

第三章

piRNA がつくられるしくみ

緒言

piRNA は、動物の生殖巣、特に生殖細胞におけるトランスポゾン抑制システムの中心分子である。piRNA は、siRNA や miRNA よりも長い 23-30 塩基の小分子 RNA である。piRNA はこれらの小分子 RNA とは異なり、二本鎖中間体を経ずに産生されることが判明している (Vagin et al., 2006; Houwing et al., 2007)。しかしながら、piRNA がどのようにつくられるか、という点に関してはほとんど未解明である。

その理由のひとつとして、piRNA の生合成経路を再現する *in vitro* 系の欠如が挙げられる。前述の通り、piRNA 研究のパイオニアであるキイロショウジョウバエの卵巢は非常に小さい。キイロショウジョウバエの成体がカイコの卵一個に相当する大きさである。例えば、*in vitro* 系の実験を行うための卵巢の解剖には、一実験区あたり二時間から三時間を必要とする。マウスの場合も、*in vitro* の解析結果が全く報告されていないため、サンプルの調製、あるいはタンパク質抽出物の調製が困難であると考えられる。

本博士論文第一章に記載した通り、筆者はこの問題を解決しうる材料を発見した。すなわち、カイコ卵巢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有する培養細胞である。BmN4 細胞は維持も容易で、大量に培養することも可能である。そこで本章では、BmN4 細胞に由来するタンパク質抽出物を用いて、piRNA 生合成経路を再現することを試みた。

カイコゲノムには二つの PIWI サブファミリーである Siwi、および BmAgo3 遺伝子が存在する(Kawaoka et al., 2008b)。第一章の研究において、Siwi には 1U piRNA が、BmAgo3 には 10A piRNA が選択的に結合していることが明らかとなっている(Kawaoka et al., 2009)。また、全 piRNA の塩基組成を調べると、total では 1U に偏っていることが分かる。つまり、BmN4 細胞内では、Siwi-bound 1U piRNA がメジャーであり、BmAgo3-bound 10A piRNA は比較的マイナーであると考えられる。実際、Siwi mRNA の発現量は BmAgo3 mRNA よりも数十から数百倍ほど高いことが知られている (Kawaoka et al., 2008b)。BmAgo3-bound 10A piRNA はトランスポゾン mRNA の分解により生じた RNA であり、piRNA の生合成としては Siwi-bound 1U piRNA が先に産生されると推測できる。

小分子 RNA と Arogonute(AGO)/PIWI ファミリータンパク質の結合に関しては、構造生物学的見地から得られた知見がその理解の助けとなる(Ma et al., 2004; Ma et al., 2005; Yuan et al., 2005; Wang et al., 2008; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009b)。一般に、小分子 RNA の 5'末端は一リン酸が突出したかたちになっている。AGO/PIWI タンパク質群が持つ四つのドメインのうち、MID ドメインと呼ばれるドメインのなかには、この一リン酸を直接認識するアミノ酸残基が存在する。また、小分子 RNA の 1 塩基目は、MID ドメインに存在するアミノ酸ループと直接相互作用することが知られている。すなわち、小分子 RNA の一リン酸を含む 1 塩基目は、直接 AGO/PIWI タンパク質と相互作用する。

これらの情報を考え合わせると、Siwi は 1U piRNA の 5'末端を直接認識している、という仮説をたてることができる。本章では、BmN4 細胞に由来するタンパク質抽出物を利用し、Siwi による 1U piRNA への選択的結合を *in vitro* で再現することを試みた。また、1U piRNA の 3'末端がどのように決定されるのか、という点に関しても検討した。

材料と方法

培養細胞

第一章に準じた。

バッファー

40×リアクションミックス、lysis バッファー[30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂], 2×PK バッファーなどは常法に従って調製し、実験に供した(Haley et al., 2003)。

タンパク質抽出物の調製

BmN4細胞をPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) でウォッシュしたのち、1,000×gの遠心で細胞のペレットを回収した。ペレットは等量のlysisバッファーで再懸濁し、ダウンスホモジェナイザーによって物理的に破碎した。その後、17,000×gの遠心により上清を細胞ライセートとして使用した。トリミングアッセイに供するライセートは、1,000×gの遠心で得られたペレットをlysisバッファーで再懸濁することにより調製した。

基質 RNA の調製

本章で用いた RNA の配列は別表に纏めた。各合成オリゴは T4 polynucleotide kinase(TaKaRa)と γ -³²P[ATP]にて 5'末端を放射性標識した。

ウェスタン解析

ウェスタン解析は第一章に準じた。

Siwi 変異体の作成とトランスフェクション

リン酸結合ポケットの変異体、Y607E (MID ドメインに存在するアミノ酸変異)ならびに C-term+A (タンパク質 C 末端にアラニンを付加)は PCR 法により作出し、pIZ/V5-His vector (Invitrogen)に導入し、実験に供した。トランスフェクションは FuGENE HD (Roche)を使用して行った。

ローディングとトリミング

基質 RNA(1 μ M)を 6 μ l の Flag-Siwi あるいは Flag-BmAgo3 を発現するライセート、そして 3 μ l の 40 \times リアクションミックスと室温でインキュベートした。免疫沈降は抗 Flag 抗体を使用して行った。免疫沈降物は lysis バッファーに終濃度 0.1% Empigen (Sigma)を加えたウォッシュバッファーでウォッシュした。複合体に含まれる RNA は PK バッファーで抽出し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離、FLA-7000 イメージアナライザ(Fujifilm)で検出した。トリミング反応は、7 μ l の 1,000 \times g ペレットを Siwi/1U-50 RNA 複合体を含むビーズ 3 μ l (40 \times リアクションミックスにサスペンド)に加えて行った。用いた RNA オリゴの配列は表 3.1 に記した。

β -elimination

過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応は、第一章に準じた。

結果

Siwi の 1U RNA への選択的結合を再現する in vitro 系の確立

Flag-Siwi と Flag-BmAgo3 を定常発現する BmN4 細胞から、細胞質画分に相当するタンパク質抽出物(ライセート)を調製した。同時に、成熟型 piRNA を模した 1 番目が U、A、G、C である 26 塩基の合成 RNA (1U/1A/1G/1C-26 RNA) を γ -P³²[ATP] により 5' 末端を放射性標識した。その後、調製したライセートと 1U/1A/1G/1C-26 RNA をインキュベートし、抗 Flag 抗体による免疫沈降によって、Flag-Siwi、あるいは Flag-BmAgo3 複合体に含まれる放射性 RNA の量を定量した。その結果、Flag-Siwi は 1U-26 RNA に好んで結合することが明らかとなった(図 3.1)。一方、Flag-BmAgo3 はそのような選択性を示さなかった(図 3.1)。ここで観察された Siwi と一本鎖 RNA の結合が機能的なものであることを確認するために、Siwi のリン酸結合ポケットに変異を導入したコンストラクト(SiwiY607E、C-term+A)を作成し、同様の実験を行った。その結果、Flag-SiwiG607A は 1U-26 RNA と結合できないことが明らかとなった(図 3.2)。従って、本実験で観察された Siwi と 1U-26RNA の結合は、Siwi のリン酸結合ポケットを介した正規の結合であることが明らかとなった。

次に、使用する合成 RNA の長さを 50 塩基とし(1U/1A/1G/1C-50 RNA)、同様の実験を行った(図 3.3)。その結果、Flag-Siwi は 26 塩基の RNA に対するものと全く同様の選択性を示した(図 3.3)。すなわち、Flag-Siwi は 1U-50 RNA に好んで結合した。構造的見地から推察すると、1U-50 RNA の 3' 末端は Siwi からはみ出て

いることが想像できる。そのような長さの RNA であっても、Siwi は 1 塩基目の塩基が U であるかどうかを見分けることができると考えられた(図 3.1、図 3.2、図 3.3)。

トリミング反応の発見

上記の実験により、Siwi 自身が、結合する RNA の長さに依らず 1U RNA を選択できることが判明した。すなわち、piRNA の 5'末端は Siwi の結合親和性そのものによって規定されている可能性が考えられた。それでは、piRNA の 3'末端はどのようにして決まるのだろうか？BmN4 細胞由来 piRNA の配列データを眺めると、同一の 1U 5'末端を有する piRNA が異なる 3'末端をもつ場合が多く見受けられることに気がついた(データ示さず)。この事実と、上述の実験結果を考え合わせ、piRNA 生合成経路においてはまず 5'末端が Siwi 自身によって規定され、その後はみ出した 3'末端が適切な長さまで削り込まれる、という仮説をたて、その実験的検証を試みた。

まず、コントロール実験として、Siwi に結合していないフリーの 1U-50 RNA を各種ライセートとインキュベートする実験を行った(図 3.4(A))。図に示すように、使用したライセートはフリーの RNA に対して非常に強い分解活性を示した(図 3.4(B))。特に、常法によって調整した 17,000×g ライセートの分解活性が高かった。次に、Flag-Siwi を発現するライセートを 1U-50 RNA とインキュベートし、免疫沈降法によって Siwi/1U-50 RNA 複合体を精製した(図 3.4(C))。ビーズ上の

Siwi/1U-50 RNA 複合体に BmN4 細胞に由来する 17,000×g ライセートを加え戻し、3′末端が削り込まれるかどうかを検証した。ところが、使用した 17,000×g ライセートが強い RNA 分解活性を示していたにもかかわらず(図 3.4(B))、Siwi/1U-50 RNA の 3′末端が削り込まれる、という現象は観察されなかった(図 3.4(D))。

ライセートを調製する際には、通常、回収した細胞ペレットをダウンスホモジェナイザーで破碎し、遠心分離によって精製した上清画分を用いる。上記の結果から通常の 17,000×g ライセートには 3′末端を削り込む活性はなかったため、ダウンスホモジェナイザーで破碎した細胞破碎液(クルードライセート)そのものを実験に供することにした。その結果、クルードライセートが、Siwi に結合した 1U-50 RNA の 3′末端を 27 塩基程度まで削り込む活性(トリミング活性)を有することが判明した(図 3.4(D))。本実験では RNA の 5′末端を放射性標識しているため、この反応は 3′末端からのヌクレアーゼ反応であると考えられた。興味深いことに、トリミング活性は 1,000×g という非常に緩やかな遠心分離によっても沈殿画分に存在することが明らかとなった。このことから、トリミング活性を司るタンパク質複合体は非常に巨大な複合体であると予想された。また、その他の様々な実験によって、物理的破碎や一般的な界面活性剤では、トリミング活性を効率良く可溶化することができないことも分かった(データ示さず)。以降、トリミング反応の中心となる酵素を仮にトリマーと呼ぶことにする。

トリマーはマグネシウム依存性の 3′-5′エキソヌクレアーゼである

次に、トリミング反応を生化学的に特徴付けるための実験を行った。一般にヌクレアーゼ反応は二価の陽イオンがその活性に必要である。そこで、反応系にカルシウムのキレーターである EGTA とマグネシウムのキレーターである EDTA を添加した。その結果、EDTA の添加によってトリミング活性がほぼ 100% 抑えられることが明らかとなった(図 3.5)。この条件にさらにマグネシウムを添加すると、トリミング活性は復活した(図 3.6(A))。また、マグネシウムイオンの至適濃度は 2mM であった(図 3.6(B))。EGTA の添加によってわずかにトリミング活性が上昇するのは、カルシウムの存在がトリミング反応において阻害的に働くためであると考えられる(図 3.6(C))。

次に、トリミング反応がエンドヌクレアーゼ反応かエキソヌクレアーゼ反応かを調査した(図 3.7)。もしトリミング反応がエンドヌクレアーゼ反応であれば、基質である 1U-50 RNA の 3'末端の構造は反応の可否に無関係なはずである。このことを確かめるために、過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応と β -elimination 反応によって、3'末端のヒドロキシル基をリン酸基へと変化させた 1U-49-P RNA を調製した。興味深いことに、この基質に対してはトリミング反応が全く進行しなかった(図 3.7(A))。次に、38 番目にデオキシヌクレオシドを導入した 1U-50-38deoxy と、2'-O-メチル化を導入した 1U-50-38OMe を調製した。また、38 番目と 39 番目の塩基の間にホスホロチオエートを導入した 1U-50-38PS を調製した(図 3.7(B))。ホスホロチオエートは一般に、ホスホジエステル結合を分解するヌクレアーゼ反応を阻害する。放射性標識したこれらの基質に対してトリミングアッセイを行ったところ、1U-50-38deoxy と 1U-50-38OMe に対してはト

リミング活性が認められ、成熟型の piRNA がつくられた。よって、トリマーは DNA と RNA を見分けておらず、2'-O-メチル化はトリミング反応を阻害できないことが判明した。いっぽうで、1U-50-38PS に対してトリミング反応を行うと、トリミング反応が 38 塩基目で止まることが明らかとなった。以上を考え合わせ、トリマーはマグネシウム依存性の 3'-5'エキソヌクレアーゼである、と結論した(図 3.7)。

piRNA の 3'末端の修飾はトリミングと共役している

piRNA の 3'末端は 2'-O-メチル化修飾されていることが知られている(Horwich et al., 2007; Kirino and Mourelatos, 2007a; Kirino and Mourelatos, 2007b; Ohara et al., 2007; Saito et al., 2007; Kamminga et al., 2010)。そこで、トリミング反応によって生じた成熟型 piRNA の 3'末端の構造を調査した(図 3.8)。本実験においても、過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応と β -elimination 反応を利用した。その結果、トリミングされる前の基質の 3'末端は修飾されていないが、トリミングによって生じた成熟型 piRNA の 3'末端は修飾されていることが明らかとなった。しかしながら、Siwi/1U-27 RNA、つまり、それ以上トリミングされ得ない基質に対してトリミング反応を行っても 1U-27 RNA の 3'末端は修飾されなかった(図 3.7)。従って、トリミング反応と 3'末端修飾は共役反応であると考えられる。さらに、ホスホロチオエート修飾の導入によりトリミング反応が特定の塩基で止まるような RNA を用いると、トリミング反応が起こったにも関わらず、トリミング産物の 3'末端は修飾されなかった(図 3.9)。以上の結果から、3'末端が修飾される

ためには、1U-50 RNA の 3'末端が成熟型 piRNA の長さに至るまでトリマーによって削り込まれる必要があると考えられた(図 3.9)。

piRNA の長さは piRNA の 3'末端の修飾に依らない

2'-O-メチル化修飾には S-アデノシルメチオニン(SAM)のメチル基が使われる。当該反応の生成物である S-アデノシル-L-ホモシステイン(SAH)を反応に加えると、メチル化反応を阻害することができるという報告がある(Horwich et al., 2007)。そこで、SAH を添加することによるトリミング反応への影響を調査した(図 3.9)。過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応と β -elimination 反応実験の結果、SAH 存在下ではトリミング産物の 3'末端が修飾されないことが分かった。この結果から、これまで観察していた 3'末端修飾は 2'-O-メチル化修飾であることが確認できた。興味深いことに、2'-O-メチル化修飾が起らない場合でも、トリミングによって生じた成熟型 piRNA の長さは不変であった(図 3.9)。よって、2'-O-メチル化修飾それ自体は piRNA の長さを決めることに無関係であることが明らかになった。

考察

本章では、カイク卵巢由来の培養細胞である BmN4 細胞のライセートを駆使して、piRNA 生合成経路を試験管内で再現することに成功した。実験結果から想定される piRNA 生合成モデルは以下のようなものである(図 3.10)。

最初に、長い一本鎖 RNA が、おそらくランダムな長さの RNA へと分解される。分解産物の 1 塩基目が U である確率は 25%である。適切な長さになった 1U piRNA 前駆体 RNA は、Siwi 自身の 1U RNA への選択的結合性によって Siwi に結合する。この結合には、Siwi の MID ドメインに存在するリン酸認識ポケットが必須である。1U piRNA 前駆体 RNA の 3'末端が Siwi からはみ出していた場合、トリマーと名付けたマグネシウム依存性の 3'-5'エキソヌクレアーゼが成熟型 piRNA の長さまで前駆体 RNA を削り込む。このトリミング反応と共役するかたちで、トリミング産物の 3'末端に修飾が施される。しかしながら、piRNA の長さは 3'末端の修飾に依存せず規定される。以上のプロセスを経て、Siwi/piRNA 複合体が完成する。完成した Siwi/piRNA 複合体は、Siwi タンパク質のヌクレアーゼ反応によって新たな piRNA 前駆体を作り出す。このような生合成経路は、siRNA や miRNA の生合成とは全く異なるものである(表 0.1)。

トリマーは非常に大きな複合体を形成していると考えられる。現在まで、トリマーを生化学的に精製する試みがなされているが、いまだ同定には至っていない。また、各種モデル生物でトリマーを発見するための大規模な遺伝学的解析

が行われているが、有力な候補ヌクレアーゼさえ見つからないのが現状である。もしかすると、トリマー複合体のなかには互いに機能が重複したヌクレアーゼが複数含まれているのかもしれない。そのような場合、トリマーの分子実体を明らかにすることは容易ではないと予想される。

siRNA や miRNA の研究は、それらの生合成を再現するような *in vitro* 系の構築によって爆発的に進展した。本章において樹立した Siwi の 1U バイアスを再現する系、トリマーによるトリミング反応を再現する系は以後、piRNA 研究における必須のツールになると考えられる。現在、BmN4 細胞とこの *in vitro* 再構成系を利用して、シャペロンタンパク質である Hsp90 の piRNA 経路における役割が明らかにされつつある。その結果、Hsp90 は siRNA や miRNA の生合成には必須であるが(Iki et al., 2010; Iwasaki et al., 2010; Miyoshi et al., 2010)、piRNA の生合成経路においては、1U RNA の Siwi タンパク質への取り込みを制御することにより、piRNA 経路によるトランスポゾン抑制に寄与していることが示唆された。本章で確立した *in vitro* 実験系をより多くの研究者が利用することで、piRNA 生合成経路に関する理解が加速されると期待できる。

