

RNAi 機構は本当に転移因子を抑制するか？：ショウジョウバエを例に

RNAi の起こらない線虫 *Caenorhabditis elegans* の変異体の中には、転移因子が転移しやすくなる変異体が含まれている。このことから、RNAi の機構の一部はトランスポゾンを抑止するために働いていると発見当初から考えられていた。RNAi の分子機構の解析から、RNase III、Argonaute タンパク質、RNA 結合タンパク質、RNA ヘリカーゼなどが関与していることが分かってきた。一方で、外来の dsRNA が切断されて生成される siRNA 以外にも、non-coding RNA として転写され切断される miRNA があることが示された。その後、siRNA の生成と miRNA の生成に異なるタンパク質パラログが関与していることがわかった。それでは転移因子の抑制にはどのタンパク質が働いているのだろうか。ここでは遺伝子レベルでの解析がよくなされているキロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* に限定して、転移因子の抑制にどのような RNAi 関連機構が関与しているのかをまとめてみたい。

キロショウジョウバエには 3 種類の RNase III (*dicer-1*, *dicer-2*, *drosha*)、5 種類の Argonaute ファミリータンパク質 (*argonaute-1*, *argonaute-2*, *argonaute-3*, *piwi*, *aubergine*)、多数の RNA 結合タンパク質や RNA ヘリカーゼが存在する。二本鎖 RNA 結合タンパク質の Loquacious、R2D2、Pasha はそれぞれ Dicer-1、Dicer-2、Drosha と結合し協調して dsRNA を切断することが報告されている。Dicer は RNase III ドメインと PAZ ドメインを持つ。PAZ ドメインは siRNA、miRNA 特有の末端構造を認識して RNA と結合することが報告されている。Argonaute ファミリーのタンパク質は PAZ ドメインと PIWI ドメインを持ち、PIWI ドメインは RNase として siRNA の標的となる mRNA を切断する活性を示す。Argonaute-1 (AGO1) は miRNA と結合し、主に切断を介さずに翻訳を抑制する。一方、Argonaute-2 (AGO2) は siRNA と結合し、切断を介して外来 RNA の分解に携わる。*argonaute-3*, *piwi*, *aubergine* は生殖細胞と初期胚で特異的に発現する。

また植物では、外来遺伝子に反応して生成される siRNA に長いものと短いものがあることがわかっている。24-26nt の長い siRNA は転写後の RNA の分解の他、転写抑制にも働くが、21-22nt の短い siRNA は後者の機能を持たない。しかも、内在性のレトロエレメントの siRNA には長いものしか存在しない。このような内在性の反復配列の部分配列を持つ siRNA は repeat-associated small interfering RNA (rasiRNA) と呼ばれている。

Aravin らの解析によると、*Drosophila* でも rasiRNA は存在し、かつ、rasiRNA の量は発生段階によって変化する (Aravin et al. 2003)。初期胚で最も多く、成体ではその 1/5 程度しか存在しない。また、rasiRNA は平均長が 23.6nt で miRNA

や siRNA の 22.0nt よりも有意に長い分布を示す。しかし、5'末端の塩基がウラシルである点は miRNA や siRNA と共通する。Sarot らの解析で示された *gypsy* の 5'UTR に対応する rasiRNA は長さが 25-27nt であった (Sarot et al. 2004)。

それでは、rasiRNA と協調して働くタンパク質は多数のパラログの内のどれなのだろうか。あるいは全く新規の遺伝子なのだろうか。DExH タイプ RNA ヘリカーゼをコードする *spindle-E* (別名 *homeless*) を破壊すると LTR レトロトランスポゾン (*1731*, *mdg1*)、non-LTR レトロトランスポゾン (*F*) の転写量が共に増加することが示された (Aravin et al. 2001)。*spindle-E* も生殖細胞で発現する遺伝子である。*spindle-E* は *copia* の転写抑制にも作用している (Kalmykova et al. 2005)。一方、*spindle-E* と協調して働く Argonaute ファミリー遺伝子 *aubergine* (別名 *sting*) を破壊しても転写量の増加は見られなかった。一方、別の Argonaute ファミリー遺伝子である *piwi* を破壊すると LTR レトロトランスポゾン的一种 *gypsy* の転写抑制が解除される (Sarot et al. 2004)。Kalmykova らは *piwi* を破壊すると LTR レトロトランスポゾンの転写量が増えるだけでなく、転移頻度も上昇することを示している (Kalmykova et al. 2005)。*piwi* を破壊した株では、LTR レトロトランスポゾンの *mdg1* と *copia* の RNA 転写量が上昇した。その時期と細胞は、*mdg1* は germinal proliferative center、*copia* は後期精原細胞や減数分裂後の段階であった。*piwi* タンパク質は germinal proliferative center でしか検出されないため、これは *piwi* によって誘導される抑制機構が後の時期まで継続していることを示している。一方、一次精原細胞で転写が活性化される LTR レトロトランスポゾンである *1731* と *GATE* では、転写量の抑制解除は確認されなかった。また、少なくとも *copia* の転写抑制は実際に転移抑制に機能していることが示された。*piwi* 破壊系統では、多数の *copia* の転移が確認され、その頻度は世代当たり 10^{-4} から 0.19 以上にまで上昇した。

