

博士論文

PIWI タンパク質の標的塩基認識機構

東京大学新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻 RNA 機能研究分野

吉川 真由

目次

I. 研究背景と目的	3
(1) 真核生物とトランスポゾン	3
(2) PIWI タンパク質と piRNA	4
(3) PIWI タンパク質の生化学的特徴	7
(4) piRNA の生合成経路	12
(5) ショウジョウバエにおける piRNA 研究	21
(6) piRNA 経路関連遺伝子	21
(7) 本研究の目的	22
II. 結果	27
(1) ヒト Ago2 は t1A の選択性を持つ	27
(2) Siwi は t1A の選択性を持ち、BmAgo3 は持たない	31
(3) piRNA の網羅的な標的 RNA 解析	46
(4) Siwi、BmAgo3、ヒト Ago2 の MID-PIWI ドメインの発現	47
(5) リコンビナントの Siwi、BmAgo3、ヒト Ago2 は t1A の選択性が無い	49
(6) ヒト Ago2 の t1A の選択性にはライセート中の因子が関与する	54
(7) t1A の選択性にはライセート中のタンパク因子が関与する	65
(8) 希釈したライセートを用いた標的切断アッセイ	69
(9) ウォッシュバッファーの塩濃度の検討	71
(10) ゲルろ過クロマトグラフィーによる t1A を生み出す因子の分画	73
(11) MID-PIWI にライセートを加え戻すと切断産物が見られない	80
(12) PIWI タンパク質を用いた t1A を生み出す因子の検討	81
III. 考察	84
IV. 材料と方法	91
V. 謝辞	106
VI. 参考文献	108

I. 研究背景と目的

(1) 真核生物とトランスポゾン

我々ヒトを含めた全ての生物は細胞と呼ばれる小さな構成単位より成り、ひとつひとつの細胞には「ゲノム」と呼ばれる遺伝情報が積み込まれている。「変異」とは、このようなゲノムを構成する遺伝物質である DNA や RNA 等に変化（置換、挿入、欠損）が起こることを指す。変異は全ての生物に普遍的に起こるものであり、その要因として、細胞分裂時の DNA 複製の際に生じるエラーや、化学物質・放射線照射による DNA の損傷、ウイルスの感染、および「トランスポゾン」と呼ばれる転写因子による遺伝子の破壊等が挙げられる。トランスポゾンとは、ゲノムを自由に飛び回る（トランスポジションする）ことのできる一群の転移因子である¹。諸説の中には、トランスポゾンは転移によりゲノムを変化させることで、多様性を増幅させて生命の進化に貢献してきたという考え方が存在する。しかしながら、一般的には、トランスポゾンは正確な遺伝情報の伝達を攪乱し、時として重篤な変異を引き起こしてしまう「宿主にとって有害なもの」という考え方が受け入れられている。

トランスポゾンはその転移様式の違いより、RNA型トランスポゾンとDNA型トランスポゾンの大きく2つに分類される。RNA型トランスポゾンはトランスポゾン全体が転写された後、トランスポゾンRNAが逆転写酵素によりDNAに逆転写され、そのDNAが新たな位置に挿入される（コピー&ペースト方式）²。遺伝子領域に挿入が起こることで突然変異を誘発する場合がある。また、転移様式から推測できるように、転移の際にはコピー数は増え、ゲノムのサイズを大幅に増加させる。逆転写が必須なことから逆転写酵素遺伝子を持つことが一般的であり、RNA型トランスポゾンの代表として、LINE1因子や Alu因子、Gypsy因子等が挙げられる。

一方、DNA型トランスポゾンは、転移のために自身がコードする「トランスポザーゼ」と呼ばれる酵素を必要とする。DNAトランスポゾンは末端に逆向きの反復配列を持っており、トランスポザーゼはこの配列を認識してトランスポゾンをゲノムから切り出し、別のゲノム領域に挿入する（カット&ペースト方式）³。この際コピー数は変化しない。遺伝子領域に挿入が起こることで突然変異を誘発したり、切り出しの際に周辺遺伝子を削り、染色体異常を引き起こしたり、不完全な切り出しによりジャンク配列を残したりすることもある。DNA型トランスポゾンとしてはショウジョウバエのP因子が有名である^{4,5}。P因子はわずか50年程前に水平移動により自然界のショ

ウジョウバエに持ち込まれたと考えられており、それ以前に野外から採集されていた多くの系統はPエレメントを持たない。そのため、50年以上前から研究室で維持されていたP因子を持たない系統と、野外から採集してきたP因子を持つ系統とを交配させると、P因子の転移が原因となり高頻度で不妊を引き起こす Hybrid dysgenesis と呼ばれる現象が生じる^{6,7}。このように、新たにゲノムに導入されたトランスポゾンがゲノムを改変し、時として重篤な変化を引き起こしてしまう。

上記の転移様式から分かるように、ゲノムにおけるコピー数は、RNA型トランスポゾンの方がDNA型トランスポゾンよりも多い。真核生物のゲノムにおいてトランスポゾンは非常に大きな割合を占めており、ショウジョウバエでは約15%、ヒトやマウスでは約45%、植物に至っては80%以上も存在する^{1,8}。タンパク質をコードする遺伝子が高々2%程度であることと比較すれば、その存在数の多さは驚くべきである。

さて、生物がゲノムの遺伝情報を子孫へと伝え残す仕組み、すなわち「生殖」を鑑みたとき、トランスポゾン等によるゲノムの変異は非常に大きな影響を与え得る。多くの真核生物は有性生殖を行うが、特に動物は有性生殖を唯一の生殖手段としている。有性生殖とは、一般的にオスの精子とメスの卵の核が受精することにより新しい個体ができることを指す。精子や卵、精細胞や卵細胞等の生殖のための細胞は「生殖細胞」と呼ばれ、動物の遺伝情報は生殖細胞をとおして次世代へ受け継がれる。よって、生殖細胞に変異が生じると、それが子孫に代々伝わることになるので、生殖細胞におけるゲノムの「品質管理」は極めて重要である。このため、動物はトランスポゾンの活性をコントロールするさまざまな仕組みを進化させてきた。

(2) PIWI タンパク質と piRNA

生殖細胞において、トランスポゾンの活性をコントロールする中心的な役割を果たすのが、生殖巣に特異的に発現する PIWI タンパク質である。PIWI タンパク質の PIWI とは、P-element induced wimpy testis の略であり、1990 年後半にショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングにより、卵巣形成不全および精子形成不全の原因遺伝子として発見されたことに始まる^{9,10}。最初に同定された PIWI タンパク質は Piwi と Aubergine (Aub) であった。Piwi 変異体のショウジョウバエのメスでは、卵巣の発達過程で生殖幹細胞が失われており、オスでも、やはり精巣の発達過程で生殖幹細胞が失われ、精巣が萎縮していた。その後の配列解析の結果、Piwi には Aub の他にもう一つのパラログが存在することが分かり、AGO3 と名付けられた¹¹。そしてこれら 3 種類はいずれも生殖巣特異的に発現すること、しかしながらそれぞれの局在場所は異なること、それぞれ

の機能に相違があること、等が明らかになった。昆虫の卵巣は生殖細胞である卵母細胞および栄養細胞と、体細胞である濾胞細胞より構成される。Piwi が生殖細胞の核と体細胞の核に局在するのに対して、Aub と AGO3 は生殖細胞特異的に発現し、細胞質の中でも特に「nuage」と呼ばれる核膜の外側に位置する顆粒状の構造体に局在する^{12,13}。このように、ショウジョウバエやマウスによる遺伝学的な解析から、1990年代後半には PIWI タンパク質が生殖系列細胞の形成・維持に重要な因子として認識されていたが、その詳細な役割については長い間分かっていなかった。

やがて、2005年にショウジョウバエのPIWIタンパク質の変異がトランスポゾンの脱抑制をもたらすことが示され、2006年にはマウスやラットを用いた解析により、PIWIタンパク質は PIWI-interacting RNA (piRNA) とよばれる23~30塩基の小分子RNAと複合体を形成することが明らかとなった¹⁴⁻²⁰。piRNAはその配列や長さが非常に多様であり、種間ではほとんど保存されていない。しかしながら、piRNA配列はトランスポゾンRNA配列に相補的であるものが圧倒的に多い、という共通点を持つ¹³。piRNAは、配列の相補性を利用してトランスポゾン RNAを認識し、PIWIタンパク質の持つ切断活性によってRNAを切断することでトランスポゾンの発現を抑制しているのである(図1-2-1)。実際、ショウジョウバエだけでなくマウス、ゼブラフィッシュ等を用いた遺伝学的な研究から、PIWIタンパク質の変異体では、トランスポゾンの脱抑制が起こることが示されている^{21,22}。また、PIWIタンパク質の変異がDNA二本鎖切断 (double-strand breaks (DSBs)) を引き起こすことが知られており、これもトランスポゾンの脱抑制によると考えられている²³。以上のことより、PIWIタンパク質は生殖巣の発達や維持と、トランスポゾンのコントロールに重要な役割を果たしていることが分かる。動物においてはsiRNAもトランスポゾンの抑制に寄与していることが知られているが、piRNAはその最前線の防御機能を果たしていると言える。さらに、最近では、ショウジョウバエのPiwiが核内でHP1等のヘテロクロマチン関連因子と相互作用を持ち、クロマチンやDNAのメチル化に関与することや、遺伝子を転写レベルで制御しているという可能性も示唆されている^{24,25}。

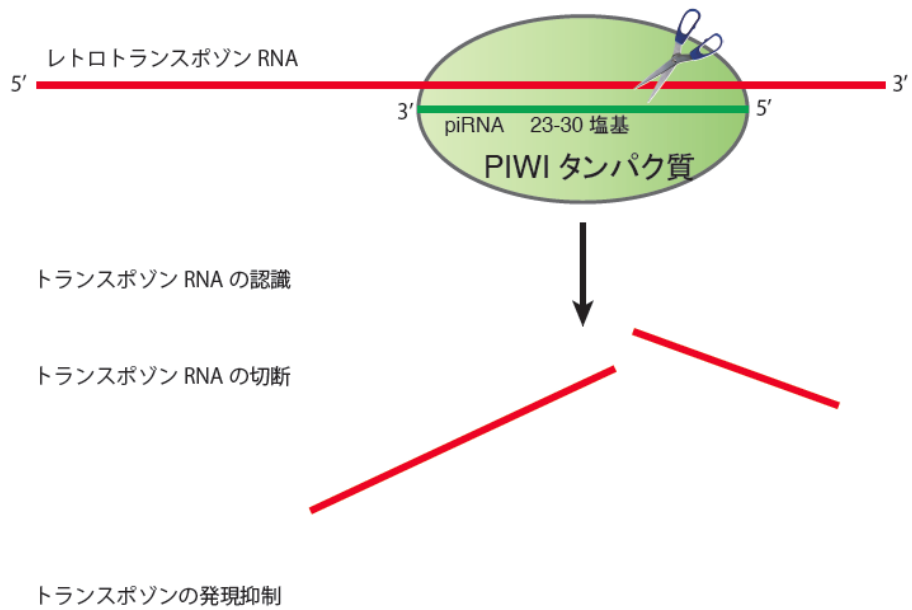


図 1-2-1. PIWI タンパク質によるトランスポゾン抑制機構

PIWI タンパク質は、PIWI-interacting RNA (piRNA) と複合体を形成する。piRNA はトランスポゾン RNA 配列に相補的であるものが多く、piRNA が配列の相補性を利用してトランスポゾン RNA を認識し、PIWI タンパク質の持つ切断活性によって RNA を切断することでトランスポゾンの発現を抑制している。

(3) PIWI タンパク質の生化学的特徴

PIWIタンパク質は、そのドメイン構造よりRNAサイレンシングの中核であるArgonauteファミリーに属する²⁶。Argonauteファミリーに属するタンパク質は、「PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) ドメインとPIWIドメインを持つタンパク質」と定義されており、そのような最初のタンパク質は植物で見つかった。Argonauteファミリータンパク質は、恒常的に発現しているAGOタンパク質と生殖巣特異的に発現しているPIWIタンパク質という2つのサブファミリーに大別される²⁷ (図1-3-1)。

AGOタンパク質は、1993年に線虫ではじめてRNAサイレンシングが報告され以来、タンパク質をコードしない18-30塩基長の小分子RNAと結合し、重要な生命現象に関わることが明らかになっている²⁸。代表的な小分子RNAとして、microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) がある。miRNAはゲノム中にコードされた内在性の小分子RNAであり、発生や分化、形態形成、細胞周期、アポトーシスなど生体内のさまざまな生命現象を綿密に制御している。一方、siRNAはウイルスなど外来遺伝子に対する防御応答として働く外因性の小分子RNAであり、RNA interference (RNAi) を引き起こす。最近では、細胞内で発現する二本鎖RNAによって生じる内在性のsiRNAの存在が報告されている。内在性siRNAはトランスポゾンなど動く遺伝子からゲノムを守るのに寄与する。

AGOタンパク質に関しては、現在までに生化学的解析だけでなく、構造生物学的な解析もすみ、個々のドメインを切り分けた構造解析や、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* や、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* といった原核生物のAGOホモログタンパク質を用いた構造解析などが行われてきた。2012年には、ヒトのAgo2と出芽酵母の一種である *Kluyveromyces polysporus* のAGOタンパク質の全長の結晶構造解析が報告され、AGOタンパク質の作用機序への理解が進んでいる^{29,30}。AGOタンパク質は、4つのドメイン (Nドメイン、PAZドメイン、MIDドメイン、PIWIドメイン) と2つのリンカー部分 (L1リンカー、L2リンカー) から構成される分子量が100kDa程度のタンパク質である (図1-3-2)。結合するRNAは、5'末端にモノリン酸基を持ち、AGOタンパク質と主に5'末端から1~7番目の塩基と3'末端の2塩基によって結合する³¹。

MIDドメインとPIWIドメインとの境界部分には、結合するRNAの5'末端のモノリン酸基を厳密に認識し、結合する5'末端結合ポケットが存在する。5'末端モノリン酸の認識に関しては、*Thermus thermophilus* や *Aquifex aeolicus* 等の原核生物と、真核生物のAGOタンパク質では違

いがあり、原核生物では、AGO タンパク質はリン酸基との相互作用に Mg^{2+} を用いているが、真核生物では真核生物でのみ保存されているリジン残基が Mg^{2+} と同様の役割が果たされている³²⁻³⁴。生化学的な解析により、この 5'末端の塩基の認識には好みがあることが知られており、AGO タンパク質によっては特定の 5'塩基を持つ小分子 RNA を優先的に取り込むものもある。

総じて、ヒト、ショウジョウバエ、植物の miRNA には、5'末端塩基が U や A である miRNA が多いのだが^{35,36}、例えば、ショウジョウバエに存在する二種類の AGO タンパク質 (Ago1 と Ago2) のうち、Ago1 は 5'末端塩基目がウラシル (1U)、Ago2 は 1C の小分子 RNA と選択的に結合する³⁶⁻³⁸。また、10 種類存在する Arabidopsis の AGO タンパク質 (Ago1-Ago10) においては、Ago1 は 1U、Ago2、Ago4、Ago6、Ago9 は 1A、Ago5 は 1C の選択性があり、5'末端の塩基を変えると異なる AGO タンパク質と複合体を形成することが生化学的な実験から分かっている³⁹⁻⁴²。4 種類あるヒトの AGO タンパク質 (Ago1-Ago4) のうち、最も存在量の多い Ago2 に関しては、1U の小分子 RNA と結合することが多く、次いで 1A が多いことが知られている³⁵。

なぜこのような塩基の偏りが見られるのだろうか。ヒト Ago2 の結晶構造解析より、5'末端結合ポケットは、MID ドメインの中で最も正の電荷を帯びており、結合する RNA の 5'末端のモノリン酸基と、ポケットを構成するアミノ酸は水素結合を形成することが明らかになった。さらに、小分子 RNA の 5'塩基が C や G であるよりも A や U である方が 5'末端結合ポケットと強い相互作用を持てることが示されている。結合 RNA の 3'末端の 2 塩基は PAZ ドメインと結合し、固定されているのだが、標的を認識すると PAZ ドメインより解き放たれる。そのような場合でも、1U や 1A の小分子 RNA は 5'末端結合ポケットと強い結合を保ち続けることができ、AGO タンパク質と比較的安定して結合していられるので、1C や 1G の小分子 RNA より好まれていると考えられている。ヒト Ago2 において A より U の方が多いのは、プリン塩基とピリミジン塩基によるわずかな違いが影響していると考えられている。しかしながら、ショウジョウバエの Ago2 や植物の Ago5 等で 1C が好まれる理由については明確な答えは得られていない。後述するように、ショウジョウバエの Ago2 は選択的に siRNA と結合することや、植物の Ago5 が他の植物の Ago と異なり発現場所が生殖細胞に偏っていることを踏まえると、ショウジョウバエの Ago2 や植物の Ago5 が少し特殊であると考えられる。少なくとも、それぞれの AGO タンパク質は、正しく機能を発揮するために、小分子 RNA の 5'末端塩基に異なる親和性を持ち、いずれの AGO タンパク質と結合するか規定していると考えられている。実際、ヒト Ago2 に結合する小分子 RNA の一つである let-7 の 5'末端塩基である U を別の塩基に変えると、ヒト Ago2 とは結合できるが、標的 RNA を切断できなくなり、正しい機能を発揮できないことが生化学的な実験より示されている。これ

らのことから、小分子 RNA の 5'末端塩基の認識が AGO タンパク質の機能に重要な役割を持つと考えられる³⁵。

AGOタンパク質のスライサー活性を担うのはPIWIドメインであり、RNase Hと似た構造をとっている。AGOタンパク質による標的RNAの切断は、結合RNA（ガイド鎖）の5'末端から数えて10番目と11番目の塩基と塩基対を形成している標的RNAのリン酸エステル結合を切断することによって起こる⁴³。これまでAGOタンパク質のスライサー活性は、PIWIドメイン内の2つのアスパラギン酸と1つのヒスチジン残基（DDH）、あるいは3つのアスパラギン酸（DDD）によって活性部位が形成され、それに配位する2つのMg²⁺がRNA加水分解を促進することにより、標的RNAを切断すると考えられていた⁴⁴。しかし、2012年の出芽酵母とヒトのAgoタンパク質の結晶構造解析により、新たにグルタミン酸残基が活性中心を形成する重要なアミノ酸として見つかり、DEDHの4残基によって活性中心が形成されることが判明した^{29,30,45}。

AGOタンパク質のスライサー活性は、すべてのAgoタンパク質に保存されている訳ではない。例えば、ショウジョウバエでは、Ago1はAgo2に比べて極めて弱いスライサー活性を持つ。植物では、Ago1、Ago5、Ago7、Ago10にはスライサー活性があり、Ago2、Ago3、Ago4、Ago6、Ago8、Ago9には無いことが示されている。また、ヒトの4種類のAGOタンパク質においては、Ago2だけがスライサー活性を持っており、残りのAgo1、Ago3、Ago4は完全にその活性が失われている^{46,47}。

一方、PIWIタンパク質もAGOタンパク質と同様に、4つのドメインと2つのリンカー部分から構成されていることがアミノ酸配列上分かっている。PIWIタンパク質も、5'末端にモノリン酸基を持つ小分子RNAと結合することが知られており、piRNAの5'末端は5'結合ポケットにより認識されていると考えられている。また、AGOタンパク質と同様に、PIWIドメインの持つスライサー活性により、結合したpiRNAの5'末端から数えて10番目と11番目の塩基と塩基対を形成している標的RNAを切断することが、Piwi、Aub、AGO3やマウスのPIWIタンパク質であるMiw1等を用いた解析で明らかになっている^{18,48,49}。しかしながら、AGOタンパク質に比較して、PIWIタンパク質の生化学的・構造生物学的な解析は遅れている。

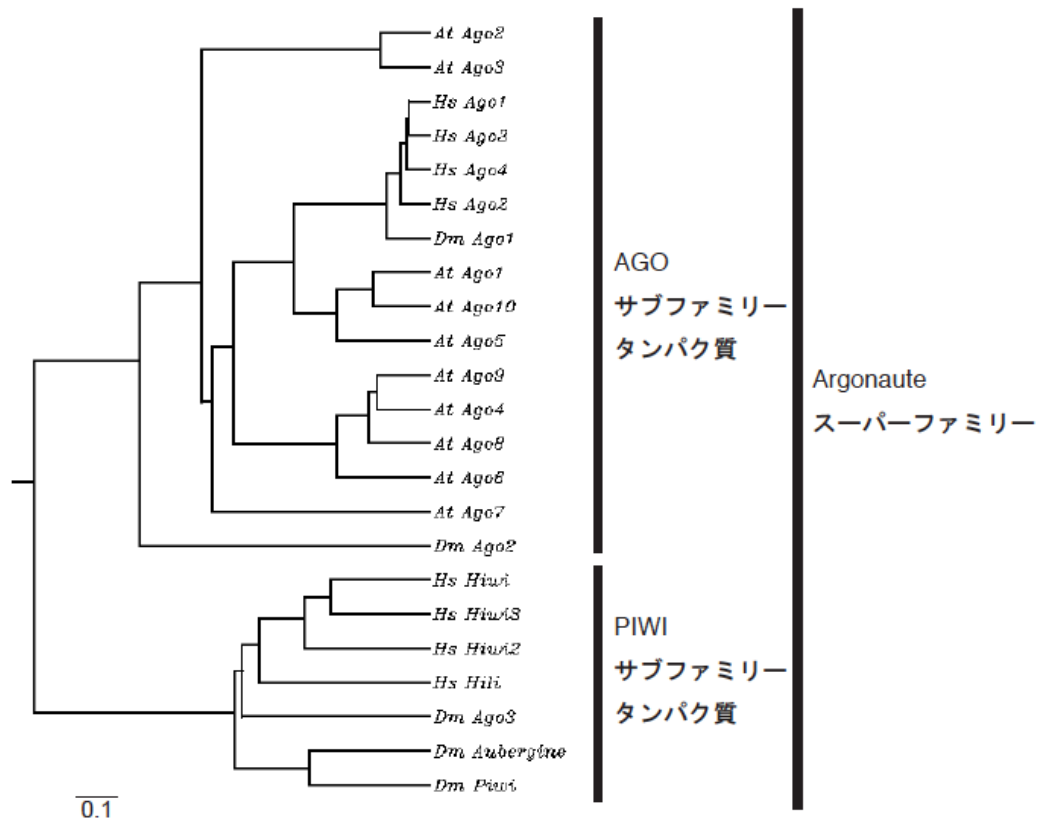


図 1-3-1. Argonaute スーパーファミリー

Argonaute ファミリーには、AGO タンパク質と PIWI タンパク質が含まれる。

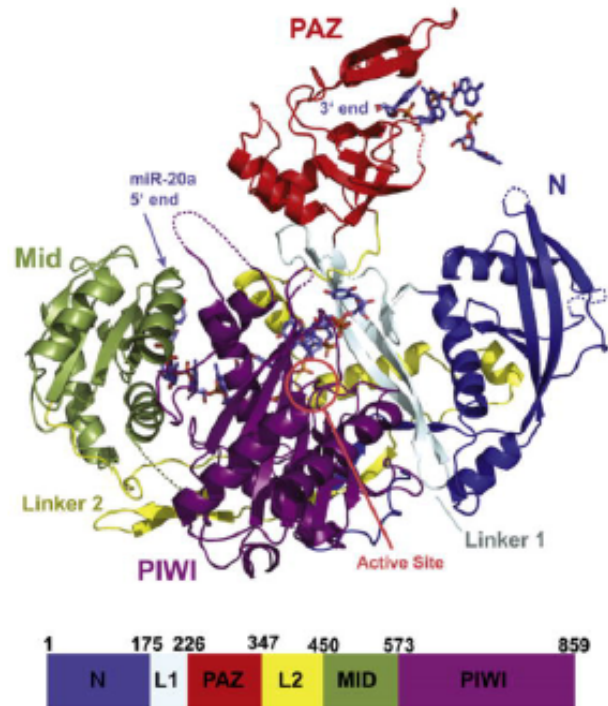


図 1-3-2. AGO タンパク質の構造

ヒト Ago2 が小分子 RNA と結合する様子。AGO タンパク質は、4 つのドメイン（N 末端ドメイン、PAZ ドメイン、PIWI ドメイン、C 末端ドメイン）と 2 つのリンカー部分（L1 リンカー、L2 リンカー）から構成される。MID ドメインと PIWI ドメインとの境界部分には、結合 RNA の 5' 末端のモノリン酸基を厳密に認識し結合するポケットが存在する。Elkayam *et al.*, 2012 より。

(4) piRNA の生合成経路

① piRNA と他の小分子 RNA 群との比較

piRNA の生合成経路を理解するために、現在までに詳細な理解がすすんでいる siRNA と miRNA の生合成経路について触れる (図 1-4-1)。

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 III 型酵素によって 21-22 塩基の二本鎖 siRNA に切断されるところから始まる。切断された RNA 二本鎖は AGO タンパク質に取り込まれ、一方の鎖は AGO タンパク質の中に残り、AGO タンパク質と RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する。もう一方の鎖は AGO から解離して分解される。AGO タンパク質に残る側の鎖をガイド鎖、そうでない方の鎖をパッセンジャー鎖と呼ぶ。いずれの鎖がガイド鎖となるかは、主に小分子 RNA 二本鎖の 5'末端の熱力学的不安定性によって決まる。5'末端が熱力学的により不安定な鎖がガイド鎖となり、より安定な 5'末端をもつ鎖がパッセンジャー鎖となりやすい⁵⁰⁻⁵⁵。

miRNA 経路は、ポリメラーゼ II によりステムループ構造を持つ primary miRNA (pri-miRNA) が転写されることから始まる。pri-miRNA は、核内で RNase III 型酵素である Drosha とその補因子である二本鎖 RNA 結合タンパク質 (ヒトでは DGCR8、ショウジョウバエでは Pasha) などにより切断され、70-80 塩基程度のヘアピン型 RNA となる。その後、Exportin-5 により核から細胞質へと輸送され、やはり Dicer によって 21-22 塩基の二本鎖 miRNA (miRNA/miRNA*) へと切断される^{50,52}。miRNA/miRNA* は互いにミスマッチを持った二本鎖 RNA である。miRNA/miRNA* は AGO タンパク質へと積み込まれ、miRNA が AGO タンパク質と RISC を形成する。一方、miRNA* は自身の塩基組成や熱力学的な安定性に基づいて、AGO タンパク質から排除される。

ショウジョウバエでは基本的に miRNA は Ago1 に、siRNA は Ago2 に取り込まれる。この「振り分け」は miRNA/miRNA* 二本鎖や siRNA 二本鎖の構造に依存しており、中央付近にミスマッチを持つ miRNA/miRNA* 二本鎖は Ago1 に取り込まれ、中央付近にミスマッチを持たない相補的な siRNA 二本鎖は Ago2 に取り込まれる⁵⁶⁻⁵⁹。一方、ヒトの場合は、ショウジョウバエのような厳密な「振り分け」は存在せず、miRNA/miRNA* 二本鎖も、siRNA 二本鎖も、Ago1-4 すべてに取り込まれる^{46,47} (図 1-4-2)。

siRNA や miRNA における標的 mRNA の認識に特に重要な役割を果たすのは、ガイド鎖の seed

領域（5'末端から数えて2-8番目の塩基）であり、seed領域の相補性をたよりに標的RNAを認識する。siRNA経路では、標的の認識後は、標的を切断することで標的の発現抑制を行う。一方、miRNA経路では、通常、mRNAの3'UTR領域に存在する標的サイトに結合し、ポリA鎖の分解と翻訳の抑制をひき起こすことで標的の発現抑制を行う。miRNAの標的サイトが3'UTRにあるのは、もしmiRNAの標的サイトが5'UTRやOpen Reading Frame (ORF)にあると、リボソームなどがRISCによる標的認識を阻害してしまうからであろうと考えられ、それを回避するため進化的に標的配列が3'UTRに蓄積されていったためだと考えられている^{60,61}。また、例は多くないものの、miRNAが切断活性を持つAGOタンパク質（哺乳類ではAgo2のみ）に取り込まれ、標的mRNAの配列がほぼ完全に相補的である場合には、siRNAの場合と同様に、標的mRNAの切断が行われる。

対して、piRNAの生合成はsiRNAやmiRNAと大きく異なる過程を経ることが知られている。piRNAの生合成にはDicerが不必要であることがショウジョウバエ、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、一本鎖の長い前駆体より生合成されることが明らかになっている^{20,21}。piRNAの生成過程は、一次生成過程と、一次生成過程に続いて起こるpiRNA増幅経路であるピンポンサイクルの2つに大別できる。以下にそれぞれの過程を説明する。

② 一次生成過程

一次生成過程は、「piRNAクラスタ」と呼ばれる、転移能力を失ったトランスポゾンの残骸が集積したゲノム領域からRNAポリメラーゼIIにより長い一本鎖RNAが転写されることから始まる（図1-4-3）。このpiRNAクラスタは、マウスやショウジョウバエにおいて、次世代シーケンサーを用いたpiRNAの網羅的解析の結果見つかった。80%近くのpiRNAは、全ゲノム中の数十～数百カ所程度の、ゲノム全体の約1%程度にしか満たない領域に集中的にマッピングされ、その領域がpiRNAを産生するゲノム領域としてpiRNAクラスタと名付けられた^{25,62}。piRNAクラスタは一つあたり数kb~200kbにも及び、各piRNAはほぼランダムにマッピングされる。現在までに見つかったクラスタのうちのほとんどは、ペリセントロメア領域と呼ばれるセントロメアと隣接するDNA領域か、テロメア領域に存在する。特に有名なpiRNAクラスタとしては、P因子を抑制するX染色体上のX-TAS (teromere associated sequence) や、*gypsy*、*ZAM*、*Idefix*などのトランスポゾンを抑制するX染色体上のペリセントロメア領域に存在する*flamenco*と呼ばれる領域が挙げられる¹³。ショウジョウバエではpiRNAクラスタは二種類に大別でき、DNAの両鎖からpiRNAを産生する2方向性クラスタと単方向性クラスタが知られている¹³。また、最

近の解析から単方向性クラスタの一群として、大 Maf 転写因子 *traffic jam* というタンパク質をコードする遺伝子の mRNA の 3' UTR にもクラスタが存在することが明らかとなった⁶³。

piRNA クラスタからの転写には、Heterochromatin protein1 (HP1) のパラログである Rhino や、Cutoff 等の因子が必須であるということが、最近の研究で明らかにされている^{64,65}。piRNA クラスタから転写された長い piRNA 前駆体は、Zucchini (Zuc) と呼ばれるエンドヌクラーゼ等により適当な長さに切断された後、5'末端塩基がウラシル (1U) の piRNA 前駆体を選択的にある種の PIWI タンパク質と結合する^{66,67}。その後、Trimmer と呼ばれる Mg^{2+} 依存的なエキソヌクラーゼにより 3'末端が削られ、最終的に 3'末端の 2'OH 基がメチル化され (2'OMe 修飾)、成熟 piRNA となる^{68,69}。この 2'OMe 修飾反応は Hen1 と呼ばれる Mg^{2+} 依存的な RNA メチルトランスフェラーゼによって行われる。また、3'末端が適切な長さまで削られる為には PAPI と呼ばれるタンパク質が必要である^{70,71}。

現在のところ、2012 年に報告された Zuc のみが piRNA の一次生成過程に関与するエンドヌクラーゼとして明らかになっている。Zuc はもともと雌不妊の原因遺伝子としてショウジョウバエの遺伝的スクリーニングで同定された因子である。Mitochondrial phospholipase D (PLD) サブファミリーに属し、ミトコンドリア外膜に局在し、ダイマーとして機能する。piRNA 前駆体はある決まった構造や配列を持たないと考えられており、Zuc がどのようにして piRNA 前駆体と他の RNA 転写物を見分けているのかは明らかではない。現在までに、Zuc は、DEAD-box ヘリカーゼである Armitage (Armi) や Yb といった piRNA の一次生成経路への関与が示唆されている因子などと共同してはたらいっていることが示唆されている^{72,73}。さらに、ショウジョウバエにおける近年の研究で、核外輸送に関与する DEAD-box ヘリカーゼである UAP56 が Rhino と共局在したり、nuage 上に局在したりしていることや、piRNA 前駆体と結合していることが明らかになった。これらのことを踏まえると、複数の piRNA 関連因子らが結合・共同することによって、piRNA 前駆体を他の RNA と区別するためにはたらきつつ piRNA 生合成経路へと誘導しているのではないかと考えられている^{64,74}。

