

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、以前、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している。平成22年度は主に、①siRNA の RISC loading に関する研究、②OSC 細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析、③精巣内で 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、⑤piRNA 生合成経路への Maelstrom の関与、に焦点を当て研究をすすめた。①、②、③に関しては、研究成果を論文にまとめて発表した。④に関しては、カイコ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。⑤に関しては、Maelstrom が centrosome 形成の regulator である事が判明したため、現在、論文執筆中である。最近あらたに、endo-siRNA の RISC 選別には R2D2 が深く関与する事が判明したため、さらに研究を進めている⑥。

§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)

§3. 研究実施内容

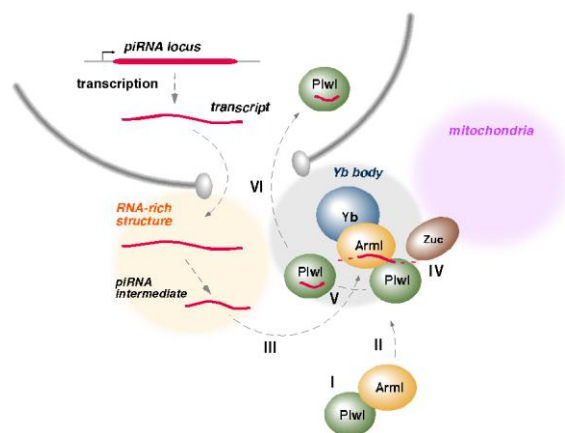
(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

①精巣内で AGO3 に特異的に結合する小分子 RNA の解析

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 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 Su(ste)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見解が得られた(原著論文発表 4-1 の論文 1 に相当)。

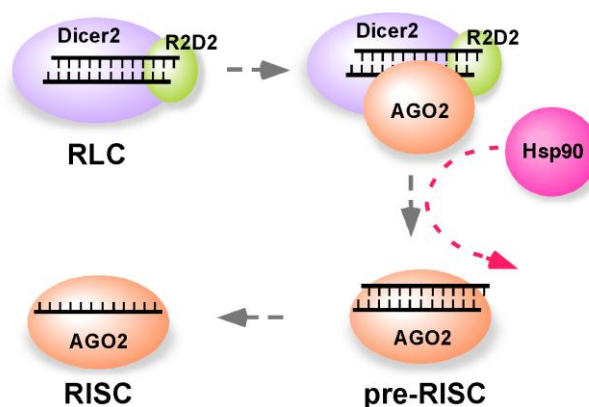
②OSC 細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析

我々は以前、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生殖細胞と体細胞の両者を含むが、OSC は卵巣由来体細胞のみを含む。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)活性が関与するが、OSC はこれら因子を発現しない。OSC の Piwi は piRNA と結合した状態にあるため、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 細胞において RNAi-screen を行う事によって、Armitage 遺伝子とその一つである事を突き止めた。Armitage 抗体を作成し、その解析をすすめたところ、Armitage は Yb body の構成因子である事、Armitage は Piwi を Yb body へ局在させる因子である事、Yb body は primary piRNA 生合成の場である事、Piwi は piRNA と結合しないと、核へ局在出来ないこと、そして Piwi は核において、transposon などのサイレンシングを遂行出来る事、などがわかった(右図)。現在、この経路の更なる解析を進めるとともに、piRNA 前駆体の同定を進めている(原著論文発表 4-1 の論文 2 に相当)。



③siRNA の RISC loading に関する研究

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、今年度、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 が必要である事を突き止めた。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 (下図) (原著論文発表 4-1 の論文 3 に相当)。



④カイコ細胞株を用いた piRNA 生合成経路の解析

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、カイコ生殖巣内では 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。特に BmAGO3 に結合する因子の一つに Tudor ドメインを持つものがあったが、これに焦点をあてて、更なる解析を進めている。また、現在なお、カイコ生殖細胞株の RNAi 効率は高くないため、その向上を目指している。

⑤piRNA 生合成経路への Maelstrom の関与

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。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。現在、論文執筆中である。

⑥endo-siRNA の RISC 選別

Dicer2 に対する抗体で S2 細胞を染色したところ、細胞質 foci に局在する事が判明した。Dicer2 の機能性パートナー因子である R2D2 との局在を調べたところ、両者は共局在した。相互関係を調べるために、Dicer2、および R2D2 を RNAi によってノックダウンした条件下において染色をおこなったところ、R2D2 が無い条件下では、Dicer2 は細胞質 foci に局在しなくなる事が判った。これは、Dicer2 の細胞質 foci への局在は R2D2 依存的に起こることを意味する。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。R2D2 をノックダウンした条件下で exo-siRNA と endo-siRNA の Argonaute への loading を確認したところ、exo-siRNA には変化が現れなかったが、endo-siRNA は AGO1 へ load される様になる事が判明した。通常は、endo-siRNA は、AGO2 に load される。R2D2 が、endo-siRNA の RISC を選択しているといえる。現在、Dicer2 の細胞質 foci への局在と、RISC 選別の相互関係を明らかにしようと試みている。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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 (doi:10.1261/rna.2270710)
2. Saito K, Ishizu H, Komai H, 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 (doi:10.1101/gad.1989510)
3. 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 (doi:10.1038/nsmb.1875)