

トランスポゾン抑制因子 piRNA による生殖細胞ゲノムの恒常性維持機構

慶應義塾大学 医学部 分子生物学教室

齋藤 都暁

1. はじめに

ゲノムプロジェクトの成果から、真核生物ゲノムの膨大な領域（ヒトでは45%）がトランスポゾン（利己的遺伝子）に占められることが分かった。トランスポゾンは転移能を持ち、生物進化の原動力となった一方で、必須遺伝子に挿入することにより、致死的、もしくは疾患の原因となることが知られている（Belancio et al., *Genome Res.*, 2008）。従って生物はトランスポゾンの脅威から自身のゲノムを防衛するシステムを有している。これまでに、トランスポゾンに由来する piRNA と呼ばれる小分子 RNA がその中核を成すことが明らかとなっている（reviewed in Saito & Siomi, *Dev. Cell*, 2010）。piRNA は生殖巣特異的に発現し、Piwi と呼ばれる RNAi 関連因子と相互作用する。Piwi 遺伝子変異体は、レトロトランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞発生異常が起こる。従って、次世代形成が不能となる。しかし、piRNA が生殖巣で如何に造られ、選択的にトランスポゾンを抑制し、機能するかは不明な点が多い。そこで本研究は piRNA によるトランスポゾン抑制の分子経路を明らかにし、生物ゲノムが次世代に安定して継承されるシステムを理解する。

Piwi は Argonaute ファミリーに属する遺伝子である。Argonaute ファミリーは小分子 RNA と直接結合する事によってその塩基配列に従って標的 RNA を認識し、それに作用する事によって標的遺伝子の発現を抑制する。ショウジョウバエでは 5 種類の Argonaute タンパク質 (AGO1 と AGO2、AGO3、Aubergine、Piwi) があり、Piwi は生殖巣特異的に発現する。これらショウジョウバエ Argonaute に結合する小分子 RNA はお互い異なっており、さらには各 Argonaute が機能する RNA サイレンシング経路は独立して存在する事が示されている。これまでショウジョウバエ Piwi タンパク質に焦点をあて研究を進めた結果、Piwi は、レトロトランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する小分子 RNA (piRNA) と結合する事によってレトロトランスポゾンの発現を抑制する因子である事 (Saito et al. *Genes & Dev.* 2006)、piRNA が Pimet によって 3' 末端メチル化修飾を受ける事 (Saito et al. *Genes & Dev.* 2007)、などを明らかにした。更に、piRNA 生合成因子の同定を目指し、ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞 OSC (Saito et al. *Nature* 2009) において、RNAi 法による遺伝子ノックダウン法や過剰発現系を確立した。そこで、OSC を用いて piRNA の生合成、及び作用機構の解明を目指した。

2. 方法

OSC において Piwi をノックダウンすると、piRNA 量の減少と、レトロトランスポゾンの発現上昇（脱抑制）が起こる。これまでに Piwi 相互作用蛋白質として Armitage を同定し、これが piRNA 生合成に関わることを報告した (Saito et al. *Genes & Dev.* 2010)。更に、Armitage に対するマウスモノクローナル抗体を用いて解析を行った結果、Yb と呼ばれる生殖巣形成に必要な蛋白質を見いだした。Yb は Yb body と呼ばれる顆粒状構造体の中心因子であり、これをノックダウンするとやはり piRNA の減少が認められた。従って、Yb body は piRNA 生合成の場であると考えられる。そこで本研究は、① RNAi によるトランスポゾン抑制因子のスクリーニング、② トランスポゾン抑制因子の中で、piRNA 生合成過程へ関わる遺伝子を抽出、③ Yb body の形成や局在を検討することで piRNA 生合成過程における分子的作用の検討、の 3 点を行うことで、スクリーニングで得られたトランスポゾン抑制因子群の役割検討を行うこととした。次に具体的手法について述べる。① スクリーニング候補遺伝子を得るため、Armitage や Yb に対するモノクローナル抗体を作製し免疫沈降することで、Yb body 構成因子の同定を行った。構成因子群に対する siRNA を設計し、OSC にトランスフェクションすることにより、遺伝子ノックダウンを行った。ノックダウン細胞におけるトランスポゾン mRNA 量を定量的 PCR によって検討した。② トランスポゾンの脱抑制が認められた遺伝子をノックダウンし、全 RNA を抽出した。次に、ノザンプロット法によって piRNA 量を定量し、piRNA 生合成に関与するか否か検討した。③ piRNA 量に変動した遺伝子をノックダウンし、その細胞における Yb body の形態を免疫染色法によって検討した。また、各 piRNA

生合成遺伝子のcDNAを取得し、発現ベクターに挿入した。OSCにおいてpiRNA生合成因子の局在を検討し、機能する細胞内の場を特定した。以上の解析を遂行し、トランスポゾン抑制因子のスクリーニングと機能特定を行った。