ショウジョウバエの三種類の PIWI タンパク質 (Piwi, Aub, AGO3) や、マウスの三種類の PIWI タンパク質 (Miwi, Miwi2, Mili)、ゼブラフィッシュの二種類の PIWI タンパク質 (Ziwi, Zili) およびカイコの二種類の PIWI タンパク質 (Siwi, BmAgo3) のうち、Piwi, Aub, Miwi, Mili, Ziwi, Siwi には 1U piRNA が結合することが分かっている (1U バイアス~80%)。In vitro の実験では、Zuc が RNA を切断する際には塩基特異性が無く、ランダムに切断することが分かっているため、

piRNAに1Uが多いのは、未だ明らかになっていない因子の影響や、PIWIタンパク質に存在する5'結合ポケットの選択性によると考えられている^{66,67}。前述したように、1UのガイドRNAと選択的に結合する性質はPIWIタンパク質に限ったことではなく、ショウジョウバエのAGOタンパク質や植物のAGOタンパク質等でも見られる現象である。PIWIタンパク質においても、何故それほどまでに1UのpiRNA前駆体との結合が好まれるのか、ということに関しては、明確な答えが得られていない。

③ ピンポンサイクル

一方、ピンポンサイクルは一次生成過程に続いて起こるpiRNAの増幅過程であり、二種類のPIWIタンパク質の切断活性に基づいて行われる。PIWIタンパク質も他のAGOタンパク質と同様に、結合piRNAの5'末端から10番目と11番目の塩基の間で標的RNAを切断する。ピンポンサイクルでは、一方のPIWIタンパク質に結合したpiRNAをガイドとして相補的なRNAが認識および切断され、その切断産物が新たなpiRNA前駆体となり、他方のPIWIタンパク質と複合体を形成する。その後、Trimmerにより3'末端が削られ、3'末端に2'OMe修飾が入り、成熟piRNAとなる(図1-4-4)。このようにして、ピンポン(卓球)のラリーのようにPIWIタンパク質とpiRNAの複合体が標的の間を行き来することでpiRNAが増幅する仕組みをとることから、ピンポンサイクルと名付けられた。このピンポンサイクルは、1塩基目から10塩基目までの配列が完全に相補的なpiRNAが存在すること(10塩基オーバーラップ)と、1U piRNAと10塩基目がアデニン(10A)のpiRNAの対が多い(1U/10Aバイアス)という配列上の情報から提唱されたモデルであるが、生化学的な実証は未だ行われていない^{13,48,64}(図1-4-5)。

サブファミリー タンパク質	PIWI		AGO	
結合小分子	piRNA	siRNA		miRNA
長さ (塩基)	23-30	21-22		21-22
前駆体	一本鎖 RNA	二本鎖 RNA		ヘアピン RNA
発現組織	生殖巣	恒常的		恒常的
機能	トランスポゾン 制御	トランスポゾン・ ウイルス制御		遺伝子発現 制御

図 1-4-1. PIWI タンパク質と AGO タンパク質

PIWI タンパク質と AGO タンパク質、およびそれぞれに結合する小分子 RNA の特徴を示した。siRNA は二本鎖 RNA、miRNA はヘアピン RNA から作られるのに対し、piRNA はその前駆体が一
本鎖である。また、piRNA は siRNA や miRNA よりも長く、発現場所も生殖巣に限定される。

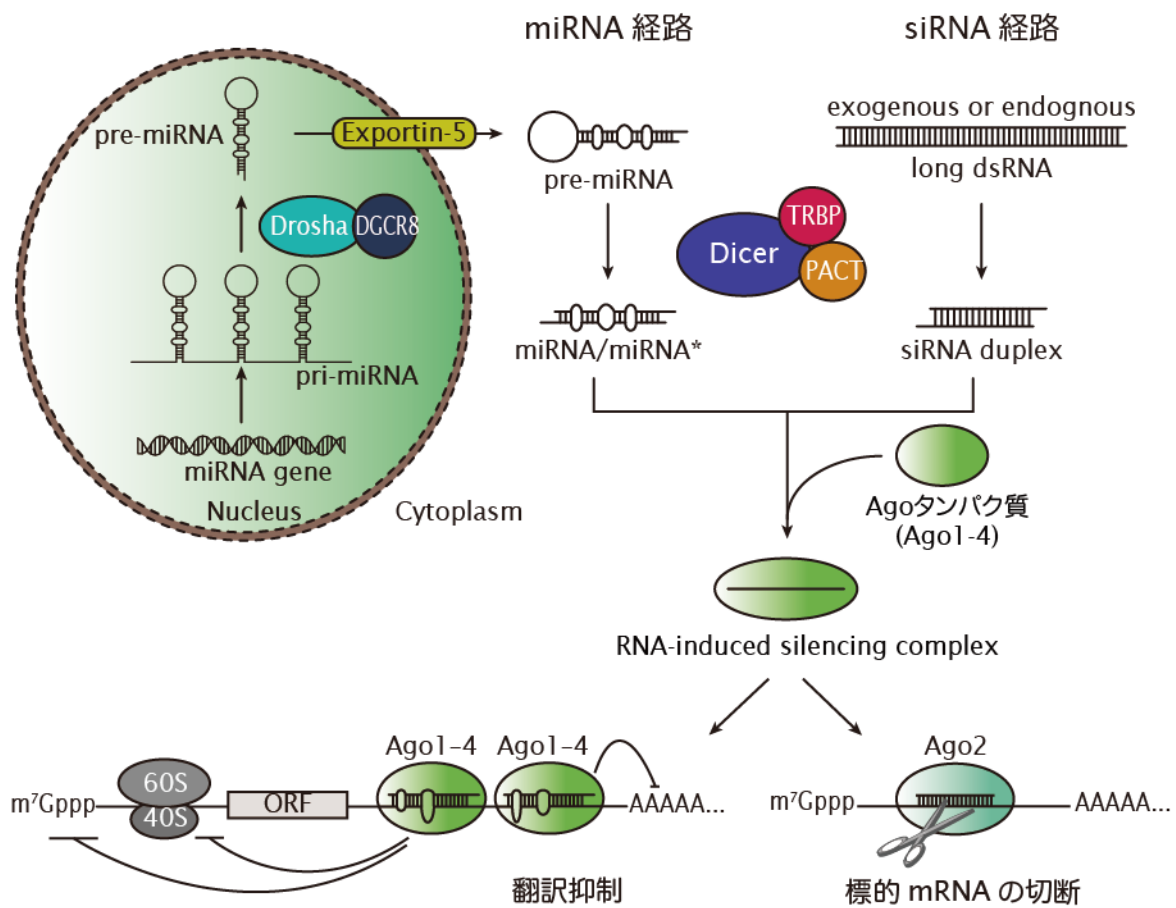


図 1-4-2. ヒトにおける RNA サイレンシングの模式図

依田真由子博士により作成された図である。

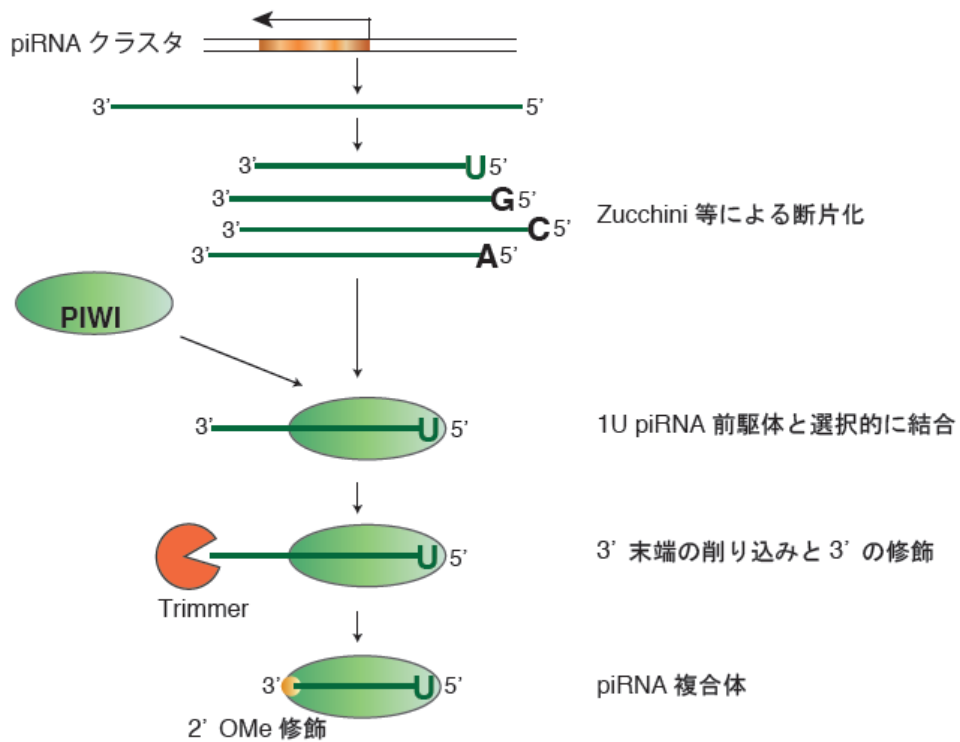


図 1-4-3. 一次生成過程

piRNA クラスタから長い一本鎖 RNA が転写され、Zucchini と呼ばれるエンドヌクラーゼ等により断片化された後、1U の piRNA 前駆体を選択的にある種の PIWI タンパク質と結合する。その後、Trimmer により 3' 末端が削られ、最終的に 3' 末端が 2'OMe 修飾され、成熟 piRNA となる。

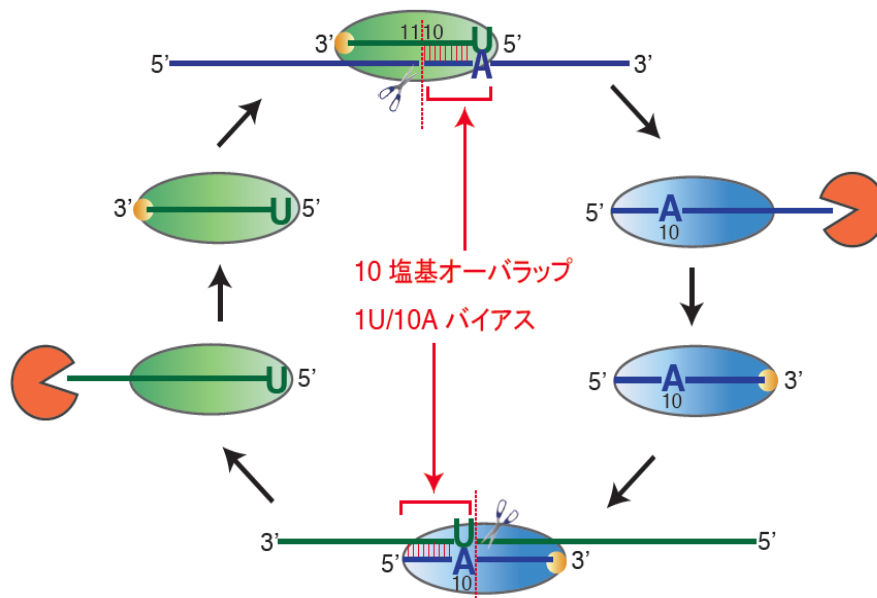
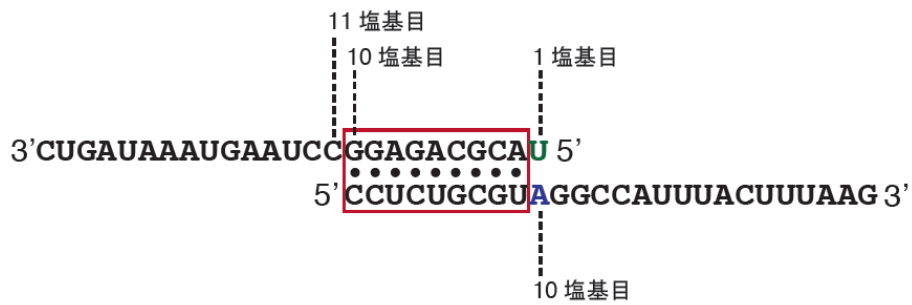


図 1-4-4. ピンポンサイクル

ピンポンサイクルは、二種類の PIWI タンパク質の切断活性に基づく。一方の PIWI タンパク質に結合した piRNA をガイドとして相補的な RNA が認識および切断され、その切断産物が新たな piRNA 前駆体となり、他方の PIWI タンパク質と複合体を形成し、成熟 piRNA となる。それぞれの PIWI タンパク質に結合する piRNA どうしが、10 塩基オーバーラップと 1U/10A バイアスの特徴を持つ。



- 10 塩基オーバーラップ
- 1U/10A バイアス

図 1-4-5. 10 塩基オーバーラップと 1U/10A バイアス

図 1-4-4 の切断サイトを拡大した。PIWI タンパク質は、結合した piRNA の 10 番目と 11 番目の塩基の間で標的 RNA を切断する。また、一次生成過程でできる piRNA の 5' 末端塩基は U であるものが 80 % 近くを占める。ピンポンサイクルで生成された piRNA どうしは 10 塩基オーバーラップと 1U/10A バイアスの特徴を持つ。

(5) ショウジョウバエにおける piRNA 研究

piRNA はショウジョウバエの卵巣においてもっともよく調べられている。ショウジョウバエには Piwi、Aub、AGO3 の三種類の PIWI タンパク質が存在し、Aub と Ago3 は生殖細胞で発現し、細胞質の特に nuage に局在する。一方、Piwi は生殖巣の体細胞と生殖細胞に発現し、核に局在する^{13,75,76}。Piwi や Aub に結合する piRNA はトランスポゾンのアンチセンス鎖に由来し、5'末端の塩基が U である piRNA が多いことが明らかとなっている。一方、AGO3 に結合する piRNA はトランスポゾンのセンス鎖に由来し、10 塩基目が A であるものが多い。そして Piwi には AGO3 の 15 倍、Aub には AGO3 の 6.4 倍の piRNA が結合している⁷⁵。また、配列解析より、Aub に結合する piRNA と AGO3 に結合する piRNA は、5'末端から 10 塩基において相補性を示す対が多く存在し、Aub と AGO3 の間でピンポンサイクルが動いているというモデルが提唱されている。一方、Piwi に結合する piRNA は主に一次産生経路によって生成されと考えられている。従って、Piwi のみが発現する生殖巣の体細胞では、ピンポンサイクルが動いていないことが判明している^{75,76}。

piRNA を生化学的に解析するためのツールとして、大きな役割を果たして来たものの一つに、ショウジョウバエの体細胞に由来する培養細胞、OSC (Ovarian Somatic Cell) がある^{63,77}。2009 年以降、OSC 細胞が piRNA を発現する培養細胞であることが示され、OSC 細胞を用いた piRNA 研究が行われてきた。しかしながら、OSC 細胞には三種類存在するショウジョウバエの PIWI タンパク質のうち Piwi しか発現しておらず、ピンポンサイクルが動いていないため解析できる経路には限界がある。

ショウジョウバエ以外のモデル生物としては後述するカイコや、マウス、ゼブラフィッシュ、カエル等が挙げられる。マウスでは、Miwi2、Miwi、Mili の三種類の PIWI タンパク質が発現しており、Miwi2 と Mili の間でピンポンサイクルが動いている。Mili にはトランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する 1U piRNA が結合し、Miwi2 にはトランスポゾンのセンス鎖に由来する 10A piRNA が結合する。

(6) piRNA 経路関連遺伝子

これまで PIWI タンパク質の生化学的特徴や piRNA の生合成機構について述べてきたが、piRNA 経路には他の多くのタンパク質が関与することが示されており、ここではそれらの因子について簡単に触れる。

質量分析の結果、PIWI タンパク質のアルギニン残基が翻訳後修飾を受けることが分かり、その

修飾には arginine methyltransferase 5 (dPRMT5) が関与すること明らかになった。PIWI タンパク質は、N 末端領域にアルギニンとグリシンからなるドメイン (RG ドメイン) が存在し、そのドメインが dPRMT5 により対称性ジメチル化修飾 (Symmetric dimethyl arginine (SDMA) 修飾) される⁷⁸。ショウジョウバエの Aub や AGO3 は、SDMA 特異的な結合能を持つ一群の Tudor タンパク質と、SDMA 修飾依存的に相互作用する⁷⁹。例えば、Aub や AGO3 は Tudor タンパク質の一種である「Tudor」(Tud) と sDMA 依存的に相互作用するのだが、Tud に変異のあるショウジョウバエでは、結合する piRNA の量や配列に変化がみられた。その他、これまでに、ショウジョウバエの Tudor タンパク質として、Papi、Qin (Kumo)、Teja (Tej)、Spindle E (Spn-E)、Yb、Brother of Yb (BoYb)、Sister of Yb (SoYb)、Vreteno (Vret)、Krimper (Krimp)、dSETDB1 等多数報告されており、piRNA 経路への関与も示され、変異体を用いた実験等からそれぞれの機能の解析も行われているが、ここでは詳細は省略する。現在までの研究より、Tudor タンパク質は PIWI サブファミリータンパク質に結合する piRNA の「質」や「種類」を制御する、ピンポンサイクルの「プラットフォーム」としてはたらく重要な因子であると考えられる。

その他、前述した Zuc や Armi、DEAD-box ヘリカーゼである Vasa、ヌクレアーゼである Squash (Squ) や Maelstorm (Mael) と呼ばれる因子等がいずれも piRNA 経路へ関与することが示唆されている⁸⁰。このように piRNA 経路には様々な因子が時間的、空間的な違いを持ちながら関与していることが多数報告されているものの、その全体像に関しては未だ混沌としている。

(7) 本研究の目的

siRNA や miRNA については生化学的な解析も進み、生合成経路も明らかになってきたのに対し、piRNA の生化学的機能に関する直接的な研究例は難航を極めていた。その要因は、piRNA の発現が生殖巣に限られているため多量のタンパク質抽出液の調製が困難であることや、ピンポンサイクルが動いている生殖細胞由来の培養細胞を見つけられていなかったことにあった。OSC 細胞には Piwi という一種の PIWI タンパク質しか発現せず、ピンポンサイクルが動いていないため、ピンポンサイクルに対する生化学的な実証は行われて来なかった。そんな中、東京大学大学院農学生命科学研究科 勝間進准教授の研究室と我々の研究室では、数年前よりカイコ卵巣由来の培養細胞 BmN4 に注目し、BmN4 細胞が piRNA を発現し、かつ、ピンポンサイクルが動いていることを見だし、共同で piRNA の生化学的解析をすすめてきた^{69,81-83}。

BmN4 細胞には Siwi と BmAgo3 という 2 つの PIWI タンパク質が発現している。これまでの解析から、Siwi にはトランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する配列を持つ 1U piRNA が多く結合

し、BmAgo3 にはセンス鎖に由来する 10A piRNA が多く結合することが明らかになっている。そして Siwi と BmAgo3 に結合する piRNA 間で 10 塩基オーバーラップと 1U/10A バイアスを示す対が多い。また、BmN4 培養細胞抽出液（ライセート）を用いた *in vitro* の実験において、Siwi のみ 1U RNA と選択的に結合する性質を持ち、BmAgo3 はそのような性質を持たないことが示されており、両タンパク質間で、piRNA の 5'末端塩基の認識に違いがあることが分かっている⁶⁹。これらの解析結果より、カイコの piRNA 経路でも Siwi-BmAgo3 間でピンポンサイクルが動いていると考えられている⁸¹（図 1-7-1）。これらのことから、piRNA 経路を研究する上で、BmN4 細胞は非常に重要なツールとなっている。

さて、ピンポンサイクルのモデルから、Siwi に 1U piRNA が選択的に結合するのであれば、切断によって生じる BmAgo3 結合 piRNA の 10 塩基目（Siwi 結合 piRNA の 1U の向かいの塩基）が A になるのはごく当然のことに思える。しかしながら、PIWI と同じく Argonaute ファミリーに属するヒトや出芽酵母の AGO タンパク質の結晶構造から、小分子 RNA の 5'末端塩基は AGO タンパク質の 5'末端結合ポケットにより認識されていて、標的 RNA と塩基対を形成できない位置にあることが明らかになった^{29,30,45}（図 1-7-2）。すなわち、BmAgo3 に 10A piRNA が多いのは、切断時に Siwi に結合する piRNA の 5'末端塩基の U と塩基対を形成することによるのではないのである。

さらに、mRNA の 3'UTR 領域において、ヒトの miRNA の標的サイトを網羅的に解析した結果、miRNA の 5'末端塩基の向かいの標的 RNA 塩基 (t1) に A が多いことが明らかになった。これも、AGO タンパク質と結合するガイド RNA の 5'末端塩基に U が多いことによらない。miRNA の 5'末端が U でない場合（すなわち、5'末端が A や G、C である miRNA に対する標的）でも、塩基対を形成できる塩基よりも約 2 倍、t1A が多いことが明らかになっている^{84,85}。以上のことより、AGO タンパク質自身が t1A の標的 RNA を選択的に認識する性質を持つ可能性が考えられる。

この性質を PIWI タンパク質に当てはめると、Siwi により切断・生成された BmAgo3 結合 piRNA に 10A が多いことから、Siwi にもヒト Ago2 等と同様に t1A の選択性が存在すると考えられる。一方、Siwi に結合する piRNA の 10 番目の塩基に明らかな偏りは見られないことから、BmAgo3 には標的 RNA の t1 塩基の選択性は無く、ヒト Ago2 等とは性質が異なることが予想される。このように、ピンポンサイクルに関わる 2 つの PIWI タンパク質において t1A の認識に違いがあることは、カイコに限った現象ではない。ショウジョウバエやマウス、ゼブラフィッシュにおいても、片方の PIWI タンパク質に結合した piRNA にのみ 10A のバイアスが見られることより、やは

り二種類の PIWI タンパク質間で t1A の選択性に違いがあることが想定され、種間で保存された性質であることが予想できる。

そこで私は、BmN4 細胞に発現する 2 つの PIWI タンパク質、Siwi と BmAgo3 の t1 塩基の選択性の違いに注目し、この違いが何によるものであるのかを生化学的に検証するために本研究を行った。

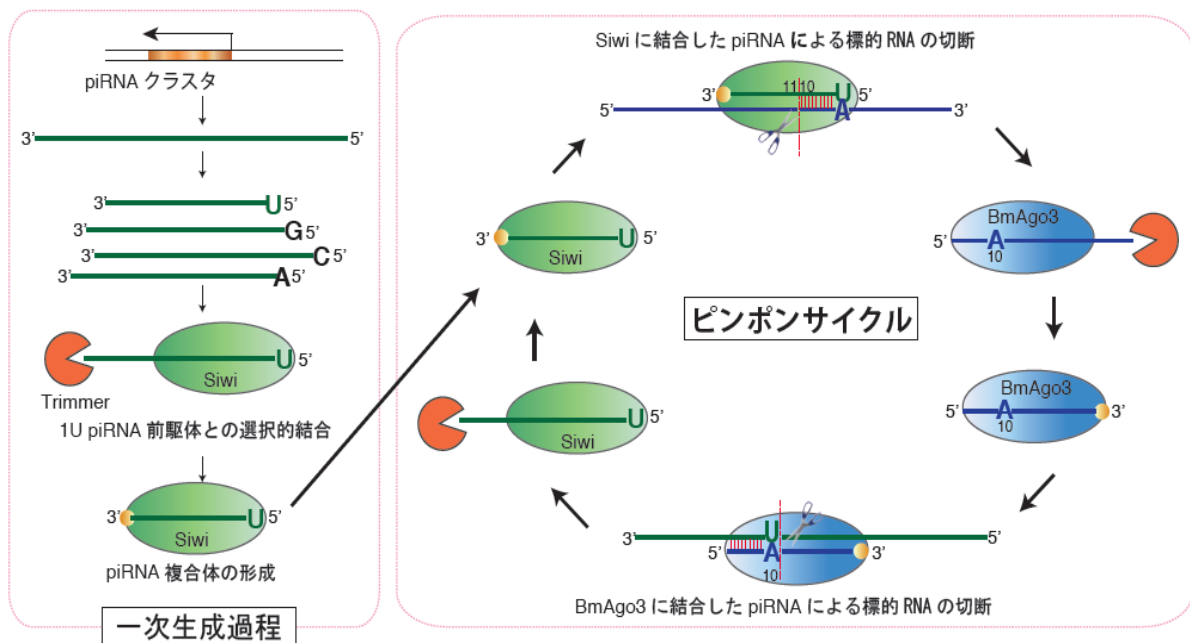


図 1-7-1. カイコにおける piRNA 生合成過程

一次生成過程では 1U piRNA 前駆体が選択的に Siwi と結合し、成熟 piRNA となる。続いてピンポンサイクルでは Siwi に結合した piRNA と相補的な標的が切断され、BmAgo3 と結合し、成熟 piRNA となる。Siwi と BmAgo3 に結合する piRNA どちらとも 10 塩基オーバーラップと 1U/10A バイアスの特徴を持つ。

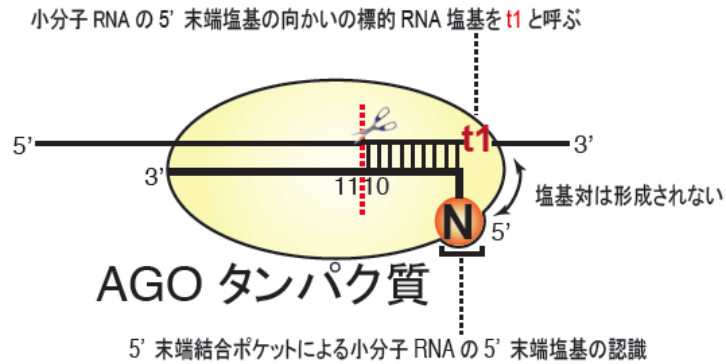
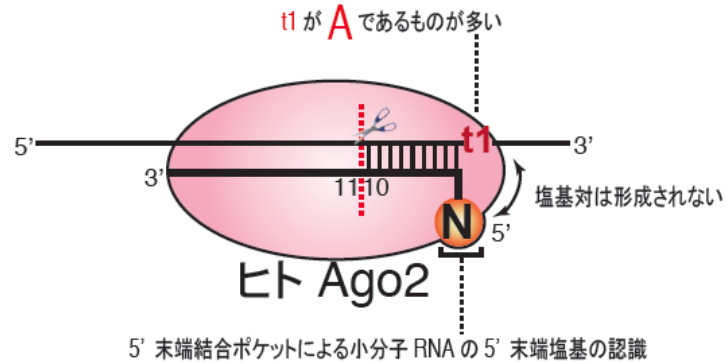
a**b**

図 1-7-2. AGO タンパク質の 5'末端結合ポケットによる RNA の 5'塩基の認識

(a) 小分子 RNA の 5'末端塩基は AGO タンパク質の 5'末端結合ポケットにより認識されていて、標的 RNA と塩基対を形成できない位置にあることがヒトや出芽酵母の結晶構造解析により明らかになった。

(b) seed 配列をたよりに mRNA の 3'UTR 領域の標的サイトを網羅的に解析した結果、miRNA の 5'末端塩基に関わらず、5'末端塩基の向かいの標的 RNA 塩基 (t1) に A が多いことが明らかになった。

II. 結果

(1) ヒト Ago2 は t1A の選択性を持つ

予てよりヒトにおいて、miRNA の 5'末端塩基に関わらず、miRNA の 5'末端塩基の向かいの標的 RNA 塩基 (t1) に A が多いことが網羅的な標的 RNA 解析により明らかになっている。しかしながら未だに、ヒト Ago2 が実際に t1A を選択的に切断する様子を生化学的に解析した研究は無い。そこで著者は、まずヒト Ago2 の t1A の選択性が in vitro の切断アッセイによって観察できるかどうか確かめた。

以下に示すようなガイド RNA とパッセンジャー RNA を用いて、それらの 5'末端をリン酸化し、ガイド RNA とパッセンジャー RNA をアニールさせて二本鎖 siRNA 前駆体様の、完全に相補的な二本鎖 RNA を作成した。FLAG-ヒト Ago2 をヒト由来の培養細胞 HEK293T に一過的に過剰発現し、ライセートを作成し、ライセートと二本鎖 RNA を 37 °C で 30 分間インキュベートすることでヒト Ago2 に RNA を取り込ませ、RISC を形成させた。その後、ライセート中に t1 塩基が A、U、G、C のいずれかの 5'キャップ構造を放射性ラベルした標的 RNA を加え、切断アッセイを行った。標的 RNA は、pGL3 basic ベクターを鋳型とし、T7 配列を持つプライマーと標的配列を含むプライマーを用いて転写した後、30 % ホルムアミド+7 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動して目的の RNA 転写物を切り出し、ScriptCap™ m7G Capping System (cell script) により 5'キャップ構造に放射性標識を入れた後、再びゲル切り出しを行うことで目的の標的 RNA のみを得た。

それぞれの切断効率の指標として、「Fraction target cleaved」の割合を、「Cleaved」のバンドの強度を「Cleaved」と「Target」のバンドの強度の和で割ることで算出した (図 2-1-1)。そして t1 塩基とその切断効率を比較した。独立した複数回の切断アッセイを行った結果、図 2-1-2 に示されるように、ガイド RNA の 5'末端塩基が A であるにも関わらず、t1A の標的 RNA の切断効率が他のものに比べて高いことが観察された。統計処理を行った場合も、t1A とその他の t1 塩基による切断効率の間には、優位差が存在した。この結果は、AGO タンパク質による t1A の選択性は、ガイドの一塩基目と t1 塩基の塩基対によらないことを強く示唆する結果であった。尚、今回の実験に用いたガイド RNA は、後述する BmAgo3 に結合する 1A piRNA の、5'末端より 21 塩基と同じ配列である。用いた 4 種類の標的 RNA (標的 A3_1A_t1A、標的 A3_1A_t1U、標的 A3_1A_t1G、標的 A3_1A_t1C) も後に BmAgo3 の標的切断アッセイに用いる標的 RNA と同じ配列である。

ガイド鎖 (A3_1A_siRNAguide)

5' AAAAGCAUGAGAAUUUGCUGU 3'

パッセンジャー鎖 (A3_1A_siRNApass)

5' AGCAAAUUCUCAUGCUUUUAA 3'

二本鎖 RNA (A3_1A_dsRNA)

```

      ガイド鎖
5' AAAAGCAUGAGAAUUUGCUGU 3'
.....
3' AAUUUUCGUACUCUAAAACGA 5'
      パッセンジャー鎖
    
```

標的 A3_1A

A3_1A_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTCCGGUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUGAUAACUCCUCUCUCCCGCAGACAGCAAUUCUCAUGCUUUACCUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1A_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTCCGGUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUGAUAACUCCUCUCUCCCGCAGACAGCAAUUCUCAUGCUUUUCCUUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1A_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTCCGGUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUGAUAACUCCUCUCUCCCGCAGACAGCAAUUCUCAUGCUUUGCCUUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1A_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTCCGGUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUGAUAACUCCUCUCUCCCGCAGACAGCAAUUCUCAUGCUUUCCUUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

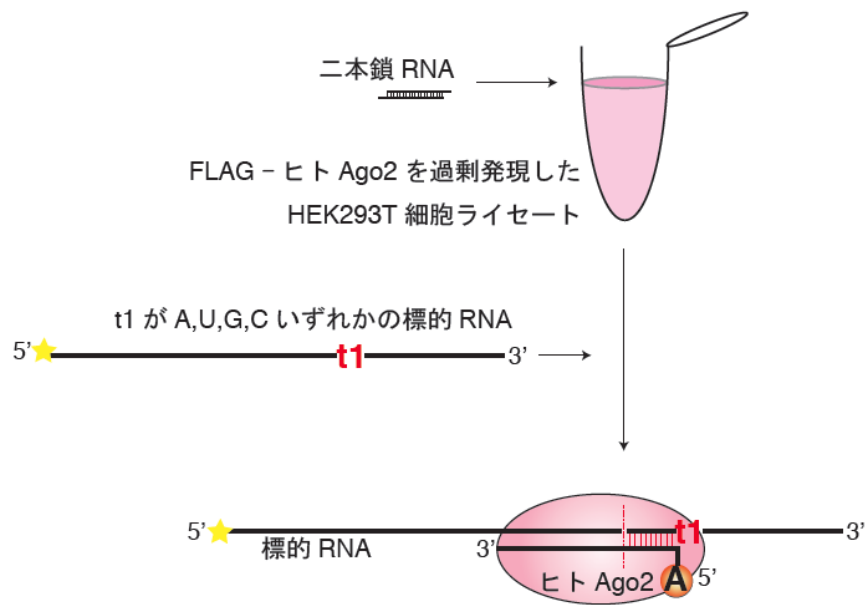


図 2-1-1. ヒト Ago2 を用いた標的切断アッセイの模式図

FLAG-ヒト Ago2 を一過的に過剰発現した HEK293T 細胞より作成したライセートをと二本鎖 RNA を 37 °C で 30 分間インキュベートすることでヒト Ago2 に RNA を取り込ませ、RISC を形成させた。その後、ライセート中に t1 塩基が A、U、G、C のいずれかの 5'キャップ構造を放射性ラベルした標的 RNA を加え、ライセート中で標的切断アッセイを行った。そして t1 塩基とその切断効率を比較した。

