

# 生殖細胞特異的 RNA サイレンシング機構に関する研究

東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻

佐藤 薫

## 1. はじめに

20 から 30 塩基長の小分子 RNA によって引き起こされる遺伝子発現抑制機構を RNA サイレンシングと呼ぶ。その代表例は RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) である。RNAi の発見以来、RNA サイレンシングに関する基礎研究は飛躍的に進み、この機構が発生や代謝、ウイルス感染防御といった、生命に欠かせない多くの現象を遺伝子発現レベルで制御していることが明らかになってきた<sup>1</sup>。RNA サイレンシングにおいて中核的な役割を担う因子は Argonaute タンパク質であり、これらは生殖細胞特異的に発現する PIWI サブファミリーとほぼ全組織で恒常的に発現する AGO サブファミリーに分類され、いずれもタンパク質群も線虫からヒトまで広く保存されている<sup>2</sup>。

PIWI サブファミリーは、piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる 24~29 塩基長の生殖細胞特異的な小分子 RNA と結合する事によって機能する。piRNA は、microRNA や内源性 siRNA といった小分子 RNA の生合成とは独立した経路によって産生されており<sup>3</sup>、その多くは、ゲノム上の転移因子、特にレトロトランスポゾンに由来する。Piwi タンパク質群は、piRNA の塩基配列特異的に標的遺伝子に作用することによって、転移因子の発現を抑制し、それらのゲノムへの侵略を防ぎ、生殖細胞のゲノムの品質管理を担っている事が明らかになってきた<sup>4</sup>。piRNA が産生されないと、減数分裂が進行せず、卵や精子が正常に形成されなくなり、種の保存は成立しなくなる。マウスやショウジョウバエにおける遺伝学的な解析から、piRNA による標的遺伝子の発現抑制過程には、ヘテロクロマチン化や DNA のメチル化などのエピジェネティックな制御機構が介在することが示唆されているが、その分子機構の詳細はまったく明らかになっていなかった。本研究では、ショウジョウバエ piRNA に焦点を当て、piRNA-Piwi 複合体がどのようにして転移因子などの標的遺伝子の発現を抑制しているのか、その仕組みを明らかにすることを目指した。今回、Piwi 核内複合体の構成因子として Maelstrom (Mael) を同定し、核内における Mael の役割について解析した結果を報告する。

## 2. 方法

・ショウジョウバエ卵巣性体細胞株 OSC の核質抽出法の検討

ヒト培養細胞を用いた古典的な細胞分画法を参考にして、OSC における細胞分画の条件検討を行った。具体的に、細胞の低張処理後の細胞破砕法の検討、核分画からの核抽出液の調整法、について検討した。

・免疫沈降法を用いた Piwi 複合体の単離

抗 Piwi モノクローナル抗体<sup>5</sup> を吸着させた Dynabeads (Invitrogen) に、OSC 抽出液を加え、4°C で 2 時間反応させた。免疫沈降法により得られた複合体構成因子はウェスタンブロット法により解析した。

#### ・ OSCにおけるMaelのノックダウンとレスキュー実験

*mael*に対する二本鎖小分子RNAをOSCにトランスフェクションすることにより、*mael*のノックダウンを行った<sup>6</sup>。二本鎖小分子RNAが標的とする*mael* cDNA内の配列を同義置換することで、RNAi耐性型Maelを作出した。

### 3 . 結果

近年、当研究室で樹立したショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞株 OSC は、piRNA や Piwi が発現している唯一のショウジョウバエ培養細胞株であり、OSC を用いた生化学的な解析により、piRNA の生合成過程が明らかにされてきた<sup>6,7</sup>。Piwi は細胞質における Yb 顆粒体において piRNA と結合した後、核内に移行し、転移因子の発現を抑制していると考えられている<sup>6,7</sup>。核内において、piRNA-Piwi 複合体がどのように転移因子の発現を抑制しているのか、その分子機構を明らかにするために、OSC を用いて Piwi 核内複合体の構成因子の同定を行った。

