

piRNA-seq に基づいた、
プラナリア多能性幹細胞システムにおける
DjpiwiB 遺伝子の機能解析

鹿島 誠

目次

| | |
|---|-----|
| 略語表..... | 2 |
| 要旨..... | 5 |
| 序章..... | 7 |
| 材料と方法..... | 41 |
| 第一章 プラナリアにおける PIWI タンパク質の細胞内局在..... | 61 |
| 第二章 DjPiwiB-piRNA 複合体による転移因子の抑制..... | 83 |
| 第三章 DjPiwiB-piRNA 複合体による非転移因子性タンパク質コード遺 伝子の制御..... | 105 |
| 第四章 細胞質 PIWI ファミリータンパク質による転移因子の抑制..... | 153 |
| 結章..... | 178 |
| 参考文献..... | 181 |
| 謝辞..... | 209 |

略語表

| | |
|---------------------|---|
| Ago3 | Argonaute 3 |
| Armi | Armitage |
| as- <i>gypsy-P1</i> | antisense RNA of <i>gypsy-P1</i> |
| Aub | Aubergine |
| <i>calu</i> | <i>calumenin</i> |
| CB | Chromatoide body |
| CDS | coding DNA sequence |
| ChIP | Chromatin immunoprecipitation |
| <i>Dj</i> | <i>Dugesia japonica</i> |
| <i>Dm</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| dpf | days post 2nd feeding |
| dpi | days post irradiation |
| <i>Dr</i> | <i>Danio rerio</i> |
| dsRNA | double-stranded RNA |
| ESC | Embryonic Stem Cell |
| EST | Expressed sequence tag |
| <i>fasIII</i> | <i>fasciclin III</i> |
| FDR | False Discover Rate |
| <i>flam</i> | <i>flamenco</i> |
| H3K9me3 | Histone H3 trimethyl Lys9 |
| H-DEGs | highly-differentially-expressed genes |
| Hili | Hiwi-like |
| Hiwi | Hydra Piwi |
| iPSC | Induced Pluripotent Stem Cell |
| L-DEGs | lowly-differentially-expressed genes |
| Masc | Masculinizer |
| <i>mcm2</i> | <i>minichromosome maintenance complex component 2</i> |
| <i>mcm3</i> | <i>minichromosome maintenance complex component 3</i> |
| Mili | Miwi-like |
| miRNA | micro-RNA |
| Miwi | Mouse Piwi |
| Miwi2 | Mouse Piwi2 |
| <i>Mm</i> | <i>Mus musculus</i> |
| OSC | Ovarian somatic cell |

| | |
|-------------|---|
| PAZ | Piwi-Argonaute-Zwille |
| PAZ | Piwi/Argonaute/Zwille |
| <i>pcna</i> | <i>proliferating cell nuclear antigen</i> |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| ph | Pharynx |
| pH3 | phospholated histone H3 |
| piRNA | PIWI-interacting RNA |
| PIWI | P-element induced wimpy testis |
| RNAi | RNA interference |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| sDMA | symmetrical dimethyl arginine |
| siRNA | small interfering RNA |
| SIWI | silkworm Piwi |
| <i>Smed</i> | <i>Schmidtea mediterranea</i> |
| Syt | Synaptotagmin |
| <i>tj</i> | <i>traffic jam</i> |
| UTR | untranslated region |
| Yb | fs(1)Yb |
| Zili | Ziwi-like |
| Ziwi | Zebrafish Piwi |
| Zuc | Zucchini |

要旨

近年、生殖細胞において転移因子を抑制することで次世代に安定してゲノムを伝えるのに重要な役割を担う PIWI ファミリータンパク質が、無性生殖を行うプラナリアの成体多能性幹細胞(neoblast : 新生細胞)においても重要な機能を担うことが示唆されてきた。しかし、PIWI がプラナリアでどのような標的遺伝子の発現を制御することで、幹細胞制御に寄与しているかは未知であった。本研究では、プラナリアの新生細胞の分化制御に不可欠であることが示唆されている核局在型 PIWI である DjPiwiB タンパク質の機能解析を DjPiwiB に結合する piRNA の配列をもとに行った。この結果、生殖細胞で発現する PIWI 同様に、体細胞に分化中の細胞でありながら、DjPiwiB は転移因子の発現を抑制していた。興味深いことに、新生細胞で産生された DjPiwiB はすべての分化した体細胞へと分解されることなく受け継がれており、転移因子抑制は新生細胞そのものではなく細胞分化の過程で DjPiwiB によって行われていることを明かにした。さらに、DjPiwiB-piRNA 複合体は転移因子以外のタンパク質をコードする遺伝子も標的にしており、新生細胞内で特定の細胞周期関連遺伝子の発現の調節や、分化中の細胞に特異的な遺伝子の一過的な遺伝子発現を制御していることがわかった。加えて、新生細胞の細胞質に局在する DjPiwiC が DjPiwiB-piRNA 複合体による標的遺伝子の発現制御に寄与していることを明らかにした。このよ

うに、本研究は PIWI タンパク質が多能性幹細胞システムの遺伝子発現制御において多様な役割を担っていることを初めて明らかにすることに成功した。

序章

多能性幹細胞と生殖細胞の共通点

分化全能性とは一個体を形成するすべての細胞種に分化することができ、自律的な個体形成を行うことができる能力を指す。例えば、哺乳類では受精卵や卵割初期の細胞のみが持つ能力であり、個体発生の過程を経て、この分化能力は次第に失われていくのが一般的である(Suwińska et al., 2008)。近年、胚性多能性幹細胞 (ES 細胞) (Martin, 1981)や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (Takahashi and Yamanaka, 2006)等の発見により人工的な培養下ではあるが、生体を構成するすべての細胞種に分化することができる分化多能性を持つ細胞を維持することが哺乳類で可能になった。しかし、これらの細胞を生体内に移植すると腫瘍化してしまう(Ben-David and Benvenisty, 2011)。一方で、一部の無脊椎動物(カイメン、ヒドラ、プラナリア、群体ボヤなど)では、三胚葉と生殖細胞に分化することができる多能性幹細胞が成体においても腫瘍化することなく維持されている(Agata et al., 2006; Sánchez Alvarado and Yamanaka, 2014)。これらの無脊椎動物の成体多能性幹細胞が生体内でどのような制御を受けることで、腫瘍化することなく維持されているのかを調べることは、基礎研究のみならず再生医療などの応用研究にも寄与すると考えられている(Agata et al., 2006; Sánchez Alvarado and Yamanaka, 2014)。

では、なぜプラナリアやカイメンといった無脊椎動物では分化多能性を有する幹細胞を成体で維持しているのでしょうか？その一つの理由は無性生殖を行うためである。例えば、カイメンは数千の休止期幹細胞を含む芽球を形成することで(Funayama, 2013)、ヒドラや群体ボヤは出芽によって(Berrill 1947; Bode 1996)、また、プラナリアは自切によって無性生殖を行う(Agata and Watanabe, 1999)。これらの無性生殖の過程で新たな子孫を作り出す源となっているのが成体多能性幹細胞である。つまり、有性生殖では生殖細胞と受精卵が担う役割を、これら無脊椎動物の無性生殖では成体多能性幹細胞が担っているのである。生殖細胞は分化細胞ではあるが受精によってすべての細胞種を生み出す細胞になりうるために、その制御の一部は幹細胞制御と同じあるいは似た機構によって行われていると考えられている。実際、他の生物では生殖細胞特異的な遺伝子が、カワカイメンやプラナリアの成体多能性幹細胞でも発現していることが報告されている(Agata et al., 2006; Alié et al., 2011, 2015; Funayama et al., 2010; Önal et al., 2012; Shibata et al., 2010)。 *piwi* ファミリー遺伝子(以下 *piwi* と記述する)もそのうちの一つである。 *piwi* は様々な生物で、生殖細胞だけでなく、成体多能性幹細胞を含む体細胞でも発現しており、それら細胞の機能・維持に重要であると考えられている(Juliano et al., 2011; Peng and Lin, 2013; Ross et al., 2014)。しかし、PIWI ファミリータンパク質 (以下 PIWI と記述する) の機

能の解析は主に生殖細胞で行われており、成体多能性幹細胞において PIWI が担う分子機構についてはほとんど明らかにされていない。

PIWI ファミリータンパク質の特徴

piwi ファミリー遺伝子の中で最初に同定されたのはショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の *piwi* (P-element induced wimpy testis) (以下、本論文では混同を避けるために、*Dmpwi*とする) 遺伝子である(Cox et al., 1998)。 *Dmpwi* は生殖幹細胞の維持や生殖細胞の発生に必須な遺伝子として突然変異体スクリーニングによって同定された(Cox et al., 1998, 2000)。PIWI は、RNA 干渉 (RNAi) 経路の重要な因子である Argonaute (AGO) ファミリータンパク質と同じ Argonaute ファミリーに属すタンパク質である。PIWI は小分子 RNA との結合に関与する PAZ(Piwi/Argonaute/Zwille)ドメインと RNaseH 活性を持つPIWIドメインを持ち、PAZドメインを介して piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる小分子 RNA と結合することが知られている (図 0-1A)。PIWI-piRNA 複合体は、結合している piRNA をガイドとして、配列特異的に標的核酸に結合し、転写レベルあるいは転写後レベルで標的遺伝子の発現を負に制御する (図 0-1B) (Iwasaki et al., 2015)。PIWI は動物界で保存されたタンパク質であり、相同遺伝子は多細胞生物ではカイメンからヒトに至るまで同定されている (図 0-1B)

(Juliano et al., 2011)。

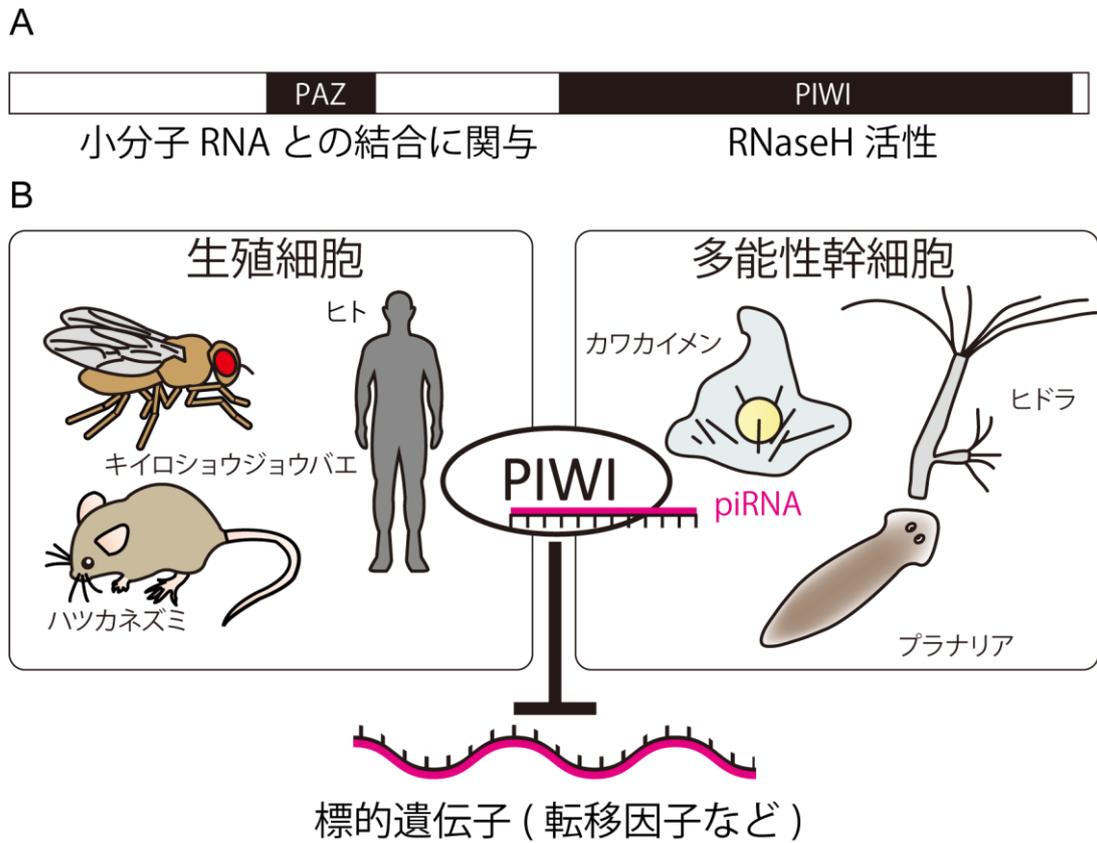


図 0-1 (A) PIWI ファミリータンパク質では、PAZ ドメインと PIWI ドメインが保存されている。(B) PIWI は多細胞生物ではカイメンからヒトに至るまで保存され、生殖細胞や多能性幹細胞で発現している。また、PIWI は piRNA をガイドとして、配列特異的に転移因子などの標的遺伝子を負に制御する。

PIWI は細胞内局在から、細胞質局在型 PIWI (細胞質 PIWI) と核局在型 PIWI (核 PIWI) に分けることができる。PIWI による標的遺伝子の制御は、細胞質では転写後制御、核内では転写制御によって行われるため、細胞内での局在は PIWI の機能を理解する上で重要である (Iwasaki et al., 2015; Olovnikov et al., 2012)。ショウジョウバエのゲノムには 3 種類の PIWI タンパク質をコードする遺伝子が存在する。Argonaute 3 (以下 DmAgo3 と記述する) と Aubergine (以下、DmAub と記述する) は細胞質に局在するタンパク質であり、DmPiwi は核に局在するタンパク質である (表 0-1) (Brennecke et al., 2007)。同様にマウス (*Mus musculus*) にも、Mouse Piwi (以下、MmMiwi と記述する)、Miwi-like (以下、MmMili と記述する) という 2 種類の細胞質 PIWI と Mouse Piwi 2 (以下、MmMiwi2 と記述する) と呼ばれる核 PIWI が存在する (表 0-1) (Carmell et al., 2007; Deng et al., 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004)。ショウジョウバエやマウスのように 2 種類の細胞質 PIWI と 1 種類の核 PIWI を持つ動物が見られる一方で、ゼブラフィッシュの Zebrafish Piwi (以下、DrZiwi と記述する)、Ziwi-like (以下、DrZili と記述する) (Houwing et al., 2007, 2008) やカイコガの silkworm Piwi (以下、BmSiwi と記述する)、*Bombyx mori* Argonaute 3 (以下、BmAgo3 と記述する) (Nishida et al., 2014) のように 2 種類の細胞質 PIWI のみを持つ動物も存在する (表 0-1)。

表 0-1 ゲノム中にコードされている

すべての PIWI の細胞内局在が既知の生物の例

| | 細胞質 PIWI | 核 PIWI |
|----------|----------------|---------|
| ショウジョウバエ | DmAub, DmAgo3 | DmPiwi |
| マウス | MmMili, MmMiwi | MmMiwi2 |
| ゼブラフィッシュ | DrZili, DrZiwi | |
| カイコガ | BmAgo3, BmSiwi | |
| ヒドラ | Hili, Hiwi | |

細胞質 PIWI は PIWI ドメインの RNase H 活性を用いて、piRNA の配列依存的に標的 RNA を切断することで転写後制御を行う (Iwasaki et al., 2015)。一方で、核 PIWI による標的遺伝子の抑制はエピジェネティックな制御であると考えられている。ショウジョウバエでは DmPIWI-piRNA 複合体が抑制性ヒストン修飾 (H3K9me3) を介して (Sienski et al., 2012)、マウスでは MmMiwi2-piRNA 複合体がゲノム DNA のシトシンのメチル化を介して (Aravin et al., 2008)、ヘテロクロマチン化が誘導されることで、核 PIWI による標的遺伝子の抑制が行われる。また、興味深いことに、ショウジョウバエの核 PIWI である DmPIWI の RNaseH 活性をなくした変異体では生殖能力は正常であり、標的遺伝子の抑制にも変化がないことから、核 PIWI の機能には RNaseH 活性は必須ではないと考えられている (Darricarrere et al., 2013)。細胞内局在による PIWI の作用機序の違いはショウジョウバエやマウスだけでなく、カイコの細胞質