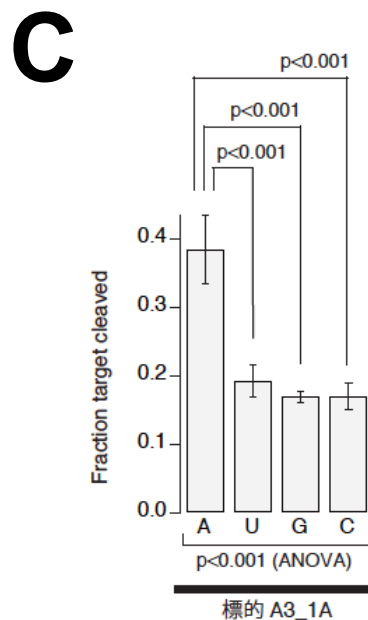
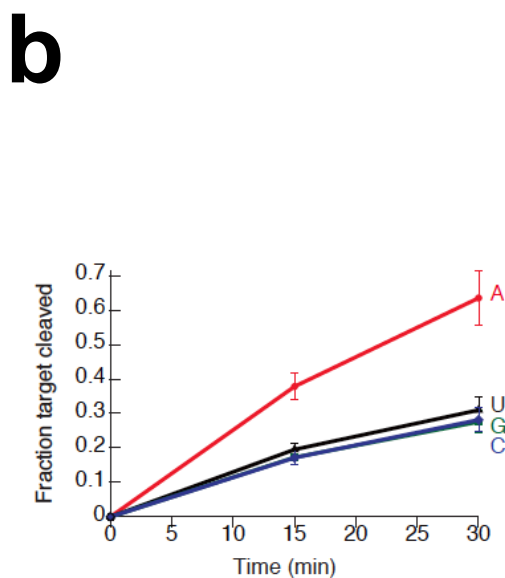
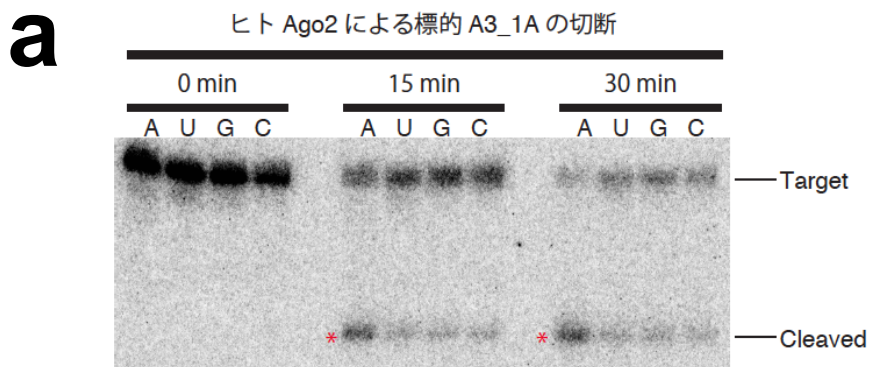


図 2-1-2. ヒト Ago2 による標的 A3_1A の切断

(a) ヒト Ago2 を用いた標的 A3_1A の切断のゲル写真。

(b) (a) をグラフ化した。「Fraction target cleaved」は「Cleaved」のバンドの強度を「Cleaved」と「Target」のバンドの強度の和で割ることで算出した。

(c) 15 分後をグラフ化し、統計処理を行った。全体の分散分析に Analysis of variance (ANOVA) の分散分析法を用い、t1A とその他の t1 塩基との切断効率の対比較には、Tukey 検定を用いた。

(2) Siwi は t1A の選択性を持ち、BmAgo3 は持たない

BmN4 細胞に発現する piRNA の配列解析を行った結果、BmAgo3 に結合する piRNA に 10A piRNA が多いことから Siwi はヒト Ago2 と同様に t1A の選択性を持つことが予想される。一方、Siwi に結合する piRNA 塩基の 10 番目に塩基の偏りが見られないことより、BmAgo3 にはそのような選択性がないことが予想される。そこで、実際に in vitro で両 PIWI タンパク質の t1 塩基の選択性の違いが観察できるかどうか調べた。

当初、ヒト Ago2 で行ったように、ライセート中に任意のガイド RNA を取り込ませることにより切断アッセイを行うことを試みた。しかしながら FLAG-Siwi や FLAG-BmAgo3 へのガイド RNA 取り込み効率が非常に低く、それを用いて切断アッセイを行うことは非常に困難であった。そのため外部から RNA を取り込ませることを行わず、内在の piRNA に対する標的 RNA を用いることにより切断アッセイを行うことにした。

以前、河岡慎平博士により行われた Siwi または BmAgo3 に結合する piRNA 配列の網羅的な解析結果を用いて、Siwi または BmAgo3 に結合する piRNA のうちリード数が多い 1U piRNA、1C piRNA、1A piRNA 等をガイド piRNA として選んだ⁸³。それぞれのガイド piRNA に対する標的 RNA について t1 塩基が A、U、G、C の 4 通りを作成し、5'キャップ構造に放射性標識を入れ、標的 RNA として用いた。ガイド piRNA として選択した piRNA 配列と、それに対する t1 塩基が A、U、G、C の標的 RNA は配列表に示した通りである(標的 S_1U、標的 S_1C、標的 S_1U2、標的 A3_1U、標的 A3_1C、標的 A3_1A)。本研究で用いた全ての標的 RNA は、(1) と同様の方法で作成されており、pGL3 basic ベクターを鋳型とし、T7 配列を持つプライマーと標的配列を含むプライマーを用いて転写した後、30 % ホルムアミド+7 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動して目的の RNA 転写物を切り出し、ScriptCapTM m7G Capping System (cell script) により 5'キャップ構造に放射性標識を入れた後、再びゲル切り出しを行うことで目的の標的 RNA のみを得た。

標的 S_1U : Siwi に結合する 1U piRNA とそれに対する標的 RNA

S_1U ガイド piRNA	5'UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC 3'
S_1U_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGACCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGUACCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGGACCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGCACCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

S_1C : Siwi に結合する 1C piRNA とそれに対する標的 RNA

S_1C ガイド piRNA	5'CAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGU 3'
S_1C_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCACUCAGUGGGUAAUUCUAUGGUGAUUACCUUUUUAUACA ACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1C_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCACUCAGUGGGUAAUUCUAUGGUGAUUACCUUUUUAUACA ACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1C_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCACUCAGUGGGUAAUUCUAUGGUGAUUGACCUUUUUAUACA ACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1C_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCACUCAGUGGGUAAUUCUAUGGUGAUUCACCUUUUUAUACA ACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

S_1U2 : Siwi に結合する 1U piRNA とそれに対する標的 RNA

S_1U2 ガイド piRNA	5'UGUUGCAAUCCACGACUGACGUACA 3'
S_1U2_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCUGUACGUCAGUCGUGGAAUUGCAACACCUUUUUAUACAA CCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U2_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCUGUACGUCAGUCGUGGAAUUGCAACUACCUUUUUAUACAA CCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U2_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCUGUACGUCAGUCGUGGAAUUGCAACGACCUUUUUAUACAA CCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U2_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUGAUGAACUCCUCUCUUCUGUACGUCAGUCGUGGAAUUGCAACACCACCUUUUUAUACAA CCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

標的 A3_1U : BmAgo3 に結合する 1U piRNA とそれに対する標的 RNA

A3_1U ガイド piRNA	5' UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC 3'
A3_1U_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGACCUUUUAUACAACC GUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1U_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGUCCUUUUUAUACAACC GUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1U_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGGCCUUUUUAUACAACC GUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1U_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGCCUUUUUAUACAACC GUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

標的 A3_1C : BmAgo3 に結合する 1C piRNA とそれに対する標的 RNA

A3_1C ガイド piRNA	5' CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACC 3'
A3_1C_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGGUUCGCGUGGUGCAUCUUUCUAUACCUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1C_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGGUUCGCGUGGUGCAUCUUUCUAUUCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1C_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGGUUCGCGUGGUGCAUCUUUCUAUGCCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1C_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGGUUCGCGUGGUGCAUCUUUCUAUCCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

標的 A3_1A : BmAgo3 に結合する 1A piRNA とそれに対する標的 RNA

((1) においてヒト Ago2 のアッセイに用いた標的と同じ配列である)

A3_1A ガイド piRNA	5' AAAAGCAUGAGAAUUGCUGUCGCG 3'
A3_1A_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGCGAGACAGCAAUUCUAUGCUUUACCUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1A_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGCGAGACAGCAAUUCUAUGCUUUUCCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1A_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGCGAGACAGCAAUUCUAUGCUUUGCCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1A_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAG ACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGCGAGACAGCAAUUCUAUGCUUUCCUUUUUAUACAAC CGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

著者は本研究に至るまで、ピンポンサイクルを生化学的に実証しようと、PIWI タンパク質を用いた標的 RNA 切断条件の最適化を図るために、12 ヶ月に渡り様々な試行錯誤を続けてきた。ライセートの作成方法や、使用するライセート量、免疫沈降後の洗いの条件、標的 RNA の放射性ラベルの位置や、切断アッセイに用いるバッファの塩濃度、切断時間等の検討の数々をここで簡単に紹介する。当初、BmN4 ライセートをそのまま系に用いることで切断アッセイを行おうとしたが、活性が非常に弱く、切断産物が検出できなかった。そこで、BmN4 細胞に一過的に FLAG-Siwi や FLAG-BmAgo3 を過剰発現し、ライセートを作成した。そのようにして作成したライセートから抗 FLAG 抗体と Protein G Magnetic beads を用いて FLAG-Siwi または FLAG-BmAgo3 を免疫沈降した。しかしながら、それらの免疫沈降物により標的を切断することはできなかった。これは、トランスフェクション後 72 時間では、過剰発現した FLAG-Siwi や FLAG-BmAgo3 によるピンポンサイクルが十分に動いておらず、piRNA が十分に増幅していないことによるのではないかと考えられた。そこで、恒常的に FLAG-Siwi や FLAG-BmAgo3 を発現する BmN4 細胞を樹立し、それらより作成した大量のライセートより、FLAG-Siwi または FLAG-BmAgo3 を抗 FLAG 抗体と Protein G Magnetic beads を用いて免疫沈降した。そして、lysis buffer で 3 回という弱い条件で沈降物を洗った後、標的 RNA と数時間（Siwi の場合は 8 時間以上）インキュベートすることで切断アッセイを行う系を確立した。lysis buffer で 3 回という弱い条件で洗うのは、タンパク質の性質上、塩濃度の高いバッファで洗うと、beads 自体から FLAG-Siwi や FLAG-BmAgo3 外れてしまうことによる。BmN4 細胞における Siwi、BmAgo3 の発現の様子と wash buffer による影響は図 2-2-1 に示した。また、放射性ラベルの位置に関しても、本研究で用いているような 5'キャップ構造へのラベルの他に、キャップ構造を持たない標的 RNA の 5'末端のリン酸基にラベルを入れたり、標的 RNA の切断部位付近に内部ラベルを入れたり様々な試行錯誤を行った。しかしながらいづれも、切断 RNA 産物の検出効率を上昇させるに至らなかった。切断アッセイに用いるバッファに関しては、一般的にヌクレアーゼの活性に必要とされる二価の陽イオンとして Mg^{2+} 以外にも Ca^{2+} や Mn^{2+} 等の濃度条件を検討したが、激的に切断効率を上昇させるような条件を見つけれなかった。現在のところ、当実験で用いている条件が、著者が見つけられた最適条件である。それでも、図 2-2-6 に示すように、大量のライセートを用いて長い時間をかけて切断アッセイを行っても、用いた標的 RNA の数 % 程度しか切断されなかった。

まず、標的 RNA がガイド piRNA の配列依存的に正しい位置で切断されていることを、切断産物の長さや、ガイド RNA と相補的な配列を持つ 2'OMe 修飾の入った RNA (competitor RNA) を用いた実験で確認した (図 2-2-2)。2'OMe 修飾を持つ competitor RNA は、ヌクレアーゼによる分解に耐性があり、RISC に切断されにくい RNA として機能することが知られている。そのた

め、もし標的 RNA がガイド piRNA の配列依存的に切断されているのであれば、competitor RNA を加えるにつれて、RISC が competitor RNA を標的として認識する割合が増え、その結果、放射性ラベルされた標的 RNA の切断は低下していく様子が観察されるはずである。Siwi に結合する 1U piRNA に対する標的（標的 S_1U）の切断アッセイ系に 1U piRNA に対する competitor RNA を加えると、標的 RNA の切断効率は低下した。対して、無関係な配列を持つ 2'OMe 修飾 RNA を加えても、標的 RNA の切断効率には変化が無かった。同様に、BmAgo3 に結合する 1A piRNA に対する標的（標的 A3_1A）の切断アッセイ系に 1A piRNA の competitor RNA を加えると、標的 RNA の切断効率は低下し、無関係な 2'OMe 修飾 RNA を加えても、標的 RNA の切断効率には変化が無かった。これらのことより、標的 RNA がガイド piRNA の配列依存的に切断されていることが確認できた（図 2-2-3）。

続いて、標的 S_1U、標的 S_1C、標的 S_1U2 それぞれにおいて、t1 が A、U、G、C の 4 種類の標的 RNA と、Siwi をインキュベートし、t1 塩基と切断効率を比較した。また、標的 A3_1U、標的 A3_1C、標的 A3_1A それぞれにおいて、t1 が A、U、G、C の 4 種類の標的 RNA と BmAgo3 をインキュベートし、t1 塩基と切断効率を比較した。「Fraction target cleaved」は「Cleaved」のバンドの強度を「Cleaved」と「Target」のバンドの強度の和で割ることで算出した。それぞれのグラフは独立した 3 回のアッセイ結果に基づいて作成された（図 2-2-4、図 2-2-5、図 2-2-6）。

図 2-2-5 に示すように、統計処理を行った結果、Siwi は標的 S_1U、標的 S_1C、標的 S_1U2 のいずれの標的を用いても t1A を優位に選択的に切断していることが分かった。対して、BmAgo3 に関しては標的 A3_1U、標的 A3_1C、標的 A3_1A のいずれの標的 RNA を用いても t1 塩基の選択性は特に見られなかった。尚、特に Siwi は切断効率が低く、切断産物が見られるには、平均して 8 時間にもわたる標的 RNA とのインキュベートが必要であったため、一点で測定している。

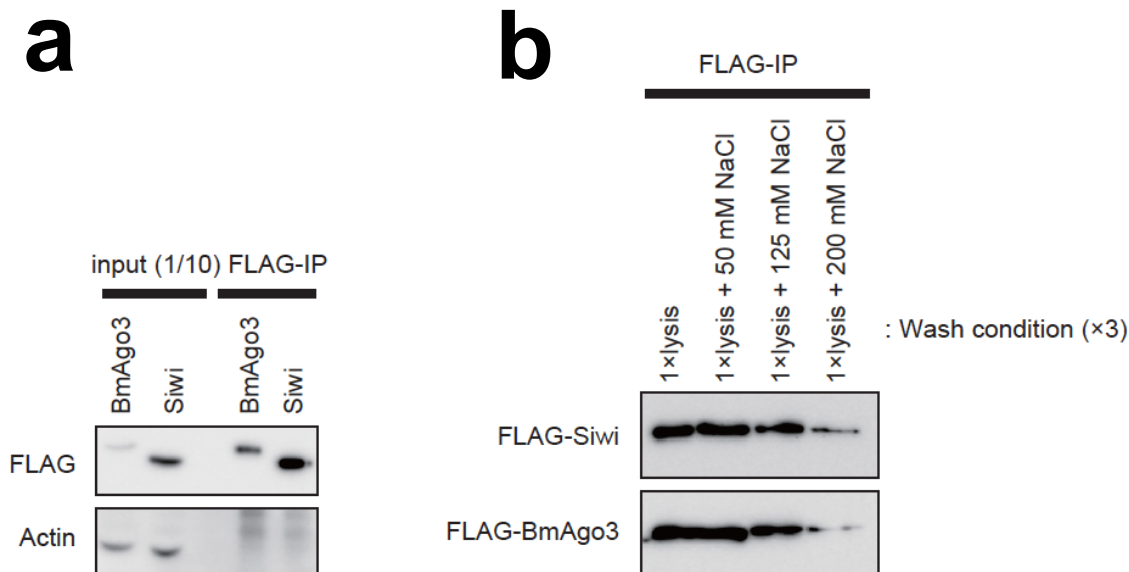


図 2-2-1. ウェスタンブロット法による発現と Wash 条件の確認

(a) 恒常的に FLAG-Siwi または FLAG-BmAgo3 を発現した BmN4 細胞よりライセートを作成し、抗 FLAG 抗体を用いて IP することにより、その発現を確認した。

(b) 抗 FLAG 抗体を用いて IP を行う際の Wash に含まれる塩濃度 (Na^+) を上げることにより、beads に結合するタンパク質が減少した。

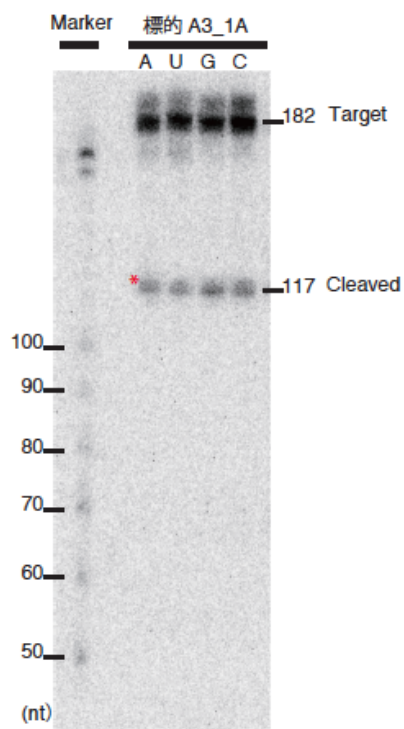


図 2-2-2. 切断産物の長さの確認

BmAgo3 を用いて 182 塩基の標的 A3_1A を切断した。マーカーを比較した結果、目的の 117 塩基付近に切断産物が見られた。

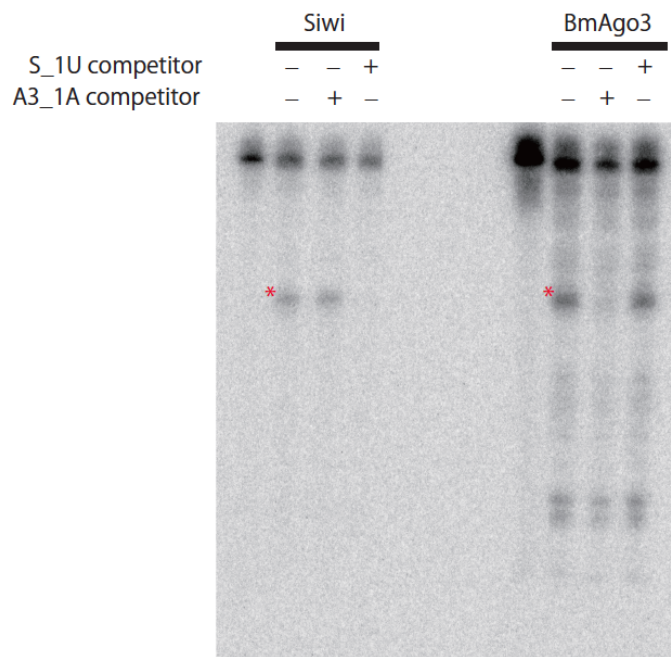


図 2-2-3. Competitor による切断の確認

Siwi による切断は標的 S_1U を用い、BmAgo3 による切断には標的 A3_1A を用いた。それぞれの competitor RNA を加えた結果、Siwi では、S_1U competitor RNA を加えた時、BmAgo3 では A3_1A competitor RNA を加えた時に切断産物が見られなくなった。

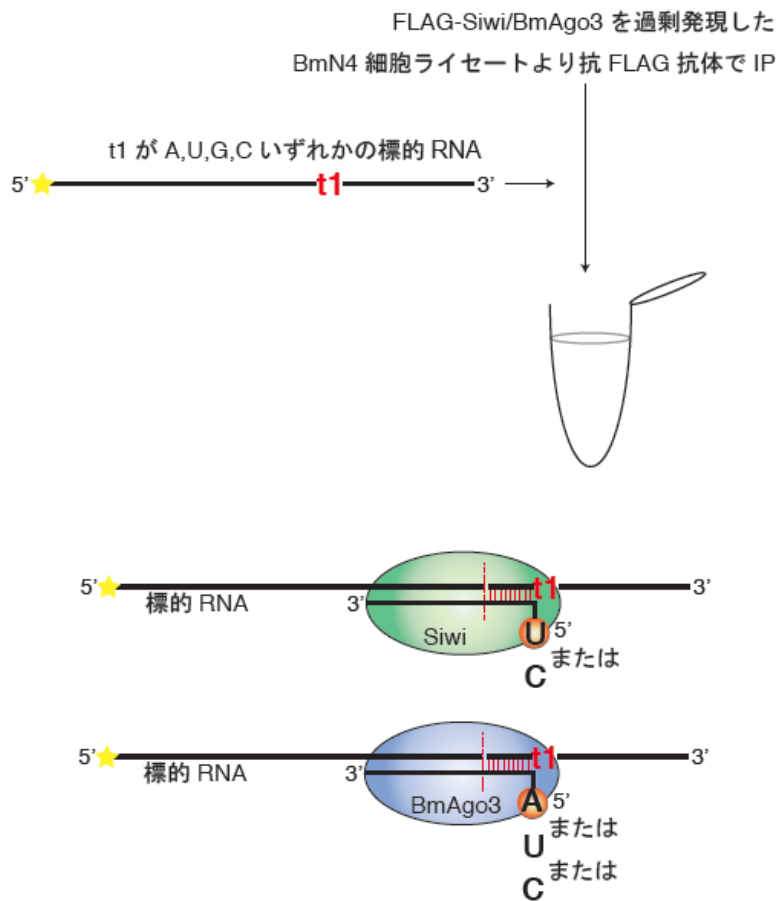
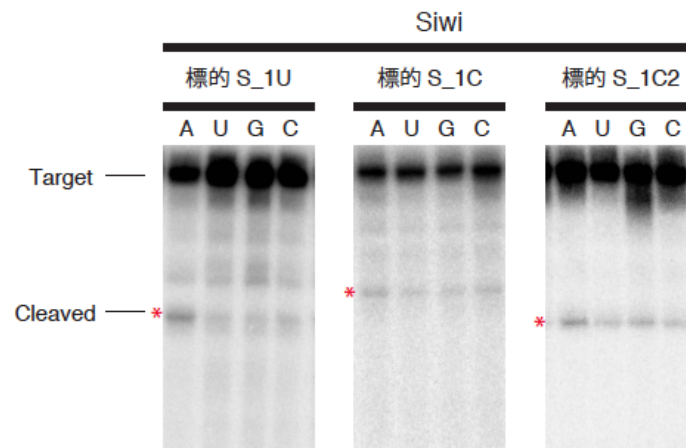


図 2-2-4. Siwi、BmAgo3 を用いた切断アッセイの模式図

恒常的に FLAG-Siwi や FLAG-BmAgo3 を発現する BmN4 細胞から作成したライセートより、抗 FLAG 抗体にを用いて FLAG-Siwi または FLAG-BmAgo3 を免疫沈降した。lysis buffer で 3 回洗った後、いずれかの標的 RNA と数時間インキュベートすることで切断アッセイを行った。

a



b

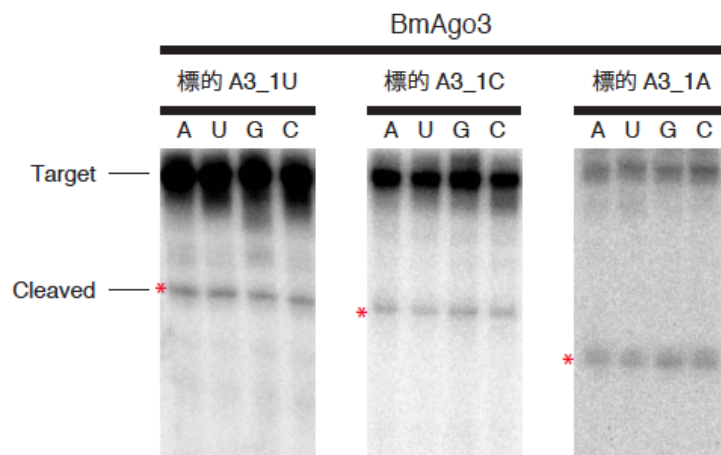


図 2-2-5. Siwi、BmAgo3 による切断アッセイのゲル写真

(a) Siwi により、左から標的 S_1U、標的 S_1C、標的 S_1U2 を切断した。

(b) BmAgo3 により、左から標的 A3_1U、標的 A3_1C、標的 A3_1A を切断した。

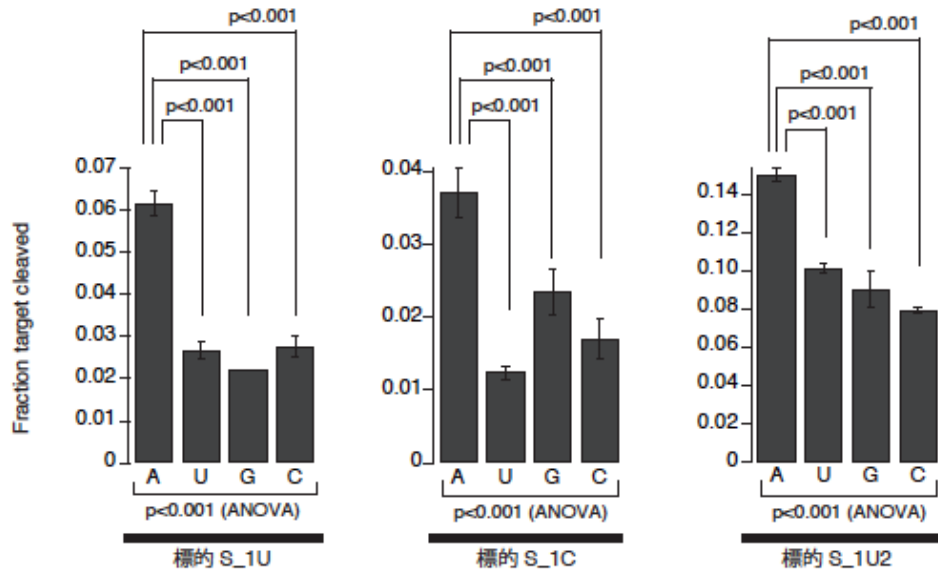
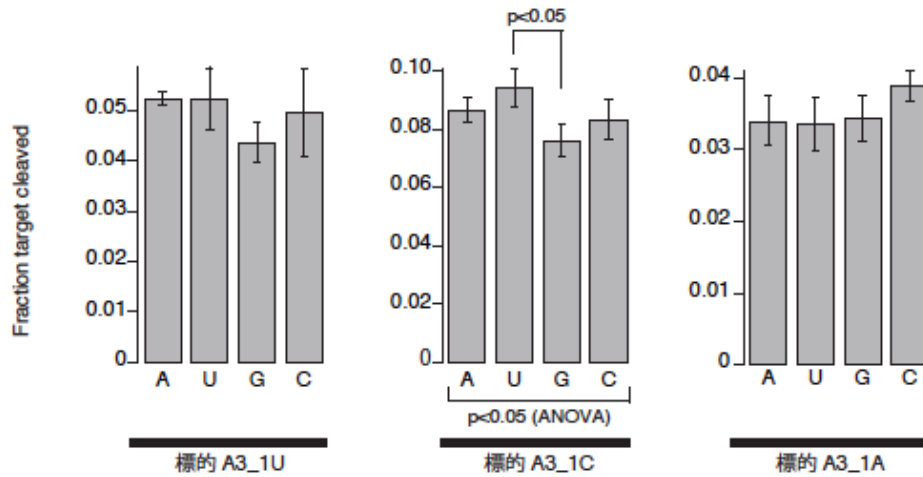
a**b**

図 2-2-6. 図 2-2-5 の結果のグラフ化と統計処理

「Fraction target cleaved」は図 2-2-6 の「Cleaved」のバンドの強度を「Cleaved」と「Target」のバンドの強度の和で割ることで算出した。全体の分散分析に Analysis of variance (ANOVA)の分散分析法を用い、t1A とその他の t1 塩基との切断効率の対比較には、Tukey 検定を用いた。その結果、Siwi では t1A 塩基とそれ以外の塩基で優位な切断効率の差が見られた (a)。BmAgo3 では 標的 A3_1C を用いた場合の t1U と t1G の以外では優位な切断効率の差は見られなかった (b)。

前述したように、PIWI タンパク質はその性質上、ヒト Ago2 のように外からガイド RNA を取り込ませて切断アッセイをする系を確立できなかった。ここで、内在の piRNA を用いて標的 RNA 切断アッセイを行う場合に問題となるのは、PIWI タンパク質に結合する piRNA はその配列と長さの両方において非常に多様であることである。Siwi や BmAgo3 に結合する piRNA も例外ではなく、非常に多様であることが分かっており、類似配列を持つ piRNA が切断アッセイに与える影響を考慮しなければならない。piRNA が標的 RNA を切断するには標的 RNA が piRNA の 2 塩基目から 22 塩基目にかけての 21 塩基が完全に相補的でなければならないとされている⁸⁶。この結果を参考に、Siwi や BmAgo3 それぞれに結合する piRNA のうち、上の実験で用いたガイド piRNA と 21 塩基にわたり完全に一致し、標的 RNA を切断し得る piRNA を探した。その結果、以下の表に示すような piRNA の候補が見つかった。

S_1U ガイド piRNA の類似配列（標的 S_1U を用いた切断アッセイ）

順位-リード数	配列	切断様式
>1-87260 (S_1U ガイド pi RNA)	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	標的 RNA の切断
>5-19049	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	
>6-18610	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCC	
>26-7919	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	t1A が切れる
>76-4751	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	
>178-3124	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>342-2269	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	t1A が切れる
>1359-1054	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCC	t1A が切れる
>1446-1010	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCA	
>1630-933	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCC	
>2024-821	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCA	
>2250-771	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAU	
>2268-766	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCC	
>2311-757	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる
>3600-570	CUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	t1A が切れる
>5329-436	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	
>7477-339	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAU	
>9188-289	ACUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>12536-226	GUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>13958-206	AAUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	t1U が切れる
>14128-204	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCU	
>15833-186	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCA	
>17562-170	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCC	
>19105-158	CCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>19778-154	CUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	t1A が切れる
>23392-132	ACAGUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	
>25231-124	GUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる
>25366-123	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCCA	

S_1C ガイド piRNA の類似配列 (標的 S_1C を用いた切断アッセイ)

順位-リード数	配列	切断様式
>19-9573 (S_1C ガイド pi RNA)	CAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGU	標的 RNA の切断
>1357-1054	CAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAG	
>1489-989	CAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGUU	
>3554-573	CAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGUC	
>4143-520	ACAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGU	t1G が切れる
>5053-453	CAAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGC	
>23668-131	AAUCACCAUAGAAUUAACCCACUGAGU	

S_1U2 ガイド piRNA の類似配列 (標的 S_1U2 を用いた切断アッセイ)

順位-リード数	配列	切断様式
>2-28399 (S_1U2 ガイド pi RNA)	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACAC	
>16-10131	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACA	
>62-5263	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACACC	
>1782-891	ATGTTGCAATCCCACGACTGACGTACAC	t1A が切れる
>3284-606	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTAC	
>5725-413	ATGTTGCAATCCCACGACTGACGTACA	t1A が切れる
>7220-348	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACACA	
>9411-284	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACAT	
>17746-168	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACAA	
>18493-162	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACC	
>18680-161	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTA	
>19872-153	TGTTGCAATCCCACGACTGACGCACAC	
>24288-128	TGTTGCAATCCCACGACTGACGTACCC	

A3_1U ガイド piRNA の類似配列 (標的 A3_1U を用いた切断アッセイ)

順位-リード数	配列	切断様式
>2-101505 (A3_1U ガイド pi RNA)	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	標的 RNA の切断
>6-47103	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	
>17-29347	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>100-10137	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAU	
>543-3157	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	
>755-2472	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる
>1057-1891	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	
>1124-1813	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>1159-1775	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>1564-1414	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	
>2079-1118	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCA	
>2128-1095	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUA	
>2450-981	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCC	t1A が切れる
>2796-886	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUA	
>3210-790	ACGGUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	t1A が切れる
>4520-602	ACAGUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	t1A が切れる
>6147-464	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	t1A が切れる
>6354-449	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCA	
>6730-426	AAGGUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	t1A が切れる
>8050-361	CUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC	
>8848-331	AUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAU	t1A が切れる
>8969-327	CUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる
>9973-297	AACGUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	

>11793-253	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCCA	
>11808-253	GUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる
>13780-219	CUUCGGUAGUATAGUGGUCAGUAU	
>14487-209	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAU	
>16001-190	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUACC	
>16090-189	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCU	
>16317-186	AAGUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGU	t1A が切れる
>19678-156	UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAAA	
>20949-146	AAUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる
>23398-131	ACUUCGGUAGUATAGUGGUCAGUAUC	
>24413-126	CUCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC	t1A が切れる

A3_1C ガイド piRNA の類似配列 (標的 A3_1C を用いた切断アッセイ)

