

## 論文の内容の要旨

論文題目 生殖巣ゲノムを保護する RNA サイレncing 因子の構造機能解析  
(Structural and functional analyses of RNA silencing factors involved in genome  
defense in animal gonads)

氏 名 松本 直樹

遺伝子発現は生体内で複雑に制御されており，制御システムの異常・破綻は生体に悪影響を及ぼす．ゲノムにコードされた 20–30 塩基程度の小分子 RNA がパートナータンパク質 Argonaute と協調して配列依存的に標的 RNA の発現を制御する機構は RNA サイレncing とよばれる．Argonaute と小分子 RNA は RISC (RNA-induced silencing complex) とよばれる複合体を形成し，RISC は配列依存的に標的 RNA の切断・標的 RNA の不安定化・ヘテロクロマチン化などを誘導することで標的 RNA の転写抑制あるいは転写後抑制を司る．高等真核生物の生殖巣においてトランスポゾン転移によるゲノム損傷からゲノムを保護するために生殖巣特異的な RNA サイレncing 経路がはたらく．Argonaute タンパク質の PIWI サブファミリータンパク質と 23–30 塩基長の piRNA (PIWI-interacting RNA) がこのシステムの中核をなす．近年，遺伝学および細胞生物学的手法により複数の因子が piRNA 経路を介したトランスポゾン抑制に関与する因子として同定されてきたが，未だに個々の因子の生理機能解明には至っていない．本研究では以下に示す 2 つの piRNA 経路因子に着目し，X 線結晶構造解析および機能解析を通じて，それらがいかに piRNA を介したトランスポゾン抑制に関与するか，その分子基盤を明らかにすることを試みた．

### Maelstrom の構造機能解析

Maelstrom (Mael) は元々 *mael* 欠損変異ショウジョウバエの卵形成初期において細胞極性・軸形成が異常を示しその個体は不妊となることから同定されたタンパク質である．その後，ショウジョウバエやマウスなどにおいて piRNA を介したトランスポゾン抑制に関与

することが明らかになった。Mael は進化的に保存されたタンパク質であり、N 末端に核酸結合モジュールの HMG ドメインと中央の MAEL ドメインからなる。マウス由来 Mael の HMG ドメインに関して、最近になって二次構造をとる RNA に結合することが生化学的解析により示された。一方、MAEL ドメインについてはバイオインフォマティクス解析により特定のヌクレアーゼに共通してみられる RNase H 様フォールドをとると予想されていたものの、その立体構造は依然として不明であり生化学的機能に関する知見も得られていなかった。そのため Mael が piRNA 経路にかかわる分子機構について不明な点が多く残されていた。

本研究ではショウジョウバエ由来 Mael の MAEL ドメイン (DmMAEL) の結晶構造を X 線結晶構造解析により分解能 1.6 Å で決定した。結晶構造から DmMAEL は RNase H 様フォールドをとっていたが、様々なエンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼを含む RNase H 様タンパク質群に高度に保存された触媒残基は DmMAEL には失われていた。しかしながら高純度に精製した MAEL ドメインを用いて生化学的解析をおこなったところ、予想外に MAEL ドメインは一本鎖 RNA 切断酵素であること、グアニン残基に切断嗜好性を示すこと、そしてその一本鎖 RNA 切断活性は種を越えて保存されていることが明らかになった。さらに立体構造情報やアミノ酸一次配列などをもとに、DmMAEL の一本鎖 RNA 切断活性にかかわるアミノ酸残基を複数同定した。それらについてショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 (OSC) を用いた細胞生物学的解析を行ったところ、OSC における piRNA を介したトランスポゾン抑制には Mael の一本鎖 RNA 切断活性は関与しないことが示唆された。

### PIWI タンパク質の X 線結晶構造解析

Argonaute は 4 つの機能ドメイン (N ドメイン, PAZ ドメイン, MID ドメイン, PIWI ドメイン) と 2 つのリンカードメイン (L1, L2) から構成される。PAZ ドメイン, MID ドメインはガイド鎖 RNA の 3'末端, 5'末端をそれぞれ繋ぎとめる。PIWI ドメインはエンドリボヌクレアーゼ活性 (スライサー活性) を示し、標的 RNA を切断する。Argonaute は AGO サブファミリーと PIWI サブファミリーに大別され、それぞれ発現部位・結合する小分子 RNA の塩基長・小分子 RNA のローディング機構・標的 mRNA の抑制機構などが異なる。たとえば AGO サブファミリーに結合する miRNA や siRNA は二本鎖 RNA を前駆体として Argonaute に取り込まれた後成熟化されるのに対して、PIWI サブファミリーに結合する piRNA は長い一本鎖 RNA を前駆体として Argonaute に取り込まれた後成熟化される。さらに piRNA は miRNA や siRNA に比べて塩基長が長いという点でも特徴的である。近年、X 線結晶構造解析により高等真核生物由来 AGO タンパク質の全体構造がガイド鎖 RNA あるいはガイド鎖 RNA/標的 RNA との複合体として相次いで報告された。これにより、AGO タンパク質が成熟型 RISC を形成する様子、成熟型 RISC がいかに標的 RNA を認識するかなどが原子分解能レベルで解明された。その一方で、PIWI タンパク質に関しては全長構造が未だ明らかとなっておらず、構造情報は各機能ドメインに限られている。これまで「PIWI

タンパク質を高純度で精製することが困難であることがその一因とされてきた。

本研究では、PIWI-piRNA 複合体の結晶構造を決定し、piRNA を介したトランスポゾン抑制の構造基盤を解明することを目的として、まず動物由来生殖細胞から PIWI タンパク質を精製する系を確立した。カイコ卵巢生殖細胞由来培養細胞 BmN4 からカイコ由来 PIWI ホモログ Siwi を精製し、Siwi の結晶構造を分解能 2.4 Å で決定した。Siwi は BmN4 に発現する piRNA と結合していた。AGO タンパク質に属する hAgo2 と PIWI タンパク質に属する Siwi の結晶構造を比較することにより、複数の点において両者の立体構造の違いがそれぞれに特異的な生化学的機能を生み出すことを見出した。