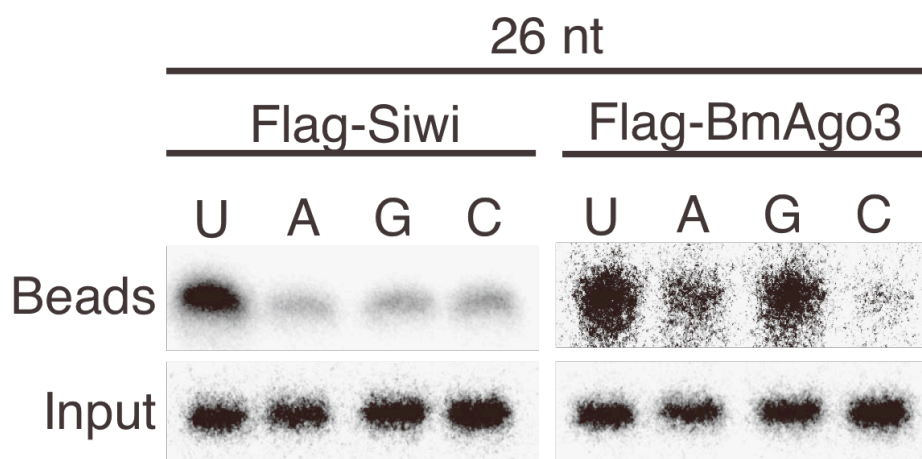


図 3.1 Flag-Siwi の 1U-26 RNA に対する選択的結合

Flag-Siwi あるいは Flag-BmAgo3 を定常発現する BmN4 細胞に由来するライセートを放射性標識した 1U/1A/1G/1C-26 RNA とインキュベーションし、抗 Flag 抗体による免疫沈降を行い、結合した RNA の量を定量した。

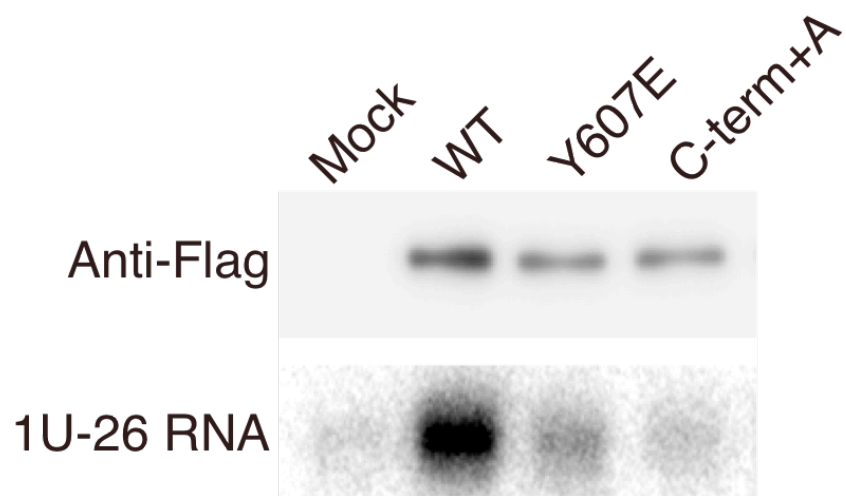


図 3.2 1U-26 RNA と Siwi の結合には Siwi のリン酸結合ポケットが必須である

リン酸結合ポケットの変異 Siwi(Y607E、C-term+A)を作成し、1U-26 RNA との結合アッセイを行った。上段は抗 Flag 抗体を用いたウェスタン解析の結果を示す。何れの変異体も 1U-26 RNA との結合が極めて弱くなる。本実験は、分子細胞生物学研究所 泉奈津子博士によるものである。

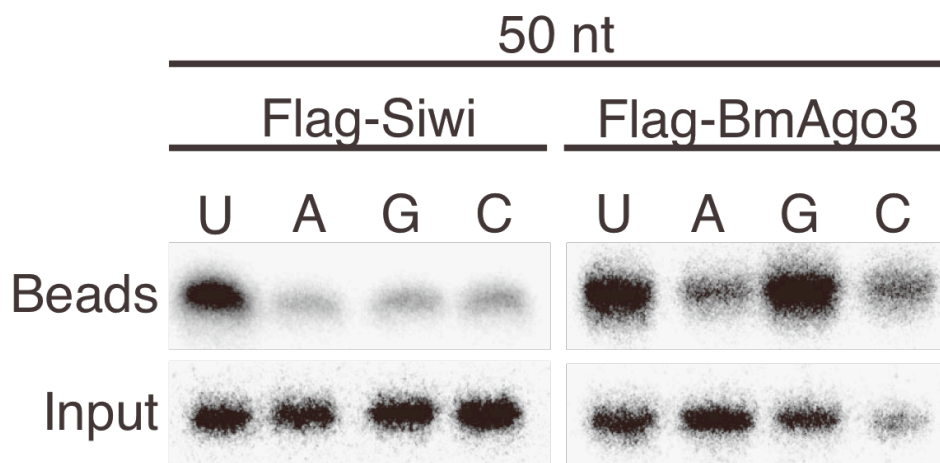


図 3.3 Flag-Siwi の 1U-50 RNA に対する選択的結合

Flag-Siwi あるいは Flag-BmAgo3 を定常発現する BmN4 細胞に由来するライセートを放射性標識した 1U/1A/1G/1C-26 RNA とインキュベーションし、抗 Flag 抗体による免疫沈降を行い、結合した RNA の量を定量した。

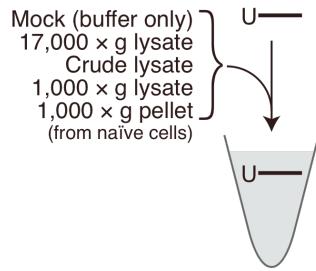
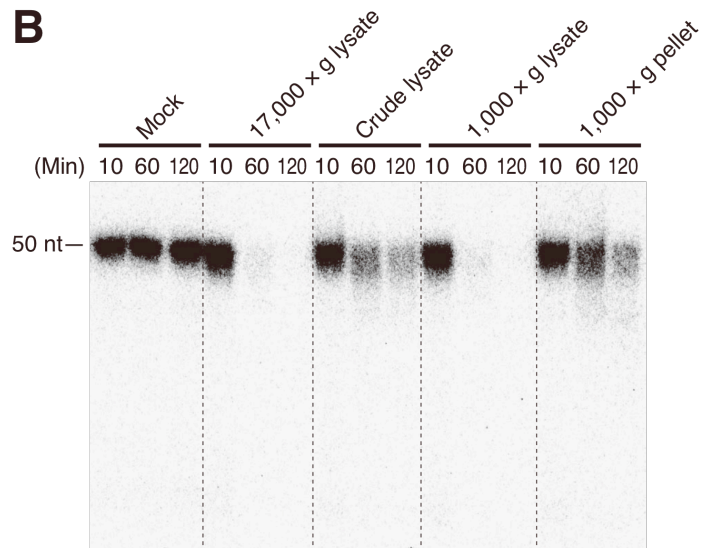
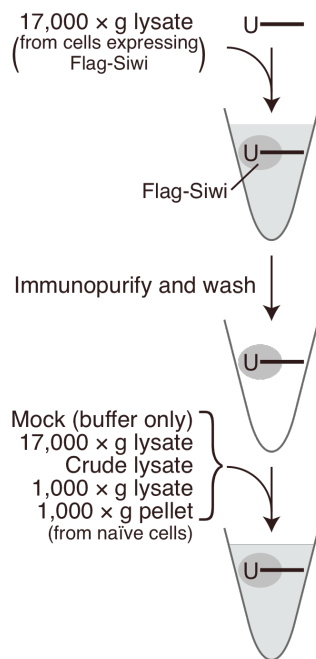
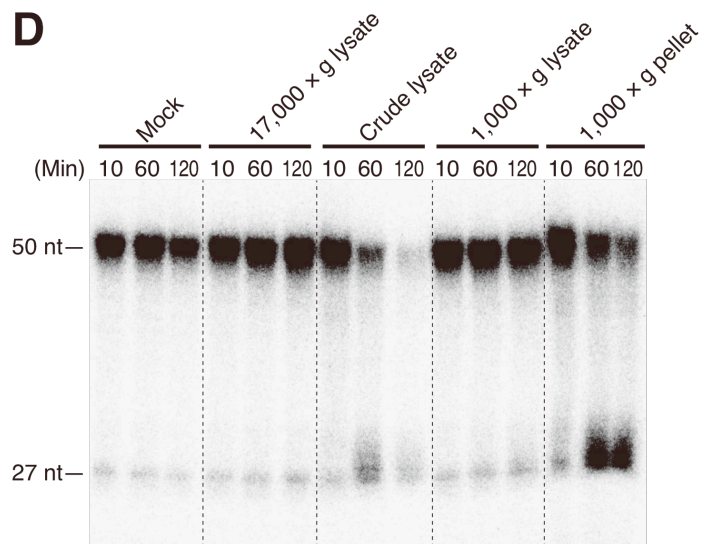
A**B****C****D**

図 3.4 トリミング反応の発見

(A) 実験(B)のスキームを示した。

(B) 各種ライセートとフリーの 1U-50 RNA をインキュベートし、各タイムコースにおいて RNA をサンプリングし、電気泳動によって分離した。

(C) 実験(D)のスキームを示した。

(D) クルードライセート、あるいは 1000g ペレットと Siwi/1U-50 RNA 複合体をインキュベートすると、27 塩基程度の RNA がつくられることが判明した。

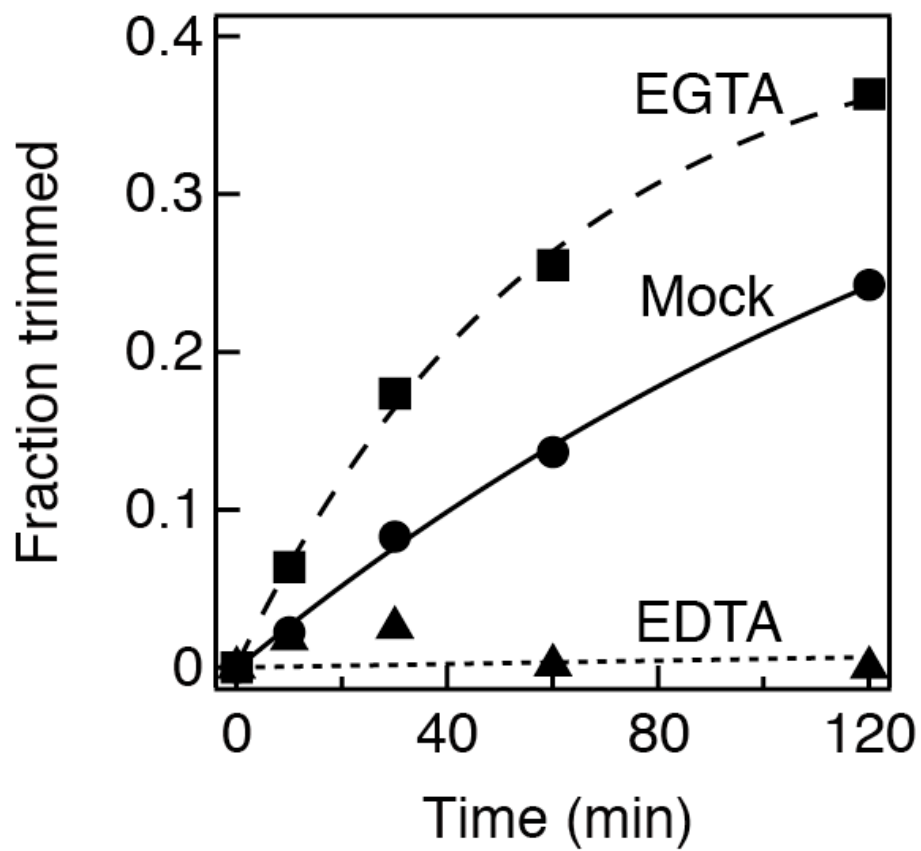


図 3.5 トリミング反応はマグネシウム要求性の反応である

終濃度が 10mM になるように EDTA、EGTA を加えてトリミング反応を行った。

各タイムコースにおけるトリミングの効率を $\frac{[\text{トリミングされた RNA のシグナル}]}{[\text{トリミングされた RNA のシグナル}] + [\text{トリミングされなかった RNA のシグナル}]}$ として計算した。

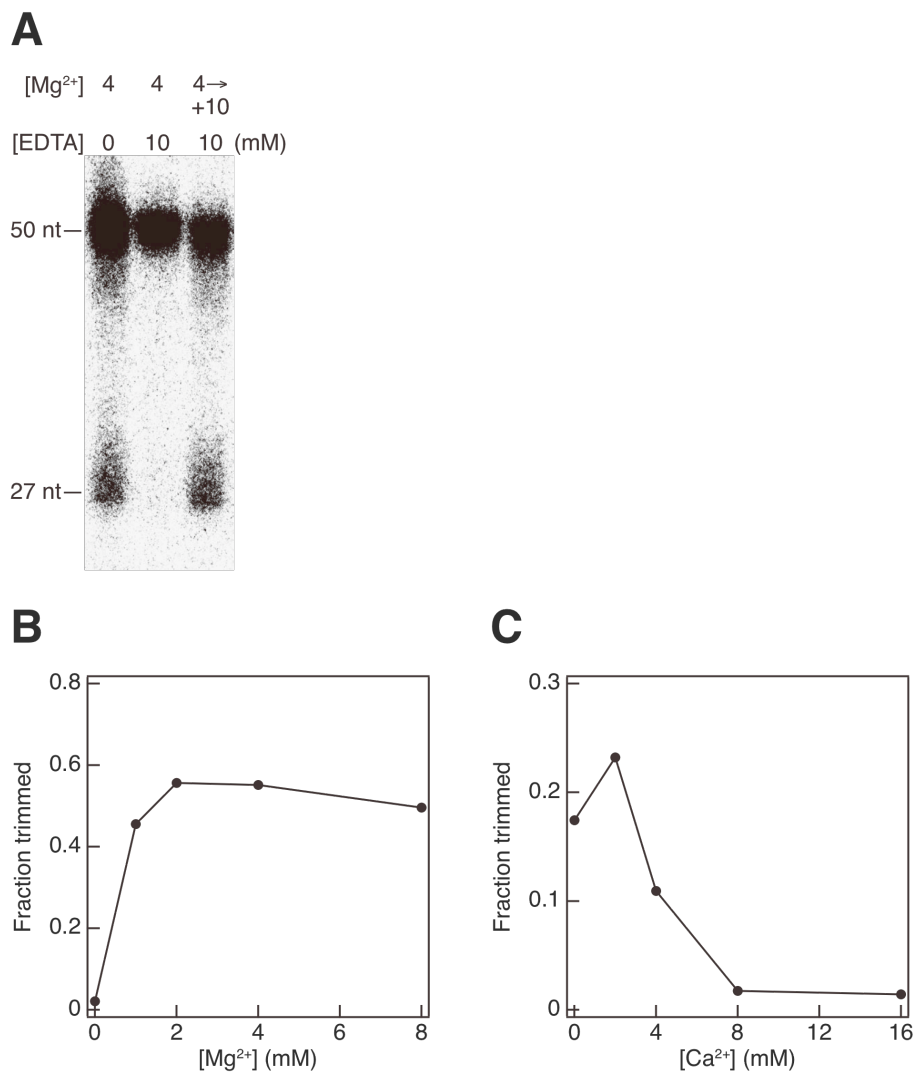


図 3.6 トリミング反応におけるマグネシウムイオンとカルシウムイオンの至適濃度

(A) 終濃度 10mM の EDTA 存在下でトリミング反応を行った。また、f.c 10mM の EDTA 存在下でマグネシウムイオンの終濃度が 14mM になるようにしてトリ

ミング実験を行った。EDTA によるトリミング反応阻害は可逆的であった。

(B) 異なるマグネシウムイオン濃度でトリミング反応を行った。トリミング反応におけるマグネシウムイオンの至適濃度は **2mM** であった。

(C) 異なるカルシウムイオン濃度でトリミング反応を行った。過剰なカルシウムはトリミング反応を阻害した。各タイムコースにおけるトリミングの効率を[トリミングされた RNA シグナル]/[トリミングされた RNA のシグナル]+[トリミングされなかった RNA のシグナル]と定義した。

