

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	トランスポゾンと他の遺伝子を区別する仕組みーゲノムにおける自己と非自己認識システムー
研究機関・ 部局・職名	慶應義塾大学・医学部・准教授
氏名	齋藤 都暁

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年6月27日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた 額	利息等収入 額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	120,095,326	120,095,326	0	120,095,326	120,095,326	0	0
間接経費	36,028,597	36,028,597	0	36,028,597	36,028,597	0	0
合計	156,123,923	156,123,923	0	156,123,923	156,123,923	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	4,469,259	28,080,372	28,457,216	17,364,489	78,371,336
旅費	0	853,160	884,380	354,880	2,092,420
謝金・人件費等	0	7,527,421	12,262,879	5,413,901	25,204,201
その他	0	5,840,200	5,300,933	3,286,236	14,427,369
直接経費計	4,469,259	42,301,153	46,905,408	26,419,506	120,095,326
間接経費計	957,066	13,262,934	14,040,000	7,768,597	36,028,597
合計	5,426,325	55,564,087	60,945,408	34,188,103	156,123,923

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
微量高速冷却遠心機	トミー精工社製 MX-105 他	1	678,300	678,300	2011/3/4	慶應義塾大学
液体窒素保存容器	テイラーワートン社 製 LS-3000	1	641,261	641,261	2011/4/6	慶應義塾大学
マルチラベルリーダー	パーキンエルマー・ジヤ パン社製 ARVO X2システム 他	1	3,402,000	3,402,000	2011/7/1	慶應義塾大学

5. 研究成果の概要

生物のゲノムには、トランスポゾンというゲノム上を転移し動き回ることのできる塩基配列が数多く存在しています。本研究はトランスポゾンの無秩序増殖を防ぐ機構を解明し、生物が、必要な情報とそうでない情報とをどのように見分けているのかを明らかにすることを目的としています。モデル動物としてショウジョウバエを用いた解析を行った結果、私達は、トランスポゾン制御に必須な新規遺伝子を見だし、DmGTSF1と命名しました。更に、Zucchiniと呼ばれる蛋白質が、トランスポゾンを制御するのに重要な小分子RNAを作る酵素として働くことを発見しました。これらの遺伝子は哺乳類においても保存されており、今後、トランスポゾンの制御装置を利用した遺伝子治療や再生医療に新たな視点をもたらすと期待されます。

課題番号	LS109
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
研究成果報告書**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	トランスポゾンと他の遺伝子を区別する仕組み ーゲノムにおける自己と非自己認識システムー
	Understanding of underlying mechanisms that discriminate transposons from cellular genes -Self-nonsel self discrimination at the genome level-
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	慶應義塾大学医学部 准教授
	Associate professor, School of Medicine, Keio University
氏名 (下段英語表記)	齋藤 都暁
	Kuniaki Saito

研究成果の概要

(和文):

生物のゲノムには、トランスポゾンというゲノム上を転移し動き回ることのできる塩基配列が数多く存在しています。本研究はトランスポゾンの無秩序増殖を防ぐ機構を解明し、生物が、必要な情報とそうでない情報とをどのように見分けているのかを明らかにすることを目的としています。モデル動物としてショウジョウバエを用いた解析を行った結果、私達は、トランスポゾン制御に必須な新規遺伝子を見だし、DmGTSF1 と命名しました。更に、Zucchini と呼ばれる蛋白質が、トランスポゾンを制御するのに重要な小分子 RNA を作る酵素として働くことを発見しました。これらの遺伝子は哺乳類においても保存されており、今後、トランスポゾンの制御装置を利用した遺伝子治療や再生医療に新たな視点をもたらすと期待されます。

(英文):

The genome of living creatures is made up of a number of base sequences called “transposons”, which can transpose or move themselves to new positions within the genome. Goal of our study is to understand the underlying mechanisms that discriminate transposons from essential

protein-coding regions. To resolve this, we utilized fruit fly as a model organism, and identified the gene, DmGTSF1, as an essential factor for transposon regulation. Moreover, we found that Zucchini act as an enzyme, producing small RNAs needed for transposon regulation. Given that DmGTSF1 and Zucchini are conserved between fruit fly and mammals, the machinery and mechanisms of transposon regulation could be utilized to develop an entirely new procedure on genetic cures and regenerative medicine in the near future.

