

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 PIWI タンパク質の標的塩基認識機構

氏名 吉川真由

### 研究の背景と目的

#### (1) piRNA 複合体の生物学的意義

真核生物のゲノムの恒常性を乱す要素のひとつに、トランスポゾンとよばれる転写因子がある。真核生物はこのような利己的な因子から生殖細胞を守る、さまざまな仕組みを進化させてきた。その中心的役割を果たすものが、生殖細胞特異的に発現するPIWIタンパク質と、それに結合するpiRNAと呼ばれる23~30塩基小分子RNAからなる複合体である。PIWIタンパク質はArgonauteファミリーに属し、ショウジョウバエやマウスの遺伝学的な解析から、生殖系列細胞の形成・維持に重要な因子として同定され、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明らかになっている。

#### (2) piRNA の生合成経路

piRNA の生成合成過程は、一次生成過程と増幅経路であるピンポンサイクルとに大別できる。一次生成過程では、piRNA クラスターと呼ばれるゲノム領域から長い一本鎖 RNA が転写されることから始まる。続いて、Zucchini 等のリボヌクレアーゼの切断を受け断片化された後、1塩基目がウラシル(1U)のpiRNAが選択的にある種のPIWIタンパク質と結合する。その後、トリマーと呼ばれる因子により3'末端が削られ、成熟piRNAとなる。一方、ピンポンサイクルはPIWIタンパク質の切断活性に基づいた生合成過程である。PIWIタンパク質も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し、新たな成熟piRNAとなる。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10A piRNAの対が多いという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(図1)。

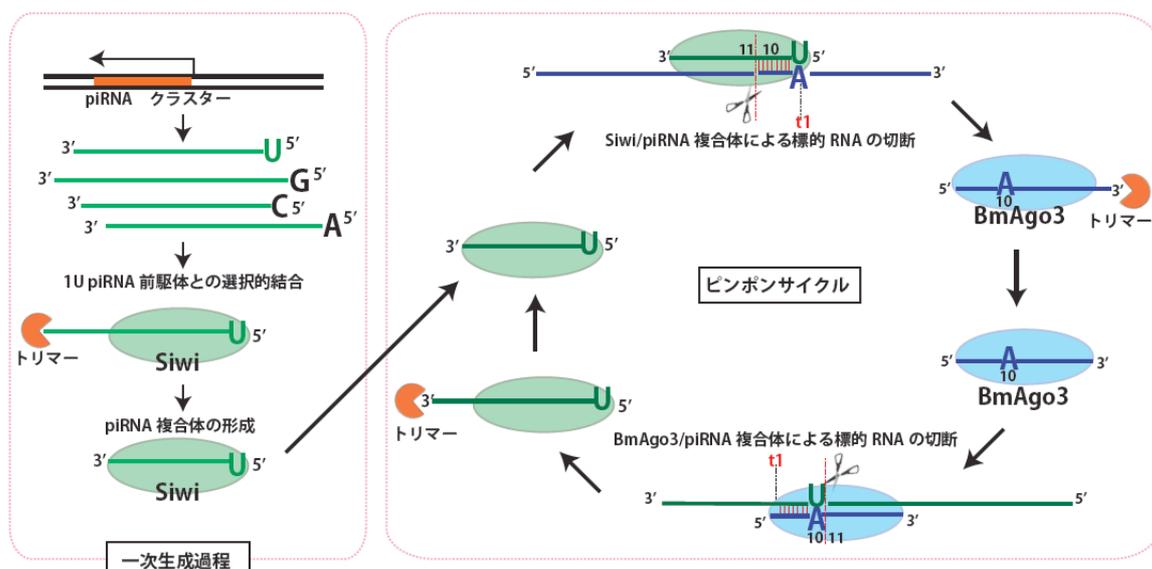


図1 BmN4細胞におけるpiRNAの生合成経路

### (3) カイコ *in vitro* 系

si/miRNA 生合成経路については生化学的に詳細に解析されてきたのに対し、piRNA の生化学的な研究は難航を極めていた。その原因は、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にあった。そんな中、東京大学大学院農学生命科学研究科、生産環境生物学専攻の勝間進先生と我々の研究室では、数年前より共同で piRNA を発現するカイコ卵巣由来の培養細胞 BmN4 を活用して piRNA の生化学的解析をすすめてきた。BmN4 細胞には Siwi と BmAgo3 という 2つの PIWI タンパク質が発現し、Siwi 結合 piRNA には、トランスポソンのアンチセンス鎖に由来する (相補的な) 配列の 1U piRNA が多く、BmAgo3 結合 piRNA にはセンス鎖に由来する 10A piRNA が多い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 を示す対が多い (Kawaoka *et al.*, 2009)。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 (図 1)。