Vagin らは、ショウジョウバエの各種の RNAi 関連遺伝子の変異体で、3 種類の LTR レトロトランスポゾン (*roo*, *mdg1*, *gypsy*) と 2 種類の non-LTR レトロトランスポゾン (I factor, HeT-A) の RNA 量を調べている (Vagin et al. 2006)。siRNA の生成と機能に関与することが知られている *dicer-2*, *r2d2*, *argonaute-2* の変異体では量の変化は見られなかった。一方、*spindle-E*, *armitage*, *piwi*, *aubergine* の各遺伝子はレトロトランスポゾンの転写抑制に必須であった。ただし、Argonaute ファミリーの 2 種類の遺伝子 *piwi* と *aubergine* は相補的な抑制効果を示した。*piwi* は *roo* と *mdg1* を良く抑制し、*aubergine* は I factor を良く抑制する。*piwi* は単純反復配列 *mst40* を抑制し、*aubergine* は *Stellate-Su(Ste)* 系によって *Stellate* を抑制する点も相補的である。ちなみに *Stellate-Su(Ste)* 系は X 染色体上で機能タンパク質をコードする 200 コピー程度の遺伝子 *Stellate* の転写を、Y 染色体上に 50 コ

ピ一程度が存在する *Suppressor of Stellate (Su(Ste))* が双方向に転写された結果生じる dsRNA を介して制御する機構である。

さらに、Vagin らは *dicer-1* についても解析を行っている。*dicer-1* は miRNA 生成の鍵となる遺伝子で、ホモ変異体は致死である。そこで、*ovoD1* という雌が不妊となる優性変異体のヘテロ個体を用いて体細胞組み換えによって卵巣で *dicer-1* 変異のホモ細胞が出来るようにし、RNA 量を測定した。*dicer-1* 変異のホモ細胞では、レトロトランスポソンの RNA 量は野生型に比べて減少した。*dicer-1* が rasiRNA の生成に必須ならばレトロトランスポソンの RNA 量が増加するはずなので、これは *dicer-1* が rasiRNA の生成に関与していないことを示している。

Saito らは抗 Piwi 抗体を用いて免疫沈降した RNA をクローニングし、配列決定することによって、Piwi タンパク質に結合する RNA を解析した (Saito et al. 2006)。Piwi と結合していた RNA は、長さが 25-29nt と miRNA に比べて明らかに長かった。また、rRNA や tRNA なども含まれていたが、やはり rasiRNA の割合が非常に高かった。rasiRNA には sense 鎖のものと antisense 鎖のものの両者が含まれていたが、sense 鎖は antisense 鎖に比べると数が少なく、Northern blotting でもこの傾向は確認できた。5'末端の塩基に U が多いことや miRNA のクローニング手法で rasiRNA がクローニング出来ているなどの点は rasiRNA の構造が miRNA に似ていることを示唆している。また、人工的に作成した siRNA と相補的な RNA を切断する Slicer 活性が Piwi にもあることも示された。

Saito らは Piwi と一緒に免疫沈降したタンパク質の中に Dicer1、Dicer2、Drosha が含まれていなかったと記述している (Saito et al. 2006)。*dicer-1*、*dicer-2*、*r2d2* の変異体でレトロトランスポソンの転写抑制が解除されない事実もこれに合致する (Vagin et al. 2006)。キイロショウジョウバエの持つ RNaseIII 遺伝子は *dicer-1*、*dicer-2*、*drosha* の3つだけなので、rasiRNA を形成する RNase は新規の遺伝子であるということになる。Vagin らの化学的な rasiRNA の構造解析はこの可能性を補強するものであった (Vagin et al. 2006)。

