

piRNA 経路におけるアルギニンメチル化 の役割

1. はじめに

タンパク質をコードしない小分子 RNA (small RNA) が標的認識分子として介在する遺伝子発現抑制機構は「RNAサイレンシング」と総称され、動物や植物、ウイルスなど種を超えて広く存在している^{1,2)}。哺乳動物細胞やショウジョウバエにおいて、その生合成機構や機能に関して最も研究が進んでいる small RNA は約 22 塩基長の micro RNA (miRNA) である¹⁾。現在ヒトでは約 1,000 種類の miRNA が報告されており、全遺伝子の 3 分の 1 という膨大な数の mRNA が miRNA により発現制御を受けると予測されている。近年になって我々のゲノムには miRNA 以外にも、piRNA (下記参照) や内在性 small interference RNA (siRNA) といった異なる種類の small RNA がコードされていることが明らかになり^{2,3)}、1998 年における Fire と Mello (2006 年ノーベル賞受賞) らの RNAi の発見以来爆発的な広がりを見せてきた RNA サイレncing 研究は、更なる拡大の一途を辿ることが予想される。

2. 生殖細胞系列特異的に発現する Piwi タンパク質と piRNA

small RNA は Argonaute ファミリータンパク質と複合体を形成することによってはじめてその機能を発現する¹⁻³⁾。Argonaute ファミリータンパク質は PAZ ドメインと PIWI ドメインをもつことを特徴とする約 100kDa のタンパク質で、Ago と Piwi という二つのサブファミリーに大別される。マウスは七種類の Argonaute ファミリータンパク質をもち、そのうち四つ (Ago1~4) が Ago サブファミリー、三つ (Miwi, Mili, Miwi2) が Piwi サブファミリーに属する。ショウジョウバエには二種類 (Ago1, Ago2) の Ago タンパク質および三種類 (Piwi, Aubergine (Aub), Ago3) の Piwi タンパク質が存在する。Ago タンパク質はほぼ全ての組織に恒常的に発現し、miRNA や siRNA に結合する^{1,2)}。それに対し、近年 Piwi タンパク質も small RNA と結合していることが見出され、それらは Piwi-interacting RNA (piRNA) と名づけられた^{2,3)}。

piRNA は Argonaute ファミリータンパク質に結合する small RNA という点で miRNA と類似しているが、独自の

特徴を有している^{2,3)}。Piwi タンパク質と piRNA は生殖細胞系列特異的に発現しており、双方の発現は生殖細胞の形成と維持に必須である。piRNA は 24~31 塩基長で miRNA よりもサイズが数塩基長く、更にその 3' 末端は HEN1 というメチル化酵素によりリボースのメチル化 (2'-O-methylation) を受ける。また、miRNA と異なり Dicer 非依存的に、おそらくは長い一本鎖の前駆体から生成される。多くの piRNA 配列は繰り返し配列やトランスポゾン配列に由来し、piRNA の重要な機能の一つとして、トランスポゾンの発現を抑制することで生殖細胞のゲノムを守っていると考えられている。しかしながら、その作用機序やその他の分子機能、また piRNA の生合成機構については不明な点が多く、それらの解明にむけての解析は非常にホットな研究分野を構築している。

3. Piwi タンパク質は PRMT5 によりアルギニンのジメチル化を受ける

タンパク質は多くの場合リン酸化やアセチル化、糖鎖や脂質の付加など、様々な翻訳後修飾が施されることによってその局在や活性が調節されるが、重要な翻訳後修飾の一つにアルギニンのジメチル化が挙げられる⁴⁾。ジメチル化されるアルギニンには、シンメトリカル (対称型) (sDMA) とアシンメトリカル (非対称型) (aDMA) の 2 種類が存在する (図 1a)。これらの合成を担うのは protein methyltransferase (PRMT) とよばれるタンパク質ファミリーである。sDMA は type II PRMT によりグリシン (時にアラニン) とアルギニンのリピート配列 (GRG や GRGRGR...) 中のアルギニンがジメチル化されることによって生成される。一方 aDMA は type I PRMT により主に RGG という配列中に生成される⁴⁾ (図 1a)。一例として、スプライシング複合体の因子である Sm タンパク質は、type II PRMT である PRMT5 およびそのコファクター MEP50 の複合体によりメチル化を受け、そのグリシン-アルギニンのリピート配列中に sDMA を有する⁴⁾。

