

論文の内容の要旨

Elucidation of a novel mechanism
underlying piRNA-mediated transcriptional transposon silencing
(piRNA によるトランスポゾン転写の新規抑制機構の解明)

氏名 大西 遼

研究背景

生殖細胞で特異的に発現する、20~30 塩基からなる小さな RNA (小分子 RNA) の一種である PIWI-interacting RNA(piRNA)は、Argonaute family に属する PIWI subfamily タンパク質と複合体 (piRISC) を形成し、相補的なトランスポゾン mRNA に作用することで、トランスポゾンの発現を抑制する。ゲノム上の位置を自由に転移するトランスポゾンは、宿主ゲノムの不安定化を引き起こすため、多くの生物で、piRNA による抑制機構が保存されている。piRNA を欠損した個体では、トランスポゾンによって生殖細胞のゲノム DNA が破壊されるため、その個体は不妊になる。

キイロショウジョウバエの卵巣でも、piRNA によるトランスポゾン抑制機構が働いており、Piwi、Aub、Ago3 という 3 つの PIWI タンパク質と piRISC を形成することで機能する。このうち Aub-piRISC、Ago3-piRISC は細胞質でトランスポゾン mRNA の切断に働くのに対し、Piwi-piRISC は核内へ移行することでトランスポゾンを転写レベルで抑制すると考えられている。

これまで、小分子 RNA による転写抑制機構としては、分裂酵母の siRNA が標的の新生 RNA を認識することで、ヒストンメチル化酵素を誘導し、ヘテロクロマチン形成を促進する機構が知られている。この知見と同様に、近年、レポーター遺伝子を用いたアッセイ系により、Piwi-piRISC もまた、抑制型ヒストンマークである H3K9me3 を誘導することでその転写を抑制することが示唆された。しかし、Piwi-piRISC 依存的なトランスポゾンの

転写抑制機構を持つ細胞株 Ovarian Somatic Cell (OSC)を用いた解析から、内在の抑制経路において、レポーター系における最下流の必須因子である H3K9me3 特異的なヒストン修飾酵素 Eggless (Egg)を発現抑制 (KD)しても、Piwi KD で見られるほどの大幅なトランスポゾン発現上昇は見られない。さらに Maelstrom (Mael)という因子は、KDすると、Piwi KD と非常に似たトランスポゾン発現パターンを示すにもかかわらず、H3K9me3 の修飾レベルにほとんど影響を与えないことがわかっている。これらのことから、内在の Piwi 依存的なトランスポゾン転写抑制機構において、H3K9me3 誘導は一つの側面に過ぎず、実際には Mael を介した他の転写抑制機構と協調して、トランスポゾンの転写を厳重に抑制しているのではないかと考えた (図1)。

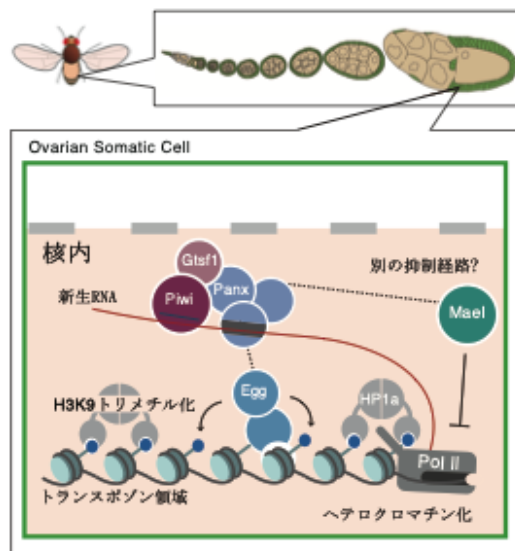


図1. 本研究における作業仮説

結果・考察

そこで、OSC を用いて Piwi の相互作用因子を同定することで Piwi-piRISC を介したトランスポゾン転写抑制機構の実体を明らかにしようと考え、細胞分画法と Piwi のモノクローナル抗体を用いて核内 Piwi 複合体の単離を行った。その結果、既知の相互作用因子である Panoramix(Panx)や Gtsf1、Histone H1 のみならず、Mael も含む核内 Piwi 複合体の単離に成功した。核内 Mael 複合体も同様に単離し、LC-MS/MS による両複合体の構成因子の網羅的な同定を行った。さらに、各複合体の共通因子について、Gene Ontology に基づくクラスタリング解析を行うことでクロマチン制御と転写に関与するクラスターに属する候補因子を特定した。それらの因子を、RNAi を用いた KD 解析を行ったところ、トランスポゾン の活性化に寄与する Brahma (Brm)を同定した。

