

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ncing 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ncing の包括的な理解を目指している。今年度は、主に①AGO1/GW182/PABP 複合体に含まれる miRNA と mRNA の解析、②OSC 細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析、③esiRNA 生合成経路の解析、④精巣内で AGO3 に特異的に結合する小分子 RNA の解析、⑤カイク細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析、⑥piRNA 生合成経路への Tudor の関与、⑦maelstrom に関する研究、に焦点を当て研究をすすめた。②、③、⑥は今年度、論文として発表した(各研究は続行している)。④に関しては、現在、論文執筆中である。精巣における piRNA 生合成経路は卵巣のそれとは複数の点において異なる事が判明してきており、興味深い。⑤に関しては、カイク生殖細胞抽出液を用いて、piRNA 生合成の assay 系の確立を試みている。この系を用いて piRNA 生合成に関する因子の全同定へとつなげる。

§ 2. 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)

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

<AGO1に関する研究:概要の①に相当>

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、塩基配列を決定した。前回はバックグラウンドが高かったが、今回IP条件などをさらに検討する事により質のよいライブラリーを作製するまでに至った。現在、miRNAおよびmRNA両者の塩基配列の解析を進めている。

<Piwiに関する研究:概要の②に相当>

我々はfGS/OSS細胞株よりOSC細胞株を確立した。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germ細胞とsoma細胞の両者を含むが、OSCはsoma細胞のみを含む。OSCは卵巣soma細胞と同様に、Aub、AGO3、Piwiのうち、Piwiしか発現しない。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)遺伝子のmRNAの3'UTRから発現するpiRNAを多く含む。OSCではTJタンパク質も発現するため、tjはOSCではタンパク質とpiRNAの両者を発現する遺伝子である事が判明した。また、Piwiの発現はTJによって正に制御されている事も明らかになった。これら一連の結果は論文として発表した(Saito et al. Nature 2009⁵⁾)。primary processing経路に必要な因子は未だ不明であるため、現在、OSCを用いて生化学的な解析をすすめている。現在までのところ、Armitage遺伝子がprimary processing経路に関わる因子の一候補として挙がっている。Armitageに対する抗体はすでに出来上がっているため、今後、Armitageに焦点を当てて解析をすすめる。

<AGO2に関する研究:概要の③に相当>

昨年度、我々はショウジョウバエesiRNA(endogenous siRNA)を同定した。これは内在性RNAiを引き起こすsmall RNAである。esiRNAはDicer2に依存したprocessing経路で生成し、AGO2に特異的に結合する。前駆体からのesiRNA生合成にはDicer2と共にmiRNA生合成因子であるLoqsが関わりとされていたが、その詳細は不明であった。今年度、esiRNA生合成経路に関する解析を進めることによって、esiRNA生合成経路にはDicer2とLoqs-PD isoformが、miRNA生合成経路にはDicer1とLoqs-PB isoformが機能する事を突き止めた。また、Dicer2とLoqs-PD複合体はR2D2(exo-siRNAを前駆体から切り出す反応において働くと考えられている因子)とも結合し3量体を形成する事、exo-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である事を証明した(Miyoshi et al. RNA in press²⁾)。

<AGO3に関する研究:概要の④に相当>

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 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、卵巣の piRNA の生合成に関するモデルを提唱した (amplification loop 経路)。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 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 Su(ste) などノン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見解が得られた。現在、論文を執筆中である。今後、トランスポゾン由来の piRNA とノントランスポゾン由来の piRNA がどの様に区別されて生合成されているか検討する予定である。

<カイコ PIWI に関する研究:概要の⑤に相当>

カイコ生殖巣では2種類の PIWI タンパク質 (Siwi と BmAGO3) が発現する。よって、Siwi と BmAGO3 の Slicer 活性を介した amplification loop 経路が成り立っていると考えられる。我々は Siwi と BmAGO3 両者に対する抗体を作製し、カイコ生殖細胞における piRNA の生合成経路の全貌を、生化学的解析を通して明らかにすることを試みている。これまで Siwi、BmAGO3 両者に対するモノクローナル抗体の作製に成功した。カイコ生殖細胞株より Siwi および BmAGO3 を免疫沈降によって得たところ、small RNA との結合が確認されたのみならず、各々に特異的に相互作用するタンパク質因子も得られた。Small RNA の塩基配列の解析結果から、amplification loop 経路で生合成されると思われる piRNA のペアの存在が確認された。この情報を基に amplification loop 経路の assay 系を立ち上げ、この経路に関わる因子を同定しようと試みている。また、相互作用因子の piRNA 生合成経路への寄与も調べつつある。後者には RNAi 法が有効な手段であると考えられるが、いまだカイコ生殖細胞株における RNAi 法は確立されていないため、その確立をすすめている。

<Aub に関する研究:概要の⑥に相当>

最近の研究から、PIWI タンパク質は sDMA (symmetrical dimethyl arginine) 修飾を受けている事、その修飾には PRMT5 メチルトランフェラーゼが関与する事が明らかになった。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。この研究内容はすでに論文として発表済みである (Nishida et al. EMBO J 2009⁴⁾)。

< Aub に関する研究: 概要の⑦に相当 >

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。Maelstrom に対する抗体を作成し、免疫沈降を行ったところ、Maelstrom 結合因子として複数のタンパク質が同定された。これらはすべて tubulin 形成や centrosome 形成あるいは機能に関わるものであった。Maelstrom 変異体では、tubulin 形成や centrosome 形成に異常がみられた。また、S2 細胞で Maelstrom を knockdown すると、細胞分裂の速度が遅くなるという結果も得られている。今後、piRNA 生合成との関連性を追及する予定である。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 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* 2010 16: 506-515. doi/10.1261/rna.1952110
2. 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*. 2009. 28: 3820-3831. doi:10.1038/emboj.2009.365;
3. 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*. 2009. 461: 1296-1301. doi:10.1038/nature08501
4. Miyoshi K, Okada TN, Siomi H and Siomi MC. Characterization of miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in *Drosophila* miRNA pathway. *RNA* 2009. 15: 1282-1291. doi/10.1261/rna.1541209