PIWI やアメフラシの核 PIWI でも確認されている (Kiuchi et al., 2014; Rajasethupathy et al., 2012)。ただし、例外もあり、一部の生物では異なる作用機序を示す PIWI が存在する。例えば、線虫では細胞質 PIWI-piRNA 複合体によって認識された標的 RNA からアンチセンス鎖に相当する小分子 RNA が産生される。そして、その小分子 RNA と AGO ファミリータンパク質が結合して作用することによって遺伝子の発現が抑制されるという報告がなされている (Lee et al., 2012)。また、単細胞生物の繊毛虫では PIWI がゲノム再編成の制御に関わっているという報告もある。例えば、テトラヒメナの大核¹では核 PIWI-piRNA 複合体によってヘテロクロマチン化が誘導された領域が除去されてゲノム再編成が起こる (Mochizuki et al., 2002; Noto et al., 2010)。

piRNA の特徴と産生機構

PIWI の標的遺伝子は、piRNA の配列によって決定される。piRNA は非タンパク質コード小分子 RNA の一種であり、その他の非タンパク質コード小分子

¹ テトラヒメナは小核と大核、2つの核を持つ。小核は完全なゲノムを含む生殖用の核であり、大核は不必要なゲノム領域が除去されたゲノムを複数コピー含んでいる。これは必要な遺伝子のコピー数を増やすためだと考えられている。

RNA (siRNA や miRNA : 20-22 塩基) に比べて長く、生物種に依存して 24 塩基から 31 塩基ほどである(Siomi et al., 2011)。また、miRNA などと比べて種類が非常に多いことも特徴であり、例えば、ショウジョウバエやマウスの生殖細胞では数百万種類以上の piRNA が報告されている(Brennecke et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Reuter et al., 2011)。piRNA は一次 piRNA と二次 piRNA に分けられる。一次 piRNA は最初の (5'末端の) 塩基がウラシル (1U) である傾向を持ち、(Aravin et al., 2008; Brennecke et al., 2007)。一方、二次 piRNA は 5'末端から 10 塩基目がアデニン (10A) である傾向を示す(Aravin et al., 2008; Brennecke et al., 2007)。piRNA の産生経路は、piRNA 前駆体から一次 piRNA を産生する経路と、一次 piRNA を起点として細胞質 PIWI が一次 piRNA と二次 piRNA を増幅する ping-pong 経路に分かれる(Iwasaki et al., 2015)。

一次 piRNA 産生経路の研究は主にショウジョウバエの卵巢由来体細胞 (OSC) を用いて解析されてきた。3 種類の PIWI (DmPiwi, DmAgo3, DmAub) を発現する生殖細胞と異なり、OSC は DmPiwi のみを発現している(Saito et al., 2009)。そのため、OSC 内では細胞質 PIWI による ping-pong 経路を介した二次 piRNA の産生は起こらない。OSC 内では、ゲノム上に存在する piRNA クラスタ (詳しくは後述する) と呼ばれる遺伝子座 (*flam* 等) から転写される転写産物

(Brennecke et al., 2007)やタンパク質タンパク質コード遺伝子 (*Dmtj*等) の 3' UTR(Saito et al., 2009)などの一本鎖 RNA から一次 piRNA が産生される (図 0-2)。転写された長鎖一本鎖 RNA は核内から細胞質へと輸送され、DmYb、DmPiwi、DmArmi 等のタンパク質から構成される Yb 小体 (ミトコンドリア上に存在する核近傍構造体) へと輸送される(Murota et al., 2014)。近年、*flam* は Yb 依存的に Flam 小体と呼ばれる Yb 小体に隣接する構造体への輸送されることが明らかになっており、Yb は一次 piRNA の前駆体となる一本鎖 RNA の輸送に関わっていると考えられている(Murota et al., 2014)。この輸送中に piRNA の前駆体となる長鎖一本鎖 RNA から、DmZuc によって、未成熟一次 piRNA が産生される(Pane et al., 2007)。未成熟一次 piRNA は、Yb 小体内で DmPiwi と結合した後に(Saito et al., 2010)、3'末端分解とメチル化修飾を経て(Kawaoka et al., 2011)、DmPIWI-piRNA 複合体として核へと輸送される(Saito et al., 2010)。

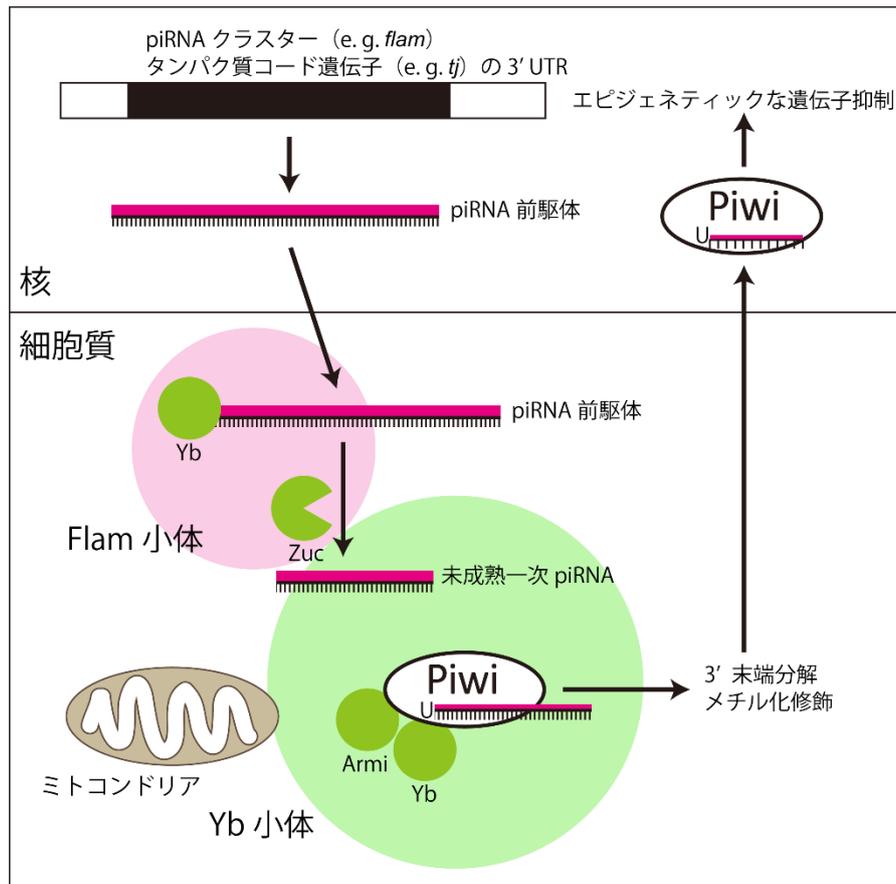


図 0-2 OSCにおける一次piRNA産生機構。piRNAクラスター等に由来するpiRNA前駆体はDmYbによってFlam小体を経て、Yb小体へと輸送される。この輸送中にpiRNA前駆体はDmZucによって未成熟一次piRNAへと加工される。その後、Yb小体内で未成熟一次piRNAはDmPiwiと結合した後に、3'末端分解とメチル化修飾を経て成熟DmPIWI-piRNA複合体として核へと輸送される。

ショウジョウバエでは、OSC における一次 piRNA 産生に関わる DmArmi が、生殖細胞でも DmPiwi や DmAub に結合する一次 piRNA の産生に関与していることが明らかになっている (Malone et al., 2009)。しかし、Yb 小体を構成するタンパク質の生殖細胞での piRNA 産生への関与は、DmArmi 以外に報告はなく、ショウジョウバエの体細胞 (OSC) と生殖細胞では一次 piRNA の産生機構に部分的に差異があると考えられている。一方で、ショウジョウバエの OSC での一次 piRNA 産生に関与するタンパク質の相同タンパク質が、マウスでも piRNA の産生に関与することが示されており (Frost et al., 2010; Soper et al., 2008; Watanabe et al., 2011; Xiol et al., 2012)、種を超えて一次 piRNA の産生経路が少なくとも部分的には保存されていることが示唆されている (Iwasaki et al., 2015)。

二次 piRNA は ping-pong 経路によって産生される (図 0-3)。ショウジョウバエの生殖細胞では、細胞質 PIWI による ping-pong 経路による piRNA の産生は、細胞質の核近傍に存在する高電子密度構造体である nuage で起こる (Lim and Kai, 2007)。ping-pong 経路では、DmAub-piRNA 複合体と DmAgo3-piRNA 複合体によって互いの標的 RNA (piRNA がセンス方向に一致する RNA とアンチセンス方向に一致する RNA) の切断を介して、piRNA の産生が行われる。DmAub には、前述した 1U を示す一次 piRNA が結合しており、piRNA に相補

的な標的 RNA に結合する。DmAub-piRNA 複合体は piRNA の 10 塩基目と 11 塩基目の間を切断するために、切断された標的 RNA の 5'末端から 10 番目の塩基は 10A を示す傾向がみられる(Brennecke et al., 2007)。この切断産物が二次 piRNA になる。この piRNA に見られる 1U と 10A 及び 10 塩基の相補的な一致を合わせて、”ping-pong サイン”と呼ばれている。

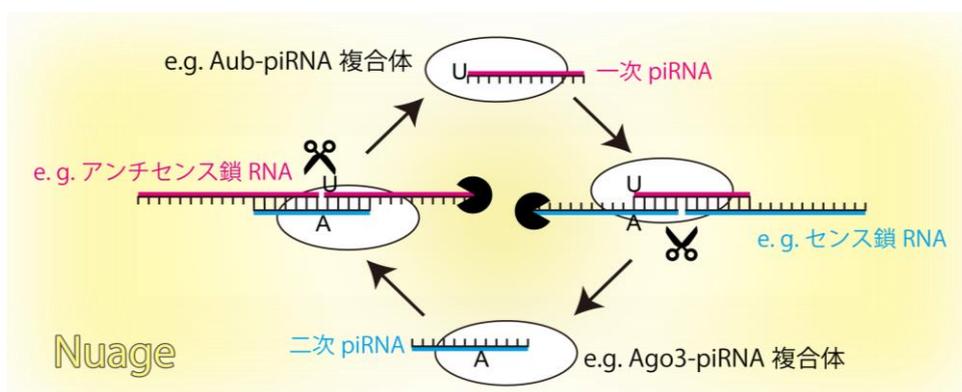


図 0-3 ショウジョウバエ生殖細胞における ping-pong 経路による piRNA 産生機構。一次 piRNA と結合している PIWI が標的 RNA に結合し、一次 piRNA の 10 番目と 11 番目の間に位置する箇所で標的 RNA を切断する。そのため、一次 piRNA と二次 piRNA は 5' 末端から 10 塩基が互いに相補的になる。その後、切断された標的 RNA の 3' 末端はトリミングされ、二次 piRNA となる。そして、二次 piRNA と結合した PIWI は同様に標的 RNA を切断し、一次 piRNA が産生される。この過程を繰り返すことで一次 piRNA と二次 piRNA は増幅されていく。

ping-pong サインはマウスやヒドラ、プラナリアまで様々な動物で報告されており (Friedländer et al., 2009; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Lim et al., 2014)、一次 piRNA を介した二次 piRNA の産生様式は種を超えて保存されていると考えられている。マウスの始原生殖細胞でも、ショウジョウバエの nuage 同様に、核近傍に存在する高電子密度構造体である pi 小体 (MmMili を含む構造体) と piP 小体 (MmMiwi2 を含む構造体) において二次 piRNA の産生が起こっていることが示されている (図 0-4) (Aravin et al., 2008; Siomi et al., 2011)。

しかし、マウスの場合、ショウジョウバエの生殖細胞で見られる ping-pong 経路を介した piRNA 産生と異なり、「一方通行の」二次 piRNA 産生であると考えられている (図 0-4)。これは、MmMili と一次 piRNA の複合体によって産生された二次 piRNA が MmMiwi2 に結合した後、Miwi2-piRNA 複合体は核に移行するためである (図 0-4) (Aravin et al., 2008; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008)。

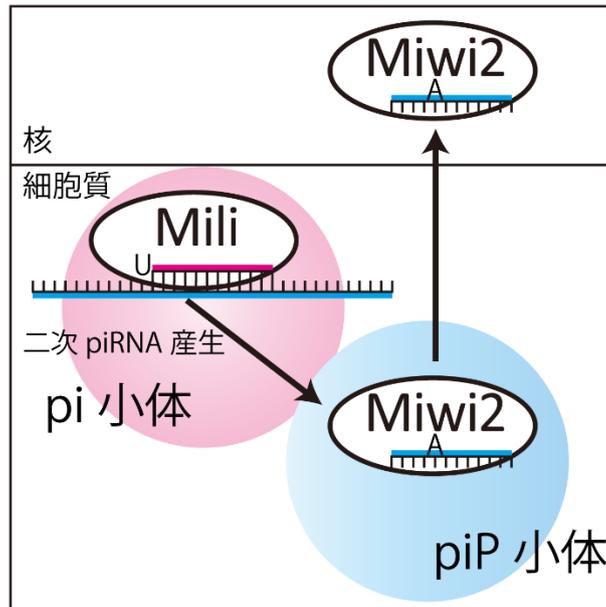


図 0-4 マウスの始原生殖細胞における ping-pong 経路。一次 piRNA-Mili 複合体は pi 小体において、二次 piRNA を産生し、piP 小体内の Miwi2 へと受け渡される。その後、二次 piRNA-Miwi2 複合体は核へと移行する。そのため、ping-pong の繰り返しは起こらない。

piRNA クラスターとは一次 piRNA の前駆体となる転写産物をコードする遺伝子座の総称であり、大量の piRNA が一致する領域として定義され、その長さは数千から数万塩基に及ぶこともある (Aravin et al., 2007; Brennecke et al., 2007; Malone et al., 2009; Manakov et al., 2015)。前述のショウジョウバエの *flam* も piRNA クラスターの一つであり、長さ 180,000 塩基にも及ぶ一本鎖 RNA をコードしている (図 0-5A)。*flam* RNA 中には *gypsy* などの転移因子の

配列が主にアンチセンス方向に存在しており (図 0-5A)、転移因子に対するアンチセンス piRNA が産生される (Brennecke et al., 2007; Sarot et al., 2004; Zanni et al., 2013)。piRNA クラスター内に新規の配列が挿入されると、挿入配列由来の piRNA が産生される (Muerdter et al., 2012)。転移因子は自身の配列あるいはコピーをゲノム中に転移させるので (図 0-5B)、piRNA クラスターに挿入された転移因子から piRNA が産生され、PIWI によって転移因子が配列特異的に抑制されることにつながると考えられる (図 0-5C) (Khurana et al., 2011)。すなわち、*flam* のような piRNA クラスターは転移因子を抑制するために piRNA を産生するために特化したゲノム領域と考えられている。実際、piRNA の配列の多くは転移因子と一致する。このことから PIWI の主な標的は転移因子であると考えられ、転移因子に対する先天免疫として機能していると考えられている (Aravin et al., 2007; Friedländer et al., 2009; Lim et al., 2014; Siomi et al., 2011)。

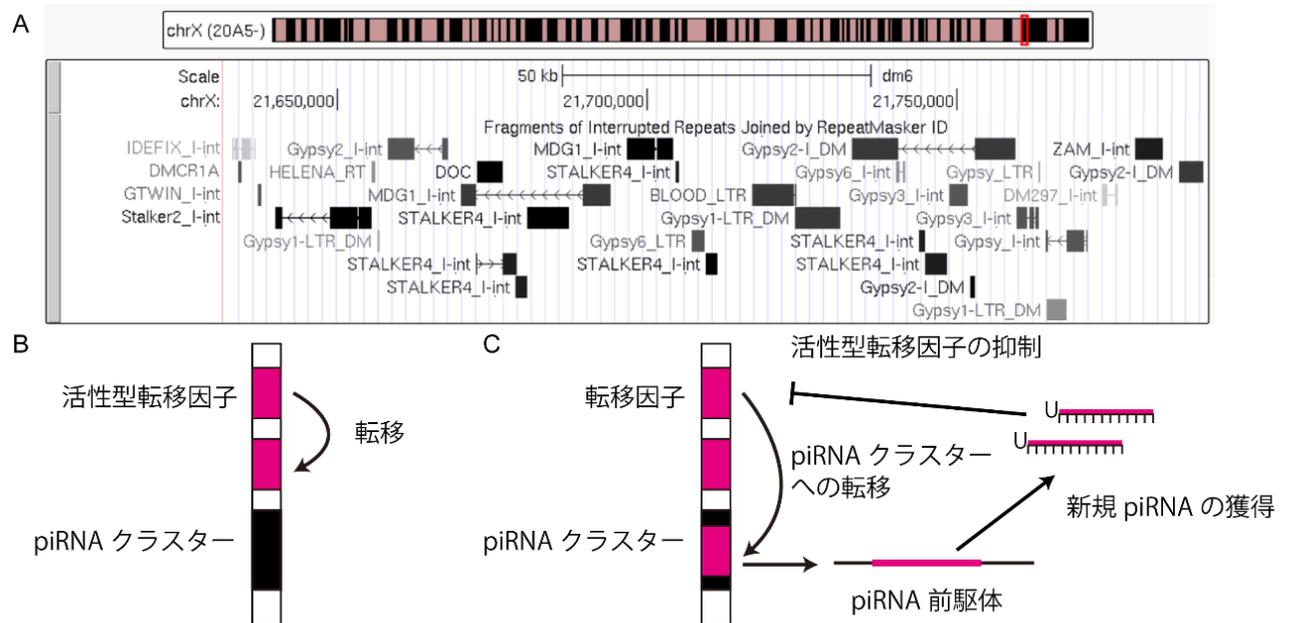


図 0-5 (A) ショウジョウバエの *flam* 遺伝子座に存在する転移因子。(出典 :