1. 執行金額 156,123,923 円

(うち、直接経費 120,095,326 円、 間接経費 36,028,597 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年6月27日

3. 研究目的

真核生物ゲノムは、トランスポゾンの無秩序増殖の脅威から自己防衛しつつ、自己の生存に必須な遺伝子群の発現を確保するシステムを持っている。言い換えれば、自己(生存に必須な遺伝子群)と非自己(トランスポゾン)を明確に区別する分子機構を備えている、と言える。これまでの解析からトランスポゾンの発現抑制の分子機構としてヘテロクロマチン化や DNA メチル化などのエピジェネティックな発現制御機構が明らかになっている。しかし、如何にしてトランスポゾンがトランスポゾンとして識別され、どのような分子経路を経て発現抑制に至るかは不明である。遺伝学的な解析から、このトランスポゾンの発現抑制に関与する遺伝子群が単離され、DNA メチル化酵素やヒストン修飾に関わる因子とともに Piwi 蛋白質群が同定された。2006 年、私を含む複数の研究グループが、Piwi 蛋白質群と結合する piRNA と名付けた約 25 塩基長の小分子 RNA 群を発見した。次世代型シーケンサーを用いた解析から、piRNA はトランスポゾンの転写産物に由来し、膨大な種類数(現在報告されているもので数 10 万種類以上)が同定された。また、配列をゲノムにマッピングした結果、piRNA が大部分のトランスポゾン領域をカバーすることが分かった。すなわち、piRNA は抑制を受けるトランスポゾンの断片化された配列情報である、と考えられる。Piwi 遺伝子群の変異体では、レトロトランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞の消失や発生異常が起こり不稔となる。piRNA を欠損する変異ハエ、変異マウスでは、各種トランスポゾンの脱抑制が見られる。私は、以上の解析結果を考えあわせ、piRNA がトランスポゾン認識のガイド分子として機能し、自己-非自己識別メカニズムのごく初期に機能するのではないかと、という着想に至った。そこで本研究は、piRNA 及び Piwi 蛋白質群の分子機能解明を足がかりに、ゲノム内自己-非自己識別メカニズムを理解することを目的とする。具体的には、モデル動物ショウジョウバエを用いて、(1)トランスポゾンと他の遺伝子の転写機構の違い、(2) piRNA 前駆体と他の転写産物の区別機構、(3)piRNA-Piwi 蛋白質群複合体の作用機構、を明らかにする。

#### 4. 研究計画・方法

ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞 OSC は piRNA や Piwi が発現し、非常にシンプルな実験系で機能解析ができる(Saito et al. Nature 2009)。更に高効率の RNAi やトランスフェクションによる過剰発現系も開発した。piRNA が発現する培養細胞で RNAi や過剰発現を遂行できる実験系は OSC 以外に例がなく、クロマチンリモデリング因子群などのノックダウンを簡便に行うことが可能である。従って、OSC を用いた生化学的アプローチによって、トランスポゾンの制御因子の機能を迅速かつ簡便に解明できる。そこで OSC を実験材料の中心に据え、以下の研究計画を立案した。

##### (1) トランスポゾンの発現抑制に重要な因子のスクリーニング

スクリーニングの候補遺伝子として、Piwi と相互作用する蛋白質因子、ヘテロクロマチン形成に重要な既知因子、Piwi と同様の表現型を示すハエ遺伝子、という 3 つの観点から解析を進める。各候補遺伝子のノックダウンを行い、トランスポゾンの発現量を定量的 PCR によって解析する。トランスポゾンの発現に影響した遺伝子がコードする蛋白質に対するマウスモノクローナル抗体の作製を行う。この解析では複数のトランスポゾン制御遺伝子群が得られる可能性があり、各因子の相互作用様式を免疫沈降法で検討する。

##### (2) piRNA 発現の分子機構

これまでに piRNA は長い前駆体 RNA として転写され、細胞質において短い RNA へとプロセシングされることを見いだしている。そこでアイソトープで標識した前駆体 RNA と、大腸菌を用いて精製した Piwi 蛋白質、そして OSC の抽出液を用いた *in vitro* の piRNA 生合成系を立ち上げる。この実験系をもとに piRNA の生合成に関わる因子をスクロースグラジエント法やゲル濾過などの分画法と質量分析を用いた生化学的実験系によって明らかにする。得られた因子に対するモノクローナル抗体を作製し、各因子の相互作用蛋白質や細胞内局在を解析し、piRNA 生合成経路の理解を目指す。piRNA と他の RNA 分子との違いを見分ける分子機構を検討するため、各因子が結合する RNA 配列や構造的特徴を解析する。解析には次世代型シーケンサーや RNA 分子の質量分析等の手法を用いる。