順位-リード数	配列	切断様式
>3-58635 (ガイド A3_1C piRNA)	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACC	標的 RNA の切断
>57-13886	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAC	
>275-5316	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACCC	
>499-3323	AUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACC	
>1014-1958	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAA	
>2462-977	ACAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACC	t1G が切れる
>3390-754	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACCU	
>4971-555	AUCCAUAAGAAAGAUGCACCACGCCGGA	t1G が切れる
>5125-541	AUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAC	
>5692-496	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACCA	
>6485-441	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAA	
>7894-367	AUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACCC	
>10312-288	ACAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAC	t1G が切れる
>10465-283	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACA	
>14343-210	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACCG	
>18393-166	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGA	
>19251-159	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAU	
>21994-140	AUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACCGA	
>22356-137	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAACU	
>24937-123	UCCAUAAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAC	t1G が切れる
>25024-122	CAUAGAAAGAUGCACCACGCCGGAAAC	

A3_1A ガイド piRNA の類似配列 (標的 A3_1A を用いた切断アッセイ)

順位-リード数	配列	切断様式
>1-115680 (ガイド A3_1A piRNA)	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGT	
>31-20480	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGG	
>373-4141	ACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGT	
>498-3324	AAACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGT	t1U が切れる
>594-2926	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTC	
>714-2563	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTTTC	
>898-2176	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTT	
>1071-1876	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAG	
>1631-1366	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGC	
>2800-885	AAACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGG	t1U が切れる
>2962-846	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTA	
>4339-624	CAACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGT	
>5073-546	ACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGG	
>7009-409	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGA	
>8417-346	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTTCC	

>8966-327	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGA	
>13598-221	AAAACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGT	t1U が切れる
>14073-214	ACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTC	
>14682-206	TACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGG	t1U が切れる
>17071-179	GACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGT	t1U が切れる
>17551-174	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTCA	
>17908-171	CAACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGG	t1U が切れる
>19315-159	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGA	
>19515-157	ACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTC	
>20805-148	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTAA	
>22561-136	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGC	
>25079-122	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGGTCC	
>25926-118	AACGGGAGATGTGGTGTTCGGGAGAT	

今回アッセイで用いたガイド piRNA と類似配列を持つ piRNA を厳密に見ていくと、いくつかの piRNA は確かに t1A の標的 RNA を優先的に切断し得る配列を持つ。しかしながら、注目したガイド piRNA と比較した場合、リード数が一桁以上少ないことや、類似配列を持つ piRNA が t1A を優先的に切断するように作用しない場合（標的 S_1C を用いた場合）であっても Siwi は t1A を優先的に切断していることが分かる。逆に、類似配列を持つ piRNA が t1A を優先的に切断するように作用し得る場合（標的 A3_1A、標的 A3_1U、標的 A3_1C を用いた場合）においても BmAgo3 は t1A の選択性に大差が見られないことが分かった。これらより、内在の PIWI タンパク質を用いた in vitro のアッセイ系でも、Siwi は t1A の標的 RNA を選択的に切断し、BmAgo3 はそのような選択性無く切断していることが再度裏付けられた。

(3) piRNA の網羅的な標的 RNA 解析

現在、共同研究先のマサチューセッツ州立大学、Phillip D. Zamore 博士の研究室の Visiting Student である Wei Wang 氏により、ショウジョウバエとカイコにおいて、ピンポンサイクルに関わる 2 種類の PIWI タンパク質の t1 塩基の認識の違いを、網羅的にバイオインフォマティクス解析して頂いている。未発表データであるため、詳細の紹介は省略するが、まず、ショウジョウバエやカイコにおいてピンポンサイクルに関与する二種類の PIWI タンパク質に結合する piRNA について、ピンポンサイクルのペアとなる組み合わせを網羅的に探した。そして、それぞれの piRNA ペアにおいて、一方の piRNA の一塩基目の向かい側の塩基を調べることにより、t1A の選択性を網羅的に解析した。その結果、ショウジョウバエにおいては Aub、カイコにおいては Siwi が t1A を選択的に認識している傾向が見られた。一方、ピンポンサイクルにおけるそれぞれの相手の PIWI タンパク質である AGO3、BmAgo3 には t1A の選択性が見られない。これは、in vivo においても片方の PIWI タンパク質が t1A を選択的に認識していることを示す結果であり、in vitro で著者が観察している結果と矛盾しない。

(4) Siwi、BmAgo3、ヒト Ago2 の MID-PIWI ドメインの発現

(1)~(3) により、ヒト Ago2 と Siwi には t1A の選択性があり、BmAgo3 には無いことが示された。この t1A の選択性の違いは、PIWI や AGO タンパク質自身の性質の違いによるのであろうか。それとも別の因子の影響によるものであろうか。

この疑問を確かめるため、まず、大腸菌を用いて GST-タグ付きのヒト Ago2、Siwi、BmAgo3 のリコンビナントタンパク質を発現した。当研究室の佐々木浩氏により、過去に全長の Siwi と BmAgo3 のリコンビナントタンパク質の発現は試みられていたが、発現量が低い上、発現したタンパク質の大半が不溶性画分に出ってしまうため精製が困難であった。そこで、pGEX-6P-2 ベクター (GE Healthcare) を用いて、ヒト Ago2、Siwi、BmAgo3 タンパク質ドメインのうち、ガイド RNA の結合と標的 RNA の切断に関与する MID-PIWI ドメインのみを GST タグ付きで発現した。いずれのタンパク質もやはり大半が不溶性画分に出ってしまうが、大量の大腸菌培養液からわずかに可溶性画分に出たタンパク質を、少量の glutathione により溶出することにより精製した。いくつかのコンストラクションを作成し、発現・精製効率を試行錯誤した結果、GST-ヒト Ago2 (458-859) (72 kDa)、GST-Siwi (539-899) (67 kDa)、GST-BmAgo3 (565-926) (68 kDa) を以下の切断アッセイに用いることになった (図 2-4-1)。精製したタンパク質は、その後カラム精製などは一切行わずに直接切断アッセイに用いた。GST-ヒト Ago2 (458-859) は 1.82 μ M、GST-Siwi (539-899) は 1.64 μ M、GST-BmAgo3 (565-926) は 5.67 μ M で精製できた。尚、MID-PIWI ドメイン部分のリコンビナントタンパク質でもガイド RNA を取り込むことができ、かつ標的 RNA が切断できるということは、ショウジョウバエの AGO タンパク質によってなされた過去の実験に基づく⁸⁷。

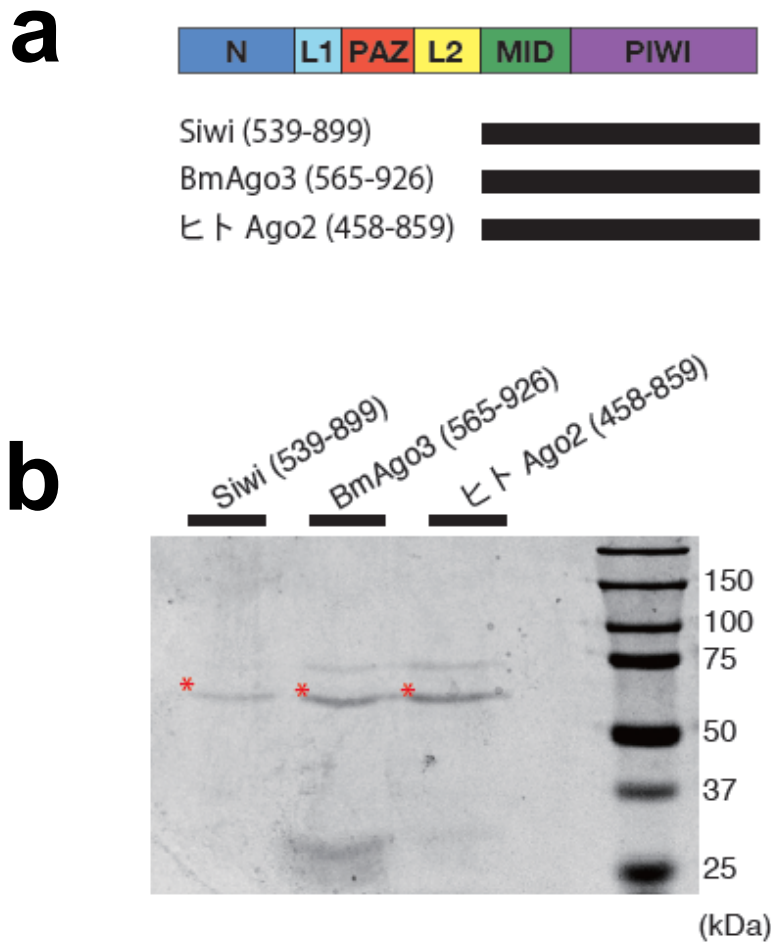


図 2-4-1. Siwi (539-899)、BmAgo3 (565-926) 、ヒト Ago2 (458-859) の発現

(a) それぞれのリコンビナントタンパク質の発現に用いた領域の模式図。

(b) 精製した GST-Siwi (539-899) (67 kDa)、GST-BmAgo3 (565-926) (68 kDa)、GST-ヒト Ago2 (458-859) (72 kDa) をウェスタンブロット法により確認した。

(5) リコンビナントの Siwi、BmAgo3、ヒト Ago2 は t1A の選択性が無い

当研究室における依田真由子博士や岩崎信太郎博士による先行研究や、過去の報告により、大腸菌で発現したリコンビナント Ago2 は、一本鎖 RNA は取り込むことができ、標的 RNA を切断できるが、二本鎖 RNA は取り込むことができず、標的 RNA も切断できないことが分かっている⁸⁸⁻⁹⁰。通常、細胞内で AGO タンパク質が二本鎖 RNA を取り込む場合は、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが必要であるのだが、これはシャペロンが ATP の加水分解エネルギーを利用して AGO タンパク質の構造変化を引き起こすことによって二本鎖 RNA を取り込む手助けをしていることによる、と考えられている⁹⁰。従って、シャペロンマシナリーの存在しないリコンビナントの AGO タンパク質は、二本鎖 RNA を取り込むことができない。また、当研究室における Pieter Bas Kwak 博士の研究により、AGO タンパク質の N ドメインは、二本鎖 RNA の末端に、ちょうど「くさび」を打ち込む様なかたちで作用することで、取り込んだ二本鎖 RNA を引きはがし、成熟 RISC の形成に寄与していることが示されている⁹¹。これらのことを踏まえ、今回 MID-PIWI ドメインのみを発現したリコンビナントタンパク質には、シャペロンマシナリーを加えず、一本鎖 RNA を取り込ませて標的 RNA を切断することにした。

以下の表に、リコンビナントタンパク質によるアッセイに用いたガイド RNA と標的 RNA の配列を示す。Siwi に結合する 1U piRNA や BmAgo3 に結合する 1U piRNA と同じ配列を持つ合成 RNA の 5'末端をリン酸化し、ガイド RNA として用いた。

標的 S_1U

S_1U ガイド RNA	5' UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUCCC 3'
S_1U_t1A	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTGGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAG <u>A</u> ACCUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U_t1U	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTGGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAG <u>U</u> ACCUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U_t1G	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTGGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAG <u>G</u> ACCUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
S_1U_t1C	5' GUCACAUCUCAUCUACCUCCTGGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUAUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAG <u>C</u> ACCUUUUAUA CAACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

標的 A3_1U

A3_1U ガイド RNA	5'UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC 3'
A3_1U_t1A	5'GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGACCUUUUUAUAC AACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1U_t1U	5'GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGUCUUUUUAUAC AACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1U_t1G	5'GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGGCUUUUUUAUAC AACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'
A3_1U_t1C	5'GUCACAUCUCAUCUACCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACA AGACAAUUGCACUGAUC AUGAACUCCUCUCUUCGAUACUGACCACUAUACUACCGAAGCCUUUUUAUAC AACCGUUCUACACUCAACGCGAUGUAAAUCUAUAGUGUCACCUAA 3'

まず、精製した GST-Siwi (539-899) を用いてこのリコンビナントタンパク質が実際にガイド RNA の配列と相補的な標的 RNA を認識し、正しい位置で切断できるかどうか確認した。GST-Siwi (539-899) と S_1U ガイド RNA を 25 °C で 30 分間インキュベートし、タンパク質にガイド RNA を取り込ませた。それを用いて、まず、t1 A の標的 RNA (S_1U_t1A) を切断したところ、時間経過に従って切断産物が増加する様子が観察できた。この切断産物は標的 RNA と GST-Siwi (539-899) のみ反応させた場合や、無関係な配列を持つガイド RNA を取り込ませた GST-Siwi (539-899) と反応させた場合には観察されなかった (図 2-5-1)。さらに、GST-Siwi (539-899) によって標的 S_1U を切断した時に見られた切断産物の長さは、(2) で内在の Siwi を用いて標的 S_1U の切断アッセイで見られた切断産物の長さと同じであった (図 2-5-1)。これらの結果より、MID-PIWI 部分のリコンビナントタンパク質は、結合したガイド RNA と相補的な配列を持つ標的 RNA を正しい切断位置で切断していることが確認できた。

続いて、精製した GST-ヒト Ago2 (458-859)、GST-Siwi (539-899)、GST-BmAgo3 (565-926) それぞれと、S_1U ガイド RNA や A3_1U ガイド RNA を 25 °C で 30 分間インキュベートし、タンパク質にガイド RNA を取り込ませた。それらを用いて t1 塩基が A、U、G、C である標的 RNA を切断した。その結果、(2) で Siwi は t1A の選択性が観察されたこととは対照的に、GST-Siwi (539-899) のリコンビナントタンパク質では t1A の選択性は観察されなかった。ヒト Ago2 も、(1) で内在のヒト Ago2 を用いて切断アッセイを行った際には t1A の選択性が観察されたのにも関わらず、GST-ヒト Ago2 (458-859) リコンビナントタンパク質を用いた場合は観察されなかった (図 2-5-2、図 2-5-3)。

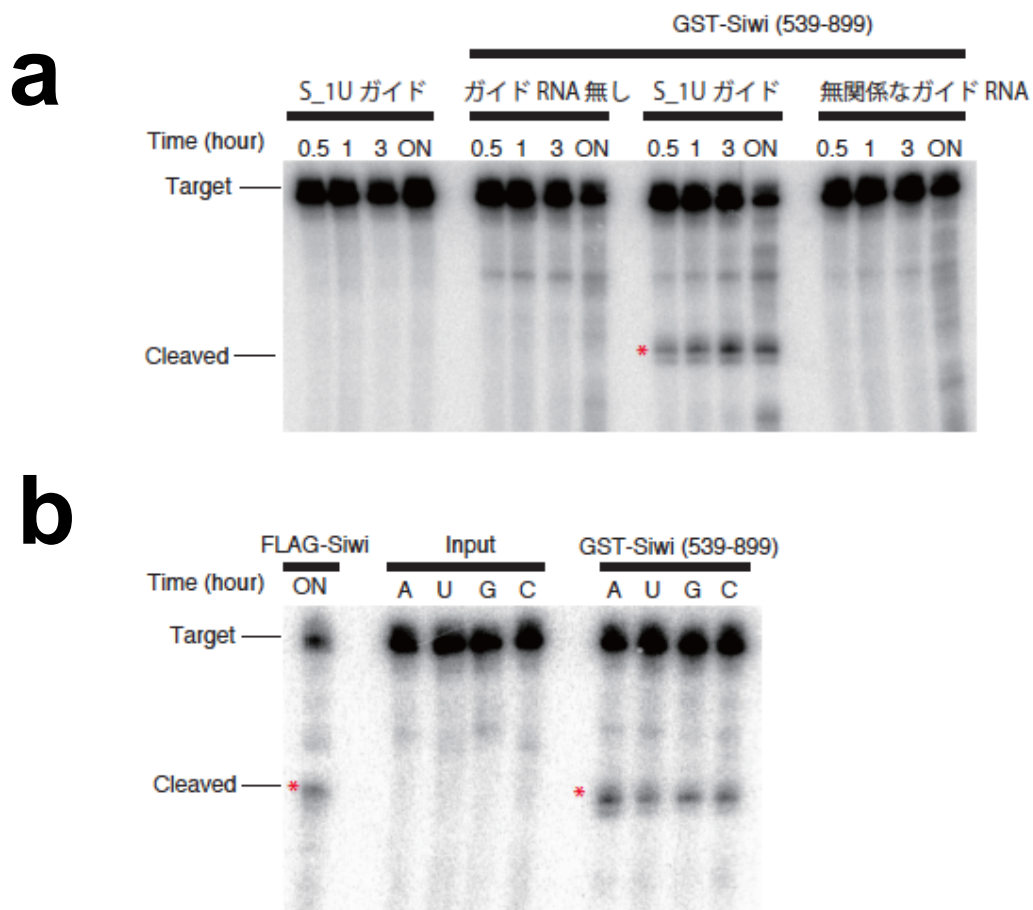


図 2-5-1. GST-Siwi (539-899) による標的 RNA 切断認識

(a) GST-Siwi (539-899) に、t1 A の標的 RNA (S_1U_t1A) を用いて切断アッセイを行った。S_1U ガイド RNA を取り込ませ多場合のみ時間経過に従って切断産物が増加する様子が観察できた。

(b) 左端が内在の Siwi を用いて行った切断アッセイであり、右端が GST-Siwi (539-899) を用いて行った切断アッセイである。ともに標的 S_1U を用いた。観察された切断産物の長さは同じであった。

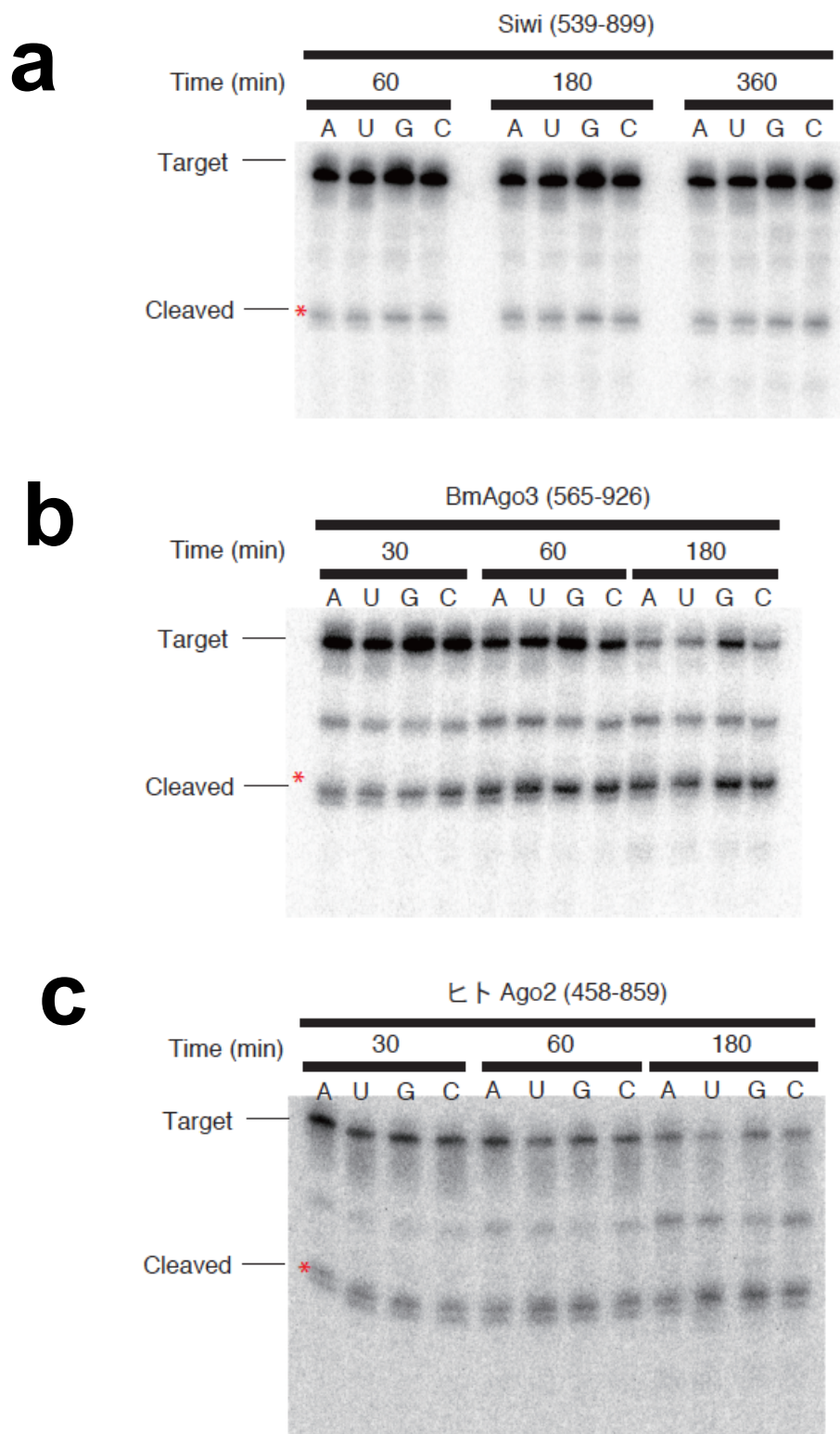


図 2-5-2. リコンビナントタンパク質による標的切断のゲル写真

(a) Siwi (539-899) による標的 S₁U の切断。

(b) BmAgo3 (565-926) による標的 S₁U の切断。

(c) ヒト Ago2 (458-859) による標的 A3₁U の切断。

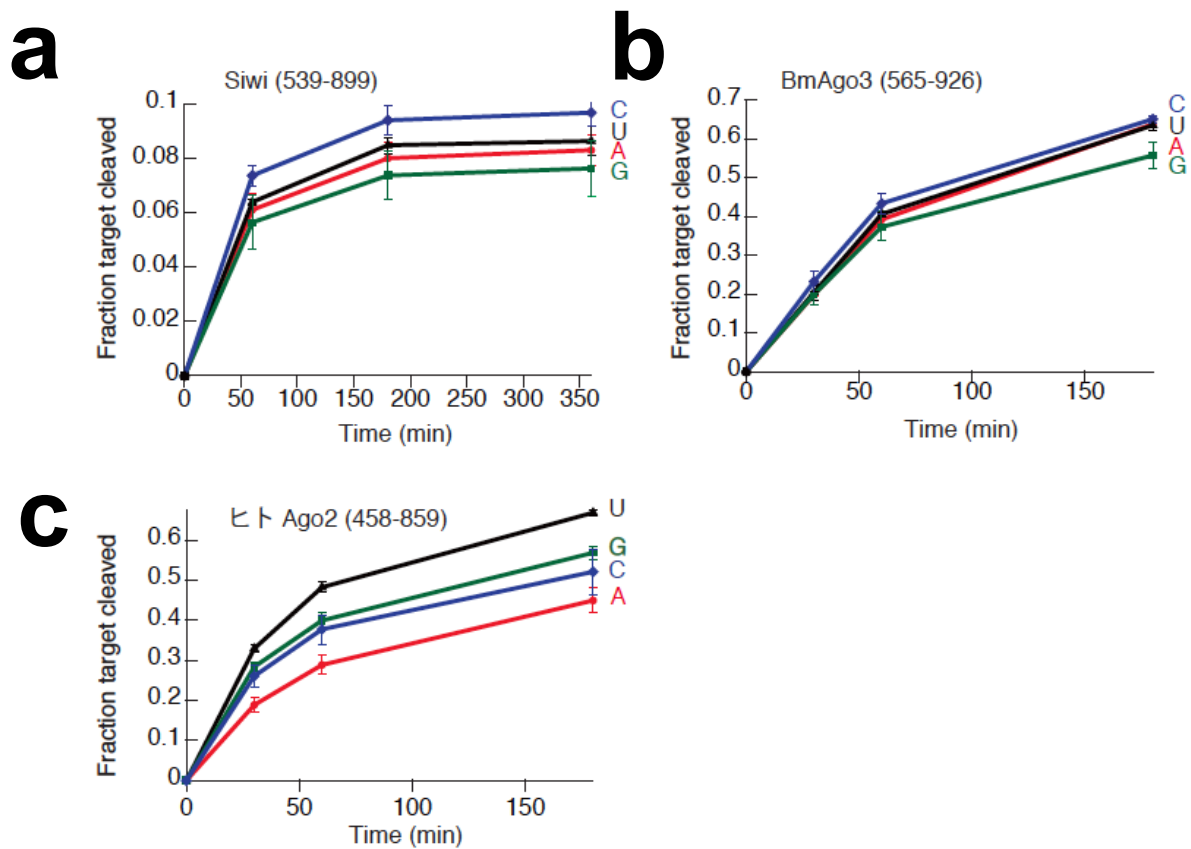


図 2-5-3. リコンビナントタンパク質による標的切断のグラフ

- (a) Siwi (539-899) による標的 S₁U の切断。
 (b) BmAgo3 (565-926) による標的 S₁U の切断。
 (c) ヒト Ago2 (458-859) による標的 A3₁U の切断。

(6) ヒト Ago2 の t1A の選択性にはライセート中の因子が関与する

ヒト Ago2 におけるここまでの結果をまとめると、HEK293T 細胞に一過的に過剰発現した FLAG-ヒト Ago2 を用いてライセート中で標的 RNA を切断すると、t1A の選択性が観察できた。しかしながらヒト Ago2 の MID-PIWI ドメインのリコンビナントタンパク質では t1A の選択性は観察されなかった。この違いは、用いたヒト Ago2 のドメインの違いに因るのではないかという仮定のもと、HEK293T 細胞に MID-PIWI ドメインのヒト Ago2 を過剰発現し、そこから作成したライセートを用いることで t1A の選択性が観察できるかどうか調べることにした。HEK293T 細胞に過剰発現する際に用いた MID-PIWI ドメイン領域は、リコンビナントタンパク質を発現する際に用いた MID-PIWI ドメイン領域と同一である。尚、ここでまずヒト Ago2 を用いて実験をすすめていくことにしたのは、図 2-2-5 に示されるように、Siwi では 8 時間にわたって標的 RNA とインキュベートしても非常に切断効率が悪いためである。

HEK293T 細胞に一過的に FLAG-ヒト Ago2 (458-859) を過剰発現し、ライセートを作成した。ライセート中には内在の全長ヒト Ago2 も発現しているため、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、塩濃度の高いウォッシュバッファー (0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1× lysis buffer) で 3 回洗うことによりできるだけ他の因子を除き、ヒト Ago2 (458-859) のみを濃縮した。その後、1× lysis buffer で 3 回洗った上で、FLAG-ヒト Ago2 (458-859) とガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を 37 °C で 30 分間インキュベートすることでガイド RNA を取り込ませた。さらにその後、lysis buffer で 3 回洗うことにより、FLAG-ヒト Ago2 (458-859) に取り込まれなかったガイド RNA を取り除いた。そして、標的 A3_1A を加えて切断アッセイを行った。その結果、t1A の選択性は見られなかった (図 2-6-1、図 2-6-2)。

また、比較のため、HEK293T 細胞に一過的に全長の FLAG-ヒト Ago2 を過剰発現し、ライセートを作成し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。そして FLAG-ヒト Ago2 (458-859) で行ったのと同様に、塩濃度の高いウォッシュバッファーと 1× lysis buffer で 3 回洗った上で、ガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を取り込ませ、RISC を形成させた。その後、lysis buffer で 3 回洗うことにより、ヒト Ago2 に取り込まれなかったガイド RNA を取り除き、標的 A3_1A を用いて切断アッセイを行った。その結果、やはり t1A の選択性は見られなかった (図 2-6-4 左)。すなわち、ライセート中で切断すると t1A の選択性が観察できたにも関わらず (図 2-1-2)、リコンビナントの MID-PIWI ドメイン部分のヒト Ago2、細胞に発現した MID-PIWI ドメイン部分のヒト Ago2、全長のヒト Ago2 のいずれも、t1A の選択性が見られなかった。

続いて、HEK293T細胞に一過的に全長のFLAG-ヒトAgo2を過剰発現し、ライセートを作成し、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降した。そしてFLAG-ヒトAgo2 (458-859)で行ったのと同様に、塩濃度の高いウォッシュバッファと1× lysis bufferで3回洗った上で、ガイドRNA (A3_1A_siRNAguide)を取り込ませ、RISCを形成させた。その後、1× lysis bufferで3回洗った後、再びヒトAgo2のライセートを加え戻してから標的RNA切断アッセイを行った。その結果、非常に驚くべきことに、t1Aの選択性が復活した(図2-6-3、図2-6-4)。

今度は、ガイドRNAを取り込ませる順番を変えた場合でも同様の結果が得られるかどうか実験した。全長のFLAG-ヒトAgo2を一過的に過剰発現したHEK293Tからライセートを作成し、ガイド二本鎖RNA (A3_1A_dsRNA)とインキュベートすることによりまずヒトAgo2にガイドRNAを取り込ませてRISCを形成させ、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降した。その後、塩濃度の高いバッファと1× lysis bufferで3回洗うことで、ライセート中の他の因子をできるだけ洗い流し、ヒトAgo2のみを濃縮し、標的A3_1Aを用いて切断アッセイを行った。その結果、やはりt1Aの選択性が見られなかった。続いて、免疫沈降後、塩濃度の高いバッファと1× lysis bufferで3回洗った後に再びライセートを加え戻してから標的RNA切断アッセイを行った結果、t1Aの選択性が復活した(図2-6-5、図2-6-6)。

続いて、t1塩基による切断効率の違いがライセート中の標的RNAの分解速度の違いによらないことを確認するため、標的A3と切断産物のライセート中での安定性の違いを比較した(図2-6-7)。標的A3はt1塩基に寄らず、15分間ライセート中でインキュベートすると、65~70%程度に分解されるという同等の安定性を示した。一方、ヒトAgo2に結合したガイドRNA (A3_1A_siRNAguide)により切断されてできる切断産物は、t1塩基によらず全て同じ配列を持ち、安定性が同等である。よって、図2-6-4と図2-6-6で観察できたt1塩基の選択性はヒトAgo2自身の標的RNAの選択性をあらわしていると考えられた。

図2-5-4と2-6-6より、lysis buffer中で標的RNAを切断した時よりも、ライセートを加え戻したときの方が切断効率が低いのは、ライセート中の因子が、RISCの標的RNAを認識・切断を妨害しているためである可能性と、切断産物がライセート中のヌクレアーゼにより分解されている可能性が考えられた。lysis buffer中で標的RNAを切断した場合にt1Aの選択性が観察されなかったのが、切断効率が良く、標的RNAの切断が飽和状態にあったためでは無かったことを確認するため、希釈したライセートを用いてアッセイを行った。HEK293T細胞に一過的に全長のFLAG-ヒトAgo2を過剰発現し、ライセートを作成し、そのライセートを1/60に希釈した上で抗FLAG

抗体を用いて免疫沈降した。塩濃度の高いウォッシュバッファーと 1× lysis buffer で 3 回洗った上で、ガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を取り込ませ、RISC を形成させた。その後、1× lysis buffer で 3 回洗うことにより、ヒト Ago2 に取り込まれなかったガイド RNA を取り除き、標的 A3_1A を用いて切断アッセイを行った。その結果、RISC 濃度が低い場合でも、やはり t1A の選択性は見られなかった (図 2-6-8)。

これらの結果を総合的に踏まえると、ヒト Ago2 単独にガイド一本鎖 RNA を取り込ませた場合でも、ライセート中のヒト Ago2 に二本鎖 RNA を取り込ませて RISC を形成させた後ヒト Ago2 だけを濃縮した場合でも、ヒト Ago2 単独では t1A の選択性は観察できなかった。しかしながら、標的 RNA を加える際にライセートも一緒に加え戻すと、t1A の選択性は復活した。以上より、t1A の選択性を生み出しているのはライセート中に存在する何らかの因子であることが強く示された。尚、今回用いたライセートは、HEK293T 細胞をダウンスホモジナイザーで破碎後、17,000 × g で 20 分間遠心した際の上清であるので、細胞質中の因子が含まれている。よって、t1A の選択性を生み出す因子も細胞質中に存在すると考えられた。

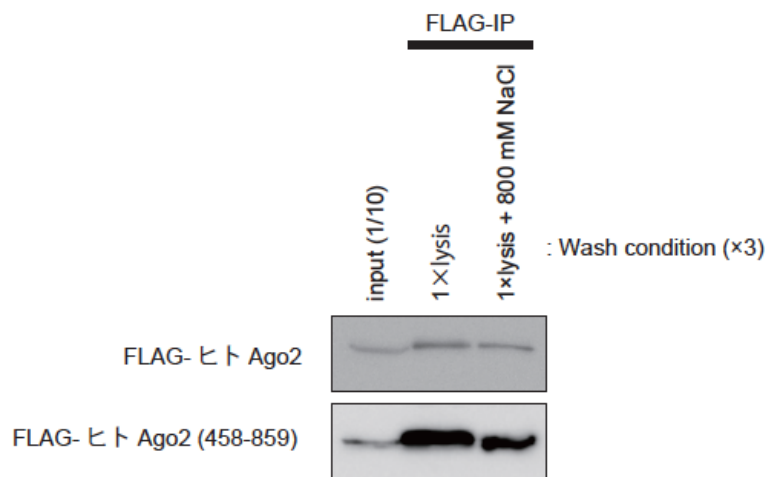


図 2-6-1. FLAG-ヒト Ago2 と FLAG-ヒト Ago2 (458-859) の発現

抗 FLAG 抗体を用いて IP を行う際の wash buffer に含まれる塩濃度 (Na^+) を 800mM まで上げても、beads に結合するタンパク質は減少しなかった。

