

# 論文の内容の要旨

## CRISPR-mediated establishment and analyses of novel *Drosophila* cell lines for investigation of the piRNA pathway

### (piRNA 機構の解明を目指したゲノム編集による新規細胞株の樹立とその解析)

氏名 住吉哲太郎

#### ○背景・目的

PIWI-interacting RNA (piRNA) は、主に生殖組織特異的な小分子 RNA である。piRNA は PIWI タンパク質と複合体を形成し、トランスポゾンの発現を抑制することによって、生殖細胞ゲノムをトランスポゾンによる DNA 損傷から保護する。生殖細胞の保護に重要な piRNA は、有性生殖を行う多くの生物で保存されている。piRNA の欠損は、生殖組織の発生・分化を阻害し、その個体は不妊となる。近年は、piRNA が幹細胞やがん細胞などの体細胞においてもごく微量ながら発現することが明らかとなった。piRNA は、体細胞においても、トランスポゾンの抑制などによって、細胞の状態の維持に働くと考えられている。

piRNA の生合成の分子メカニズムは十分な理解が進んでいない。その一因として、piRNA が多量に発現する生殖系列由来の培養細胞株は極めて少なく、生化学的解析が困難であることが挙げられる。ping-pong 機構は哺乳類から無脊椎動物まで生物間に広く保存されている重要な piRNA 生合成機構の一つである。しかし、ping-pong 機構を有し、容易な生化学的解析が可能な細胞株は存在しないため、ping-pong 機構の分子メカニズム解明は進んでいなかった。ping-pong 経路に必須の RNA ヘリカーゼタンパク質である Vasa は、ping-pong 経路の場である核膜近傍に局在する細胞質顆粒、nuage の形成において中核を担い、Vasa を足場にして他の ping-pong 関連因子が集積すると示唆されている。nuage 形成に関連して、マウスの Vasa ホモログを用いた先行研究より、N 末に存在する disorder 領域が相分離を起こし、顆粒を形成すると報告がある。さらに、Vasa は ping-pong 機構に使用する RNA を nuage で受け取る役割があり、受け渡しを契機に nuage を形成すると示唆する報告もある。また、Vasa が標的 RNA をどのように認識し、乖離するか、その詳細な分子機構も不明である。

本研究では、ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞株、OSC の遺伝子編集により ping-pong 経路の機能する細胞株を樹立した。また、その細胞株を用いて、nuage 形成及び、ping-pong 経路における Vasa の生化学的な機能解析を行った。

#### ○方法・結果・考察

##### 1) Δmbt-OSC の樹立

ping-pong 機構を有するショウジョウバエ由来細胞株の樹立にあたり、先行研究

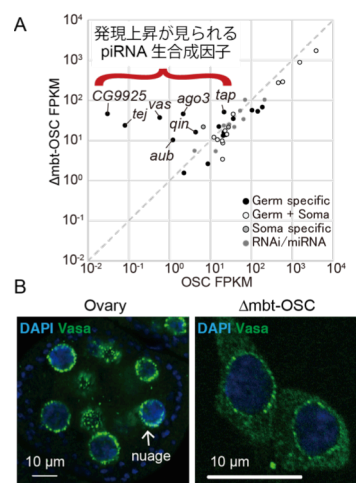


図 1 *l(3)mbt* の欠失は体細胞 OSC に生殖細胞様の性質をもたらす (A) Δmbt-OSC における、トランスクリプトーム解析。 (B) 生殖細胞 (Ovary) と Δmbt-OSC の Vasa 免疫染色。緑色が Vasa であり、核周辺の緑色の顆粒が nuage である (白矢印)。