我々は偶然にも抗 Sm 抗体である Y12 抗体が、Sm タンパク質のみならずマウスの Piwi タンパク質である Miwi と Mili をも認識することを見出した⁵⁾。Y12 抗体のエピトープは Sm タンパク質中の sDMA であることが知られていたため、我々は Piwi タンパク質にも sDMA が存在し、ゆえに Y12 抗体が交差反応したのだと考えた。そこで sDMA 特異的な抗体 SYM11 を用い、実際に Miwi と Mili に sDMA が存在することを確認した⁵⁾。Piwi タンパク質を有する全ての生物は共通して、主にその N 末端配列中に

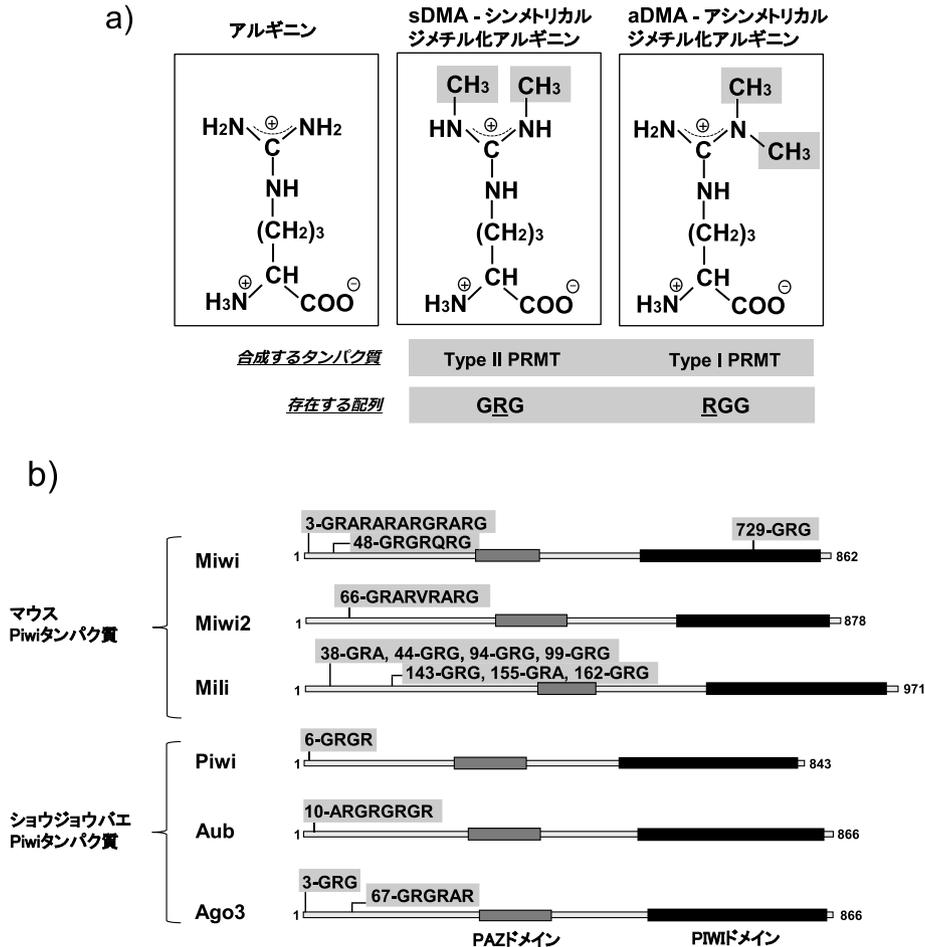


図1 Piwi タンパク質におけるアルギニンのジメチル化
 a) アルギニンのジメチル化
 b) Piwi タンパク質における sDMA の存在が予想されるグリシン(G)とアルギニン(R)のリピート配列

グリシンとアルギニンからなるリピートをもつ⁵⁾(図1b). sDMA はそれらのリピート配列中に存在すると予想され、したがってその存在は進化的に保存されている. マウスやショウジョウバエにおける sDMA 修飾は、後に質量分析を用いた詳細解析によっても存在が確認された⁶⁻⁸⁾.

