

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 26 年度博士課程進学

氏 名 庄司佳祐

指導教員 東京大学大学院准教授 勝間 進

論文題目：カイコ培養細胞を用いた piRNA 研究

真核生物のゲノムにコードされるトランスポゾン、ゲノム中の別の領域に転移することが可能な転移因子である。トランスポゾンの転移は宿主ゲノムにとって重大な問題になりうる。例えば、トランスポゾンが遺伝子コード領域に転移した場合、当該遺伝子の構造は破壊され、機能が失われる。特に、生殖細胞におけるトランスポゾンの転移は、次世代に変異したゲノム情報が受け継がれるため、生物にとっては致命的になる可能性がある。そのため、動物の生殖巣においては、トランスポゾンの発現を抑制するシステムが存在している。トランスポゾン抑制システムの中核をなすのは、PIWI サブファミリーと呼ばれる一群の RNA 結合タンパク質（以下、PIWI タンパク質）と、それらに結合する PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる 23–30 塩基程度の小さな RNA である。PIWI タンパク質と piRNA を中核とする抑制システムは piRNA pathway と呼ばれ、海綿動物からヒトまで、広く動物に保存されている。

カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞は、piRNA 研究において非常に強力なツールである。特に、BmN4 細胞が ping-pong pathway を保持する細胞であ

るという利点を生かして、ping-pong pathway に関する解析が数多く行われてきた。カイコの ping-pong pathway においては、10 塩基の相補配列を保持した Siwi に結合する 1U piRNA と BmAgo3 に結合する 10A piRNA がペアで増幅していくとされている。この 1U と 10A を保持する piRNA 同士のペアは ping-pong pair と呼ばれており、piRNA ライブラリ内にこのペアが大量に存在することが、piRNA が ping-pong pathway により産生された証左であると考えられている。本博士論文では、BmN4 細胞を用いて、ping-pong pathway を中心とした piRNA 経路に関する研究を行った。

1. カイコ培養細胞を用いた人工 ping-pong piRNA 産生系の構築とその利用

バイオインフォマティクス解析によって ping-pong pathway の存在は示唆されていたものの、piRNA の増幅経路として機能している実験的な証拠に乏しかった。そこで、カイコに特異的な *Fem* piRNA および *Masc* piRNA のペアを用いて、人工的に ping-pong piRNA を産生するシステムを確立した。本システムに内在性の *Fem* piRNA-Siwi 複合体によって認識される配列を持つ piRNA 前駆体 (pre-piRNA-I) を導入したところ、人工 piRNA (piRNA-I) が産生された。さらに piRNA-I と BmAgo3 の複合体がカイコ内在性の *Importin-5* mRNA を認識・切断することにより、内在性遺伝子由来の人工 piRNA (piRNA-J) が産生され、その後 piRNA-J-Siwi 複合体が形成された。以上の結果から、Siwi 結合 piRNA から一周して再度 Siwi 結合 piRNA を産生する piRNA の増幅経路を観察することができた。また、この実験系を用いることによって、ping-pong piRNA の産生には連続した 17 塩基の base pairing が必要であり、22 塩基の base pairing があればそれ以上の base pairing を持つものと遜色無い量の piRNA-J を産生できることを明らかにした。以上要するに、本システムによって ping-pong pathway が存在することを実験的に示すことができたと同時に、本システムが ping-pong pathway の解析において有力なツールとなることを示した。