### (4) PIWI タンパク質の標的認識と切断活性

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、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 1 塩基目は 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 と塩基対を形成しない可能性が高いことが明らかになった

(Elkayam *et al.*, 2012; Schirle and MacRae, 2012; Nakanishi *et al.*, 2012)。さらに、網羅的な解析から、AGO タンパク質である hAgo2 は、自身と結合する小分子 RNA の 1 塩基目に関わらず、小分子 RNA の 5'末端塩基の向かいの標的 RNA 塩基 (t1) に A が多いことが知られている (Lewis *et al.*, 2005)。これらより、Argonaute ファミリータンパク質が t1A を選択的に認識する未知の性質を持つ可能性が考えられた (図 2)。

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 が多いことの説明がつく。一方、Siwi 結合 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 と Siwi には t1 塩基の選択性に明らかな違いがある事が示唆された。そこで私は、何故 PIWI タンパク質の t1 塩基の選択性に違いが見られるのか、生化学的に検証するために本研究を行った。

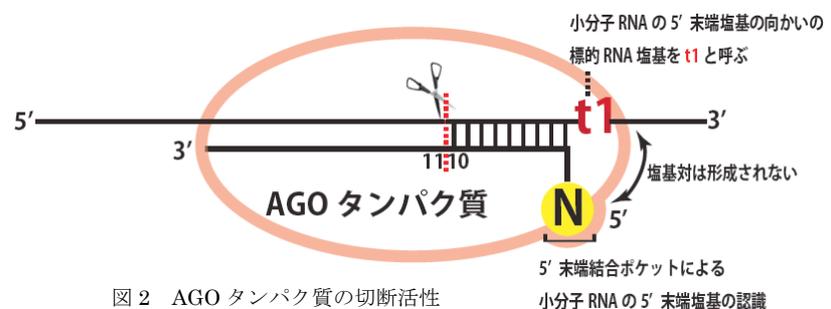


図 2 AGO タンパク質の切断活性

## これまでの研究成果

### (1) Siwi タンパク質には t1A の選択性が存在し、BmAgo3 には存在しない

まず私は、Siwi および BmAgo3 の切断活性を *in vitro* で解析する系を確立した。BmN4 細胞に FLAG-Siwi あるいは FLAG-BmAgo3 を恒常的に発現させ、細胞抽出液から免疫沈降を行った。それらを用いて、Siwi/BmAgo3 それぞれに結合する内在の 1U piRNA と 1C piRNA に対する標的 RNA について、t1 塩基が A/U/G/C の 4 通りの場合で切断アッセイを行い、切断効率を比較した。その結果、Siwi は、t1A の標的 RNA の切断効率が高かった。一方、BmAgo3 は t1 塩基に依らず、4 種の標的 RNA で同程度の切断効率を示した (図 3)。この結果から Siwi には hAgo2 等と同様、t1A を優先的に切断する性質がある一方で、BmAgo3 にはそのような性質が無いことが示された。