我々は異なる生物種の Piwi タンパク質においても sDMA 修飾を確認するため、アフリカツメガエルの卵母細胞より Piwi タンパク質 Xiwi と Xili を単離した. これらのタンパク質中の sDMA 修飾を確認し、更に、結合している piRNA の配列を大規模シーケンスによりはじめて同定した⁵⁾. piRNA 研究の障壁の一つとして、その生殖細胞のみという発現特異性ゆえに、研究に適した培養細胞の入手が困難な点が挙げられる. アフリカツメガエルの卵母細胞

はマイクロインジェクションを用いた mRNA の翻訳活性の解析等に非常に優れたシステムであり、我々のこの解析は今後の卵母細胞を用いた piRNA の機能解析へとつながることが期待される.

次に我々は Piwi タンパク質の sDMA 修飾の合成酵素の同定を目指した. ショウジョウバエにおいて type II PRMT である dPRMT5、およびそのコファクター dMEP50 の変異体^{9,10)}が、Piwi タンパク質の変異体と同様に生殖細胞形成に異常をきたす^{9,10)}ことに着目し、野生型と dPRMT5 変異体の双方より全三種類の Piwi タンパク質を単離し、アルギニン修飾の有無を解析した. その結果、全ての Piwi タンパク質において野生型由来には sDMA が存在しているのに対し、dPRMT5 変異体由来は sDMA が完全に欠落して

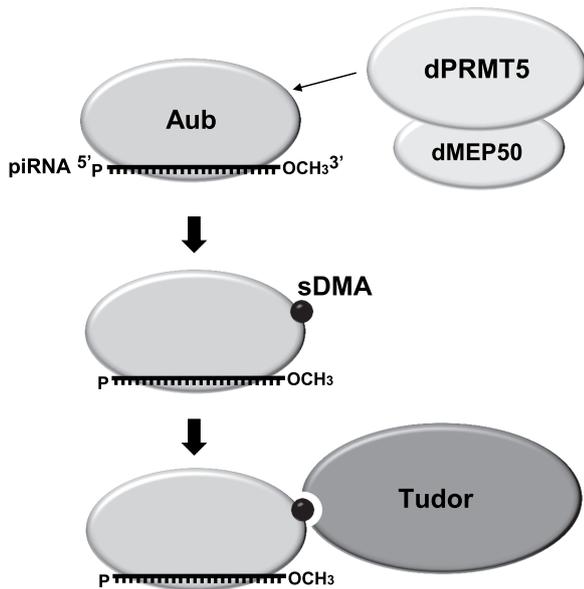


図2 ショウジョウバエにおける四つの極顆粒局在タンパク質, Aub, dPRMT5, dMEP50, Tudor の関係性

いることを見出した⁹⁾。これにより, Piwi タンパク質の sDMA は PRMT5 によって生成されることが明らかになった (図 2)。

4. Piwi タンパク質の sDMA 修飾は Tudor タンパク質に特異的に認識される

Piwi タンパク質における sDMA の役割は何であろうか? Tudor ドメインとよばれるタンパク質ドメインは sDMA 特異的な結合能をもつことが知られており, 上述の Sm タンパク質の sDMA は, SMN タンパク質中の Tudor ドメインに特異的に認識されることによって, Sm-SMN 間のタンパク質結合を促進させる役割がある⁴⁾。我々はマウスの Miwi およびショウジョウバエの Aub の sDMA 特異的に結合するタンパク質を同定した結果, Miwi には TDRD6 (Tudor-domain containing 6), Aub には Tudor というそれぞれ Tudor ドメインを有するタンパク質が, sDMA 依存的に結合することを明らかにした¹¹⁾(図 2)。したがって, Piwi タンパク質の sDMA は Tudor ドメインタンパク質との結合に必須であることが強く示唆される。

Piwi-Tudor 間の結合については近年多くの知見が積み重ねられ, マウスにおいては TDRD1~TDRD9 といった Tudor ドメインを有するタンパク質が正常な精子形成に不可欠であり, Miwi-TDRD6 のみならず, Mili-TDRD1, Miwi2-TDRD9 等, それぞれの Piwi タンパク質が異なる