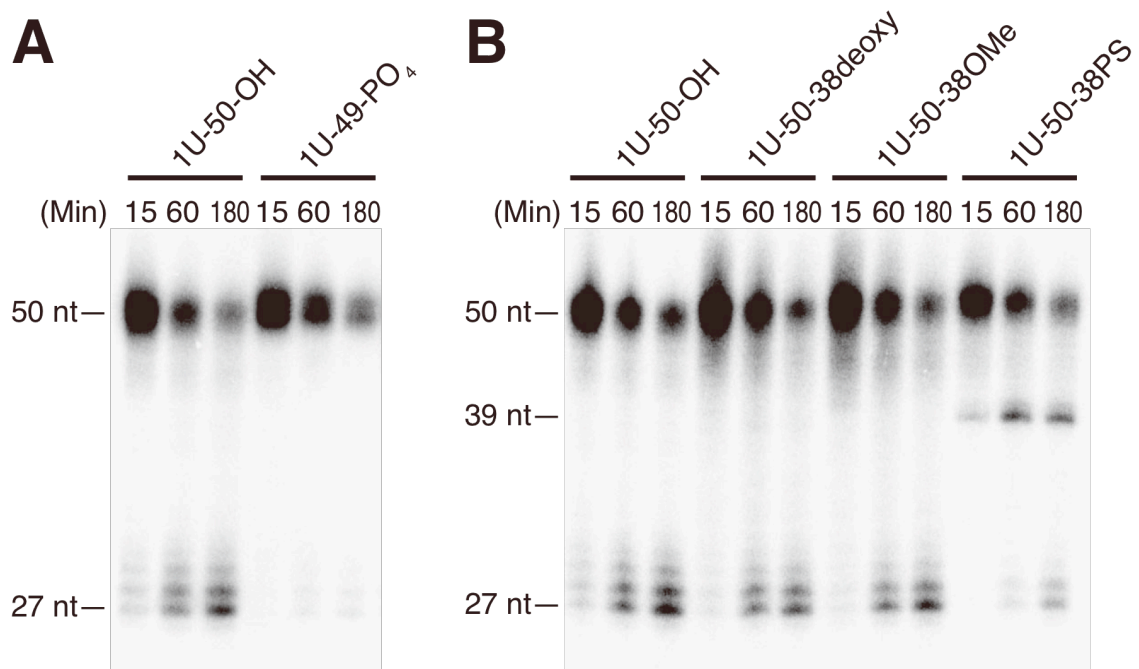


図 3.7 トリマーは 3'-5'エキソヌクレアーゼである

(A) 3'末端をリン酸突出型にした 1U-49-PO₄(3'-リン酸)を基質としてトリミング反応を行った。

(B) 38 番目の塩基にそれぞれ deoxy、2'-O-メチル化修飾を施した 1U-50-38deoxy、1U-50-38OMe を基質としてトリミング反応を行った。また、38 番目と 39 番目の間にホスホロチオエート修飾を導入した 1U-50-38PS を基質としてトリミング反応を行った。

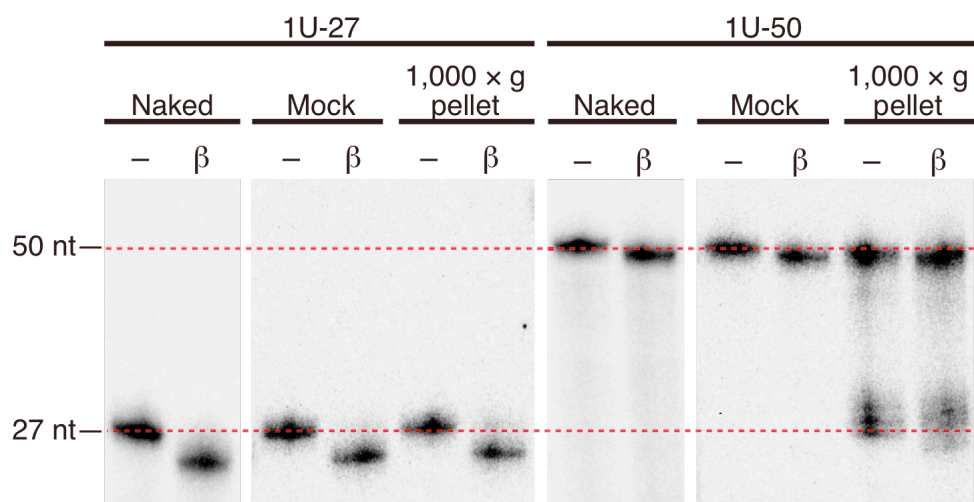


図 3.8 トリミング反応は 3'末端修飾と共役している

Siwi/1U-27 RNA 複合体、Siwi/1U-50 RNA 複合体を用いてトリミング反応を行った。Siwi に結合していないフリーの 1U-27 RNA、1U-50 RNA、あるいはトリミング反応なし(Mock)をネガティブコントロールとした。移動度の変化を判別しやすくするために、27 塩基、50 塩基に該当する部位に赤い点線を書き入れた。

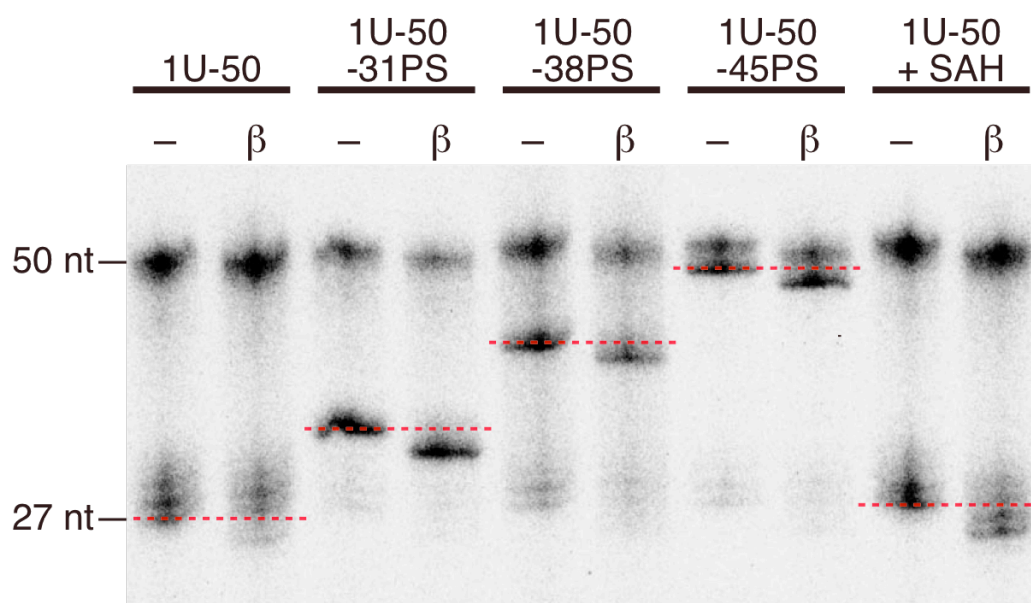


図 3.9 3'末端の修飾には完全なトリミング反応が必要であり、また、piRNAの長さが決定されることと3'末端修飾の有無は無関係である

31 番目と 32 番目、38 番目と 39 番目、45 番目と 46 番目の間にホスホロチオエート修飾を導入した 1U-50-31PS/38PS/45PS を基質としてトリミング反応を行った。また、トリミング産物の 3'末端の修飾を調査した。また、1U-50 RNA を基質としたトリミング反応を、メチル化反応を阻害する SAH 存在下で行い、さらに、3'末端の修飾の存否を調査した。何れの実験区も、 β -elimination 反応をしていないサンプルのトリミング産物の長さに該当する部分に赤い点線を書き入れた。

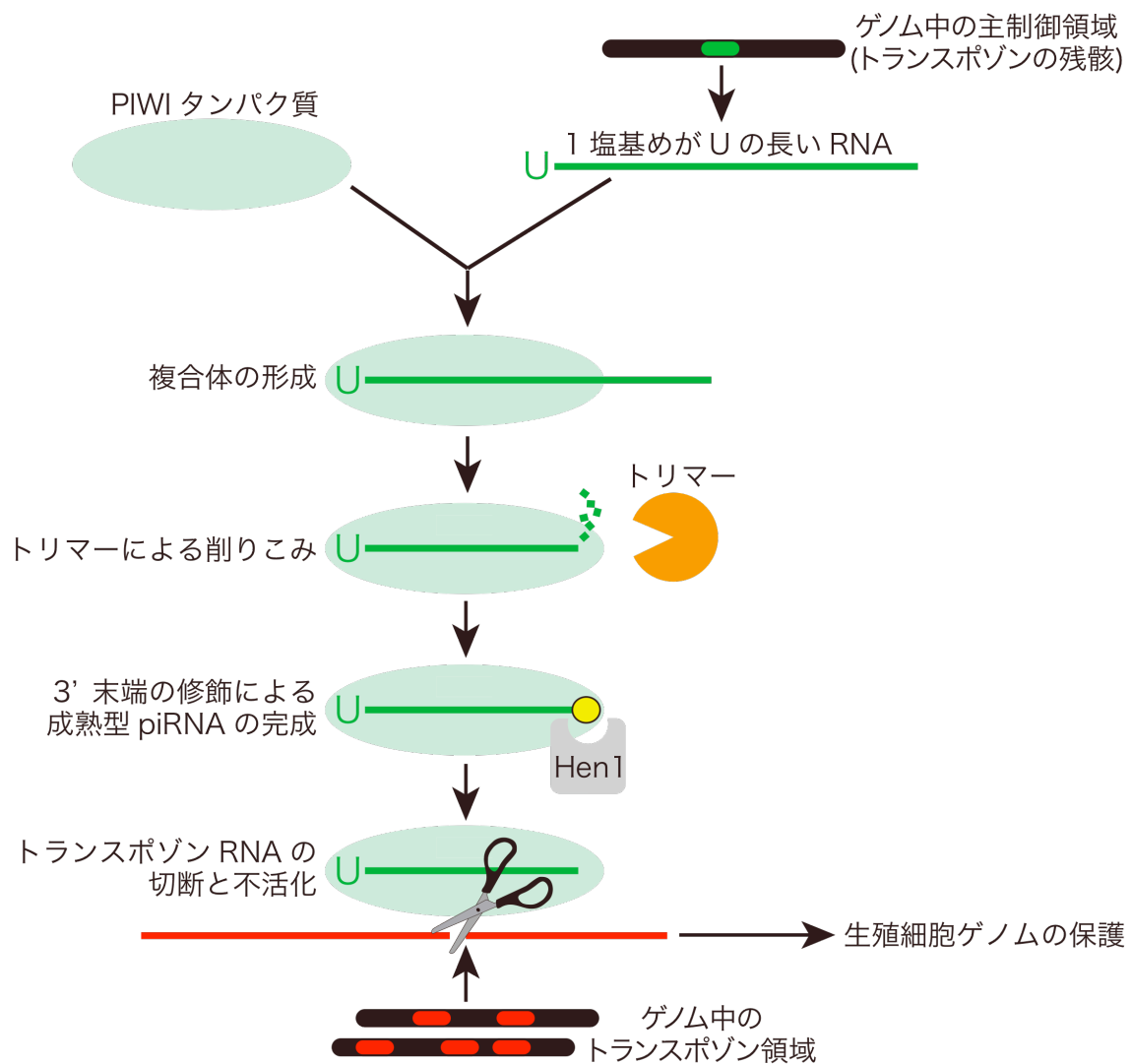


図 3.10 piRNA 生合成モデル

ゲノムに存在するトランスポゾンの残骸領域である piRNA クラスターから、第二章に記載した通りに前駆体 RNA が転写される。そこから生じた 1U RNA が Siwi に選択的に取り込まれる。この際、成熟型 piRNA よりも長い RNA でも問題はない。その後、トリマーによる削り込み反応とそれに伴う 3'末端修飾が起こり、成熟型 piRNA が完成する。成熟型 piRNA は自身が結合する PIWI タンパク質をトランスポゾン mRNA へと導き、第二章に記載した通り、ピンポンサイクルによって piRNA を増幅する。

表 3.1 本章で使⽤した RNA オリゴの配列

Name	seq (5' to 3')
1U-26	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAA
1A-26	ACAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAA
1G-26	GCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAA
1C-26	CCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAA
1U-50	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGCCCGGACAGGUCCC
1A-50	ACAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGCCCGGACAGGUCCC
1G-50	GCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGCCCGGACAGGUCCC
1C-50	CCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGCCCGGACAGGUCCC
1U-27	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAAC
1U-28	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACA
1U-29	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAG
1U-30	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGU
1U-31	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUC
1U-32	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCA
1U-33	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCAC
1U-34	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACC
1U-35	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCC
1U-36	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCG
1U-37	UCAAAAACUAAACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGC

1U-38 UCAAAAACUACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGCC

1U-39 UCAAAAACUACGGAUUGGUUUCGAACAGUCACCCGCC

第四章

カイコ雌性決定 W 染色体と piRNA

緒言

カイコにおける性染色体構成は、雌が ZW、雄が ZZ である(Fujii and Shimada, 2007; Traut et al., 2007)。Z 染色体の本数に関わらず、W 染色体が 1 本あれば雌になる。従って、W 染色体上には強力な雌決定遺伝子が座乗していると考えられ、仮想雌決定遺伝子は *Fem* と呼ばれている。現在まで、多くの研究者が *Fem* の分子実体を突き止めようと努力をしてきた。ところが、2011 年現在、*Fem* はおろか、W 染色体に座乗する単一のタンパク質コード遺伝子さえも見つかっていない。さらに、W 染色体に由来する転写物も見つかっていない。こういった現状は、W 染色体が持つ特異な特徴に起因するところが多い。

カイコの W 染色体はトランスポゾンに占拠された染色体であることが知られている(Abe et al., 1998; Abe et al., 2002; Sahara et al., 2003; Abe et al., 2005a; Abe et al., 2005b; Abe et al., 2008)。W 染色体の BAC (Bacterial Artificial Clone; BAC) プローブを用いた FISH の結果、W 染色体由来の BAC プローブは W 染色体全体、そして常染色体にもハイブリダイゼーションすることが示された(Sahara et al., 2003)。また、W 染色体由来 BAC クローンの配列解析では、トランスポゾンに由来する配列しか見いだされていない(Abe et al., 2002; Abe et al., 2005a)。興味深いことに、W 染色体に存在するトランスポゾンは複雑な入れ子構造を示すことが分かっている(Abe et al., 2002; Abe et al., 2005a)。さらに、W 染色体に特異的な RAPD マーカーはのちに、そのすべてがトランスポゾン配列であることが判明している(Abe et al., 2002; Abe et al., 2005a)。このような背景から、カイコゲノムシークエ

ンシングプロジェクトには雄ゲノム DNA が使用された(International Silkworm Genome Consortium, 2008)。W 染色体に由来するトランスポゾン配列がゲノムアセンブリのプロセスを妨害すると考えられたためである。従って、現在手に入る W 染色体配列は、断片的な BAC コンティグ配列のみである。

キイロショウジョウバエ、およびカイコのトランスポゾンの多くは、piRNA がマップされるトランスポゾンである。このことから、カイコの W 染色体は piRNA の源なのではないか、という仮説をたてた。この仮説を検討するために、カイコ精巣、卵巣に由来する piRNA の配列を解析し、W 染色体に由来する female-enriched piRNA を同定することに成功した。

材料と方法

カイコ系統

本研究に使用したカイコ系統は野生型 p50T、LY、WF、MW 系統(結果を参照)の 4 系統である。全ての系統は 12L:12D の短日条件で新鮮な桑葉を与えて飼育した(Fujii et al., 2006; Abe et al., 2008)。

RNA 抽出

第一章に準じた。

小分子 RNA の精製と小分子 RNA ライブラリの作成

第一章に準じた。

小分子 RNA の配列解析

第一章に準じた。

ピンポンシグネチャーに関する統計的解析

ピンポンシグネチャーは、sense、antisense piRNA の 5'末端から 10 塩基が完全に相補するペアとして定義し、実測値を O とした。予測値(E)は、piRNA が各種トランスポゾンにランダムにマップされるという仮定のもとに計算した。ランダムマッピングのプロセスを 100,000 回繰り返し、 $O-E < 0$ を満たした回数 k を 100,000 で割った値を p 値とした。この方法は Li et al., 2009 に基づく。また、

Brennecke et al. (2008)、Malone et al. (2009)、Kawaoka et al. (2011a)による方法も同時に用いた。

定量 PCR 解析

小分子 RNA の逆転写反応と PCR 反応は第二章に準じた。使用したプライマーのリストは表 4.3 に示した。

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DRA000173(DDBJ)としてデータベースに登録した。

結果

piRNA プロファイルの性的二型

カイコの卵巣は蛹期に急激に発達する。piRNA プロファイルの性的二型を調査するために、蛹脱皮後 4 日目の卵巣と精巣から total RNA を抽出し、piRNA ライブラリを作成した。得られた配列はカイコゲノム、121 個のアノテーションされたトランスポゾン配列、およびコンピュータ解析によって同定された 1668 個のトランスポゾン様配列のデータットにマッピングした。シーケンスした小分子 RNA 配列は piRNA の特徴を有していたため、以後、これらを piRNA と呼ぶ。

以下、野生型の卵巣に由来する piRNA の量を WT[OV]、精巣に由来する piRNA の量を WT[TE]と記載する。シーケンスされた配列が何リードゲノムに 100% マッチしたか、という情報によってライブラリの規模を補正しているため、各値は補正值であり、100 万リードあたりのリード数 (reads per million : RPM) という単位で表記する。この補正作業を行うことで、異なる二つのライブラリ間比較が可能になる。マッピングの結果、1789 個のトランスポゾンのうち、587 配列、実に 30%以上のトランスポゾンが $WT[OV]/WT[TE]>2$ を示すことが明らかとなった(図 4.1(A)、データ示さず)。すなわち、これらのトランスポゾンには、卵巣由来の piRNA のほうが精巣由来の piRNA よりも 2 倍以上多くマップされた。例えば、レトロトランスポゾンである *Suzuka* には、卵巣に由来する piRNA が精巣に由来する piRNA の 31 倍多くマップされ、*Pakurin* では 78 倍であった(図 4.1(B))。一方で、 $WT[OV]/WT[TE]<0.5$ となる配列は比較的少なく、122 配列、

8%弱であった。例えば *Robertson_mariner* はこのクラスに属するトランスポゾンである。

121 個のトランスポゾンにユニークにマッチする 29,822 種類の piRNA リードのうち、22,453 種類の piRNA は精巣ではシーケンスされていなかった。piRNA ライブラリに基づく解析の結果は、定量 PCR 実験により検証し、その妥当性が保証された(図 4.2)。以後、 $WT[OV]/WT[TE]>2$ を満たすような piRNA を female-enriched piRNA と呼ぶ。