Brm は、生物種間で保存される転写活性型クロマチンリモデリング複合体である、SWI/SNF 複合体のコアとなる構成因子として知られている。RNA-seq のデータをもとに、piRNA の有無と、Brm の KD による影響によって、トランスポゾンを分類したところ、Piwi-KD でトランスポゾンの脱抑制を示すのは Brm によって活性化を受けるトランスポゾンであることが明らかになった (図2A)。さらに、SWI/SNF 複合体構成因子について ChIP 解析を行ったところ、Piwi が主に標的とする LTR 型レトロトランスポゾンの LTR 領域へ

のこれらの因子の結合が、Piwi KD で上昇することも明らかにした。LTR 型レトロトランスポゾンには自身のプロモーターを持つと考えられており、Piwi はプロモーターへの SWI/SNF 複合体の結合を抑制する

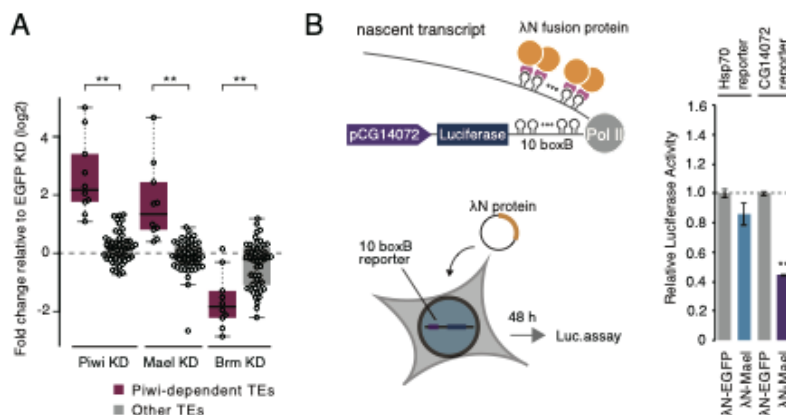


図2. PiwiはMaelを介してBrm依存的なTEを抑制する

ことで転写を制御することが示唆された。

また、任意の遺伝子を標的とする piRNA を発現させることで、抑制を誘導する人工 piRNA システムを用いて、Brm 依存的な遺伝子と Brm 非依存的な遺伝子の人工 piRNA を発現させた結果、Brm 非依存的な遺伝子では抑制が見られないが、Brm 依存的な遺伝子では効率的な転写抑制を示し、Egg KD でもこの抑制は解除されないことが明らかになった。さらに、λ N-boxB システムを用いた、新生 RNA 鎖へのタンパク質誘導実験で、Mael の誘導により Brm 依存的なプロモーターによる転写が抑制されることも示された (図 2 B)。

これらの結果から Piwi は、Mael を介して LTR への SWI/SNF 複合体の結合を抑制することにより、H3K9me3 に依存せず、トランスポゾンの転写を抑制することが示された(図 3)。他の後生動物においても piRNA 核内転写抑制は機能していることが明らかになっているが、同様の抑制機構の発見は、私の知りうる限り本研究が初であり、後生動物における同様の抑制機構の分子基盤となると考えられる。

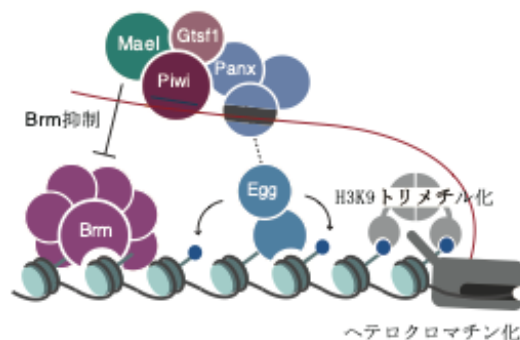


図3. 本研究で提唱するモデル