Tudor タンパク質と結合することが報告されている^{6,7)}。ショウジョウバエにおいては, Aub-Tudor の結合に関して結晶構造解析を含めた詳細な解析がなされ¹²⁾, また Aub のみならず Ago3 も Tudor と結合することが明らかになった⁸⁾。更に, Krimper, Spindle-E や Tejas といった Tudor ドメインを有するタンパク質が, piRNA の生合成経路に関与することが報告されている¹³⁾。これらのタンパク質が実際に Piwi タンパク質と結合するかは未解明であり, 生殖細胞で明らかになりつつある Piwi-Tudor の相互作用ネットワークの解明が注目される。

5. Piwi-Tudor 結合の重要性

動物の生殖細胞には生殖顆粒という特異的な細胞質構造体が存在し, 生殖細胞決定因子が局在する。ショウジョウバエでは, 生殖細胞形成に不可欠な RNA やタンパク質因子が卵母細胞の後極に蓄積することにより, 生殖顆粒である極顆粒を形成する。その後, 初期胚において極顆粒因子が取り込まれた極細胞が形成され, それらは生殖巣に移動して生殖細胞へと分化する¹⁴⁾(図 3)。極顆粒に局在する因子の中に Aub, dPRMT5, dMEP50, Tudor が含まれるが, 我々の上述の解析は未解明であったこれらの因子の関係性を明らかにするものである。すなわち, dPRMT5 と dMEP50 の複合体が Aub 上に sDMA を生成し, その Aub の sDMA が Tudor の Tudor ドメインに特異的に認識される (図 2, 図 3)。それでは, Piwi タンパク質と Tudor タンパク質の結合の重要性とは何であろうか?

ショウジョウバエにおいて, Aub-Tudor 結合が存在しない dPRMT5 変異体や Tudor 変異体では, Aub および Tudor の極顆粒への蓄積が著しく低下している^{5,9,10,12)}。このことは sDMA を介した Aub-Tudor の結合が, これらの因子の極顆粒における安定した局在, ひいてはそれに続く生殖細胞形成に必須であることを強く示唆している。またマウスにおいても, TDRD1 または TDRD6 の欠失は生殖顆粒の顕著な縮小を招くことから, Piwi-Tudor 結合は生殖顆粒形成に必要であることが示唆される。

生殖顆粒形成に加えて, Piwi-Tudor 結合は piRNA の生合成に影響を与えることがわかってきている。ショウジョウバエの Tudor は piRNA 前駆体と見られる長い RNA に結合し, 更に Tudor 変異体では Piwi タンパク質に結合する piRNA の種類が変化する⁹⁾。また, マウス TDRD1 の消失は Mili に結合する piRNA プロファイルの変化につながり, L1 レトロトランスポゾンの上昇を引き起こす⁶⁾。我々は現在 Piwi-Tudor 結合の piRNA の生合成における影響を

