

**Studies on piRNA-based defense system
against transposons in germ line cells
(生殖細胞ゲノムを護る小分子 RNA に関する研究)**

河 岡 慎 平

目次

序論・・・4

図表・・・15

第一章 piRNA 研究モデルとしての BmN4 細胞・・・19

緒言・・・20

材料と方法・・・24

結果・・・28

考察・・・32

図表・・・34

第二章 piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構・・・43

緒言・・・44

材料と方法・・・47

結果・・・50

考察・・・56

図表・・・59

第三章 piRNA がつくられるしくみ・・・72

緒言・・・73

材料と方法・・・76

結果・・・78

考察・・・83

図表・・・86

第四章 カイコ雌性決定 W 染色体と piRNA・・・100

緒言・・・101

材料と方法・・・103

結果・・・105

考察・・・112

図表・・・114

総合考察・・・126

謝辞・・・133

引用文献・・・137

序論

トランスポゾンとゲノム

真核生物のゲノムには、トランスポゾンと呼ばれる、ゲノムを自由に飛び回る
ことのできる一群の転移因子が存在する(Slotkin and Martienssen, 2007; Malone
and Hannon, 2009)。トランスポゾンはその転移様式によって大きく 2 種類に大別
することができる。一つが、いわゆるカットアンドペースト型の転移を行う DNA
型トランスポゾンである。DNA 型トランスポゾンは、転移単位それ自身が転移
酵素(トランスポゼース)をコードして転移をする。自身の転移酵素の機能が失わ
れていた場合でも、他の DNA 型トランスポゾンに由来する転移酵素を利用して
転移をすることもある。DNA 型トランスポゾンとは対照的に、いわゆるレトロ
トランスポゾンと呼ばれる一群のトランスポゾンは、コピーアンドペースト型
の転移を行う。まず、自身をコードする RNA を転写し、逆転写酵素やヌクレア
ーゼの活性を以て自身を新しいゲノム領域へと挿入する。その転移様式から容
易に想像できることではあるが、ゲノムにおけるコピー数は概して、レトロト
ランスポゾンのほうが DNA 型トランスポゾンよりも多い。

昨今の DNA シーケンシング技術の進歩により、いまや、ある生物のゲノム配
列を手に入れる、ということは容易になった。その結果、我々ヒトを含む真核
生物のゲノムは信じられないほどの量のトランスポゾン配列を有していること
が明らかとなってきた。トランスポゾンに着目した研究のなかには、「トランス
ポゾンが真核生物ゲノムの構造にとって必須である」という立場や、「トランス
ポゾンに由来するタンパク質が宿主生物の発生に必須である」という立場の研
究が存在するが(Volff et al., 2001; Ono et al., 2006; Cam et al., 2008)、本論ではトラ

ンスポゾンを中心に「有害なもの」として扱う。

動物の生殖巣におけるトランスポゾン抑制システムとしての piRNA 経路

トランスポゾンの転移は宿主ゲノムに重大な変化を引き起こすことがある。例えば、トランスポゾンが宿主の生存にとって必須な遺伝子の構造を破壊した場合、その個体は死んでしまうであろう。トランスポゾンの転移が生殖細胞、すなわち次世代へとゲノム情報を伝達する細胞のゲノムで起こった場合には、そこで生じた負の効果が次世代へと引き継がれる可能性がある。この点において、生殖細胞ではトランスポゾンの活性が正確にコントロールされる必要がある。実際、動物の生殖巣、生殖細胞には、トランスポゾンの活性をコントロールするシステムが存在する(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009)。動物の生殖巣は、生殖細胞ならびに生殖系列の体細胞から成る。生殖系列の体細胞におけるトランスポゾンの発現は、隣接する生殖細胞に負の影響をもたらすことがある(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009)。したがって、生殖細胞におけるトランスポゾン抑制が最も重要ではあるが、生殖系列の体細胞におけるトランスポゾン抑制は、生殖系列ではない体細胞におけるそれよりも重要であると考えられる。また、生殖系列の体細胞におけるトランスポゾン抑制システムの根幹は、生殖細胞におけるそれとほぼ同一であることが知られている(Malone et al., 2009)。生殖系列ではない体細胞においても同等の機能を有した異なるシステムが存在するが、本論では生殖巣、とくに生殖細胞におけるトラ

ンスポゾン抑制システムに関して述べる。また、同様の意味を成すシステムは、植物、線虫および大腸菌などの生物にも存在するが(Karginov and Hannon, 2010)、本論では、動物におけるシステムに焦点をあてる。

動物の生殖巣におけるトランスポゾン抑制システムは、PIWI サブファミリーと呼ばれる一群の RNA 結合タンパク質群と、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 をその中核とし、piRNA 経路と呼ばれている(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009)(図 0.1)。piRNA 経路を理解するためには、詳細なメカニズムが解明されている RNAi 経路—small interfering RNA (siRNA)経路と microRNA (miRNA)経路—を理解する必要がある。そこで、まず、siRNA 経路、および miRNA 経路について簡単に解説する(表 0.1)。

小分子 RNA の生合成—siRNA と miRNA を例に

siRNA 経路は外来性、あるいは内在性の長い二本鎖 RNA が、Dicer と呼ばれる RNase によって 21-22 塩基の二本鎖 siRNA(siRNA duplex)に分解されるところからはじまる(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009; Kawamata and Tomari, 2010)。siRNA duplex は Argonaute タンパク質へと積み込まれ、複雑な過程を経て 1 本鎖の成熟型 siRNA となる。成熟型 siRNA は自身が結合する Argonaute タンパク質を自身に相補的な配列を持つターゲット RNA へと導く。Argonaute タンパク質もまた RNase であるため、ターゲ

ット RNA の抑制が観察される。siRNA に結合する Argonaute タンパク質の発現は一般にユビキタスである(表 0.1)。

miRNA 経路は内在性ヘアピン型 RNA が、やはり Dicer によって 21-22 塩基の二本鎖 miRNA(miRNA/miRNA*)へと分解されるところからはじまる(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009; Kawamata and Tomari, 2010)。miRNA/miRNA*は互いにミスマッチをもった二本鎖 RNA である。miRNA/miRNA*は Argonaute タンパク質へと積み込まれ、miRNA*は自身の塩基組成や熱力学的な安定性に基づいて、Argonaute タンパク質から排除される。miRNA も siRNA と同様に、自身が結合する Argonaute タンパク質をターゲットへと導く。siRNA と miRNA によるターゲットの抑制は、そのメカニズムが異なる場合と、同様である場合がある。本論文では miRNA の作用機序については詳しくは述べてない。miRNA に結合する Argonaute タンパク質の発現はユビキタスであるが、miRNA 自身の発現が組織、あるいは発生段階特異的である場合が多く認められる(表 0.1)。

piRNA 経路に関する研究の流れ

PIWI-interacting RNA(piRNA)は、siRNA や miRNA よりも長い小分子 RNA として、2006 年に登場した小分子 RNA である(Aravin et al., 2006; Grivna et al., 2006; Lau et al., 2006; Saito et al., 2006; Watanabe et al., 2006; Vagin et al., 2006; O'Donnell and Boeke, 2007; Seto et al., 2007)(図 0.1)。その長さは 23-30 塩基長であり、piRNA

という名称は、PIWI タンパク質群に結合する、という性質を反映したものである。piRNA という名称が登場したのは 2006 年であるが、それよりも以前、2003 年に、トランスポゾンをはじめとする反復配列に由来する長い小分子 RNA、repeat-associated small interfering RNA(rasiRNA)として同定されていたことは留意しておくべき点である(Aravin et al., 2003)。Argonaute タンパク質、miRNA とは異なり、PIWI タンパク質および piRNA は生殖巣にほぼ特異的に存在することが知られている(表 0.1)。piRNA の生合成には Dicer が不必要であることがキイロショウジョウバエ、ゼブラフィッシュを用いた遺伝学的解析から証明されており(Vagin et al., 2006; Houwing et al., 2007)、piRNA 生合成経路の何れの過程においても二本鎖 RNA 中間体は存在しない、と考えられている。最も重要な点は、piRNA はトランスポゾン mRNA 配列に相補的であるものが圧倒的に多く、これらの piRNA は自身の結合パートナーである PIWI タンパク質をトランスポゾン mRNA に導くことで、トランスポゾンの発現を抑制する、という点である。

piRNA の結合パートナーである PIWI サブファミリー遺伝子群の研究は 1990 年代後半から 2000 年代はじめへとさかのぼる。PIWI とは *P-element induced wimpy testis* の略であり、キイロショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングにより 1990 年代後半に同定された(Lin and Spradling, 1997; Cox et al., 1998; Cox et al., 2000)。初期に発見されたキイロショウジョウバエの PIWI サブファミリータンパク質は Piwi、Aubergine (Aub)と呼ばれ、それぞれ、生殖幹細胞の自己新生と維持に必須の役割を担っていることが証明されている(Lin and Spradling, 1997; Cox et al., 1998; Cox et al., 2000; Brennecke et al., 2007; Li et al., 2009a)。その後の研

究から、PIWI サブファミリータンパク質のドメイン構造は RNA サイレンシング経路の中核である Argonaute ファミリータンパク質のドメイン構造と酷似していることが明らかとなった。すなわち、4 つのドメイン—N ドメイン、RNA 結合ドメインである MID、そして PAZ ドメイン、RNase III 様ドメインである PIWI ドメイン—を有していた(Carmell et al., 2002)。現在では PIWI タンパク質群は Argonaute ファミリーのサブファミリーとして扱われている。また、2005 年以降、PIWI 遺伝子群の変異がトランスポゾンの爆発的な発現をもたらすことが証明された(Kalmykova et al., 2005; Vagin et al., 2006)。多くの piRNA がトランスポゾンに相補的な配列をもつ、という点と考え合わせ、PIWI/piRNA 複合体は動物の生殖巣におけるトランスポゾン抑制システムの中核である、というモデルが広く受け入れられることとなった(図 0.1)。piRNA の詳細な生合成経路に関しては、次の項でより詳しく述べる。

piRNA の生合成

piRNA 生合成の多くは謎につつまれている。piRNA 生合成を考えるうえで、piRNA 生合成を便宜上二つのグループに分ける。すなわち、PIWI タンパク質の切断活性に依存しない生合成と、依存する生合成である。前者に関しては、反応機構の詳細はまったくと言って良いほど明らかになっていない。手がかりは、siRNA や miRNA とは異なり、piRNA は一本鎖のままつくられる、という点である(Vagin et al., 2006; Houwing et al., 2007)。また、piRNA の多くは 1 塩基目が U であり、1 番目の塩基を決める機構の存在が示唆されている。PIWI タンパク質

の切断活性に依存しない piRNA 生合成に関してはこれまで未解明であったが、本博士論文・第三章でその詳細を明らかにすることができた。

ひとたび PIWI/piRNA 複合体が完成すると、piRNA は自身の結合パートナーである PIWI タンパク質を標的 RNA へと導く(図 0.1)。少なくともキイロショウジョウバエの PIWI タンパク質はすべてヌクレアーゼ活性を有している(Saito et al., 2006; Gunawardane et al., 2007; Nishida et al., 2007)。また、結晶構造解析により、Argonaute/PIWI タンパク質は自身が結合する小分子 RNA の 10 番目と 11 番目の間で標的 RNA を切断することが知られている(Ma et al., 2004; Ma et al., 2005; Yuan et al., 2005; Wang et al., 2008; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009b)。興味深いことに、PIWI/piRNA 複合体によって切断された RNA は単純に分解されるのではなく、次の piRNA をつくる前駆体としてはたらく、と考えられている。図に示すように、新しくつくられる piRNA の少なくとも 5'末端は、PIWI/piRNA 複合体の切断点そのものである(Ma et al., 2004; Ma et al., 2005; Yuan et al., 2005; Wang et al., 2008; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009b)(図 0.2)。切断産物の 3'末端がどのようにして適切な長さになるかは明らかではない。PIWI タンパク質の切断活性に基づく piRNA 生合成経路はピンポンサイクルと呼ばれる。PIWI/piRNA 複合体の切断活性によって作られた piRNA は、切断活性を誘導した piRNA と自身の 5'末端から 10 塩基が完全にオーバーラップすることが知られている(Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007)。この 10 塩基のオーバーラップを本論文ではピンポンシグネチャー、あるいはピンポンペアと呼ぶ(図 0.2)。この特徴は、マウス、ゼブラフィッシュ、そしてカイコの piRNA 経路で非常によ

く保存された特徴である(Houwing et al., 2007; Houwing et al., 2008; Aravin et al., 2008; Kawaoka et al., 2009; Kawaoka et al., 2011a; De Fazio et al., 2011)。しかしながら、ピンポンサイクルに依存した piRNA の生合成は、未だ実験的に証明されていない。

piRNA 経路とクロマチン/DNA メチル化修飾

本論文では、piRNA 経路の主たる機能は PIWI/piRNA 複合体によるトランスポゾン mRNA 切断反応である、として紹介してきた。しかしながら、piRNA がクロマチン/DNA メチル化修飾を媒介するという報告が少なからず存在する(Pal-Bhadra et al., 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004; Carmell et al., 2007; Klenov et al., 2007; Aravin and Bourc'h, 2008; Aravin et al., 2008; Lin and Yin, 2008; Shoji et al., 2009; Watanabe et al., 2011a; Watanabe et al., 2011b)。これらの研究の多くはノックアウトマウス、あるいはキイロショウジョウバエを用いた遺伝学的解析に基づいている。第二章で詳しく述べるが、これらの解析の多くはヘテロなサンプルを用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析等に基づいている。また、ノックアウトマウスなどでは、生殖細胞の発生に甚大な影響が生じるために、直接要因によって各種修飾に問題が生じたのか、間接要因によるのか、はっきりとした結論を出すのは難しいと考えられる。piRNA 発現培養細胞であるキイロショウジョウバエ OSC(Ovarian Somatic follicle Cell line; OSC)細胞を用いた研究においても、piRNA 経路によるクロマチン/DNA メチル化修飾機構の存否に関する決定的な証拠は得られていない (Lau et al., 2009; Moshkovich and Lei, 2010)。

piRNA 経路の未解決問題

これまで述べてきた通り、研究がよく進んでいる siRNA 経路、miRNA 経路と比較して、piRNA 経路にはより多くの謎が存在する(図 0.3)。例えば、piRNA 経路はどのようにトランスポゾンとトランスポゾンと認識しているのだろうか？何故、自身の遺伝子に由来する転写物とトランスポゾンを見分けることができるのだろうか？piRNA はどのようにしてつくられるのだろうか？piRNA 経路の役割はトランスポゾンを抑えることだけなのだろうか？

piRNA 経路の研究には、キイロショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなど、何れも強力な遺伝学系をもつモデル生物が用いられてきた。しかしながら、これらのモデル生物では解明できない問題も存在する。本研究では、非モデル生物であるカイコを利用して piRNA に関する研究を実施した。その結果、カイコの特徴を活かした研究を展開することにより、piRNA 経路に関する重要な知見を得ることに成功した。

siRNA 経路や miRNA 経路の研究においては、キイロショウジョウバエ由来 S2(Schneider 2)細胞などの培養細胞系が大きな貢献をしてきた。ところが、2009 年まで、piRNA 経路を発現するような培養細胞はまったく見つかっていなかった。本論文では、第一章において、カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞が piRNA 経路を発現する培養細胞であることを証明した。第二章では、BmN4