2. piRNA 解析における piRNA locus の設定とその利用

個々の piRNA について発現量や長さの変化に関する情報を処理するため、piRNA locus という考え方を導入した。人工 piRNA 産生系を用いた実験結果から、5'末端から 1-22 塩基目の配列が同じであれば、それ以降の配列が異なっているもターゲット mRNA の認識の程度には大きな差がないことが判明している。そこで、5'末端から 1-23 塩基目の配列が同じである piRNA の一群を piRNA locus として定義した。以降、特別に言及する場合を除いて、この piRNA locus のことを piRNA と言及する。さらに、個々の piRNA について、ping-pong pair の観点からアノテーションを行うことで、sense piRNA、antisense piRNA のいずれもが主に Siwi に結合している一群の piRNA を発見した。Siwi-Siwi piRNA と名付けたこの piRNA グループは、BmN4 細胞由来の piRNA ライブラリ中には確認できたが、キイロショウジョウバエ卵巢に由来する piRNA ライブラリからは確認することができなかった。また、Siwi-Siwi piRNA の多くは 1U および 10A の特徴を併せ持っているため、sense piRNA、antisense piRNA のいずれもが 1U かつ 10A である特徴を保持していた。一方、sense piRNA が Siwi に結合し、その ping-pong pair piRNA が BmAgo3 に結合する Siwi-Ago3 piRNA は、Siwi-Siwi piRNA と異なる性状を持つことがわかった。Siwi-Ago3 piRNA と Siwi-Siwi piRNA はいずれも Siwi-dominant な piRNA ではあるが、このようにグループごとに解析することで piRNA の性状をより詳細に調査できることが示された。本研究で導入した piRNA locus を用いて様々な piRNA ライブラリを解析していくことで、piRNA 経路をより深く理解できると考えられた。

3. BmN4 細胞の脂肪細胞分化誘導時における piRNA および mRNA プロファイリング

piRNA 経路は生殖巣の生殖細胞系列のみならず、生殖巣の体細胞においても機能していることが知られている。さらに、生殖巣に関係ない他の体細胞組織においても piRNA が機能する事例が報告されており、piRNA=生殖巣という構図が見直されつつある。BmN4 細胞は、piRNA を発現するなど生殖細胞としての特徴を持つ培養細胞であるが、既報の条件を用いることで脂肪細胞様に分化する。

そこで、BmN4 細胞に対して体細胞である脂肪細胞へと分化誘導処理を行った際に、piRNA 経路が受ける影響について調査した。実際には、piRNA-seq と mRNA-seq を同じ RNA サンプルを用いて並行して行い、それらのオームデータに関して比較解析を行った。その結果、分化誘導処理によって、脂肪細胞分化のマーカ遺伝子群が発現上昇すると共に、一部の piRNA 経路関連因子の発現が低下することがわかった。また、piRNA のターゲットであるトランスポゾンの発現量が上昇していることも判明した。一方、分化誘導によって piRNA に直接結合する Siwi や BmAgo3 の発現量はほとんど変化しなかったことから、piRNA 経路に影響はあるが機能しうる状態であることが示唆された。piRNA ライブラリについて詳細に解析を行った結果、Siwi-Siwi piRNA の量が顕著に減少する一方、Ago-Siwi piRNA の量は増加する傾向にあることが分かった。また、piRNA の産生領域である piRNA cluster から発現する piRNA および mRNA を比較解析したところ、一部の piRNA cluster 由来の piRNA と mRNA の発現がともに顕著に変化しており、それらの増減パターンはほぼ一致していた。これらの piRNA cluster については、カイコ胚子の発達段階別の piRNA ライブラリを用いた解析でも同様の変動傾向が確認できた。すなわち、脂肪細胞分化時に発現が上昇した piRNA cluster 由来の piRNA は、胚子が発達するに従って発現量が増加し、分化時に発現が減少する piRNA cluster に由来する piRNA は、その量が減少した。以上の結果から、BmN4 細胞を脂肪細胞へと分化させる実験系は、piRNA cluster の発現変動からみると、胚発生における piRNA 経路の変化と類似していると言える。これらの piRNA cluster や piRNA locus を活用することで、piRNA 経路に関する研究が進展することが期待できる。

以上要するに、本博士論文は piRNA 産生細胞であるカイコ BmN4 細胞を用いることで、ping-pong サイクルの存在について実験的な証拠を示し、個々の piRNA を解析する新しいインフォマティクス手法を考案し、体細胞分化によって piRNA 経路が影響を受けることを示したものである。