まず、Piwi 核内複合体を単離するに辺り、OSC の核抽出法を検討した。従来の核抽出法に基づき、OSC を 10 mM KCl の低張液で処理したところ、細胞質と核を分離し、核のみを単離することができた。また、この際の細胞破碎は行わなくても十分核画分を得ることができることを明らかにした。さらに、収集した核を 400 mM KCl の高張液で処理(塩抽出)することにより、核質を抽出できることを明らかにした。RNA サイレンシングに関わるいくつかの因子に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、この核質成分には、細胞質における Yb 顆粒体構成因子である Armitage はほとんど含まれていない一方、piRNA 因子の一つである Maelstrom (Mael)が含まれていることが分かった。

次に、得られた核質より、抗 Piwi モノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により、Piwi 複合体を単離した。それに含まれるタンパク質成分を SDS-PAGE により分離後、いくつかの piRNA 因子に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、Mael が検出された。

OSC において Mael は、主に細胞質に局在し、わずかに核内にも局在がみられた。RNAi 法を用いて *mael* のノックダウンを行ったところ、piRNA 量に減少はみられなかったが、解析したいいくつかの転移因子の発現が上昇していた。また、この Mael をノックダウンした OSC における転移因子の脱抑制は、RNAi 耐性型 Mael の強制発現により回復できたことから、核移行シグナル(Nuclear Localization Signal; NLS) や核外移行シグナル(Nuclear Export Signal; NES)を付加した Mael をそれぞれ強制発現させた場合に、転移因子の脱抑制が回復するか、レスキュー実験を行った。その結果、NLS 付加 Mael を強制発現させた OSC では転移因子の抑制がみられたが、NES 付加 Mael ではみられなかった。

### 4 . 考察

Mael は、ショウジョウバエだけでなくヒトなどの脊椎動物まで広く保存された遺伝子であり、マウスにおいてはショウジョウバエ同様 piRNA 因子の一つとして知られている。また、Mael は、核と細胞質を移行する分子として知られている<sup>8,9</sup>。これまでに我々は、ショウジョウバエ Mael が卵形成過程において、微小管・中心体形成に関与することを明らかにしているが<sup>10</sup>、この微小管・中心体形成の制御は Mael の細胞質における機能であると考えられる。本研究により、核内において、Mael が Piwi と共に転移因子の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかにした。最近、Piwi がヒストン修飾や RNA ポリメラーゼ

II の機能を制御することにより、転移因子の発現を抑制していること、さらに、この抑制には Mael も寄与していることが報告された<sup>11</sup>。しかし、Piwi や Mael が核内で具体的にどのような分子と相互作用し、転移因子の発現を制御しているのか、については全く明らかになってされていない。今後、引き続き、免疫沈降法を用いて他の Piwi 核内複合体構成因子を同定するとともに、抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降により、核内における Mael 複合体構成因子についても明らかにしていきたい。これらの解析により、piRNA-Piwi 複合体が転移因子のゲノム状態に与える影響を分子レベルで解明できると考えている。

## 5 . 参考文献

1. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. (2009) 457:396-404.
2. Williams RW, Rubin GM. ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2002) 99:6889-6894.
3. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2009) 10:126-139.
4. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2011) 12:246-258.
5. 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*. (2006) 20: 2214-2222.
6. 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*. (2009) 461:1296-1299.
7. 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*. (2010) 24:2493-2498.
8. Findley SD, Tamanaha M, Clegg NJ, Ruohola-Baker H. Maelstrom, a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development*. (2003) 130:859-871.
9. Aravin AA, van der Heijden GW, Castañeda J, Vagin VV, Hannon GJ, Bortvin A. Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS Genet*. (2009) 5:e1000764.
10. Sato K, Nishida KM, Shibuya A, Siomi MC, Siomi H. Maelstrom coordinates microtubule organization during *Drosophila* oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes Dev*. (2011) 25:2361-2373.
11. Sienski G, Dönertas D, Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell*. (2012) 151:964-980.