細胞を利用して、piRNA 経路がいかにしてトランスポゾンを見分けているか、という命題にアプローチした。第三章では、BmN4 細胞由来のタンパク質抽出物を用いた piRNA 生合成経路再構成系の開発を行った。最後に、第四章では、piRNA 経路とカイコ性染色体の関係について調査した。総合考察では第一章から第四章で得られた知見を俯瞰し、また、本博士論文に加えなかった研究結果についても言及し、カイコをモデルとした piRNA 研究の総括を行った。

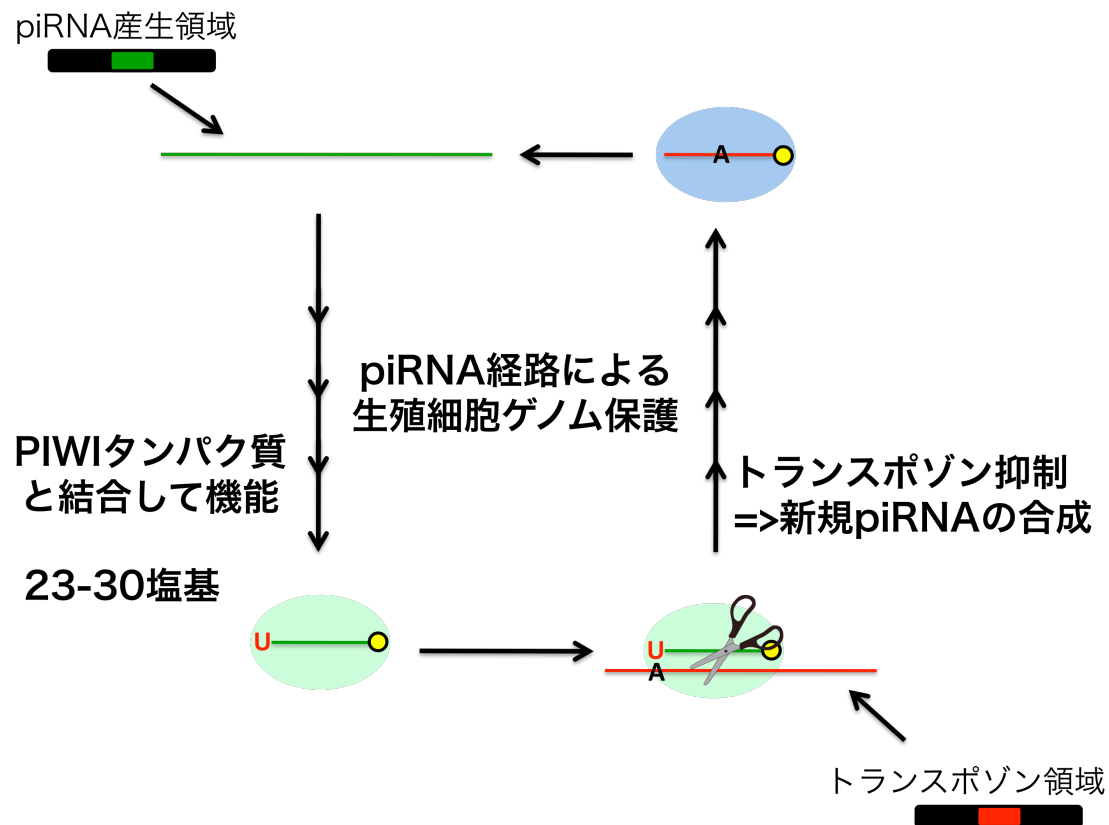


図 0.1 piRNA 経路の概略図

piRNA 経路の概略図を記した。まず、ゲノム上の piRNA 産生領域から、piRNA 前駆体が転写される。つぎに、piRNA 前駆体が未知の機構によってプロセッシングされ、PIWI タンパク質と結合する 23-30 塩基の成熟型 piRNA となる。成熟型 piRNA は自身が結合している PIWI タンパク質を、自身と相補的な配列を持つトランスポゾン mRNA へと導く。PIWI タンパク質は核酸切断活性を有しており、トランスポゾン mRNA を分解することでトランスポゾンを抑制する。トランスポゾン mRNA の分解産物は、未知の機構によって、新しい piRNA の前駆体となる。新しくできた piRNA は piRNA 産生領域からつくられる piRNA 前駆体に相補的な配列を持つため、やはり新しい piRNA の産生に寄与する。



赤: piRNA
 青: 標的トランスポゾンmRNA
 はさみ: PIWI

図 0.2 ピンポンシグネチャー

図 0.1 に記した切断サイトの拡大図を記した。赤で記した piRNA は、青で記した標的トランスポゾン mRNA に相補的(antisense)である。Antisense piRNA の 1 番目の塩基は U であることが多い。PIWI タンパク質は、piRNA の 10 番目と 11 番目の塩基の間で標的トランスポゾン mRNA を切断する。切断点は新しい piRNA の 5'末端になる(図では G)。従って、新しい piRNA の 5'末端から 10 塩基目は A となる。3'末端がどのように整形されるかは未知である。piRNA の 5'末端からはじまる 10 塩基のオーバーラップは切断に基づく piRNA 生合成の痕跡であり、ピンポンシグネチャーまたはピンポンシグナルと呼ばれる。

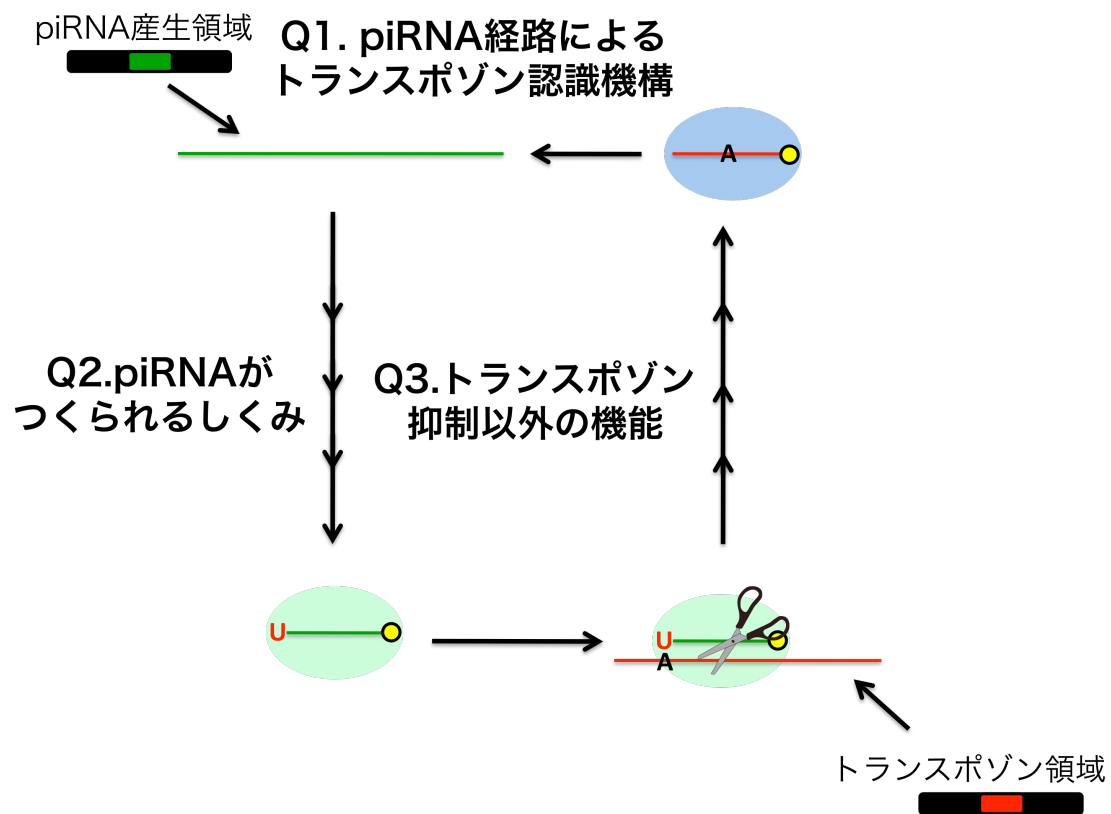


図 0.3 piRNA 経路の未解決問題

Q1: piRNA 経路がどのようにトランスポズンを識別しているか

Q2: piRNA 前駆体がどのようにプロセッシングされるか

Q3: piRNA 経路がトランスポゾン抑制以外の機能を有するかどうか

表 0.1 動物の小分子 RNA

動物の小分子 RNA の主な特徴を記した。他の小分子 RNA と比べて、piRNA はより長さが長く、ARGONAUTE タンパク質のサブクラスである PIWI タンパク質と結合し、発現が生殖巣に限られ、一本鎖前駆体からつくられる、という点異なる。

	siRNA	miRNA	piRNA
長さ	21-22	21-22	23-30
結合タンパク質	Argonaute	Argonaute	PIWI
発現組織	ユビキタス	ユビキタス	生殖巣
前駆体	二本鎖RNA ¹	ヘアピン二本鎖 ²	一本鎖
機能	切断/翻訳抑制	切断/翻訳抑制	切断/クロマチン？
変異体表現型 ³	viable	致死	不妊

- (1) siRNA 前駆体は siRNA duplex と呼ばれ、相補性が非常に高い
- (2) miRNA 前駆体は miRNA/miRNA* と呼ばれ、ミスマッチを多く持つ
- (3) キイロショウジョウバエの変異体の代表的な表現型を記した

第一章

piRNA 研究モデルとしての BmN4 細胞

緒言

PIWI/piRNA 複合体は、動物の生殖巣、特に生殖細胞において、トランスポゾン
の発現を適切に調節する複合体である(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal
and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009)。piRNA の多くはトランスポゾン
mRNA に相補的な配列をもち、自身が結合する PIWI タンパク質をトランスポゾ
ン mRNA へと導く。PIWI タンパク質は自身がもつ RNase 活性によって標的ト
ランスポゾン mRNA を切断する。PIWI サブファミリー遺伝子の変異体では、ト
ランスポゾンの発現が上昇し、生殖巣の発達が正常に起こらない、生殖幹細胞
が失われる、などの重篤な表現型が観察され、その結果、次世代が生じなくな
ることが知られている(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore,
2009; Malone and Hannon, 2009)。

piRNA は一本鎖のまま成熟する小分子 RNA であることが知られているが、その
生合成機構はまったくといっていいほど分かっていない。大規模配列解析の結
果から、PIWI タンパク質の切断によって生じた RNA 断片が新たな piRNA の前
駆体となることが示唆されているが、その実証はなされていない(Brennecke et al.,
2007; Gunawardane et al., 2007)。以下にキイロショウジョウバエ、あるいはマウ
スの piRNA 経路を例にとって、現在までに明らかになっている事実について説
明する。

キイロショウジョウバエゲノムには Piwi、Aubergine(Aub)、そして Ago3 という

三つの PIWI サブファミリータンパク質がコードされており (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007)、その何れも生殖巣で強い発現を示す。Piwi と Aub は似て非なる特徴を持ったタンパク質である。キイロショウジョウバエ、マウス、ゼブラフィッシュの piRNA はいずれも 1 塩基目がウラシル(U)に偏っていることが観察されていた(1U piRNA)(Aravin et al., 2006; Grivna et al., 2006; Lau et al., 2006; Saito et al., 2006; Vagin et al., 2006; O'Donnell and Boeke, 2007; Seto et al., 2007)。2007 年には、キイロショウジョウバエの Piwi、Aub は、Ago3 とは異なったタイプの piRNA と結合することが示された (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007)。すなわち、Piwi、Aub は 1U piRNA と結合し、Ago3 は 10 番目の塩基が A に偏った piRNA(10A piRNA)と結合していた。さらに、Aub-1U piRNA は、Ago3-10A piRNA と、それぞれ 1 塩基目から 10 塩基目までの 10 塩基が完全にオーバーラップする場合が多いことが証明された。また、キイロショウジョウバエの PIWI タンパク質はいずれもヌクレアーゼ活性を有していることが明らかとなった(Saito et al., 2006; Gunawardane et al., 2007; Nishida et al., 2007)。

ここで観察された 10 塩基のオーバーラップは、PIWI タンパク質の生化学的性質と密接に関連していると考えられている。すなわち、PIWI タンパク質は、自身が結合する piRNA の 5'末端から 10 番目と 11 番目のあいだで、piRNA に相補的な標的を切断するのである(Ma et al., 2004; Ma et al., 2005; Yuan et al., 2005; Wang et al., 2008; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009b)。Aub-1U piRNA による切断によって生じた RNA の 5'側から 10 塩基目が A になる、というのは、この相補

性に由来すると考えられる。また、5'末端から 10 塩基がオーバーラップする piRNA セットは、互いが互いの切断反応により生じた、と考えることができる。以上を要するに、piRNA による切断が新たな piRNA を産生する、と言える。このモデルはピンポンモデルと呼ばれている(Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007; Li et al., 2009; De Fazio et al., 2011)。著者らの研究によって、ピンポンモデルが実際にカイコ生体で機能している様子が観察されており、マウス、ゼブラフィッシュでもこの機構は保存されている(Houwing et al., 2007; Houwing et al., 2008; Aravin et al., 2008; Kawaoka et al., 2009; Kawaoka et al., 2011a; De Fazio et al., 2011)。

これらの知見のほとんどは遺伝学的解析、あるいはインフォマティクス解析に基づくものであり、生化学実験などによる頑健な証明、あるいは妥当性の検討はまったく行われてこなかった。序論で述べたように、siRNA 経路や miRNA 経路の研究においては、S2 細胞をはじめとする培養細胞、あるいはキイロショウジョウバエ胚由来のタンパク質抽出物を用いた *in vitro* 系が活躍してきた(Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000; Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Hutvagner et al., 2001)。具体的には、細胞由来のタンパク質抽出物を材料として siRNA、あるいは miRNA の生合成経路を再現し、生化学的な解析を行うことが非常に重要であった。ところが、piRNA 経路を発現するような培養細胞は発見されておらず、また、動物の生殖巣は一般に小さいために、タンパク質抽出物を用いた生化学的実験系を構築することは困難であるとされてきた。

著者らの過去の研究により、カイコ卵巣には他のモデル生物と良く似た特徴をもつ piRNA が発現していること(Kawaoka et al., 2008a)、また、カイコゲノムにはふたつの PIWI サブファミリー遺伝子がコードされており、そのいずれも卵巣で発現していることが分かっている(Kawaoka et al., 2008b)。そこで本章では、カイコ卵巣由来の培養細胞が piRNA 経路を発現する、という仮説をたて、その証明を試みた。

材料と方法

培養細胞

BmN4 細胞は IPL-41 培地(Gibco)に非働化した牛胎児血清を 10%添加した培地を用いて 27°Cにて培養した。Sf9 細胞は同じく牛胎児血清を 10%添加した TC-100 培地(Invitrogen)、High Five 細胞は Express Five 培地(Invitrogen)を用いて同じく 27°Cで培養した。

RNA 抽出

Total RNA は Trizol 試薬(Invitrogen)にて、常法に従って抽出した。小分子 RNA は miRVana miRNA isolation kit(Ambion)にて、小分子 RNA 抽出プロトコルに従って抽出した。

小分子 RNA の精製と小分子 RNA ライブラリの作成

10 μ g の total RNA を 8M のウレアを含む 15%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。RNA は SYBRGold(Invitrogen)試薬にて検出し、泳動像の撮影は LAS-100-film(Fujifilm)にて行った。piRNA に相当するシグナルをカッターによって切り出し、small RNA gel extraction kit(TaKaRa)によってゲルからの抽出を行った。抽出した小分子 RNA は TaKaRa small RNA cloning kit(TaKaRa)にて 3'、および 5'アダプターを付加し、逆転写、PCR 法によって cDNA ライブラリに変換した。得られた cDNA は pGEM-T easy vector(Promega)にサブクローニングしたのちに配列を確認し、その後、1 μ g の cDNA を Illumina の Solexa シーケンシング解析に