UCSC Genome Browser on *D. melanogaster* Aug. 2014) (B) 活性型の転移因子

はゲノム上の別の座位に自身あるいはコピーを挿入する。(C) piRNA クラスター

に転移因子が挿入されると、挿入された転移因子由来の新規 piRNA が産生され、

配列特異的に転移因子は抑制される。

生殖細胞における PIWI の機能

では、PIWI はどのような役割を担っているのでしょうか？まず、生殖細胞の PIWI の機能について紹介する。ショウジョウバエやマウスのそれぞれの *piwi* 変異体では、生殖巣において、転移因子の抑制解除が起こる (Carmell et al., 2007; Kalmykova et al., 2005; Li et al., 2009; Reuter et al., 2011; Vagin et al., 2006; Wang et al., 2015)。 *piwi* 変異体や機能阻害個体は結果として不妊となるが、転移因子の発現抑制の解除がどのようにして生殖巣の発生異常を引き起こすのかについての具体的な機序についてはいまだ明らかになっていない。しかし、転移因子が転移によってゲノム統合性を損ないうる点と *Mmmiwi2*、*Dmaub* や *Dmarmi* の変異体において DNA 損傷が確認されていることから (Carmell et al., 2007; Klattenhoff et al., 2007)、生殖細胞における PIWI の主な機能は転移因子の抑制を、核では転写レベルで、細胞質では転写後レベルで行い、ゲノム統合性の維持を行うことで生殖細胞の正常な分化を保証することであると考えられている (Iwasaki et al., 2015)。

また、近年、マウスの精子形成の段階で細胞質 PIWI である MmMiwi による転移因子以外の mRNA の分解を示唆する報告がなされている (Siong et al., 2015; Zhang et al., 2015)。特に、Zhang らは MmMiwi の標的であり DNA 修復・組換えに関与する遺伝子である *Xrcc2* や *Rad1* の過剰発現が精子形成を阻

害することを示し、MmMiwiによるこれら遺伝子の転写後抑制が精子形成（生殖細胞の正常な分化）に重要性であることを示した(Zhang et al., 2015)。

体細胞における PIWI の機能

前述のように、*piwi* は元々生殖細胞特異的遺伝子として同定されたが、近年生殖細胞以外の体細胞でも *piwi* の発現が報告されており、体細胞における PIWI の役割が徐々に明らかになってきている。例えば、ショウジョウバエの卵胞細胞²では、DmPiwi のみが発現している(Brennecke et al., 2007; Saito et al., 2009)。Saito らは卵胞細胞由来の OSC を用いて、DmPiwi は転写因子 DmTj によって転写を正に制御されており、さらに *Dmtj* の 3' UTR に由来する piRNA を用いて DmPiwi が細胞接着因子である *DmfasIII* の過剰発現を抑制していることを明らかにした(Saito et al., 2009)。過剰な FasIII は細胞接着を強め、卵胞細胞の正常な形状の維持、あるいは卵胞細胞と生殖細胞の接触、卵胞細胞の移動等に影響を与えると考えられる。そのため、生殖巣の正常な発生に卵胞細胞内の DmPiwi が細胞接着を制御することで寄与していると考えられている(Li et al., 2003; Saito et al., 2009)。また、ヒトからショウジョウバエに至るまで様々な癌細胞での PIWI の発現が報告されている(Janic et al., 2010; Tan et al., 2015)。例え

² 卵胞を形成する体細胞。卵胞は卵母細胞を包む体細胞集団をさす。

ば、ショウジョウバエでは DmPiwi や DmAub の変異体での脳腫瘍の成長が抑制される(Janic et al., 2010)。しかし、PIWI がどのような標的遺伝子を制御することで腫瘍の増殖抑制に寄与しているかについては不明である。加えて、神経細胞でも PIWI の発現が報告されている。ショウジョウバエの脳では DmAub と DmAgo3 が発現し、転移因子の抑制に寄与している。しかし、キノコ体³ではこれら 2 つの PIWI の発現が低く、転移因子の転移が起こり神経細胞の多様性が生まれると考えられている(Perrat et al., 2013)。また、アメフラシの脳では核 PIWI が発現しており、DNA のメチル化を介して、記憶に関わる抑制性転写因子 CREB2 を抑制することで、神経の可塑性に関与していることが報告されている(Rajasethupathy et al., 2012)。他にも初期胚における PIWI の発現も報告されている。ショウジョウバエの初期胚では受精卵での 3 種類の母性 PIWI が初期胚でも分解されず、保持される。初期胚において保持された PIWI がどのような分子機構を担っているかは不明であるが、この 3 種類の PIWI は初期胚の正常な細胞分裂に必須である(Mani et al., 2014)。また、カイコの初期胚では細胞質 PIWI である SIWI が雌特異的 piRNA を使って、オス化転写因子をコードする *Masc* mRNA を分解することで性決定を行っている(Kiuchi et al., 2014)。

最後に、成体の多能性幹細胞での PIWI の機能について紹介する。プラナリア

³ 昆虫の記憶や学習を司る中枢神経系

を含む扁形動物や群体ボヤでは、*piwi* 遺伝子の機能が再生能力の維持や幹細胞の維持に必要であることが示されている(De Mulder et al., 2009; Palakodeti et al., 2008; Reddien et al., 2005; Rinkevich et al., 2010)。また、ヒドラでも多能性幹細胞からの適切な体細胞分化に PIWI が必須であることが示されている(Juliano et al., 2014)。これらの生物では、核酸の長さに基づく分画によって得られた piRNA と予測される小分子 RNA の配列が決定されてきた(Friedländer et al., 2009; Palakodeti et al., 2008)。また、海産性の扁形動物 (*Macrostomum lignano*) とヒドラにおいては PIWI に結合する piRNA 配列決定が、免疫沈降法と次世代シーケンサーを用いて行われている(Juliano et al., 2014; Lim et al., 2014; Zhou et al., 2015)。これら piRNA の解析から、成体多能性幹細胞においても PIWI は転移因子を標的としていると考えられている(Friedländer et al., 2009; Juliano et al., 2014; Lim et al., 2014; Palakodeti et al., 2008; Zhou et al., 2015)。しかし、実際に転移因子が PIWI によって制御されていることを示した先行研究は *M. lignano* の先行研究のみである(Zhou et al., 2015)。また、この先行研究でも、*piwi* 遺伝子の機能阻害によって転移因子の発現上昇が多能性幹細胞自体で起こっているのかあるいは別の細胞で起こっているのかは示されていない。また、興味深いことに、ヒドラやプラナリアなどの piRNA の解析から、多能性幹細胞において転移因子以外の遺伝子が PIWI によって制御され

ている可能性が示唆されている (Juliano et al., 2014; Lim et al., 2014; Palakodeti et al., 2008; Zhou et al., 2015)。しかし、プラナリア *Schmidtea mediterranea* の多能性幹細胞において、細胞質 PIWI である SMEDWI-1 と SMEDWI-3 が *histone h4* RNA の細胞内局在の制御に関与している以外に（詳しくは第四章で後述する）、多能性幹細胞における PIWI の転移因子以外の標的遺伝子の制御は未知である。

以上のように PIWI-piRNA 複合体は多様な遺伝子の発現制御を介して様々な役割を担っていると考えられているが、いまだ明らかになっていない部分が多い。種を超えた *piwi* の多能性幹細胞での発現の保存性から、成体多能性幹細胞における PIWI-piRNA 複合体の機能解析は、成体内で多能性幹細胞を維持するのに重要な要素を理解する上で重要であると考えられる。また、生殖細胞と多能性幹細胞は次世代を残す点において共通の役割を担っており、多能性幹細胞における PIWI 機能の理解は、生殖細胞における PIWI の役割についても新たな知見を与える可能性がある。

プラナリアの体制と生態

淡水生プラナリアの一種である *Dugesia japonica* (和名：ナミウズムシ) は、扁形動物門・渦虫綱・三岐腸目に分類される左右相称の三胚葉性動物であり、水質の良い河川に生息し、体の中央部にある咽頭を使って水棲昆虫などを食する肉食性の動物として知られる。全長は~2 cm ほどであり、扁平な体に三角形の頭を持つ (図 0-6A, B)。頭部背側には一对の眼が、その下には逆 U 字型の脳、また全身に亘って一对の腹側神経索とそれらをつなぐはしご状神経を持つ (図 0-6D) (Agata et al., 1998)。加えて、プラナリアの形態的特徴である三又に分岐した腸管 (三岐腸) が全身に分布している (図 0-6C)。体のほぼ中心にある腸管の分岐部分から尾側にかけて、口と肛門を兼ねた咽頭が存在し、腹側には咽頭を体外に出すための咽頭口が存在する (図 0 C, E)。このようにプラナリアは単純ではあるが組織化された体制を持つ。プラナリアは自然界では有性生殖と無性生殖の両方を行うことができ、主に冬場、気温が低下し生活環境が悪化すると有性化し有性生殖を行う。一方で、それ以外の時には無性状態を維持し、体長が一定を超えると自切⁴し再生することで二個体になる無性生殖を行う (Agata et al., 2006)。

⁴ プラナリアの場合、咽頭前部あるいは後部で横に自らくびれきれることを指す。

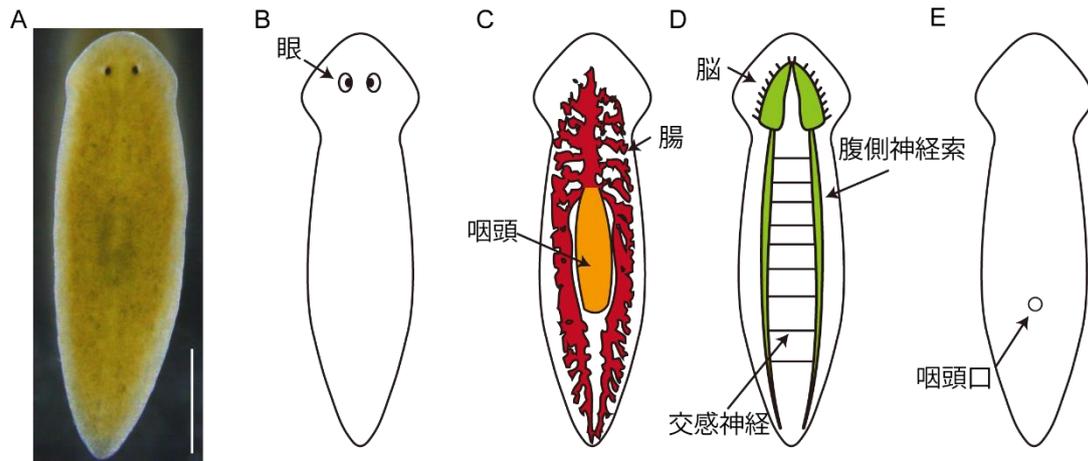


図 0-6 淡水生プラナリア *Dugesia japonica*。(A) 背側からの写真。スケールバー：500 μm (B) 背側からの外見の模式図。(C) 腸管と咽頭の模式図背側からの外見の模式図。(D) 神経系の模式図。(E) 腹側からの外見の模式図。

プラナリアの再生と成体多能性幹細胞（新生細胞）

プラナリアは、小さな断片に人為的に切断した際にも、自切した際と同様に、すべての断片から全身の器官をおよそ一週間で再生することができる(Agata, 2003; Morgan, 1898)。頭部領域を切断した胴体断片からの再生の場合、切断直後に傷口が閉じ、損傷治癒が起こる。そして、再生 1 日目には切断面に再生芽⁵

⁵再生段階の初期に傷口に見られる未分化細胞が集まった細胞塊と一般には定義されるが、プラナリアでは頭部先端部に形成される分化中の細胞 (*DjpiwiA* mRNA 陰性/*DjPiwiA* タンパク質陽性)からなる細胞塊である最近明らかにされ

が形態的に観察され、再生 3 日目には再生芽を含む領域に、再生した眼が確認される (図 0-7A)。このプラナリアの驚異的な再生能力は多能性幹細胞である新生細胞 (neoblast) に依存している (Agata and Watanabe, 1999)。新生細胞は X 線によって特異的に消失する、再生芽形成に必須な細胞として同定された (Wolff and Dubois, 1948)。新生細胞はプラナリアにおいて唯一分裂能を持つ細胞であり (Hayashi et al., 2010; Newmark and Sánchez Alvarado, 2000)、成体を構成するすべての細胞に分化する分化多能性を持つ (図 0-7B) (Wagner et al., 2011)。新生細胞は再生時のみだけでなく、恒常性維持のための分化細胞の供給にも寄与している (図 0-7B) (Newmark and Sánchez Alvarado, 2000)。新生細胞は成体において全細胞の約 30%を占め、頭部と咽頭を除く全身に分布しており、間充織内で恒常的に維持されている (図 0-7C) (Hayashi et al., 2006)。

た (Tasaki et al., 2011a)。

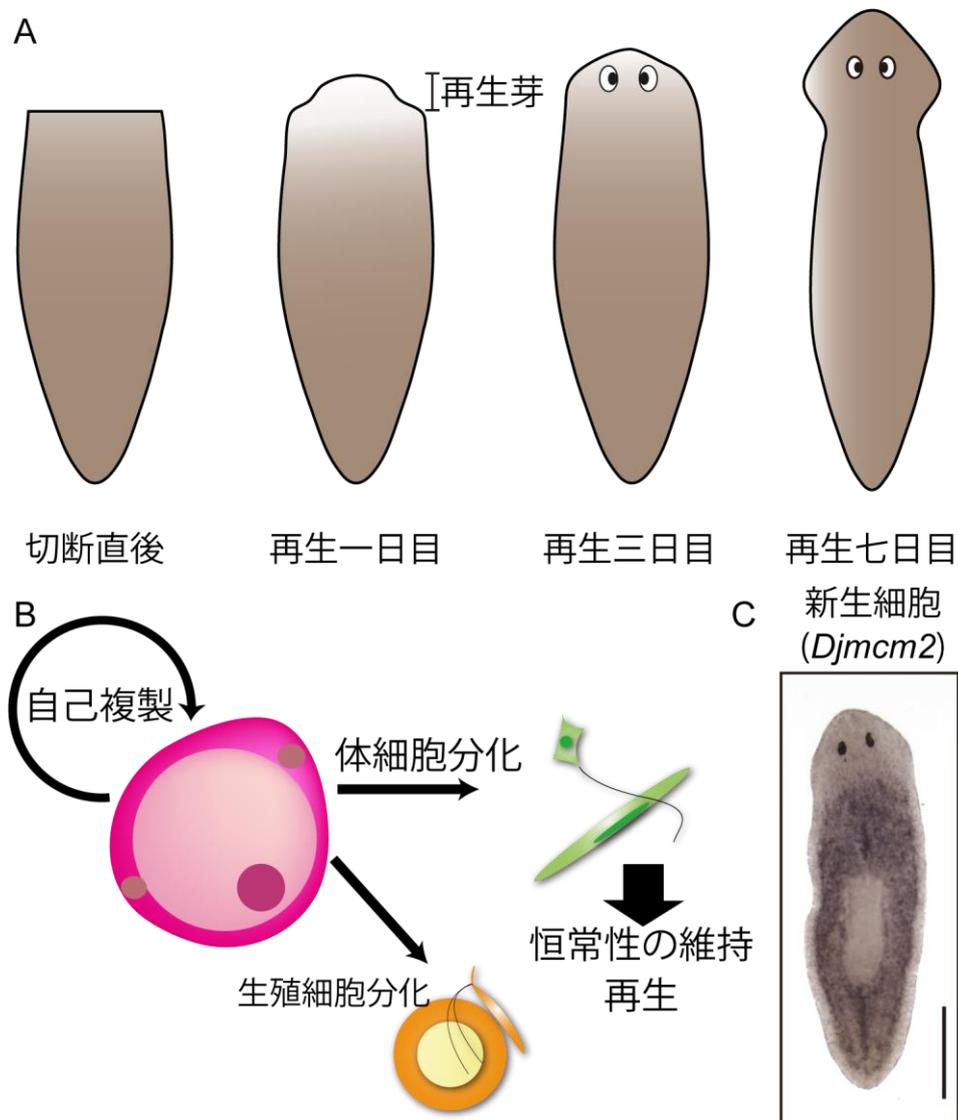


図 0-7 (A) プラナリア *D. japonica* の再生過程の模式図。(B) 新生細胞を起点としたプラナリア幹細胞システム。恒常性の維持や再生に必要な細胞はすべて新生細胞から供給される。(C) 新生細胞の分布。(*Djmcm2* のホールマウン
ト *in situ* ハイブリダイゼーション)。スケールバー : 500 μ m。