Female-enriched piRNA は W 染色体に由来する

次に、female-enriched piRNA がゲノムのどの領域に由来するのかを調査した。カイコゲノム、および W 染色体由来 BAC 配列 (W-BAC 配列) に各種トランスポゾン配列を BLAST し、各トランスポゾンの全長が座乗している染色体を探索した。W-BAC 配列の平均長は 1,775 塩基であり、これは平均的なトランスポゾン全長よりも短い。つまり、各トランスポゾンより長い W-BAC に座乗しているトランスポゾンのみ、その全長配列が W 染色体に座乗しているか、ということ調べればよいということになる。解析の結果、 $WT[OV]/WT[TE]>2$ を満たすトランスポゾンの多くが、その全長を含むユニットが W 染色体に座乗している、という性質を持つことが判明した(図 4.3(A))。

先に述べた通り、W 染色体の配列はトランスポゾンに富み、W 染色体に良く似

た配列が常染色体に散在していることが知られている。実際に、W-BAC 配列から発見されたトランスポゾンカイコゲノムにマップすると、常染色体にマッチする断片が多数発見される。従って、ある piRNA が本当に W 染色体に由来するか、という結論を出すには慎重を要する。そこで、W 染色体と常染色体のわずかな塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) に着目した配列解析を行った。その結果、真に W 染色体に由来すると考えられる piRNA を発見した(図 4.3(B))。これは、W 染色体に由来する転写物を同定した初めての例となる。

W 染色体はピンポンサイクルを介して female-enriched piRNA を産生する

Female-enriched piRNA の産生メカニズムを解明するために、1U piRNA と 10A piRNA が互いの 5'末端から 10 塩基相補するかどうかについて調査した。この 10 塩基の相補は当該ペアが PIWI タンパク質の切断活性によって産生されたことを示す指標のひとつであり、ピンポンシグネチャーと呼ばれる(Brennecke et al., 2008; Li et al., 2009a; Malone et al., 2009; Kawaoka et al., 2011a)。解析の結果、 $WT[OV]/WT[TE]>2$ を示すトランスポゾンにマッチする piRNA 群のピンポンシグネチャーは、卵巣では統計的に有意に検出されるが、精巣では検出されない、ということが明らかになった(表 4.1)。従って、female-enriched piRNA はピンポンサイクルによって増幅されていると考えられる。興味深いことに、 $WT[OV]/WT[TE]<0.5$ となる代表格である *Robertson_mariner* の完全長コピーが、少なくとも 1 コピー Z 染色体に座乗していることが明らかとなった。雄では Z 染色体が雌よりも 1 コピー多いため、この違いが male-enriched piRNA を産み出

していると考えられた。

Female-enriched piRNA のピンポンサイクルによる増幅は二通りに分けることができる。すなわち、W 染色体がトランスポゾン mRNA を供給し、sense female-enriched piRNA の産生のみに参加する、という経路と、W 染色体がトランスポゾン mRNA とアンチセンストランスポゾン RNA の両方を供給し、sense female-enriched piRNA、antisense female-enriched piRNA のどちらの産生にも参加する、という経路である。この可能性を調べるために、piRNA 量の雌雄差を鎖ごとに分け、 $WT(OV)_{antisense}/WT(TE)_{antisense}$ 、 $WT(OV)_{sense}/WT(TE)_{sense}$ 、を計算した (表 4.2)。その結果は、どちらの経路の存在も支持していた。前者の代表が *W-Sasuke* であり、 $WT(OV)_{sense}/WT(TE)_{sense}=3.6$ 、 $WT(OV)_{antisense}/WT(TE)_{antisense}=1.4$ であった。後者の代表は *SART1* であり、 $WT(OV)_{sense}/WT(TE)_{sense}=4.1$ 、 $WT(OV)_{antisense}/WT(TE)_{antisense}=4.3$ であった。以上のことから、W 染色体の female-enriched piRNA 産生への参加は、トランスポゾンによって異なることが分かった。

性決定領域に由来する female-enriched piRNA の発見

ここまで述べてきた結果は、W 染色体上のトランスポゾン組成の違いが、雌雄の piRNA プロファイルに反映されていることを明確に示している。これは同時に、piRNA プロファイルの違いを調べることで、興味のあるトランスポゾンのゲノム上の分布、例えば W 染色体に座乗しているかどうか、を検証しうる、とも言い

換えることができる。そこで、このアイデアを用いて、W 染色体の性決定領域に解析を拡げることを試みた。

本解析では、三つの W 染色体関連変異体を用いた(図 4.4)。一つが、X 線照射によって作出された限性黄繭系統(以下 LY と呼ぶ)である(Abe et al., 2008)。現在までに知られている 12 個の W 染色体特異的 RAPD マーカーのうち、LY 系統の W 染色体(LY-W)には 1 個の RAPD マーカーしか座乗していない。RAPD マーカーが W 染色体上に均等に散在していると仮定すれば、LY-W の長さは野生型 W 染色体の 1/10 程度であると考えられ、LY-W の全長は数 Mb であると思われている。このような小さな染色体であるにも関わらず、LY-W は雌性を決定できる。DfZ-DfW 系統(以下 WF と呼ぶ)では、RAPD マーカー 3 個分の W 染色体領域(WF-W)が Z 染色体に転座している(Fujii et al., 2006)。この領域には雌性決定能力はなく、性決定領域を欠く断片であると言える。Mandarina W 系統(以下 MW と呼ぶ)の W 染色体はカイコの祖先種と考えられているクワコに由来する W 染色体(MW-W)である。クワコの W 染色体はカイコの雌性を決定する能力がある。すなわち、カイコとクワコの性決定領域は機能的に同一である。以上 3 系統の piRNA ライブラリを構築し、各トランスポゾンに対する piRNA の発現量を比較することで、性決定領域に偏って存在する piRNA を探索した。3 系統に由来する piRNA の発現量はそれぞれ LY[OV]、WF[TE]、そして MW[OV]と表記する。

5 つの piRNA ライブラリの情報を利用して、以下の基準に従って性決定領域に偏って存在する piRNA を探索した。(i) $WT[OV]/WT[TE]>2$; このパラメータによ

り、W 染色体に当該トランスポゾンが座乗しているかを予測することが可能である。(ii) $0.5 < \text{WT(OV)}/\text{LY(OV)}, \text{WT(OV)}/\text{MW(OV)}$); これによって、野生型 W 染色体と LY-W、あるいは MW(OV)の性状比較が可能であり、この条件を満たすトランスポゾンは LY-W で欠失した領域に存在しない、あるいはクワコ W 染色体にも保存されている、と推察することができる。(iii) $0.5 < \text{WT(TE)}/\text{WF(TE)} < 2$ かつ $\text{WT(OV)}/\text{WF(TE)} > 2$; これらのパラメータによって、Z 染色体に転座した WF-W の性状を推測することができ、この条件を満たすトランスポゾンは WF-W 断片上に存在しない、と推察することができる。(i)、(ii)、(iii)の条件をすべて満たすトランスポゾンは、WF-W 断片には存在せず、LY-W、そして MW-W に存在することになる。すなわち、性決定領域を含む限定された領域に偏って存在するトランスポゾンとそれらに由来する piRNA を同定することができる。

上記の基準に基づく解析の結果、273 配列がこれらの条件を満たすことが分かった(図 4.5)。*Judo* を例にとると(図 4.6)、 $\text{WT[OV]}=3496$ であり、 $\text{LY[OV]}=3627$ 、 $\text{MW[OV]}=3590$ である。よって、*Judo* は LY-W から失われた W 染色体断片には存在しないと考えられる。その一方、 WT[TE] 、そして WF[TE] の値はいずれも卵巣由来 piRNA ライブラリより低いので、WF-W 断片にも *Judo* は存在しないことになる。よって、*Judo* に由来する piRNA は性決定領域に偏っている、と言える(図 4.6)。また、piRNA ライブラリのデータを定量 PCR 解析によって検証したところ、ライブラリ解析と同様の結果を得ることができた(図 4.7)。

本解析は、カイコとクワコの W 染色体の組成についても興味深い知見を与える

ものであると考えられる。121 個のトランスポゾンのうち、107 個のトランスポゾンが $0.5 < WT(OV)/MW(OV) < 2$ という基準を満たした。従って、カイコの W 染色体とクワコの W 染色体に存在するトランスポゾンの組成はかなり似通っていると結論できる。

考察

本論では、piRNA の大規模配列解析を基礎として、カイコの雌性を決める性染色体である W 染色体の新しい特徴を明らかにした(図 4.8)。W 染色体は female-enriched piRNA の巨大な源であり、また、性決定領域に偏って存在する female-enriched piRNA が多数存在することも明らかとなった。さらに、piRNA 配列に基づいてトランスポゾンに富む染色体を解析するというガイドラインは、配列構成が複雑な他生物の染色体を解析するうえでも有効であると考えられる。

本章で同定した female-enriched piRNA がカイコにおける雌性決定に関与する、というのは非常に魅力的な仮説である。しかしながら、この仮説は実験的検証が非常に困難であり、現在、サポーティブなデータがいくつか存在するにとどまっている。例えば、最近新たに藤井らによって発見された KG 系統では、雌成虫において雄様の生殖器構造を呈する表現型が散見され、体細胞の性決定遺伝子である *doublesex(dsx)* 遺伝子の性特異的スプライシングに異常が生じることが知られている。カイコの体細胞における性決定では、この *dsx* 遺伝子が重要な役割を果たすことが知られており、さらには、*dsx* の性特異的スプライシングを制御する因子群も次々と同定されている(Funaguma et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Suzuki et al., 2008; Suzuki et al., 2010)。しかしながら、*dsx* 遺伝子と生殖細胞の性決定の関連は明らかではなく、*dsx* の性特異的スプライシングを制御する因子群も W 染色体には座乗していない。著者らの未発表の研究によって、KG 系統の卵巢では雄特異的遺伝子が発現していること、トランスポゾンの発現異

常が認められること、そして、性決定領域に由来する female-enriched piRNA の発現が低下することが明らかとなっている(Kawaoka et al., unpublished)。すなわち、性決定領域に由来する female-enriched piRNA の発現量と雌性の間に明確な相関が認められる。したがって、性決定領域に由来する female-enriched piRNA がカイコ成虫の性的二型の形成に関与する可能性が考えられる。

一方、カイコ胚発生の段階別 piRNA ライブラリを利用したインフォマティクス解析により、piRNA の性的二型が受精後 24 時間の段階で生じ始めることが分かっている(新井ら、データ示さず)。この段階はまさに *dsx* 遺伝子の性特異的スプライシングが観察されはじめる時期である。当研究室では、現在、カイコ胚子を W 染色体マーカーによって雌雄に分別し、発生段階別に雌雄別 RNA シーケンスを行うことで、カイコ性決定メカニズムに迫ろうとしている。このような研究においても、本章の研究結果は解析の礎になると考えられる。

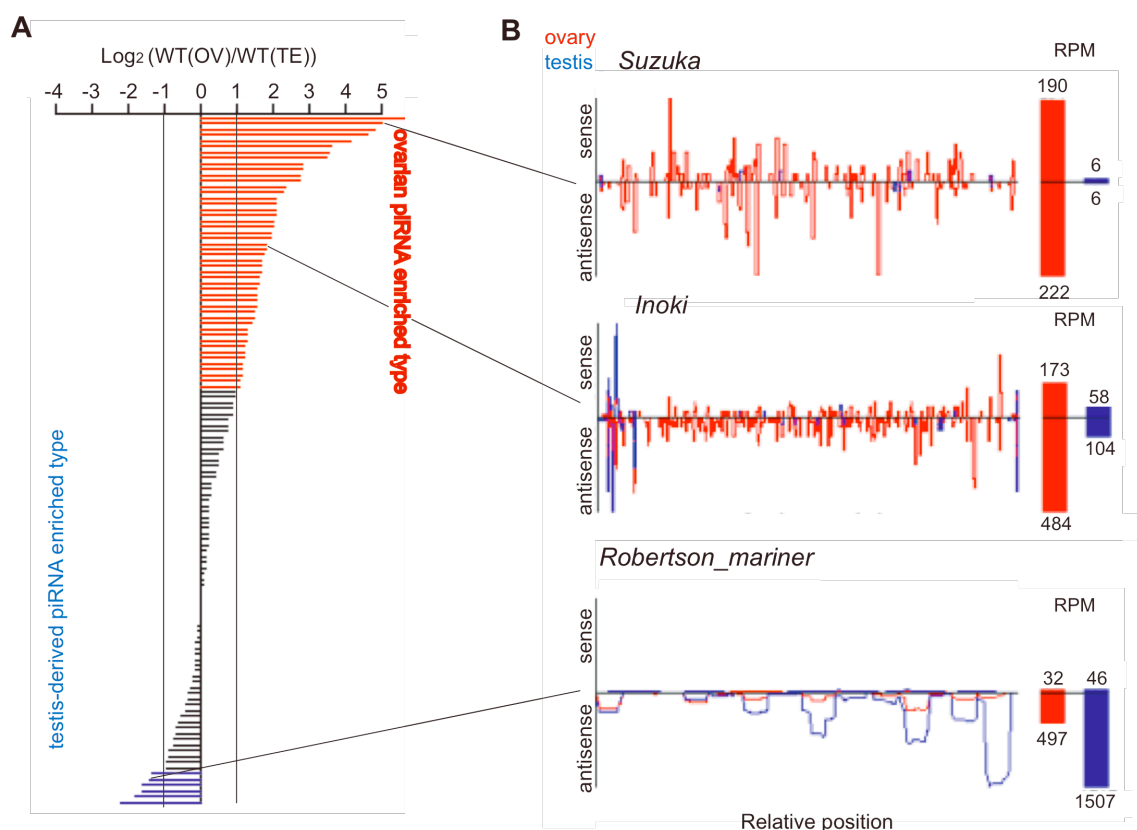


図 4.1 カイコにおける piRNA プロファイルの性的二型

蛹期 4 日目の卵巣および精巣より調製した piRNA ライブラリに由来する piRNA 配列(それぞれ WT[OV]、WT[TE]と表記する)を 121 個のアノテーションされたトランスポゾン配列にマップしたデータを記す。

(A) 各トランスポゾンあたりの $\text{Log}_2(\text{WT}[\text{OV}]/\text{WT}[\text{TE}])$ をプロットした。各バーがトランスポゾンあたりの $\text{Log}_2(\text{WT}[\text{OV}]/\text{WT}[\text{TE}])$ を示す。WT[OV]/WT[TE]>2 となるものを赤線で、WT[OV]/WT[TE]<0.5 となるものを青線で示した。

(B) (A)において赤および青で示したトランスポゾンのうち代表的なものに関して、WT[OV]と WT[TE]をマッピングした density map とと sense、antisense piRNA の相対頻度を示した。ここでも、WT[OV]を赤色で、WT[TE]を青色で図示した。