供した。Solexa シークエンシングは東京大学大学院新領域創成科学研究科 菅野教授、鈴木准教授に依頼して行っていた。

小分子 RNA の配列解析

Solexa シークエンシングによって得られたシーケンスの長さは 36 塩基である。piRNA は長さが 23-30 塩基であり、piRNA の 5'末端からシーケンスが得られるため、3'末端には付加したアダプター配列が含まれる。3'アダプター配列が適切に含まれるリードは、R-code あるいは Unix プログラムを用いて抽出し、その後、アダプター配列を除去した。解析に必要な R-code は <http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/> に記されたコードを改変したものであり、Unix プログラムは基本的なコマンドを組み合わせて作成した。得られた生リードは SOAPaligner/soap2 アルゴリズム(Li et al., 2009b)によってカイコゲノム配列やトランスポゾン配列にミスマッチを許容せずにマッピングした。

β -elimination

過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応は、total RNA を 25mM の過ヨウ素酸ナトリウムと室温で 30 分インキュベートすることにより行った。酸化反応は 10 μ l のグリセロールを添加することでクエンチし、 β -elimination 反応は引き続き 10 μ l の水酸化ナトリウムを添加することで行った。 β -elimination 反応は 45°C で 90 分行った。反応後、エタノール沈殿により RNA を精製し、以後の解析に供した。

ノザン解析

Total RNA、あるいは β -elimination 反応を行った RNA を、終濃度が 8M のウレアを含む 15%変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Hybond-N+(GE healthcare) にブロットした。ブロットには Trans-Blot SD semidry electrophoresis transfer cell(Bio-RAD)を用いた。piRNA の検出とカイコ *let-7* の検出には以下の DNA オリゴを用いた。

5'-ATTCGAAACCAATCCGTTAGTTTTTGA-3' (piRNA-1)

5'-TACTATACAACCTACTACCTCA-3' (*let-7*)

何れのオリゴも T4 polynucleotide kinase(TaKaRa)と γ - 32 P[ATP]にて放射性標識し、PerfectHyb(Sigma)中で 37°Cにてハイブリダイゼーションを行った。

ポリクローナル抗体の作成

Siwi の N 末端から 1-200 アミノ酸、BmAgo3 の N 末端の 80-230 アミノ酸に該当する cDNA 配列を pET24b vector(Novagen)にサブクローニングした。完成したベクターは BL21(DE3)大腸菌株に形質転換し、1mM の IPTG 存在下、37°Cで発現誘導を行った。His タグを利用したタンパク質精製は HisGravTrap column(GE healthcare)を使用して行った。抗体作成は Sigma に発注し、ウサギを用いて行った。

Flag-Siwi、Flag-BmAgo3 を定常発現する BmN4 細胞の作成

Flag タグを付加した Siwi、BmAgo3 を pIZ/V5-His vector(Invitrogen)にサブクローニングした。本ベクターにはゼオシン耐性遺伝子がコードされている。完成し

たベクターは Cellfectin reagent(Invitrogen)を用いて BmN4 細胞にトランスフェクションし、終濃度 500 μ g/mL のゼオシンで薬剤選抜を行った。ウェスタンブロットによる発現解析は、抗 Flag 抗体(1:1000、Sigma)、抗 Siwi 抗体(1:10000)、抗 BmAgo3 抗体(1:5000)を用いて行った。

Flag-Siwi、Flag-BmAgo3 複合体の精製

上述のFlag-Siwi、Flag-BmAgo3定常発現細胞より、RIPA buffer (50 mM Tris at pH 8.0, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1% NP-40, protease inhibitor cocktail (Roche), 100 U/mL RNasin ribonuclease inhibitor (Promega))によってタンパク質抽出物を調整した。免疫沈降は抗Flag抗体(1:100)ならびにProtein A Sepharose 4 Fast Flow beads(GE healthcare)にて行った。複合体に含まれるRNAはmiRVana miRNA extraction kit(Ambion)によって抽出した。得られたRNAは上述の方法によりウレアを含む15%変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、小分子RNAライブラリの作成に供した。

シーケンスデータ

本研究で得られたシーケンスデータは下記の通りデータベースに登録した。

AHAAB0000001-AHAAB0547473 (BmN4-derived piRNAs)

AHAAC0000001-AHAAC1704525 (BmN4-derived Siwi-bound piRNAs)

AHAAD0000001-AHAAD2196220 (BmN4-derived BmAgo3-bound piRNAs)

結果

BmN4 細胞は piRNA を発現する培養細胞である

piRNA はさまざまな特徴によって定義される。特に、長さが 23-30 塩基である、という点は検出しやすい特徴である。そこで、カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞由来の total RNA を調整し、ウレアを含む変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行った(図 1.1(A))。この際、他 2 種のチョウ目昆虫の卵巣由来の培養細胞(Sf9 細胞, High Five 細胞)から調製した total RNA も同時に電気泳動した。電気泳動後、SYBRGold による染色を行った結果、実験に供した 3 種の培養細胞いずれも、長さが 25-30 塩基の小分子 RNA を多量に発現していることが明らかとなった(図 1.1(A))。以後、ゲノム配列がある程度の精度で決定されているカイコの卵巣に由来する BmN4 細胞にフォーカスして実験を行った。

検出された小分子 RNA の特徴を詳しく知るために、シグナルに該当する部分をゲルから切り出し、常法によって 5'、3'リンカーを付加し、逆転写、PCR による増幅を経て、Solexa シークエンス解析を行った。得られた配列に対し、R あるいは Unix コマンドによって配列解析を行った。シークエンスされた小分子 RNA は、27 塩基を頂点とする一峰性の長さ分布を示した(図 1.1(B))。この長さ分布は、siRNA や miRNA よりも長かった。得られた小分子 RNA 配列の特徴を精査すると、1 塩基目がウラシル(U)に偏っていることが明らかとなった(図 1.1(C))。これは、他生物で報告されている piRNA の特徴に合致するものであった。次に、得られた小分子 RNA を、カイコゲノム、予測遺伝子データセット、トランスポゾ

ンデータセットなどにマッピングした。その結果、30%以上の小分子 RNA がトランスポゾンにマップされることが明らかとなった(図 1.1(D))。

序論では述べなかったが、piRNA に関して明らかとなっている生化学的特徴が存在する。すなわち、piRNA の 3'末端には、2'-O-メチル化修飾が施されている(Horwich et al., 2007; Kirino and Mourelatos, 2007a; Kirino and Mourelatos, 2007b; Ohara et al., 2007; Saito et al., 2007; Kamminga et al., 2010)。そのような修飾は miRNA では認められない。RNA の 3'末端の構造は、過ヨウ素酸ナトリウムを用いた酸化とそれに引き続く β -elimination 反応およびノザンブロッティングによる検出を用いて調べることができる(Vagin et al., 2006)。RNA の 3'末端に修飾が入っていた場合は、当該 RNA は一連の反応に抵抗性であり、ノザンブロッティングによってゲル上の移動度が変わらないことを確認できる。一方、修飾が入っていなければ、この反応に感受性となり、ゲル上での移動度が早くなる。この方法によって、BmN4 由来小分子 RNA の 3'末端の構造を調査したところ、これらの小分子 RNA の 3'末端には修飾が入っていることが明らかとなった(図 1.1(E))。以上の結果は、BmN4 細胞由来の小分子 RNA が piRNA であることを示している。

BmN4 細胞は PIWI タンパク質を発現する培養細胞である

piRNA は PIWI タンパク質群と結合して機能する。BmN4 細胞が内在性の PIWI タンパク質群を発現しているかどうかを調べるために、カイコゲノムにコード

された二つの PIWI タンパク質、Silkworm Piwi(Siwi)と *Bombyx mori* Argonaute3(BmAgo3)に対するポリクローナル抗体を作出した。同時に、Flag タグを付加した Siwi、BmAgo3(Flag-Siwi、Flag-BmAgo3)を発現する発現ベクターと薬剤選抜を組み合わせて、Flag-Siwi あるいは Flag-BmAgo3 を定常発現するような BmN4 細胞を作出した。Flag-Siwi、Flag-BmAgo3 の免疫沈降物に対するウェスタンブロッティングの結果、作出した抗 Siwi 抗体、抗 BmAgo3 抗体はいずれも特異的に Siwi、BmAgo3 を検出できることが明らかとなった(図 1.2)。また、これらの抗体を用いて、BmN4 細胞は内在性の Siwi、BmAgo3 を発現していることが明らかとなった(図 1.2)。

BmN4 細胞は piRNA 経路を完全なカチで発現する培養細胞である

次に、Flag-Siwi、Flag-BmAgo3 の免疫沈降物に含まれる piRNA をクローニングし、solexa シークエンシングによって大量に配列を決定した。Siwi に結合する piRNA(Siwi-bound piRNA)、および BmAgo3 に結合する piRNA(BmAgo3-bound piRNA)の性状を調べた結果、Siwi-bound piRNA は 1 番目の塩基が U に、BmAgo3-bound piRNA の 10 塩基目が A に偏っていることが明らかとなった(図 1.3)。Siwi、BmAgo3 はそれぞれキイロショウジョウバエの Piwi/Aub、Ago3 のオルソログである。Piwi/Aub は 1U piRNA に、Ago3 は 10A piRNA に結合するので、PIWI タンパク質の piRNA の塩基組成に対する選択性はカイコとキイロショウジョウバエの間で保存された特徴であると言える。

次に、Siwi-bound piRNA、BmAgo3-bound piRNA をそれぞれトランスポゾン配列にマッピングした。その結果、Siwi-bound piRNA、BmAgo3-bound piRNA はそれぞれ、トランスポゾンに対してアンチセンス(相補的)方向、センス方向にマップされることが明らかとなった(図 1.4、図 1.5)。すなわち、Siwi-bound 1U antisense piRNA はトランスポゾン mRNA を分解するための piRNA であり、BmAgo3-bound 10A sense piRNA はトランスポゾン mRNA の分解産物に由来する piRNA であった。このストランド特異性はトランスポゾンによっては逆転している場合が観察されたが(図 1.5)、同様の結果がキイロショウジョウバエ、ゼブラフィッシュで報告されている(Brennecke et al., 2007; Houwing et al., 2007; Houwing et al., 2008; Li et al., 2009a)。

最後に、Siwi-bound 1U antisense piRNA と BmAgo3-bound 10A sense piRNA が 5' 末端から 10 塩基でオーバーラップするかどうかを調査した。当該解析にはトランスポゾンにマップされる piRNA のみを供した。5' 末端から X 塩基オーバーラップするようなペアを網羅的に探した結果、10 塩基のオーバーラップを組む場合が大多数であることが明らかとなった(図 1.6)。これらの piRNA セットは互いが互いの切断反応によって作り出されたと考えることができる。また、そのようなオーバーラップは Siwi-BmAgo3 のペアでもっとも多く観察された(図 1.7)。これらの特徴は、キイロショウジョウバエやカイコの卵巣で観察される特徴に完全に合致していた。つまり、BmN4 細胞は生殖巣における piRNA 生合成経路——ピンポンサイクル——を完全なカタチで有する培養細胞であることが証明された。

考察

piRNA 経路に関する謎に取り組むためには、実験的な操作が施し易い培養細胞の存在が必須である。実際、siRNA や miRNA の生合成や作用機作の理解への培養細胞系の貢献は計り知れない。ところが現在まで、piRNA 経路を発現するような培養細胞は一切見つかっておらず、このことが、piRNA 研究を推進するにあたり大きな障壁になっている。本章において、著者は、カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞が piRNA 経路を完全なかたちで保持する培養細胞であることを証明した(Kawaoka et al., 2009)。BmN4 細胞はカイコの二つの PIWI タンパク質、Siwi と BmAgo3 を内在的に発現し、Siwi-bound 1U antisense piRNA と BmAgo3-bound 10A sense piRNA は Siwi、BmAgo3 の切断反応に基づく合成経路——ピンポンサイクル——によって生成される piRNA であることが分かった。2009 年後半、キイロショウジョウバエの OSC 細胞が piRNA 経路を発現する培養細胞であることが示されたが(Saito et al., 2009; Lau et al., 2009)、OSC 細胞と BmN4 細胞の性質は大きく異なっている。以下、その点について詳しく考察する。

昆虫の卵巣は生殖細胞である卵母細胞、栄養細胞と、体細胞である濾胞細胞より成る(Malone et al., 2009)。キイロショウジョウバエにおいては、Aub、Ago3 は卵母細胞、栄養細胞で発現し、Piwi は濾胞細胞でのみ発現することが知られている(Brennecke et al., 2007; Li et al., 2009a; Malone et al., 2009)。興味深いことに、Aub、Ago3 が発現する卵母細胞、栄養細胞においてはピンポンサイクルがアクティブである一方で、Piwi のみが発現する濾胞細胞ではピンポンサイクルが機

能していないことが判明している(Li et al., 2009a; Malone et al., 2009)。これらのことから、キイロショウジョウバエにおいては、卵巢の piRNA 経路は germ line piRNA 経路と somatic piRNA 経路の二つの経路に分けられており、ピンポンサイクルは germ line piRNA 経路に特異的であるとされている。著者らのカイコ卵巢、および初期胚を用いた研究により、カイコ卵巢においてはこのような区分は存在しないことが証明されている(Kawaoka et al., 2011a)。

OSC 細胞はキイロショウジョウバエの濾胞細胞に由来する培養細胞である。例えば、生殖細胞マーカーである Vasa タンパク質の発現は OSC 細胞では認められない(Lau et al., 2009; Saito et al., 2009)。OSC 細胞はキイロショウジョウバエの三つの PIWI サブファミリータンパク質のうち、Piwi のみを発現し、ピンポンサイクルの特徴を欠いている。これは、キイロショウジョウバエの昆虫個体を用いた実験データとよく合致する。2009 年以降、OSC 細胞をモデルとした piRNA 研究がさかんに行われるようになった (Lau et al., 2009; Saito et al., 2009; Haase et al., 2010)。OSC 細胞の強みは OSC 細胞に存在する piRNA 経路が非常にシンプルであることである。一方で、BmN4 細胞はカイコゲノムにコードされる二つの PIWI サブファミリータンパク質を発現し、また、Vasa タンパク質も発現している。さらに、BmN4 細胞においてはピンポンサイクルがアクティブである。したがって、トランスポゾン抑制にとって最も重要である germ line piRNA 経路を有する培養細胞系は現時点でも唯一 BmN4 細胞だけである。以上のことから、piRNA 経路を研究する上で、BmN4 細胞は欠くことのできない材料であると考えられる。