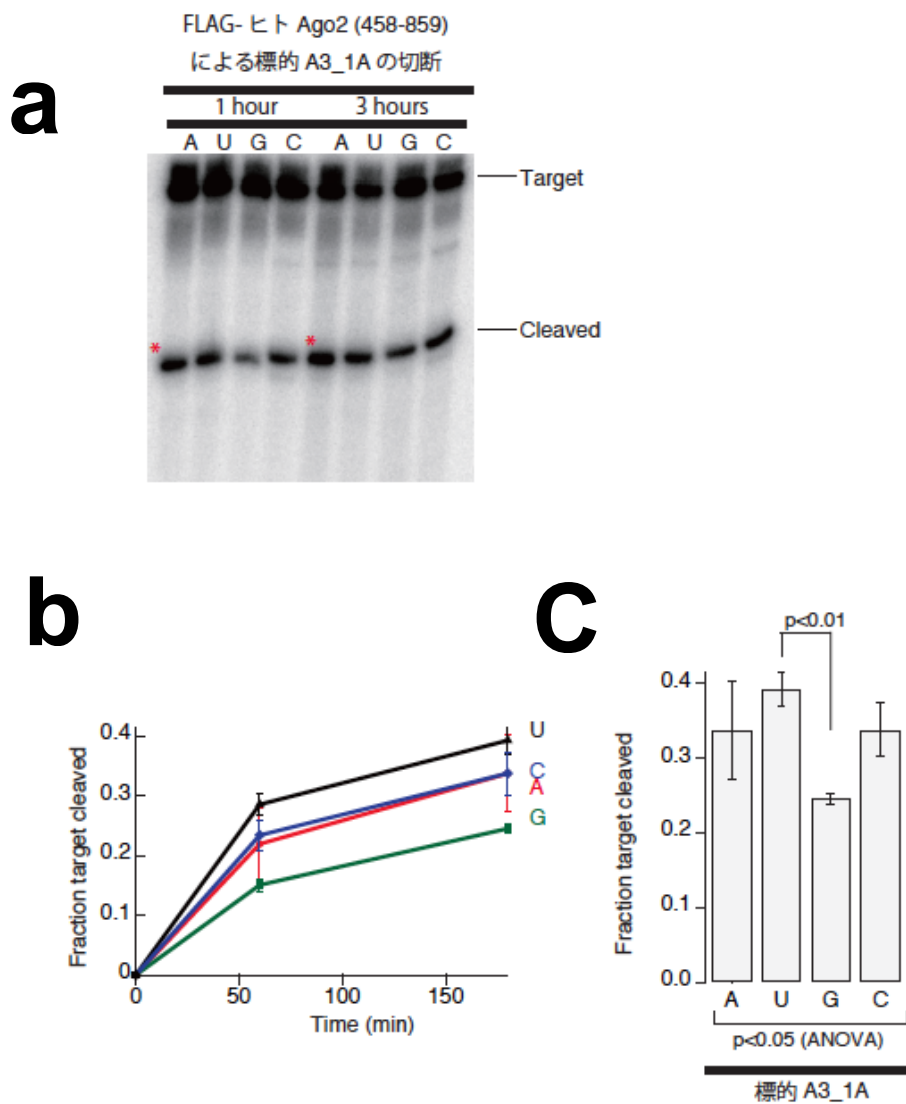


図 2-6-2. FLAG-ヒト Ago2 (458-859) による標的切断アッセイ

(a) 一過的に FLAG-ヒト Ago2 (458-859) を過剰発現した HEK293T 細胞からライセートを作成し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。それにガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を取り込ませ、標的 A3_1A を用いて切断アッセイを行った。

(b) (a) をグラフ化した。「Fraction target cleaved」はこれまでと同様に算出した。

(c) 切断後 3 時間後の切断効率をグラフ化し、統計処理を行った。その結果、t1A の優位な選択性は見られなかった。

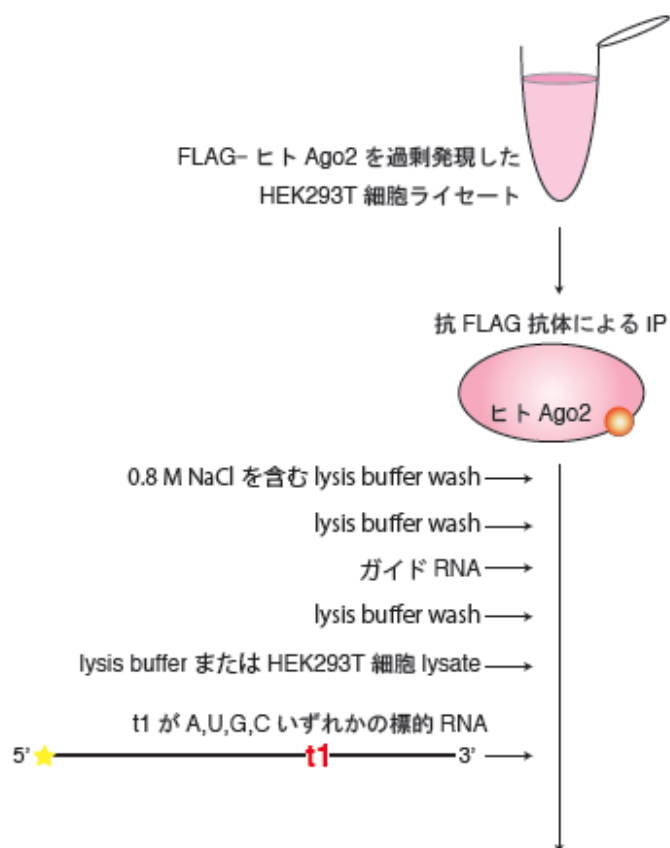


図 2-6-3. ヒト Ago2 による、免疫沈降後一本鎖 RNA を取り込ませる切断アッセイの模式図

FLAG-ヒト Ago2 を過剰発現した HEK293T 細胞より作成したライセートを、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。その後、塩濃度の高いウォッシュバッファーで洗った上で、ガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を取り込ませ、RISC を形成させた。Lysis buffer で 3 回洗うことで取り込まれなかったガイド RNA を取り除き、標的 A3_1A を加えて切断アッセイを行った。ライセートを加え戻す場合は標的 RNA を入れる際に同時に加えた。

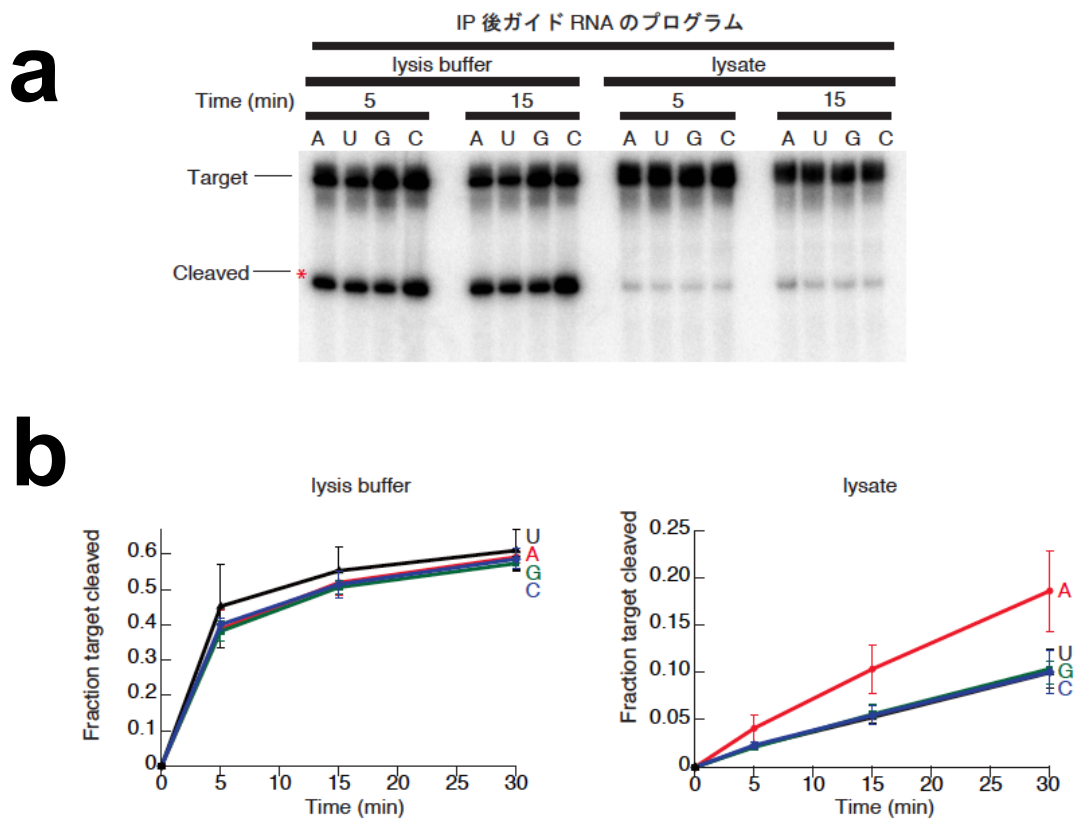


図 2-6-4. ヒト Ago2 による、免疫沈降後一本鎖 RNA を取り込ませる切断アッセイ

(a) 図 2-6-3 に示すように標的 A3_1A を用いて切断アッセイを行った。Lysis buffer 中で切断アッセイを行った結果 t1A の選択性は見られなかった。しかしながら、標的 RNA を加える際に、ライセートを加え戻すと t1A の選択性が復活した。

(b) (a) の結果をグラフ化した。ライセートを加え戻した場合のみ、t1A の選択性が復活した。

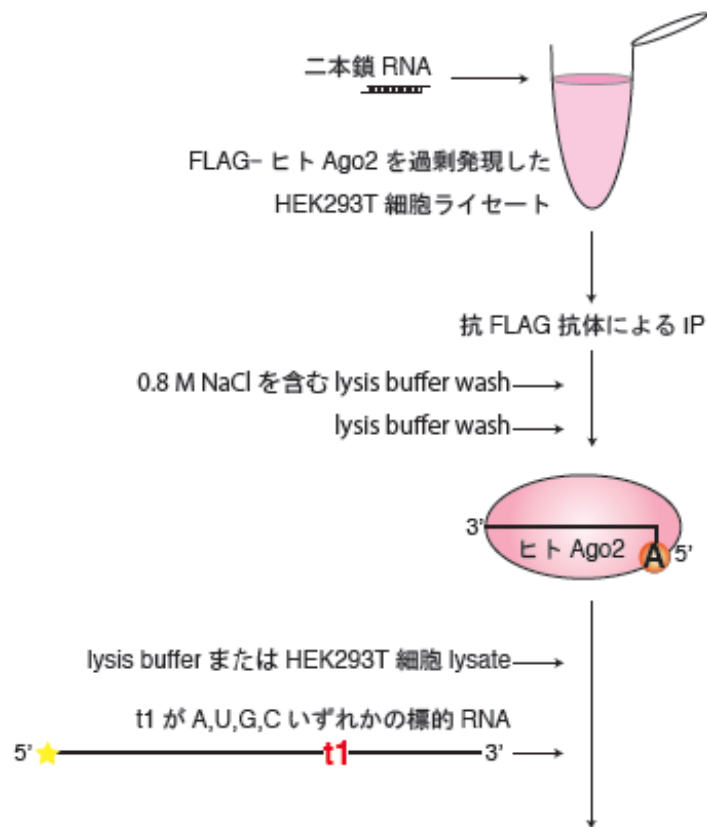


図 2-6-5. RISC 形成後、免疫沈降したヒト Ago2 による切断アッセイ

ガイド二本鎖 RNA (A3_1A_dsRNA) とヒト Ago2 をインキュベートし、RISC を形成させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。その後、塩濃度の高いバッファーで洗い、標的 A3_1A を用いて切断アッセイを行った。ライセートを加え戻す場合は標的 RNA を入れる際に同時に加えた。

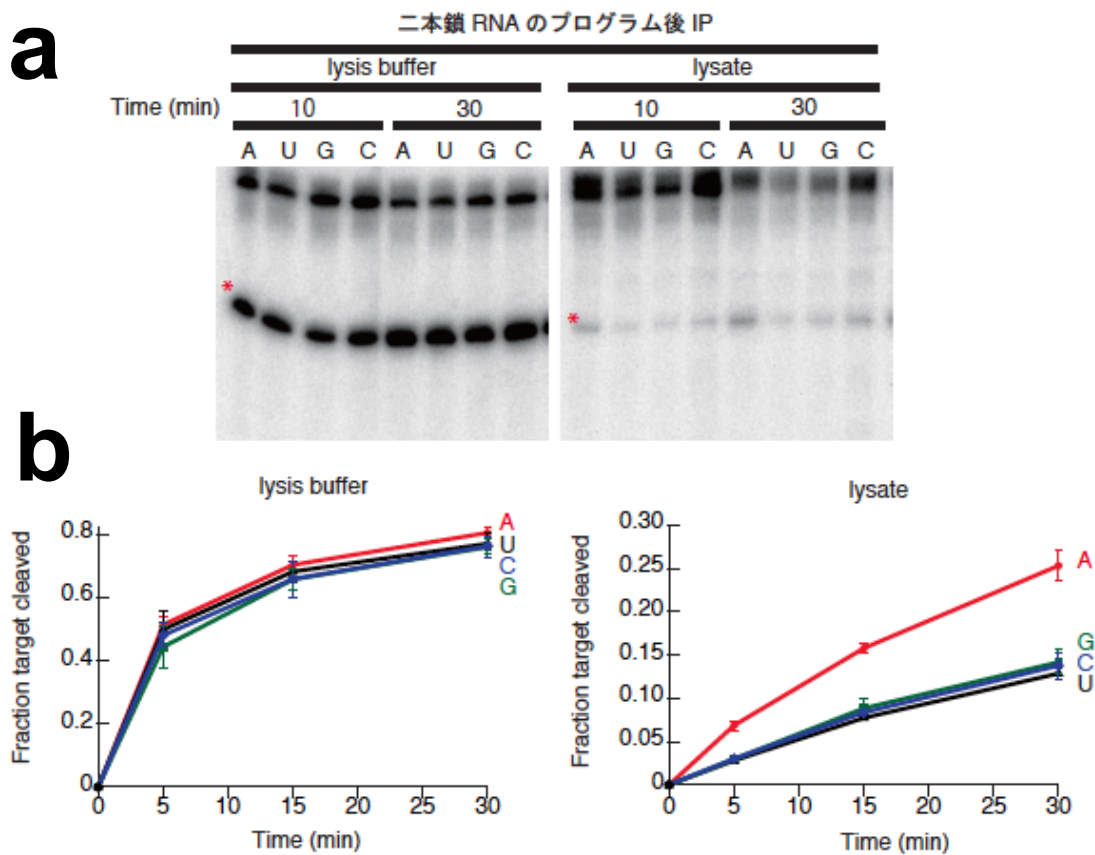


図 2-6-6 RISC 形成後、免疫沈降したヒト Ago2 による切断アッセイ

(a) 図 2-6-5 に示すように、HEK293T ライセートにガイド二本鎖 RNA (A3_1A_dsRNA) とヒト Ago2 をインキュベートし、RISC を形成させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。その後、塩濃度の高いバッファーで洗い、標的 A3_1A を用いて切断アッセイを行った。

(b) (a) の結果をグラフ化した。ライセートを加え戻した場合のみ、t1A の選択性が復活した。

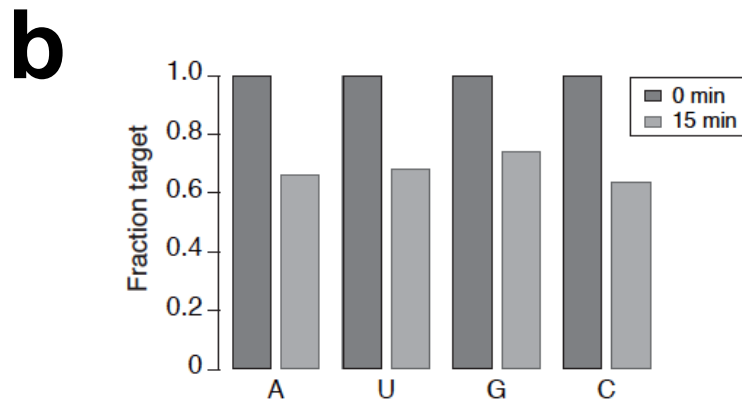
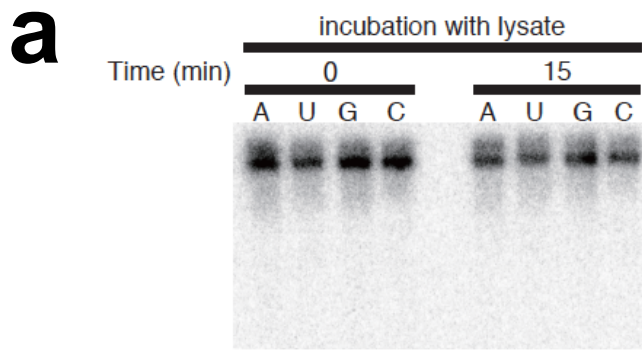


図 2-6-7. t1 塩基と標的 RNA の安定性

(a) 標的 A3_1A、A3_1U、A3_1G、A3_1C のライセート中での分解を示したゲル写真。
 (b) 0 分後を 1 として、15 分後の標的 RNA の割合をグラフ化したもの。

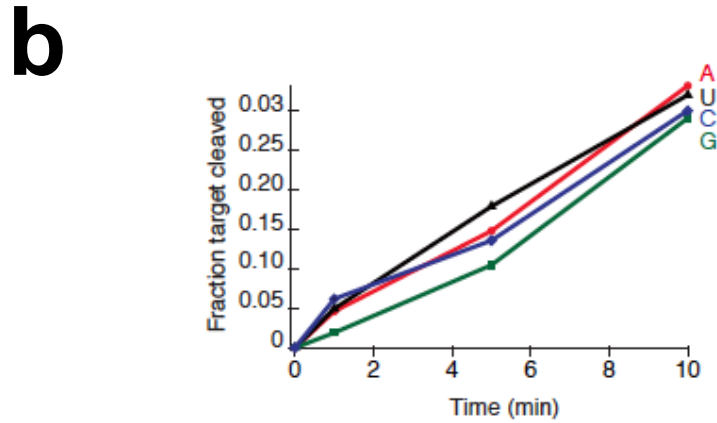
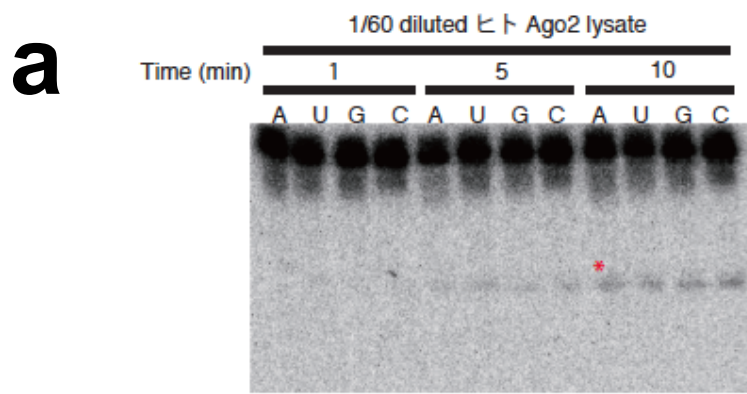


図 2-6-8. 希釈したヒト Ago2 を用いた切断アッセイ

(a) HEK293T 細胞に一過的に全長の FLAG-ヒト Ago2 を過剰発現し、ライセートを作成し、そのライセートを 1/60 に希釈した上で抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。塩濃度の高いウォッシュバッファーで洗った上で、ガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を取り込ませ、RISC を形成させた。その後、lysis buffer で 3 回洗うことにより、ヒト Ago2 に取り込まれなかったガイド RNA を取り除き、標的 A3_1A を用いて lysis buffer 中で切断アッセイを行った。

(b) (a)をグラフ化したもの。t1A の選択性は観察されなかった。

(7) t1A の選択性にはライセート中のタンパク因子が関与する

続いて、t1A の選択性に関与するライセート中の因子がタンパク質であるか、あるいはそれ以外の因子（核酸、無機化合物など）であるかどうか調べた。まず、FLAG-ヒト Ago2 を一過的に過剰発現した HEK293T 細胞より作成したライセートと、ガイド二本鎖 RNA をインキュベートすることにより RISC を形成させた後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、高い塩濃度のバッファーと 1× lysis buffer で洗った。標的 RNA を加える際に、ライセートの代わりに、95 °C で 5 分間加熱したライセートあるいはフェノール・クロロホルム沈殿を行ったライセートの水層を加え戻した。その結果、t1A の選択性は復活しなかった。フェノールは強力なタンパク質変成作用を持つため、ライセートにフェノール・クロロホルム沈殿を行うと、核酸や無機化合物などは水層、タンパク質はフェノール層にトラップされることとなり、除タンパク質された水溶液が得られることになる。

一方、加熱したライセートを加え戻した場合は、わずかに t1A の選択性が見られた。好熱菌に由来する特殊なタンパク質を除くと、タンパク質は一般的に 100 °C 以下で変性する。しかしながら、ペプチドなどのような小さなタンパク質や折りたたみがタイトな一部のタンパク質は熱に耐性があることが知られている。これにより、t1A の選択性を生み出す因子は、比較的熱に耐性のあるタンパク質であると想定できた（図 2-7-1）。

では、t1A の選択性を生み出すタンパク質因子は、いったいどのようなタンパク質なのであろうか。予め AGO タンパク質と相互作用があることが知られているタンパク質因子の代表として、シャペロンに注目し、シャペロンが t1A の選択性を生み出す因子であるかどうか調べた。シャペロンとは、前述したように、多くのタンパク質の折りたたみや、構造変化を促すことができる一群のタンパク質である。有名なものに Hsp60、Hsp70、Hsp90、Hsp100 ファミリータンパク質がある。これらはすべて ATP 依存的に、結合するタンパク質の折りたたみや、構造変化を促すことができる。当研究室における、岩崎信太郎博士と依田真由子博士の先行研究によって、ショウジョウバエおよびヒトの Ago2 への小分子 RNA 二本鎖の積み込みに Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが必要であることが明らかになった⁹⁰。Hsc70 とは、Hsp70 の恒常的発現ホモログである。Hsc70 と Hsp90 は、様々なコシャペロンを含む「マシナリー」として共同してはたらくことにより、AGO タンパク質の構造変化を促すことで、小分子 RNA 二本鎖と結合できる状態にしていると考えられており、Hsc70 または Hsp90 のいずれかが欠けるとその機能を発揮できない。一方、標的 RNA の切断や、切断された標的 RNA の乖離には Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーは必

要ないということが明らかになっている。

今回、Hsp90 の特異的阻害剤として良く知られる、ゲルダナマイシンの誘導体である 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) を用いた。17-AAG は Hsp90 がもつ ATPase に結合し、ATP と競合阻害することが知られている⁹²。Hsc70 の阻害剤としては、2-phenylethynesulfonamide (PES) を用いた。近年の報告により PES はクライアントタンパク質と Hsp70 の結合を阻害することが報告されている。PES は Hsp70 にのみ作用し Hsc70 には作用しないことが示唆されていたが、岩崎信太郎博士の先行研究により、Hsc70 にも作用することが示されていた⁹³。

FLAG-ヒト Ago2 を一過的に過剰発現した HEK293T 細胞から作成したライセートとガイド二本鎖 RNA をインキュベートすることにより RISC を形成させた後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。そして、高い塩濃度のバッファーと 1× lysis buffer で洗い、標的 RNA と共にライセートを加え戻す際に、17-AAG あるいは PES を同時に加え、t1A の選択性の復活が阻害されるかどうか調べた。その結果、17-AAG を加えた場合も PES を加えた場合も、t1A の選択性は復活した(図 2-7-2)。PES を加えた際に、t1A の復活がわずかに緩やかに見えるのは、PES がそもそも Hsp70 (Hsc70) のみに作用するだけでなく、様々な細胞シグナリング経路に影響を与え、コシャペロンやその他のタンパク質との相互作用にも影響を及ぼすことが示されていることと関係すると考えられる。しかしながら、現段階では Hsc70 の関与は完全に否定できないため、更なる解析が必要である。例えば、私の確立したアッセイ系を用いれば、系の中にリコンビナント Hsc70 を加えることにより、Hsc70 の関与をよりはっきりと解析できると考える。

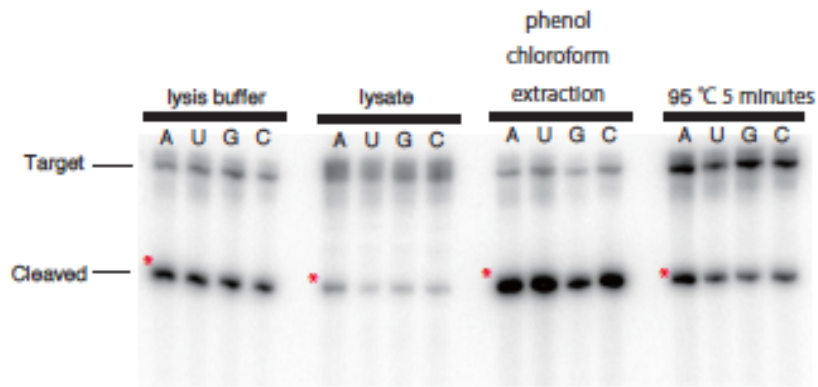
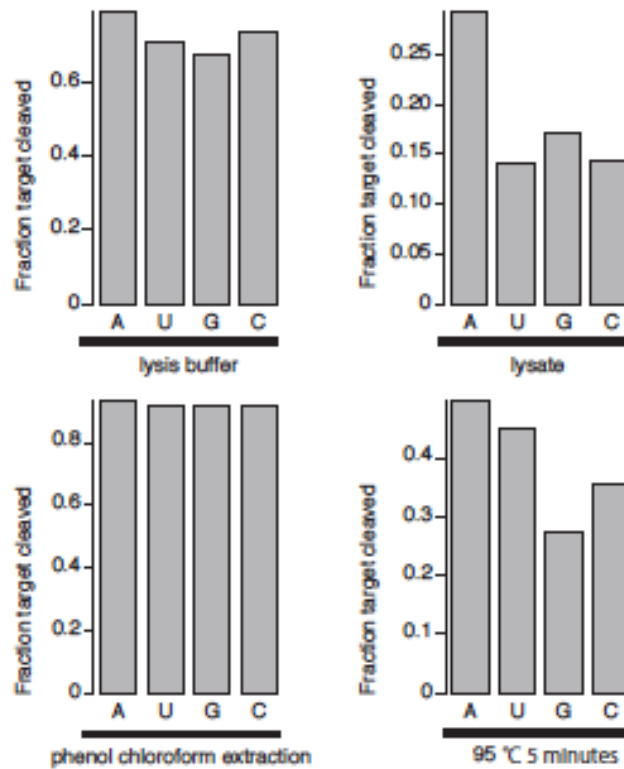
a**b**

図 2-7-1. フェノール・クロロホルム沈殿、熱処理したライセートによるアッセイ

(a) ライセートの代わりに、フェノール・クロロホルム沈殿を行ったライセートの水層、あるいは 95 °C で 5 分間加熱したライセートを加え戻した。標的 A3_1A を使用。

(b) (a) をグラフ化したもの。独立した二回の実験において同様の実験結果が得られた。

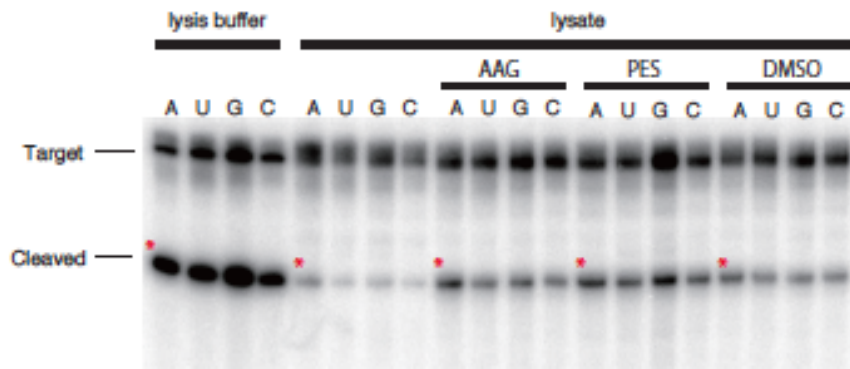
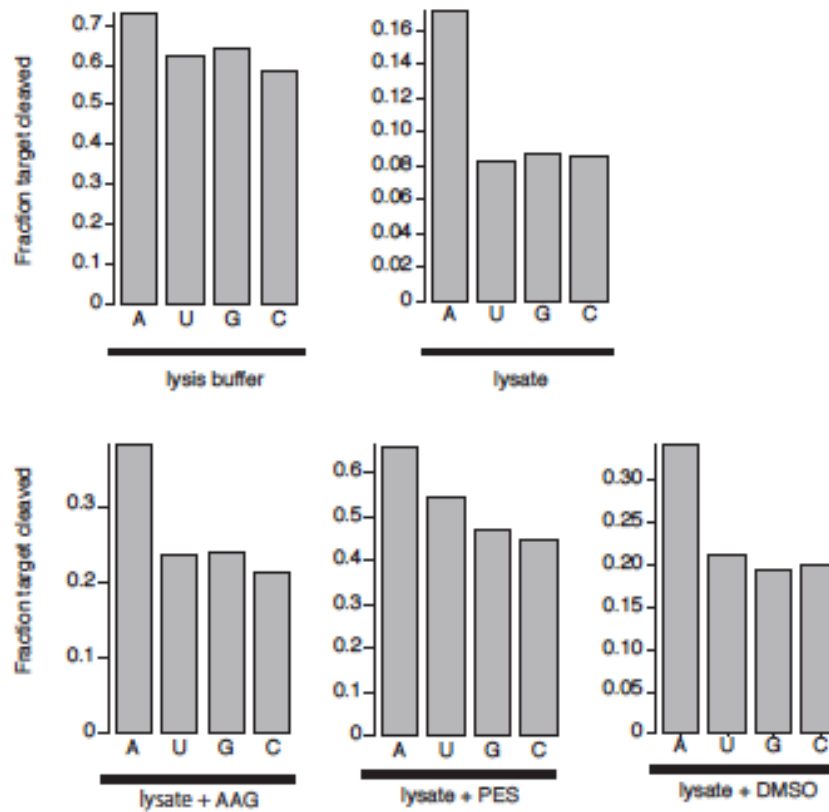
a**b**

図 2-7-2. シャペロン阻害剤を加えたライセートによるアッセイ

(a) ライセートを加え戻す際に、17-AAG (1 mM) あるいは PES (1 mM) を同時に加え、t1A の選択性の復活が阻害されるかどうか調べた。標的 A3_1A を使用。

(b) (a)をグラフ化したもの。独立した二回の実験において同様の実験結果が得られた。

(8) 希釈したライセートを用いた標的切断アッセイ

t1A を生み出す因子の同定を見据えた場合、古典的なカラムクロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィー等を用いてライセート中のタンパク質を分画し、それぞれの画分に t1A の選択性を生み出す因子が存在するか検討し、MS 解析等を用いて同定して行くこととなる。その場合を想定し、ライセートをどの程度まで希釈しても t1A を生み出す因子の影響を観察できるかどうか調べた。これまでと同様に、HEK293T 細胞ライセートに二本鎖 RNA を取り込ませ、RISC を形成させた後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、塩濃度の高いバッファーで洗った。入れ戻すライセートを、 $1\times$ lysis buffer で 1/4、1/16、1/64、1/256、1/1024 と希釈していった結果、1/16 までの希釈では t1A の選択性が観察できた。

