

転移因子と Argonaute の軍拡競争からゲノムの進化を探る

Fathoming the evolution of gene regulation through an 'arms race' between transposons and Argonautes



塩見 春彦 (SIOMI HARUHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究の概要

転移因子とRNAサイレンシングの間の「軍拡競争」が複雑なゲノムの進化をもたらしたことを示唆する「なごり」を見出す。本研究では、1) 宿主遺伝子の発現制御に関与する (miRNA以外の) 小分子RNAの同定と、2) RNAサイレンシングによる転移因子抑制機構とその疾患/幹細胞生物学への関与、を中心に解析を進める。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：転移因子、RNAサイレンシング、Argonaute、ゲノム、進化

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの場合、全体の45%以上が転移因子 (transposable elements; TE) 及びその残骸で占められている。このようなTEは、最近まで、利己的DNAと見なされ、宿主にとって中立かまたは、むしろ転移の結果、ゲノム損傷を引き起こし、害を与えるものと捉えられてきた。しかし、近年のゲノム解析から、宿主とTEとの間の軍備拡張競争 ('arms race'、つまり、TEの転移、それに対抗する宿主のTE抑制機構、そしてそれに対抗するTEの抑制/回避機構等々)の結果がゲノムを形づくって来たことが明らかになりつつある。この軍拡競争の宿主側の重要な'arms'が「RNAサイレンシング」であり、その機構における鍵となる因子が Argonaute (AGO)と20~30塩基長の小分子RNAである。RNAサイレンシングはRNAiやmiRNAに代表される配列特異的な遺伝子発現抑制機構であり、AGOと小分子RNAが結合し、作動複合体 (RISC)の中核を形成する。RISCは小分子RNAの相補的塩基対合により標的特異性を示す。ショウジョウバエの遺伝学的な解析から幾つかのRNAサイレンシング因子がTEの抑制に関与していることが明らかになって来た。

2. 研究の目的

本研究の目標は、TEとRNAサイレンシング

機構の間の「軍拡競争」の結果が複雑な遺伝子発現制御を進化させ、それらが特にAGOを中核とする「生命活動を支えるプログラム」に組み込まれてきたことを理解することにある。このため、TEの抑制に関与する小分子RNAを同定し、その生合成経路を理解し、そして、それら小分子RNAとAGOが形成するRISCがどのようにTEを抑制するかを解析する。その上で、その機構がTEのみならず、細胞の遺伝子発現制御に関与していることを解析し、理解して行く。

3. 研究の方法

5種類のAGOタンパク質 (AGO1, AGO2, AGO3, Aub, Piwi) が存在するショウジョウバエをモデル動物として用い、これらAGOそれぞれに特異的に反応するモノクローナル抗体を作成する。それらを用い、個々のAGOが形成する複合体の構成因子 (タンパク質とRNA)を生化学的に精製同定し、そしてそれらを生物情報学的に解析する。In vitroのアッセイ系を構築し、さらに、遺伝学的解析を加えることで、TEの抑制と細胞遺伝子の制御、そしてそれらの疾患及び幹細胞生物学への関与を理解する。

4. これまでの成果

ショウジョウバエ AGO タンパク質は普遍的に発現している AGO サブファミリー (AGO1, AGO2) と生殖細胞特異的な PIWI サブファミリー (AGO3, Aub, Piwi) とに分類される。これらの解析から、AGO2 が結合する新規内在性小分子 RNA である endo-siRNA (esiRNA) を発見した。また、esiRNA 経路が TE の抑制に関与していることを示した。この結果、ショウジョウバエには TE 抑制に関与する RNA サイレンシング経路が少なくとも2つ存在することが明らかになった。一つは生殖細胞特異的な PIWI-piRNA 経路であり、もう一つが体細胞における AGO2-esiRNA 経路である。

ショウジョウバエ卵巣における piRNA 合成経路の解析から、piRNA には少なくとも2つの合成経路が存在することがわかった。一つは PIWI の Slicer 活性 (RNase H 様の小分子 RNA にガイドされた標的 RNA の切断活性) を用いた、TE 両鎖 (センス/アンチセンス) 転写産物の相互切断とプロセッシングによる合成 ('Ping-pong cycle' と呼ばれる) であり、この経路の Slicer 活性は主に細胞質に局在する AGO3 と Aub により供与される。Ping-pong cycle において、TE 転写産物は piRNA 前駆体でありかつ piRNA の標的である。したがって、この系では piRNA 合成と TE 抑制がカップルしており、TE は細胞質で転写産物が切断されることにより抑制される。もう一つの合成経路は Slicer 活性に依存しない系 ('primary processing pathway' と呼ばれる) であり、この系路は主に生殖体細胞 (follicle cell 等) で機能し、成熟 piRNA は Piwi と結合した後、核に移行し、TE の抑制を行う。

さらに、primary processing pathway により合成される piRNA の配列解析から、Piwi が制御する重要な遺伝子の一つとして *FasIII* を同定した。*FasIII* は細胞接着因子であり、体細胞ニッチ-生殖幹細胞相互作用に極めて重要な働きを持つことが遺伝学的解析から知られている。遺伝学的な解析から *piwi* の体細胞ニッチでの発現が生殖幹細胞の自己新生と分化に必須であることは既に示されていたが、その分子機能は不明であった。*piwi* 変異体卵巣では体細胞ニッチにおける *FasIII* の発現が昂進し、その結果、(*FasIII* は homophilic な接着因子であるため) 体細胞同士が接着凝集し、生殖幹細胞とうまく混じり合わないことが *piwi* 変異体における生殖幹細胞形成異常の1つの原因であることを突き止めた。

ショウジョウバエ精巣における piRNA 合成経路の解析も進めた。精巣は卵巣と比べ小さく、また、培養細胞も存在しないため、生化学的な解析に用いる材料の収集に時間と労力がかかる。大学院生の献身により1万個

ほどのハエ精巣を集め、実験を行った結果、精巣においても Ping-pong cycle は存在するが、この系は TE の抑制に関与していないことがわかった。したがって、精巣には全く異なる TE 抑制機構が存在することを示唆する。

5. 今後の計画

今までと同様、生化学的な解析から得られた因子や RNA 分子の生物情報学的解析を進め、それをもとにアッセイ系の構築や遺伝学的解析を進めて行く。我々は既にショウジョウバエ卵巣由来の体細胞培養株 (OSC) を樹立したが、これを用いて、RNAi、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、ChIP アッセイ等を組み合わせることで、Piwi による TE 抑制機構の理解を深める。その上で、その仕組みがどのように細胞の遺伝子の発現制御に借用されているかを理解して行く。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, N.T., Siomi MC. and **Siomi, H.** 2008. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. *Nature* 453: 793-797.
2. Saito, K., Inagaki, S., Mituyama, T., Kawamura, Y., Ono, Y., Sakota, E., Kotani, H., Asai, K., **Siomi H.** and Siomi, MC. 2009. A regulatory circuit for *piwi* by *traffic jam*, a large Maf, in *Drosophila* gonadal somas. *Nature* 461: 1296-1299.
3. **Siomi, H.**, and Siomi, MC. 2009. On the road to reading the RNA interference code. *Nature* 457: 396-404.
4. Nagao, A., Mituyama, T., Huang, H., Chen, D., Siomi, MC., **Siomi, H.** 2010. Biogenesis pathways of piRNAs loaded onto AGO3 in the *Drosophila*. *RNA* 16: 2503-2515.

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/dmb/sindex.html>