま NMR 構造生物学研究会第37回ワークショップ、横浜、平成21年7月24日
 27. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA biogenesis pathways in Drosophila germline cells」、16th International Society of Developmental Biologists Congress、スコットランド、平成21年9月7日
 28. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「低分子 ncRNA はどのように現れ、どのように機能するか？ーショウジョウバエの知見を基にー」、神奈川科学技術アカデミー(KAST)機能性 RNA コース、神奈川、平成21年9月15日
 29. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「遺伝子発現は小さな RNA によってどのように制御されるのか？」、岐阜大学フェア2009、岐阜、平成21年10月31日
 30. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Specific requirement of Dicer2 and Loquacious-PD for endo-siRNA biogenesis in Drosophila」、第5回 OTS 年会-第19回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム、福岡、平成21年11月5日
 31. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「生体生命の仕組みを分子レベルで理解する意義と手法と必要因子」、宮崎大学院生のためのサイエンスキャリアセミナー、宮崎、平成21年12月3日
 32. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Tudor domain-containing proteins in the piRNA biogenesis pathways in Drosophila」、第39回日本分子生物学会年会、横浜、平成21年12月9日
 33. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNAs in the fly germ line」、Keystone Symposia 2010、Keystone、平成22年1月19日
 34. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNAs in Drosophila germlines」、Cincinnati Children's Hospital Research Foundation Seminar、Cincinnati、平成22年3月9日
 35. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Function of Tudor protein in the Drosophila

- piRNA pathway」、EMBL Symposium、ドイツ、平成 22 年 3 月 19 日
36. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Small RNAs in animals」、UCR Symposium、アメリカ、平成 22 年 3 月 28 日
 37. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA-mediated gene silencing mechanisms in Drosophila germlines」、Symposium “Control of Gene Expression and Cancer”、ロシア、平成 22 年 6 月 23 日
 38. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「小さい RNA による遺伝子発現の制御機構」、生物リズム若手の会 夏の学校、千葉、平成 22 年 8 月 7 日
 39. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Biogenesis and function of small RNAs functioning in RNA silencing」、第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、平成 22 年 9 月 23 日
 40. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA biogenesis in Drosophila germline」、2010 Exciting Biologies meeting, ‘Biology of Recognition’、シンガポール、平成 22 年 10 月 8 日
 41. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Primary piRNA biogenesis in Drosophila germline」、EMBL Symposium:Non-Coding Genome、ドイツ、平成 22 年 10 月 15 日
 42. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「低分子 ncRNA はどの様に現れ、どの様に機能するか?—ショウジョウバエの知見をもとに—」、KAST(神奈川科学技術アカデミー)教育講座 機能性 RNA コース、神奈川、平成 22 年 10 月 19 日
 43. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「小さな RNA が生命を操作する?—その仕組みと応用性—」、東京大学柏キャンパス(新領域創成科学研究科・物性研究所・数物連携宇宙研究機構)合同イベント「未来をのぞこう!」、千葉、平成 22 年 10 月 30 日
 44. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Primary piRNA biogenesis in Drosophila germline」、RNA Biology meeting、中国、平成 22 年 11 月 2 日
 45. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Small RNA-mediated gene silencing pathways in Drosophila」、The 16th International Conference of the International Society of Differentiation “From Stem Cells to Organisms” Anne McLaren Memorial Lecture、奈良、平成 22 年 11 月 15 日
 46. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「RNA silencing の分子機構」、奈良県立医科大学 特別講義、奈良、平成 22 年 11 月 16 日
 47. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA biogenesis in Drosophila germline」、4th International Symposium on Nanomedicine、岡崎、平成 22 年 11 月 30 日
 48. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「研究と家庭は両立するのか～女性研究者の視点から～」、徳島大学 AWA (OUR) サポートシステムキックオフシンポジウム 基調講演、徳島、平成 22 年 11 月 7 日
 49. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「「RNA の働きと必要性」 夢の創薬応用へ研究」、岐阜新聞・岐阜放送在京岐阜県人懇談会第 85 回例会、東京、平成 22 年 12 月 15 日
 50. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA biogenesis in Drosophila germline」、The 3rd International Symposium of NCRC “MicroRNAs in Neurodegenerative diseases”、韓国、平成 23 年 2 月 10 日
 51. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「RNA silencing 因子 small RNA の生合成とその制御」、第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会、広島、平成 23 年 5 月 13 日
 52. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Biogenesis of PIWI-interacting small RNA in insects」、the annual micro-symposium on small RNA biology、ドイツ、平成 23 年 5 月 16 日
 53. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「PIWI-interacting small RNA の生合成経路」、第