で報告された *I(3)mbt* 遺伝子に着目した。*I(3)mbt* は転写抑制因子であり、その変異体は脳腫瘍を誘発する。*I(3)mbt* 変異体の脳腫瘍で発現上昇する遺伝子の解析から、複数の生殖細胞特異的遺伝子が異所的に発現すること、またそれらには ping-pong 機構の主要因子が多く含まれることが示された。よって体細胞株の *I(3)mbt* を欠失させれば、ping-pong 機構に関与する因子が発現し、体細胞株が ping-pong 機構を獲得するのではないかと着想した。そこで CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用いて、ショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞株 OSC の *I(3)mbt* を恒常的に欠失した株の確立を試みた。OSC を用いたゲノム編集は前例がなかったため、OSC に適した条件の検討を行った。その結果 50 株から 2 株程度、新規細胞株  $\Delta mbt$ -OSC を樹立することに成功した。 $\Delta mbt$ -OSC を用いたトランスクリプトーム解析等の結果より、 $\Delta mbt$ -OSC では Aub や AGO3、Vasa などの ping-pong 機構に必要な因子が発現が見られた (図 1A)。 $\Delta mbt$ -OSC は ping-pong 機構が生じる場である nuage を有した (図 1B)。さらに、piRNA のシーケンス解析を行うと、 $\Delta mbt$ -OSC の piRNA には、ping-pong 機構特異的な特徴がみられた。また、ping-pong 機構に必須の因子を発現抑制したところ、ping-pong 機構に依存する piRNA が失われた。これらの結果から、私は  $\Delta mbt$ -OSC が ping-pong 機構を獲得したことを示した。私が樹立した  $\Delta mbt$ -OSC は ping-pong 機構を有する唯一のショウジョウバエ由来細胞株である。

## 2) Vasa の分子動態の解明

樹立した  $\Delta mbt$ -OSC では、nuage の形成が確認された。そこで、nuage が形成される機構を解析した。Vasa は ping-pong 機構に必要なヘリカーゼタンパク質であり、ping-pong 機構の場である nuage 形成においても必須の因子である。そこで、Vasa の nuage 形成に必要な条件の解析を行った。まず OSC やショウジョウバエ体細胞由来の細胞株である S2 細胞に Vasa を強制発現させた。すると S2 細胞では nuage が形成されなかったが、OSC には nuage 様の顆粒が観察された。 $\Delta mbt$ -OSC においても、強制発現した Vasa は nuage を形成するが、安定した nuage の観察が困難であった。そこで強制発現を行う系では、S2 細胞と OSC を用いることにした。Vasa は N 末端側に disorder 領域をもち、C 末側にヘリカーゼ活性をもつ部分が存在する。Vasa のヒトホモログである DDX4 は、N 末端側の領域が顆粒形成において重要であるという先行研究がある。Vasa の nuage 形成に必要な部分を検証するために、Vasa を disorder 領域と helicase 領域の二つに分割した欠損変異体を作製した。2 つの Vasa を強制発現させたところ、意外にも helicase 領域のみが nuage 様の顆粒を形成した (図 2A)。先行研究と異なる結果が得られたが、この結果は Vasa においては、ヘリカーゼ活性に関する部分が nuage 様顆粒の形成に重要であることを示唆した。Vasa は、RNA と結合し、ATP を加水分解して、二本鎖になった RNA を乖離させる。そこで、Vasa の点変異体 RNA 結合変異体 (R528A) を作成し、nuage 形成を観察した。その結果、R528A 変異体において nuage 様の顆粒が見られなかった (図 2A)。この結果は、Vasa が nuage を形成するには、Vasa の RNA 結合能が必要であると示唆する。しかし、顆粒を形成する OSC 細胞と顆粒を形成しない S2 細胞において、UV クロスリンクを用いた Vasa の RNA 結合アッセイを行ったところ、いずれの細胞株においても、RNA 結合シグナルが観察された (図 2B)。Vasa が nuage 様の顆粒を形成するには、RNA に結合するだけではなく、他の要素も必要であると考えられる。 $\Delta mbt$ -OSC において RNA 存在、非存在下で Vasa 結合タンパク質を比較したところ、いくつか結合量が異なるタンパク質がみられた。CG7194 は、MS 解析によって RNA 非存在下で、Vasa との結合が著しく低下する因子である。しかし、CG7194 の発現減少は Vasa の局在に影響を与えなかった。したがって、CG7194 とは異なる未知因子が要求されることが考えられる。

Vasa 結合 RNA は、UV クロスリンクによって取得することが可能である。そこで、 $\Delta mbt$ -OSC を用いて、iCLIP 法による Vasa 結合 RNA の同定を試みた。iCLIP 法は結合する RNA の配列だけでなく、タンパク質の RNA 結合位置を明らかにすることが可能な方法である。次世代シーケンサーを用いた解析の結果、iCLIP 法で得られた Vasa 結合位置と PIWI タンパク質に結合する piRNA の 5'末端の位置は、定まった距離にあることが判明した。この結