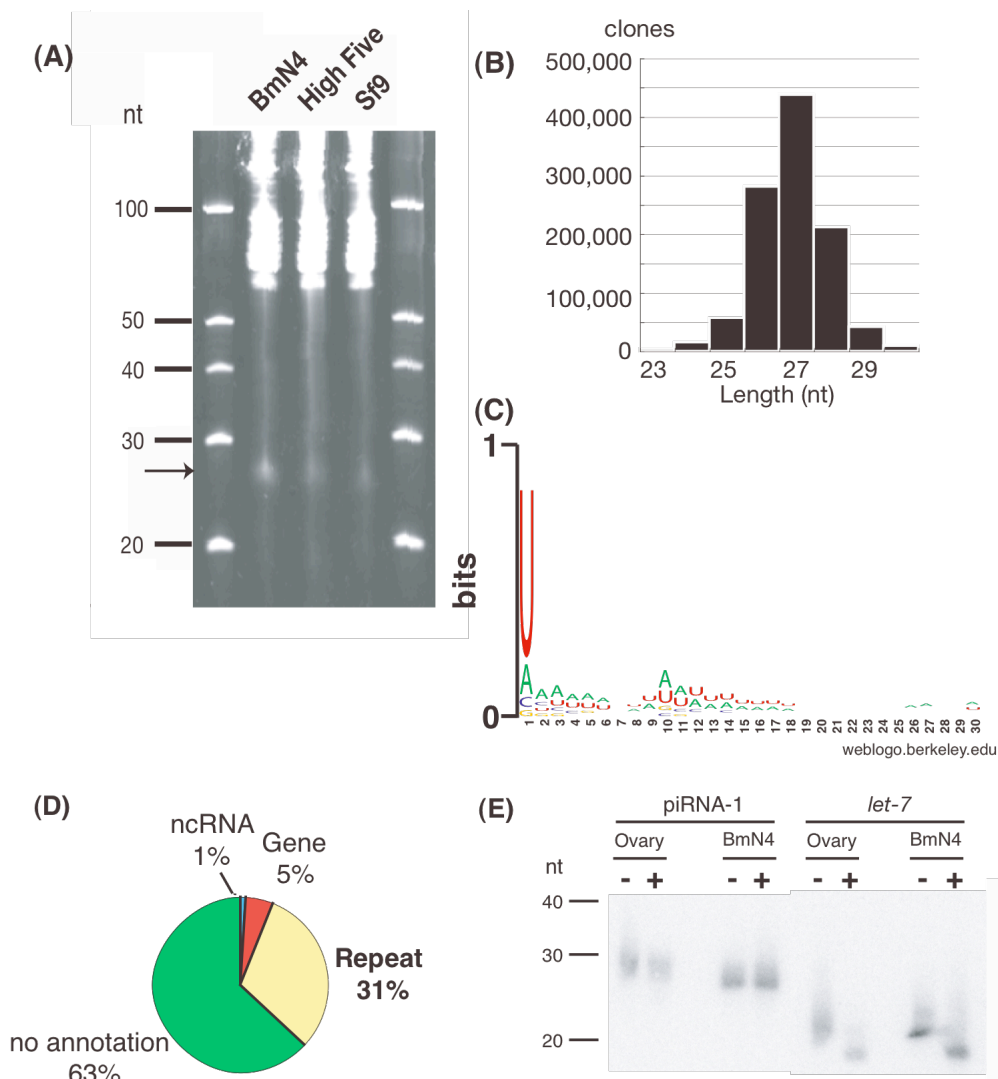


図 1.1 BmN4 細胞は内在性の piRNA を発現する培養細胞である

(A) BmN4 細胞、Sf9 細胞、および High Five 細胞に由来する total RNA を、ウレ
アを含む変性ポリアク

リルアミドゲルで電気泳動し、SYBRGold 試薬で可視化した。何れの細胞におい
ても 30 塩基未満の小分子 RNA が検出された。

(B) BmN4 細胞に由来する小分子 RNA の配列を Illumina の Solexa シーケンサ
により大量に決定し、その長さ分布を示した。クローニングした小分子 RNA は

27 塩基を頂点とする一峰性の分布を示した。

(C) BmN4 細胞に由来する小分子 RNA の塩基組成の偏りを示した。ここでは weblogo アルゴリズムによって塩基組成の偏りを表現した。クローニングした小分子 RNA は 1 番目の塩基が U に偏っていることが分かる。

(D) BmN4 細胞に由来する小分子 RNA を、カイコゲノム、トランスポゾンを含むリピート配列、予測遺伝子配列などにマップし、その組成を示した。30% をこえる小分子 RNA がトランスポゾンを含むリピート配列にマッチすることが判明した。

(E) 卵巣、BmN4 細胞に発現する piRNA と miRNA の 3' 末端の修飾を調査した。miRNA の代表として *let-7* を、piRNA の代表として、ライブラリ中で発現量が高かった piRNA-1 を用いた。放射性プローブを用いたノザン解析の結果、卵巣、BmN4 細胞に発現する *piRNA-1* は β -elimination 反応に耐性であり、3' 末端が修飾されていることが示唆された。

バイオインフォマティクス解析は当時生物測定学研究室修士課程に所属していた林伸光氏の協力のもと行った。

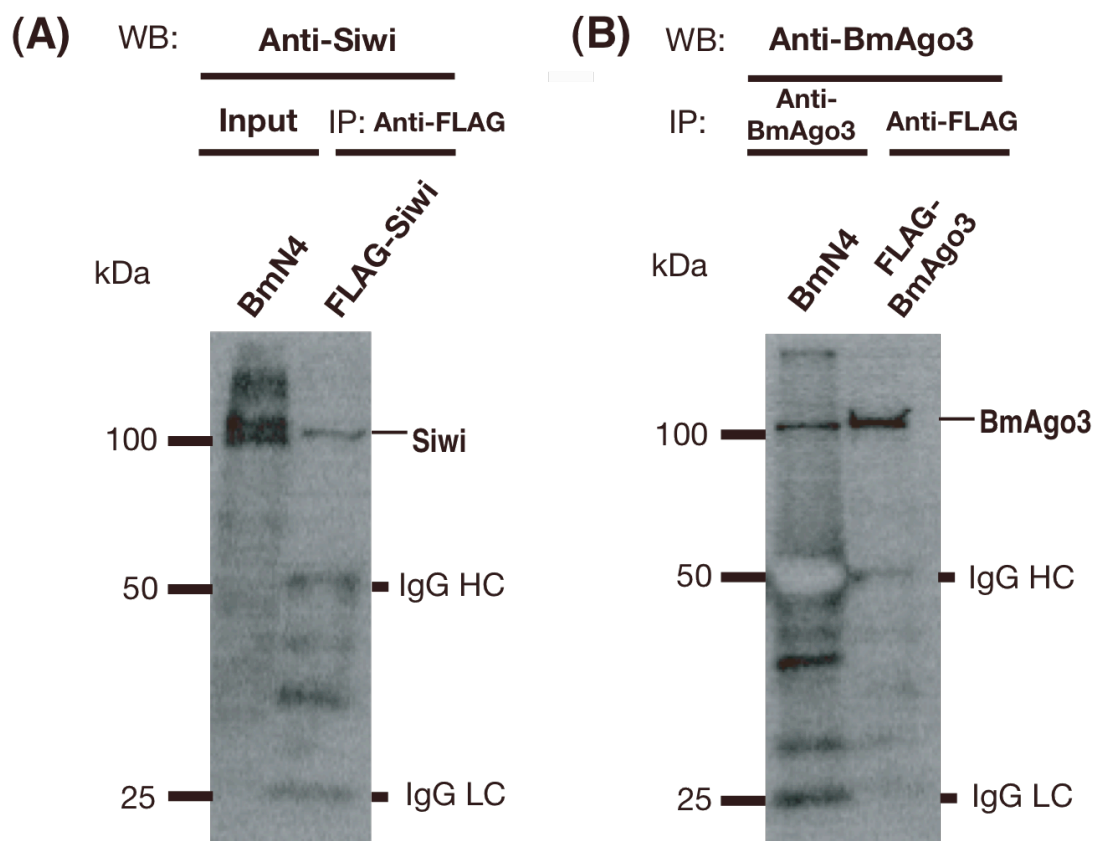


図 1.2 BmN4 細胞は内在性の PIWI タンパク質を発現する培養細胞である

(A) Siwi タンパク質に対するウェスタン解析の結果を示す。Flag-Siwi を定常発現する BmN4 細胞に由来する Flag-Siwi 免疫沈降物をポジティブコントロールとし、著者が作成したウサギ抗 Siwi 抗体によるウェスタン解析を行った。

(B) BmAgo3 タンパク質に対するウェスタン解析の結果を示す。Flag-BmAgo3 を定常発現する BmN4 細胞に由来する Flag-BmAgo3 免疫沈降物をポジティブコントロールとし、著者が作成したウサギ抗 BmAgo3 抗体によるウェスタン解析を行った。BmAgo3 は発現量が低く、input でのシグナルが認められなかったため、抗 BmAgo3 抗体による免疫沈降物を解析に供した。

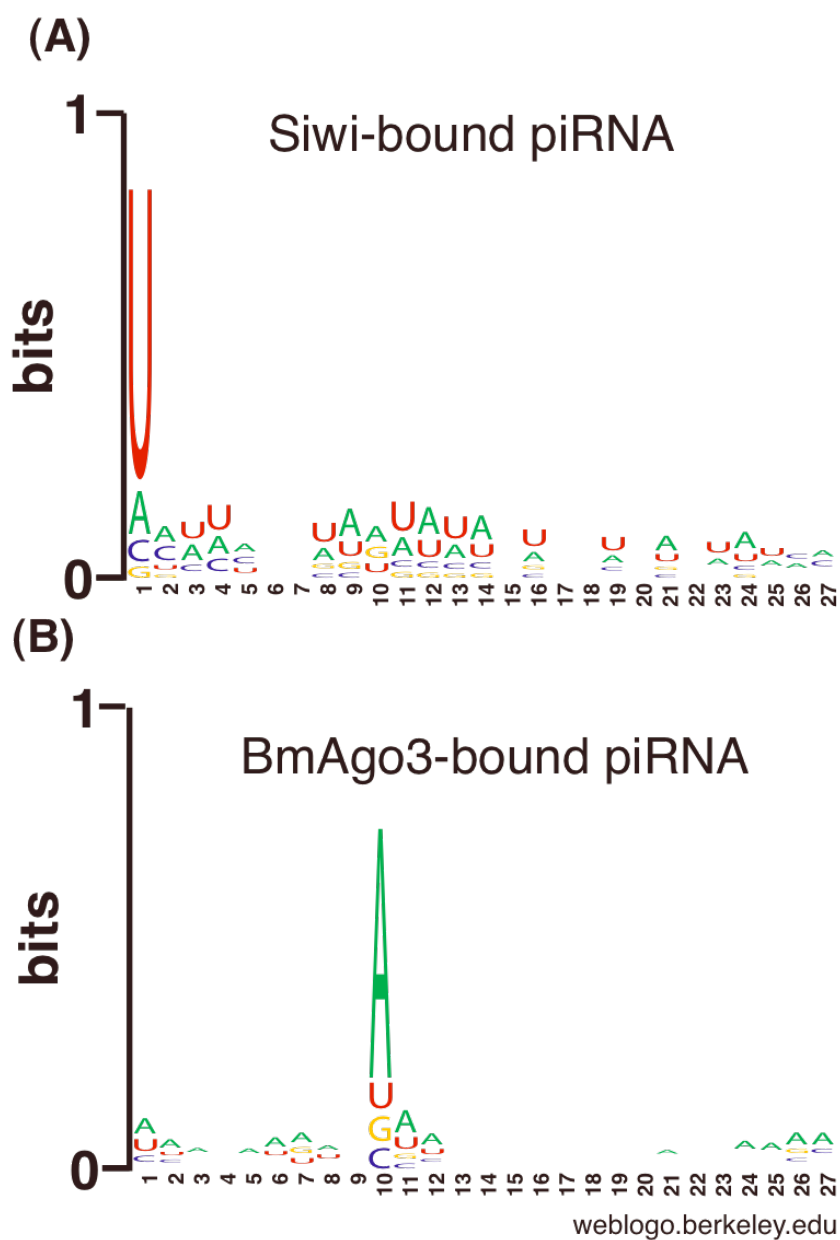
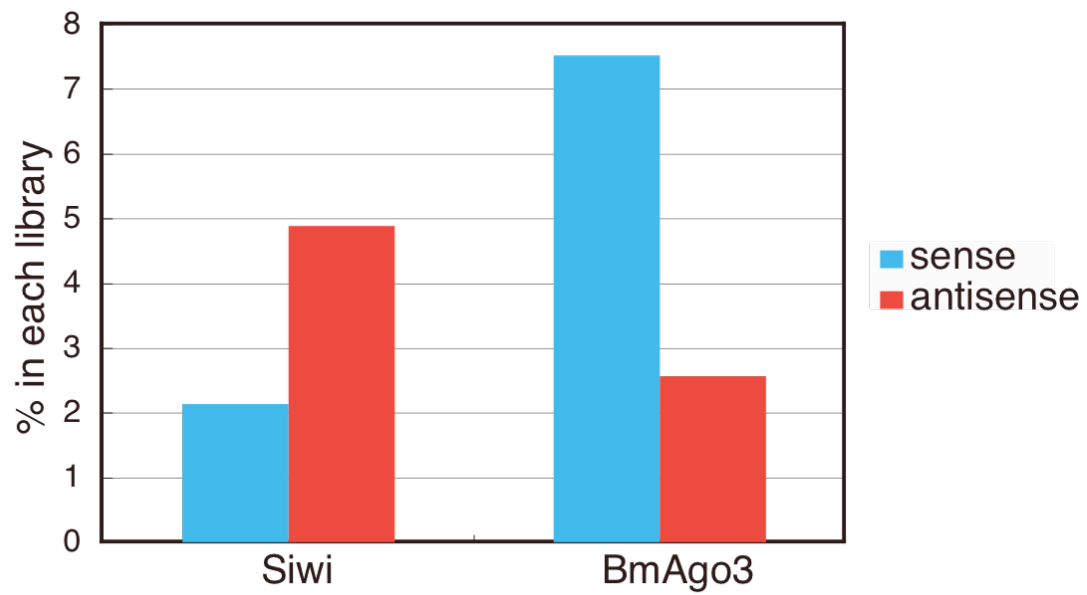


図 1.3 Siwi-bound piRNA の 1 塩基目は U に、BmAgo3-bound piRNA の 10 塩基目は A に偏っている

(A) Siwi-bound piRNA の塩基組成を示す。piRNA の 5'末端から 1 塩基ごとの塩基の偏りを表現している。

(B) BmAgo3-bound piRNA の塩基組成を示す。piRNA の 5'末端から 1 塩基ごとの塩基の偏りを表現している。

バイオインフォマティクス解析は林伸光氏の協力のもと行った。



**図 1.4 Siwi-bound piRNA はトランスポゾンに対して antisense に、
BmAgo3-bound piRNA は sense に偏っている**

Siwi-bound piRNA、BmAgo3-bound piRNA をそれぞれトランスポゾンの antisense 方向、sense 方向にマップされる二群に分けて、その頻度を表した。