バイオインフォマティクス解析は門田幸二博士の協力のもと行った。

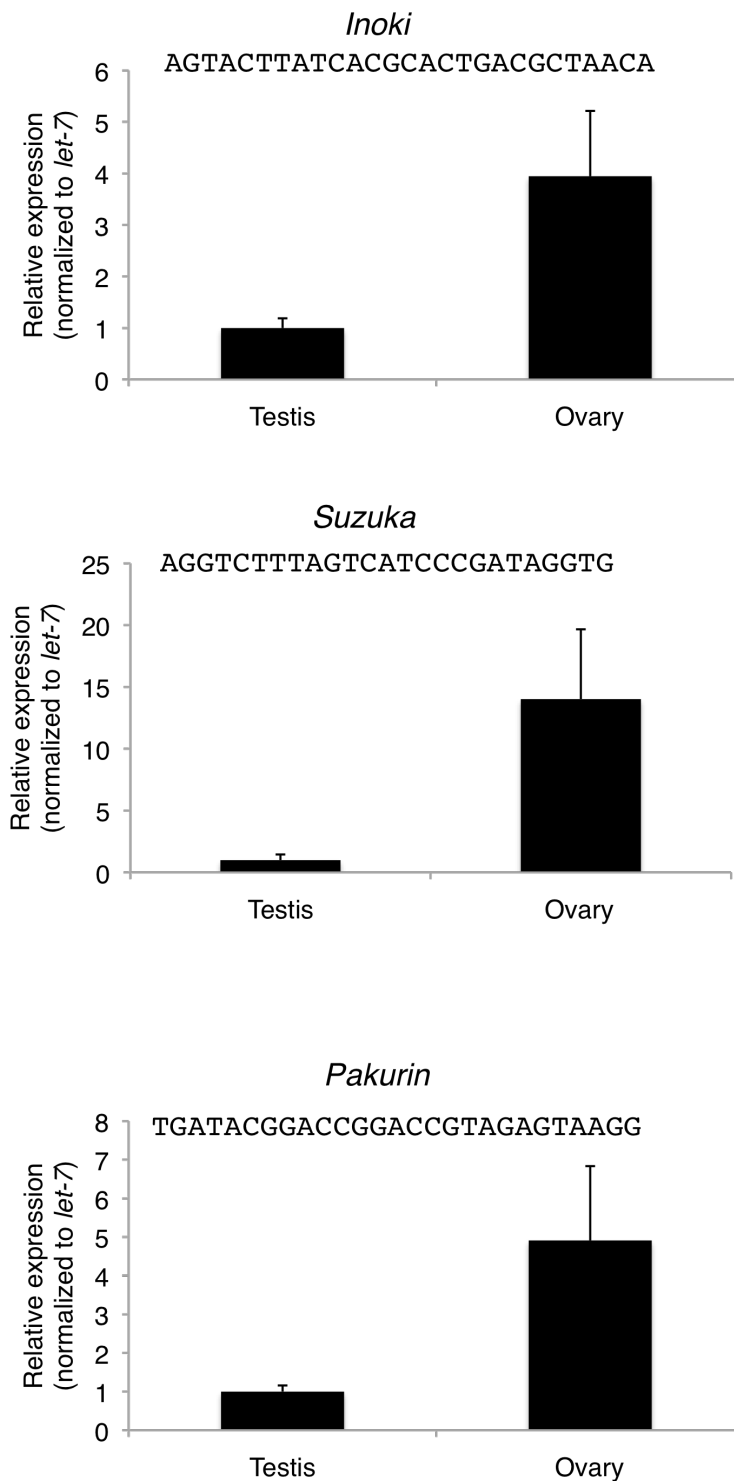


図 4.2 定量 PCR による female-enriched piRNA の確認

定量 PCR によって female-enriched piRNA の存在を確認した。本実験は昆虫遺伝研究室 新井祐二氏によるものである。

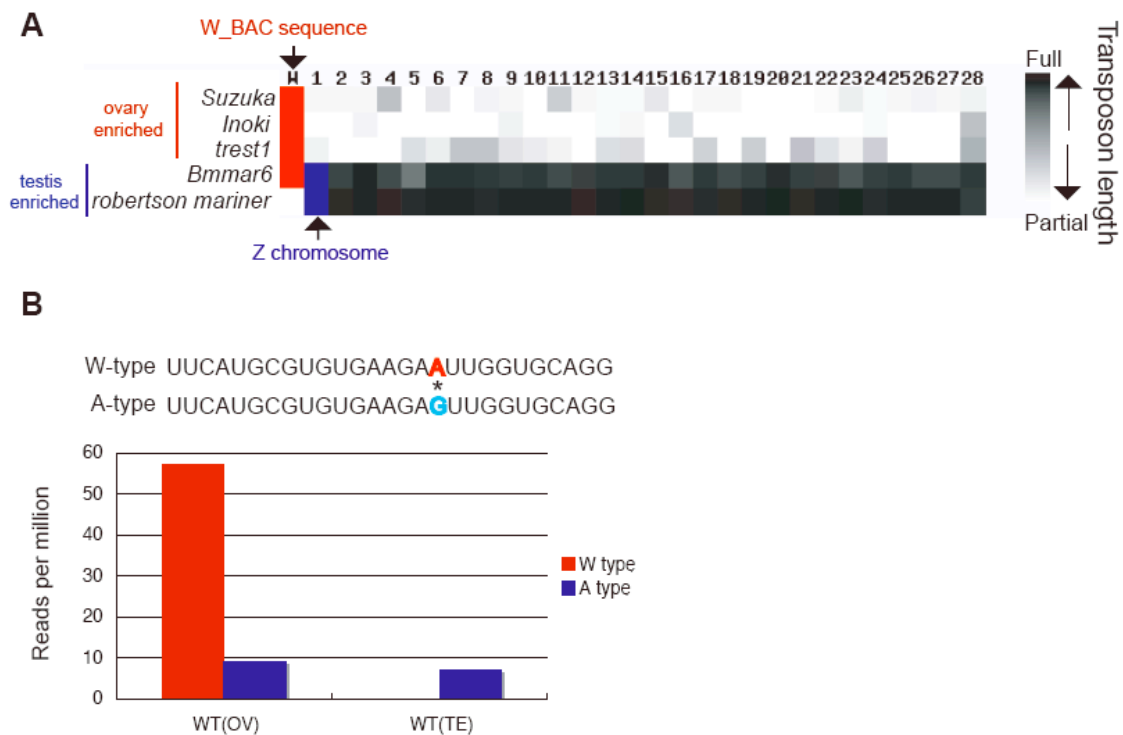


図 4.3 Female-enriched piRNA は W 染色体に由来する

(A) $WT[OV]/WT[TE]>2$ 、あるいは $WT[OV]/WT[TE]<0.5$ となるトランスポゾンそれぞれ赤色、青色で示している。各トランスポゾンを W-BAC 配列、カイコゲノムアセンブリ (Z 染色体と常染色体) に BLAST した。完全長でマップされた染色体に該当するボックスを濃く、断片がマップされた染色体に該当するボックスを薄く示した。

(B) SNP によって W 染色体に由来する piRNA と常染色体に由来する piRNA を区別した。また、各 piRNA の $WT[OV]$ 、 $WT[TE]$ における相対発現頻度をグラフで示した。

バイオインフォマティクス解析は門田幸二博士の協力のもと行った。

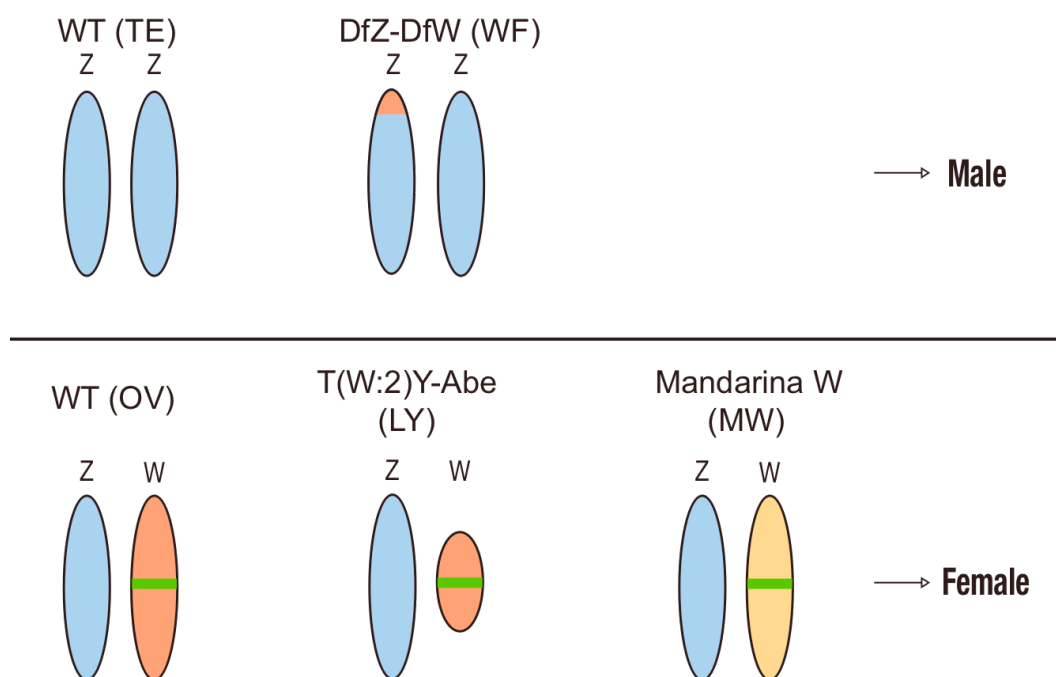


図 4.4 本研究で使用了系統の W 染色体の構造と性決定能

各系統の略称と性決定能を示した。WF に存在する W 染色体断片は雌決定能がない。一方で、LY-W 染色体は、野生型に比べてそのサイズが 1/10 程度と見積もられているにも関わらず、雌性を決定できる。MW に存在するクワコの W 染色体はカイコの雌性を決定できる。

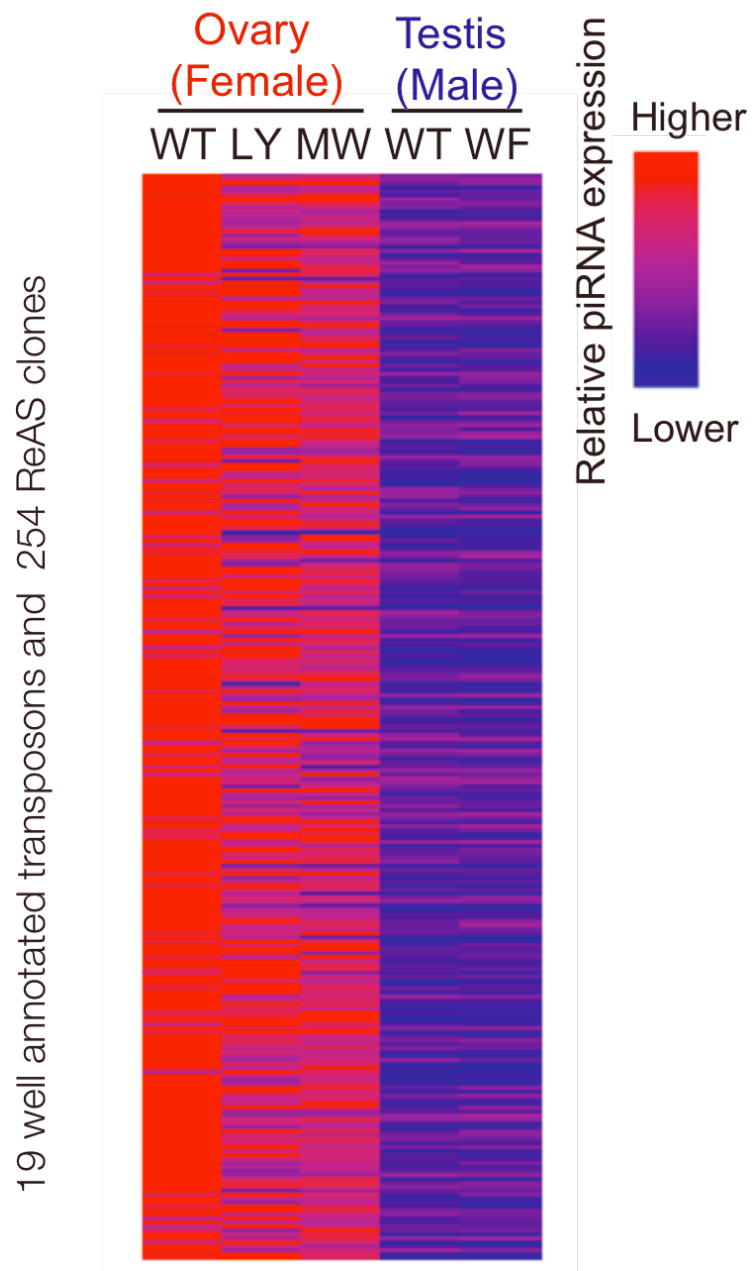


図 4.5 性決定領域への偏って存在する 273 配列のヒートマップ

図に示した各 piRNA ライブラリにおける相対発現量を示した。

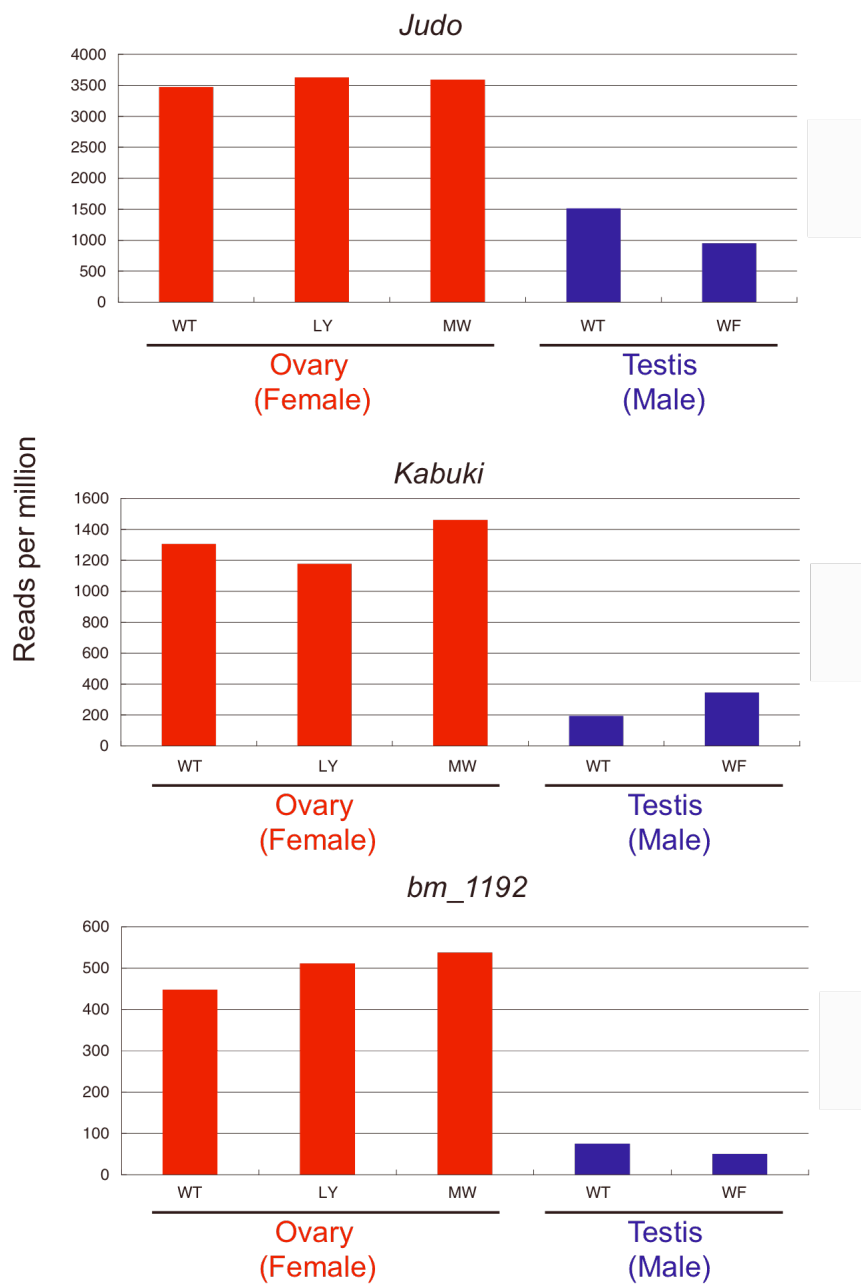


図 4.6 性決定領域に偏って存在するトランスポゾンの代表例

図 4.5 で示したトランスポゾンの一部に関して、piRNA の相対発現量を棒グラフで図示した。

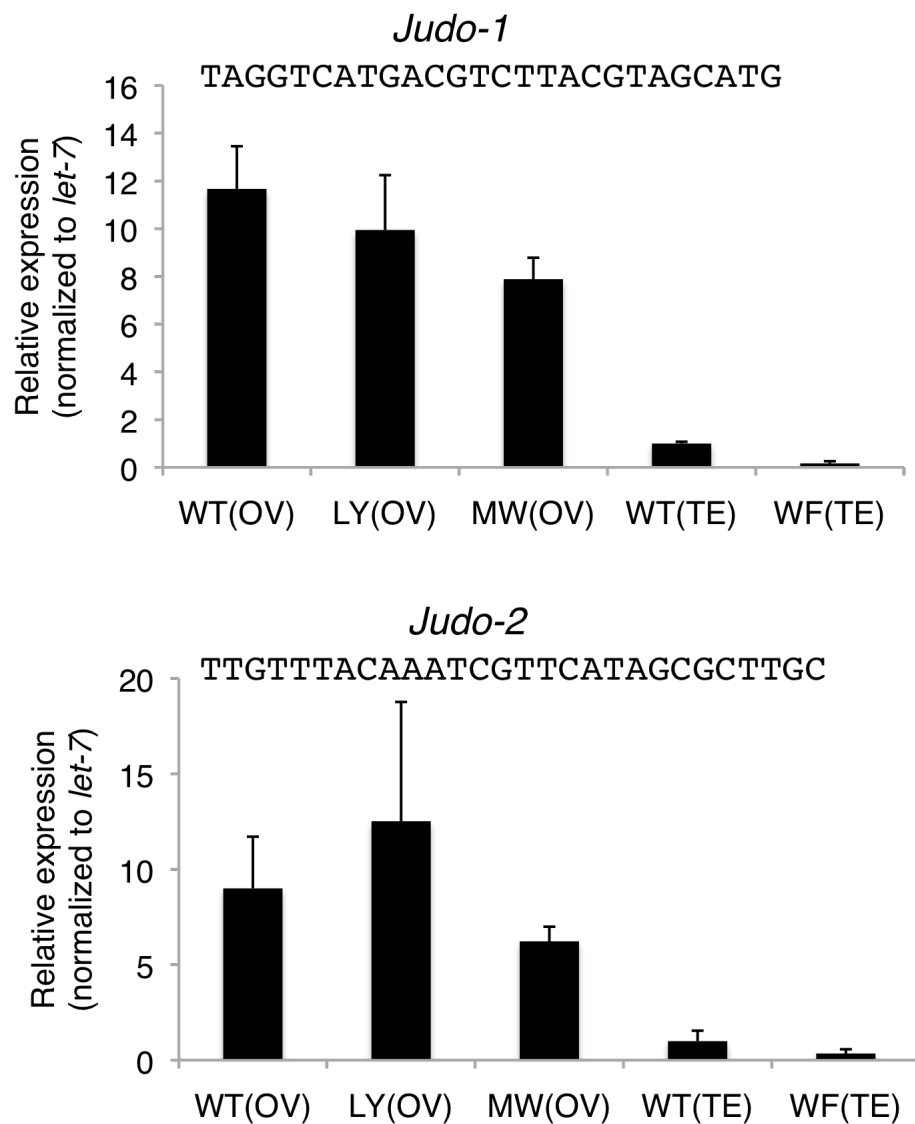


図 4.7 性決定領域に偏って存在する piRNA の定量 PCR による確認

定量 PCR によって、性決定領域に偏って存在する piRNA の存在を確認した。本実験は昆虫遺伝研究室 新井祐二氏によるものである。

Silkworm W chromosome as a source of female-enriched piRNAs

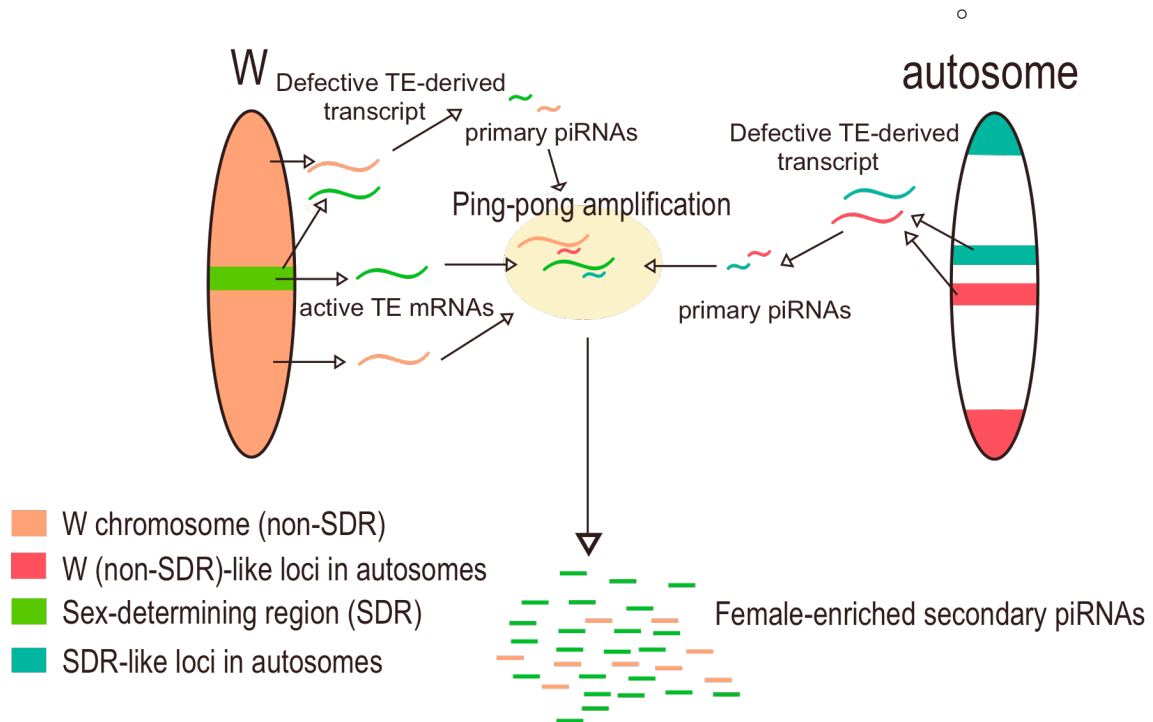


図 4.8 W 染色体による piRNA 生合成モデル

W 染色体は、完全長トランスポゾン mRNA、あるいはトランスポゾン断片に由来する piRNA を供給することで female-enriched piRNA を産生する。一部の piRNA は性決定領域に偏って存在する。産生された female-enriched piRNA の機能は未知である。