- 5 回日本エピジェネティクス研究会、熊本、平成 23 年 5 月 19 日
54. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「piRNA Biogenesis in Drosophila Germline」、RNA 2011 Kyoto、京都、平成 23 年 6 月 14 日
 55. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Biogenesis of small RNAs functioning in RNA silencing in Drosophila」、第 3 回日本 RNAi 研究会、広島、平成 23 年 8 月 27 日
 56. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「若い人たちへのメッセージ:研究者と母との両立は如何に」、RNA フロンティアミーティング 2011、愛知、平成 23 年 8 月 31 日
 57. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Biogenesis of PIWI-interacting small RNAs in Drosophila germline」、Cell Symposia -Regulatory RNAs-、アメリカ、平成 23 年 10 月 11 日
 58. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「小さなRNAによる生体内制御の仕組み」、愛知県立明和高校 SSH 記念講演、名古屋、平成 23 年 10 月 27 日
 59. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「PIWI-interacting RNA in Drosophila germline」、The CBG/CGC meeting、オランダ、平成 23 年 11 月 11 日
 60. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Biogenesis of piRNAs」、Keystone Symposia、カナダ、平成 24 年 2 月 8 日
 61. 塩見美喜子(慶應義塾大学)、「Biogenesis of PIWI-Interacting Small RNAs in Drosophila」、Keystone Symposia、アメリカ、平成 24 年 3 月 6 日(オーガナイザーも務める)
 62. 塩見美喜子(東京大学)、「piRNA biogenesis in Drosophila」、Conference “Small silencing RNA Biology and Mechanism”、フランス、平成 24 年 4 月 25 日
 63. 塩見美喜子(東京大学)、「Biogenesis of PIWI-interacting small RNAs in Drosophila」、The 22nd CDB Meeting RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II、神戸、平成 24 年 6 月 30 日
 64. 塩見美喜子(東京大学)、「A role of Zucchini in primary piRNA biogenesis in Drosophila」、CSHL meeting、アメリカ、平成 24 年 8 月 31 日(座長も務める)
 65. 塩見美喜子(東京大学)、「Biogenesis and function of PIWI-interacting RNA in Drosophila」、EMBO/ENBL Symposium、ドイツ、平成 24 年 10 月 10 日

② 口頭発表 (国内会議 8 件、国際会議 0 件)

1. 塩見美喜子(徳島大学)、日本がん学会年会 Symposium S18 “Cancer and functional small RNAs”、横浜、平成19年10月4日(座長も務める)
2. 塩見美喜子(徳島大学)、The 20th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology III(座長)、葉山、平成19年10月11日
3. 塩見美喜子(徳島大学)、BMB 2007 Symposium 1S15 “Small RNA による生命機能の多様化戦略”(座長)、横浜、平成19年12月11日
4. 塩見美喜子(徳島大学)、東工大にて公開セミナー、神奈川、平成20年1月18日
5. 萬年太郎(慶應義塾大学)、「カイコ生殖系培養細胞(BmN4)を用いた PIWI サブファミリータンパク質の機能解析」、第 11 回 RNA ミーティング、新潟、平成 21 年 7 月 28 日
6. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「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」、BMB2010、神戸、平成 22 年 12 月 8 日
7. 荻野あきよ(慶應義塾大学)、「内在性 siRISC 形成機構における Dicer-2 顆粒体の機能的役割」、RNA フロンティアミーティング 2011、愛知、平成 23 年 8 月 31 日

8. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of MTOC」、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 23 年 12 月 14 日

③ ポスター発表 (国内会議 13 件、国際会議 6 件)

1. 萬年太郎(慶應義塾大学)、「Biochemical characterization of the Piwi-subfamily proteins, BmAGO3 and SIWI, in a BmN4 germ cell line established from silkworm ovaries」、第 7 回幹細胞シンポジウム、東京、平成 21 年 5 月 16 日
2. 稲垣幸(慶應義塾大学)、「Piwi regulation by a large Maf transcription factor, traffic jam, in *Drosophila* ovarian somatic cells.」、第 7 回幹細胞シンポジウム、東京、平成 21 年 5 月 16 日
3. 稲垣幸(慶應義塾大学)、「Piwi regulation by a large Maf transcription factor, traffic jam, in *Drosophila* ovarian somatic cells.」、9th International Conference on *Drosophila* Heterochromatin、イタリア、平成 21 年 5 月 25 日
4. 萬年太郎(慶應義塾大学)、「Biochemical characterization of the Piwi-subfamily proteins involved in RNA silencing in a silkworm germ cell line BmN4」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21 年 12 月 10 日
5. 長尾章弘(徳島大学大学院)、「piRNA pathways in *Drosophila* testes」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21 年 12 月 10 日
6. 萬年太郎(慶應義塾大学)、「Biochemical characterization of the piRNA biogenesis in a silkworm germ cell line BmN4」、keystone Symposia 2009、アメリカ、平成 22 年 1 月 14 日
7. 長尾章弘(徳島大学)、「piRNA biogenesis and piRNA-mediated gene silencing in *Drosophila* testes」、keystone Symposia 2009、アメリカ、平成 22 年 1 月 14 日
8. 萬年太郎(慶應義塾大学)、「カイコ生殖系培養細胞を用いた RNA サイレンシングに
関与する PIWI サブファミリータンパク質の機能解析」、第 1 回 CREST シンポジウム、
東京、平成 22 年 6 月 1 日
9. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「A possible link between piRNA biogenesis and
microtubule organization in *Drosophila* ovaries」、第 1 回 CREST シンポジウム、東京、
平成 22 年 6 月 1 日
10. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「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」、第 12 回日本 RNA 学会年会、東京、平成 22 年 7 月 27 日
11. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「A possible link between piRNA biogenesis and
microtubule organization in *Drosophila* ovaries」、The 16th International Conference
of the International Society of Differentiation "From Stem Cells to Organisms"、奈良、
平成 22 年 11 月 15 日
12. 荻野あきよ(慶應義塾大学)、「内在性 siRNA 機構における Dicer-2 顆粒体の機能解
析」、BMB2010、神戸、平成 22 年 12 月 9 日
13. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「An essential role of a Tudor domain-containing protein,
Krimper, in piRNA biogenesis in *Drosophila* ovaries」、RNA 2011 Kyoto、京都、平成
23 年 6 月 16 日
14. 大谷仁志(慶應義塾大学)、「RNAi をベースとした遺伝子スクリーニングによる
piRNA 生合成因子の探索」、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 23 年 12
月 14 日
15. 小谷菜月(慶應義塾大学)、「PIWI-interacting RNA 産生機構の分子機序解明:S2
細胞を用いて」、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 23 年 12 月 14 日
16. 駒井太陽(慶應義塾大学)、「免疫電顕を基盤とした PIWI-interacting RNA 産生機構
の分子機序解明」、横浜、平成 23 年 12 月 14 日