##### (3) piRNA-Piwi 複合体の作用機構

Piwi-piRNA 複合体によるトランスポゾン識別機構を探る。これまでに、OSC やショウジョウバエ生殖巣において、Piwi が核に局在することを報告している(Saito et al. Nature 2009)。そこで、Piwi に対するモノクローナル抗体(取得済み)を用いた免疫沈降実験を行い、piRNA が直接相互作用する核酸分子(DNA もしくは RNA と予想される)を同定する。(1)の解析で得られた因子群のノックダウンによって、トランスポゾン領域のヒストンコードや転写装置との相互作用が変化するかを ChIP 法で解析し、トランスポゾン領域のエピゲノム変化を検討する。

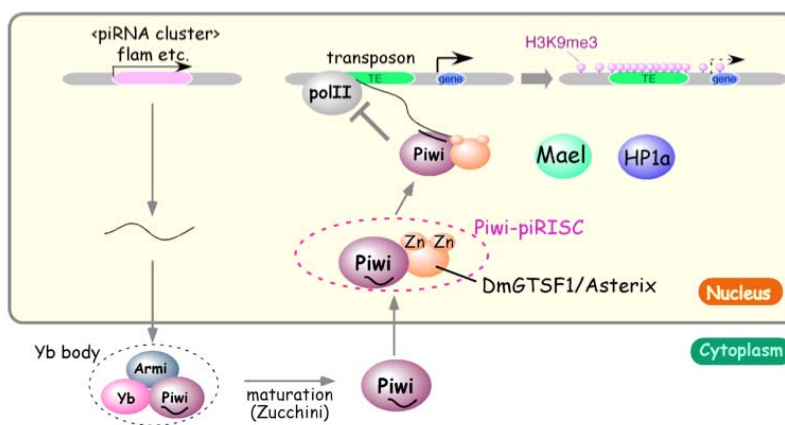
以上の(1)から(3)の項目を達成することで、トランスポゾンが如何に識別され、発現抑制されるかを、piRNA の生合成段階、転写抑制段階の各段階で明らかにする。

5. 研究成果・波及効果

(1)研究成果

培養細胞 OSC を用いて piRNA 生合成に関わる因子をスクリーニングした結果、Armitage、fs(1)Yb、Zucchini、Hsp83、CG2183、Shutdown、Squash、Vreteno が piRNA 生合成に必須であることを明らかにした。しかし、これら因子群の具体的な分子機能は不明である。これまでにこれらの因子群は 3 つのグループに分類されることを明らかにした。1: Yb body 内の因子、2: ミトコンドリア局在因子、3: 細胞質全体に局在する因子、である。従って、細胞内局在の制御によってトランスポゾン(piRNA 前駆体)と他の遺伝子の識別が行われている示唆された。これら因子群の中で、ミトコンドリア局在因子 Zucchini は、その piRNA 生合成過程における重要性は明らかなものの、どのような分子機能を持つのかは不明であった。Zucchini のマウスホモログ MitoPLD は、PLD スーパーファミリーに属し、カルジオリピン(CL)をフォスファチジン酸(PA)に変換する触媒活性を持つことが知られる。一方、Zucchini のバクテリアホモログ Nuc は、DNA 及び RNA 切断酵素活性を持つことが報告されていた。そこで Zucchini が脂質代謝に関わることで piRNA 生合成に寄与するのか、それとも核酸切断活性を介して piRNA 生合成に関わるのか、検証することとした。我々は Zucchini の構造学的解析を東京大学の濡木博士と連携する一方、脂質代謝活性解析を東北大学の青木博士と連携し、遂行した。その結果、Zucchini に CL を PA に変換する触媒活性は認められず、立体構造解析は Zucchini が核酸認識に働くことを示唆した。そこで我々は、培養細胞 OSC において、