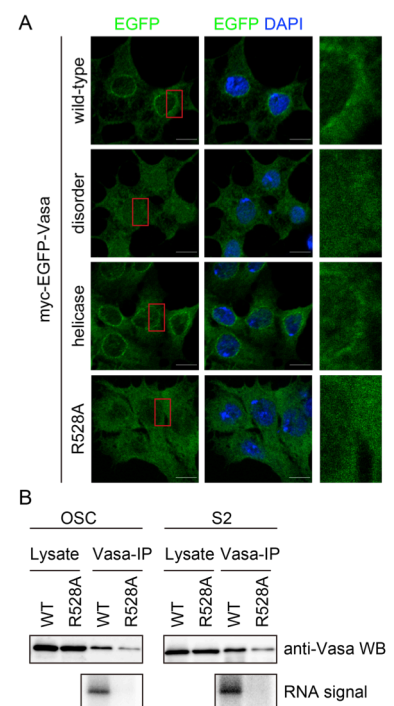


図 2 Vasa の nuage 形成アッセイ (A) Vasa 変異体の局在。右端の図は、左端の赤枠拡大図を示す。disorder が disorder 領域を、helicase が helicase 領域を、R528A が R528A 変異体を示す。(B) RNA 結合アッセイ。2 段目の RNA signal が RI ラベルされた RNA シグナルを示す。

果は、Vasa が piRNA と PIWI タンパク質の複合体から標的 RNA を乖離するときには決まった位置で行う可能性を示した。

### 3) ゲノム編集による Zuc 検出可能細胞株の樹立

Zucchini(Zuc)は、piRNA 生合成に必須のエンドヌクレアーゼである。Zuc は N 末領域のトランスメンブレン領域によりミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア上で piRNA 前駆体を切断することで piRNA の成熟に寄与する。近年、Zuc の結晶構造解析など様々な研究が進められてきたが、これまで Zuc に対する良質なモノクローナル抗体が作製できず、強制発現を用いた系により解析が進められてきた。そのため、未だ Zuc が piRNA 成熟化に関わる詳細な分子メカニズムの解明には至っていない。そこで、 $\Delta mbt$ -OSC 樹立時の条件を活用し、ゲノム上の Zuc 領域に、アフィニティータグとして頻繁に用いられる FLAG タグ配列を挿入することで、既存の抗体による内在 Zuc の検出を目指すという着想に至った。FLAG タグ配列の挿入にあたり、ゲノムの欠損を誘導する際に働く Ku70 を発現抑制し、Cas9 の導入時に相同配列をもつ FLAG タグ配列を導入した。その結果、Zuc 遺伝子へ FLAG タグ配列の挿入した細胞株、Zuc-FLAG OSC の樹立に成功した。Zuc-FLAG OSC では、FLAG 抗体を用いた内在 Zuc の検出が可能である (図 3)。Zuc に FLAG 配列が挿入されたことに起因する未成熟 piRNA の増加や、ターゲット遺伝子の脱抑制は見られなかった。強制発現を用いた系では、発現量の調整が難しく免疫染色による局在の確認が困難であったが、Zuc-FLAG OSC を用いた FLAG 抗体による免疫染色により局在の観察がより容易になった。今後、Zuc-FLAG OSC を用いた Zuc の piRNA 生合成における詳細な作用機序の解析が期待できる。

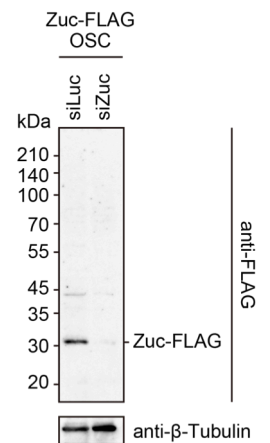


図 3 Zuc-FLAG OSC を用いたウェスタンブロットリング。siZuc による Zuc のノックダウンにより anti-FLAG 抗体で検出されるシグナルが消失することから見られるバンドが内在 Zuc に起因するものとわかる。