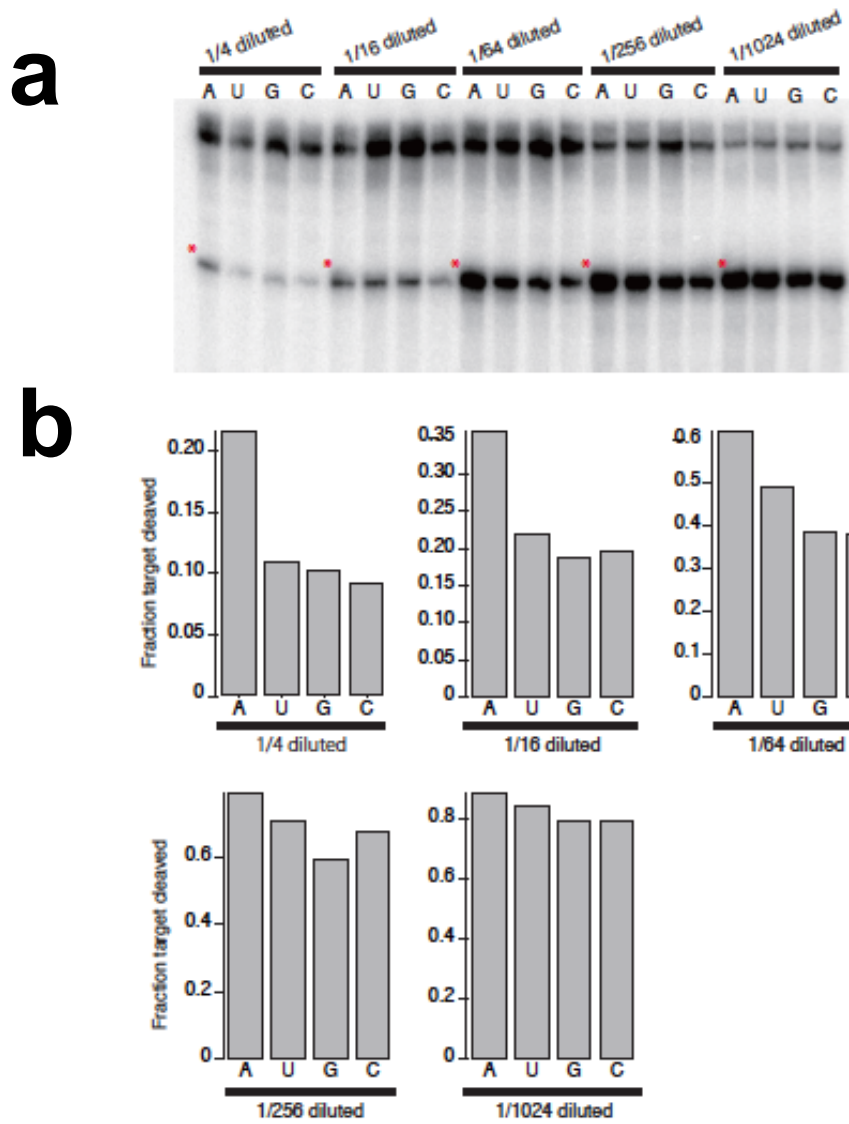


図 2-8-1. 希釈したライセートによるアッセイ

(a) HEK293T 細胞ライセートを加え戻す際に、それぞれ $1 \times$ lysis buffer で 1/4、1/16、1/64、1/256、1/1024 と希釈たものを加え戻した。標的 A3_1A を使用。

(b) (a) をグラフ化したもの。独立した二回の実験において同様の実験結果が得られた。

(9) ウォッシュバッファの塩濃度の検討

t1A を生み出す因子の同定を目的とし、ライセート中のタンパク質を分画する別の方法として、抗 FLAG 抗体による FLAG-ヒト Ago2 の免疫沈降後の wash 条件を検討した。すなわち、t1A を生み出す因子は、どの程度の塩濃度であればヒト Ago2 と相互作用を持つことができるかどうか調べることで、wash 液中に適切に溶出できる。これまでと同様に、HEK293T 細胞ライセートに二本鎖 RNA を取り込ませ、RISC を形成させた後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、通常の lysis buffer、または 0.2 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1× lysis buffer、または 0.4 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer、または 0.6 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer、または 0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer で 3 回洗い、さらに 1× lysis buffer で 3 回洗った後、標的 RNA とインキュベートし、切断効率を比較した。その結果、0.2 M NaCl 付近を境に、t1A の選択性が観察できなくなった。尚、1× lysis buffer で 3 回洗うだけでも、ライセート中で標的を切断するより t1A の選択性は緩やかであった。Siwi の場合は、免疫沈降後 1× lysis buffer で 3 回洗ってから標的を切断しても t1A の選択性が明らかに観察されたことと比較すると、多少、タンパク質により t1A を生み出す因子との相互作用の差異がある可能性が想定された。

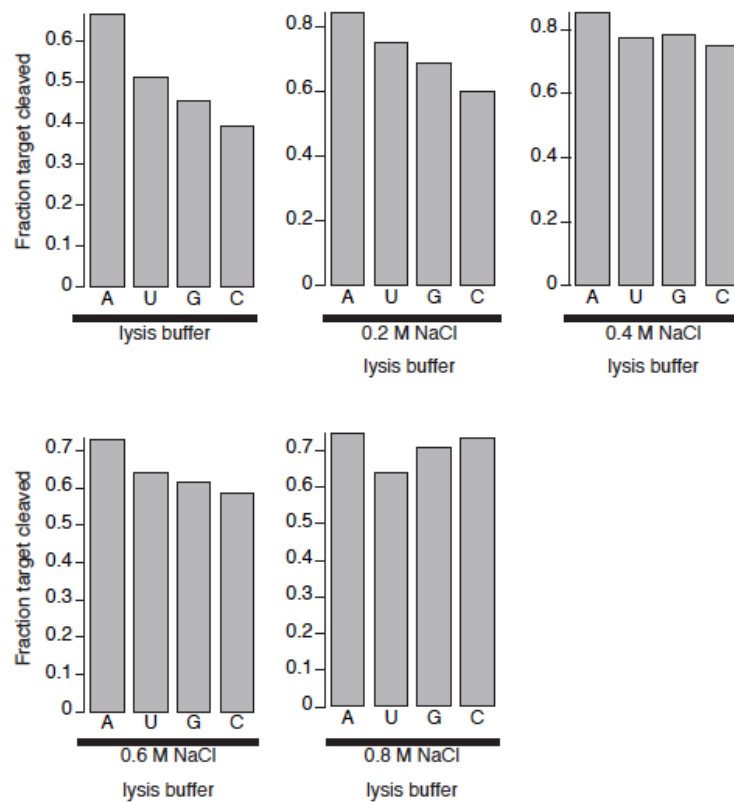


図 2-9-1. ウォッシュバッファの塩濃度の検討

抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し多後の wash に用いる beffer を、通常の lysis buffer、または 0.2 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer、または 0.4 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer、または 0.6 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer、または 0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 1× lysis buffer と変えた。30 分後の切断の様子をグラフ化したものである。標的 A3_1A を使用。独立した二回の実験において同様の実験結果が得られた。

(10) ゲルろ過クロマトグラフィーによる t1A を生み出す因子の分画

続いて、t1A の選択性を生み出す因子を同定するための第一段階として、タンパク質を分画する古典的手法の一つであり、大きい違いにより分子を分離することができるゲルろ過クロマトグラフィーを用いてタンパク質の精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィー用担体としては、当研究室で使用されている Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いた。

まず、これまでの実験で用いたのと同様の方法で作成した HEK293T 細胞ライセートを分画に用いた。すなわち、用いた HEK293T 細胞ライセートは、回収した HEK293T 細胞の重さに対して 2 倍量の 1x lysis buffer (1x Protease Inhibitor Cocktail、1 mM DTT を含む) を加え、ダウンスホモジナイザーを用いて 4 °C で破砕した後 17,000 x g、4 °C、20 分の遠心分離を行った上清である。図 2-10-1 に示すようにタンパク質が溶出されたと思われる画分を A5-A8、A9-A12、B1-B4 の大きく三つのグループにまとめ、いずれの画分に活性があるのか解析した。しかしながら、図 2-10-2 に示すように、A5-A8、A9-A12、B1-B4 のいずれにおいても t1A の選択性は観察されず lysis buffer 中で切断した際と同様の結果を示した。そしてその原因はライセートが希釈され過ぎたことにあると考えられた。

そこで今度は、ライセートを作成する際に、回収した HEK293T 細胞の重さに対して 1 倍量の 1x lysis buffer (1x Protease Inhibitor Cocktail、1 mM DTT を含む) を用いることで、通常より濃い HEK293T 細胞ライセートを作成し、それらを用いて同様の分画を行った。図 2-10-3 に示すように、前回と同様の溶出パターンを示したので、やはり前回と同様にタンパク質が溶出されたと思われる画分を A5-A8、A9-A12、B1-B4 の大きく三つのグループにまとめ、いずれの画分に活性があるのか解析した。二回の独立したアッセイを繰り返したが、図 2-10-4 と図 2-10-5 に示すように、A5-A8 と A9-A12 の両方において t1A の選択性が観察され、A5-A12 のいずれの画分に t1A の選択性が生み出す因子が存在するか断定するまで至らなかった。その要因としては、今回用いたゲルろ過クロマトグラフィー用担体や条件による分画では、t1A を生み出す因子を適切に分離できず、いくつかの画分にまたがって溶出してしまったためだと考えられた。しかしながら、少なくとも B1-B4 ではなく A5-A12 の範囲に t1A を生み出す因子が存在する可能性が示唆できたので、きちんと条件検討を行うことによって、分画の精度を上げられる可能性があると考えられる。よって、今後はゲルろ過クロマトグラフィーだけでなく、電荷の違いを利用するイオン交換クロマトグラフィー、疎水性の違いを利用する疎水クロマトグラフィー、互いの親和性の違いを利用す

るアフィニティークロマトグラフィーなどの様々な方法と、それに用いるカラムや条件を検討し、タンパク質を分画していくことで、適切にタンパク質を精製していくべきであると考え。

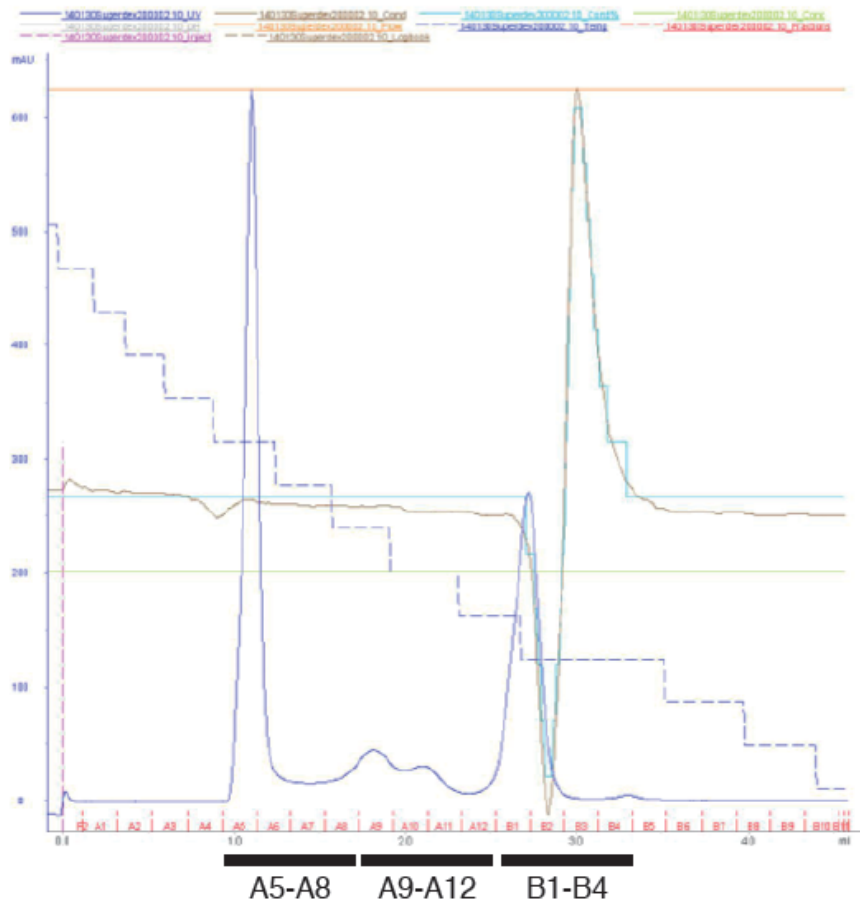


図 2-10-1. ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターン①
A5-B4 の画分にタンパク質が溶出する様子が観察された。

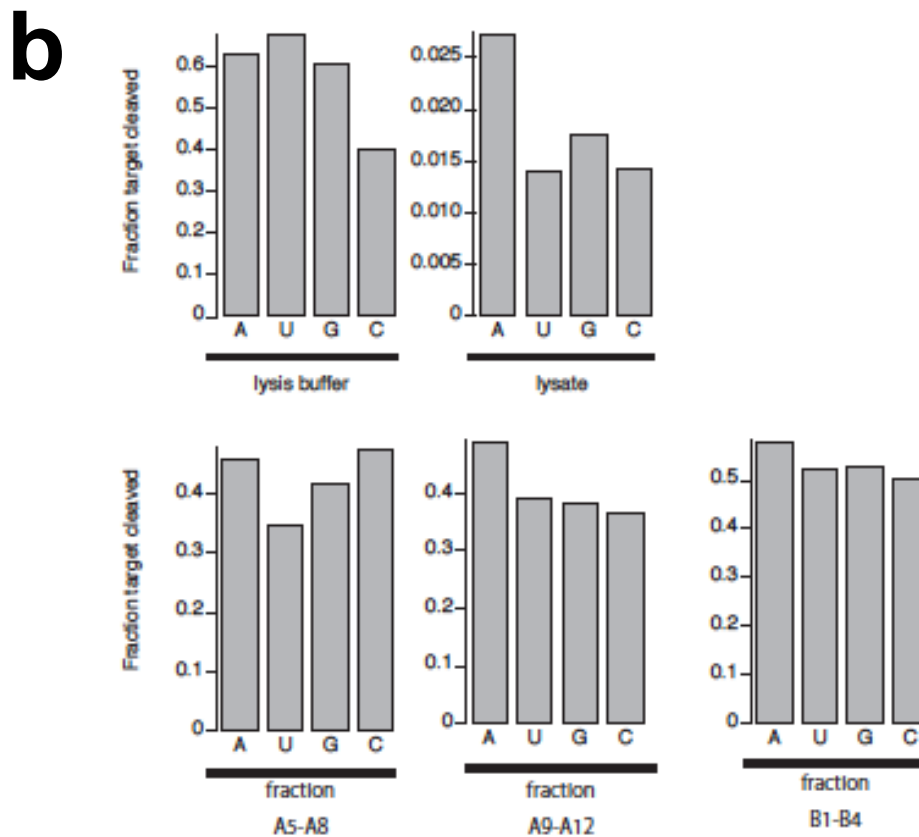
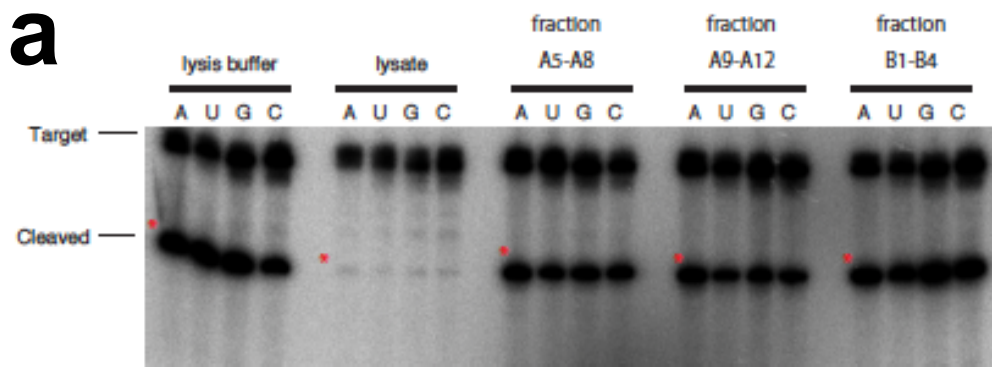


図 2-10-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画サンプルを用いたアッセイ①

(a)、(b)に示すように、分画したサンプルを用いた切断アッセイでは、lysate buffer 中で切断アッセイを行ったときと同様の切断効率を示した。これは、分画により、ライセートが希釈され過ぎたことによると考えられた。尚、独立した二回の切断アッセイで同様の結果を示した。

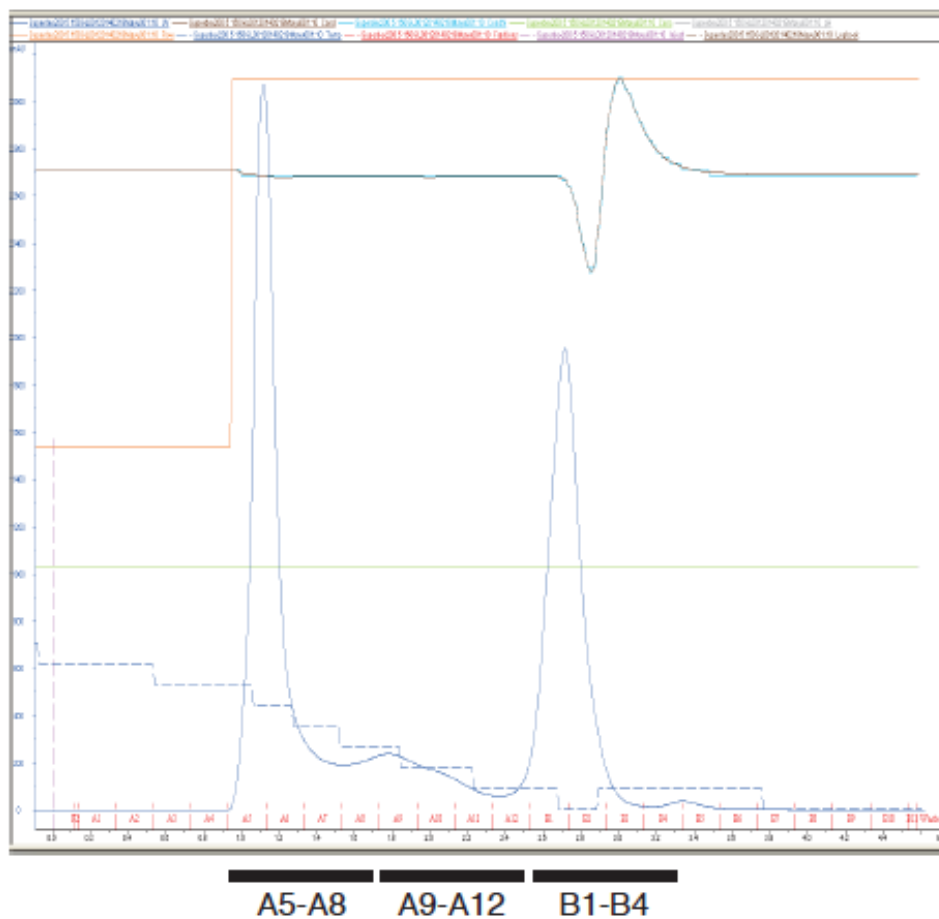


図 2-10-3. ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターン②

濃い HEK293T 細胞ライセートを用いて分隠した場合も、図 2-10-1 と同様に、A5-B4 の画分にタンパク質が溶出する様子が観察された。

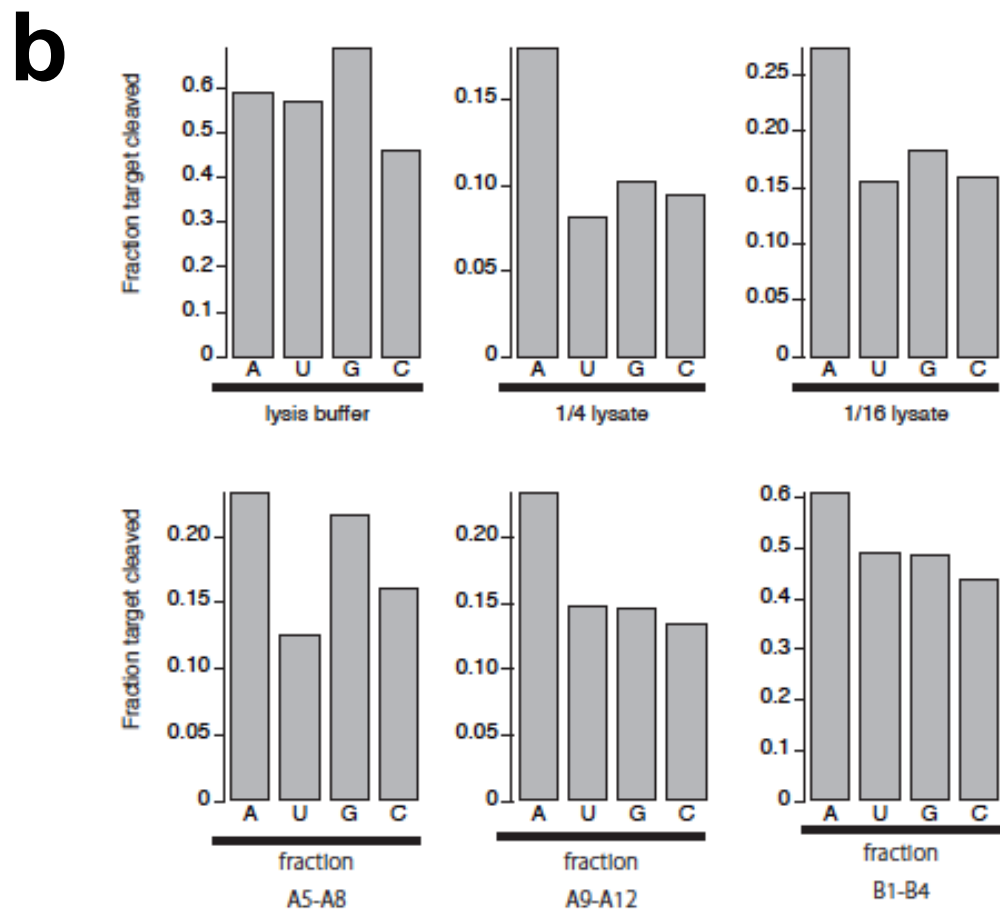
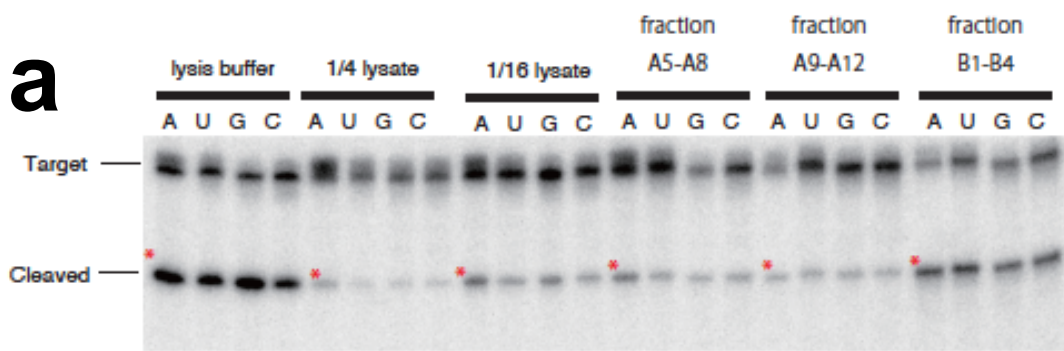


図 2-10-4. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画サンプルを用いたアッセイ②-1

(a)、(b) に示すように、A4-A9 または A10-A12 のいずれかの分画に t1A を生み出す因子が溶出している様子が観察された。

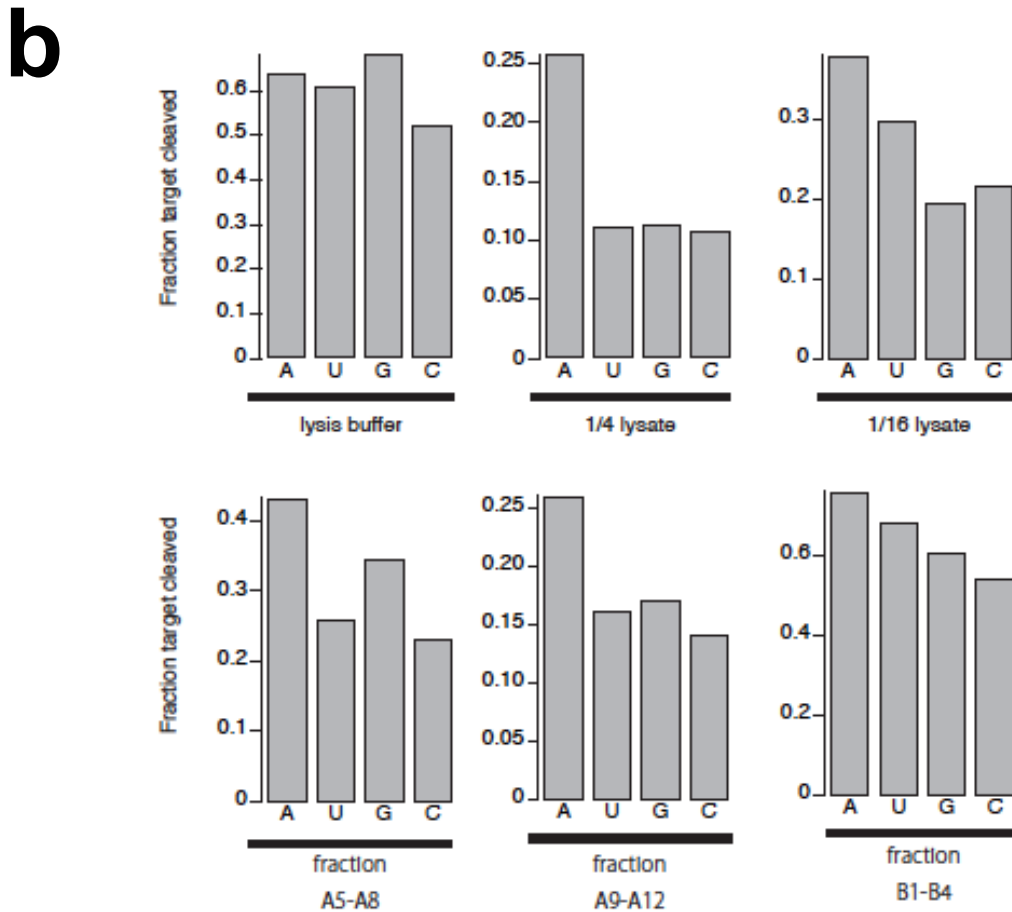
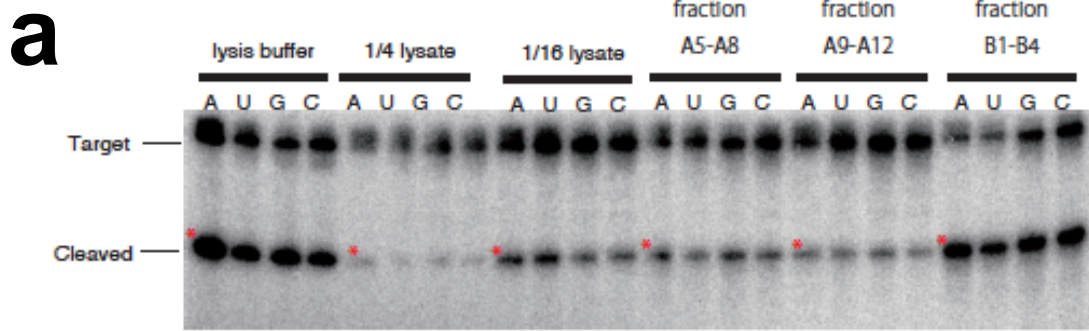


図 2-10-5. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画サンプルを用いたアッセイ②-2
 (a)、(b) に示すように、A4-A9 または A10-A12 のいずれかの分画に t1A を生み出す因子が溶出している様子が観察された。

(11) MID-PIWI にライセートを加え戻すと切断産物が見られない

続いて、これまでの結果を踏まえ、MID-PIWI ドメインタンパク質にライセートを戻すことにより、t1A の選択性が復活するかどうか確かめた。まず、リコンビナントタンパク質である GST-ヒト Ago2 (458-859)、GST-Siwi (539-899)、GST-BmAgo3 (565-926) それぞれと、S_1U ガイド RNA や A3_1U ガイド RNA を 25 °C で 30 分間インキュベートし、タンパク質にガイド RNA を取り込ませた。それに、HEK293T ライセート、または BmN4 ライセートと t1 塩基が A、U、G、C である標的 RNA を加えて切断アッセイを行った。しかしながら、切断産物は観察できなかった。

今度は、一過的に FLAG-ヒト Ago2 (458-859) を過剰発現した HEK293T 細胞からライセートを作成し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、塩濃度の高いウォッシュバッファーで洗い、FLAG-ヒト Ago2 (458-859) のみを濃縮した。その上で、ヒト Ago2 (458-859) とガイド RNA (A3_1A_siRNAguide) を 37 °C で 30 分間インキュベートし、lysis buffer で 3 回洗うことにより、ヒト Ago2 (458-859) に取り込まれなかったガイド RNA を取り除いた。そして、HEK293T ライセートと標的 A3_1A を加えて切断アッセイを行った。しかしながら、やはり切断産物は観察できなかった。

これらの実験より、切断産物が観察できなかった要因は、MID-PIWI ドメインのみでは、ガイド RNA の 5'末端が、5'末端結合ポケットに結合しているだけで、通常の RISC 形成のようにタンパク質によってきちんと守られた形を取っておらず、3'末端がふらふらした状態にあるためであると考えられる。そのため、ライセートを加えるとライセート中のヌクレアーゼ等の影響で、ガイド RNA が素早く分解してしまい、標的 RNA の切断が見られなかったと考えられた。

(12) PIWI タンパク質を用いた t1A を生み出す因子の検討

続いて、ヒト Ago2 で行ったように、免疫沈降後のウォッシュバッファの塩濃度を上げることで Siwi で観察された t1A の選択性が失われる様子や、ライセートを加え戻すことにより t1A の選択性が復活する様子が観察できるかどうか実験を行った。図 2-2-1 に示したように、FLAG-Siwi は免疫沈降後のウォッシュバッファの塩濃度を 200 mM NaCl 以上にすると、beads から外れてしまい、標的 RNA の切断が観察されなかった。そこで、当研究室の泉奈津子博士が使用されていた Halo-Siwi を発現する BmN4 細胞を用いて標的切断実験を行うことにした。Halo-Siwi は Magne™ HaloTag® Beads (Promega) とのインキュベート後のウォッシュバッファの NaCl の濃度を 800 mM まで上げてても beads から外れないことが予備実験により分かっていた。

まず、Halo-Siwi を pIZ/V5-His vector (Invitrogen) にサブクローニングしたプラスミドを泉博士に分けて頂き、Halo-Siwi を発現する BmN4 細胞を作成した。当初、FLAG-Siwi で行った時と同様に Halo-Siwi を恒常的に発現する BmN4 細胞を樹立しようと試みたが、長い時間飼育すると細胞が死滅して行く様子が観察されたため、一過的に過剰発現する方法をとった。BmN4 細胞を 1×10^6 cells/mL で 6 cm Dish (treated) (IWAKI 社) にまき、1 dish あたり 100 μ L の無添加の IPL-41 培地に 1 μ g/ μ L の上記の発現プラスミド 5 μ L と X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) 10 μ L を加えて室温で 30 分インキュベートし、BmN4 細胞に加えてトランスフェクションをおこなった。トランスフェクション後 72 時間で細胞を回収し、通常通りライセートを作成した。

Halo-Siwi を一過的に過剰発現する BmN4 細胞から作成したライセートと Magne™ HaloTag® Beads (Promega) を 25 °C で 90 分間インキュベートした。そして、1× lysis buffer で 3 回洗った後、いずれかの標的 S₁U RNA を加え (終濃度 ~1 nM)、25 °C でインキュベートすることで切断アッセイを行った。その結果、図 2-12 (a) に示すように、適切な長さの切断産物が観察でき、かつ、t1A の選択性がみられた。以前、FLAG-Siwi を一過的に過剰発現した BmN4 細胞より精製したライセートでは切断が観察されなかったが、Halo-Siwi の場合は一過的な過剰発現でも切断の観察が十分可能であった。

続いて、wash 条件による t1A の選択性を観察するために、Halo-Siwi を一過的に過剰発現する BmN4 細胞から作成したライセートと Magne™ HaloTag® Beads (Promega) を 25 °C で 90 分間インキュベートした。その後、beads を 0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1× lysis buffer で beads を 3 回洗った後、1× lysis buffer でさらに 3 回洗った。その上で、いずれかの標

的 S₁U RNA を加え（終濃度 ~1 nM）、25 °C でインキュベートすることで切断アッセイを行った。すると、lysis buffer 中で切断アッセイを行った場合は、明らかに t1A の選択性が失われた。一方、標的の切断時に BmN4 ライセートを加え戻すと t1A の選択性が復活する様子が観察された（図 2-11）。尚、標的 RNA 切断時に加えた BmN4 ライセートは、野生型であり、本研究で用いるライセートの作成方法に従って細胞を破碎した後、破碎液を 17,000 × g で遠心した上清を用いた。

このように、Siwi においても、ヒト Ago2 で観察されたように、濃縮してきた Siwi を強い wash 条件で洗うと t1A の選択性が失われ、再びライセートを加え戻すと t1A の選択性が復活する様子が観察できた。このことより、Siwi もヒト Ago2 と同様にライセート中のタンパク因子が t1A の選択性を生み出している可能性が強く示唆された。尚、Halo-Siwi では、Magne™ HaloTag® Beads (Promega) とインキュベーション後に 0.4 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1 × lysis buffer で beads を 3 回洗っただけでは、t1A の選択性は完全に失われなかった（結果省略）。これは、ヒト Ago2 において免疫沈降後の wash 条件を検討した際に、0.4 M NaCl で完全に t1A の選択性が失われていたこととは、異なる点である（図 2-9-1）。これには、HEK293T 細胞と BmN4 細胞のライセート調製法の違いや、AGO タンパク質と PIWI タンパク質の性質の違いが影響していると考えられる。