新生細胞の形態的・分子的特徴

新生細胞は球状で細胞の直径が 10 μm 程と小さいことや核が細胞全体に占める割合が大きいことなどの典型的な未分化細胞の形態的特徴を持っているため、電子顕微鏡による観察によって容易に判別することができる (Morita et al., 1969; Pedersen, 1959)。加えて、新生細胞は、クロマトイド小体と呼ばれる膜構造を持たない高電子密度構造体を細胞質に持つという形態的特徴を持つ (Coward, 1974; Hori, 1982)。クロマトイド小体は、RNA を含んでいることから、RNA-タンパク質複合体であると考えられており (Auladell et al., 1993; Hori, 1982)、多くの動物の生殖細胞で観察される生殖顆粒に形態的に似た構造体である。新生細胞の分子的な特徴としては、細胞分裂関連遺伝子や *piwi* 遺伝子を含む生殖細胞関連遺伝子を発現していることが挙げられる。前述のように、新生細胞はプラナリアの成体において唯一分裂能を持った細胞であり、細胞周期関連遺伝子を特異的に発現している。そのため、*mcm2* や *mcm3*、*pcna*、*histone* などの S 期特異的に転写される遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現細胞の染色 (Hayashi et al., 2010; Orii et al., 2005; Rouhana et al., 2014; Salvetti et al., 2000) や抗リン酸化ヒストン H3 抗体 (抗 pH3 抗体) を用いた免疫染色 (Hendzel et al., 1997; Newmark and Sánchez Alvarado, 2000) によって、新生細胞の一部を可視化することができる。また、電子顕微鏡による観察から見

出された高電子密度構造体という新生細胞と生殖細胞の形態的な類似性に着眼し、生殖細胞において生殖顆粒を構成する RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子が新生細胞特異的あるいは優位に発現していることが、*D. japonica* を含む複数の種で報告されてきた(Guo et al., 2006; Hayashi et al., 2010; Reddien et al., 2005; Rouhana et al., 2010; Salvetti et al., 2005; Shibata et al., 1999, 2012; Solana et al., 2009; Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。これらの中には、*piwi* 遺伝子やクロマトイド小体の構成タンパク質として初めて同定された Me31B/Dhh1/RCK/p54 のプラナリア相同タンパク質である DjCBC-1 (*Dugesia japonica* Chromatoid-Body-Component-1) などが含まれる(Palakodeti et al., 2008; Reddien et al., 2005; Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。

プラナリアにおける *piwi* ファミリー遺伝子の発現と機能

先行研究において、*S. mediterranea* の新生細胞で 3 種類の *piwi* 遺伝子、*smedwi-1*、*smedwi-2*、*smedwi-3* が発現していることが示された(Palakodeti et al., 2008; Reddien et al., 2005; Sánchez Alvarado et al., 2002)。その後、異なる 2 種類のプラナリア *D. japonica* と *Dugesia ryukyuensis* においても、それぞれ 3 種類の *piwi* 遺伝子 (*smedwi-1*、*smedwi-2*、*smedwi-3* の相同遺伝子が *D. japonica* では *DjpiwiA*、*DjpiwiB*、*DjpiwiC*、*D. ryukyuensis* では *Drpiwi-*

1、*Drpiwi-2*、*Drpiwi-3*と名付けられている)の新生細胞での優位な発現が報告された(Hayashi et al., 2010; Nakagawa et al., 2011)。また、免疫染色法によって、DjPiwiA、SMEDWI-1、DrPiwiA はすべて細胞質 PIWI であることが(Nakagawa et al., 2011; Wenemoser and Reddien, 2011; Yoshida-Kashikawa et al., 2007)、SMEDWI-2 は核 PIWI であることが明らかになっている(Zeng et al., 2013)。また、近年、抗対称性メチル化アルギニン抗体である Y12 抗体によって認識されるクロマトイド小体に局在するタンパク質の一つが SMEDWI-3 であることを示唆する報告があり(Rouhana et al., 2014)、SMEDWI-3 は細胞質 PIWI である可能性が高い。RNA 干渉法 (RNAi) による各遺伝子の機能阻害実験の結果、*Drpiwi-1* 機能阻害個体では再生能力や多能性幹細胞の維持などには大きな影響がない一方、生殖細胞の発生に異常が見られ、*Drpiwi-1* は生殖細胞分化に必須であることが明らかになっている(Nakagawa et al., 2011)。また、*smedwi-2* や *Drpiwi-2* 機能阻害個体では再生不全がおこることが報告されている(Nakagawa et al., 2011; Reddien et al., 2005)。*smedwi-2* RNAi 処理後初期では分裂能を持った新生細胞が存在するにもかかわらず、再生能力が失われることと、表皮の細胞の形状に異常が見られることから、SMEDWI-2 は新生細胞の正常な分化に必要なのではないかと考えられている(Reddien et al., 2005)。また、*smedwi-2*機能阻害個体では、再生能力を失ってから数日後には、新生細胞

が失われていく (Reddien et al., 2005)。この現象に関しては、新生細胞の分化異常の結果、恒常性の維持ができなくなっているためではないかと Reddien らは考察している。一方、*smedwi-3* 機能阻害個体でも、*smedwi-2* 機能阻害個体に比べると緩やかではあるが、再生能力の喪失と新生細胞の消失が起こることが報告されている (Palakodeti et al., 2008)。

プラナリアにおいてははまだ PIWI との直接の結合が示された RNA は得られていないが、核酸の長さに基づいた分画による piRNA と予測される小分子 RNA の解析は行われている (Friedländer et al., 2009; Palakodeti et al., 2008)。

それら piRNA と予測される小分子 RNA は 1 U や ping-pong サインを示しており、多くの転移因子に一致していた (Friedländer et al., 2009; Palakodeti et al., 2008)。また、Palakodeti らは SMEDWI-2 や SMEDWI-3 が少なくとも一部の piRNA と予測される小分子 RNA の産生に重要であることを明らかにしている (Palakodeti et al., 2008)。piRNA と予測される小分子 RNA には転移因子以外の遺伝子に一致するものも多く含まれていた (Palakodeti et al., 2008)。

Rouhana らは、*S. mediterranea* を用いて、上記の先行研究で得られた piRNA と予測される小分子 RNA の中に *histone* RNA に一致するものを同定し、RNAi 法を用いることで、SMEDWI-2 を除く SMEDWI-1 と SMEDWI-3 が *histone h4* RNA のクロマトイド小体への局在に重要であることを示している

(Rouhana et al., 2014)。しかし、*histone h4*の局在を制御する以外に、PIWI が成体多能性幹細胞システムにおいて具体的にどのような役割を担っているのかは不明であった。

本研究で明らかになったこと

本研究では成体多能性幹細胞における PIWI の機能を理解するために、機能阻害によって最も重篤な再生不全を引き起こした *DjpiwiB* 遺伝子を中心に標的遺伝子の同定と PIWI の機能解析を行った。第一章では、3 種類の *piwi* 遺伝子の機能阻害実験を行い、再生能力や新生細胞に与える影響を確認した。また、3 種類の PIWI に対する抗体を用いることで、DjPiwiA と DjPiwiC が細胞質 PIWI であるのに対して、DjPiwiB が核 PIWI であることを示した。さらに DjPiwiB のみがすべての分化細胞へと分解されることなく受け継がれていくことを明らかにした。第二章、第三章では、DjPiwiB の標的遺伝子の同定を試みた。まず、第二章では、抗 DjPiwiB 抗体を用いた免疫沈降法によって、DjPiwiB 結合 piRNA を得た。そして、決定した DjPiwiB 結合 piRNA の配列をもとに DjPiwiB-piRNA 複合体の標的として、転移因子である *gypsy-P1* を同定した。コントロール個体では *gypsy-P1* の発現は完全に抑制されているが、*DjpiwiB* 機能阻害個体では *gypsy-P1* の発現が、新生細胞ではなく、DjPiwiB 陰性の分化中の細胞で確認さ

れた。*DjpiwiB*機能阻害個体で発現が上昇する他の転移因子に関しても、分化中の細胞での抑制の解除が起こっていることを示唆する結果が得られた。これらの結果から、新生細胞から保持される DjPiwiB-piRNA 複合体が転移因子の抑制に重要であると結論づけた。第三章では、*DjpiwiB*機能阻害個体の RNA-seq と DjPiwiB 結合 piRNA の配列をもとに、転移因子以外のタンパク質コード遺伝子が DjPiwiB-piRNA 複合体によって制御されるのかを検証した。結果、DjPiwiB-piRNA 複合体が新生細胞において細胞周期関連遺伝子 (*Djmcm2*, *Djhistone h4*) の発現を制御していることを明らかにした。さらに、DjPiwiB は *Djcalu* を新生細胞と分化細胞で抑制することで、*Djcalu* の分化中の細胞における一過的な発現制御に寄与していることも示した。以上の結果から、DjPiwiB-piRNA 複合体は新生細胞や分化細胞において、転移因子以外の機能性タンパク質をコードする遺伝子の発現を制御する役割を持っていると結論づけた。第四章では、DjPiwiC が新生細胞内の Y12 抗体免疫反応性クロマトイド小体上に局在し、*gypsy-P1* のアンチセンス RNA と共局在していることを見出した。また、*DjpiwiC*機能阻害個体では、DjPiwiB 陽性の分化中の細胞において *gypsy-P1* の発現が観察されたことや DjPiwiB の標的転移因子が *DjpiwiC*機能阻害個体でも発現が上昇することなど、DjPiwiC がアンチセンス RNA からの DjPiwiB 結合 piRNA の産生に関与していることを示唆する結果を得た。

本研究は、成体多能性幹細胞システムにおける PIWI-piRNA 複合体の多様な役割、特に、遺伝子の発現制御における、分解されずに保持される核 PIWI の重要性を初めて明らかにしたものであり、ここに報告する。

材料と方法

生物試料と飼育法

淡水生プラナリア *Dugesia japonica* (和名：ナミウズムシ) の GI 系統および GI 系統の有性生殖によって生じた F1 である SSP 系統 ($2n=16$) (Ito et al., 2001)を用いた。人工海水塩 Instant Ocean Sea Salt (Aquarium systems) を 0.05 g/L になるように脱イオン水に溶かした飼育水中で、24°Cで飼育し、一週間あるいは二週間に一度ニワトリの肝臓を与えることで、無性個体を維持した。一週間から二週間絶食したプラナリアを実験に使用した。

X 線照射

プラナリアを氷上の湿ったろ紙上に配置し SOFTEX B-5 (SOFTEX) を用いて 150 レントゲンの X 線照射を行った。

抗体作成

抗体の作成は株式会社医学生物学研究所に依頼した。DjPiwiA、DjPiwiB、DjPiwiC に対するウサギ抗体を作成するために、各 DjPiwi タンパク質の一部に相当するペプチドを合成し、ウサギに投与した。そして、ウサギの血清から親和性精製によって、各ペプチドに対するポリクローナル個体を得た。使用したペプ

チドは以下の通りである。

DjPiwiA EPALQPETIIDKVGKDG 27 アミノ酸から 43 アミノ酸に

相当

DjPiwiB KKPMRERRRKPGEEDKE 303 アミノ酸から 319 アミノ酸

に相当

DjPiwiC FENSEKPTTSKFRRREH 172 アミノ酸から 188 アミノ酸

に相当

ホールマウント免疫組織染色

プラナリアを 2% HCl を含む 5/8 Holtfreter 氏液 (37.44 mM NaCl / 0.42 mM KCL / 0.57 mM CaCl₂ / 1.49 mM NaHCO₃) 内で、室温で 5 分間激しく震盪し、酸固定と粘液の除去を行った。次に、5% methanol / 4% パラホルムアルデヒド / 5/8 Holtfreter 氏液に液を交換し、室温で 30 分間震盪した。その後、5% 過酸化水素 / 83% methanol 中で、蛍光灯下で 16 時間脱色を行った。100% methanol で洗浄後、50% methanol / 50% キシレンを加え、4 °C で 30 分間震盪した。さらに再水和のため 100%, 75%, 50%, 25% のエタノールを含む 5/8 Holtfreter 氏液、TPBS (2.7 mM KCl / 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O / 136.9 mM NaCl / 1.5 mM KH₂ PO₄ / 0.1% Triton X-200) で 4 °C で 30 分間ずつ震盪した。5 µg/mL proteinase K を含

む TPBS に液交換をし、37 °C で 15 分間震盪し透過処理を行い、5% methanol/4% パラホルムアルデヒド/5/8 Holtfreter 氏液に交換し、4 °C で 30 分間震盪し、後固定を行った。その後 TPBS に液交換と 4 °C での 10 分間震盪を三回繰り返した。その後、TPBS で希釈した 10% ヤギ血清で 4°C で 30 分振盪することで、サンプルのブロッキングを行った。ブロッキングの後、一次抗体（抗 Syt 抗体：1/500、Y12 抗体:1/250、抗 DjCBC-1 抗体：1/800、その他の一次抗体：1/1000 の濃度で使用した。）を含む TPBS で希釈した 10% ヤギ血清で終夜 4°C で振盪を行った。その後 TPBS に液交換と 4 °C での 30 分間震盪による洗浄を 6 回以上繰り返した。洗浄後、1/1000 に希釈した二次抗体（Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 594 / Alexa Fluor 6980 (Molecular Probe)）と Hoechst33342 (1 μ g/ml) (Calbiochem) を含む TPBS で希釈した 10% ヤギ血清で終夜 4°C で振盪を行った。その後 TPBS に液交換と 4 °C での 30 分間震盪による洗浄を 6 回以上繰り返した。サンプルは Fluosave Reagent (Merck Millipore)を用いて、スライドグラスに封入した後、共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (Olympus) あるいは蛍光実体顕微鏡 M205FA-TRC 1 (Leica) を用いて観察と撮影を行った。

***Djhistone h4*, *Djcalu* のクローニング**

正常個体由来の cDNA と下記のプライマーを用いて Ex-taq (Takara) を用いて PCR を行ったのち、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用い

て PCR 産物を精製した。そして、TOPO® TA Cloning® Kit, Dual Promoter, with pCR™II-TOPO® Vector (Invitrogen) を用いて、クローニングを行った。その後シーケンスを行い、cDNA がセンス方向に挿入されているものを使用した。

| 標的遺伝子名 | 方向性 | 配列 (5'→3') |
|---------------------|---------|-----------------------------|
| <i>Djhistone h4</i> | forward | CTCATGAAATCAATCCTGAGTTAGAAC |
| | reverse | ATCGATAAAAATGTCTGGACGTGG |
| <i>Djcalu</i> | forward | ATGGTGTAATTCATTCGCTGAG |
| | reverse | GCAGTACAAGACAAAGAGATTTAAG |

PCR の条件は下記の通りである。

- ① 94 °C で 1 分間
- ② 98 °C で 10 秒間
- ③ 55 °C で 15 秒間
- ④ 72 °C で 2 分間
- ⑤ 72 °C で 7 分間
- ⑥ 4 °C