Serial	name	log ₂ (OV/TE)	OV p-value	TE p-value
TK0080	Non-LTR_retrotransposon_Pakurin	6.29	0.000	0.000
TK0066	LTR_Rikishi-Full_length_Kabuki_type	5.32	0.000	1.000
TK0067	LTR_Suzuka-Full_length_Kabuki_type	4.96	0.000	1.000
TK0056	LTR_Kenta-Full_length_Pao_type	4.76	0.000	1.000
TK0013	Bm1-related_LTR-Yaocho	4.41	0.000	1.000
TK0116	W-Yukemuri_L	4.02	0.000	1.000
TK0045	D55702-tresl	3.59	0.000	1.000
TK0078	non-LTR_retrotransposon_Daiki	3.54	0.000	1.000
TK0081	non-LTR_Taguchi	2.86	0.000	1.000
TK0059	LTR_Matsui-Full_length_Mag_type	2.86	0.000	1.000
TK0048	Kabuki	2.76	0.000	1.000
TK0101	TRAS5	2.54	1.000	1.000
TK0100	TRAS4	2.45	1.000	1.000
TK0083	non-LTR_TREST-W	2.38	0.000	0.000
TK0107	W-Bonsai	2.16	0.000	1.000
TK0044	D38414-TRAS1	2.14	0.232	1.000
TK0021	BmRT11	2.12	0.000	1.000
TK0046	D85594-SART1	2.11	0.000	0.000
TK0002	AB046668-TRAS3	2.05	0.000	1.000
TK0108	W-Mikan	2.03	0.000	0.116
TK0052	LTR_Inoki-Full_length_Pao_type	2.01	0.000	1.000
TK0102	TRAS6	1.89	1.000	1.000
TK0041	BmRT7	1.84	0.000	0.000
TK0112	W-Samurai_partial_2	1.82	0.000	0.001
TK0114	W-Samurai_partial_4	1.78	0.000	0.001
TK0003	AB090825_HOPEBm2	1.77	0.000	0.000
TK0119	lcl_Retrovirus_Kuroneko	1.73	0.000	1.000
TK0060	LTR_Moriya_7603bp_Pao_group	1.72	0.000	0.000
TK0111	W-Samurai_partial_1	1.71	0.000	0.000
TK0113	W-Samurai_partial_3	1.71	0.000	0.001
TK0031	BmRT20	1.68	0.000	0.000
TK0115	W-Sasuke	1.58	0.000	0.106
TK0016	Bm5886_high-copy-non-LTR-retrotransposon	1.57	0.000	0.000
TK0105	TRASZ_partial	1.54	1.000	1.000
TK0004	AF273696-BmTc1	1.49	0.000	1.000
TK0073	non-LTR_Kendo	1.48	0.000	0.000
TK0028	BmRT18	1.41	0.000	0.055
TK0110	W-Sakura	1.33	0.000	0.000
TK0099	Supermite-BMC1	1.26	0.000	0.000
TK0092	other-repeats_Nukegara_LTR_type	1.26	0.000	0.000
TK0050	L1Bm_AB002281_after_720	1.22	0.000	0.000
TK0053	LTR_Judo-Full_length	1.20	0.000	0.000
TK0084	non-LTR_Yubi	1.19	0.000	0.000
TK0109	W-Musashi	1.17	1.000	1.000
TK0088	other-repeats_Kohichi	1.16	0.070	1.000
TK0076	non-LTR_Nakasone	1.11	0.000	0.000
TK0017	BMC1_Abe	0.97	0.000	0.000
TK0072	non-LTR_BMC1_W_chromosome	0.97	0.000	0.000
TK0062	LTR_Nemawashi-Full_length	0.90	0.000	0.000
TK0069	LTR_Yokohama-Full_length_pao_type	0.90	0.000	0.000
TK0068	LTR_Yamato-Full_length_Pao_type	0.89	0.000	0.000
TK0061	LTR_Muta-Full_length_Pao_type	0.79	0.318	1.000
TK0032	BmRT21	0.78	0.000	0.000
TK0035	BmRT26	0.76	0.000	0.000
TK0089	other-repeats_Kusanagi	0.66	0.001	1.000
TK0049	L09635-Pao	0.65	0.000	0.000
TK0051	LTR_Ichiro-Full_length_Pao_type	0.64	0.000	0.000
TK0071	MITE-Nabedandy	0.54	1.000	1.000
TK0094	other-repeats_Seppuku	0.54	1.000	1.000
TK0042	BmRT9	0.52	0.000	0.000
TK0065	LTR_Otora-Full_length_Copia_type	0.52	0.000	0.000
TK0077	Non-LTR_retrotransposon_Benkei	0.48	0.000	0.000
TK0096	R2Bm	0.45	1.000	0.000
TK0009	Bm1-related_ChoBm1	0.41	0.000	0.000
TK0039	BmRT5	0.33	0.000	0.000
TK0118	X17219-Mag	0.29	0.000	0.000
TK0098	Shirigonomi	0.27	1.000	1.000
TK0011	Bm1-related-Ins11	0.24	0.000	0.007
TK0001	AB014676-yokozuna	0.24	0.000	0.000
TK0040	BmRT6	0.24	0.000	0.000
TK0064	LTR_Orochi-Full_length_Pao_type	0.24	0.000	0.000
TK0020	BmRT10	0.22	0.000	0.000
TK0038	BmRT3	0.22	0.000	0.000
TK0034	BmRT25	0.22	0.000	0.000
TK0055	LTR_Karate-Full_length_Micropia_type	0.22	0.000	0.000
TK0012	Bm1-related_LTR-Kinne	0.21	0.000	0.000
TK0091	other-repeats_Nagisa	0.19	1.000	1.000
TK0006	Bm1	0.18	0.001	0.296
TK0082	non-LTR_Takuya	0.15	0.000	0.000
TK0037	BmRT2	0.13	0.001	0.000
TK0058	LTR-Kokubaru_6926bp_Pao_group	0.13	0.000	0.000
TK0054	LTR_Kamikaze-Full_length_Pao_type	0.09	0.000	0.000
TK0087	other-repeats_Kasu_polyA_type	0.09	0.000	0.000
TK0019	BmpiggyBac-MER85	0.02	0.000	0.000
TK0074	non-LTR_Kinutaku	0.02	0.000	0.000
TK0121	lcl_Kaeede_Pao-type_LTR_retrotransposon	0.00	0.000	0.000
TK0103	TRASW_partial	0.00	1.000	1.000
TK0104	TRASV_partial	0.00	1.000	1.000
TK0117	W-Yukemuri-S	0.00	1.000	1.000
TK0010	Bm1-related_Hikikomori	0.00	0.262	0.190
TK0090	other-repeats_Minichikuri	-0.01	0.000	0.000
TK0095	R1Bm	-0.03	0.002	1.000
TK0043	Chochin	-0.07	0.000	0.000
TK0022	BmRT12	-0.08	0.000	0.000
TK0024	BmRT14	-0.10	0.000	0.000
TK0075	non-LTR_Koshinaka	-0.11	0.000	0.000
TK0097	repetitive_sequence_Amanoya	-0.12	0.000	0.000
TK0027	BmRT17	-0.13	0.000	0.000
TK0093	other-repeats_Sayama	-0.16	0.000	0.000
TK0008	Bm1-related_Bm1modoki	-0.17	0.000	0.000
TK0026	BmRT16	-0.25	1.000	1.000
TK0120	lcl_LTR-Benibana-Full_length	-0.28	0.000	0.000
TK0085	other-repeats_Chikuri_polyA_type	-0.29	0.000	0.000
TK0007	Bm1-related_Bm1-450bp_type	-0.37	0.000	0.003
TK0015	Bmhyper_not_many	-0.39	0.000	0.000
TK0014	Bm1-related_Neet	-0.51	0.000	0.000
TK0086	other-repeats_FUI	-0.56	0.000	0.000
TK0036	BmRT27	-0.67	0.000	0.000
TK0070	MITE-Hoshidandy	-0.69	1.000	1.000
TK0057	LTR_Kimono-Full_length_Pao_type	-0.70	0.000	0.000
TK0023	BmRT13	-0.70	0.240	0.000
TK0079	non-LTR_retrotransposon_Kagayaki	-0.82	0.000	0.000
TK0029	BmRT19	-0.83	0.000	0.000
TK0063	LTR_Noguchi-Full_length_Pao_type	-0.89	0.000	0.000
TK0030	BmRT1	-0.89	0.000	0.950
TK0005	AF461149_Bmmar6	-1.31	0.000	0.000
TK0015	Bm1-related_tenshi	-1.48	1.000	0.247
TK0033	BmRT24	-1.55	0.000	0.000
TK0106	U47917-robertson-mariner	-1.55	0.000	0.000
TK0047	D88671-tomita-mariner	-1.81	1.000	0.006
TK0025	BmRT15	-2.14	0.000	0.000

表 4.1 121 のアノテーションされたト

ランスポゾンにおけるピンポンシグネ

チャーの統計的解析

材料と方法に記載した方法に従って統

計的解析を行った。トランスポゾンは

WT[OV]/WT[TE]の値に従って並べ替え

て表示した。

表 4.2 Female-enriched piRNA の strand specificity

WT[OV]/WT[TE]>2 となるトランスポゾンに関して、 $\text{WT(OV)}_{\text{antisense}}/\text{WT(TE)}_{\text{antisense}}$ 、 $\text{WT(OV)}_{\text{sense}}/\text{WT(TE)}_{\text{sense}}$ を計算し、表記した。

serial	name	length	$\log_2(\text{OV} / \text{TE})$	sense ratio	antisense ratio
TK0080	Non_LTR_retrotransposon_Pakurin	6835	6.29	11.8	109.6
TK0066	LTR_Rikishi-Full_length_Kabuki_type	4560	5.32	45.5	37.2
TK0067	LTR_Suzuka-Full_length_Kabuki_type	4807	4.96	28.7	33.5
TK0056	LTR_Kenta-Full_length_Pao_type	3000	4.76	100.7	16.6
TK0013	Bm1-related_LTR-Yaocho	5851	4.41	13.3	24.5
TK0045	D55702-trest1	1738	3.59	9.0	13.1
TK0078	non-LTR_retrotransposon_Daiki	3365	3.54	2.0	19.6
TK0081	non-LTR_Taguchi	6846	2.86	4.4	7.5
TK0059	LTR_Matsui-Full_length_Mag_type	4552	2.86	6.1	7.9
TK0048	Kabuki	5308	2.76	63.9	5.8
TK0083	non-LTR_TREST-W	6968	2.38	3.0	5.6
TK0107	W-Bonsai	1435	2.16	12.0	4.0
TK0044	D38414-TRAS1	7850	2.14	2.6	11.8
TK0021	BmRT11	3673	2.12	6.9	2.1
TK0046	D85594-SART1	6684	2.11	4.1	4.3
TK0002	AB046668-TRAS3	8005	2.05	2.5	14.7
TK0108	W-Mikan	600	2.03	5.0	3.5
TK0052	LTR_Inoki-Full_length_Pao_type	6369	2.01	3.0	4.6
TK0102	TRAS6	1908	1.89	0.9	7.2
TK0041	BmRT7	8899	1.84	4.2	1.2
TK0112	W-Samurai_partial_2	871	1.82	1.3	5.6
TK0114	W-Samurai_partial_4	871	1.78	1.3	5.4
TK0003	AB090825_HOPEBm2	3883	1.77	4.6	3.4
TK0119	lcl Retrovirus_Kuroneko	7997	1.73	2.6	3.5
TK0060	LTR-Moriya_7603bp_Pao_group	7603	1.72	2.9	3.3
TK0111	W-Samurai_partial_1	871	1.71	1.3	4.8
TK0113	W-Samurai_partial_3	871	1.71	1.3	4.8
TK0031	BmRT20	6448	1.68	3.3	2.0
TK0115	W-Sasuke	1004	1.58	3.6	1.4
TK0016	Bm5886_high-copy-non-LTR-retrotransposon	3055	1.57	0.7	3.4
TK0004	AF273696-BmTc1	1656	1.49	2.7	4.4
TK0073	non-LTR_Kendo	3676	1.48	0.9	2.9
TK0028	BmRT18	6799	1.41	1.3	8.5
TK0110	W-Sakura	1269	1.33	3.3	0.8
TK0099	Supermite-BMC1	1991	1.26	0.8	2.9
TK0092	other-repeats_Nukegara_LTR_type	764	1.26	7.3	0.8
TK0050	L1Bm_AB002281_after_720	2303	1.22	0.7	2.4
TK0053	LTR_Judo-Full_length	3097	1.20	3.8	2.2
TK0084	non-LTR_Yubi	5210	1.19	0.6	10.0
TK0109	W-Musashi	574	1.17	2.3	1.8
TK0088	other-repeats_Kohichi	1303	1.16	1.5	2.6
TK0076	non-LTR_Nakasone	5554	1.11	1.7	2.3

表 4.3 プライマーリスト

primer name	seq (5' to 3')	purpose
<i>Suzuka-piRNA</i> -qPCR	AGGTCTTTAGTCATCCCGATAGGTG	RT-PCR
<i>Inoki-piRNA</i> -qPCR	AGTACTTATCACGCACTGACGCTAACA	RT-PCR
<i>Pakurin-piRNA</i> -qPCR	TGATACGGACCGGACCGTAGAGTAAGG	RT-PCR
<i>Judo-piRNA</i> -qPCR1	TAGGTCATGACGTCTTACGTAGCATG	RT-PCR
<i>Judo-piRNA</i> -qPCR2	TTGTTTACAAATCGTTCATAGCGCTTGC	RT-PCR
<i>bmo-let7</i>	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTA	RT-PCR

総合考察

本研究の総括

本博士論文では、動物の生殖細胞におけるトランスポゾン抑制の中核分子である PIWI タンパク質と piRNA の複合体に関する研究について、カイコをモデルとして行った解析結果について論じた。まず、第一章では、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発現するユニークな培養細胞であることを証明した(Kawaoka et al., 2009)。第二章では、BmN4 細胞を利用して、piRNA 経路がどのようにトランスポゾンをトランスポゾンと認識するか、という問題について論じた(Kawaoka et al., 2011d)。第二章の研究により、外来遺伝子の piRNA クラスターへの挿入とそれに続く転写が piRNA 経路によるトランスポゾン認識の重要なステップであることが明らかとなった。第三章では、BmN4 細胞のタンパク質抽出物を用いた in vitro 系によって piRNA 生合成経路の 1st ステップを再現することに成功した(Kawaoka et al., 2011b)。第四章では、カイコの雌性決定染色体である W 染色体を piRNA の比較解析という新しい視点から研究し、W 染色体が female-enriched piRNA の源であること、一群の piRNA が雌性決定領域に偏って存在していることを示した(Kawaoka et al., 2011c)。

piRNA 経路によるトランスポゾン認識機構

第二章で述べたように、BmN4 細胞を用いたシステムを有効活用することで、外来遺伝子に対して細胞が piRNA を作り出すための必要十分条件に迫る実験をデザインすることができるようになった。ChIP シークエンスなどのいわゆる