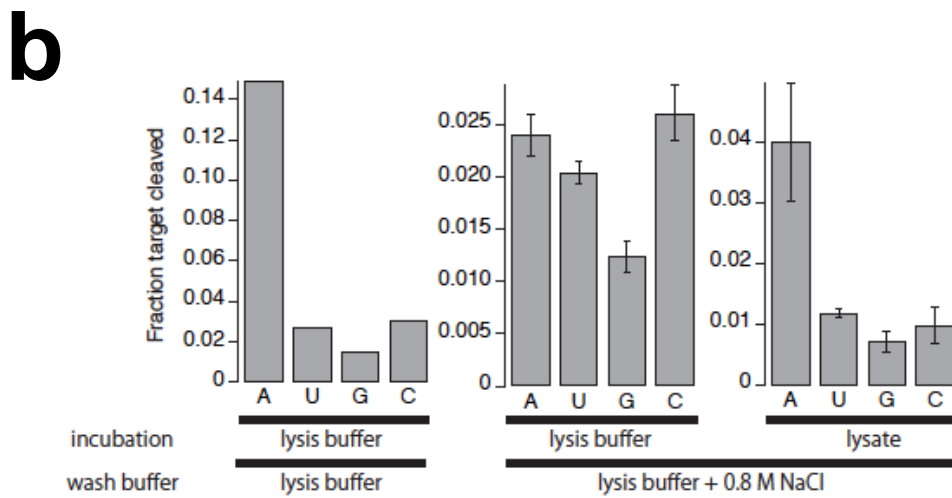
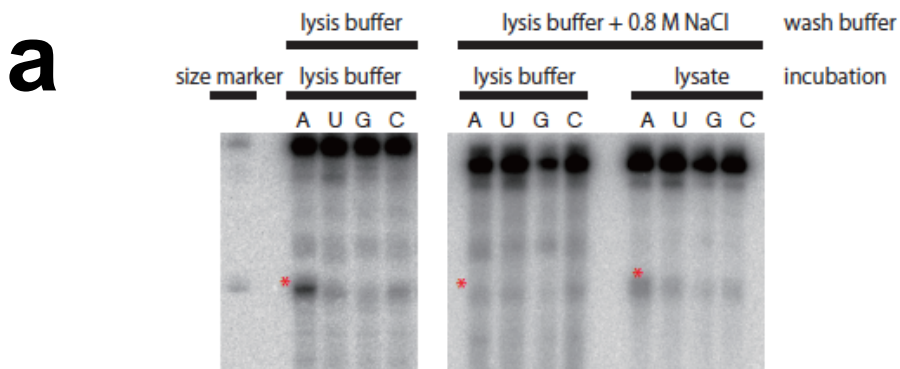


図 2-12. Halo-Siwi による標的切断アッセイ

(a) Halo-Siwi により、標的 S₁U を切断した。左から、lysis buffer で wash 後 lysis buffer 中で切断アッセイ、0.8M NaCl を含む lysis buffer で wash 後 lysis buffer 中で切断アッセイ、0.8M NaCl を含む lysis buffer で wash 後 BmN4 ライセート 17,000 x g 上清中での切断アッセイ。

(b) (a) をグラフ化した。

III. 考察

本研究により、はじめて AGO タンパク質と PIWI タンパク質の t1A の選択性を生化学的に解析することに成功し、著者が確立したアッセイ系により、t1A の選択性は AGO や PIWI といったタンパク質自身にあるのではなく、ライセート中の他のタンパク質因子による影響であることをはじめて示した。これまで、ヒト Ago2 では、網羅的な miRNA の標的解析と結晶構造により、miRNA の 5'末端塩基に関わらず t1A の選択性があることが示唆されていたが、実際に in vitro でそれらを確かめたのは著者が初めてであった。また、ピンポンサイクルのモデルより、Siwi に 1U piRNA が結合するのであれば、それをガイドとして切断された標的 RNA の t1 塩基（すなわち BmAgo3 に結合する piRNA の 10 塩基目）が A となるのは、ごく当然のこのように考えられていた。しかしながら、10A のバイアスは 1U と 10A の間で塩基対が形成されることによらないことを in vitro で示した。そして、ピンポンサイクルに関与する 2 つの PIWI タンパク質の間で t1A の選択性に違いがあることを示した。

これまでに 5'末端結合ポケットは、結合 RNA の 5'末端のモノリン酸基を厳密に認識することが知られている。構造学的な解析より、AGO タンパク質の 5'末端ポケットが、1U や 1A を好むことも塩基とアミノ酸の間における相互作用の側面から明らかになりつつある³⁵。一方、t1 塩基の選択性に関しては、AGO タンパク質の構造を見る限りでは、AGO タンパク質自身が t1A を選択するような特徴を持つようには考えられない。著者の研究により、t1A を生み出す因子はライセート中のタンパク質であることが強く示唆されたが、現在のところ、その因子は、積極的に t1A の標的 RNA を認識するようにはたらいっているのか、あるいは t1U、t1G、t1C の標的 RNA を認識しにくいようにはたらいっているのかは不明である。さらには、t1A を生み出す因子は標的 RNA と直接相互作用を持つことにより、AGO タンパク質や PIWI タンパク質の t1A の選択性を生み出しているのか、あるいは、AGO タンパク質や PIWI タンパク質と結合することでその構造を何らかの形で変化させることにより、t1A の選択性を生み出しているのかも明らかではない。これらを明らかにする為にも、今後、t1 塩基の選択性を生み出す因子の同定が急がれる。方法としては原始的なカラムクロマトグラフィー等を用いてタンパク質を分画し、t1A の選択性を指標に、活性のある画分を質量分析法を用いて同定して行くことが王道であると考えられる。

それでは、t1A を選択する意義は何であろうか。Argonaute ファミリーの中で、現在までに t1A の選択性が知られているのは、AGO タンパク質であるヒト Ago2 や、ピンポンサイクルのモデルより PIWI タンパク質である Siwi、Aub、Miwi2 等が挙げられる。種を越えて保存された性質であ

ることを鑑みると、t1A の選択性は Argonaute ファミリーにおいて何らかの意味を持つと考えられる。

ヒトにおいて、標的を切断しない miRNA の標的 RNA の網羅的解析で t1A の割合が多いことが明らかになったことより、AGO タンパク質の t1A の選択性は、切断時ではなく、標的の認識時に作用していると考えられる。また、Andrew Grimson らの研究で、miRNA が実際に発現を制御し得る mRNA の 3'UTR 領域における標的サイトを網羅的に解析した結果、seed 領域とマッチするサイトの近傍は A や U である割合が高いことが明らかになった⁸⁵。これらのことを踏まえると、AGO タンパク質を中心とするサイレンシング複合体が、3'UTR 上に存在する標的を認識する一つのポイントとして、AU リッチな領域を認識すること、さらには t1A を認識することが含まれているのではないかと想定される。mRNA はその配列が多様であり、mRNA 上に様々な RNA 結合タンパク質が結合し、複雑な高次構造をとる。そのような中で、確実に標的サイトを見つけるには、A や U といった塩基を頼りに探していくことが非常に有用であり、より確実に 3'UTR 領域上に存在する標的サイトを見つけるために、A や U を認識するように進化していったのではないかと考えられる。このような t1 塩基の選択性はヒト Ago2 以外の AGO タンパク質では現在のところ解析されていないが、他の AGO タンパク質においても、標的サイト周辺の塩基配列と、t1 塩基の選択性の関係を解析することでより明確な答えが得られるかも知れない。

PIWI タンパク質の場合はどうであろうか。ピンポンサイクルより、PIWI タンパク質の持つ t1A の選択性には、AGO タンパク質の場合とは異なる理由が考えられた。もしも Siwi が t1A の選択性を持たなければ、BmAgo3 に結合する piRNA の 10 塩基目に特には特にバイアスが見られないことになる。BmAgo3 に結合した 10A バイアスを持たない piRNA をガイドとして相補的な piRNA が切断された場合、新たにできる piRNA は 1U のバイアスを持たないことになる。Siwi が U 以外の塩基を 5'末端に持つ RNA とは結合しにくいことは、以前 in vitro の実験において示されているので、そのような piRNA は Siwi と結合できなくなってしまう、ピンポンサイクルにおける piRNA の増幅は見られないことになってしまう⁶⁹ (図 3-1)。このような理由から、PIWI タンパク質では進化の過程で片方が t1A の選択性を持つようになったのではないかと考えられる。

ここで重要になってくるのは、なぜ Siwi は 1U の piRNA 前駆体と選択的に結合するのか、ということである。結晶構造解析がすすんでいる AGO タンパク質を参考にすると、ヒト Ago2 の結晶構造より、結合する RNA の 5'末端のモノリン酸基と、5'末端結合ポケットを構成するアミノ酸は水素結合を形成することが明らかになった。さらに、小分子 RNA の 5'塩基が C や G であるより

も A や U である方が 5'末端結合ポケットと強い相互作用を持てることが示されており、これは、標的 RNA を認識した際に結合 RNA の 3'末端が AGO タンパク質の PAZ ドメインから解き放たれた後でも、安定して AGO タンパク質と結合できるためだと予想できる。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* や、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* といった原核生物の AGO ホモログタンパク質の結晶構造からは、真核生物で見られるような、5'末端ポケットとガイド RNA の 5'末端塩基との相互作用が無く、結合 RNA の 5'末端塩基に特別な選択性が無いと考えられる。よって、1U や 1A の選択性は、原核生物の AGO タンパク質から真核生物の AGO タンパク質へと進化する過程で、より正確に標的 RNA を認識するために獲得していった特徴ではないか、と推測できる。

PIWI タンパク質のピンポンサイクルは、トランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する 1U の piRNA が結合した PIWI タンパク質（カイコの場合は Siwi）と、トランスポゾンのセンス鎖に由来する 10A piRNA が結合した PIWI タンパク質（カイコの場合は BmAgo3）の二種類によって動くが、機能面から考えても、存在量から考えても、トランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する 1U の piRNA およびそれに結合する PIWI タンパク質（カイコの場合は Siwi）がより重要な役割を担うことが予想できる。トランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する 1U の piRNA をガイドとして PIWI タンパク質が標的 RNA を認識する際、AGO タンパク質と同様に、5'末端塩基と PIWI タンパク質の 5'末端ポケットとの相互作用が重要になると考えられる。そのような中で、より重要な方の PIWI タンパク質（カイコで言うと Siwi）が 1U の選択性を持つようになったのではなかろうか。

それでは、t1A の選択性を生み出すタンパク質因子とはどのようなタンパク質であろうか。そもそもヒト Ago2 で観察された t1A を生み出すタンパク質因子と、Siwi で観察されたタンパク質因子は同じタンパク質による同様の作用機序に基づくものであろうか。

AGO タンパク質と相互作用がある因子の第一候補としてシャペロンに目を付けて、シャペロンが t1A を生み出す因子であるかどうか本研究で検証した。AGO タンパク質が二本鎖 RNA を取り込む場合には、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが必須である。AGO タンパク質が二本鎖 RNA を取り込む際には、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーは様々なコシャペロン等とともに共同してはたらくことや、いずれかの因子が欠けるとその機能を十分に発揮できないことが知られている。今回、17-AAG を用いて Hsp90 のシャペロンのはたらきを阻害しても、ライセート中の t1A の選択性が失われなかったことより、少なくとも Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーは t1A を生み出す因子の候補から外れた。Hsc70 に関しては、PES を加えた際に、わずかに t1A の選択性が

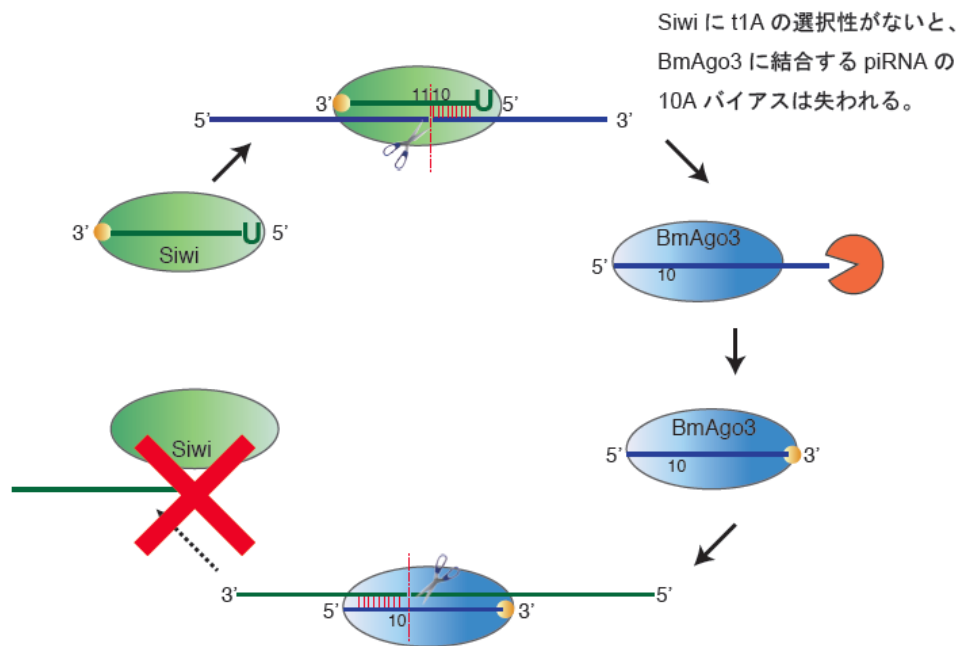
阻害されている様子が観察された。これは、そもそも PES が Hsp70 のみに作用するだけでなく、様々な細胞シグナリング経路に影響を与え、コシャペロンやその他のタンパク質との相互作用にも影響を及ぼすことが示されていることを併せて考えると、そのような影響によるものだとも考えられる。しかしながら、現段階では Hsc70 が t1A を生み出す因子ではないことが完全に否定できないので、更なる解析が必要である。例えば、私の確立したアッセイ系を用いれば、系の中にリコンビナント Hsc70 を加えることにより、Hsc70 の関与をよりはっきりと解析できると考える。

ヒトの miRNA 経路に関わる因子として現在知られているものに、pri-miRNA 切断に関与する Drosha や DGCR8 等が挙げられるが、いずれも核内に存在するため、t1A を生み出す因子である可能性は非常に低い。siRNA 二本鎖の切断やヘアピン型 miRNA の切断に関与する Dicer は、ヒトにおいては、RISC 形成にすら必要無い因子だと考えられている^{94,95}。そのため、標的の認識時に作用しているとは考えにくい。その他、GW182 と呼ばれる因子が存在し、ショウジョウバエ Ago1、ヒト Ago1-4 に直接結合し、翻訳の抑制、poly (A) 鎖の短縮、標的 mRNA の分解に関与していることが明らかになっている^{96,97}。GW182 はその名前からも分かるようにグリシンとトリプトファン (GW) に富む領域を持ち、それらのトリプトファンが AGO タンパク質の PIWI ドメインに存在するトリプトファンポケットと結合する⁹⁸。全ての AGO タンパク質が GW182 と相互作用を持つわけではなく、トリプトファンポケットが保存されていないショウジョウバエの Ago2 は GW182 と相互作用を持たない。今回、カイコやハエの PIWI タンパク質のドメインを解析したところ、トリプトファンポケットが保存されていないことが分かり、PIWI タンパク質とは相互作用を持たないと考えられる。そのため、GW182 は t1A の選択性を生み出す因子である可能性は低いと考えられる (図 3-2)。

これらのことから、t1A の選択性を生み出す因子は、Argonaute ファミリーのサイレンシングマシーナリーにおいて、標的の認識時に作用する未だに知られていない因子である可能性があり、非常に興味深い⁹⁹。

今回、著者は t1A 塩基の選択性という切り口から PIWI タンパク質や AGO タンパク質の標的塩基認識機構に迫った。特に、AGO タンパク質に比較してまだまだ未解決な謎が多く残される PIWI タンパク質の作用機序に関して、未だに生化学的な解析が難航しているピンポンサイクルに注目したことは非常にチャレンジングであり、興味深いことであった。ピンポンサイクルの様式より、二種類の PIWI タンパク質による標的 RNA の切断機構を理解することは、同時に piRNA の成合成経路を理解することに繋がる。piRNA は PIWI タンパク質と結合してトランスポゾンの抑制や

生殖系列細胞の形成・維持に重要な役割を果たしていることを鑑みると、piRNAの切断機構や合成機構を理解することは、PIWIタンパク質そのものの機能の理解へと繋がるため、非常に重要である。本研究では、以前はごく当然と思われていたpiRNAの合成経路に注目し、実はPIWIタンパク質の緻密な標的認識機構のもと制御されていることを明らかにした。t1A塩基を生み出す因子の同定は今後の課題であるが、その研究はPIWIだけでなく、Argonauteファミリーに属するタンパク質全体において、標的認識に関与する新たなタンパク質の同定へと繋がる可能性が非常に高い。



10A バイアスの無い piRNA をガイドとして切断された標的 RNA よりできる新たな piRNA は、1U のバイアスを持たないため Siwi と結合できない。そのため、piRNA は増幅しない。

図 3-1. Siwi が t1A の選択性を持たなかった場合の模式図

上に示すように、Siwi が t1A の選択性を持たないと、BmAgo3 に結合する piRNA に 10A バイアスは見られなくなる。よって BmAgo3 に結合した piRNA をガイドとして新たに作られる piRNA は 1U のバイアスを持たなくなり、その結果、Siwi に結合できず、ピンポンサイクルが動かない。

```

Hs_Ago3      VYAEVKRVGDTLLGMATQCVQVKNVIKTS-PQTLSN-LCLKINVKLGGINNILVPHQRPS
Hs_Ago4      VYAEVKRVGDTLLGMATQCVQVKNVVKTS-PQTLSN-LCLKINAKLGGINNVLVPHQRPS
Hs_Ago1      VYAEVKRVGDTLLGMATQCVQVKNVVKTS-PQTLSN-LCLKINVKLGGINNILVPHQRSA
Hs_Ago2      VYAEVKRVGDTVLGMATQCVQMKNVQRTT-PQTLSN-LCLKINVKLGGVNNILLPQGRFP
Dm_Ago1      VYAEVKRVGDTVLGMATQCVQAKNVNKTTS-PQTLSN-LCLKINVKLGGINSILVPSIRPK
Dm_Ago2      SYDIIKQKAELQHGILTQCIKQYTFDRKLNPTIGN-ILLKVNSKLNGINHKIKDDPRLP
BmAgo3      RYAAIKKVCCADNPVPSQVINARTLMNTNKIRSITQKILLQLNCKLGGT-----LWSIS
Siwi        RYEAIAKKKCTVDRAVPTQVVCARNMSSKS-AMSIATKVAIQINCKLGGs-----PWTVD
          *  !*!      : !*!  .. .  !:  : !:* **.*

Hs_Ago3      VFQQPVIIFLGADVTHPPAGDGKKPSIAAVVGSMDAHPSTRYCATVRVQRPRQ-----
Hs_Ago4      VFQQPVIIFLGADVTHPPAGDGKKPSIAAVVGSMDGHPSTRYCATVRVQTSRQEISQELLYS
Hs_Ago1      VFQQPVIIFLGADVTHPPAGDGKKPSITAVVGSMDAHPSTRYCATVRVQRPRQ-----
Hs_Ago2      VFQQPVIIFLGADVTHPPAGDGKKPSIAAVVGSMDAHPNRYCATVRVQQHRQ-----
Dm_Ago1      VFNEPVIIFLGADVTHPPAGDNKKPSIAAVVGSMDAHPSTRYAATVRVQQHRQ-----
Dm_Ago2      MLKN-AMYMGADVTHPSPDQREIPSVVGVAASHDPYGAAYNMQYRLQRGAL-----
BmAgo3      IPFKSAMIVGIDSYHDPS--RRNRSVCSFVASYNQSMTLWYSKVIQFQEKQ-----
Siwi        IPLPSLMVVGYDVCHDTR--SKEKSFQAFVATLQKQMTQYYSIVNAHTSGE-----
          :      : !* * * . . * . . . . : :      :

Hs_Ago3      -EIIQDLASMVRELLIQFYKSTR-FKPTRIIFYRDGVSEGQFRQVLYELLAIREACISL
Hs_Ago4      QEVIQDLTNMRELLIQFYKSTR-FKPTRIIYRGGVSEGQMKQVAVPELIAIRKACISL
Hs_Ago1      -EIIEDLSYMVRELLIQFYKSTR-FKPTRIIFYRDGVPEGQLPQILHYELLAIRDACIKL
Hs_Ago2      -EIIQDLAAMVRELLIQFYKSTR-FKPTRIIFYRDGVSEGQFQVLHHELLAIREACIKL
Dm_Ago1      -EIIQELSSMVRELLIMFYKSTGGYKPHRIILYRDGVSEGQFPHVLQHELTAIREACIKL
Dm_Ago2      -EEIEDMYAITLEHLRVYHQYRK-AYPEHILYRDGVSDGQFPKIKNEELRGINQACAKV
BmAgo3      -EIVDGLKCCLVDAALTHYLRSNG-QLPDRIIYRDGVGDGQLKLLQOYEIPQMKICFTIL
Siwi        -ELSSHMGFNIA SAVKKFREKNG-TYPARIFIYRDGVGDGQIPYVHSHEVAEIKKLAEI
          * . ! . ! : . * !*! **.* !*! : *! : . :

Hs_Ago3      EKDYQPGITYIVVQKRHHTRLFCADRTERVGRSGNIPAGTTVDTDITHPYEFDYLCSHA
Hs_Ago4      EEDYRPGITYIVVQKRHHTRLFCADKTERVKGSGNVPAGTTVDSTITHPSEFDYLCSHA
Hs_Ago1      EKDYQPGITYIVVQKRHHTRLFCADKNERIGKSGNIPAGTTVDTNITHPFEFDYLCSHA
Hs_Ago2      EKDYQPGITFIVVQKRHHTRLFCCTDKNE-----
Dm_Ago1      EPEYRPGITFIVVQKRHHTRLFCAEKKEQSGKSGNIPAGTTVDVGITHPTEFDYLCSHQ
Dm_Ago2      G--IKPKLCCVIVVQKRHHTRFFPNGEPSQYNKFNNDVPGTVVDRDIVHPNEMQFFMVSHQ
BmAgo3      GSNYQPTLTYVVVQKRINTRIFLKS RDG----YDNPNGTVVDHCITRRDWYDFLIVSQK
Siwi        YAGVEIKLAFIIVSKRINTRIFVQRGRS----GENPRPGTVIDDVVTLPERYDFYLVSQN
          . : !* * * !*!*

```

図 3-2. トリプトファンポケット

黄色でハイライトしたアミノ酸がトリプトファンポケットの形成に重要である。GW182 と相互作用を持たないことが知られているショウジョウバエの Ago2 や、Siwi、BmAgo3 にはそれらのアミノ酸が保存されていない。

IV. 材料と方法

本研究で用いたbufferなど

本研究で用いたbufferなどの組成は以下の通りである。40× reaction mixの作成は次の論文に準拠した (Haley *et al.*, 2003)。

1x lysis buffer

30 mM	HEPES-KOH、pH 7.4
100 mM	KOAc
2 mM	Mg(OAc) ₂

2x lysis buffer

60 mM	HEPES-KOH、pH 7.4
200 mM	KOAc
4 mM	Mg(OAc) ₂

2x PK buffer

200 mM	Tris-HCl、pH 7.5
25 mM	EDTA、pH 8.0
300 mM	NaCl
2 % w/v	SDS

ホルムアミドloading dye

98 % w/v	deionized formamide
10 mM	EDTA、pH 8.0
0.025 % w/v	xylene cyanol
0.025 % w/v	bromophenol blue

BmN4 培養細胞

BmN4 細胞は IPL-41 培地 (Gibco) に 10 % (v/v) 非働化 FBS (invitrogen) を添加した培地を用いて、27 °Cにて培養した。

HEK293T 細胞培養

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma またはナカライ) に 10 % (v/v) FBS (Sigma) と 100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用いて、5 % CO₂ インキュベーターで 37 °C にて培養した。

FLAG-Siwi、FLAG-BmAgo3 を恒常的に発現する BmN4 細胞の作成

河岡慎平博士によって作製された、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プラスミドを分けて頂いた。pIZ/V5-His vector にはゼオシン耐性遺伝子がコードされている。

BmN4 細胞を 1×10^6 cells/mL で 6 cm Dish (treated) (IWAKI 社) にまき、1 dish あたり 100 µL の無添加の IPL-41 培地に 1 µg/µL の上記の発現プラスミド 5 µL と X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) 10 µL を加えて室温で 30 分インキュベートし、BmN4 細胞に加えてトランスフェクションをおこなった。トランスフェクション後 0.5 µg/µL ゼオシンと 10 % (v/v) 非働化 FBS を添加した IPL-41 培地で培養し、FLAG-Siwi および FLAG-BmAgo3 を恒常的に発現する BmN4 細胞を樹立した。その後、0.25 µg/µL のゼオシンと 10 % (v/v) 非働化 FBS を添加した IPL-41 培地で培養を行った。

FLAG-Siwi、FLAG-BmAgo3 を発現する細胞ライセートの調製

細胞を回収後、PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM Na₂HPO₄、1.4 mM KH₂PO₄) により洗い、1,000 x g の遠心で細胞のペレットを回収した。回収した細胞の重さの 2 倍量の 1x lysis buffer (1x Protease Inhibitor Cocktail、1 mM DTT を含む) に懸濁しダウンスホモジナイザーを用いて 4 °C で破碎した。破碎液をそのまま crude 細胞ライセートとし、液体窒素で凍結させて -80 °C で保存した。

Halo-Siwi を一過的に過剰発現する BmN4 ライセートの作成

泉奈津子博士によって作製された、Halo タグを付加した Siwi を pIZ/V5-His vector (Invitrogen) にサブクローニングしたプラスミドを分けて頂いた。

BmN4 細胞を 1×10^6 cells/mL で 6 cm Dish (treated) (IWAKI 社) にまき、1 dish あたり 100 µL の無添加の IPL-41 培地に 1 µg/µL の上記の発現プラスミド 5 µL と X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) 10 µL を加えて室温で 30 分インキュベートし、BmN4 細胞に加えてトランスフェクションをおこなった。トランスフェクション後 72 時間で細胞を回収した。回収した BmN4 細胞は重さを量り、2 倍量の 1x lysis buffer (1x Protease Inhibitor Cocktail、1 mM

DTT を含む) に懸濁し、ダウンスホモジナイザーを用いて 4 °C で破碎した。破碎液をそのまま crude 細胞ライセートとし、液体窒素で凍結させて -80 °C で保存した。

FLAG-ヒト Ago2 を発現する細胞ライセートの調製

依田真由子博士によって作製された、FLAG タグを付加したヒト Ago2 を pCAGEN vector にサブクローニングしたプラスミドを分けて頂いた。HEK293T 細胞をトランスフェクションする前日に、抗生物質を抜いた培地を用いて 1×10^6 cells/mL で 15 cm Dish (treated) (IWAKI 社) にまいた。翌日 1 dish あたり 2 ml の無添加の DMEM 培地に 1 μ g/ μ L の上記の発現ベクター 10 μ L とポリエチレンジオキシラン (PEI) 60 μ L を加えて室温で 30 分インキュベートし、HEK293T 細胞に加えてトランスフェクションをおこなった。トランスフェクション後 24 時間で細胞を回収した。回収した HEK293T 細胞は重さを量り、2 倍量の 1x lysis buffer (1x Protease Inhibitor Cocktail、1 mM DTT を含む) に懸濁し、ダウンスホモジナイザーを用いて 4 °C で破碎した。破碎液は 17,000 x g、4 °C、20 分の遠心分離をおこない、上清を HEK293T ライセートとして回収し、液体窒素で凍結させて -80 °C で保存した。

ウェスタンブロット解析

抗 FLAG 抗体 (1: 2500) (Sigma、マウスモノクローナル抗体)、抗アクチン抗体 (1: 2500) (Santa Cruz Biotechnology、ヤギポリクローナル抗体) を用いて行った。化学発光を SuperSignal West Dura substrate (Pierce) によって誘導し、LAS-3000 imaging system によってシグナルを検出した。また Multi Gauge software (Fujifilm Life Sciences) によって画像を解析した。

標的 RNA の作成

本研究で使用した全ての標的 RNA の作成に用いたプライマーと作成した標的 RNA の配列は表にまとめた。

Forward プライマーはすべて以下の配列を用いた。

5' GCGTAATACGACTCACTATAGTCACATCTCATCTACCTCC 3'

標的 RNA		Reverse プライマー
標的 S_1U	A	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAGTTCT TCGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	U	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAGTTCT ACGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	G	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAGTTCT CCGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	C	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAGTTCT CGGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
標的 S_1U2	A	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GTGTCGAATTCC CACGACTGACGTACGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	U	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG AGTTCGAATTCC CACGACTGACGTACGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	G	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG CGTTCGAATTCC CACGACTGACGTACGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	C	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GGTTCGAATTCC CACGACTGACGTACGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
標的 S_1C	A	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG TAATCACCATAGA ATTAACCCACTGAGTGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	U	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG AAATCACCATAGA ATTAACCCACTGAGTGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	G	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG CAATCACCATAGA ATTAACCCACTGAGTGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	C	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GAATCACCATAGA ATTAACCCACTGAGTGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
標的 A3_1U	A	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG TTCTTCGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	U	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG TACTTCGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	G	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG CTTCGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	C	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GTCTTCGGTAGT ATAGTGGTCAGTATCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
標的 A3_1C	A	5' TTAGTGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GTATAGAAAGATGC ACCACGCCGGAACCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	U	5' TTAGTGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GAATAGAAAGATGC ACCACGCCGGAACCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	G	5' TTAGTGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GCATAGAAAGATGC ACCACGCCGGAACCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	C	5' TTAGTGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GGATAGAAAGATGC ACCACGCCGGAACCGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
標的 A3_1A	A	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG TAAGCATGAGA ATTTGCTGTCTGCGGGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	U	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG AAAAGCATGAGA ATTTGCTGTCTGCGGGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	G	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG CAAGCATGAGA ATTTGCTGTCTGCGGGAAGAGAGGAGTTCATG 3'
	C	5' TTAGGTGACACTATAGATTTACATCGCGTTGAGTGTAGAACGGTTGTATAAAAAG GGAAAGCATGAGA ATTTGCTGTCTGCGGGAAGAGAGGAGTTCATG 3'

それぞれの標的 RNA を作成するため、pGL3-Basic (Promega) を鋳型に、標的配列を含む DNA 断片を表にまとめたプライマーを用いて増幅した。増幅した DNA 断片から T7-Scribe™ Standard RNA IVT Kit (cell script) を使って標的 mRNA を転写した。その後、30 % ホルムアミド+7 M 尿

素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動して目的の RNA 転写物を切り出した。さらに、ScriptCap™ m7G Capping System (cell script) と α -³²P[GTP]を用いて 5'末端のキャップ構造を放射性標識した後、再びゲル切り出しを行うことで目的の標的 RNA のみを得た。以下に詳細をまとめる。

DNA 断片を作成する際の PCR 反応は全て酵素 KOD –Plus- Neo (東洋紡社) を使用し、以下の 50 μ L の反応系でおこなった。

10x buffer for KOD –Plus- Neo	5 μ L
2 mM dNTP	5 μ L
25 mM MgSO ₄	3 μ L
10 μ M Fw プライマー	1 μ L
10 μ M Rv プライマー	1 μ L
1 ng/ μ L template DNA	1 μ L
MilliQ	33 μ L
10 U/ μ L KOD –Plus-Neo buffer	1 μ L
<hr/>	
	50 μ L

ゲル精製をした後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製し、以下の 20 μ L の反応系で標的 mRNA の転写をおこなった。

DNA 断片	1 μ g
10x T7 scribe buffer	2 μ L
100 mM ATP	1 μ L
100 mM UTP	1 μ L
100 mM GTP	1 μ L
100 mM CTP	1 μ L
1 mM DTT	2 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L
T7 enzyme	2 μ L
DNA 断片	5 μ L
MilliQ	9.5 μ L
	<hr/>
	20 μ L

37 °Cで2時間インキュベート後、20 μ L のホルムアミド loading dye に溶かして 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動にて電気泳動泳動を行い、目的の基質 RNA バンドを切り出し、ゲル片を 2x PK buffer 500 μ L と混合し室温で一晩インキュベートして RNA を溶出した。溶出した RNA はエタノール沈殿により回収して MilliQ に溶かし、1 μ M となるように調製した。

末端のキャップ構造の放射性標識は、以下の 20 μ L の反応系でおこなった。

10x ScriptCap buffer	2 μ L
2 mM S-adenosyl-methionine	1 μ L
1 μ M 標的 mRNA	2 μ L
ScriptCap enzyme	1 μ L
3.3 μ M α - ³² P[GTP]	1 μ L
MilliQ	13 μ L
	<hr/>
	20 μ L

