

生殖ゲノムを保護する piRNA の生成経路の解明

東京大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻

西田 知訓

研究の背景

有性生殖動物は、卵子と精子の遺伝子の組み換えにより多様な子孫を作る。生殖細胞の異常な分化による卵子と精子の形成不全は、次世代に重篤な悪影響を及ぼす。この重篤な悪影響を及ぼす原因の1つとして、トランスポゾンの無作為なゲノム上の転移による遺伝子破壊が挙げられる。そのため、生物はトランスポゾンの発現を抑制する機構を進化させてきた。生殖細胞特異的に発現するPIWIタンパク質は、25〜30塩基長のpiRNA (PIWI-interacting RNA) と piRISC (piRNA-induced silencing complex) を形成し、piRNAの配列に相補的なトランスポゾンmRNAの発現を転写段階または転写後段階で抑制する。piRNAは、始めに第一次生成経路で生成された後、第二次生成経路で増幅される。piRNAの素となるRNA前駆体は、piRNAクラスターと呼ばれるゲノム領域から転写される。これまでにpiRNA生成経路に関与する因子は多数同定されてきた。しかし、これら因子のpiRNA生成経路における詳細な分子機能については未だよく判っていない。

私は、カイコ卵巣由来の生殖細胞から樹立した培養細胞であるBmN4を実験材料として用い、piRNA生成経路の解明を試みた。カイコでは、2種類のPIWIタンパク質 (Siwi と Ago3) が piRNA と結合し、piRNA生成経路も保存されている。これまでに、第二次生成経路において Siwi-piRISC から Ago3 への piRNA 中間体の受渡しに RNA ヘリカーゼである Vasa が必要であることを *in vitro* アッセイ系を用いた解析から示した (Nishida et al. 2015)。さらに、ミトコンドリア局在因子である Papi と エンドヌクレアーゼである Zuc の機能により、piRNA 中間体から piRNA が生成される新規 piRNA 生成経路のモデルを提唱した (Nishida et al. 2018)。しかし、もう一つの経路である第一次生成経路は、どの因子がどのように機能して piRNA を生成するのかは判っていない。

研究の目的

これまでに行った解析から、Spn-E が第一次生成経路に関与し、Siwi と Qin とともに複合体を形成することを示した (Nishida et al. 2015)。Spn-E と Qin は、共にショウジョウバエやマウスにおいて piRNA 生成に重要な因子であることが判っているが、分子機能については不明であった。私が、Siwi をノックダウンした BmN4 で mRNA seq を行ったところ、顕著に発現上昇が見られる新規 LTR 様 トランスポゾン Count Down (CD) を同定した。また、Qin は、CD 由来 piRNA の生成に関与し、CD mRNA の発現を抑制するために重要であることが判った。一方、Spn-E は、CD 由来 piRNA の生成に影響は無いが、その他のトランスポゾン由来 piRNA の生成に関与した。つまり、Spn-E と Qin は第一次生成経路で異なる piRNA の生成を制御していることが示唆された。しかし、Spn-E と Qin は同じ複合体を形成するにも関わらず、異なる piRNA の生成で機能する仕組みは判らなかった。そこで、Spn-E と Qin に特異的に結合する新規因子および piRNA 前駆体を同定することで、同じ複合体を形成するにも関わらず、異なる piRNA を生成する仕組みを明らかにすることを目的とした。

研究結果

1. Qin または Spn-E に結合する新規 piRNA 生成経路因子の同定

Spn-EとQinは、同じ複合体を形成するにも関わらず、異なるpiRNAを生成することがわかった。しかし、この異なる仕組みを未だ明らかになっていないため、この複合体形成よりも上流過程でQinまたはSpn-Eに結合する新規piRNA生成経路因子の同定を試みた。コントロールまたはそれぞれの因子をRNAiでノックダウンしたサンプルから、それぞれの抗体を用いて免疫沈降を行い、ショットガン解析を試みた。その結果、それぞれ約300因子が得られた。一段階目のスクリーニングとして、これら因子をノックダウンしたサンプルと比較して、タンパク質の量比のスコアが1.5以上ある因子をそれぞれ56(Qin結合因子)と71(Spn-E結合因子)個抽出した。二段階目のスクリーニングとして、RNA結合能または核酸結合能を持つ因子を更に11(Qin結合因子)と15(Spn-E結合因子)個選別した(図1)。これらの因子に対するdsRNAを作製し、BmN4細胞を用いたRNAi法によりノックダウンを行い、ノーザンブロット法を用いてpiRNAの生成量を確認した。その結果、2因子(タンパク質EとF)について、RT3 piRNAの量に変化が見られないが、CD piRNAの量の劇的な減少が見られた(図2)。

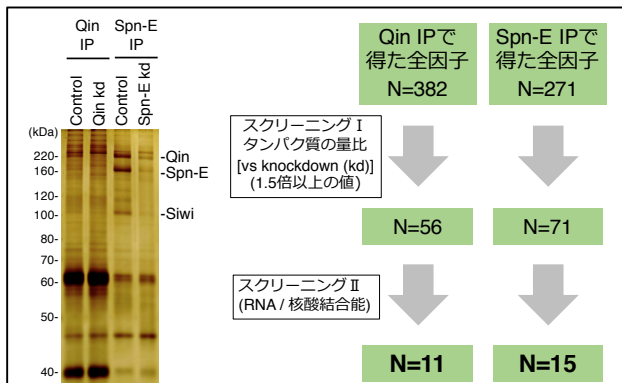


図1. 相互作用因子のスクリーニング

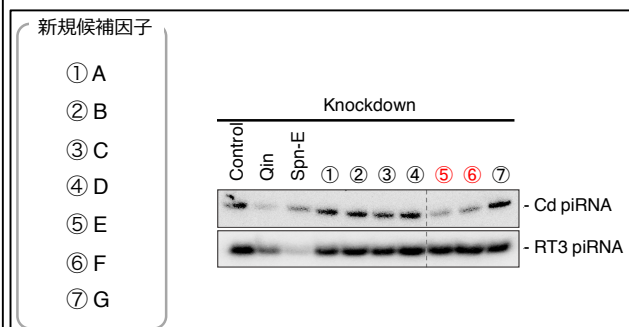


図2. タンパク質EとFはCd piRNAの生成に関与する

2. CD piRNAを生成するpiRNA前駆体の探索

カイコのデータベースは、整備されておらず不完全なゲノム配列しか判っていなかった。そのため、piRNAの元となるpiRNA前駆体を転写するpiRNAクラスターを同定することは、非常に困難であった。最近、Kawamotoらが報告した論文により、詳細にカイコゲノムが読まれ、データベースが整備された。そこで、私は、Siwiに結合するCd piRNAを新しいゲノム配列にマップすることで、Cd piRNAクラスターの同定を試みた。その結果、2つの染色体の一部の領域で、Cd断片が挿入されており、piRNAがマップされることが判った。おそらく、これらの領域からpiRNA前駆体が転写されていると考えられた。

考察と今後の予定

本研究で、piRNA生成に関与する新規因子を同定するに至った。更に、カイコのCd piRNAクラスターと推測されて領域の情報も得ることができた。これら因子の生化学的機能を明らかにすることで、piRNA生成経路を更に明らかにすることができると考える。

現在、同定した新規piRNA生成因子の機能を明らかにするため、トランスジーンを用いた生化学的解析を試みている。更に、内在の同定された因子の機能を解析するために、抗体作製そして作製した抗体を用いた生化学的解析を進めている。