-omics 解析は、サンプルの純度、あるいは細胞のヘテロ性によって結果が大きく異なってしまふことがある。BmN4 細胞はその問題点を解決することができる材料であり、また、遺伝子導入なども比較的容易であるため、本問題を論じるに今後中心的役割を果たすものと期待している。最近、他のグループの研究によって、piRNA クラスタにトランスジーンを組み込んだコンストラクトを用いてトランスジェニックショウジョウバエ、あるいはトランスジェニックマウスを作成することで、本研究で観察されたものと同等の現象を観察できることが報告されている (Muerdter et al., 2011)。トランスポゾンの配列が生物種間でほとんど保存されていないことから推察できるように、piRNA の配列は種間の保存性が非常に低い。piRNA を産生するためのシグナル配列は種間で保存されているのだろうか？piRNA を介したクロマチンのエピジェネティックな制御状態は共通なのだろうか？piRNA クラスタ自体はどのように誕生したのだろうか？これらの問題には、カイコ、キイロショウジョウバエ、およびマウスなど多種の生物を用いた種間相互比較解析が必要であろう。

piRNA クラスタからの転写に必要なタンパク質としては、Heterochromatin protein1(HP1)のパラログである Rhino が必須の役割を担うことがキイロショウジョウバエを用いた研究から明らかにされている(Klattenhoff et al., 2009)。同じくキイロショウジョウバエを用いた研究によって、ヒストン 3 の 9 番目のリジンをメチル化するメチルトランスフェラーゼである SETDB1 タンパク質によるヘテロクロマチン形成が piRNA の産生に必要であることが示されている (Rangan et al., 2011)。これらの研究と上述の研究結果がどのように関連してくる

かも非常に重要な問題である。

第二章の研究結果は、応用研究につながる側面を有している。すなわち、望んだ配列を *torimochi* 領域へと挿入することで、piRNA 経路を介した遺伝子ノックダウン法を確立することが可能である。しかも、piRNA は生殖細胞を通して次世代へと伝わること、胚発生に伴ってトランスポゾン mRNA の切断に寄与することが実証されている(Brennecke et al., 2008; Kawaoka et al., 2011a)。本ノックダウンシステムは生殖細胞を通して次世代へと伝わる可能性が高く、カイコにおける世代間ノックダウンが実現できると考えられる。

トリマーの分子実体同定に向けて

第三章において piRNA 生合成を再現する *in vitro* 系を世界で初めて確立した。この流れにおける次なる目標は、トリマーの分子実体を明らかにすることである。これまで、キイロショウジョウバエの遺伝学的解析から、いくつかのヌクレアーゼが piRNA 経路に必須であることが分かっている。例えば Zucchini は、マウス、キイロショウジョウバエ、カイコで保存されたエンドヌクレアーゼ様タンパク質であり、piRNA の産生とトランスポゾン抑制に必須であることが示されている(Pane et al., 2007; Saito et al., 2009; Haase et al., 2010; Watanabe et al., 2011)。しかしながら、Zucchini は可溶性のタンパク質であり、本研究におけるトリマーの生化学的性質と異なっている。また、最近の知見から、ヌクレアーゼというよりはむしろ脂質代謝に関与する酵素であることが示唆されている

(Watanabe et al., 2011a)。Maelstrom は DNA 結合ドメインをもつと同時に、弱く保存されたエキソヌクレアーゼドメインを持つタンパク質である(Lim and Kai, 2007; Soper et al., 2008; Zhang et al., 2008; Aravin et al., 2009; Pek et al., 2009)。しかしながら、Maelstrom も可溶性のタンパク質であり、マウスの Maelstrom 変異体では piRNA の完全な消失は認められない (Soper et al., 2008)。piRNA 経路への関与は示唆されていないが、スタフィロコッカスタイプのヌクレアーゼであり、RNA、あるいはタンパク質結合ドメインである Tudor ドメインをもつ Tudor-SN(Caudy et al., 2003; Schwarz et al., 2004)もトリマーの候補として考えられた。しかし、著者の実験により、Tudor-SN の機能阻害剤である 5', 3'-diphosphate がトリミング活性を阻害できないことが明らかとなっている (データ示さず)。以上のことから、現時点ではトリマーの遺伝子候補が見つからない状態である。著者らは現在、RNA シークエンシングによって BmN4 細胞に発現するヌクレアーゼを網羅的に同定しようとしているが、今後、トリマーの分子実体を同定するためには、BmN4 細胞を活用した一連の実験の寄与が必要不可欠であり、他モデル生物を用いた-omics 解析、遺伝学的解析の組み合わせによって piRNA 生合成マシナリーの解明におけるブレイクスルーがうまれるだろう。

本論では詳しく述べなかったが、piRNA 経路に関与するタンパク質群は核膜のまわりに偏って局在し、ある種の構造体を形成することが知られている。当該構造体は電子密度が高く、雲のように観察されるため、フランス語の雲の意味で nuage(ヌアージュ)と呼ばれる(Lim and Kai, 2007; Li et al., 2009a; Patil and Kai, 2010)。BmN4 細胞はヌアージュのダイナミクスを観察することにも非常に適し

た材料である。先に述べた Tudor ドメインはヌアージュ形成に必須なドメインとされ、Tudor ドメインを持つタンパク質群は Tudor ファミリーと呼ばれる。Tudor ドメインタンパク質の多くは piRNA 経路の機能発現に必須であることが知られている(Nishida et al., 2009; Shoji et al., 2009; Vagin et al., 2009; Wang et al., 2009a; Kirino et al., 2010a; Kirino et al., 2010b; Olivieri et al., 2010; Patil and Kai, 2010; Liu et al., 2011; Qi et al., 2011; Handler et al., 2011; Zamparini et al., 2011)。また、一般に、Tudor と PIWI タンパク質群の結合は PIWI タンパク質 N 末端に存在するメチル化アルギニンを介することが知られている(Kirino et al., 2009; Nishida et al., 2009; Vagin et al., 2009; Kirino et al., 2010a; Kirino et al., 2010b)。ヌアージュの具体的な機能、あるいはその形成過程はほぼ謎に包まれているが、BmN4 細胞を用いた研究が新たな進展をうみだす可能性が考えられる。

性染色体に由来する piRNA

W 染色体と piRNA の関係に関する研究は、カイコ W 染色体の研究に新しい方向性を示した。第四章で述べた通り、本研究を礎として、female-enriched piRNA の生理機能に迫るような研究が展開されることが期待される。実際に female-enriched piRNA の機能に関する傍証が得られつつある。piRNA 研究はさまざまなモデル生物を用いて行われているが、トランスポゾン抑制以外の生理機能に関する研究はほとんど行われていない。この点に関しても、カイコというユニークな材料を活用した piRNA 研究は重要であると言える。本研究は、トランスポゾンが単なる負の因子ではない、という立場にたっている。実際、ト

ランスポゾンに由来する配列が宿主ゲノムにとって有用であることを示唆する研究はいくつか報告されている(Volff et al., 2001; Ono et al., 2006; Cam et al., 2008)。全くのがらくた、あるいは負の因子なのであれば、なぜこれほど多くのトランスポゾンが宿主ゲノムから排除されずに残っているのだろうか？著者には、トランスポゾン、それらに由来する piRNA が、新しい生理機能を有しているように思えてならない。

カイコをモデルとした piRNA 研究

これまで述べてきたように、カイコという材料を活用することで、piRNA 経路にトランスポゾン認識機構ならびに piRNA 生合成経路に関する piRNA 経路の根幹をなす命題に取り組むことができた。その一方で、W 染色体というユニークな性決定染色体に着目することで、トランスポゾン抑制以外の piRNA 経路の機能に迫ることもできた。以後、本論文で述べてきたシステムを活用するような piRNA 研究が、新しい事実の発見に寄与していくことが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 昆虫遺伝研究室 勝間進准教授には素晴らしい指導をしていただきました。勝間准教授は著者の性格を非常によく理解したうえで、著者の良いところを伸ばすように、そして悪いところを減らしていくように、研究面だけではなく社会生活面においても適切な指導をしてくださいました。著者が道に迷った際には、決して強要することなく、適切な道筋をさりげなく辛抱強く指し示してくださいました。勝間准教授に出会えたことは著者の得難い幸運でした。5年間のご指導に、この場を借りて感謝申し上げます。

嶋田透教授には、研究室参加以来、著者の研究に関して客観的かつ適切な指導を賜りました。著者の非常に生意気かつ無礼な一面を知りつつも暖かく見守ってくださったことに深く感謝申し上げます。

東京大学分子細胞生物學研究所 泊幸秀准教授には、正統な生化学実験に関する薫陶を賜りました。明瞭かつシンプルな考え方によって現象を切り分け、試験管内で再現する、というアプローチならびに思考法を学ぶことをできたのは著者の財産です。論文執筆に関する薫陶を受けることができたことも幸運でした。また、研究面のみならず、種々の国際学会への参加の道筋を示してくださいましたことは、著者の研究人生に大きく影響しました。深く感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 アグリバイオインフォマティクス養成ユニット 門田幸二特任助教には、バイオインフォマティクス全般に関する薫陶を受けました。迷惑も省みず通い詰める著者に丁寧かつ適切な指導をしてくださった甲斐あって、著者自らある程度の小分子 RNA に関するインフォマティクス解析を行うことができるようになりました。門田博士に教わった技術は著者の財産のひとつであり、感謝申し上げます。同研究科 清水謙太郎教授にもインフォマティクス解析のご援助をいただきました。感謝申し上げます。

東京大学大学院新領域研究科 鈴木穰准教授、菅野純夫教授には、小分子 RNA の大規模配列決定全般を行っていただきました。著者の研究は大規模配列決定なしでは語ることができません。多大なるご協力に感謝申し上げます。

本研究科修士課程卒業、現農林水産省勤務の林伸光氏には、カイコを用いた piRNA 研究を展開する初期段階で、本論文における第一章で記載したインフォマティクス解析において多大なる援助をしていただきました。同期の仲間と机を並べ、試行錯誤、暗中模索を続けたことは、素晴らしい体験でした。林氏の多大なるご協力に感謝申し上げます。

第二章で記載したトランスジェニックセルラインは、山口大学 小林淳教授、同博士課程 光武宏氏によって作出されました。2010 年に信州大学で開催された蚕糸学会における出合いが第二章に記した研究のきっかけでした。深く感謝申し上げます。

第二章で記載した **trans silencing** 実験は、昆虫遺伝研究室 木内隆史特任助教によるものです。木内博士には、本実験のみならず、研究のさまざまな面で多大なるご援助をいただきました。木内博士からは、実験に対する思慮深さ、慎重さの重要性を学びました。深く感謝申し上げます。

第二章で記載した **RACE** 実験は、分子細胞生物学的研究所博士課程 小林真希氏によるものです。小林氏の粘り強い解析が、新規 **piRNA** クラスタである *torimochi* の発見につながりました。深く感謝申し上げます。

分子細胞生物学的研究所 泉奈津子博士には、第三章で記載した生化学データのうち、各種 **Siwi** 変異体の解析を行っていただきました。泉博士の出された一連の美しいデータは、投稿論文作成の際の大きな助けとなりました。深く感謝申し上げます。

第四章に記載した **W-BAC** 配列解析は、農業資源生物研究所 三田和英博士、安河内祐二博士、東京農工大学 阿部広明博士によるものです。深く感謝申し上げます。

第四章に記載した **W** 染色体変異体は、東京農工大学 阿部広明博士、東京大学大学院農学生命科学研究科 藤井告博士によって作出、提供されました。深く感謝申し上げます。

第二章、四章に記載した piRNA-qPCR 解析はそれぞれ、分子細胞生物学研究所 博士課程 吉川真由氏、東京大学農学生命科学研究科修士課程 新井祐二氏によるものです。深く感謝申し上げます。

また、この 5 年のあいだにともに研究を行う機会を供にくださった、昆虫遺伝研究室の川本宗孝氏、南皓輔氏、安原聡氏、原加保里氏、庄司圭祐氏に感謝申し上げます。多くの仲間の存在なくして、研究を進めることはできませんでした。また、実際に同じ研究課題にアプローチせずとも、昆虫遺伝研究室、泊研究室に所属している、あるいは所属していたメンバーの全員に、感謝申し上げます。

引用文献

Abe, H., T. Fujii, N. Tanaka, T. Yokoyama, H. Kakehashi, M. Ajimura, K. Mita, Y. Banno, Y. Yasukochi, T. Oshiki, M. Neno, T. Ishikawa and T. Shimada. 2008. Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica* **133**: 269-282.

Abe, H., M. Kanehara, T. Terada, F. Ohbayashi, T. Shimada, S. Kawai, M. Suzuki, T. Sugasaki and T. Oshiki. 1998. Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes Genet Syst* **73**: 243-254.

Abe, H., K. Mita, Y. Yasukochi, T. Oshiki and T. Shimada. 2005a. Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet Genome Res* **110**: 144-151.

Abe, H., M. Seki, F. Ohbayashi, N. Tanaka, J. Yamashita, T. Fujii, T. Yokoyama, M. Takahashi, Y. Banno, K. Sahara, A. Yoshido, J. Ihara, Y. Yasukochi, K. Mita, M. Ajimura, M.G. Suzuki, T. Oshiki and T. Shimada. 2005b. Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* **14**: 339-352.

Abe, H., T. Sugasaki, T. Terada, M. Kanehara, F. Ohbayashi, T. Shimada, S. Kawai, K. Mita and T. Oshiki. 2002. Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*. *Insect Mol Biol* **11**: 307-314.

Aravin, A., D. Gaidatzis, S. Pfeffer, M. Lagos-Quintana, P. Landgraf, N. Iovino, P. Morris, M.J. Brownstein, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan and T. Tuschl. 2006. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**: 203-207.

Aravin, A.A., M. Lagos-Quintana, A. Yalcin, M. Zavolan, D. Marks, B. Snyder, T. Gaasterland, J. Meyer and T. Tuschl. 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* **5**: 337-350.

Aravin, A.A., G.W. van der Heijden, J. Castaneda, V.V. Vagin, G.J. Hannon and A. Bortvin. 2009. Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS Genet* **5**: e1000764.

Aravin, A.A. and D. Bourc'h. 2008. Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev* **22**: 970-975.

Aravin, A.A., R. Sachidanandam, D. Bourc'h, C. Schaefer, D. Pezic, K.F. Toth, T. Bestor and G.J. Hannon. 2008. A piRNA pathway primed by individual transposons is

linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* **31**: 785-799.

Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond and G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.

Brennecke, J., A.A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam and G.J. Hannon. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**: 1089-1103.

Brennecke, J., C.D. Malone, A.A. Aravin, R. Sachidanandam, A. Stark and G.J. Hannon. 2008. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* **322**: 1387-1392.

Cam, H.P., K. Noma, H. Ebina, H.L. Levin and S.I. Grewal. 2008. Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins. *Nature* **451**: 431-436.

Carmell, M.A., Z. Xuan, M.Q. Zhang and G.J. Hannon. 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* **16**: 2733-2742.

Carmell, M.A., A. Girard, H.J. van de Kant, D. Bourc'his, T.H. Bestor, D.G. de Rooij and G.J. Hannon. 2007. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of

transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* **12**: 503-514.

Caudy, A.A., R.F. Ketting, S.M. Hammond, A.M. Denli, A.M. Bathoorn, B.B. Tops, J.M. Silva, M.M. Myers, G.J. Hannon and R.H. Plasterk. 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**: 411-414.

Cox, D.N., A. Chao, J. Baker, L. Chang, D. Qiao and H. Lin. 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* **12**: 3715-3727.

Cox, D.N., A. Chao and H. Lin. 2000. *piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* **127**: 503-514.

De Fazio, S., N. Bartonicek, M. Di Giacomo, C. Abreu-Goodger, A. Sankar, C. Funaya, C. Antony, P.N. Moreira, A.J. Enright and D. O'Carroll. 2011. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*

Desset, S., C. Meignin, B. Dastugue and C. Vaury. 2003. COM, a heterochromatic locus governing the control of independent endogenous retroviruses from *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **164**: 501-509.

Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.

Elbashir, S.M., W. Lendeckel and T. Tuschl. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200.

Fujii, T. and T. Shimada. 2007. Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: a female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 379-388.

Fujii, T., N. Tanaka, T. Yokoyama, O. Ninaki, T. Oshiki, A. Ohnuma, Y. Tazima, Y. Banno, M. Ajimura, K. Mita, M. Seki, F. Ohbayashi, T. Shimada and H. Abe. 2006. The female-killing chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*, was generated by translocation between the Z and W chromosomes. *Genetica* **127**: 253-265.

Funaguma, S., M.G. Suzuki, T. Tamura and T. Shimada. 2005. The *Bmdsx* transgene including trimmed introns is sex-specifically spliced in tissues of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Sci* **5**: 17.

Ghildiyal, M. and P.D. Zamore. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* **10**: 94-108.

Grivna, S.T., E. Beyret, Z. Wang and H. Lin. 2006. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* **20**: 1709-1714.

Gunawardane, L.S., K. Saito, K.M. Nishida, K. Miyoshi, Y. Kawamura, T. Nagami, H. Siomi and M.C. Siomi. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* **315**: 1587-1590.

Haase, A.D., S. Fenoglio, F. Muerdter, P.M. Guzzardo, B. Czech, D.J. Pappin, C. Chen, A. Gordon and G.J. Hannon. 2010. Probing the initiation and effector phases of the somatic piRNA pathway in *Drosophila*. *Genes Dev* **24**: 2499-2504.

Haley, B., G. Tang and P.D. Zamore. 2003. In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* **30**: 330-336.

Handler, D., D. Olivieri, M. Novatchkova, F.S. Gruber, K. Meixner, K. Mechtler, A. Stark, R. Sachidanandam and J. Brennecke. 2011. A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors. *EMBO J* **30**: 3977-3993.

Horwich, M.D., C. Li, C. Matranga, V. Vagin, G. Farley, P. Wang and P.D. Zamore. 2007. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs

and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* **17**: 1265-1272.

Houwing, S., E. Berezikov and R.F. Ketting. 2008. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J* **27**: 2702-2711.