Zucchini の立体構造から示唆される核酸認識能、核酸切断能に重要なアミノ酸残基に変異を導入し、その重要性を OSC 細胞によるレスキュー実験で証明した。更に、Zucchini が試験管内で RNA 切断能を有することを証明した。以上の成果から、Zucchini が piRNA 生合成過程において、piRNA 前駆体を成熟型 piRNA に変換する RNA 切断酵素として働くと



(図) 本研究で得られた成果をもとに提唱したトランスポゾン制御機構モデル

いうモデルを提示した(図)(Nishimasu et al. Nature 2012)(Saito K. 日本分子生物学会ワークショップ招待講演 2012)。

一方、トランスポゾン抑制に関わる因子群について、解析した結果、Maelstrom、HP1a、Spindle E、CG3893 遺伝子が重要であることを明らかにした。詳細な機能解明を行った結果、CG3893 は piRNA 生合成には関与しないこと、核局在蛋白質であること、Piwi 同様ショウジョウバエ雌の生殖能に必須であること、Piwi-piRNA 複合体と相互作用すること、CG3893 が持つ Zn-finger motif がト

ランスポゾンの抑制に必須であること、などを明らかにした。以上の解析結果をまとめ、CG3893 遺伝子を DmGTSF1 と命名し、その機能解析の結果を学術誌に掲載 (Ohtani et al. Genes & Dev 2013)するとともに国外のミーティングにて発表した(図) (Saito K. Microsymposium on small RNA, Austria 招待講演 2013)。

### (2)研究の先進性と優位性

piRNA 生合成経路における Zucchini の RNA 切断活性の発見(Nishimasu et al. Nature 2012)は、Nature Structural & Molecular Biology 誌の Research Highlights においても紹介されており、今後の piRNA 生合成機構の研究において重要な発見であると紹介されている(Heinrichs A. Zucchini has bite, NSMB 19: 1067 (2012))。この発見は、microRNA 生合成経路における Dicer の発見に匹敵するものであり、先進性の高い研究と考える。更に、ランスポゾン抑制に働く DmGTSF1 の発見は、初めて核内 Piwi-piRNA のパートナー分子を明らかにした報告である(Ohtani et al. Genes Dev. 2013)。この研究は、Nature Reviews Molecular Cell Biology 誌の Research Highlights において取り上げられており(David R. PIWI' s new assistant, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14: 544 (2013))。今後のランスポゾン制御研究に拍車をかけるものである。

### (3)ライフイノベーションの推進への寄与と波及効果

遺伝子発現のセントラルドグマでは、転写制御機構やスプライシング、翻訳機構など蛋白質が作られるまでの正の遺伝子発現機構がこれまで研究された。一方、機能性小分子 RNA の解析から、高等真核生物では小分子 RNA 群による遺伝子発現の負の制御カスケードが生命にとってきわめて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。これは、遺伝子発現のセントラルドグマを大きく改変することにつながった。現在、miRNA と呼ばれる小分子 RNA に関しては、総説や論文を通じて広く認知されており、癌などの疾患の原因として研究対象とされた例が報告されている。しかし、piRNA と呼ばれる一群の小分子 RNA に関しては、生殖細胞の維持・形成に必須であることが報告されているものの詳細な分子機構は不明である。ゲノム配列の解読がほぼ完了した今、「生命の設計図の解明」につながる次の大きなステップの一つは、膨大な数の小分子 RNA による生命活動を支える制御プログラムを理解することであり、本研究はその最前線に位置する研究であり、ライフイノベーションの理念と合致するものである。第一級の学術誌に成果が掲載されたことも本研究の重要性を強く示している。