3. 結果

①RNAiによるトランスポゾン抑制因子のスクリーニング

ArmitageやYbに対するモノクローナル抗体を作製し免疫沈降することで、Yb body構成因子の同定を行った。その結果、CG7194及びItp-r83AがArmitage複合体に含まれていることを見いだした。これらをスクリーニング対象遺伝子に加えた。更に、スクリーニング候補遺伝子を抽出するため、mRNA-seqを行い、FPKM値を指標にOSCで発現が高い遺伝子を同定した。OSC及びコントロールとして体細胞由来培養細胞S2を用い、FPKM値を比較した。その結果、OSCの高発現遺伝子上位200位には、リボソーム蛋白質などハウスキーピング遺伝子が多く含まれる一方、Piwi、ArmitageなどのpiRNA関連遺伝子もその中に含まれることが分かった。また、既知のトランスポゾン抑制に働く遺伝子、例えば、HP1a, spn-E, maelstromは、上位1000位以内であったことから、トランスポゾン抑制に関連する遺伝子群の発現量は、OSCにおいて非常に高いと推測した。そこで、OSCでFPKM値の高い遺伝子、RNAとの相互作用に働くドメインを有する遺伝子、ヘテロクロマチン形成に機能する遺伝子、RNA分解酵素遺伝子などを、Flybaseアノテーション情報をもとに抽出し、スクリーニング対象遺伝子群とした。計118種の遺伝子をスクリーニング対象とし、siRNAを用いたノックダウンによって、トランスポゾン抑制因子を探索した。その結果、既知のトランスポゾン抑制関連遺伝子群 (Piwi, Armitage, fs(1)Yb, Zucchini, Vreteno, Squash, Spindle E, Hsp83, HP1a, Maelstrom) に加えて、2つの新規因子(CG2183, shutdown)がトランスポゾンの抑制に必須であることを見いだした。

②piRNA生合成因子の同定

スクリーニングで得られた2つの新規遺伝子がpiRNA生合成に関与するか検討した。OSCにおいてノックダウンを行い、全RNA抽出後、piRNAに対するプローブを用いてノザンプロットを行ったところ、CG2183及びshutdownノックダウン細胞において、piRNAの減少が認められた。従って、CG2183及びshutdownは、piRNA生合成因子として機能することが示唆された。piRNAの減少量の比較を行った結果、ArmitageやZucchini, fs(1)Ybは、コントロールと比較して、約90%のpiRNA減少が認められた。しかし、CG2183やshutdownノックダウン細胞では、約50%の減少であった。複数種のpiRNAに対するプローブを用いたが、量が減少するpiRNA種に特異性は存在しなかった。更に、CG2183やshutdownノックダウン時にPiwiや他のpiRNA生合成因子の蛋白質安定性についてwestern blotにより検討したが、蛋白質量の減少は認められなかった。

③新規トランスポゾン抑制因子の分子機能解析

CG2183及びshutdownの分子機能を解析するため、cDNAをクローニングし、Mycタグが付加された遺伝子を発現するベクターに挿入した。OSCに各発現ベクターを導入し、抗Mycタグ抗体を用いて免疫染色した結果、CG2183はミトコンドリアに、shutdownは細胞質全体に局在する蛋白質であった。既知のpiRNA生合成因子であるZucchiniもミトコンドリアの細胞質側表面に局在することから、CG2183もミトコンドリア上でpiRNAの生合成に機能する可能性が示唆された。Mitoprotと呼ばれるミトコンドリアターゲティングシグナルの予測プログラムを使うと、ZucchiniはN末端にミトコンドリア局在化シグナルが認められたが、CG2183では検出できなかった。次に、CG2183やshutdownのノックダウンによって、ミトコンドリアやYb bodyが影響を受けるか否か検討した。その結果、両遺伝子のノックダウンを行っても、Yb bodyやミトコンドリアの数や形態に特に変動は認められなかった。

4. 考察

ゲノムの約半分を占める膨大な数のトランスポゾンは、発現が低いこと、コピー数が多いこと、などの理由から解析があまり行われていなかった。しかし、piRNAの発見から、トランスポゾンは従来考えられていたよりも動的なものであり、発現抑制と解除のバランスが巧妙に制御されていることが示唆された。本研究及びこれまでの国内外の研究から、発現抑制に機能する分子が明らかにされつつある。今回の解析から、新たに二つのトランスポゾン抑制因子が見いだされた。CG2183はミトコンドリア蛋白質であり、Zucchiniと同様、ミトコンドリア機能がpiRNA生合成に関与することを示唆する。一方、shutdownは細胞質全体に局在し、Yb bodyやミトコンドリアに特に局在する蛋白質ではなかった。ドメイン構造予測から、shutdownは、ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ (PP1ase) ドメインを有し、FKBPファミリーに属する蛋白質である。shutdown変異ハエは雌生殖巣形成異常を来し、不稔となることが報告されている (Munn

and Steward. *Genetics*, 2000)。しかしながらその分子機能の詳細は不明であった。今回の解析により、shutdownはpiRNAの生合成に機能することでトランスポゾン抑制し、生殖巣ゲノムの安定的維持に機能することが示唆された。今後、shutdownが結合する蛋白質を同定することによって、どの蛋白質がペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ活性の基質となるか検討する必要があると考える。

ゲノムプロジェクトから真核生物ゲノムの蛋白質コード領域はたかだか数%であり、配列の多様性、総数ともにトランスポゾンの数は莫大である。生物は、自身が持つエネルギーや資源（糖やイオン、核酸など）を有効にトランスポゾン以外の遺伝子発現に用いる必要がある。すなわち、トランスポゾン制御機構の理解は、細胞が持つゲノム情報利用のもっとも根幹に関わる研究であるという点で重要である。従って、本研究でトランスポゾン抑制に関わる因子が非常に多く存在することが明らかにできたのは、妥当であると考えられる。今後、本研究で用いたスクリーニング手法を用いることで、更に多くのトランスポゾン抑制因子が同定できると期待している。

5. 発表論文・参考文献

Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res.* 18:343-358 (2008)

Munn K, Steward R. The shut-down gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel FK506-binding protein essential for the formation of germline cysts during oogenesis. *Genetics* 156:245-256 (2000)

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

Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes & Dev.* 21:1603-1608 (2007)

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

Saito K, Siomi MC. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Dev. Cell* 19:687-697 (2010)

Saito K, Ishizu H, Komai M, Kotani H, Kawamura Y, Nishida KM, Siomi H, Siomi MC. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes & Dev.* 24:2493-2498 (2010)