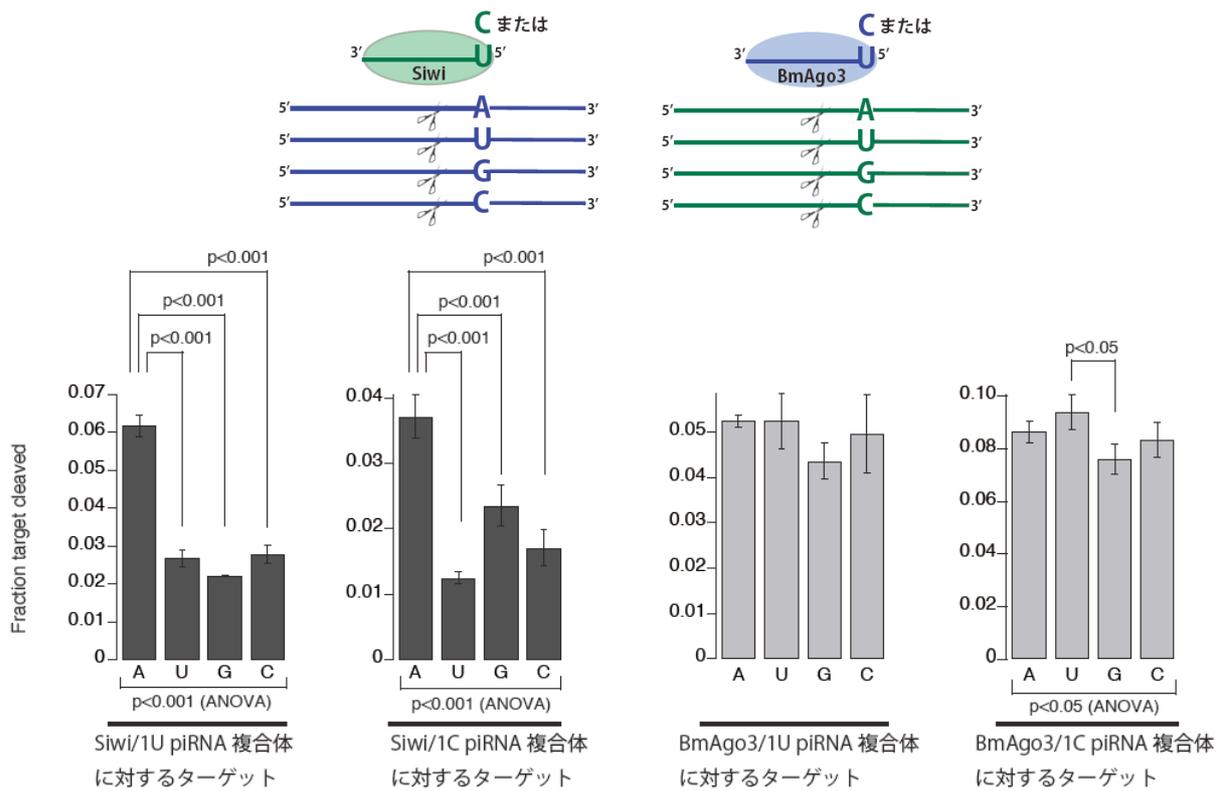


図3 内在の Siwi/BmAgo3 を用いた標的 RNA 切断アッセイ

(2) MID-PIWI ドメイン部分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い

続いて、この t1 塩基の選択性の違いが Siwi/BmAgo3 それぞれのタンパク質自身の性質の違いによるものかどうかを検証することを試みた。しかし、リコンビナントの PIWI タンパク質を全長で発現する事が困難であったので、標的認識と切断に関与する MID-PIWI ドメイン部分の Siwi、BmAgo3、および hAgo2 それぞれのリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現した。そして、それぞれのリコンビナントタンパク質にガイド RNA を取り込ませ、標的 RNA の切断アッセイを行った。その結果、(1) で内在の Siwi タンパク質を用いた場合には t1A の選択性が観察されたこととは対照的に、リコンビナントタンパク質を用いた場合は Siwi、BmAgo3、hAgo2 のいずれの場合も t1A の選択性は観察されなかった (図 4)。

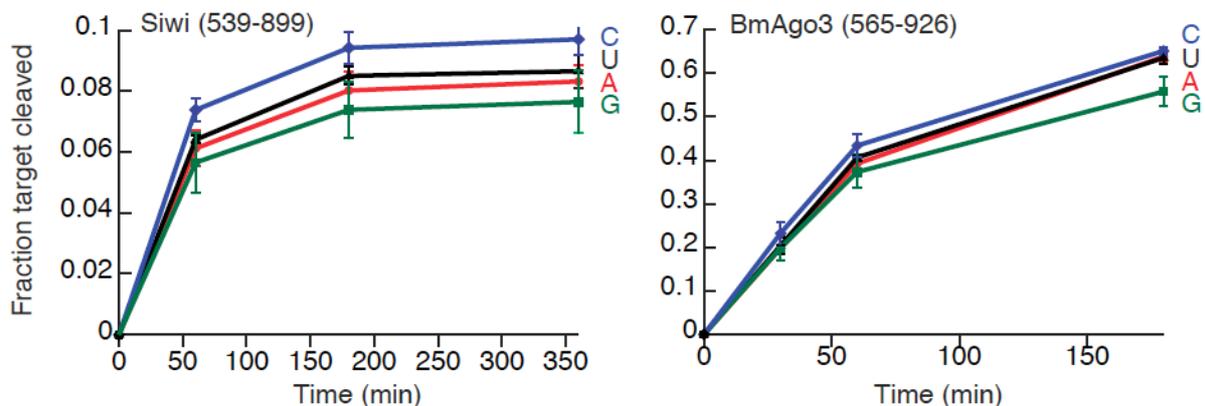


図4 リコンビナントタンパク質を用いた標的 RNA 切断アッセイ

(3) 細胞中の因子が t1A の選択性に関与している

MID-PIWI ドメインのリコンビナントタンパク質で t1A 選択性が観察できなかった要因として、① PIWI/AGO タンパク質全長でないから② t1A の選択性は PIWI/AGO タンパク質に相互作用のある細胞中の他の因子によるものだから、という 2 つの可能性が考えられた。しかし、上記したようにリコンビナントの PIWI タンパク質は全長で発現する事が困難であり、また、内在の PIWI タンパク質は

