

「生命システムの動作原理と基盤技術」
平成 19 年度採択研究代表者

塩見 美喜子

慶應義塾大学医学部・特別研究准教授

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。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理解を目指している。今年度は、主に①miRNA 経路の詳細な解析、②OSC 細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析、③精巣で AGO3 に特異的に結合する小分子 RNA の解析、④カイコ細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析、に焦点を当て、研究をすすめた。①と②に関しては、現在、論文投稿中である。③に関しては、AGO3 に結合する小分子 RNA のライブラリーを作成中である。来年度前半には、小分子 RNA の同定が完了すると考える。精巣における piRNA 生合成経路の解明、および卵巣のそれとの相違が判明すると期待する。④に関しては、カイコ PIWI に特異的に結合する小分子 RNA 及びタンパク質因子の同定を進めている。ショウジョウバエの系ではこれまで見えてこなかった結合因子や、RNA サイレンシング経路の調節に関する新知見が得られるものと期待される。

2. 研究実施内容

<AGO1 に関する研究:概要の①に相当>

ショウジョウバエ AGO1 は microRNA (miRNA) と特異的に結合する。AGO1 は結合した 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動態に関する知見は乏しい。本年度は、以下の実験を行った。

- 1) 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。Dicer2 と GW182 に対する抗体を作製し、それらを利用する事によって生化学的解析をすすめた。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同様に 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 mutant 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。また、gel shift 解析により、miRLC と miRISC の可視化に成功した。

- GW182 抗体を用いて AGO1/miRNA/標的 mRNA/GW182 複合体を細胞より単離し、この複合体に含まれる mRNA の library を作製することによって、各 miRNA の標的遺伝子の同定をすすめた。S2 細胞を由来とする library の作製は成功したとおもわれたが(昨年度報告書参照)、クローンの塩基配列を決定したところ、ほとんどが rRNA などバックグラウンドタイプの配列であることが判明した。よって、現在、library の作製を再度試みている。

<AGO2 に関する研究>

昨年度 S2 細胞内で AGO2 に内在的に結合する esiRNA を同定した。論文発表は今年度初期に行った(Kawamura et al. Nature. 2008,原著論文①)。今年度はそれに引き続き、esiRNA の生合成機構の解析をすすめた。(現在のところ、特筆すべき成果は得られていない)。

<Piwi に関する研究:概要の②に相当>

最近、我々は OSC 細胞株を fGS/OSS 細胞株より確立した。fGS/OSS は、ショウジョウバエ卵巣より確立された細胞株で germ 細胞と soma 細胞の両者を含むが、OSC は soma 細胞のみを含む。卵巣の IF 結果から、PIWI タンパク質3種のうち Piwi のみが soma で発現する事が判っていたが、western 解析によって OSC でも Piwi のみの発現が確認された。我々は以前、piRNA は主に Aub と AGO3 からなる amplification loop 経路によって生合成されると発表したが、OSC の Piwi は卵巣の場合と同様に piRNA と結合する、つまり OSC では piRNA は Aub/AGO3 非依存的に生成されると判断した。OSC で発現する piRNA の解析をすすめたところ、traffic jam (tj) 遺伝子の mRNA の 3' UTR から発現する piRNA が多く存在する事が判った。OSC では TJ タンパク質も発現する。つまり tj 遺伝子は OSC ではタンパク質と piRNA の両者を発現しうる事が判明した。また、遺伝学的な解析から、Piwi に発現は TJ によって制御されている事も明らかになった。OSC における piRNA 生合成経路の解析は、現在すすめている。

<AGO3 および Aub に関する研究:概要の③に相当>

我々はこれまで卵巣で発現する AGO3 に結合する piRNA の解析を進める事によって、AGO3 には sense 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、卵巣において多くの piRNA は Aub と AGO3 からなる amplification loop 経路によって生合成されると発表した。しかし、これが精巣の piRNA 生合成にもあてはまるかどうかは未だ不明である。精巣 AGO3 に結合する piRNA の解析はこれまで行われていない。我々は、現在 Chinese Academy of Sciences の Dahua Chen 博士から供与していただいた AGO3 抗体を用いた免疫沈降によって精巣 AGO3 を単離精製し、AGO3 に結合する small RNA の同定、解析を進めている。同時に Aub に結合する small RNA の解析も再度、規模をより大きくして進めた。これらの塩基配列情報がそろえば、精巣における piRNA 生合成経路が明らかになると考える。これまでに、Aub に結合する small RNA の library の作製に成功し、そのクローンの塩基配列も決定した。現在、bioinformatics 解析を行っている。卵巣で発現する piRNA は amplification loop 経路と primary processing 経路と両経路でつくられると考えられている。精巣では amplification loop 経路が存在しない可能性もあり、得られる結果に期待される。

<カイクに関する研究:概要の④に相当>

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。他グループによってカイク piRNA は amplification loop 経路で生合成されると報告されているが、それに関する知見は未だ乏しい。我々は Siwi と BmAGO3 両者に対する抗体を作製し、カイク生殖細胞における piRNA の生合成経路を明らかにすることを試みている。ショウジョウバエが3種類の PIWI タンパク質を発現するのに対し、カイクは2種類しか発現しないため、piRNA 生合成経路がより単純であると解釈された。これまで、Siwi モノクローナル抗体の作製に成功している。カイク生殖細胞より Siwi を免疫沈降によって得たところ、small RNA の存在が確認されたのみならず、相互作用するタンパク質因子も得られた。現在、これらの同定を進めている。

3. 研究実施体制

(1) 「塩見」グループ

① 研究分担グループ長: 塩見 美喜子 (慶應義塾大学、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)

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. 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
2. 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
3. Siomi MC, Saito K, Siomi H. How selfish retrotransposons are silenced in *Drosophila* germline and somatic cells *FEBS Lett.* 582: 2473-2478 (2008)
4. Siomi MC, Nishida KM, Siomi H. How to defining RNAi targets. *Methods in Enzymology* vol. 449 RNA turnover in eukaryotes: Analysis of specialized and quality control RNA decay pathways, 345-355 (2008)
5. Siomi, H., Siomi, MC. On the road to reading the RNA interference code. *Nature* 457: 396-404 (2009)
6. Kim NV, Han J, Siomi M.C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 126-139 (2009)
7. Siomi MC, Kuramochi-Miyagawa S. RNA Silencing in germlines - exquisite collaboration of Argonautes with small RNAs for germline survival. *Current Opinion in Cell Biology* 21:1-9 (2009)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）