これまで、蛋白質をコードする mRNA に関しては、輸送因子や poly(A)配列付加とその意義など、これまで盛んに研究されてきた。しかし、ランスポゾン由来の転写産物は、ほぼ全ての細胞種で簡単に検出できるほど発現しているのに対し、その転写物の情報(RNA 構造、修飾構造)については明らかとされていない。本研究は新たな RNA 代謝装置を見いだしたものであり、新たな RNA 代謝システムの発見につながる可能性が高い。将来的には、得られた違いが如何に達せられるかその分子機構の詳細が明らかになり、人工的に自己-非自己識別を操作することで、その破綻が生物の進化や維持継承に如何に影響をあたえてきたか解析することが可能になると期待する。従って、本研究は、RNA 研究分野、エピゲノム研究分野、生殖細胞研究分野の今後の研究に貢献すると考える。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 (*: Corresponding author) Nishimasu K, Ishizu H, <u>Saito K</u>, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, *Siomi MC, *Nureki O. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. <b>Nature</b> 491: 284-287 (2012)</p> <p>*<u>Saito K</u>. The epigenetic regulation of transposable elements by PIWI-interacting RNAs in Drosophila. <b>Genes &amp; Genetic Systems</b> 88: 9-17 (2013)</p> <p>Ohtani H, Iwasaki YW, Shibuya A, Siomi H, *Siomi MC, *<u>Saito K</u>. DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in Drosophila. <b>Genes &amp; Development</b> 27: 1656-1661 (2013)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件 <u>Kuniaki Saito</u>, piRNA pathways in Insect. Monterey, California (U.S.A.), 2011 年 3 月 20 日-25 日、Keystone symposia</p> <p><u>Kuniaki Saito</u>, Characterization of the primary piRNA biogenesis factors in Drosophila ovarian somas. Monterey, California (U.S.A.) 2011 年 3 月 20 日-25 日、Keystone symposia</p> <p><u>齋藤都暁</u> piRNA によるショウジョウバエ転移因子の抑制機構 第 83 回日本遺伝学会年会 京都 (2011 年 9 月)</p> <p><u>齋藤都暁</u> 拡大する miRNA 研究 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 大阪 (2011 年 7 月)</p> <p><u>Saito K</u>, Ohtani H, Shibuya A, Iwasaki YW, Siomi MC and Siomi H. Role of a Zn-finger protein, DmGTSF1, in the effector phase of the Drosophila somatic primary piRNA pathway. Keystone symposium, Vancouver, Canada. Mar 25, 2013 (Poster)</p> <p><u>Saito K</u>. Zucchini endoribonuclease is required for primary piRNA biogenesis. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Dec 14, 2012 (Oral, Invited)</p> <p><u>齋藤都暁</u> piRNA 生合成における Yb body とミトコンドリア外膜の機能, 国立遺伝学研究所 研究集会、11 月, 2012 (招待講演)</p> <p><u>齋藤都暁</u> 小分子 RNA の機能～遺伝子発現のセントラルドグマの新たな認識～, 神戸大学 特別講義現代の生物学、7 月, 2012(招待講演)</p>

様式21

	<p>一般向け 計2件</p> <p><u>齋藤都暁</u> 動く遺伝子の抑制機構 最先端・次世代研究開発支援プログラム「国民との科学・技術対話」 慶應義塾ライフ・イノベーションオープンセミナー 次世代を担う若手研究者たち 慶應義塾大学信濃町キャンパス 東京(2012年3月) 参加者数80名</p> <p><u>齋藤都暁</u> 小分子 RNA が担う生命現象, 生命科学夏の学校、参加者数 150 名(2012年8月)(招待講演)</p>
図書	
計0件	
産業財産権 出願・取得 状況	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
計0件	
Webページ (URL)	
国民との科学・技術対話 の実施状況	<p>最先端・次世代研究開発支援プログラム「国民との科学・技術対話」の趣旨に従い、2012年3月13日に慶應義塾大学信濃町キャンパスにて一般の方を対象としたオープンセミナーを開催した。「次世代を担う若手研究者たち」と題して行ったこのオープンセミナーでは、慶應義塾大学医学部の3名の最先端・次世代研究開発支援プログラム採択者が、研究の目的・手法、研究成果が将来の国民の生活にどのように役立つことが期待されるのか、などについて一般向けに解説した。学内外から約80名の参加者が集う活気あるセミナーとなった。研究代表者の表題は「動く遺伝子の抑制機構」。</p> <p>最先端・次世代研究開発支援プログラム「国民との科学・技術対話」の趣旨に従い、2012年7月26日に慶應義塾大学信濃町キャンパスにて愛知県立明和高等学校(Super Science High School 指定校)の体験活動を行った。主として分子生物学実験体験を担当し、約50名の参加者が集う活気ある会となった。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	日経産業新聞、2012年3月9日、10面(先端技術)、見出し名「若手研究者がセミナー」
その他	



様式21

7. その他特記事項