

論文審査の結果の要旨

氏名 大西 遼

本論文は10章の項目からなる。第1章には、本論文の要旨が英文及び和文で記載されている。第2章は本論文で登場する略語集である。第3章は piRNA と Piwi による核内トランスポゾン転写抑制機構に関する序論となっている。第4章には本研究の狙い、第5章には実験材料と実験手法が記載されている。また、第6章には実験の結果が、第7章には考察が述べられている。第8章には本論文の結論がまとめられている。第9章には参考文献が、第10章には謝辞がそれぞれ記載されている。

生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA である piRNA は、ゲノムの不安定化を引き起こすトランスポゾンを抑制することで、ゲノムの完全性に寄与する。ショウジョウバエの piRNA は Piwi というタンパク質と複合体を形成し、核内でトランスポゾンの転写を抑制する。この抑制機構はこれまで H3K9me3 の誘導を介したヘテロクロマチン形成によって引き起こされると考えられてきた。しかし、機能未知の Maelstrom(Mael) という因子の発現を RNAi により抑制(KD)すると、H3K9me3 の修飾にはほとんど影響を与えずに、トランスポゾンの転写抑制が解除される。このことから、Mael が H3K9me3 の誘導を介さずに転写を抑制する可能性が示唆されてきた。しかし、Mael の機能は未だに明らかになっていない。本研究では、生殖細胞特異性細胞株である OSC を用いて、Piwi による核内転写抑制機構における Mael の役割を明らかにするとともに、新たな抑制モデルの提示を目的としており、以下の結果を得ている。

1. Mael の役割の手がかりを得るため、OSC から Piwi、Mael の複合体を単離し、質量解析を行った。その相互作用因子から、Piwi が標的とするトランスポゾン(Piwi 依存性トランスポゾン)の一つである *mdg1* の転写活性化に寄与する、SWI/SNF 転写活性化複合体の中心因子である Brm という因子を同定した。
2. Piwi を介したトランスポゾン抑制における Brm のゲノムワイドな寄与を明らかにするため、Brm KD OSC の RNA-seq を行ったところ、Piwi 依存性トランスポゾンのほぼ全てが、Brm によって制御されていることが示された。さらに Piwi KD OSC を用いた Brm ChIP-seq を行ったところ、Piwi KD 時にこれらのトランスポゾンの LTR への Brm の結合が上昇することが示された。
3. Piwi による抑制機構の Brm 依存性転写に対する選択性を明らかにするため、人工 piRNA システムを用いて Brm 依存的な遺伝子、非依存的な遺伝子に対する piRNA を発現させた。人工的 piRNA システムとは、生合成の起点となる配列と目的の遺伝子のアンチセンス配列を組み込んだプラスミドを発現させることで、任意の遺伝子に対する piRNA を生合成させる手法である。その結果、Brm 非依存的な遺伝子の緩慢な抑制傾向に対して、Brm 依存的な遺伝子は H3K9me3 の蓄積を伴わない急速な転写抑制が

観察された。

4. Brm 依存的な転写抑制における Mael の寄与を明らかにするために、テザリング実験により Mael の Brm 依存性転写抑制能を検証した。テザリング実験とは、レポーターの UTR に新生 RNA がステム構造を形成する boxB 配列を挿入し、ステムと結合する lambdaN ペプチドを融合したタンパク質を発現させることで、そのタンパク質の新生 RNA 上でのレポーター抑制能を検証する方法である。その結果、Mael は Brm 依存性プロモーターを有するレポーターの転写を抑制する機能を持つことが示された。

本論文では、1~4 の結果から、Piwi は Mael を介して、Brm 依存的に転写活性化する LTR 型のレトロトランスポゾンの転写を選択的に抑制しており、その後に H3K9me3 を誘導することでヘテロクロマチン形成を引き起こすというモデルを提唱している。本研究の成果は、従来の piRNA による核内転写抑制に関する研究に対して新たな見地を提供するものであり、非常に重要性の高いものであると考えられる。

なお、本論文は、佐藤 薫、村野 健作、根岸 瑠美、塩見 春彦、塩見 美喜子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、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）の学位を授与できると認める。