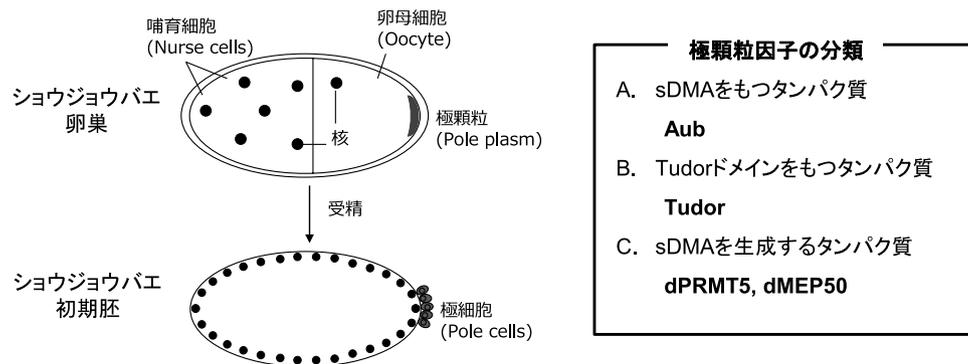


図3 ショウジョウバエにおける極顆粒と極細胞

精査するため、ショウジョウバエの野生型、dPRMT5 変異体、Tudor 変異体から単離した piRNA の大規模シーケンスによる詳細な配列解析を行っている。

6. おわりに

上述のように、生殖細胞において Piwi タンパク質の sDMA を介した Tudor タンパク質との結合、それに影響を受ける生殖顆粒の形成および piRNA の生合成は、進化的に保存された機構である。我々は更に、Piwi タンパク質と同様に生殖細胞形成に必須で生殖顆粒に局在する Vasa タンパク質も、生物種を超えて保存されたアルギニンのジメチル化部位を有し、更に Tudor タンパク質と結合することを見出した¹⁵⁾。この知見は、生殖細胞におけるアルギニンメチル化タンパク質と Tudor タンパク質の更なる相互作用の例であり、なぜ生殖細胞はメチル化アルギニンと Tudor ドメインの相互作用を多用して顆粒形成を行うのか、個々の相互作用はそれぞれ生殖細胞形成と維持、また piRNA の生合成と機能にどのような役割をもつのか、興味は尽きない。引き続き、遺伝情報を次世代へ伝える役割をもつ生殖細胞が特別に備えた piRNA 経路とアルギニン修飾-Tudor の相互作用、その意義の解明を目指していきたい。

謝辞

本研究は私が博士研究員および Research Associate として、University of Pennsylvania School of Medicine の Zissimos Mourelatos 博士のもとで行ったものです。Mourelatos 博士およびラボメンバー、また多くの共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献の数が限られているため多くの論文が引用できなかったことをこの場を借りてお詫びいたします。

- 1) Liu, X., Fortin, K., & Mourelatos, Z. (2008) *Brain Pathol.*, **18**, 113–121.
- 2) Kim, N.V., Han, J., & Siomi, M.C. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 126–139.
- 3) Klattenhoff, C., & Theurkauf, W. (2008) *Development*, **135**, 3–9.
- 4) Krause, C.D., Yang, Z., Kim, Y., Lee, J., Cook, J.R., & Pestka, S. (2007) *Pharmacol. Ther.*, **113**, 50–87.
- 5) Kirino, Y., Kim, N., Planell-Saguer, M., Khandros, E., Chioresan, S., Klein, P.S., Rigoutsos, I., Jongens, T.A., & Mourelatos, Z. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 652–658.
- 6) Reuter, M., Chuma, S., Tanaka, T., Franz, T., Stark, A., & Pilai, R.S. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 639–646.
- 7) Vagin, V.V., Wohlschlegel, J., Qu, J., Jonsson, Z., Huang, X., Chuma, S., Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., & Aravin, A.A. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 1749–1762.
- 8) Nishida, K.M., Okada, T.N., Kawamura, T., Mitsuyama, T., Kawamura, Y., Inagaki, Sachi., Huang, Haidong, Chen, D., Kodama, T., Siomi, H., & Siomi, M.C. (2009) *EMBO J.*, **28**, 3820–3831.
- 9) Anne, J., Ollo, R., Ephrussi, A., & Mechler, B.M. (2007) *Development*, **134**, 137–146.
- 10) Gonsalves, G.B., Rajendra, T.K., Tian, L., & Matera, A.G. (2006) *Curr. Biol.*, **16**, 1077–1089.
- 11) Kirino, Y., Vourekas, A., Sayed, N., Lima-Alves, F., Thomson, T., Lasko, P., Rappsilber, J., Jongens, T.A., & Mourelatos, Z. (2010) *RNA*, **16**, 70–78.
- 12) Liu, H., Wang, J.S., Huang, Y., Li, Z., Gong, W., Lehmann, R., & Xu, R. (2010) *Genes Dev.*, **24**, 1876–1881.
- 13) Patil, V.S. & Kai, T. (2010) *Curr. Biol.*, **20**, 1–7.
- 14) Strome, S. & Lehmann, R. (2007) *Science*, **316**, 392–393.
- 15) Kirino, Y., Vourekas, A., Kim, N., Lima-Alves, F., Rappsilber, J., Jongens, T.A., & Mourelatos, Z. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 8148–8154.