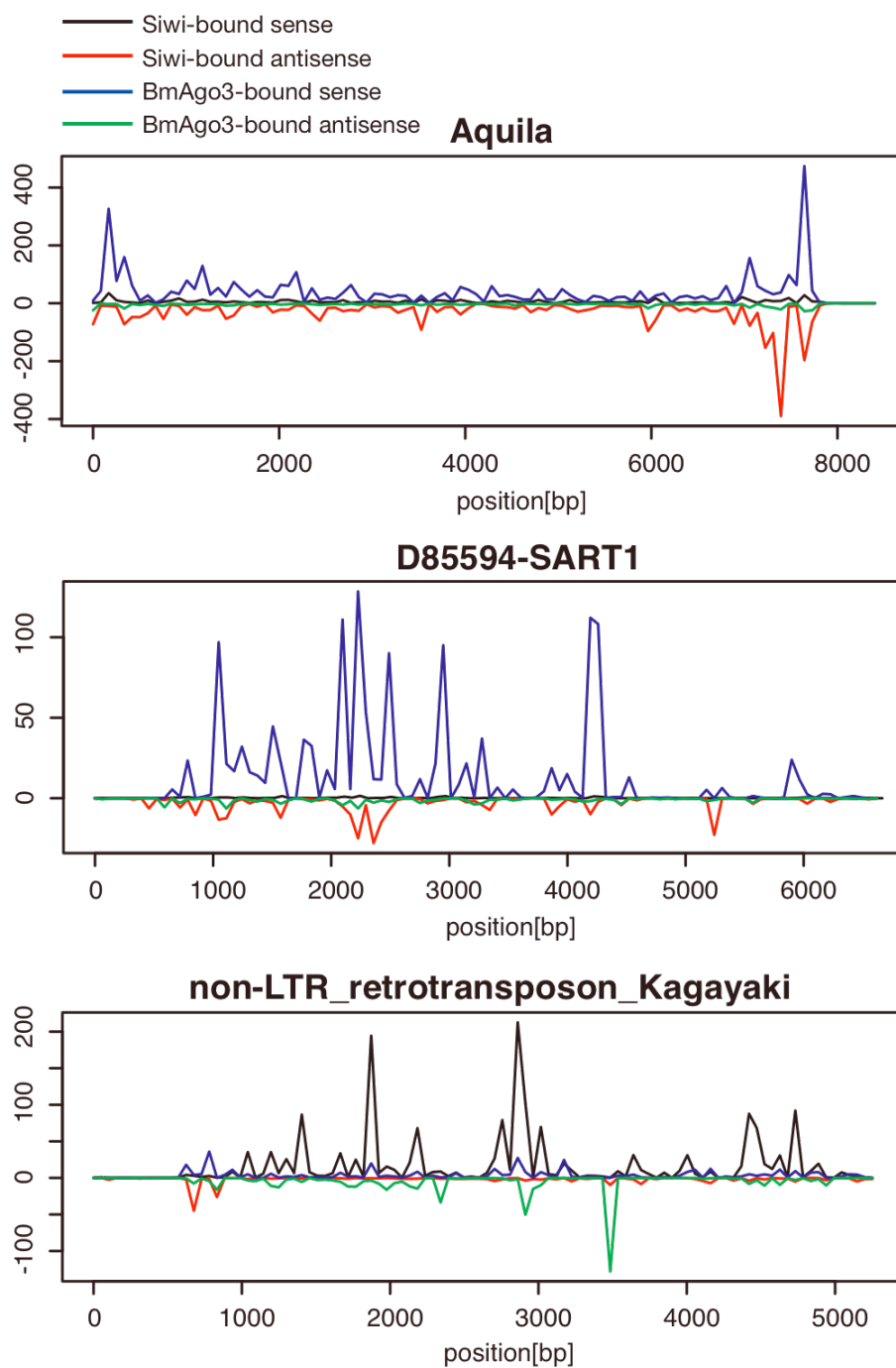


図 1.5 Siwi-bound piRNA と BmAgo3-bound piRNA の strand polarity

図 1.4 で解析した piRNA を各トランスポゾンにマップした結果を示す。

Kagayaki では、*Aquila*、*SART1* で観察される Siwi-bound piRNA、BmAgo3-bound piRNA の strand bias が逆転していることが分かる。バイオインフォマティクス解析は林伸光氏の協力のもと行った。

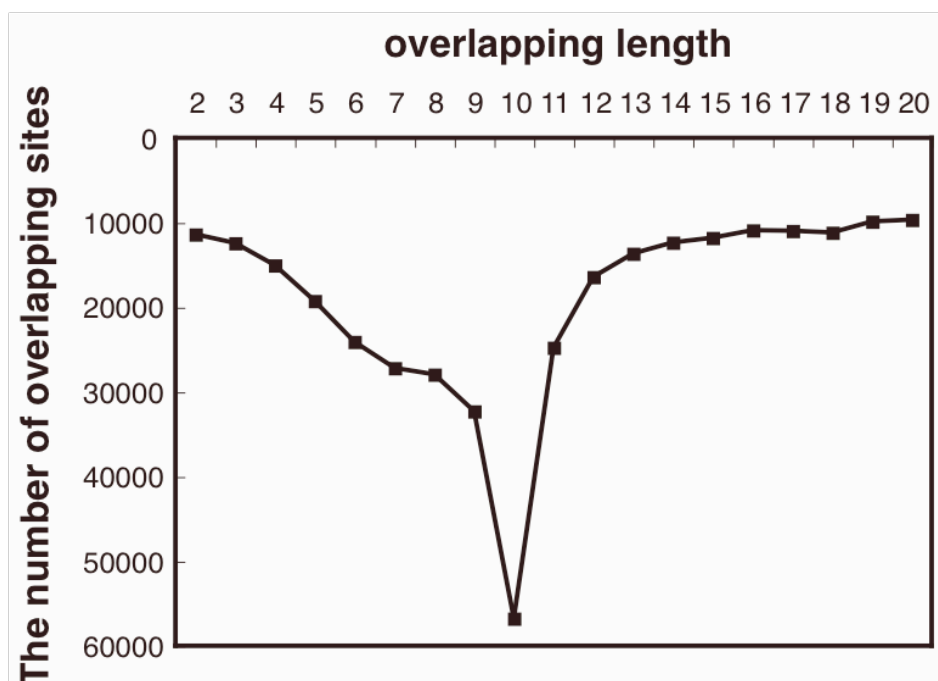


図 1.6 antisense piRNA と sense piRNA のオーバーラップ長

横軸にオーバーラップ長、縦軸に各値を満たすサイト数を記した。トランスポゾンにマップされる piRNA に解析を絞っている。オーバーラップ長は 10 塩基であるものが多い。バイオインフォマティクス解析は林伸光氏の協力のもと行った。

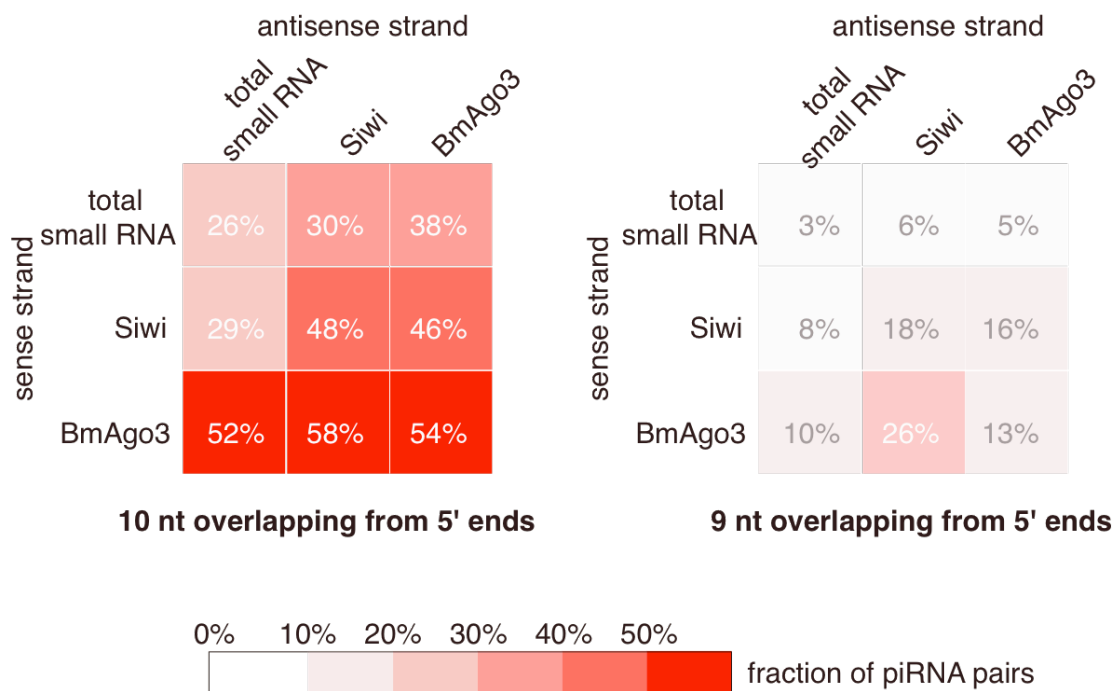


図 1.7 Siwi-bound antisense piRNA と BmAgo3-bound sense piRNA の 10 塩基オーバーラップ—カイコにおけるピンポンサイクル

各ボックスに示した組み合わせごとの 10 塩基、あるいは 9 塩基オーバーラップの頻度を、当該ペアが占める割合で表現した。Siwi-bound antisense piRNA と BmAgo3-bound sense piRNA の組み合わせ(58%)が最も多いことが分かる。一方で、Siwi-Siwi、あるいは BmAgo3-BmAgo3 の組み合わせも観察されるが、この特徴はマウスなどでも同様である(Aravin et al., 2008)。バイオインフォマティクス解析は林伸光氏の協力のもと行った。

第二章

piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構

緒言

動物の生殖巣にはトランスポゾンの活性を適切に調節するシステムが存在する。その中核を成すのが PIWI サブファミリータンパク質群とそれらに結合する 23-30 塩基の小分子 RNA、piRNA である(Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Ghildiyal and Zamore, 2009; Malone and Hannon, 2009)。これまでの研究から、piRNA の多くはトランスポゾン mRNA に対して相補的(アンチセンス方向)にマップされる。したがって、これらの piRNA は自身が結合する PIWI タンパク質をトランスポゾン mRNA に導くことができると考えられる。

その一方、宿主ゲノムがコードする遺伝子配列に相補的な piRNA はほとんど見つからない。例外として遺伝子配列にセンス方向にマップされる piRNA の存在が挙げられるが、少なくともこれらの piRNA は遺伝子 mRNA の分解を誘導することはできないと考えられ、その機能は不明である(Robine et al., 2009; Saito et al., 2009)。

それでは、piRNA 経路はどのようにしてトランスポゾンとタンパク質コード遺伝子を見分けているのだろうか？以下に、キイロショウジョウバエにおける遺伝学的解析、あるいは piRNA 配列のインフォマティクス解析から得られている知見について紹介する。

キイロショウジョウバエで発見されたトランスポゾンのひとつである P-element

は、現在の遺伝学的解析に欠かすことのできない変異源である。キイロショウジョウバエのストックセンターには P-element がゲノムの任意のローカスに挿入された系統が多数存在している。それら系統のなかには、興味深い系統が存在する(Ronsseray et al., 1991; Ronsseray et al., 1996; Ronsseray et al., 1998)。当該系統では、1 コピーの P-element がユークロマチン領域に座乗している。その P-element は活性型であり、適切な条件下において自身の配列をゲノムの他の領域に挿入する活性を持っている。ところが、新たな P-element が X 染色体上のある領域、X-TAS(Telomere-Associated-Sequence)に挿入されると、ユークロマチン領域に座乗している P-element の活性が trans に抑制される(Ronsseray et al., 1991; Ronsseray et al., 1996; Ronsseray et al., 1998)(Ronsseray et al., 2003)。同様の領域として、flamenco/COM(Complex locus)領域が挙げられる(Desset et al., 2003; Brennecke et al., 2007)。どちらの領域も、転移活性のない不活性型トランスポゾン断片が集積した領域であることが知られていた。

2006 年に piRNA が発見されると、X-TAS、そして flamenco/COM 領域が、piRNA が大量にマップされる領域—piRNA クラスタ—であることが明らかとなった(Brennecke et al., 2007)。また、当該領域への P-element の挿入によってもたらされる trans サイレンシング効果が piRNA 経路に関与する遺伝子群の変異によって認められなくなること、また、当該領域への P-element の挿入が piRNA 様の小分子 RNA を産生するトリガーとなりうることが示唆された(Todeschini et al., 2010)。これらの結果から、piRNA 経路によるトランスポゾン認識において、piRNA クラスタが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。しかしなが

ら、このショウジョウバエを用いた研究で観察された小分子 RNA の特徴や、piRNA の前駆体となりうる RNA 転写物の性状を含め、piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構の詳細は未知のままであった。

カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞は、piRNA 経路を完全なかたちで保持することが証明された唯一の培養細胞である(Kawaoka et al., 2009)。本章では、BmN4 細胞を利用して、piRNA 経路がどのようにしてトランスポズンを認識しているか、という問題に取り組んだ。まず、カイコの *piggyBac* トランスポズンを用いた転移システムを利用して、緑色蛍光タンパク質遺伝子である EGFP を含むトランスジーンを BmN4 ゲノムに転移させ、トランスジーンが発現が piRNA 経路によって抑制されるかどうかを検証した。すなわち、piRNA 経路がトランスジーンをトランスポゾンである、と誤認するようなラインの構築を試みた。また、non-biased なスクリーニングによって得られた複数のトランスジェニックラインを利用して、トランスジーンが piRNA 経路を介して抑制されるための条件を探索した。

材料と方法

培養細胞

BmN4 細胞は IPL-41 培地(Applichem)あるいは TC-100 培地(Invitrogen)に非働化処理牛胎児血清を 10%添加した培地を用いて 27°Cにて培養した。

クローナルラインの作出

BmN4 細胞に EGFP、ピューロマイシン耐性遺伝子をもつ pPGIA ベクターをトランスフェクションした。この際、piggyBac トランスポゼースをコードするヘルパーRNA を同時にトランスフェクションした。トランスフェクション試薬は Cellfectin(Invitrogen)を用いた。方法は基本的に Mitsutake and Kobayshi, 2011 に記された方法に従った(Mitsutake and Kobayashi, 2011)。BmN4 細胞はピューロマイシンによる薬剤選抜後、限外希釈培養によりクローン化し、その後継代することでライン化した。

RNA 抽出

RNA 抽出は、第一章に記載した方法で行った。

ノザン解析

ノザンブロットは第一章に記載した方法に準じた。GFP piRNA を検出するためのプローブは、MaxiScript kit(Ambion)と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP を用いて作成した。

β -elimination

過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応は、第一章に記載した方法に準じた。

Trans 抑制効果の検証

GFP を発現するレポーターコンストラクトとして、pIZ/V5-His vector(Invitrogen) に GFP を導入したベクターを作成した。また、pGL3-Basic vector(Promega)にバキュロウイルスの *ie1* プロモーターを導入したコントロールベクター(pGL3-*ie1*)を作成し、トランスフェクション効率の正規化に用いた。トランスフェクション試薬は FuGENE HD(Roche)を使用した。

Flag-Siwi、Flag-BmAgo3 を定常発現する#8 細胞の作成

第一章に記載した方法に準じた。

免疫沈降と定量 PCR

Flag-Siwi、Flag-BmAgo3 を発現する#8 細胞からのライセートの調製は常法に従った。免疫沈降は抗 Flag 抗体を用いて行い、複合体に含まれる RNA は miRVana miRNA extraction kit(Ambion)によって抽出した。得られた RNA の逆転写反応と PCR 反応は miScript kit(Qiagen)を用いて行った。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

5'-TGAACCTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGT-3' for antisense GFP piRNA-1,
5'-CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC-3' for sense GFP piRNA-1, and
5'-TACTATACAACCTACTACCTCA-3' for *let-7*.