17. 佐藤薫(慶應義塾大学)、「Functional analysis of the MAEL domain of Maelstrom in transposon silencing in *Drosophila* ovarian somatic cells」、Keystone Symposia、カナダ、平成 24 年 2 月 10 日
18. 荻野あきよ(慶應義塾大学)、「The role of the novel cytoplasmic D2-body in the esiRNA biogenesis pathway in *Drosophila*」、Keystone Symposia、カナダ、平成 24 年 2 月 10 日
19. 大谷仁志(慶應義塾大学)、「Biochemical characterization of the primary piRNA factor dGASZ in *Drosophila* ovarian somatic cells」、Keystone Symposia、カナダ、平成 24 年 2 月 10 日

(4)知財出願

- ①国内出願 (0 件)
- ②海外出願 (0 件)
- ④ その他の知的財産権
該当なし

(5)受賞・報道等

- ①受賞
2009 年 5 月 第 29 回猿橋賞受賞
- ②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)
2008年5月8日 遺伝情報破壊を抑制する内在性小分子RNAを初めて発見
—ショウジョウバエ内在性esiRNAの発見と解析—
2009年10月8日 転写因子 *traffic jam* 遺伝子が産生する2種類の機能分子による生殖幹細胞形成維持因子Piwiの機能制御機構の発見
2012年10月9日 ゲノムを変異から守る小さなRNAが作られる仕組みを解明
- ③その他
猿橋賞を受賞した 2009 年と翌 2010 年は様々なインタビューをうけた。
新聞、雑誌、大手中学受験指導塾、男女共同参画関係など。

§ 6 研究期間中の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H20.4.25	分子生物学セミナー	慶應義塾大学信濃町キャンパス	40 名	北舘祐 博士によるセミナー
H20.8.29	分子生物学セミナー	慶應義塾大学信濃町キャンパス	50 名	Dr. Dinshaw J. Patel によるセミナー

H20.9.26	分子生物学セミナー	慶應義塾大学信濃町キャンパス	40名	Dr. Shou-Wei Ding によるセミナー
H21.12.3	宮崎大学院生のためのサイエンスキャリアセミナー	宮崎大学	80名	「生体生命の仕組みを分子レベルで理解する意義と手法と必要因子」について講演
H22.10.30	(新領域創成科学研究科・物性研究所・数物連携宇宙研究機構) 合同イベント「未来をのぞこう！」	東京大学柏キャンパス	80名	「小さな RNA が生命を操作する？ーその仕組みと応用性ー」について講演
H22.11.7	徳島大学 AWA (OUR) サポートシステムキックオフシンポジウム 基調講演	徳島大学	60名	「研究と家庭は両立するのか～女性研究者の視点から～」について講演
H22.12.3	Tokyo RNA Club 4 th meeting	慶應義塾大学信濃町キャンパス	80名	Dr. Joan A. Steitz (Yale University) による講演
H23.6.20	分子生物学セミナー	慶應義塾大学信濃町キャンパス	40名	Dr. Ramesh Pillai によるセミナー
H23.10.27	愛知県立明和高校 SSH 記念講演	愛知県立明和高校	800名	「小さなRNAによる生体内制御の仕組み」について講演
H23.12.8	Tokyo RNA Club the 8th meeting	慶應義塾大学信濃町キャンパス	90名	Dr. David P Bartel, Dr. Valerio Orlando らによる講演
H23.12.12	Tokyo RNA Club the 9th meeting	慶應義塾大学信濃町キャンパス	60名	Dr. Markus Hafner, Dr. Chandrasekhar Kanduri, Dr. Marcel Dinger らによる講演
H24.9.30	東京大学女子中高生理系進路支援ー東大理学部で考える女子中高生の未来ー	東京大学本郷キャンパス	70名	「小さな RNA による遺伝子制御のしくみ」について講演