Houwing, S., L.M. Kamminga, E. Berezikov, D. Cronembold, A. Girard, H. van den Elst, D.V. Filippov, H. Blaser, E. Raz, C.B. Moens, R.H. Plasterk, G.J. Hannon, B.W. Draper and R.F. Ketting. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* **129**: 69-82.

Hutvagner, G., J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P.D. Zamore. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* **293**: 834-838.

Iki, T., M. Yoshikawa, M. Nishikiori, M.C. Jaudal, E. Matsumoto-Yokoyama, I. Mitsuhashi, T. Meshi and M. Ishikawa. 2010. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* **39**: 282-291.

International Silkworm Genome Consortium. 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 1036-1045.

Iwasaki, S., M. Kobayashi, M. Yoda, Y. Sakaguchi, S. Katsuma, T. Suzuki and Y.

Tomari. 2010. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* **39**: 292-299.

Kalmykova, A.I., M.S. Klenov and V.A. Gvozdev. 2005. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res* **33**: 2052-2059.

Kamminga, L.M., M.J. Luteijn, M.J. den Broeder, S. Redl, L.J. Kaaij, E.F. Roovers, P. Ladurner, E. Berezikov and R.F. Ketting. 2010. Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *EMBO J* **29**: 3688-3700.

Karginov, F.V. and G.J. Hannon. 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell* **37**: 7-19.

Kawamata, T. and Y. Tomari. 2010. Making RISC. *Trends Biochem Sci* **35**: 368-376.

Kawaoka, S., Y. Arai, K. Kadota, Y. Suzuki, K. Hara, S. Sugano, K. Shimizu, Y. Tomari, T. Shimada and S. Katsuma. 2011a. Zygotic amplification of secondary piRNAs during silkworm embryogenesis. *RNA* **17**: 1401-1407.

Kawaoka, S., N. Hayashi, S. Katsuma, H. Kishino, Y. Kohara, K. Mita and T. Shimada. 2008a. *Bombyx* small RNAs: genomic defense system against transposons in the

silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 1058-1065.

Kawaoka, S., N. Hayashi, Y. Suzuki, H. Abe, S. Sugano, Y. Tomari, T. Shimada and S. Katsuma. 2009. The *Bombyx* ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA* **15**: 1258-1264.

Kawaoka, S., N. Izumi, S. Katsuma and Y. Tomari. 2011b. 3' End Formation of PIWI-Interacting RNAs In Vitro. *Mol Cell* **43**: 1015-1022.

Kawaoka, S., K. Kadota, Y. Arai, Y. Suzuki, T. Fujii, H. Abe, Y. Yasukochi, K. Mita, S. Sugano, K. Shimizu, Y. Tomari, T. Shimada and S. Katsuma. 2011c. The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs. *RNA*

Kawaoka, S., K. Minami, S. Katsuma, K. Mita and T. Shimada. 2008b. Developmentally synchronized expression of two *Bombyx mori* Piwi subfamily genes, *SIWI* and *BmAGO3* in germ-line cells. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 755-760.

Kawaoka, S., H. Mitsutake, T. Kiuchi, M. Kobayashi, M. Yoshikawa, Y. Suzuki, S. Sugano, T. Shimada, J. Kobayashi, Y. Tomari and S. Katsuma. 2011d. A role for transcription from a piRNA cluster in de novo piRNA production. *RNA* **in press**:

Kirino, Y., N. Kim, M. de Planell-Saguer, E. Khandros, S. Chiorean, P.S. Klein, I.

Rigoutsos, T.A. Jongens and Z. Mourelatos. 2009. Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol* **11**: 652-658.

Kirino, Y. and Z. Mourelatos. 2007a. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 347-348.

Kirino, Y. and Z. Mourelatos. 2007b. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA* **13**: 1397-1401.

Kirino, Y., A. Vourekas, N. Kim, F. de Lima Alves, J. Rappsilber, P.S. Klein, T.A. Jongens and Z. Mourelatos. 2010a. Arginine methylation of vasa protein is conserved across phyla. *J Biol Chem* **285**: 8148-8154.

Kirino, Y., A. Vourekas, N. Sayed, F. de Lima Alves, T. Thomson, P. Lasko, J. Rappsilber, T.A. Jongens and Z. Mourelatos. 2010b. Arginine methylation of Aubergine mediates Tudor binding and germ plasm localization. *RNA* **16**: 70-78.

Klattenhoff, C. and W. Theurkauf. 2008. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* **135**: 3-9.

Klattenhoff, C., H. Xi, C. Li, S. Lee, J. Xu, J.S. Khurana, F. Zhang, N. Schultz, B.S.

Koppetsch, A. Nowosielska, H. Seitz, P.D. Zamore, Z. Weng and W.E. Theurkauf. 2009. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters. *Cell* **138**: 1137-1149.

Klenov, M.S., S.A. Lavrov, A.D. Stolyarenko, S.S. Ryazansky, A.A. Aravin, T. Tuschl and V.A. Gvozdev. 2007. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline. *Nucleic Acids Res* **35**: 5430-5438.

Kuramochi-Miyagawa, S., T. Kimura, T.W. Ijiri, T. Isobe, N. Asada, Y. Fujita, M. Ikawa, N. Iwai, M. Okabe, W. Deng, H. Lin, Y. Matsuda and T. Nakano. 2004. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* **131**: 839-849.

Lau, N.C., N. Robine, R. Martin, W.J. Chung, Y. Niki, E. Berezikov and E.C. Lai. 2009. Abundant primary piRNAs, endo-siRNAs, and microRNAs in a *Drosophila* ovary cell line. *Genome Res* **19**: 1776-1785.

Lau, N.C., A.G. Seto, J. Kim, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, D.P. Bartel and R.E. Kingston. 2006. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* **313**: 363-367.

Li, C., V.V. Vagin, S. Lee, J. Xu, S. Ma, H. Xi, H. Seitz, M.D. Horwich, M. Syrzycka, B.M. Honda, E.L. Kittler, M.L. Zapp, C. Klattenhoff, N. Schulz, W.E. Theurkauf, Z. Weng and P.D. Zamore. 2009a. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* **137**: 509-521.

Li, R., C. Yu, Y. Li, T.W. Lam, S.M. Yiu, K. Kristiansen and J. Wang. 2009b. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25**: 1966-1967.

Lim, A.K. and T. Kai. 2007. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6714-6719.

Lin, H. and H. Yin. 2008. A novel epigenetic mechanism in *Drosophila* somatic cells mediated by Piwi and piRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 273-281.

Lin, H. and A.C. Spradling. 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **124**: 2463-2476.

Liu, L., H. Qi, J. Wang and H. Lin. 2011. PAPI, a novel TUDOR-domain protein, complexes with AGO3, ME31B and TRAL in the nuage to silence transposition. *Development* **138**: 1863-1873.

Ma, J.B., K. Ye and D.J. Patel. 2004. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**: 318-322.

Ma, J.B., Y.R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl and D.J. Patel. 2005. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**: 666-670.

Malone, C.D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W.R. McCombie, R. Sachidanandam and G.J. Hannon. 2009. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* **137**: 522-535.

Malone, C.D. and G.J. Hannon. 2009. Molecular evolution of piRNA and transposon control pathways in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **74**: 225-234.

Mitsutake, H. and J. Kobayashi. 2011. piggyBac-mediated stable transformation of cultured *Bombyx mori* cells using in vitro synthesized transposase mRNA. *J Insect Biotech Seric* **80**: 15-24.

Miyoshi, T., A. Takeuchi, H. Siomi and M.C. Siomi. 2010. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1024-1026.

Moshkovich, N. and E.P. Lei. 2010. HP1 recruitment in the absence of argonaute proteins in *Drosophila*. *PLoS Genet* **6**: e1000880.

Muerdter, F., I. Olovnikov, A. Molaro, N.V. Rozhkov, B. Czech, A. Gordon, G.J. Hannon and A.A. Aravin. 2011. Production of artificial piRNAs in flies and mice. *RNA*, in press

Nishida, K.M., T.N. Okada, T. Kawamura, T. Mituyama, Y. Kawamura, S. Inagaki, H. Huang, D. Chen, T. Kodama, H. Siomi and M.C. Siomi. 2009. Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *EMBO J* **28**: 3820-3831.

Nishida, K.M., K. Saito, T. Mori, Y. Kawamura, T. Nagami-Okada, S. Inagaki, H. Siomi and M.C. Siomi. 2007. Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* **13**: 1911-1922.

O'Donnell, K.A. and J.D. Boeke. 2007. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* **129**: 37-44.

Ohara, T., Y. Sakaguchi, T. Suzuki, H. Ueda, K. Miyauchi and T. Suzuki. 2007. The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 349-350.

Olivieri, D., M.M. Sykora, R. Sachidanandam, K. Mechtler and J. Brennecke. 2010. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J* **29**: 3301-3317.

Ono, R., K. Nakamura, K. Inoue, M. Naruse, T. Usami, N. Wakisaka-Saito, T. Hino, R. Suzuki-Migishima, N. Ogonuki, H. Miki, T. Kohda, A. Ogura, M. Yokoyama, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. 2006. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* **38**: 101-106.

Pal-Bhadra, M., U. Bhadra and J.A. Birchler. 2002. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* **9**: 315-327.

Pane, A., K. Wehr and T. Schupbach. 2007. zucchini and squash encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. *Dev Cell* **12**: 851-862.

Patil, V.S. and T. Kai. 2010. Repression of retroelements in *Drosophila* germline via piRNA pathway by the tudor domain protein tejas. *Curr Biol* **20**: 724-730.

Pek, J.W., A.K. Lim and T. Kai. 2009. *Drosophila* maelstrom ensures proper germline

stem cell lineage differentiation by repressing microRNA-7. *Dev Cell* **17**: 417-424.

Qi, H., T. Watanabe, H.Y. Ku, N. Liu, M. Zhong and H. Lin. 2011. The Yb body, a major site for Piwi-associated RNA biogenesis and a gateway for Piwi expression and transport to the nucleus in somatic cells. *J Biol Chem* **286**: 3789-3797.

Rangan, P., C.D. Malone, C. Navarro, S.P. Newbold, P.S. Hayes, R. Sachidanandam, G.J. Hannon and R. Lehmann. 2011. piRNA production requires heterochromatin formation in *Drosophila*. *Curr Biol* **21**: 1373-1379.

Robine, N., N.C. Lau, S. Balla, Z. Jin, K. Okamura, S. Kuramochi-Miyagawa, M.D. Blower and E.C. Lai. 2009. A broadly conserved pathway generates 3'UTR-directed primary piRNAs. *Curr Biol* **19**: 2066-2076.

Ronsseray, S., T. Josse, A. Boivin and D. Anxolabehere. 2003. Telomeric transgenes and trans-silencing in *Drosophila*. *Genetica* **117**: 327-335.

Ronsseray, S., M. Lehmann and D. Anxolabehere. 1991. The maternally inherited regulation of P elements in *Drosophila melanogaster* can be elicited by two P copies at cytological site 1A on the X chromosome. *Genetics* **129**: 501-512.

Ronsseray, S., M. Lehmann, D. Nouaud and D. Anxolabehere. 1996. The regulatory

properties of autonomous subtelomeric P elements are sensitive to a Suppressor of variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **143**: 1663-1674.

Ronsseray, S., L. Marin, M. Lehmann and D. Anxolabehere. 1998. Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by combinations of telomeric P-element reporters and naturally occurring P elements. *Genetics* **149**: 1857-1866.

Sahara, K., A. Yoshido, N. Kawamura, A. Ohnuma, H. Abe, K. Mita, T. Oshiki, T. Shimada, S. Asano, H. Bando and Y. Yasukochi. 2003. W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**: 48-55.

Saito, K., S. Inagaki, T. Mituyama, Y. Kawamura, Y. Ono, E. Sakota, H. Kotani, K. Asai, H. Siomi and M.C. Siomi. 2009. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature* **461**: 1296-1299.

Saito, K., K.M. Nishida, T. Mori, Y. Kawamura, K. Miyoshi, T. Nagami, H. Siomi and M.C. Siomi. 2006. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev* **20**: 2214-2222.

Saito, K., Y. Sakaguchi, T. Suzuki, T. Suzuki, H. Siomi and M.C. Siomi. 2007. Pimet,

the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev* **21**: 1603-1608.

Schwarz, D.S., Y. Tomari and P.D. Zamore. 2004. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol* **14**: 787-791.

Seto, A.G., R.E. Kingston and N.C. Lau. 2007. The coming of age for Piwi proteins. *Mol Cell* **26**: 603-609.

Shoji, M., T. Tanaka, M. Hosokawa, M. Reuter, A. Stark, Y. Kato, G. Kondoh, K. Okawa, T. Chujo, T. Suzuki, K. Hata, S.L. Martin, T. Noce, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, H. Sasaki, R.S. Pillai, N. Nakatsuji and S. Chuma. 2009. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell* **17**: 775-787.

Slotkin, R.K. and R. Martienssen. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* **8**: 272-285.

Soper, S.F., G.W. van der Heijden, T.C. Hardiman, M. Goodheart, S.L. Martin, P. de Boer and A. Bortvin. 2008. Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Dev Cell* **15**: 285-297.

Funaguma, S., M.G. Suzuki, T. Tamura and T. Shimada. 2005. The *Bmdsx* transgene including trimmed introns is sex-specifically spliced in tissues of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Sci* **5**: 17.

Suzuki, M.G., S. Funaguma, T. Kanda, T. Tamura and T. Shimada. 2005. Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori*. *Evol Dev* **7**: 58-68.

Suzuki, M.G., S. Imanishi, N. Dohmae, M. Asanuma and S. Matsumoto. 2010. Identification of a male-specific RNA binding protein that regulates sex-specific splicing of *Bmdsx* by increasing RNA binding activity of BmPSI. *Mol Cell Biol* **30**: 5776-5786.

Suzuki, M.G., S. Imanishi, N. Dohmae, T. Nishimura, T. Shimada and S. Matsumoto. 2008. Establishment of a novel in vivo sex-specific splicing assay system to identify a trans-acting factor that negatively regulates splicing of *Bombyx mori dsx* female exons. *Mol Cell Biol* **28**: 333-343.

Todeschini, A.L., L. Teyssset, V. Delmarre and S. Ronsseray. 2010. The epigenetic trans-silencing effect in *Drosophila* involves maternally-transmitted small RNAs whose production depends on the piRNA pathway and HP1. *PLoS One* **5**: e11032.

Traut, W., K. Sahara and F. Marec. 2007. Sex chromosomes and sex determination in

Lepidoptera. *Sex Dev* **1**: 332-346.

Tuschl, T., P.D. Zamore, R. Lehmann, D.P. Bartel and P.A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* **13**: 3191-3197.

Vagin, V.V., A. Sigova, C. Li, H. Seitz, V. Gvozdev and P.D. Zamore. 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* **313**: 320-324.

Vagin, V.V., J. Wohlschlegel, J. Qu, Z. Jonsson, X. Huang, S. Chuma, A. Girard, R. Sachidanandam, G.J. Hannon and A.A. Aravin. 2009. Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev* **23**: 1749-1762.

Volff, J., C. Korting and M. Scharl. 2001. Ty3/Gypsy retrotransposon fossils in mammalian genomes: did they evolve into new cellular functions? *Mol Biol Evol* **18(2)**: 266-270.

Wang, J., J.P. Saxe, T. Tanaka, S. Chuma and H. Lin. 2009a. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *Curr Biol* **19**: 640-644.

Wang, Y., S. Juranek, H. Li, G. Sheng, T. Tuschl and D.J. Patel. 2008. Structure of an

Argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* **456**: 921-926.

Wang, Y., S. Juranek, H. Li, G. Sheng, G.S. Wardle, T. Tuschl and D.J. Patel. 2009b. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**: 754-761.

Wang, Y., G. Sheng, S. Juranek, T. Tuschl and D.J. Patel. 2008. Structure of the guide-strand-containing Argonaute silencing complex. *Nature* **456**: 209-213.

Watanabe, T., S. Chuma, Y. Yamamoto, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Totoki, A. Toyoda, Y. Hoki, A. Fujiyama, T. Shibata, T. Sado, T. Noce, T. Nakano, N. Nakatsuji, H. Lin and H. Sasaki. 2011a. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell* **20**: 364-375.

Watanabe, T., A. Takeda, T. Tsukiyama, K. Mise, T. Okuno, H. Sasaki, N. Minami and H. Imai. 2006. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev* **20**: 1732-1743.

Watanabe, T., S. Tomizawa, K. Mitsuya, Y. Totoki, Y. Yamamoto, S. Kuramochi-Miyagawa, N. Iida, Y. Hoki, P.J. Murphy, A. Toyoda, K. Gotoh, H. Hiura,

T. Arima, A. Fujiyama, T. Sado, T. Shibata, T. Nakano, H. Lin, K. Ichiyanagi, P.D. Soloway and H. Sasaki. 2011b. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science* **332**: 848-852.

Yuan, Y.R., Y. Pei, J.B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H.Y. Chen, Z. Dauter, T. Tuschl and D.J. Patel. 2005. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* **19**: 405-419.

Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp and D.P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.

Zamparini, A.L., M.Y. Davis, C.D. Malone, E. Vieira, J. Zavadil, R. Sachidanandam, G.J. Hannon and R. Lehmann. 2011. Vreteno, a gonad-specific protein, is essential for germline development and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Development* **138**: 4039-4050.

Zhang, D., H. Xiong, J. Shan, X. Xia and V.L. Trudeau. 2008. Functional insight into Maelstrom in the germline piRNA pathway: a unique domain homologous to the DnaQ-H 3'-5' exonuclease, its lineage-specific expansion/loss and evolutionarily active site switch. *Biol Direct* **3**: 48.