②から④のサイクルを 35 回繰り返した。

RNA プローブ用鋳型調整

標的遺伝子が挿入されたプラスミド (*Djhistone h4* と *Djcalu* は pCR II-TOPO に、その他の EST ライブラリー(Nishimura et al., 2012)に存在する cDNA は pBluescript に挿入されている) を下記の制限酵素を用いて切断したのち、phenol/chloroform 抽出によって核酸を精製した。

Djhistone h4 : BamH1

Djcalu : BamH1

DjpiwiA (*Dj_aH_000_03609HH*) : BamH1

DjpiwiB (*Dj_aH_221_M14*) : BamH1

DjpiwiC (*Dj_aH_000_05977HH*) : BamH1

gypsy-P1 (*Dj_aH_208_K05*) : Not1 (5'末端側) あるいは Xho1 (3'末端側)

Djmcm2 (*Dj_aH_301_B02*) : Spe1

DjgraA (*Dj_aH_000_02072HH*) :Not1

標識 RNA プローブ合成

直鎖プラスミド DNA を鋳型として、アンチセンス鎖 RNA のプローブの作成には T7 ポリメラーゼ (Fermentus) を、センス鎖 RNA のプローブの作成には T3

ポリメラーゼ (Fermentus) あるいは SP6 ポリメラーゼ (Promega) を使用した。RNA プローブの標識は、Digoxigenin (DIG)(Roche diagnostics Diagnostics) あるいは Fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC)(Roche diagnostics Diagnostics)を取扱説明書に従い使用し行った。37 °C で三時間反応後、20 µl の反応液に、125 mM EDTA を 1 µl 加えて、反応を停止させた。その後、NH₃OAc (10 M) を 5 µl、EtOH を 60 µl 加えてエタノール沈殿によって、核酸を生成した。RNA プローブは 50 ng/µl の濃度になるように DEPC 処理水に溶解した。

ホールマウント *in situ*ハイブリダイゼーション

後固定の後の洗浄までは前述のホールマウント抗体染色と同様である。洗浄後、サンプルはハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide / 5x SSC (0.75 M NaCl / 0.075 M tri-sodium citrate dihydrate) / 0.1 mg/mL 酵母全 RNA / 100 U/mL heparin / 0.1% Tween-20 / 10 mM DTT / 10% Dextran) 中で 55 °C で一時間振盪した。その後、熱変性した標識 RNA プローブを加えて、55 °C で 40 時間振盪した後、wash バッファー (50% formamide / 5x SSC / 0.1% Tween-20) に液交換し、55 °C で一時間に洗浄を 6 回繰り返した。Buffer I (0.1 M maleic acid / 5x SSC / 0.1% Tween-20 : pH 7.5) への液交換をし、サンプルを馴染ませたのち、Buffer II (1% blocking reagent (Roche diagnostics)を含む Buffer I) 中

で、4 °C で 30 分間震盪しブロッキングを行った。その後、AP 発色の場合は、1/2000 に希釈した抗 DIG-AP 抗体(Roche diagnostics)を含む Buffer II 中で、蛍光発色の場合は 1/100 に希釈した 抗 DIG-POD 抗体(Roche diagnostics)を含む Buffer II あるいは TUNEL-POD (Roche diagnostics) 中で、4 °C での終夜震盪を行った。その後、Buffer I による 4 °C での 30 分間の洗浄を五回以上行った。AP 発色の場合は、175 µg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (Roche diagnostics)と 180 µg/mL 4-nitro blue tetrazolium chloride (Roche diagnostics)を含む TMN 液 (0.1 M Tris-HCl / 0.1 M NaCl / 50 mM MgCl₂ : pH 9.5)中で発色を行い、TE (10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA : pH 8) を加えることで、反応を停止した。その後、T-PBS (2.7 mM KCl / 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O / 136.9 mM NaCl / 1.5 mM KH₂ PO₄ / 1% Triton X-200) 中で、4 °C での終夜震盪を行い、脱色を行った。蛍光発色の場合は、TSA kit #2 あるいは #5 (Thermo Fisher Scientific)を使用した。その後必要に応じて免疫染色を行った。サンプルは Fluosave Reagent (Merck Millipore)を用いて、スライドグラスに封入した後、共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (Olympus) あるいは蛍光実体顕微鏡 M205FA T-RC 1 (Leica) を用いて観察と撮影を行った。

ウェスタンブロッティング

プラナリアを 2x サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.12% bromophenol blue, 0.6% 2-mercaptoethanol) 中で粉砕した後、98 °C で 5 分間熱変性を行った。10%ポリアクリルアミドゲルを用いて 20 A で 100 分間の SDS-PAGE を行った後、immuno-Blot PVDF membranes (BIO-RAD) に対して 60 V で 90 分間転写を行った。サイズマーカーとして MagicMark™ XP Western Protein Standard (Thermo Fisher Scientific) を使用した。1% ウシ血清アルブミンを含む TPBS (2.7 mM KCl / 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O / 136.9 mM NaCl / 1.5 mM KH₂ PO₄ / 0.1% Triton X-200) 中で、メンブレンのブロッキングを行った後、一次抗体 (Y12 抗体:1/250、その他の一次抗体 : 1/1000 の濃度で使用した。) を含む TPBS 中で終夜 4°C で振盪を行った。その後 TPBS に液交換と室温での 15 分間震盪による洗浄を 3 回以上繰り返した。洗浄後、1/5000 に希釈した HRP 結合二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) を含む TPBS 中で、室温で一時間振盪を行った。その後 TPBS に液交換と室温での 15 分間震盪による洗浄を 3 回以上繰り返した。ImmunoStar Zeta (Wako) を用いて、シグナルの検出を行った。

二本鎖 RNA (dsRNA) 合成

下記のプライマーと Ex-taq (Takara) を用いて、プラスミドに挿入された

cDNA 断片の両端に T7 プロモーターを付加した。Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて PCR 産物を精製したのち、MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、dsRNA を合成した。

【使用したプライマー一覧】

Zap Linker + T7 (*DjpiwiA*, *DjpiwiB*, *DjpiwiC*, *gypsy-P1*):

GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGAATTCGGCACGAGG

SK Fw + T7 (*gfp*):

GATCACTAATACGACTCACTATAGGGCGCTCTAGAACTAGTGGATC

M13 Rev (*gfp*, *DjpiwiA*, *DjpiwiB*, *DjpiwiC*, *gypsy-P1*):

GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAA.

PCR の条件は下記の通りである。

- ① 94 °C で 2 分間
- ② 94 °C で 30 秒間
- ③ 65 °C で 30 秒間
- ④ 72 °C で 4 分間
- ⑤ 72 °C で 7 分間

⑥ 4 °C

②から④のサイクルを 35 回繰り返した。

摂餌 RNA 干渉 (RNAi)

すり潰したトリのレバーと等量の水を混ぜた溶液 25 μ l に 6 μ l の 2% Type IV agarose (Sigma)、6.5 μ l の 2 μ g/ μ l dsRNA を混ぜたものを 6 μ l ずつに分けて、-20 °C で 30 分間固まらせ、15 匹のプラナリアに与えた。2 日の間をあけて、摂餌 RNA は 2 回行った。コントロールとして、*egfp* (*enhanced green fluorescent protein*) の dsRNA を使用した。

RNA 抽出

プラナリアを ISOGEN-LS (Nippongene) でホモジナイズし、取扱説明書に従って High-salt solution (1.2 M NaCl, 0.8 M Sodium Citrate) を用いて、RNA を抽出した。

cDNA 合成

抽出した RNA を鋳型として、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて cDNA 合成を行った。

定量 PCR を用いた発現量解析

第三章以外での定量 PCR は ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) を用いて行った。1x QuantiTect SYBR green PCR master mix (QIAGEN)、0.3 μ M 遺伝子特異的順鎖プライマー、0.3 μ M 遺伝子特異的逆鎖プライマー、1 μ l の 20 倍希釈した cDNA を含む 10 μ l の反応液中で PCR 反応を行った。

第三章での qPCR は、Biomark HD (Fluidigm) と 96.96 DynamicArray IFC chips (Fluidigm) を用いて、取扱説明書に従って、反応を行った。鋳型には 1/5 に希釈した cDNA を TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて増幅したものを用いた。

cDNA の増幅時の PCR の条件は下記の通りである。

- ① 95 °C で 10 分間
- ② 95 °C で 15 秒間
- ③ 60 °C で 4 分間
- ④ 4 °C

②から③のサイクルを 14 回繰り返した

定量 PCR の条件は下記の通りである。

- ① 50 °C で 2 分間
- ② 95 °C で 15 分間
- ③ 95 °C で 15 秒間
- ④ 60 °C で 30 秒間
- ⑤ 72 °C で 1 分間

②から⑤のサイクルを 40 回繰り返した

【使用したプライマー一覧】

| 標的遺伝子名 | 方向性 | 配列 (5'→3') |
|------------------|---------|-------------------------|
| <i>c24699_g1</i> | forward | ATGGCCAACAATTCAATGTG |
| | reverse | CGTTTTCCGTCCTTCTAAATTTG |
| <i>c30762_g1</i> | forward | TGACCCTGCTGAGGAAATTC |
| | reverse | TGCCTTAAATCGATTCCAGC |
| <i>c34156_g1</i> | forward | GACCAGCTTTCAAGGATTGC |
| | reverse | TGAAACCAATTGCACAAAGC |
| <i>c41596_g2</i> | forward | TGACACATGAACCAAAACGAC |
| | reverse | AATAACTGCGATCGGATTGAG |
| <i>c42056_g1</i> | forward | CCGATTCAGGCAGATAAAGG |
| | reverse | TTGCATAGCCTGTTGGTTG |
| <i>c45204_g2</i> | forward | TTGAAACAGGAATTCGAGGTG |
| | reverse | AGGCTGTGTTAATGCCCATC |
| <i>c45827_g2</i> | forward | GCAAGTTGCGCATGTACAAG |
| | reverse | AAAGCTGTCTGTGTCACCTGC |
| <i>c45937_g2</i> | forward | ATTTTCCGTCCTGTCAAAATG |

| | | |
|----------------------|---------|----------------------------------|
| | reverse | GGTGCTCTGCCTTCAGATTC |
| <i>c46079_g1</i> | forward | CCAAGATCGGTCAATGTGTTACC |
| | reverse | TCGGCATCAATAGGACCACC |
| <i>c46086_g1</i> | forward | TGGGCAATTGGGAGGACATC |
| | reverse | TGGCTCCTGTATTTCTGCTGG |
| <i>gypsy-P1</i> | forward | GTCTTTTCTGAAACGTTCAACGAAC |
| | reverse | CAGCCATTTACATTTTGTAGGCTT |
| <i>Djbc-1</i> | forward | TCAGTGTTTTGTGAACTTTAGTGGTGCTGAA |
| | reverse | GTCTTTCACATTATCTTGCAATTTGCTAACAC |
| <i>Djcalu</i> | forward | GGAACACCTTTACGAGCAACC |
| | reverse | TAGTGCCACCGTGCGAATTA |
| <i>Djhistone h1</i> | forward | CTTGAAACTTCCCGAAGCAC |
| | reverse | ATGGTCCATTTCTACGACGTG |
| <i>Djhistone h2a</i> | forward | CCTAGGCATTTGCAGCTCGCTATTC |
| | reverse | GAGACTTGTGGATATGAGGTATAACTCCAC |
| <i>Djhistone h2b</i> | forward | ATTCAAACATCCGTCCGTCT |
| | reverse | TTTTGTAACAGCCTTCGTCC |
| <i>Djhistone h3</i> | forward | CCTTTCCAAAGACTGGTTCG |
| | reverse | TAAAGCACCAACAGCAGCAC |
| <i>Djhistone h4</i> | forward | GCCAACAAGAAGCAGCAGTAG |
| | reverse | AACCCTTTACGGATTCGGAG |
| <i>Djcalu</i> | forward | CATTCTGGCTGTGGATCTTTATTAC |
| | reverse | TTCGCATACATTCGACCAGA |
| <i>Djg3pdh</i> | forward | ACCACCAACTGTTTAGCTCCCTTAG |
| | reverse | GATGGTCCATCAACAGTCTTTTGC |
| <i>pcna</i> | forward | ACCTATCGTGTCACTGTCTTTGACCGAAAA |
| | reverse | TTCATCATCTTCGATTTTCGGAGCCAGATA |
| <i>Djmcm2</i> | forward | AAATTGTTCACTCGCATCACC |
| | reverse | AAAATCGCTGTTGGACAAGG |
| <i>Djmcm3</i> | forward | GAGTCAGTTCCAAATCATCGATTATATCCT |
| | reverse | TTCAAGGATGTCTTGAAGAAGACGAACAAG |
| <i>c44080_g1</i> | forward | AAATTTTCATCCGCAAAGTCG |
| | reverse | TCAACAATGCACAATCCACC |
| <i>c45902_g1</i> | forward | TGAGGCGATTAGGGGTTTCAG |

| | | |
|------------------|---------|----------------------------|
| | reverse | AACAAGCATCAACCAGCCAG |
| <i>c45810_g2</i> | forward | CGTCAAGATGAATGTGGAGTGG |
| | reverse | ATGCTTTTATACCACAACCTACCTGG |
| <i>c40767_g1</i> | forward | AAGGTCATCATCCCGATCAG |
| | reverse | CTGTGCTGAATGGATGCAAG |
| <i>c45663_g1</i> | forward | GGACACAAATAATTGGTGGGA |
| | reverse | GGGTTTTGAGAACATGGAGC |

U0126 処理と摂餌 RNAi

MAPK/ERK kinase (MEK)阻害剤 U0126 (Cell Signaling Technology)は 0.25%の DMSO を含む飼育水中に終濃度が 25 μ M になるようにして、使用した。1 度目の摂餌 RNAi の直後から継続して、U0126 処理を行った。

免疫沈降に用いるプラナリア組織抽出液の調整

250 μ l の Medium Salt Buffer (MSB: 50 mM Tris-HCl / 150 mM NaCl / 0.05% NP-40) と Mini Complete protease inhibitors (Roche diagnostics)をプラナリア二十匹に加え、液体窒素で冷凍した。凍結させたプラナリアは氷上で解凍しつつ、ホモジナイズを行い、さらにピッペッティングによって細胞を解離させた。冷凍と解凍をもう一度繰り返したのち、18000 x g、4°C で 10 分間の遠心を行い、上清を新しいチューブに移した (サンプル 1)。200 μ l の MSB とプロテアーゼ阻害剤を入れて、上記の破碎、冷凍、解凍を繰り返した。そして、上清を新しいチューブ

ブに移した (サンプル 2)。さらに同様の操作を行い、サンプル 3 を得た。そして、サンプル 1-3 を混ぜたものを免疫沈降に用いた。

免疫沈降

まず、300 μ l の Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow slurry (GE Healthcare) を 1 ml の MSB に加えて、5 分間転倒混和を行った。遠心後、上清を捨て、650 μ l の MSB を加えたのち、100 μ l 毎に分けた。そして、50 μ l の抗 DjPiwiA 抗体、抗 DjPiwiB 抗体あるいはコントロールとして正常個体由来の血清を加えてのち、総量が 1 ml になるように MSB を加えた。混合液の転倒混和を 4 °C で 3 時間行った。1 ml の MSB による 1 分間の洗浄と遠心を介した液交換を 4 回行った。300 μ l のプラナリア組織抽出液を上記の混合液にそれぞれ加え、MSB を総量が 1 ml になるように加えた。その後、混合液の転倒混和を 4 °C で 1 時間行った。その後、1 ml の MSB による 3 分間の洗浄と遠心を介した液交換を 5 回行い、最終的に免疫沈降物が得られた。

銀染色

得られた免疫沈降物に対して、250 μ l のサンプルバッファー を加えてのち、

95 °C で 10 分間熱変性させた。その後、前述のように SDS-PAGE を行った。銀染色には SilverQuest™ Staining Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。

DjPiwiB 結合 piRNA-seq

抗 DjPiwiB 抗体を用いて得られた免疫沈降物に 150 µl ずつ H₂O と phenol/chloroform を加え、phenol/chloroform 抽出、ethanol 沈殿を行った。得られた RNA を ³²P で標識した後、電気泳動を行った。免疫沈降によって得られた RNA の GA IIx を用いたシーケンスは北海道システムサイエンスに依頼し、リード長 36 塩基の配列情報が得られた。