37 °Cで2時間インキュベート後、MilliQ で 50 μ L にしてから G-25 カラム (GE ヘルスケア社) によって α -³²P[GTP]を除去し、50 μ L のホルムアミド loading dye に溶かして 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動にて電気泳動泳動を行い、目的の基質 RNA バンドを切り出し、ゲル片を 2x PK buffer 500 μ L と混合し室温で一晩インキュベートして RNA を溶出した。

溶出した RNA はエタノール沈殿により回収して MilliQ に溶かし、10 nM となるように調製した。

切断アッセイに用いる際には t1A、t1U、t1G、t1C であるそれぞれの標的 RNA の放射性標識の強度が揃うように濃度調整を行った。

ガイド RNA およびガイド 2 本鎖 RNA の調製

使用したガイド RNA、二本鎖 RNA 調製用のガイド鎖、パッセンジャー鎖の基質 RNA は表にまとめた。これらの基質 RNA はジーンデザイン社から購入した。

A3_1A_siRNAguide	5' AAAAGCAUGAGAAUUUGCUGU 3'
A3_1A_siRNApass	5' AGCAAAUUCUCAUGCUUUUAA 3'
A3_1U_piRNA	5' UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC 3'
S_1U_piRNA	5' UCUUCGGUAGUAUAGUGGUCAGUAUC 3'

基質 RNA と T4 polynucleotide kinase (T4 PNK、タカラバイオ社) を以下のように調製し、37 °C で 2 時間インキュベートして 5' 末端をリン酸化した。

10 μM RNA	10 μL
10x PNK buffer	2 μL
10 mM ATP	2 μL
T4 PNK	1 μL
MilliQ	5 μL
<hr/>	
	20 μL

インキュベート後、フェノール・クロロホルム精製とエタノール精製を行った後 MilliQ でガイド鎖、パッセンジャー鎖を 5 μM に調製した。

二本鎖 RNA を作成する場合は、以下の組成でガイド鎖とパッセンジャー鎖の基質 RNA を混合し、95 °C で 2 分インキュベートした後に室温で 1 時間インキュベートすることでアニーリングした。

ガイド鎖 (5 μM)	4 μL
ガイド鎖 (5 μM)	6 μL
2x lysis buffer	10 μL
<hr/>	
	20 μL

アニーリング後はガイド二本鎖 RNA の濃度が 500 μM となるように 1x lysis buffer で調製した。

FLAG-ヒトAgo2を用いた切断アッセイ

HEK293T 細胞で FLAG-Ago2 を過剰発現させたライセート 5 μL を以下の組成でガイド RNA と混ぜ、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分インキュベートすることによってガイド RNA をプログラムした。

1x lysate	5 μL
40x reaction mix	3 μL
二本鎖 RNA (500 μM)	1 μL
<hr/>	
	10 μL

そこに標的 RNA を 1 μL 加え (終濃度 ~ 1 nM)、計 10 μL の反応系アッセイを行った。

切断反応開始後 5 分、15 分、30 分等でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μL のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。乾燥した後、ホルムアミド loading dye を加えて 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動を行った。ゲルを乾燥した後に FLA-7000 image analyzer (Fujifilm) でシグナルを検出し、Image Gauge software (Fujifilm) で画像を解析した。

FLAG-Siwi、FLAG-BmAgo3を用いた切断アッセイ

まず、4 μL の抗 FLAG 抗体 (M2、Sigma) と 40 μL の Dynabeads protein G (Invitrogen) と混ぜて、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。その後、1 \times lysis buffer で 2 回洗った後、FLAG-Siwi または FLAG-BmAgo3 のライセートを 120 μL 加えて 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。1 \times lysis buffer で beads を 3 回洗った後、4 つに分け (t1A、t1U、t1G、t1C)、それぞれに 3 μL の 40 \times mix、6 μL の 1 \times lysis buffer、1 μL の標的 RNA (終濃度 ~ 1 nM) を加えて計 10 μL の反応系で 25 $^{\circ}\text{C}$ でアッセイを行った。基本的に、BmAgo3 の場合は切断反応開始後 3 時間、Siwi の場合は切断反応開始後 8 時間でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μL のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。乾燥した後、ホルムアミド loading dye を加えて 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動を行った。ゲルを乾燥した後に FLA-7000 image analyzer (Fujifilm) でシグナルを検出し、Image Gauge software (Fujifilm) で画像を解析した。

Competitor 実験

まず、1 μL の抗 FLAG 抗体 (M2、Sigma) と 10 μL の Dynabeads protein G (Invitrogen) と混ぜて、4 °C で 1 時間インキュベートした。その後、1× lysis buffer で 2 回洗った後、FLAG-Siwi または FLAG-BmAgo3 のライセートを 30 μL 加えて 4 °C で 1 時間インキュベートした。1× lysis buffer で beads を 3 回洗った後、3 μL の 40× mix、5 μL の 1× lysis buffer、1 μL の competitor RNA を加えて 25 °C で 10 分間インキュベートした。その後 1 μL の標的 RNA (終濃度 ~1 nM) を加えて 10 μL の反応系でアッセイを行った。反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μL のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。乾燥した後、ホルムアミド loading dye を加えて 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動を行った。ゲルを乾燥した後に FLA-7000 image analyzer (Fujifilm) でシグナルを検出し、Image Gauge software (Fujifilm) で画像を解析した。以下に competitor RNA の配列を示す。(M) は、2'OMe 修飾を示す。

A3_1A competitor	5' U(M)C(M)U(M)U(M)C(M)C(M)C(M)G(M)C(M)A(M)G(M)A(M)C(M)A(M)G(M)C(M)A(M)A(M)A(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M) 3'
S_1U competitor	5' U(M)C(M)U(M)U(M)C(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(M)G(M)A(M)C(M)C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)C(M)G(M)A(M)A(M)G(M)A(M)A(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M) 3'

大腸菌発現用ベクターの調製

GST-ヒトAgo2 (458-859)、GST-Siwi (539-899)、GST-BmAgo3 (565-926) の発現ベクターは、次のように構築した。Siwi、BmAgo3、ヒトAgo2のcDNAクローンをテンプレートとして以下のプライマーと酵素KOD –Plus- Neo (東洋紡社) を用いてPCRを行った。これらのDNA断片は、EcoR1 とBamH1で制限酵素処理し、ゲル精製をした後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製した。GST融合タンパク質発現ベクターであるpGEX-6P-2 (GE Healthcare) をEcoR1とBamH1で制限酵素処理し、ゲル精製をした。次にDNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ) を用いて、線状化したpGEX-6P-2とヒトAgo2 (458-859)、Siwi (539-899)、BmAgo3 (565-926) の3つのDNA断片を結合させ、プラスミドを構築した。得られたプラスミドはDNA シークエンシングにより塩基配列を確認した。

以下の表にプラスミド作製に用いたプライマーの配列を示す。

Siwi (539-900)	Fw プライマー	5' CATGGATCCGAAAGACAAC 3'
	Rv プライマー	5' TACGAATTCGGTTAGAGGAAA 3'
BmAgo3 (566-926)	Fw プライマー	5' CATGGATCCCAGAGGGATAAGCAG 3'
	Rv プライマー	5' TACGAATTCGGCTACAAAAGAAGACAGCT 3'
ヒト Ago2 (460-859)	Fw プライマー	5' CATGGATCCCGCCAGTGCACG 5'
	Rv プライマー	5' TACGAATTCGGTTAAGCAAAGTACATGGTGC 3'

タンパク質の発現と精製

GST-ヒトAgo2 (458-859)、GST-Siwi (539-899)、GST-BmAgo3 (565-926) それぞれのタンパク質を次のように発現精製した。発現ベクターを用いて大腸菌BL21 株に形質転換し、10 mLのLB 培地で一晩前培養を行った。翌日、全培養液を遠心して上清を取り除いた後に、菌体を1L のLB 培地に加え、OD600 が0.6 に達するまで振盪培養した。培養液を30分間氷上に静置し、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度1 mM になるように添加した。その後18 °Cで24 時間振盪培養を行った。培養後は2,730 × g で20分間遠心して大腸菌を回収し、液体窒素で凍結して-80 °Cで保存した。精製に用いたバッファーは以下の通りである。

バッファーA :

1x lysis、1 mM DTT、1 × Ptease Inhibitor Cocktail、1 % Triton X-100 (WAKO)

バッファーB :

1x lysis、1 mM DTT、1 × Ptease Inhibitor Cocktail

溶出バッファー :

1x lysis、1 mM DTT、1 × Ptease Inhibitor Cocktail、10 mM Glutathione (還元型)

精製方法を以下に示す。

凍った大腸菌のペレットを低温室で溶解し、バッファーA 30 mLで懸濁した。ソニケーターにより氷上で3 分間大腸菌を破碎し、10,000 x g で20分間遠心することで可溶性画分と不溶性画分を分離した。

500 μLのStreptavidin Sepharose (GE healthcare) を用意し、バッファーBで2回洗った。ライセートの可溶性画分とSepharose beadsを混合し、4 °C で2時間インキュベートした。その後、ディスプレイザブルカラムに混合液を充填し、バッファーB で5回洗った後に、500 μLの溶出バッファーによりbeads上の目的タンパク質を溶出させた。目的タンパク質の溶出をSDS-PAGE により検出し、濃度を測定した後、液体窒素で凍らせ、-80 °C で保存した。

GST-ヒト Ago2 (458-859)、GST-Siwi (539-899)、GST-BmAgo3 (565-926) を用いた切断アッセイ

精製した GST-ヒト Ago2 (458-859)、GST-Siwi (539-899)、GST-BmAgo3 (565-926) それぞれ 5 μL を以下の組成でガイド RNA と混ぜ、25 °C で 30 分インキュベートすることによってガイド RNA をプログラムした。GST-ヒト Ago2 (458-859) には A_1U_piRNA、GST-Siwi (539-899) と

GST-BmAgo3 (565-926) には S_1U_piRNA をガイド RNA として用いた。

1 × lysate	5 μL
40 × reaction mix	3 μL
一本鎖 RNA (500 μM)	1 μL
<hr/>	
	9 μL

そこに 1 μL の標的 RNA (終濃度~1 nM) を加え、計 10 μL の反応系で 25 °Cにて切断アッセイを行った。切断反応開始後 30 分、1 時間、3 時間、6 時間等でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μL のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。乾燥した後、ホルムアミド loading dye を加えて 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動を行った。ゲルを乾燥した後に FLA-7000 image analyzer (Fujifilm) でシグナルを検出し、Image Gauge software (Fujifilm) で画像を解析した。

FLAG-ヒト Ago2 (458-859) を発現する細胞ライセートの調製

pCAGEN-FLAG-ヒトAgo2をテンプレートとして以下のプライマーと酵素KOD-Plus-Neo (東洋紡社) を用いてPCRを行った。1 μLのDpn1 (タカラバイオ) を加え、37 °Cで1時間インキュベートした後、大腸菌にトランスフォーメーションした。得られたプラスミドはDNA シークエンシングにより塩基配列を確認した。トランスフェクションや、ライセートの調製法等は上と同じである。以下の表にプラスミド作製に用いたプライマーの配列を示す。

	pCAGEN-ヒト Ago2 (458-859)
Forward プライマー	5' ATGACAAGCCCCAGCGCCAGTGAC 3'
Reverse プライマー	5' CGCTGGGGCTTGTCATCGTCGCCT 3'

FLAG-ヒト Ago2、FLAG-ヒト Ago2 (458-859) の免疫沈降物による標的切断アッセイ

まず、2 μLの抗FLAG抗体 (M2、Sigma) と20 μLのDynabeads protein G (Invitrogen) と混ぜて、4 °Cで1時間インキュベートした。その後、1 × lysis bufferで2回洗った後、FLAG-ヒトAgo2またはFLAG-ヒトAgo2 (458-859) のライセートを30 μL加えて4 °Cで1時間インキュベートした。0.8 M NaClと1 % Triton X-100 (WAKO) を含む1 × lysis bufferでbeadsを3回洗った後、1 × lysis bufferでさらに3回洗い、それぞれ以下の組成でガイドRNAと混ぜ、37 °Cで30分インキュベートすることによってガイドRNAをプログラムした。A3_1A_siRNAguideをガイドRNAとして用いた。

Beads + lysis buffer	5 μ L
40 \times reaction mix	3 μ L
一本鎖 RNA (500 μ M)	1 μ L
	<hr/>
	9 μ L

その後、1 \times lysis buffer で3回洗い、4つに分けた (t1A、t1U、t1G、t1C)。そこに、3 μ L の 40 \times reaction mix、6 μ L の 1 \times lysis buffer、1 μ L の標的 RNA (終濃度 \sim 1 nM) を加えて計 10 μ L の反応系で 37 $^{\circ}$ C アッセイを行った。ライセートを加え戻す場合は、標的 RNA を投加える際に lysis buffer の代わりに HEK293T 細胞ライセートを 6 μ L 加えた。

切断反応開始後 1 時間、3 時間等でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μ L のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。乾燥した後、ホルムアミド loading dye を加えて 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動を行った。ゲルを乾燥した後に FLA-7000 image analyzer (Fujifilm) でシグナルを検出し、Image Gauge software (Fujifilm) で画像を解析した。

また、FLAG-ヒト Ago2 へ二本鎖 RNA を取り込ませてから免疫沈降する場合は、まず、4 reaction 分のライセート 20 μ L を以下の組成でガイド RNA と混ぜ、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートすることによってガイド RNA をプログラムした。

1 \times lysate	20 μ L
40 \times reaction mix	12 μ L
二本鎖 RNA (500 μ M)	4 μ L
	<hr/>
	36 μ L

その後、予め 2 μ L の抗 FLAG 抗体 (M2、Sigma) と 20 μ L の Dynabeads protein G (Invitrogen) を 4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、lysis buffer で洗ったものをライセート中に加え、4 $^{\circ}$ C で一時間インキュベートした。0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1 \times lysis buffer で beads を 3 回洗った後、1 \times lysis buffer でさらに 3 回洗い、4 つに分け (t1A、t1U、t1G、t1C)、3 μ L の 40 \times reaction mix と 6 μ L の lysis buffer、1 μ L の標的 RNA を加え (終濃度 \sim 1 nM)、計 10 μ L の反応系アッセイを行った。ライセートを加え戻す場合は、標的を加える際に 1 \times lysis buffer の代わりに HEK293T 細胞ライセートを 6 μ L 加えた。

切断反応開始後 15 分、30 分等でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈

剤として 1 μ L のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。以下は同様の手順で解析を行った。

フェノール・クロロホルムまたは煮沸処理したライセートの添加

まず、4 reaction 分のライセート 20 μ L を以下の組成でガイド RNA と混ぜ、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートすることによってガイド RNA をプログラムした。

1 \times lysate	20 μ L
40 \times reaction mix	12 μ L
<u>二本鎖 RNA (500 μM)</u>	<u>4 μL</u>
	36 μ L

その後、予め 2 μ L の抗 FLAG 抗体 (M2, Sigma) と 20 μ L の Dynabeads protein G (Invitrogen) を 4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、lysis buffer で洗ったものをライセート中に加え、4 $^{\circ}$ C で一時間インキュベートした。0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1 \times lysis buffer で beads を 3 回洗った後、1 \times lysis buffer でさらに 3 回洗い、4 つに分け (t1A、t1U、t1G、t1C) た。それぞれに 3 μ L の 40 \times reaction mix と 1 μ L の標的 RNA (終濃度 \sim 1 nM)、6 μ L のフェノール・クロロホルム処理したライセート または、95 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸したライセートの上清を加え、計 10 μ L の反応系アッセイを行った。切断反応開始後 30 分でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μ L のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。以下は同様の手順で解析を行った。

シャペロン阻害剤の添加

まず、4 reaction 分のライセート 20 μ L を以下の組成でガイド RNA と混ぜ、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートすることによってガイド RNA をプログラムした。

1 \times lysate	20 μ L
40 \times reaction mix	12 μ L
<u>二本鎖 RNA (500 μM)</u>	<u>4 μL</u>
	36 μ L

その後、予め 2 μL の抗 FLAG 抗体 (M2, Sigma) と 20 μL の Dynabeads protein G (Invitrogen) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートし、lysis buffer で洗ったものをライセート中に加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一時間インキュベートした。0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1 \times lysis buffer で beads を 3 回洗った後、1 \times lysis buffer でさらに 3 回洗い、4 つに分け (t1A、t1U、t1G、t1C)、それぞれに 3 μL の 40 \times reaction mix と 1 μL の標的 RNA (終濃度 \sim 1 nM) を加えた。そして、1 μL の 10mM 17-AAG または 1 μL の 10mM PES とインキュベートした 5 μL の HEK 293T 細胞ライセートを加え、計 10 μL の反応系アッセイを行った。切断反応開始後 30 分でサンプリングし、反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μL のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。以下は同様の手順で解析を行った。

ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画

ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製は AKTA purifier (GE Healthcare) を用いて行い、カラムは当研究室で使用されている Superdex 200 Increase 5/150 GL (GEヘルスケア・ジャパン) を用いた。一回目のゲル濾過クロマトグラフィーに用いたライセートは通常と同様に、回収した HEK293T細胞の重さの2倍量の 1 \times lysis buffer (1 \times Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM DTT を含む) に懸濁し、ダウンスホモジナイザーを用いて 4 $^{\circ}\text{C}$ で破碎した後、17,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分の遠心分離をおこなった際の上清を用いた。二回目のゲルろ過クロマトグラフィーに用いたライセートは HEK293T細胞の重と等量の 1 \times lysis buffer (1 \times Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM DTT を含む) に懸濁し、以下、同様の操作を行った。用いたライセート量は二回とも 150 μL である。Buffer は 1 mM DTT を含む 1 \times lysis buffer を用い、合計 3 mL の buffer で各フラクション 200 μL ずつ溶出できるように設定した。

Halo-Siwi を用いた切断アッセイ

まず、MagneTM HaloTag[®] Beads (Promega) を 1 \times lysis buffer で 2 回洗った後、120 μL の Halo-Siwi を過剰発現する BmN4 ライセートと 25 $^{\circ}\text{C}$ で 90 分間インキュベートした。通常の切断アッセイを行う場合は 1 \times lysis buffer で 3 回洗った後、4 つに分け (t1A、t1U、t1G、t1C)、6 μL の BmN4 ライセートと、3 μL の 40 \times reaction mix、1 μL いずれかの標的 S₁U RNA を加え (終濃度 \sim 1 nM)、計 10 μL の反応系で 25 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間以上インキュベートすることで切断アッセイを行った。Wash 条件を変える場合は、インキュベート後の MagneTM HaloTag[®] Beads (Promega) を 0.8 M NaCl と 1 % Triton X-100 (WAKO) を含む 1 \times lysis buffer で beads を 3 回洗った後、1 \times lysis buffer でさらに 3 回洗った後、4 つに分け (t1A、t1U、t1G、t1C)、6 μL の lysis buffer または BmN4 ライセート、3 μL の 40 \times reaction mix、1 μL いずれかの標的 S₁U RNA を加え

(終濃度 ~1 nM)、計 10 μ L の反応系で 25 $^{\circ}$ C で 8 時間インキュベートすることで切断アッセイを行った。反応液は除タンパク質処理を行った後、共沈剤として 1 μ L のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿を行った。乾燥した後、ホルムアミド loading dye を加えて 8 M 尿素を含む 6 % ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動を行った。ゲルを乾燥した後に FLA-7000 image analyzer (Fujifilm) でシグナルを検出し、Image Gauge software (Fujifilm) で画像を解析した。尚、標的 RNA 切断時に加えた BmN4 ライセートは、野生型のものであり、本研究で用いるライセートの作成方法に従って細胞を破碎し、その後破碎液を 17,000 \times g で遠心した際の上清を用いた。

V. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、手厚いご指導下さった泊幸秀教授に心より感謝申し上げます。泊教授と生データを挟んで議論することを通し、一つのデータから沢山の情報を読み取る能力、できるだけシンプルに物事を切り分けて解析して行く方法、あらゆる可能性を見通して先回りして計画する習慣、など実に多くのことを学びました。piRNAの研究に関しては、12ヶ月にわたり条件検討の時期が続き、なかなか決め手になるデータが出ず、心が折れそうになる時もありました。けれど、いつも冷静で前向きな泊教授の姿勢を見習うことで、一喜一憂せずに前に進んで行くことができました。

本研究の審査過程において数々のご指導とご助言を下さいました、東京大学大学院新領域創成科学研究科 伊藤耕一教授、東京大学放射光連携研究機構生命科学部門 深井周也准教授、東京大学大学院理学系研究科 程久美子准教授、東京大学農学生命科学研究科 勝間進准教授に深謝致します。著者の研究に真剣に耳を傾けて下さり、中間報告会や予備審査の際に厳しくも的確なコメント、アドバイスを頂けたからこそ、今このように博士論文を書き上げることができました。

コールドスプリングハーバー研究所 河岡慎平博士には実験材料のご協力として、FLAG-Siwi及びFLAG-BmAgo3をサブクローニングしたpIZ/V5-His vector (Invitrogen)を頂きました。河岡博士には材料のご協力の他にも多大なるご指導を頂きました。研究室に所属して以来現在に至るまで、研究に関していつも気にかけて下さったことを感謝致します。キュリー研究所 依田真由子博士にはpCAGEN-ヒトAgo2のプラスミドを頂きました。当研究室の泉奈津子博士にはHalo-SiwiをサブクローニングしたpIZ/V5-His vectorを頂きました。お二人には実験のアドバイスだけに限らず、キャリアのアドバイスや日常の他愛ない会話に至るまで、様々な面でサポート頂き感謝しております。

本論文のII-(3)の、パイオインフォマティクスを用いたPIWIタンパク質の標的RNA網羅的解析は、マサチューセッツ州立大学、Phillip D. Zamore教授およびvisiting studentのWei Wang氏によりなされたものです。感謝申し上げます。

本研究の遂行過程と、本論文をまとめるにあたり、多大なる助言とご指導を下さいました泊研究室の皆様へ心よりの感謝を申し上げます。岩崎信太郎博士、包昭久博士、Pieter Bas Kwak博士、岩川弘宙博士、佐々木浩博士には、研究室に所属した当初からご指導を賜り、研究に行き

詰まった時や悩みがある時は相談に乗って下さりました。私も先輩方のように、後輩の指導ができ、面倒が見られるよう、精進したいと思います。三嶋雄一郎博士、松浦絵里子博士には、博士2年生時より共に研究させて頂きました。新しい視点からの的確なアドバイスを下さいましたこと、本当にありがたく思っております。

共に切磋琢磨した Juan Guillermo Betancur さん、深谷雄志さん、小林真希さん、一緒に3年間研究ができたことを幸せに思います。辛い時はお互いを励まし合い、嬉しい時は喜びを分かち合いながら研究を続けられたことは、本当に幸せなことです。ありがとう。

遠洞弥生さんと成瀬健さんは、同じ時期に研究室に所属し始めたということで、佐々木博士も含めた4人で新人歓迎会の練習を頑張った日を昨日のこのように思い出します。それ以降も定期的に4人で食事に行けたことは、日々の研究の活力と成りました。白晃玖さん、大籠健司さん、新沼翔さん、渡辺真里子さんとも一緒に研究ができて嬉しかったです。これからの泊研究室をリードして行って下さい。様々なサポートを下さった技術補佐員の三富みゆきさん、田代真沙美さん、清川香織さん、ありがとうございました。そして皆が充実した研究生活を送ることができるよう、いつも細やかなケアをしてくださった秘書の武田晴美さんに心から感謝申し上げます。

2012年、約3ヶ月に渡り、リサーチインターンシップを受け入れて下さった、南アフリカの Kwazulu-Natal Research Institute for Tuberculosis and HIV (K-RITH)、Alexander Pym 博士にも心より御礼申し上げます。薬剤耐性結核が広がる現場の真実、そこに軸足を置いて研究するということの厳しさ等、短い時間に私に最大限のことを学ばせようと、チャレンジングな課題に取り組みさせて下さり、愛情に溢れた視線で見守って下さったことを感謝致します。

最後になりましたが遠くからいつも温かな愛情を持って見守ってくれた奈良の家族と旦那の盛島正人さんに感謝します。特に南アフリカにリサーチインターンシップに行くと言った時には、色々心配をかけたことと思いますが、私の夢を応援して下さいありがとうございました。これからも、この3年間で学んだ全てのことを糧に、次のステップへと進んでゆきたいと思っております。

VI. 参考文献

1. Slotkin, R. K. & Martienssen, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* **8**, 272-285 (2007).
2. Finnegan, D. J. Retrotransposons. *Curr Biol* **22**, R432-R437 (2012).
3. Munoz-Lopez, M. & Garcia-Perez, J. L. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* **11**, 115-128 (2010).
4. Kidwell, M. G. & Kidwell, J. F. Selection for male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **84**, 333-351 (1976).
5. Bingham, P. M., Kidwell, M. G. & Rubin, G. M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a P-strain-specific transposon family. *Cell* **29**, 995-1004 (1982).
6. Brookfield, J. F., Montgomery, E. & Langley, C. H. Apparent absence of transposable elements related to the P elements of *D. melanogaster* in other species of *Drosophila*. *Nature* **310**, 330-332 (1984).
7. Khurana, J. S. et al. Adaptation to P element transposon invasion in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **147**, 1551-1563 (2011).
8. Biemont, C. & Vieira, C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **443**, 521-524 (2006).
9. Wilson, J. E., Connell, J. E. & Macdonald, P. M. aubergine enhances oskar translation in the *Drosophila* ovary. *Development* **122**, 1631-1639 (1996).
10. Lin, H. & Spradling, A. C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **124**, 2463-2476 (1997).
11. Williams, R. W. & Rubin, G. M. ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6889-6894 (2002).
12. Cox, D. N., Chao, A. & Lin, H. piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* **127**, 503-514 (2000).
13. Brennecke, J. et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089-1103 (2007).
14. Kalmykova, A. I., Klenov, M. S. & Gvozdev, V. A. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res* **33**, 2052-2059 (2005).
15. Aravin, A. et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203-207 (2006).
16. Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z. & Lin, H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* **20**, 1709-1714 (2006).
17. Lau, N. C. et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* **313**, 363-367 (2006).
18. Saito, K. et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev* **20**, 2214-2222 (2006).
19. Watanabe, T. et al. 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 (2006).
20. Vagin, V. V. et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* **313**, 320-324 (2006).
21. Houwing, S. et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* **129**, 69-82 (2007).

22. De Fazio, S. et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* **480**, 259-263 (2011).
23. Klattenhoff, C. & Theurkauf, W. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* **135**, 3-9 (2008).
24. Siomi, M. C. & Kuramochi-Miyagawa, S. RNA silencing in germlines--exquisite collaboration of Argonaute proteins with small RNAs for germline survival. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 426-434 (2009).
25. Thomson, T. & Lin, H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 355-376 (2009).
26. Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. & Hannon, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* **16**, 2733-2742 (2002).
27. Hock, J. & Meister, G. The Argonaute protein family. *Genome Biol* **9**, 210 (2008).
28. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854 (1993).
29. Elkayam, E. et al. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* **150**, 100-110 (2012).
30. Schirle, N. T. & MacRae, I. J. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* **336**, 1037-1040 (2012).
31. Kawamata, T., Yoda, M. & Tomari, Y. Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. *EMBO Rep* **12**, 944-949 (2011).
32. Parker, J. S., Roe, S. M. & Barford, D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* **434**, 663-666 (2005).
33. Ma, J. B. et al. Structural basis for 5' end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**, 666-670 (2005).
34. Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T. & Patel, D. J. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456**, 209-213 (2008).
35. Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B. Structural basis for 5' nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* **465**, 818-822 (2010).
36. Czech, B. et al. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell* **36**, 445-456 (2009).
37. Czech, B. et al. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* **453**, 798-802 (2008).
38. Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z. & Zamore, P. D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA* **16**, 43-56 (2010).
39. Montgomery, T. A. et al. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**, 128-141 (2008).
40. Mi, S. et al. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**, 116-127 (2008).
41. Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* **49**, 493-500 (2008).
42. Wu, L. et al. Rice MicroRNA effector complexes and targets. *Plant Cell* **21**, 3421-3435 (2009).
43. Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
44. Wang, Y. et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**, 754-761 (2009).
45. Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P. & Patel, D. J. Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* **486**, 368-374 (2012).

46. Liu, J. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441 (2004).
47. Meister, G. et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**, 185-197 (2004).
48. Gunawardane, L. S. et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* **315**, 1587-1590 (2007).
49. Reuter, M. et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* **480**, 264-267 (2011).
50. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655 (2009).
51. Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* **10**, 94-108 (2009).
52. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 126-139 (2009).
53. Ketting, R. F. The many faces of RNAi. *Dev Cell* **20**, 148-161 (2011).
54. Khvorovova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216 (2003).
55. Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).
56. Forstemann, K., Horwich, M. D., Wee, L., Tomari, Y. & Zamore, P. D. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by *dicer-1*. *Cell* **130**, 287-297 (2007).
57. Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. & Siomi, M. C. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* **18**, 1655-1666 (2004).
58. Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P. D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**, 299-308 (2007).
59. Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 953-960 (2009).
60. Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Sarnow, P. & Kay, M. A. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 144-150 (2009).
61. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798 (2003).
62. Slotkin, J. R. et al. In vivo quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells. *Dev Dyn* **236**, 3393-3401 (2007).
63. Saito, K. et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature* **461**, 1296-1299 (2009).
64. Klattenhoff, C. et al. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters. *Cell* **138**, 1137-1149 (2009).
65. Pane, A., Jiang, P., Zhao, D. Y., Singh, M. & Schupbach, T. The Cutoff protein regulates piRNA cluster expression and piRNA production in the *Drosophila* germline. *EMBO J* **30**, 4601-4615 (2011).
66. Nishimasu, H. et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* **491**, 284-287 (2012).
67. Ipsaro, J. J., Haase, A. D., Knott, S. R., Joshua-Tor, L. & Hannon, G. J. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* **491**, 279-283 (2012).
68. Kirino, Y. & Mourelatos, Z. 2'O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 417-418 (2007).

69. Kawaoka, S., Izumi, N., Katsuma, S. & Tomari, Y. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. *Mol Cell* **43**, 1015-1022 (2011).
70. Honda, S. et al. Mitochondrial protein BmPAPI modulates the length of mature piRNAs. *RNA* **19**, 1405-1418 (2013).
71. Liu, L., Qi, H., Wang, J. & Lin, H. PAPI, a novel TUDOR-domain protein, complexes with AGO3, ME31B and TRAL in the nuage to silence transposition. *Development* **138**, 1863-1873 (2011).
72. Olivieri, D., Sykora, M. M., Sachidanandam, R., Mechtler, K. & Brennecke, J. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J* **29**, 3301-3317 (2010).
73. Saito, K. et al. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* **24**, 2493-2498 (2010).
74. Zhang, F. et al. UAP56 couples piRNA clusters to the perinuclear transposon silencing machinery. *Cell* **151**, 871-884 (2012).
75. Li, C. et al. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* **137**, 509-521 (2009).
76. Malone, C. D. et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* **137**, 522-535 (2009).
77. Lau, N. C. et al. Abundant primary piRNAs, endo-siRNAs, and microRNAs in a *Drosophila* ovary cell line. *Genome Res* **19**, 1776-1785 (2009).
78. Kirino, Y. et al. Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol* **11**, 652-658 (2009).
79. Kirino, Y. et al. Arginine methylation of Aubergine mediates Tudor binding and germ plasm localization. *RNA* **16**, 70-78 (2010).
80. Lim, A. K. & Kai, T. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6714-6719 (2007).
81. Kawaoka, S. et al. The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA* **15**, 1258-1264 (2009).
82. Kawaoka, S. et al. A role for transcription from a piRNA cluster in de novo piRNA production. *RNA* **18**, 265-273 (2012).
83. Izumi, N. et al. Hsp90 facilitates accurate loading of precursor piRNAs into PIWI proteins. *RNA* **19**, 896-901 (2013).
84. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15-20 (2005).
85. Grimson, A. et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**, 91-105 (2007).
86. Reuter, M. et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* **480**, 264-267 (2011).
87. Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M. C. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* **19**, 2837-2848 (2005).
88. Rivas, F. V. et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 340-349 (2005).
89. Yoda, M. et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 17-23 (2010).
90. Iwasaki, S. et al. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* **39**, 292-299 (2010).
91. Kwak, P. B. & Tomari, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 145-151 (2012).

92. Kamal, A. et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425**, 407-410 (2003).
93. Leu, J. I., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E. & George, D. L. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell* **36**, 15-27 (2009).
94. Ye, X. et al. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 650-657 (2011).
95. Betancur, J. G. & Tomari, Y. Dicer is dispensable for asymmetric RISC loading in mammals. *RNA* **18**, 24-30 (2012).
96. Zekri, L., Kuzuoglu-Ozturk, D. & Izaurralde, E. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J* **32**, 1052-1065 (2013).
97. Behm-Ansmant, I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**, 1885-1898 (2006).
98. Eulalio, A., Helms, S., Fritsch, C., Fauser, M. & Izaurralde, E. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* **15**, 1067-1077 (2009).
99. Eulalio, A., Triteschler, F. & Izaurralde, E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **15**, 1433-1442 (2009).