小分子 RNA の精製と小分子 RNA ライブラリの作成

第一章に記載した方法に準じた。

小分子 RNA の配列解析

第一章に記載した方法に準じた。

RACE

RACE 実験は GeneRacer kit(Invitrogen)を用い、添付の説明書に従って行った。

シーケンシングデータ

本研究で得られたシーケンスデータはDRA000374(DDBJ)としてデータベースに登録した。

結果

GFP 抑制が観察されるクローナルラインの樹立

pPGIA ベクターと piggyBac トランスポゼースをコードする RNA をあコトランスフェクションし、その後ピューロマイシンによる薬剤選抜を行うことにより、トランスジーンがゲノムに組み込まれた BmN4 細胞(親ライン)を作出した(図 2.1)。親ラインを限外希釈して培養することで、様々なコピー数のトランスジーンを有するクローナルラインを 8 ライン作出した(図 2.1)。得られた 8 ラインはそれぞれ#1 から#8 と名付けた(図 2.2)。

蛍光顕微鏡によって GFP 蛍光の観察を行った結果(図 2.2)、#1 は全ての細胞が GFP を発現していることが判明した。その一方、#2 と#3 は GFP を発現する細胞と発現しない細胞の二種類の細胞から構成されていた。また、#4 から#8 は GFP を全く発現していなかった。それぞれのラインに由来する genomic DNA を鋳型として定量 PCR とインバース PCR を行った結果、全てのラインは少なくとも 1 コピーのトランスジーンを保持していることが分かった。以上の結果から、#2 から#8 では、何らかの機構によって GFP の発現抑制が起こっている、と考えられた。

GFP に由来する piRNA の検出

次に、観察された GFP の発現抑制が小分子 RNA、特に piRNA 経路を介したも

のである可能性を検討した。 α - P^{32} [UTP]によって内部標識したセンスあるいはアンチセンス GFP プローブを用いて、各ラインから調製した total RNA に対するノザンブロッティングを行った。その結果、#3、#5、そして#8 の三つのラインにおいて、長さが 26-30 塩基の小分子 RNA の発現が観察された(図 2.3(A))。第一章で述べた通り、piRNA の 3'末端は 2'-O-メチル化によって保護されている。過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化と β -elimination 反応、そしてノザンブロッティングを組み合わせることで、#8 に発現している GFP にマッチする小分子 RNA の 3'末端の構造を調査した。その結果、GFP にマッチする小分子 RNA の 3'末端は修飾によって保護されていることが判明した(図 2.3(B))。以上の結果と以下に述べる解析結果により、GFP にマッチする小分子 RNA は piRNA であることが証明されたので、以後、これらの小分子 RNA を GFP piRNA と表現する。また、GFP piRNA の発現が認められた#3、#5、#8 を piRNA-silenced line、GFP を安定に発現する#1 を non-silenced line、GFP piRNA の産生を伴わないが GFP も発現しない残りのラインを non-piRNA-silenced line と表記することにする。

GFP piRNA は標的を trans に抑制する

GFP piRNA は自身の配列依存的に自身が結合する PIWI タンパク質を標的、すなわち GFP mRNA に導くことにより、GFP の発現を抑制していると考えられる。つまり、GFP piRNA は trans に GFP を抑制しているはずである。このことを証明するために、トランスジェニックラインの作出に用いた pPGIA ベクターと基本骨格の異なる pIZ ベクターに GFP をクローニングした発現ベクター (pIZ/GFP

ベクター) を利用した。実際には、pIZ/GFP ベクターを各種ラインにトランスフェクションし、観察される GFP の蛍光を観察した。その結果、GFP piRNA を発現しない野生型 BmN4 細胞と比較して、piRNA-silenced line では GFP の発現が弱いことが判明した(図 2.4(A))。すなわち、GFP に対する trans 抑制効果が観察された。また、GFP piRNA も GFP も発現しない non-piRNA-silenced line では、GFP に対する trans の抑制効果は観察されなかった。この結果から、non-piRNA-silenced line では piRNA-silenced line とは違ったメカニズムで、cis に GFP の発現を抑制していると考えられた。また、この蛍光顕微鏡観察による結果はウェスタンブロッティングによる半定量的解析結果によって支持された(図 2.4(B))。以上を要するに、piRNA-silenced line では GFP piRNA による trans 抑制効果が認められた。

GFP piRNA はピンポンサイクルによって増幅される

次に、piRNA-silenced line において発現する GFP piRNA の性状を調査した。#3、#5、#8 の3つのラインから total RNA を調製し、cDNA ライブラリを作成後、solexa シーケンシングによる大量配列決定を行った。得られた配列は GFP を含む pPGIA ベクターにマッピングした(図 2.5)。第一章に記載した BmN4 細胞由来の piRNA ライブラリ中には、pPGIA ベクターや GFP にマッチするような piRNA は存在しなかった。pPGIA に対して piRNA-silenced line に由来する piRNA をマッピングした結果を図 2.5 に示す。ベクター全体に渡って多量の piRNA がマッピングされている様子が観察されるが、興味深いことに、ピューロマイシン耐

性遺伝子に該当する部分にマップされる piRNA は非常に少なかった。これは、ピューロマイシン耐性遺伝子に対する抑制が起こった細胞がセルラインとして生存できなかったためであると考えられる。また、GFP に対する piRNA が多量に同定された。GFP piRNA の発現量は#8 で最も多く、この結果は上記のノザンブロットティングの結果とよく合致した。一方、GFP に対して相補的(アンチセンス)な方向にマップされる piRNA の方が、センス方向にマップされる GFP piRNA よりも多いことも判明した(図 2.6)。すなわち、GFP piRNA におけるアンチセンスバイアスが観察された。さらに、GFP antisense piRNA の一番目の塩基は U に偏っており、GFP sense piRNA の 10 番目の塩基は A に富んでいた(図 2.7)。加えて、1U antisense GFP piRNA と 10A sense GFP piRNA はそれぞれの 5'末端から 10 塩基が完全に相補していた(図 2.8)。GFP piRNA の実に 90%以上がこのピンポンペアに参加していた。また、Flag-Siwi、あるいは Flag-BmAgo3 を定常発現するような#8 ラインを作出し、piRNA-qPCR により Flag-Siwi あるいは Flag-BmAgo3 複合体に含まれる GFP piRNA の鎖の偏りを調査した。その結果、Flag-Siwi は 1U antisense GFP piRNA と、Flag-BmAgo3 は 10A sense GFP piRNA と選択的に結合することが証明された(図 2.9)。これらの特徴はトランスポゾンにマッチする piRNA の特徴と酷似していた。よって、piRNA-silenced line ではピンポンサイクルを介した GFP 抑制が起こっている、と考えられた。以上の結果から、#8 ラインをはじめとする piRNA-silenced line では、piRNA 経路が GFP をトランスポゾンとして認識し、抑制していると考えられた。

piRNA 経路によるトランスポゾン認識における piRNA クラスタの役割

piRNA-silenced line では、何故、piRNA 経路が GFP をトランスポゾンとして認識するのだろうか？ piRNA-silenced line では、1U antisense GFP piRNA によって GFP mRNA が分解されている。GFP mRNA は pPGIA に含まれる外来性の *actin3* プロモータによって転写されている。特記すべき点は、pPGIA ベクターには antisense GFP を転写するようなプロモータが存在しない、ということである。それでは、1U antisense GFP piRNA はどのようにして作られたのだろうか？ 著者は、antisense GFP RNA がゲノム上のトランスジーンカセット挿入部位近傍にある内在性のプロモータによって転写されている、という仮説を立てた。また、antisense GFP RNA の存在そのものが piRNA 経路による GFP の発現抑制の引き金であると予想した。

このことを検証するために、各ラインの total RNA を抽出し、antisense GFP のみを検出する strand-specific RT-PCR を行った。ところが予想に反して、調査した全てのラインにおいて antisense GFP RNA の発現が検出された(データ示さず)。この結果から、antisense GFP RNA の発現だけでは、piRNA 経路は働かないことが判明した。そこで、antisense GFP RNA が転写されるゲノム領域が重要である、という新しい仮説を考え、各ラインにおいて antisense GFP RNA を転写する内在性転写開始点を RACE 法によって網羅的に同定することを試みた。

結果として、重複するものを含めると、piRNA-silenced line より 62 個、non-silenced line より 13 個、non-piRNA-silenced line より 48 個の転写開始点を同定すること

ができた。それらをカイコゲノムにマッピングし、piRNA-silenced line にのみ観察される転写開始点を探索した。すると、ある転写開始点が、piRNA-silenced line に共通に見つかり、それ以外のセルラインでは見つからない、ということが分かった(図 2.10)。

興味深いことに、この転写開始点は piRNA クラスタに埋もれたゲノムローカス内に存在した(図 2.10)。つまり、この piRNA クラスタには、3 つの独立したセルラインで同じようにトランスジーンが挿入された、ということである。トランスジーンがその領域に捕われ易い、という点から、当該 piRNA クラスタを *torimochi* と名付けた。詳細に解析した結果、*torimochi* から転写された antisense GFP RNA が内在性の *torimochi* RNA と融合していることが判明した(図 2.10)。また、これは予期しなかったことであるが、使用したトランスジーンをアンチセンス方向に読んだときに、強力なスプライシングアクセプタ配列が存在していた。*torimochi* RNA に存在するスプライシングドナーとの組み合わせによって、*torimochi*-antisense GFP 融合転写物がつくられていると考えられた。

このようなキメラな転写ユニットは piRNA-silenced line 以外のセルラインでは存在しなかったため、*torimochi*-antisense GFP 融合転写ユニットこそが新規の antisense GFP piRNA の源であると考えられた。実際、*torimochi* と antisense GFP RNA の融合部位をまたぐようなキメラ piRNA を探索したところ、*torimochi* と antisense GFP RNA の融合部位を 2 塩基あるいは 3 塩基またぐようなキメラ piRNA が piRNA-silenced line 特異的に見つかった(図 2.10)。以上のことから、

torimochi-antisense GFP 融合転写ユニットが新規な antisense GFP piRNA の源であることが示唆された。

考察

本章では、piRNA 経路がどのようにトランスポゾンと認識しているかという命題に取り組んだ。まず、piRNA 経路が GFP を抑制するようなトランスジェニック BmN4 細胞ラインを作出し、piRNA による GFP 抑制が起こる条件を探索する、という方法を採用した。その結果、piRNA 経路による GFP 抑制が起こるラインを独立に 3 つ樹立することに成功し、piRNA クラスタへのトランスジーン挿入とそれに続くアクティブな転写が起こることが新規な piRNA の合成を引き起こす、という結論を得た。トランスジーン挿入部位に制限を持たせないスクリーニングに基づく本実験から得られた結果は、キイロショウジョウバエやマウスで行われた遺伝学的な解析と互いに相補して、piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構の理解につながるものであると考えられる。

共同研究者である小林真希氏らが行った未発表の実験によって、*torimochi-antisense* GFP 融合転写物と全く同じ構造を持つユニットを pIZ ベクターによって発現させても、新規な GFP piRNA は産生されない、ということが明らかになっている。また、単純にトランスジーンを pIZ ベクターによって細胞内で一過性に発現させても、piRNA 様の小分子 RNA はつくられない。したがって、piRNA 経路に認識されるには、ある特定のゲノム環境からの転写が必要であると考えられる。本章で確立した BmN4 細胞を用いたシステムは、この答えを見つけるのに適している。すなわち、piRNA を産生するためのシグナル配列がゲノムにコードされているとすれば、そのシグナル配列を実験的に同定する

ことが可能である。具体的には、*torimochi* の周辺配列を持ったトランスジーンを過剰発現させ、新規な piRNA が産生される条件を見つけることで、当該シグナル配列の絞り込みを行うことができる。

piRNA クラスタのクロマチン修飾状態や、piRNA 経路によるクロマチンや DNA 修飾の可能性に関する研究としては、クロマチン免疫沈降法(ChIP)とそれに続く大規模シーケンス(ChIP-seq)、またバイサルファイト PCR による DNA メチル化解析などが行われてきた。これらの研究では、キイロショウジョウバエやマウスの組織がサンプルとして使用されている。しかしながら、クロマチンの状態は細胞種によって大きく異なることが知られているため、これらの研究で使用されたサンプルは概して不均一であると言える。一方、BmN4 細胞は均一な培養細胞であるため、細胞の不均一性を考慮する必要はない。現在、共同研究者の原加保里氏らによって、BmN4 細胞を用いた ChIP-seq によるクロマチン修飾の網羅的解析が行われている。それらの結果と piRNA 産生シグナル配列の情報を組み合わせることで、piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構に関して、より一層効率的な研究を推進することができるだろう。

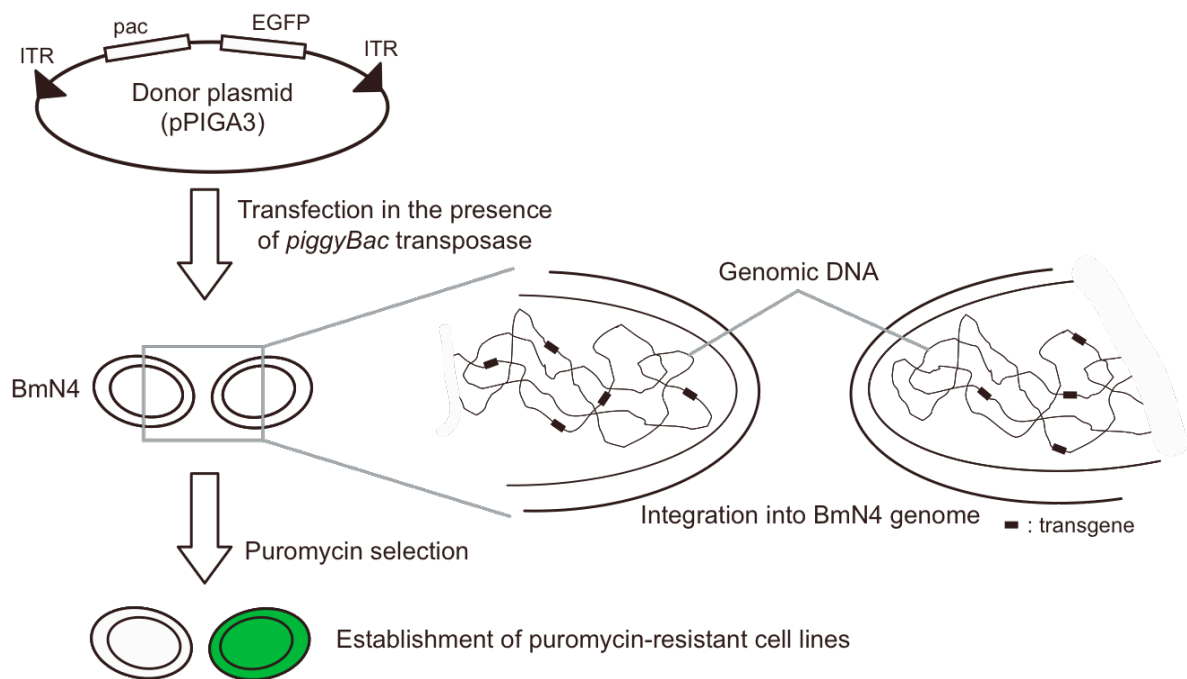


図 2.1 PiggyBac トランスポゾンを利用したトランスポジションシステム

Mitsutake and Kobayashi, 2011 による方法。Donor plasmid の両端には PiggyBac トランスポゼースに認識される Inverted terminal repeat(ITR)配列がコードされており、その間にピューロマイシン耐性遺伝子(pac)ならびに EGFP 遺伝子がコードされている。PiggyBac トランスポゼースをコードする RNA と donor plasmid をコトランスフェクションすることにより、ITR に挟まれた領域が BmN4 ゲノムに転移する。ピューロマイシンによる薬剤選抜によって転移が正常に起こった細胞のみを選抜し、限外希釈培養することによって転移が起こった細胞をクローン化することができる。