DjPiwiB 結合 piRNA の解析

自家製の Ruby スクリプトによりアダプター配列を除去したのち、33 塩基以下の配列のみを解析に用いた。*D. japonica* に由来する配列のみを選択するため、*D. japonica* EST とショットガンゲノムシーケンスの結果に対する piRNA のマッピングを BWA (0.6.1-r104; <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) (Li and Durbin, 2009) によって行った。マッピングの結果から EST あるいはゲノムに一致する piRNAs のみを選択し、piRNA の各位置における塩基頻度は seqLogo(<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/seqLogo.ht>

[ml](#))を用いて解析した。

転移因子のアノテーション

第二章における *D. japonica* EST の転移因子のアノテーションは Rebase (ver. 16.08; <http://www.girinst.org/downloads/>) (Jurka et al., 2005)に含まれるタンパク質のアミノ酸と BLASTX (ver. 2.2.25) によってえられた結果に基づいて行った。E-value が $1E^{-6}$ 未満の結果のうち、もっとも E-value が小さいものをアノテーションに使用した。

oligo (dT) ビーズを用いた mRNA 精製

http://openwetware.org/wiki/MRNA_Prep に従って、Sera-Mag Oligo (dT) Coated Magnetic particles (GE Healthcare Life Sciences) を用いた 2 度の mRNA 精製を行った。

Illumina シークエンサー用のライブラリー調整

RNA-seq 用のライブラリー調整には TruSeq RNA Sample Preparation Kits v2 (illumina) を用いた。100 μ g の oligo (dT) ビーズを用いた精製済み RNA を用いた。逆転写からアダプター付加までは取扱説明書に従って行った。その後、

LIMprep (<http://bit.riken.jp/protocols/>) に従い、2xKAPA HiFi HS (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて、5 サイクルのライブラリーの増幅を行った。

RNA-seq

RNA-seq は GS FLX + (Roche diagnostics)、 Miseq(Illumine) あるいは Hiseq2500 (illumina) を用いて行った。すべての結果は PRJDB4258 に保存されている。

次世代シーケンスリードの前処理

Miseq を用いて得られたリードのアダプター配列と信頼度が低い塩基配列の除去を `trimmomatic-0.30.jar` (オプションは `PE -phred33 ILLUMINACLIP:TruSeq2-PE.fa:2:30:7 LEADING:10 TRAILING:10 SLIDINGWINDOW:15:10 MINLEN:36 HEADCROP:10`) (Bolger et al., 2014) によって行った。その後、ペアエンドリードのアセンブリを PEAR (オプションは `-j 10 -p 1.0 -v 40`) (Zhang et al., 2014a) を用いて行った。さらに、アセンブルされなかったリードの信頼度が低い塩基配列の除去をより厳しく `trimmomatic-0.30.jar` (オプションは `PE -phred33 ILLUMINACLIP:TruSeq2-PE.fa:2:30:7 LEADING:10 TRAILING:10 SLIDINGWINDOW:15:30`

MINLEN:36) で行った。一方で、GS FLX +を用いて得られたリードのアダプター配列と信頼度が低い塩基配列の除去を trimomatic-0.30.jar (オプションは SE -phred33 ILLUMINACLIP:454_adapter.fa:2:30:7 LEADING:10 TRAILING:10 SLIDINGWINDOW:15:20 MINLEN:36 HEADCROP:10) で行った。その後、seqclean (オプションは -MAL) (<http://sourceforge.net/projects/seqclean/>)を用いて、Nが多いリードの除去を行った。

***de novo* トランスクリプトームアセンブリー**

de novo トランスクリプトームアセンブリーは Trinity の CuffFly オプションを用いて行った。(version r20140413p1) (Henschel et al., 2012)。アセンブルの結果は DRZ007413 に保存されている。

発現変動遺伝子解析

上記の *de novo* トランスクリプトームアセンブリーで得られたリファレンスを用いて、発現変動遺伝子解析を行った。マッピングは Trinity に同梱されている align_and_estimate_abundance.pl を用いて、bowtie(Hatem et al., 2011)と eXpress(Henschel et al., 2012)によって行った。予測された各遺伝子に対応するリ

ード数を四捨五入し、Sun らによって提唱されている手法を用いて、発現変動遺伝子解析を行った(Sun et al., 2013)。解析結果は DRZ007434 に保存されている。

***DjpiwiB*機能阻害個体における H-DEG のアノテーション**

DjpiwiB 機能阻害個体における H-DEG のアノテーションを BLASTX (version 2.2.25)を用いて行った。Rebase (version 17.08) (Jurka et al., 2005) と Swiss-Prot (Boeckmann, 2003)に含まれるアミノ酸配列をデータベースとして使用し、E-value が $1E^{-6}$ 未満の結果のうち、もっとも E-value が小さいものをアノテーションに使用した。

第一章 プラナリアにおける PIWI タンパク質の細胞内局在

序論

淡水生プラナリア *D. japonica* は新生細胞 (neoblast) と呼ばれる多能性幹細胞を成体においても維持している。そのため、小さな断片からでもおよそ一週間で、全身を再生することができる (Agata and Watanabe, 1999; Shibata et al., 2010)。プラナリアの新生細胞の特徴として、再生能力が低い生物の生殖細胞で通常特異的に発現している遺伝子を発現していることがあげられる (Rink, 2013; Shibata et al., 2010)。その内の一つが *piwi* 遺伝子である。有性生殖を行う生物にとって PIWI と piRNA による遺伝子抑制機構は必要不可欠である (Siomi et al., 2011)。PIWI や piRNA が機能しない生殖細胞では転移因子の抑制が解除され、最終的にその個体は不妊になってしまう (Brennecke et al., 2007; Khurana and Theurkauf, 2010)。プラナリアの新生細胞も無性生殖においてはすべての体細胞を、また有性生殖では生殖細胞を供給するという観点から、次世代を残す源となる細胞であり、有性生殖を行う生物の生殖細胞とプラナリアの新生細胞で *piwi* の発現が保存されているのは非常に興味深い。

先行研究によって、別種のプラナリア *Schmidtea mediterranea* の新生細胞で、3種類の *piwi* (*smedwi-1*, *smedwi-2*, *semdwi-3*) が優位に発現していることが示され (Palakodeti et al., 2008; Reddien et al., 2005)、特に *smedwi-2* や

semdwi-3 が新生細胞の機能に重要であることがそれぞれの遺伝子の機能阻害実験によって示唆されている (Palakodeti et al., 2008; Reddien et al., 2005)。また、SMEDWI-1、SMEDWI-2 がそれぞれ細胞質 PIWI と核 PIWI であることが示されており (Guo et al., 2006; Zeng et al., 2013)、加えて、PIWI の抗対称性メチル化アルギニンを認識する Y12 抗体を用いた先行研究によって SMEDWI-3 が細胞質 PIWI であることが強く示唆されている (Rouhana et al., 2012)。一方で、*D. japonica* の新生細胞においても 3 種類の *piwi* (*semdwi-1*, *semdwi-2*, *semdwi-3*) の相同遺伝子が、それぞれ、*DjpiwiA*, *DjpiwiB*, *DjPiwiC* が発現していることが明らかになっている (図 1-1) (Hayashi et al., 2010; Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。しかし、*D. japonica* において、各 *piwi* の機能や、細胞質 PIWI である *DjPiwiA* 以外の他の 2 種類の PIWI の細胞内局在は不明であった。そこで、本章では、まず、RNA 干渉法 (RNAi) を用いて、*DjpiwiA*, *DjpiwiB*, *DjpiwiC* 機能阻害がプラナリアの組織の恒常性や再生に与える影響を調べた。また、*DjPiwiA*, *DjPiwiB*, *DjPiwiC* のそれぞれに特異的な抗体を用いてホルマウント免疫染色を行い、プラナリアにおけるそれぞれの PIWI タンパク質の発現パターンと細胞内局在を明らかにした。以上の知見を踏まえて、本章では、プラナリア新生細胞における PIWI の機能や細胞内局在を紹介する。

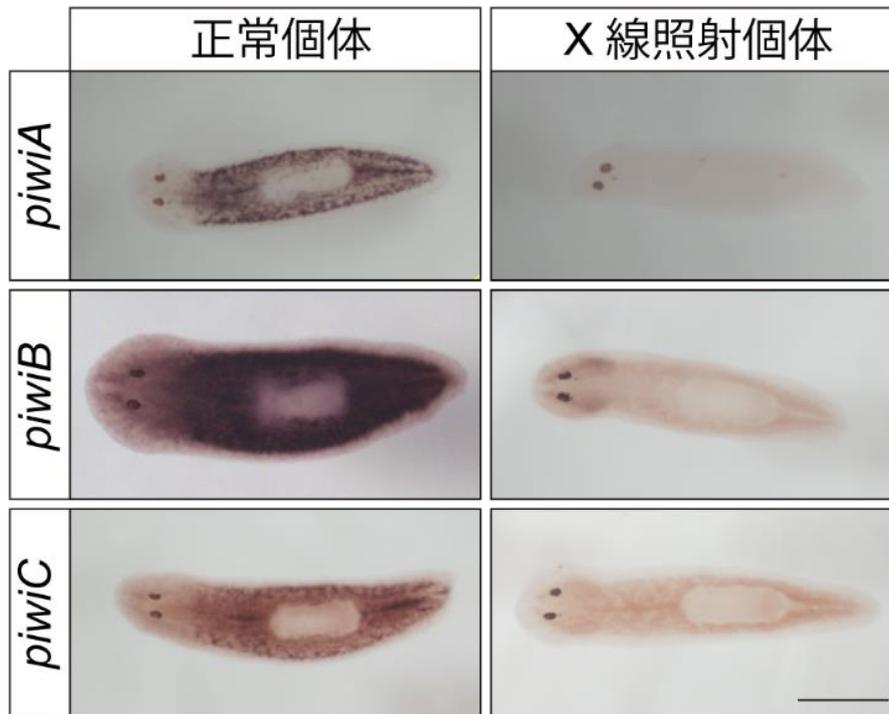


図 1-1 *D. japonica* の新生細胞で発現する 3 種類の *piwi* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。正常個体では新生細胞での優位な発現が確認されるが、X線照射後 7 日目の X線照射個体では、新生細胞の消失に伴って、*piwi* の発現は確認されなくなる。ただし、*DjpiwiB* 及び *DjpiwiC* は脳での発現が確認される。スケールバー：500 μm 。

結果

DjPiwiB は新生細胞の体細胞分化に必要である

プラナリア *D. japonica* における PIWI の機能を明らかにするために、まず、各 *piwi* 遺伝子 (*DjpiwiA*, *DjpiwiB*, *DjpiwiC*) の機能阻害が再生能力に与える影響を調べた。RNAi は標的 mRNA に対応する二本鎖 RNA (dsRNA) を含む餌による摂餌 RNAi 法によって行った。2 日の合間をあけて、2 度の摂餌を行い、2 回目の摂餌 RNAi 後 7 日目 (7 dpf) に咽頭前部及び後部で切断し、胴部断片の再生を一週間観察した (図 1-2A)。各 *piwi* RNAi は各標的 *piwi* 遺伝子特異的に発現量の減少を引き起こしていた (図 1-2B)。*DjpiwiA* 機能阻害個体や *DjpiwiC* 機能阻害個体では、コントロール個体と同様に、正常な頭部再生が観察された (図 1-2C)。一方で、*DjpiwiB* 機能阻害個体では再生芽の形成すら観察されなかった (図 1-2C)。切断を行っていない個体を用いて、7 dpf におけるリン酸化ヒストン H3 (pH3) 陽性細胞 (M 期の細胞: Hendzel et al., 1997; Newmark and Sánchez Alvarado, 2000) の数を調べたところ、7 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体では正常に細胞分裂が起こっていることが示された (図 1-3A、B)。また、7 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体における新生細胞マーカー遺伝子 *Djpcna*, *Djhistone h2b*, *Djprmt* (Sakurai et al., 2012; Shibata et al., 2012; Tasaki et al., 2011a) の発現も、コントロール個体と比べて優位な差は見受けられなかった (図 1-3C)。

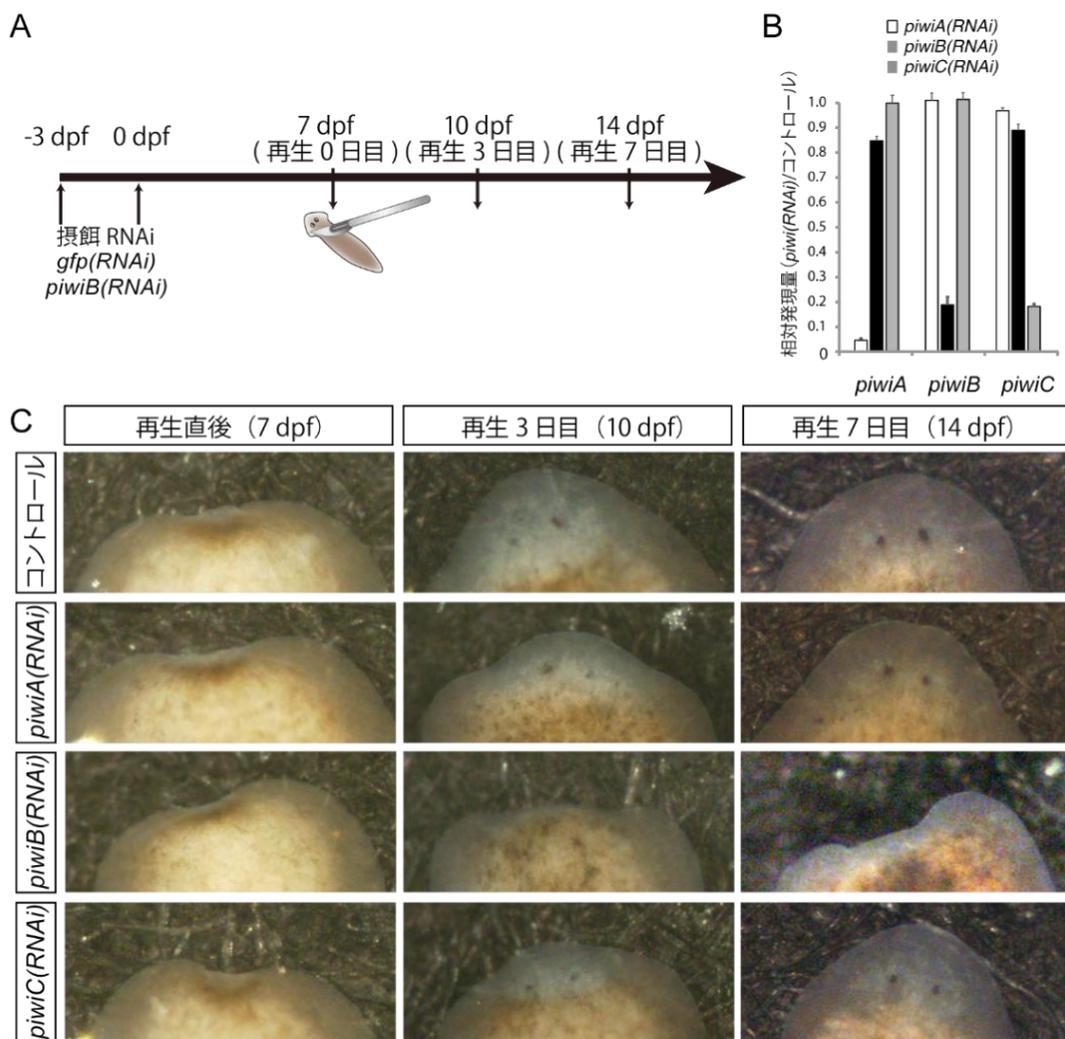


図 1-2 RNAi による各 *Djpiwi* 遺伝子の機能阻害。(A) 摂餌 RNAi を用いた機能阻害個体再生実験の日程。(B) RT-qPCR (逆転写定量 PCR) で調べた、2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目 (7 dpf) の各 *piwi* 遺伝子機能阻害個体における *piwi* 遺伝子の発現量。エラーバーは標準誤差を表している。RNAi は標的遺伝子特異的に作用していた。(C) 7 dpf でプラナリアを切断すると、*DjpiwiA* 機能阻害個体や *DjpiwiC* 機能阻害個体では正常な頭部の再生が観察された。しかし、*DjpiwiB* 機能阻害個体では再生芽が形成されず、重篤な再生不全が観察された。

