

【目的】 piRNA (PIWI-interacting RNA) は、生殖細胞特異的に発現し、PIWI タンパク質と piRISC (piRNA-induced silencing complex) を形成し、トランスポゾン mRNA の発現を抑制する。piRNA は、始めに第一次生成経路で生成され、ピンボン経路で増幅される。piRNA の前駆体は、piRNA クラスタ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、カイコ卵巣生殖細胞由来である培養細胞 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。これまでの解析から、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。さらに、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 による異なる piRNA を生成する仕組みを明らかにすることを目的とした。

【方法】 piRNA の前駆体と結合すると考えられる Spn-E および Qin に対する抗体を用いた iCLIP 法により、piRNA 前駆体の種類の同定を試みた。また、Qin のノックダウンにより、piRNA 前駆体が蓄積することが示唆された。この piRNA 前駆体を同定することにより、piRNA 前駆体の塩基長及び特徴を明らかにできると考えられた。さらに、Spn-E 抗体及び Qin 抗体を用いた免疫沈降法により精製し、ショットガン分析によって網羅的に同定した。Spn-E 及び Qin と結合する新規因子は piRNA 生合成経路に関わるのかを明らかにするため、それら因子を RNAi でノックダウンした BmN4 細胞を用いて piRNA 量やトランスポゾンの発現量をノザン解析及び qRT-PCR 法により網羅的にスクリーニングを試みた。

【結果】 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。二段階のスクリーニングを行い、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。これらの因子に対するノックダウンを行い、ノーザンプロット法を用いて piRNA の生成量を確認した。その結果、2 因子について、piRNA の量の劇的な減少が見られた。2019 年に 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 piRNA を新しいゲノム配列にマップすることで、piRNA クラスタの同定を試みた。その結果、2 つの染色体の一部の領域で、piRNA が多数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。Spn-E および Qin 抗体を用いた iCLIP 法で得られた結果は解析中である。

カイコ piRNA 生合成経路