*in vitro* でガイド RNA を取り込ませる事も難しい。そこで、既にアッセイ系の確立された hAgo2 を用いて②の可能性を検討することにした。

FLAG-hAgo2 を HEK293T 細胞に一過的に過剰発現し、細胞抽出液と二本鎖 RNA を混ぜ、hAgo2 にガイド RNA を取り込ませた。その細胞抽出液をそのまま用いて標的 RNA を切断させた場合は t1A の選択性が観察された。しかし、hAgo2 にガイド RNA を取り込ませた後、免疫沈降を行い、塩濃度の高いバッファーで洗う事で、できるだけ hAgo2 に結合する他の因子を取り除いた上で標的 RNA を切断すると、t1A の選択性は消滅した。ところが、驚くべき事に、切断時に細胞抽出液を再び加え戻すと、t1A の選択性が復活することが観察された (図 5)。これらのことより、hAgo2 において t1A の選択性は hAgo2 タンパク質自身の性質によるのではなく、細胞抽出液中の未知の因子による事が強く示唆された。また、切断時に、フェノール・クロロホルム沈殿を行った細胞抽出液の上清を加え戻すと、t1A の選択性が復活しなかった事より、t1A の選択性を生み出す未知の因子がタンパク質である事が示された。

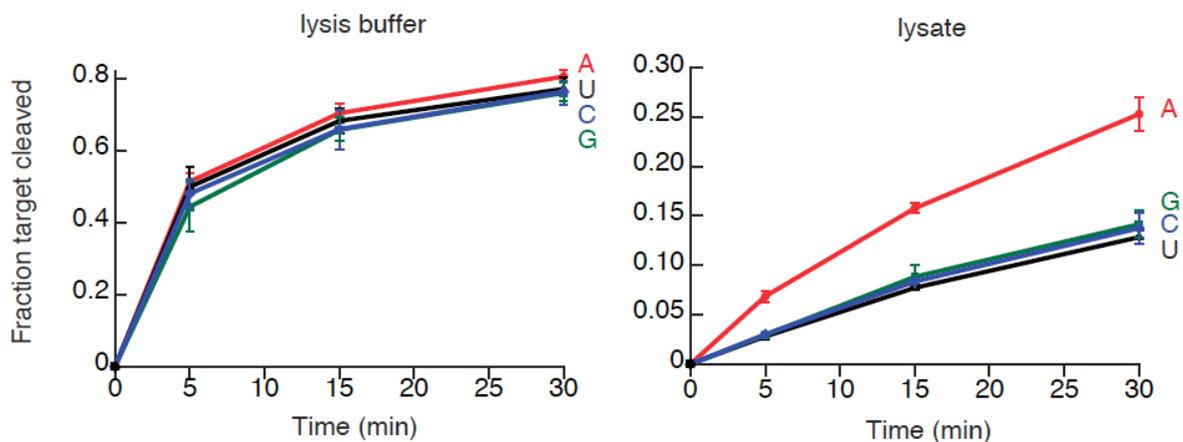


図 5 hAgo2 を用いた標的 RNA 切断アッセイ

## 考察

現在までの結果により、PIWI/AGO タンパク質の t1A の選択性は PIWI/AGO タンパク質自身の性質によるのではなく、細胞中の未知のタンパク質による事が強く示唆された。標的を切断しないヒトの miRNA の網羅的な標的予測によっても t1A の選択性が見られている事より、その t1A の選択性を生み出す未知の因子は、標的の切断時ではなく認識時に作用していると考えられる。今後、PIWI タンパク質における更なる解析が必要ではあるが、現在までの結果から考えられるモデルのひとつとして、piRNA における t1A の選択性を生み出す未知の因子は Siwi と BmAgo3 へ異なる相互作用を持ち、標的 RNA の認識段階に作用することによって t1 塩基の選択性に違いを生み出していると考えられる。

## 引用文献

- Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2012) The structure of human Argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, **150**: 100–110
- Getahun H, Sculier D, Sismanidis C, Grzemska M, Raviglione M (2012) Prevention, diagnosis, and treatment of tuberculosis in children and mothers: evidence for action for maternal, neonatal, and child health services. *J Infect Dis*, **205 Suppl 2**: S216–7
- Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y, Abe H, Sugano S, Tomari Y, Shimada T, Katsuma S (2009) The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA*, **15**: 1258–264
- Keshavjee S, Gelmanova IY, Farmer PE, Mishustin SP, Strelis AK, Andreev YG, Pasechnikov AD, Atwood S, Mukherjee JS, Rich ML et al. (2008) Treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Tomsk, Russia: a retrospective cohort study. *Lancet*, **372**: 1403–409
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**: 15–0
- Nakanishi K, Weinberg DE, Bartel DP, Patel DJ (2012) Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, **486**: 368–74
- Schirle NT, MacRae IJ (2012) The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, **336**: 1037–040