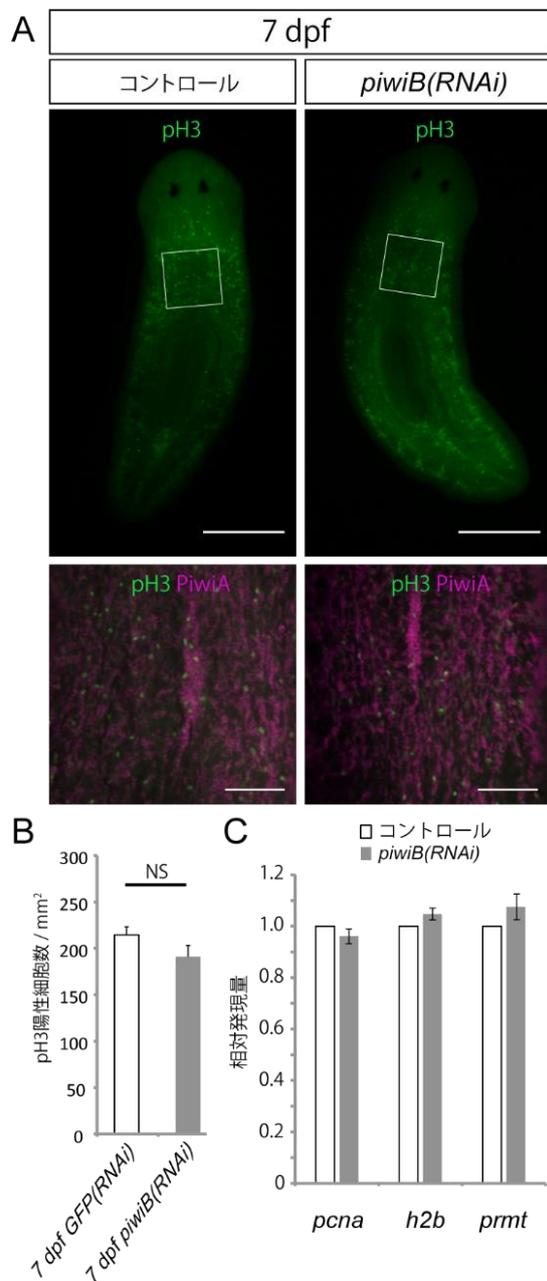


図 1-3 (A) 2 回目の摂餌 RNAi 後 7 日目 (7 dpf) の *DjpiwiB* 機能阻害個体とコントロール個体の抗 pH3 抗体 (緑) および抗 DjPiwiA 抗体 (マゼンタ) を用いたホールマウント免疫共染色。スケールバー : 500 μ m (上段)、100 μ m (下段)。(B) NS は統計的有意差がないことを示している。*DjpiwiB* 機能阻害個体とコントロール個体における pH3 陽性細胞数。NS は統計的有意差がないことを示している。(C) RT-qPCR によって得られた、7 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体とコントロール個体における新生細胞マーカー遺伝子の発現量。エラーバーは標準誤差を表している。

一方で、2回目の摂餌 RNAi 後 1 日目 (1 dpf) に切断を行った場合には (図 1-4A)、コントロール個体と比べて不完全ではあるが、*DjpiwiB* 機能阻害個体でも眼の再生が観察された (図 1-4B)。このことから、再生能力の喪失は 2 度目の摂餌 RNAi 後一週間 (7dpf) 以内起こると考えられた。また、同様のスケジュールで再生実験を行った *DjpiwiC* 機能阻害個体では、頭部を再生した後、より後期で、頭部が先端から失われていく現象 (頭部退縮) が観察された (図 1-4C)。この現象は X 線照射個体などでも観察される現象で、新生細胞の異常によって起こると考えられている。

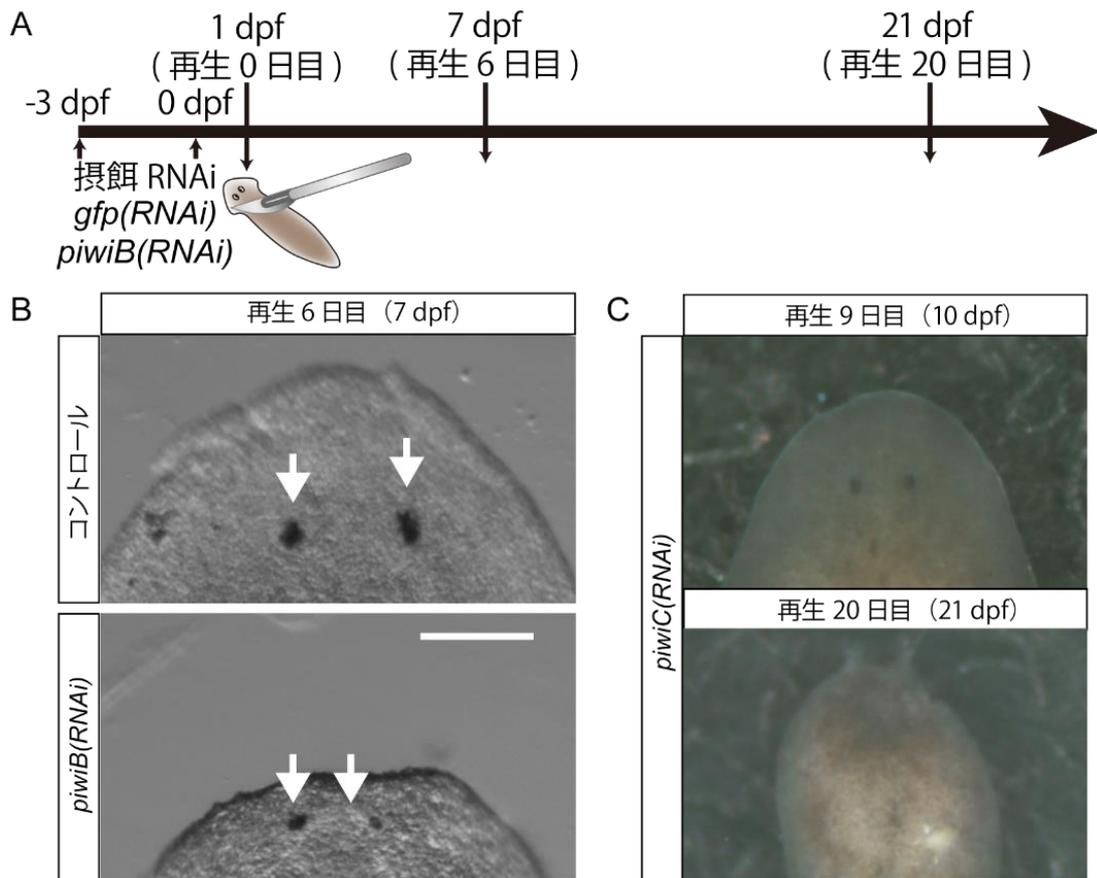


図 1-4 RNAi 後 1 日目に切断した際の *DjpiwiB* あるいは *DjpiwiC* 機能阻害の影響。(A) 摂餌 RNAi を用いた機能阻害個体再生実験の日程。(B) 2 回目の摂餌 RNAi 後 1 日目 (1 dpf) でプラナリアを切断すると、*DjpiwiB* 機能阻害個体はコントロール個体と比べて不完全ながら再生した。白矢印は再生した眼を表している。(C) *DjpiwiC* 機能阻害再生個体では、頭部の再生後、より後期で頭部の退縮が観察された。スケールバー : 100 μ m。

以上の結果から、*S. mediterranea* の *smedwi-1* や *smedwi-2*、*smedwi-3* の先

行研究の結果と一致して、*DjpiwiB* は新生細胞の制御に最も重要であり、*DjpiwiC* も新生細胞の制御に寄与していることが強く示唆された。一方で、*DjpiwiA* は新生細胞の制御に必須ではないと考えられた。また、7 dpf における *DjpiwiB* 機能阻害個体の再生能力の喪失は、新生細胞の不足によるものではないことから、新生細胞からの分化異常に起因する可能性が示唆された。

DjPiwiB タンパク質は新生細胞から分化細胞へと保持される

次に *D. japonica* における PIWI の発現パターンと細胞内局在を、各 PIWI に対する抗体を用いた免疫染色を行うことで調べた。先行研究と同様に、DjPiwiA は新生細胞の細胞質で特異的に検出された (図 1-5) (Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。同様に、DjPiwiC は新生細胞の細胞質で特異的に検出されたが、顆粒状の強いシグナルが細胞質で観察され、DjPiwiC が新生細胞特異的な RNA-タンパク質複合体であるクロマトイド小体 (Shibata et al., 2010) に局在している可能性が示唆された (図 1-5B : 矢尻)。一方で、驚くべきことに、DjPiwiB はすべての細胞の核で観察された (図 1-5C-E)。別種のプラナリアの相同タンパク質である SMEDWI-2 は新生細胞優位な核への局在が報告されているが (Zeng et al., 2013)、*D. japonica* では、すべての新生細胞 (DjPiwiA 陽性細胞) と分化細胞 (DjPiwiA 陰性細胞) の核に DjPiwiB は局在していた。DjPiwiB の特に強いシ

グナルが核小体（核内で Hoechst のシグナルが弱い領域）で観察され（図 1-5D 矢印）、DjPiwiB の核小体への局在が示唆された。

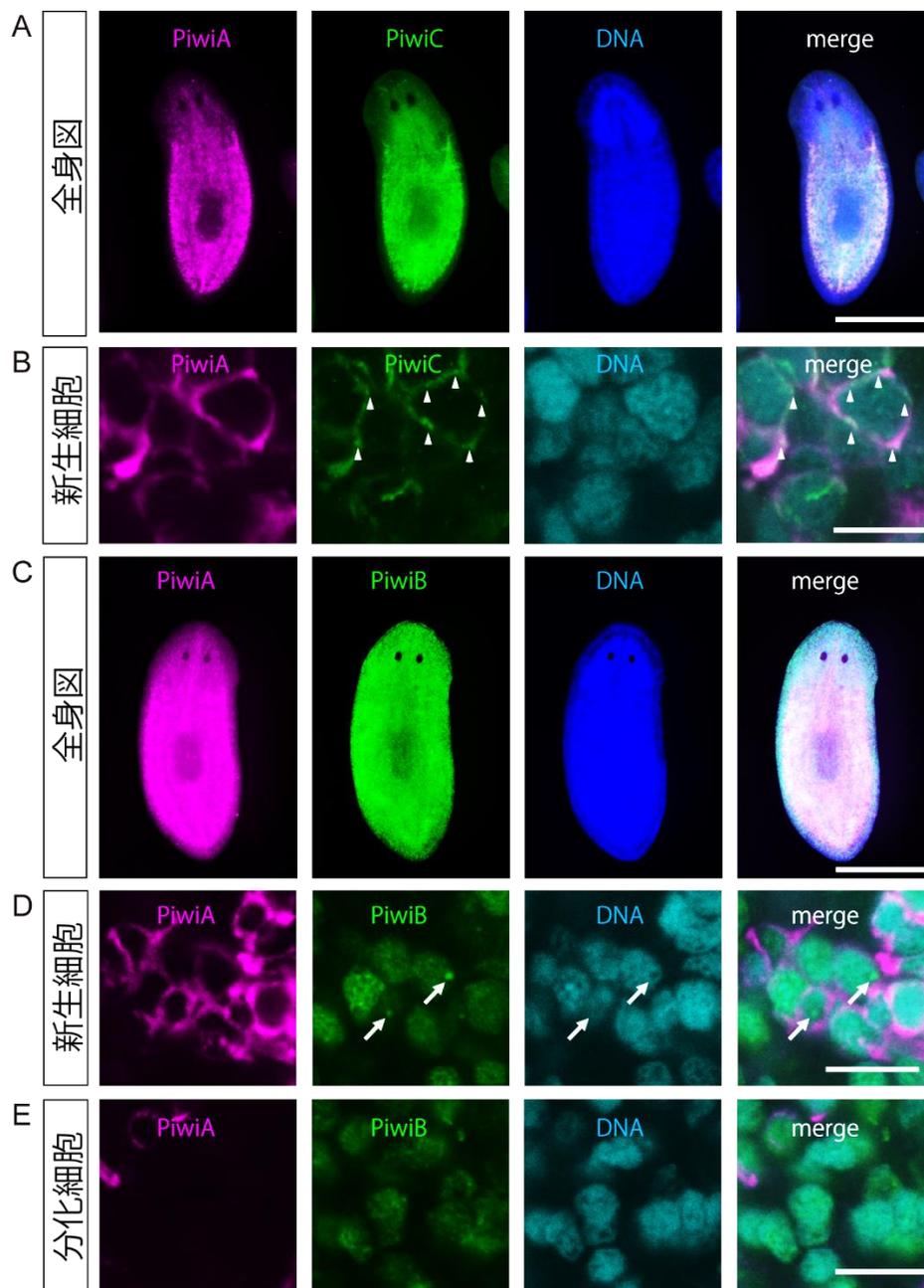


図 1-5 (A、B) 抗 DjPiwiA 抗体（マゼンタ）と抗 DjPiwiC 抗体（緑）を用いたホールマウント免疫共染色。Hoechst 33342 染色（青）。(C-E) 抗 DjPiwiA 抗体（マゼンタ）と抗 DjPiwiB 抗体（緑）を用いたホールマウント免疫共染色。

Hoechst 33342 染色（青）。（A、C）全身図。（B、D）新生細胞。（E）分化細胞。

矢尻は DjPiwiC の顆粒状のシグナルを示している。矢印は核小体への DjPiwiB の局在を示している。スケールバー：1 mm（A、C）、10 μ m（B-E）。

DjpiwiB RNA の発現と DjPiwiB タンパク質の関係を調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色を組み合わせた実験を行った。ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによって、*DjpiwiB* RNA の発現が新生細胞及び脳特異的であることが再確認された（図 1-6A、B）。その一方で、DjPiwiB タンパク質は新生細胞や脳の領域に存在する *DjpiwiB* 発現細胞だけでなく、咽頭などの *DjpiwiB* を発現していない細胞を含むすべての細胞の核で観察された（図 1-6B、C）。

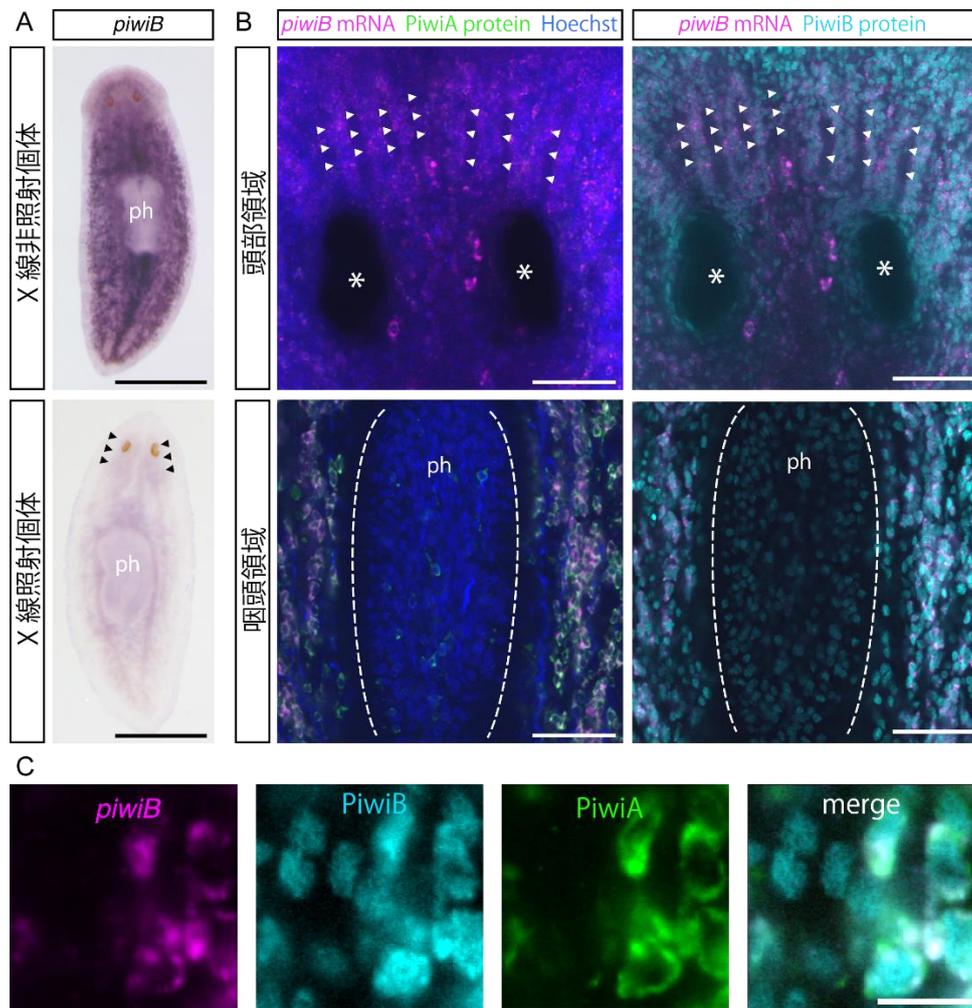


図 1-6 DjPiwiB は *DjpiwiB* を発現していない細胞を含むすべての細胞の核に存在する。(A) 正常個体及び X 線照射後 7 日目の X 線照射個体を用いた *DjpiwiB* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。(B、C) *DjpiwiB* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (マゼンタ) と抗 DjPiwiA 抗体 (緑) 及び抗 DjPiwiB 抗体 (シアン) を用いたホールマウント免疫共染色 (緑)。Hoechst 33342 染色 (青)。矢尻は脳を示している。*: 眼。ph: 咽頭。点線は咽頭の境界を表している。スケールバー: 1 mm (A)、50 μ m (B)、10 μ m (C)。