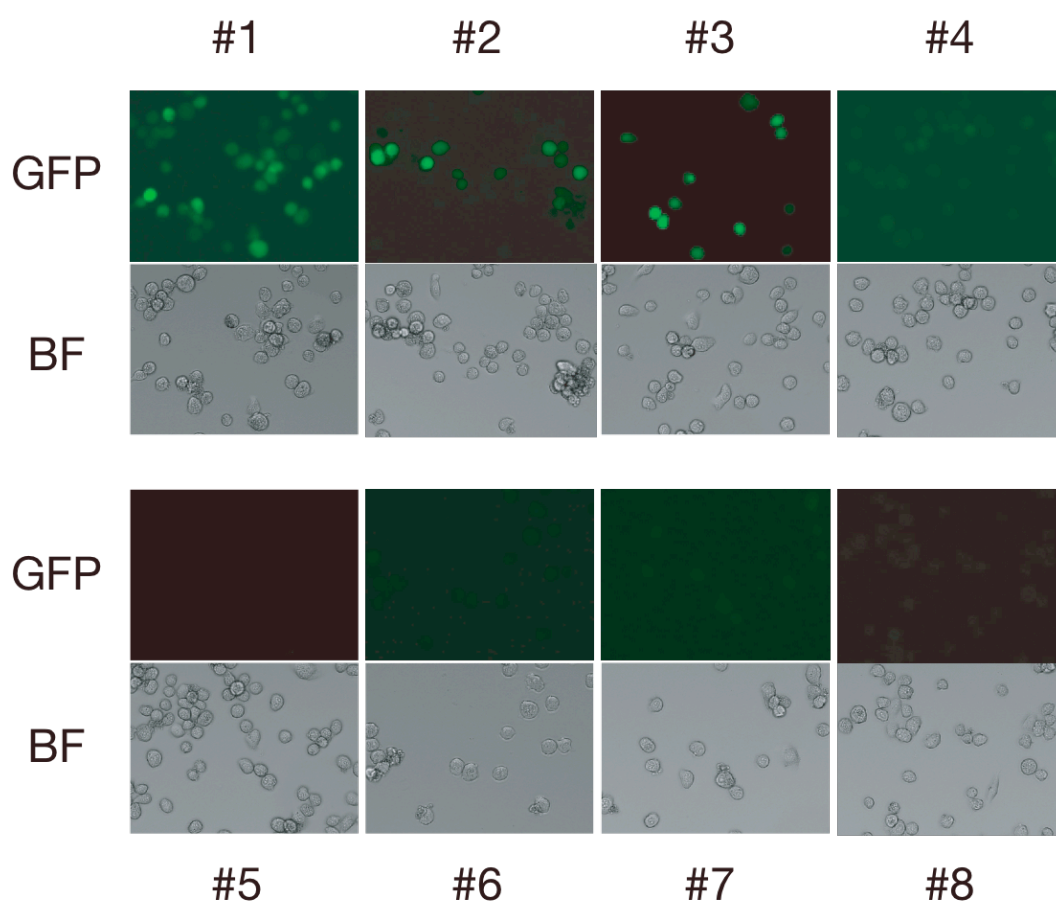


図 2.2 図 2.1 の方法によって得られたクローナルライン

明視野(BF)と比較すると、#1 ラインはほぼすべての細胞が GFP を発現していることが分かる。一方で、#2-#8 ラインは GFP-negative な細胞を含む。これらのラインは山口大学博士課程の光武宏氏によって樹立された。

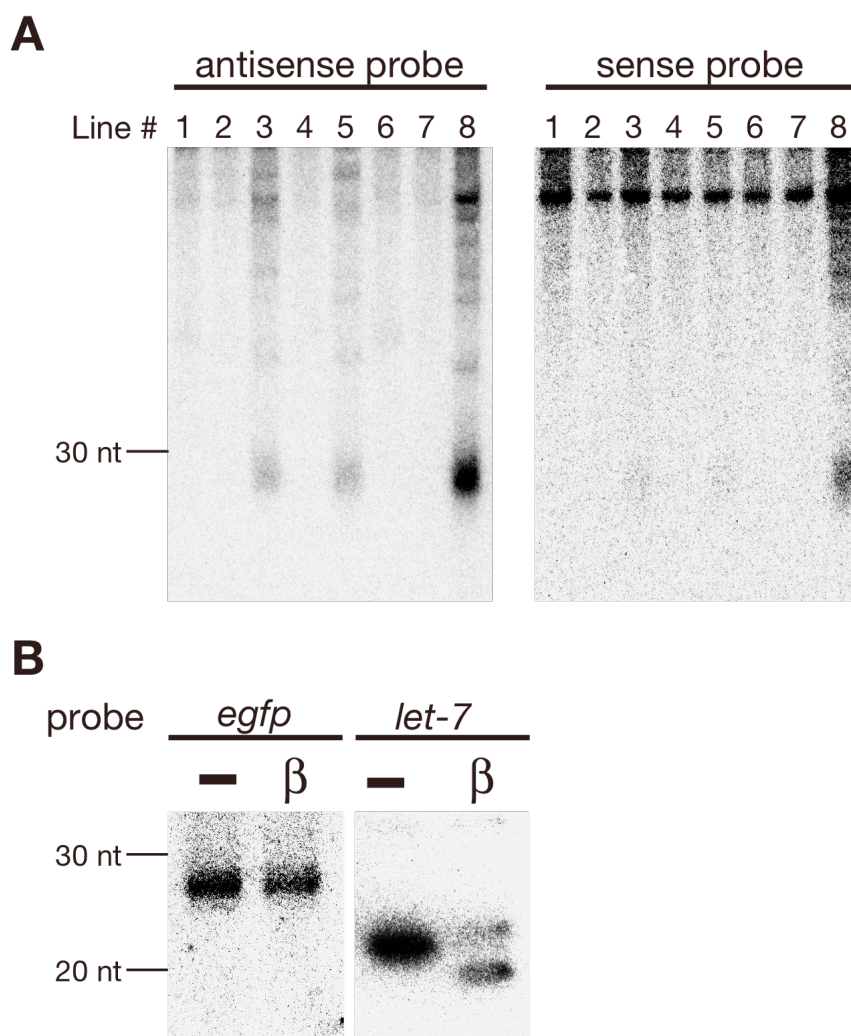


図 2.3 GFP トランスジェニック BmN4 細胞における GFP piRNA の発現

(A) #1-#8 に由来する total RNA をノザン解析に供した。放射性同位体により内部標識した GFP プローブ(sense、antisense GFP RNA を検出できるもの)をメンブレンにハイブリダイズした。#3、#5、#8 は sense、antisense GFP small RNA を発現していた。

(B) 3'末端が修飾されない miRNA の代表である *let-7* は β -elimination 反応に感受性であり、移動度が変化するが、GFP antisense small RNA は耐性であった。

本実験は分子細胞生物学研究所博士課程の小林真希氏による。

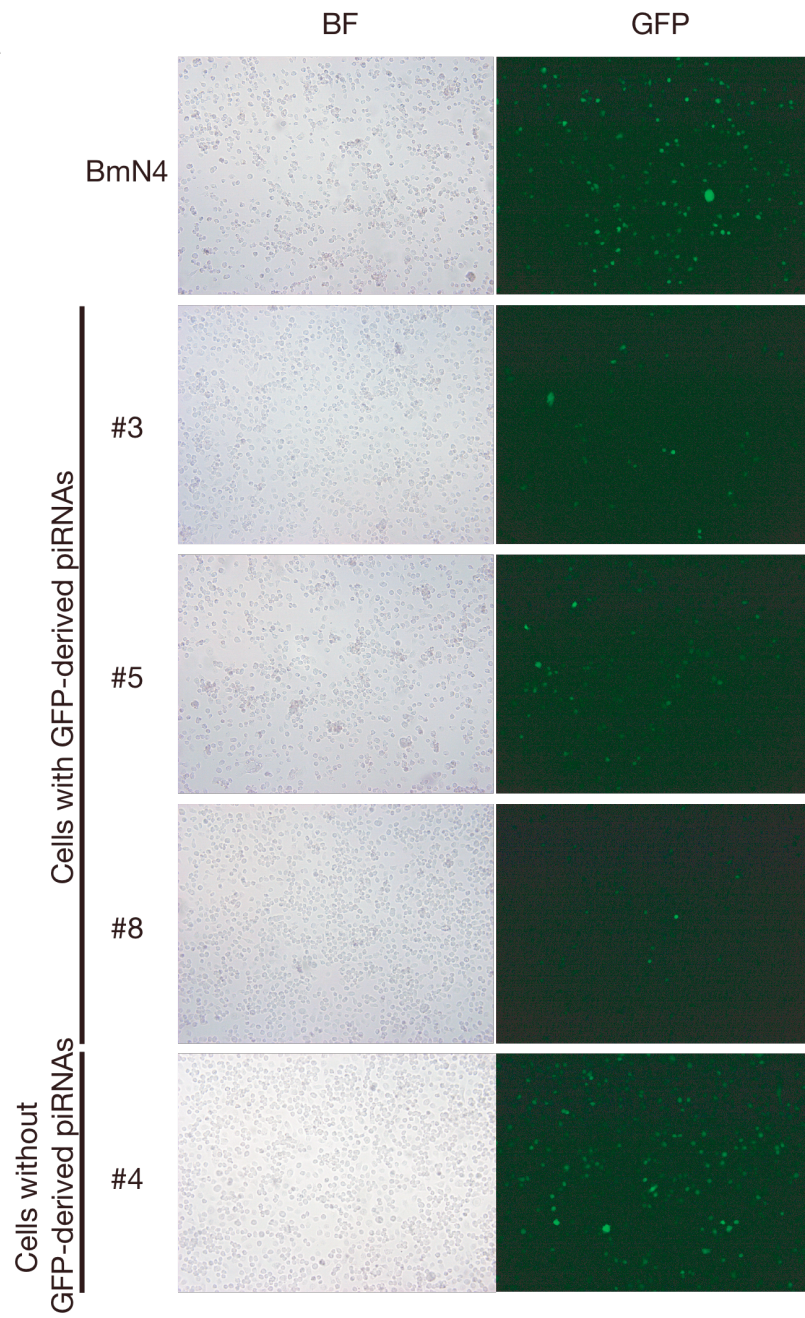
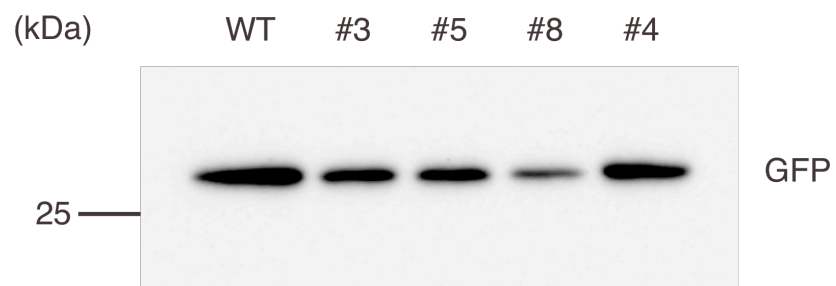
A**B**

図 2.4 GFP piRNA は GFP の発現を trans に抑制する

GFP を発現しない野生型 BmN4 細胞、GFP piRNA を発現する#3、#5、#8、そして、GFP も GFP piRNA も発現しない#4 に、pIZ/GFP ベクターをトランスフェクションした。

(A) 蛍光顕微鏡による観察を行った。

(B) ライン間におけるトランスフェクション効率の違いを、pGL-3/Luc ベクターをトランスフェクションし、総タンパク質量あたりの Luc タンパク質の発現を計測することで補正した。補正後のタンパク質抽出物を、抗 GFP 抗体を用いたウェスタン解析に供した。

本実験は、昆虫遺伝研究室 特任助教である木内隆史博士の協力のもと行った。

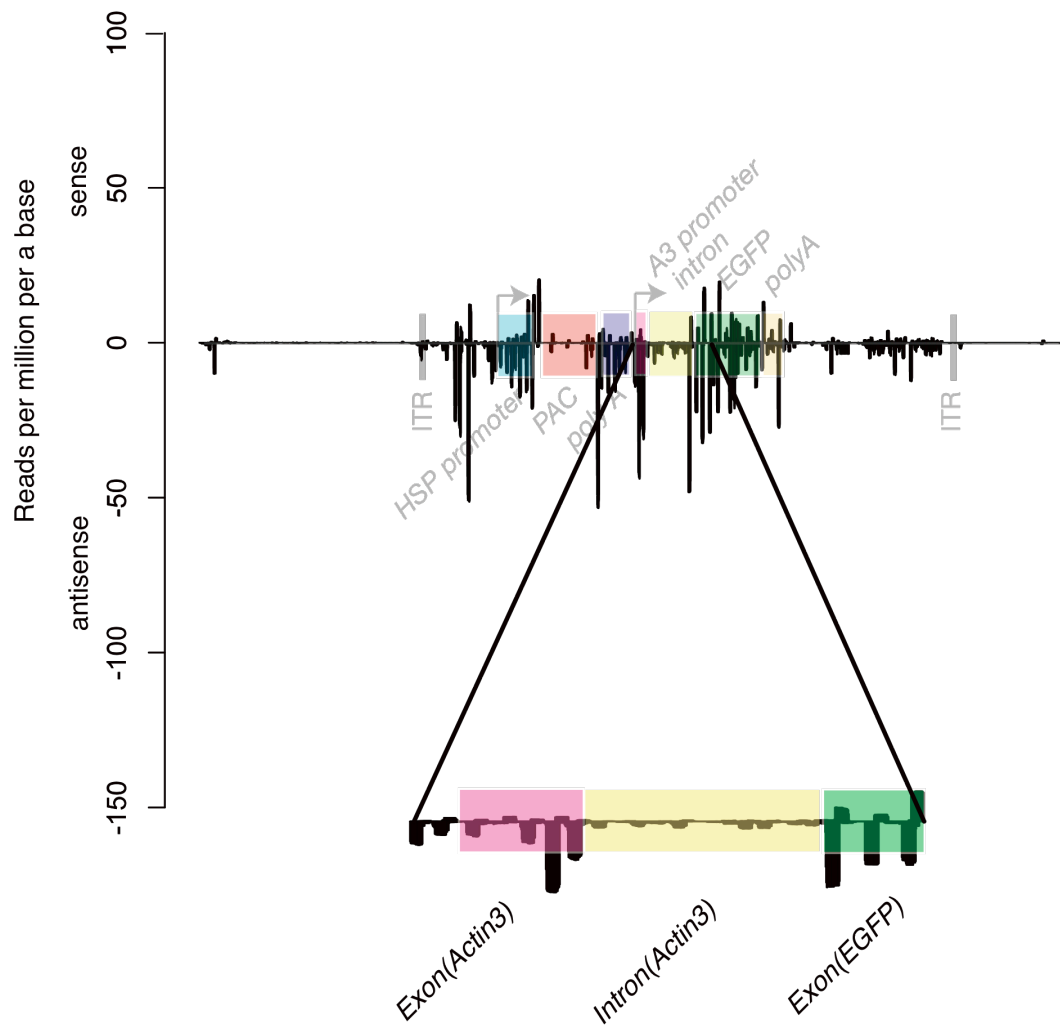


図 2.5 pPGIA/EGFP ベクターにマップされる piRNA のマッピングパターン

#3 に由来する piRNA のマッピングパターンを代表例として示した。ベクターの構成を示す簡略図を重ねて表現した。ピューロマイシン耐性遺伝子(*PAC*)に該当する部分、あるいは *actin3* のイントロン配列における piRNA 密度が低いことが分かる。