CIP (calf intestinal phosphatase) は末端のリン酸基を取り除き、polynucleotide kinase は末端にリン酸基を付加する。このため、CIP 処理をして泳動度が変わり、CIP 処理後に polynucleotide kinase と ATP を付加することで泳動度が戻れば、両末端のいずれかにリン酸基を持っていたことがわかる。また、T4 RNA ligase は、RNA の結合に 5'側のリン酸基を要求するので、rasiRNA を 5'側にリン酸基が付加されていない RNA と混ぜて結合するならば、5'末端にリン酸基があることがわかる。同様に、5'側にリン酸基が付加され、かつ 3'側に -OH が露出していないような RNA と混ぜて結合すれば、rasiRNA の 3'末端の 2'-OH、3'-OH の少なくとも片方が露出しているのがわかる。酸化剤の過ヨウ素酸ナトリウム NaIO₄ はベータ除去を経て最終的に 2'-OH と 3'-OH を持つヌクレオチドを切り離すた

め、両方の-OHが露出していると電気泳動で泳動度が変化する。以上のような解析の結果、*ras*iRNAの5'末端には1つのリン酸基が結合しており、3'末端の2'と3'の2つの-OHの内、1つが修飾され、残りは-OHのままであることが明らかとなった。動物の*si*RNAと*mi*RNAでは5'末端はリン酸基、3'末端は2'-OH、3'-OHとどちらも水酸基となっていることが知られている。これは*ras*iRNAの生成機構が*si*RNA、*mi*RNAとは全く異なっている可能性を示している。

以上の情報を整理すると、転移因子の抑制には、*ras*iRNAという種類の短いRNAが標的配列認識の役割を担う。*ras*iRNAによって抑制される配列は、LTRレトロトランスポゾン、non-LTRレトロトランスポゾンがほとんどで、他にDNAトランスポゾン、ヘテロクロマチンの反復配列、多コピー遺伝子 *Stellate* などがある。テロメア伸長を担う non-LTRレトロトランスポゾンである HeT-A や TART、TAHRE も例外ではない。*ras*iRNA は5'末端がUでリン酸基が残っているなど *mi*RNA、*si*RNA と共通する特徴も持つが、3'末端の修飾や25-29ntと *mi*RNA や *si*RNA よりも長いことなど異なった特徴も持つ。そして、キイロショウジョウバエの持つ3つのRNaseIIIタンパク質とは別のRNaseがその生成に関わっているらしい。そして Piwi と Aubergine の2種類の Argonaute ファミリータンパク質が標的を分業しながら *ras*iRNA と結合し遺伝子の抑制に働く。DEXHタイプRNAヘリカーゼ Spindle-E と別タイプのヘリカーゼ Armitage は、Piwi、Aubergine と協調して抑制に関与する。

興味深いことに、哺乳類の Piwi ホモログが piRNA と名付けられた内在性のRNAと結合し、生殖細胞の形成に関わっていることが報告されている。piRNA は *ras*iRNA と共通する性質（長さが26-31nt、5'末端がU、片側の鎖に偏る、ゲノム上にコードされる、Piwi と結合するなど）が多く、もしかすると、哺乳類では *ras*iRNA を生殖細胞の発生に流用して新しいタイプのRNAを獲得したのかもしれない。piRNAの今後の解析には常に *ras*iRNA との関係性が考慮されるべきであろう。

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T.

The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development.

Dev Cell. 2003 Aug;5(2):337-350.

Sarot E, Payen-Groschene G, Bucheton A, Pelisson A.

Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene.

Genetics. 2004 Mar;166(3):1313-1321.

Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA.

Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline.

Curr Biol. 2001 Jul 10;11(13):1017-1027.

Kalmykova AI, Klenov MS, Gvozdev VA.

Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline.

Nucleic Acids Res. 2005 Apr 7;33(6):2052-2059.

Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD.

A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline.

Science. 2006 Jul 21;313(5785):320-324.

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 Aug 15;20(16):2214-2222.

2006/12/21

小島 健司 著

禁 無断複写転載