

論文審査の結果の要旨

氏名 八代 龍

論文提出者は、ゲノムのアイデンティティーをおびやかすトランスポゾンの転移を抑制する機構についての研究を行った。ショウジョウバエなどの動物では小分子 RNA の一種 piRNA が生成され、トランスポゾンの転写レベルで抑制することが知られている。piRNA が合成されないような機能喪失を持つと、トランスポゾンが脱抑制され、ゲノム損傷が起こり、配偶子形成の不全、そして不妊などが引き起こされる。

23~30 塩基ほどの長さである piRNA は、Piwi とよばれるタンパク質と piRISC と呼ばれるリボ核タンパク質構造体を構成する。本研究開始前に、Piwi タンパク質は、細胞質で合成された piRNA と会合したのちに、核内へと移行することが明らかにされていた。論文提出者はショウジョウバエの卵巣由来体細胞株 OSC を用いて、Piwi タンパク質を核内へと移行させるタンパク質を特定すること、Piwi タンパク質が piRNA と結合することで核内に移行する分子基盤に興味を持ち、研究を展開した。

論文提出者はまず輸送される Piwi タンパク質の N 末側の 72 アミノ酸配列部分が塩基性アミノ酸に富み、核局在化シグナル配列(NLS)であると予想した。この 72 アミノ酸を欠失した Piwi 変異体は piRNA と結合はできるが、核に局在しないことが示されていた。このことは核内輸送タンパク質として知られるインポーチン (Imp) α が関与することを強く示唆した。さらにショウジョウバエは Imp α として 3 つの Imp α 1, Imp α 2, Imp α 3 の遺伝子を持つことから、Imp α のいずれかが関わる可能性を考察した。まずどのインポーチンが Piwi タンパク質の核内輸送と関わるかを検討するために各種 Imp α について特異的モノクローナル抗体の作成を行った。結果それぞれの Imp α に特異的なモノクローナル抗体を得ることができ、以後の解析を行う上で重要なツールを得ることに成功した。OSC 内の Imp α 発現量を調べると、Imp α 1 の発現量は非常に少なく、Imp α 2 の発現量が一番高く、Imp α 3 の発現は中程度であった。RNAi 実験でそれぞれの Imp α の発現をノックダウンした状況を作ると、Piwi タンパク質の核輸送の阻害が Imp α 2、Imp α 3 の発現抑制の際に観察された。Imp α 1 の発現抑制の際には輸送阻害を受けなかったが、Imp α 2、Imp α 3 を抑制した細胞で Imp α 1 を過剰発現すると Piwi は核輸送された。このことから Piwi タンパク質は自身の NLS 依存的にいずれかの Imp α の働きによって核内に輸送されることが示唆された。

以前の研究からも、Piwi タンパク質は NLS を持っていますが、piRNA と結合しないと核内に輸送されないことが明らかとなっていた。このことは piRNA が結合していない時には、Piwi タンパク質の NLS は構造上隠されているために Imp α と結合できないために輸送されない可能性を示唆した。piRNA と結合すると NLS が露出し Imp α と結合できて核輸送されるというモデルを可能性として考えた。検証するためにキモトリプシンによる限定分

解処理を施して、Piwi タンパク質の構造変化を確認する実験を行った。piRNA を結合していない Piwi タンパク質はキモトリプシンによる分解の感受性を示したのに対して、piRNA を結合すると分解に対して抵抗性を示した。このことから piRNA の結合の有無によって Piwi タンパク質の構造変化が起こることが示された。さらに NLS をさらに付加した Piwi 変異体を作成したところ、piRNA が存在しない時でも非依存的に核移行することが確認された。Piwi タンパク質の NLS を SV40 ウイルス由来の NLS に置き換えた Piwi タンパク質は Imp α 非依存的に核輸送された事実も見出した。以上から、piRNA が Piwi タンパク質に取り込まれると構造変化を起こし、N 末端がタンパク質外部に露出し、Imp α によって認識されて、核内へと輸送されるモデルが強く支持された。以上のように、論文提出者の研究によって、piRNA によるトランスポゾンの転移抑制の分子基盤に関して重要な事実が説明できるようになった。

なお、以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。