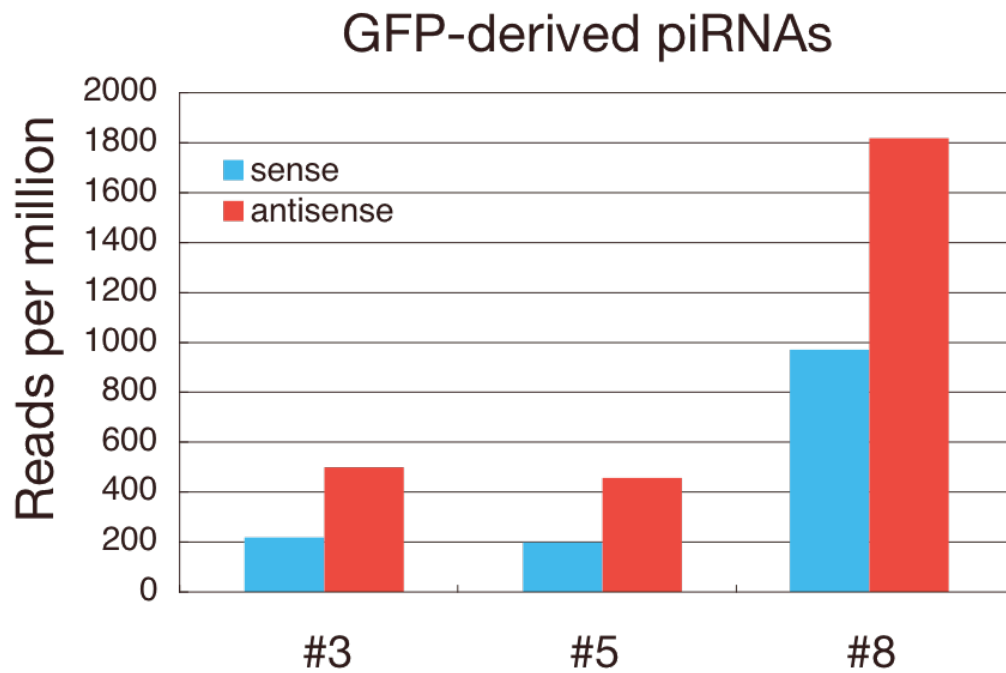


図 2.6 GFP piRNA は GFP に対して antisense に偏っている

GFP にマップされる piRNA の strand bias を示した。何れのラインにおいても、antisense GFP piRNA のほうが sense GFP piRNA よりも多く発現しており、図 2.3 のノザン解析結果と良く適合している。

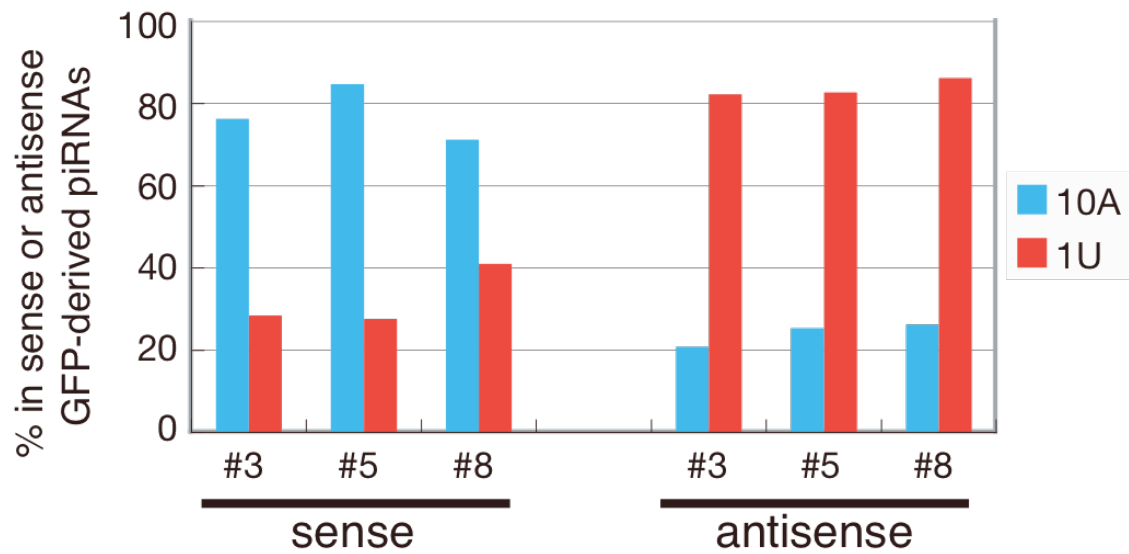


図 2.7 GFP antisense piRNA の 1 塩基めは U に、GFP sense piRNA の 10 塩基めは A に偏っている

GFP piRNA を GFP sense piRNA、GFP antisense piRNA の二群に分け、1 番目の塩基が U である割合(1U)と 10 番目の塩基が A である割合を示した。

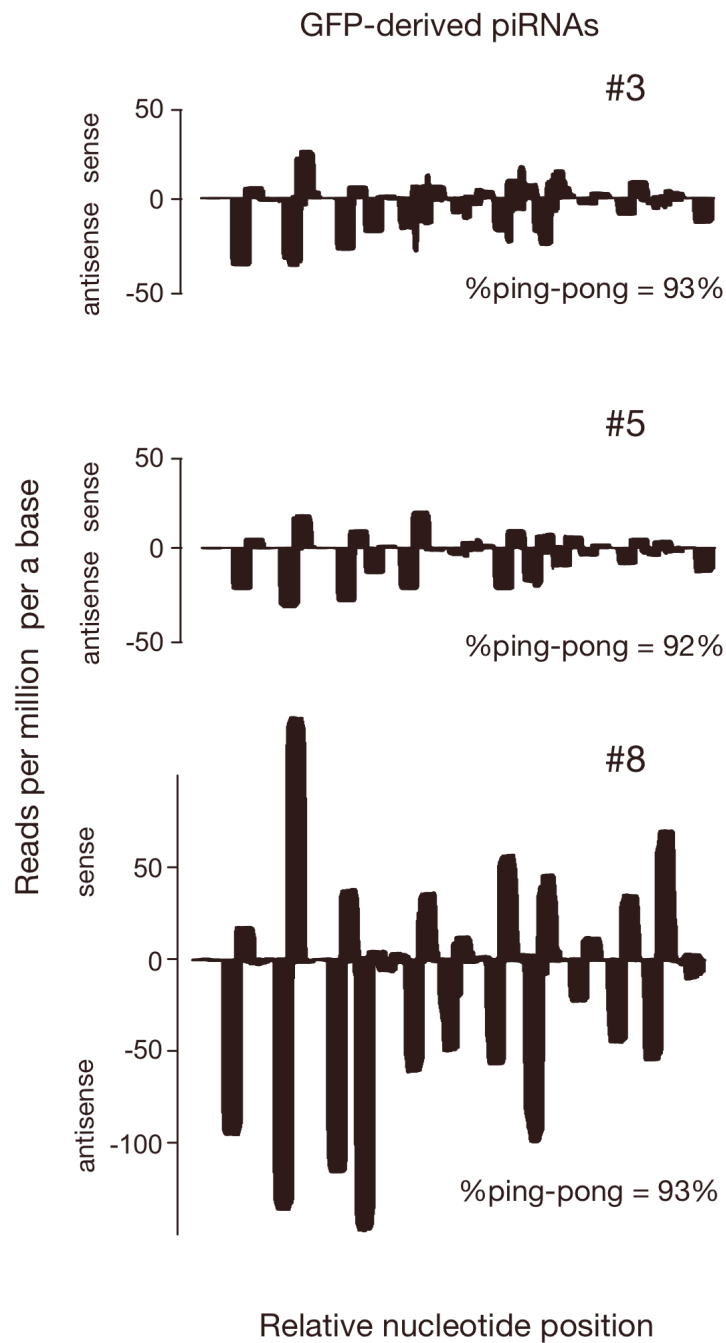


図 2.8 GFP piRNA のマッピングパターン

縦軸は 100 万リードあたりの相対リード数(RPM)、横軸は GFP ORF に対する相対位置を示す。何れのラインにおいても、sense piRNA、antisense piRNA のピークが少しずつずれてオーバーラップしている。オーバーラップはちょうど 10 塩基であり、90%以上の piRNA がこのオーバーラップに参加している(%ping-pong)。

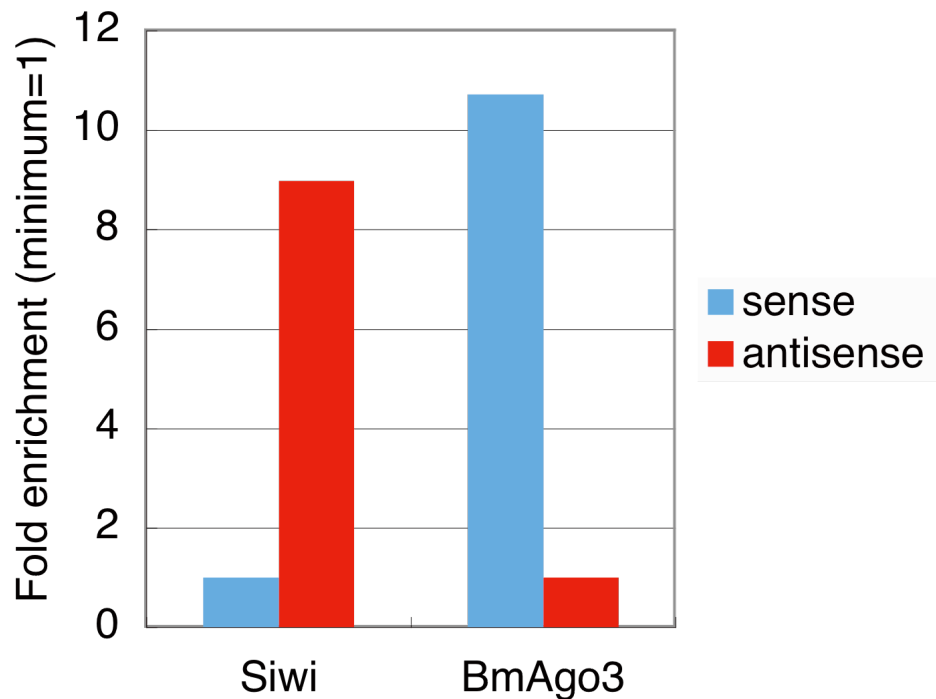


図 2.9 GFP antisense/sense piRNA と Siwi/BmAgo3 の選択的結合

Flag-Siwi、あるいは Flag-BmAgo3 を定常発現する#8 細胞からタンパク質抽出物を調製し、免疫沈降によってそれぞれの複合体を精製した。複合体に含まれる RNA を逆転写し、特異的なプライマーを用いて定量 PCR を行った。データは fold enrichment で示した。本実験は分子細胞生物学研究所博士課程の吉川真由氏によって行われ、著者が解析を行った。

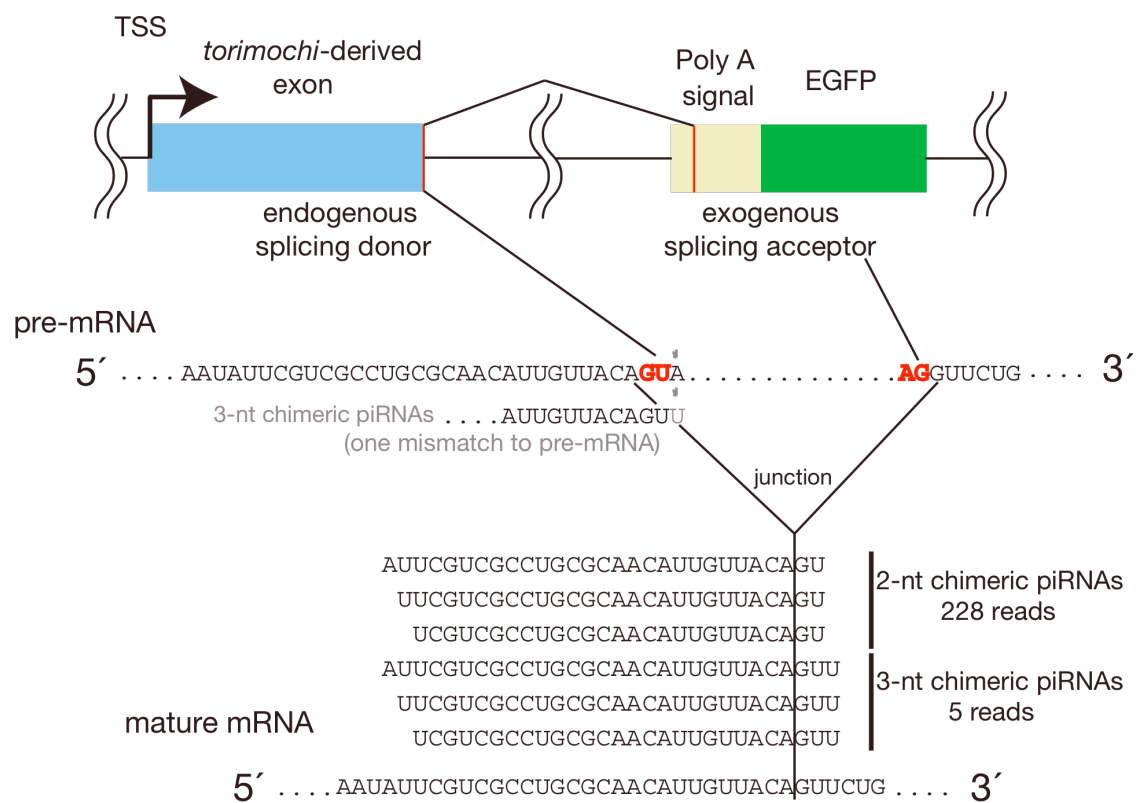
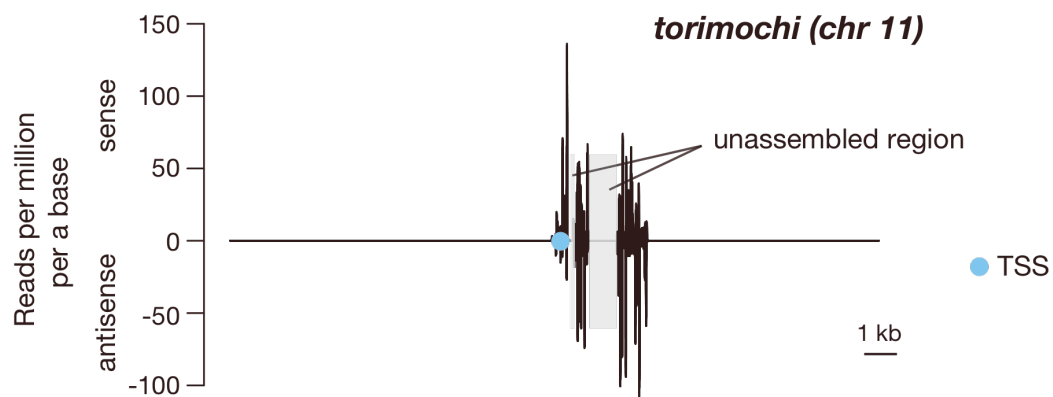


図 2.10 piRNA クラス *torimochi* の発見と *torimochi* から転写される *torimochi*-antisense GFP 融合転写物の構造

RACE 実験の結果、#3, #5, #8 では、11 番染色体の piRNA クラスである *torimochi* に埋もれた転写開始点(図中青丸)から、*torimochi*-antisense GFP 融合転写物が転写されていることが明らかとなった。本図では、転写開始点を中心に両端 10kb のゲノム領域にマップされる piRNA の密度を表している。また、当該転写開始点から転写される融合転写物の構造を簡易的に示した。さらに、融合転写物のスプライシングジャンクションを拡大表示し、当該領域にマッチするキメラ piRNA を図示した。RACE 実験ならびに転写開始点の同定は分子細胞生物学研究所博士課程の小林真希氏により行われ、その後の解析は著者が行った。