桐野 陽平

(Department of Biomedical Sciences,
Cedars-Sinai Medical Center)The role of arginine methylation in the Piwi-interacting
RNA pathwayYohei Kirino (Department of Biomedical Sciences, Cedars-
Sinai Medical Center, 5017 Davis Research Building, 8700
Beverly Blvd., Los Angeles, CA 90048, U.S.A.)シアル酸の低下により引き起こされる骨格
筋疾患

1. はじめに

シアル酸は、9炭糖であるノイラミン酸の*N*-, *O*-シアル誘導体の総称であり、植物を除く生物界に広く分布している。その存在は50年以上前から知られている。シアル酸は通常、遊離の状態では存在せず、モノあるいはポリシアル酸として、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の非還元末端に結合した状態で存在する。シアル酸は、細胞間認識、細胞-基質認識および糖タンパク質の安定性などに働き、特に、神経発生や病原体感染、免疫システムに重要な機能を果たすことが予想されていた。縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) は、遠位筋である前脛骨筋が好んで侵される遺伝性筋疾患である。この疾患はシアル酸の生合成に関わる酵素遺伝子の変異によることが示され、患者の骨格筋ではシアル酸の低下が見出された。一見、全く関連のなさそうなシアル酸の減少が、なぜ骨格筋の筋力低下、筋変性を引き起こすのであろうか。

2. シアル酸生合成酵素遺伝子の変異が遠位型ミオパチー
の原因である

DMRV は、15~35歳で発症する常染色体劣性の遺伝性筋疾患であり、欧米では遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy : hIBM) と呼ばれている¹⁾。日本には約150-400人の患者がいると推定されている。臨床的には、前述のように、前脛骨筋に進行性の筋萎縮と筋力低下を特徴とし、近位筋である大腿四頭筋は発症初期には侵されない^{2,3)}。症状は比較的ゆっくりと進行し、発症後平均12年間で歩行不能となる。罹患筋には、縁取り空胞、

萎縮した小角化線維、筋線維内にアミロイド様のタンパク質の蓄積など特徴的な筋病理所見が見られる。電子顕微鏡観察では、多数の自己貪食空胞の集積が観察される。

2001年に連鎖解析によりこのDMRV/hIBMの原因遺伝子として、シアル酸生合成経路の律速酵素であるウリジン二リン酸-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) 2-エピメラーゼ/*N*-アセチルマンノサミンキナーゼ (GNE/MNK) をコードする *GNE* 遺伝子が単離された⁴⁾。*GNE* 遺伝子には、選択的スプライシングによる3種類の転写アイソフォームの存在が知られているが、そのすべてのアイソフォームは全身で発現している。しかしながら、特に、肝臓、腎臓で強く発現しており、骨格筋での発現は非常に低いレベルである。最も長いアイソフォームが酵素活性を担っていると考えられるが、酵素活性も肝臓、腎臓で検出できるのみで、他の臓器ではきちんと測定されていない。シアル酸は外部から食物として摂取され、細胞に取り込まれる、または、リソソーム系での分解を経て再利用される他、全身の細胞で新たに生合成されている。哺乳類などの高等生物においては、シアル酸生合成経路は唯一つしかない (図1)。その経路において GNE/MNK は、一つのタンパク質が GNE 活性と MNK 活性の二つの酵素活性を担い、シアル酸の合成のスイッチを入れる鍵酵素である⁵⁾。シアル酸生合成は、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を経て、シチジンモノリン酸-*N*-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) を合成するが、この経路の最終合成産物である CMP-NeuAc のネガティブフィードバック効果により、詳しくは、CMP-NeuAc が GNE/MNK のアロステリック部位に直接結合してこの GNE 反応過程を阻害することで、全体の合成経路の進行を調節していることが知られている⁶⁾。シアル酸生合成は GNE/MNK のステップが進むかどうかで決定されている。このことから、*GNE* 遺伝子の変異をもつ DMRV/hIBM 患者の組織内ではシアル酸合成が低下していることが予測された。

3. *GNE* 遺伝子変異の特徴と酵素活性

我々は、日本人 DMRV/hIBM 患者で遺伝子変異を解析した。さらに、見出された変異をもつ組換えタンパク質を動物細胞にて発現させ、GNE/MNK 酵素活性と多量体形成能を測定した。GNE/MNK は、12分子によりホモ多量体を形成して存在することがわかっている。その結果、① DMRV/hIBM 患者は二つのアレルに *GNE* 遺伝子変異をもつが、少なくとも一つのアレルはミスセンス変異である⁷⁾、② *GNE* 遺伝子の各 GNE または MNK ドメインの変異は、