次に、*DjpiwiB* RNAi によって DjPiwiB の新規産生を阻害した際の DjPiwiB 陽性細胞への影響を調べるために、抗 DjPiwiB 抗体を用いた 7 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体のホルマウント免疫染色を行った。咽頭前部領域の観察から、コントロール個体ではほぼすべての細胞が DjPiwiB 陽性であるのに対して、*DjpiwiB* 機能阻害個体では、80%以上の新生細胞で DjPiwiB タンパク質は陰性であることが明らかとなった（図 1-7A、B）。対照的に、90%の分化細胞は DjPiwiB 陽性であった（図 1-7A、B）。

また、X 線照射個体のウエスタンブロッティングを行ったところ、*DjpiwiB* の発現は脳以外では確認されないにも関わらず（図 1-6A）、DjPiwiA や DjPiwiC と異なり、X 線照射個体における DjPiwiB タンパク質の量の減少はほとんど確認されず（図 1-7C）、DjPiwiB タンパク質は新生細胞以外の細胞にも多く存在することが示唆された。この結果は、脳を含むすべての分化細胞に DjPiwiB が確認されたホルマウント免疫染色と一致するものであった。

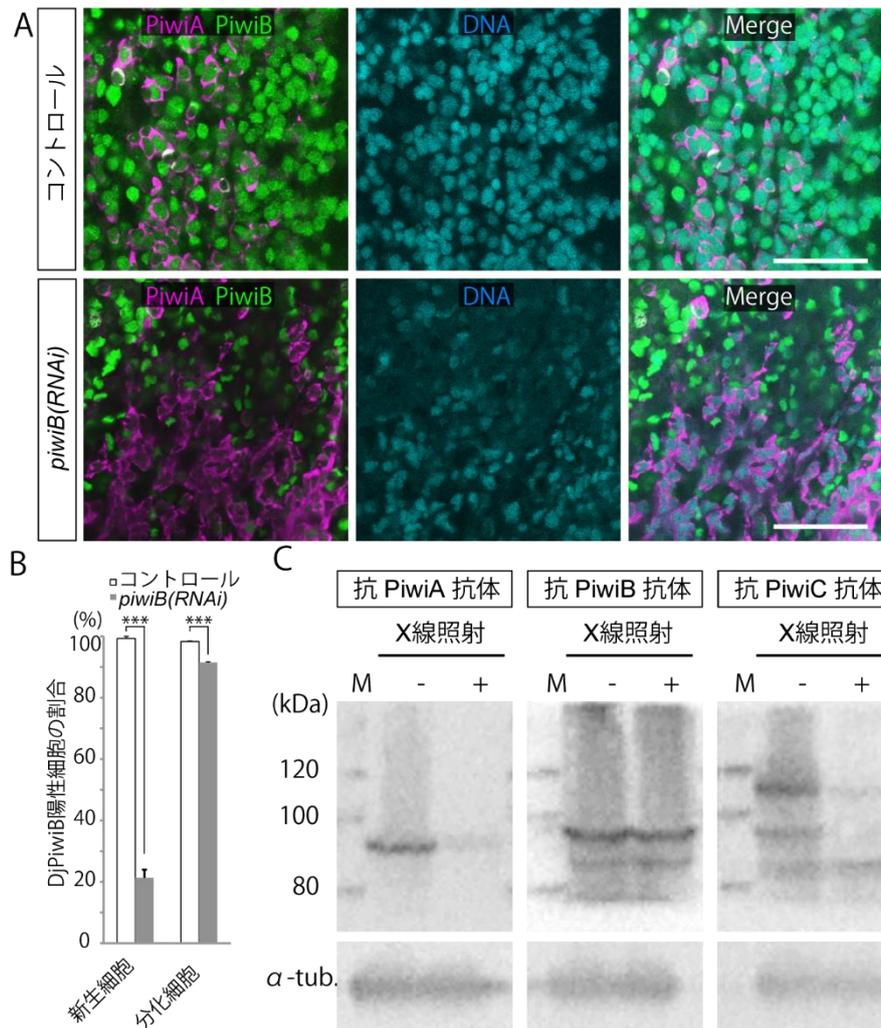


図 1-7 (A) 7 dpf コントロール個体と *DjpiwiB*機能阻害個体の抗 DjPiwiA 抗体（マゼンタ）と抗 DjPiwiB 抗体（緑）を用いたホールマウント免疫共染色。Hoechst 33342 染色（青）。スケールバー：50 μm。(B) 7 dpf コントロール個体と *DjpiwiB*機能阻害個体内の新生細胞及び分化細胞における DjPiwiB 陽性細胞の割合。*** : p < 0.005 (t 検定)。エラーバーは標準誤差を表している。(C) 抗 DjPiwiA 抗体、抗 DjPiwiB 抗体あるいは抗 DjPiwiC 抗体を用いた、正常個体及び X 線照射後 7 日目の X 線照射個体のウエスタンブロッティング。M

はサイズマーカー。X線照射個体では新生細胞が消失しているため、DjPiwiA、DjPiwiCの量が劇的に減少している。一方で、DjPiwiBのタンパク質量には大きな変化は見られなかった。

これらの結果は、分化細胞内のDjPiwiBタンパク質は、mRNAからの新規タンパク質産生非依存的に存在しうることを強く示唆していた。そのため、DjPiwiBは新生細胞で産生されたのち、新生細胞から体細胞へと細胞分化の過程で分解されず保持されていくのではないかと考えられた。この仮説は、*DjpiwiB*機能阻害個体の再生中の個体を用いたホールマウント免疫共染色によってさらに支持された。前述したように、*DjpiwiB*機能阻害個体を1 dpfで切断すると不完全ながら頭部再生が観察される(図1-4B)。再生した頭部領域にはDjPiwiB陰性新生細胞に由来する新規分化細胞が多く存在している(図1-8A)。再生した領域内の分化細胞では、DjPiwiBはほとんど存在しておらず(図1-8B)、分化細胞内のDjPiwiBタンパク質は新生細胞に由来することが示唆された。対照的に、非再生部位に存在する既存分化細胞はDjPiwiB陽性であった(図1-8B)。

以上の結果から、DjPiwiAとDjPiwiCは新生細胞特異的に存在する細胞質PIWIである一方で、DjPiwiBは新生細胞からすべての分化細胞へと保持されていく核PIWIであると結論づけた。

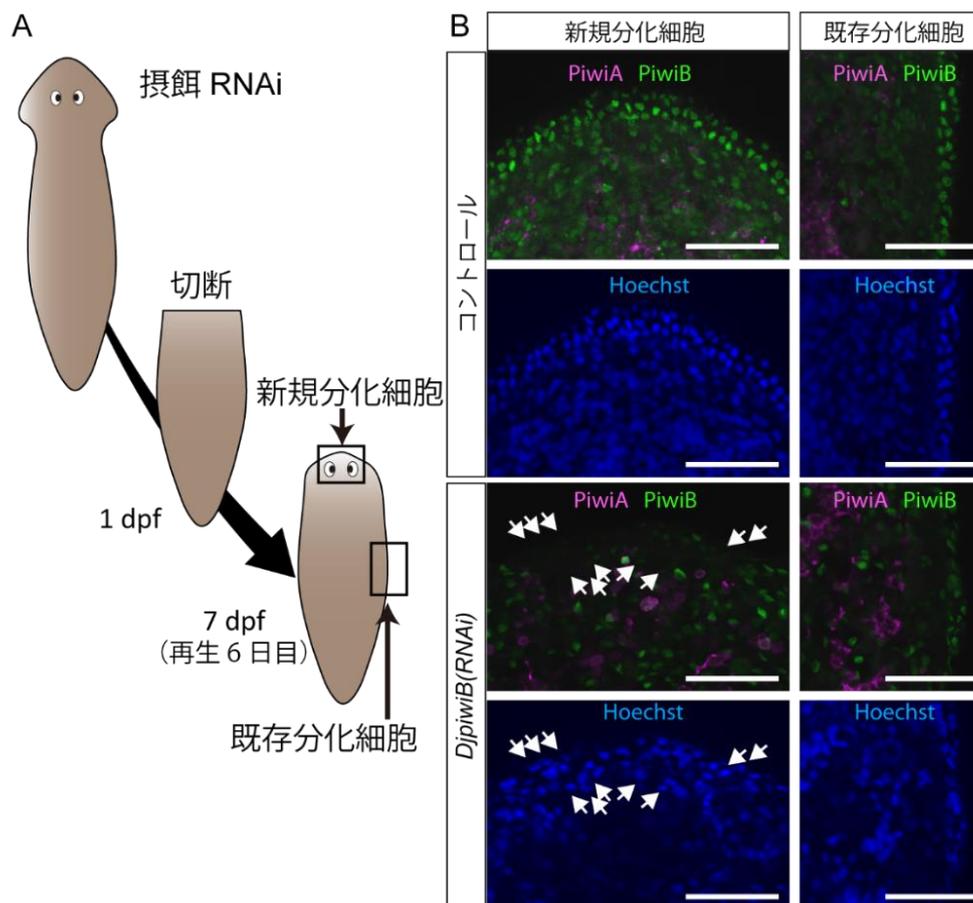


図 1-8 (A) 2 回目の摂餌 RNAi 後 1 日目にプラナリアを咽頭前部領域で切断し、
 胴部断片からの再生 6 日目の個体を観察した。再生部位には新規分化細胞が、
 非再生部位には既存分化細胞が存在すると考えられる。(B) 再生 6 日目のコン
 トロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の再生個体の抗 DjPiwiA 抗体(マゼンタ)
 と抗 DjPiwiB 抗体(緑)を用いたホールマウント免疫共染色。Hoechst 33342 染
 色(青)。矢印は DjPiwiB 陰性分化細胞を示している。スケールバー: 50 μm 。

考察

成体多能性幹細胞システムにおける PIWI の重要性

本章では、RNAi による機能阻害個体の再生実験を通して、新生細胞で発現する 3 種類の *piwi* 遺伝子の内、*DjpiwiB* と *DjpiwiC* が幹細胞システムの機能に重要であることを明らかにした。また、3 種類の *piwi* 遺伝子は 2 種類の細胞質 PIWI と 1 種類の核 PIWI をコードしていることも明らかにした。以上の知見は別種のプラナリアを用いた先行研究の結果と一致するものである(Nakagawa et al., 2011; Palakodeti et al., 2008; Reddien et al., 2005; Zeng et al., 2013)。プラナリアの異なる種で相同な関係にある PIWI の細胞内局在や、機能阻害実験から示唆される幹細胞システムにおける役割が、種を超えて保存されていることは、PIWI がプラナリア多能性幹細胞システムにおいて担う役割の重要性を示唆している。そのため、PIWI が成体多能性幹細胞システムにおいて具体的にどのような機能を担っているかを明らかにすることで、成体多能性幹細胞システムの制御についての理解が深まることが期待される。

DjPiwiB は新生細胞で産生され、分化細胞でも保持される

DjPiwiB がすべての細胞の核に存在する一方で、*DjpiwiB* は、脳を除くと、新生細胞でのみ発現している。分裂能を持たない分化細胞では、DjPiwiB タン

パク質が mRNA からの新規タンパク質産生なしに維持されていることから、DjPiwiB は、分裂中の細胞でのみ産生されすべての細胞へと保持されていくヒストンタンパク質のように、核内で非常に安定なタンパク質であると考えられる。一方、新生細胞はプラナリアで唯一分裂を恒常的に行っている細胞であり、摂餌後には 24 時間に一回以上の速度で分裂すると考えられている (Newmark and Sánchez Alvarado, 2000)。そのため、新生細胞では、mRNA からの新規産生なしには DjPiwiB は細胞分裂のたびに希釈され最終的には消失してしまうと考えられる。このため、*DjpiwiB* 機能阻害個体では新生細胞でのみ優位に DjPiwiB タンパク質の消失が観察されるのであろう (図 1-7A、B)。本章で見出した DjPiwiB が新生細胞から分化細胞へと分解されずに保持される現象は PIWI が mRNA の発現細胞を超えて機能する可能性を、多能性幹細胞システムにおいて初めて示唆するものである。ショウジョウバエでは、受精卵から初期胚へと PIWI が分解されずに保持されることが初期胚細胞分裂に重要であるとの報告が Mani らによってなされており (Mani et al., 2014)、PIWI の保持は、DjPiwiB 特異的な現象ではないと考えられる。しかし、ショウジョウバエにおいても保持された PIWI が具体的にどのような機能を担っているのかについては明らかになっておらず、保持された先の細胞で DjPiwiB がどのような標的遺伝子の制御を行っているのかは非常に興味深い。また、脳に存在する核 PIWI が

転移因子の抑制やシナプスの可塑性に関与することがそれぞれショウジョウバエやアメフラシで報告されており (Perrat et al., 2013; Rajasethupathy et al., 2012)、脳における DjPiwiB の機能解明も今後の課題である。

プラナリア多能性幹細胞システムでは、PIWI による制御機構が「共同型」から「単独型」へと変化する

D. japonica の新生細胞では 3 種類の *piwi* が発現し、2 種類の細胞質 PIWI と 1 種類の核 PIWI が存在している。このことから、新生細胞では PIWI による「共同型」遺伝子発現制御がなされていると予想される (図 1-8A)。一方、分化細胞では脳を除き、*piwi* 遺伝子の転写はなくなり、新生細胞から分解されずに保持されている DjPiwiB のみが存在している。つまり、プラナリアの分化細胞では PIWI による「単独型」遺伝子発現制御がなされていると考えられる (図 1-8A)。ショウジョウバエの卵巣では、生殖細胞では、転写を伴って 3 種類の PIWI (細胞質 PIWI : DmAub、DmAgo3 と核 PIWI : DmPiwi) が存在しており (Brennecke et al., 2007)、「共同型」遺伝子発現制御が行われている (図 1-8B)。一方で、生殖細胞を取り囲む体細胞である卵胞細胞では転写を伴って、核 PIWI である DmPiwi のみが存在しており、「単独型」遺伝子発現制御が PIWI によって行われている (Saito et al., 2009) (図 1-8B)。すなわち、プラナリアにおいて

は細胞分化の過程で PIWI による遺伝子発現制御が「共同型」から「単独型」に転換されるのに対して、ショウジョウバエの卵巢では、異なる細胞起源（生殖細胞と体細胞）を持つ細胞で PIWI による遺伝子発現制御が「共同型」と「単独型」が使い分けられているといえるのではないだろうか（図 1-9）。PIWI タンパク質の組み合わせという観点から見えてきたこの類似した遺伝子発現の制御機構が、次世代を残すことにおいて重要な役割を担う「多能性幹細胞システム」と「生殖巣の発生」で使われていることは非常に興味深い。それぞれのシステムにおける PIWI による制御の対象となる遺伝子の同定と比較を通じて、多能性幹細胞システムにおける PIWI と生殖巣における PIWI が担う役割の共通項と差異が明らかになっていくことが期待される。

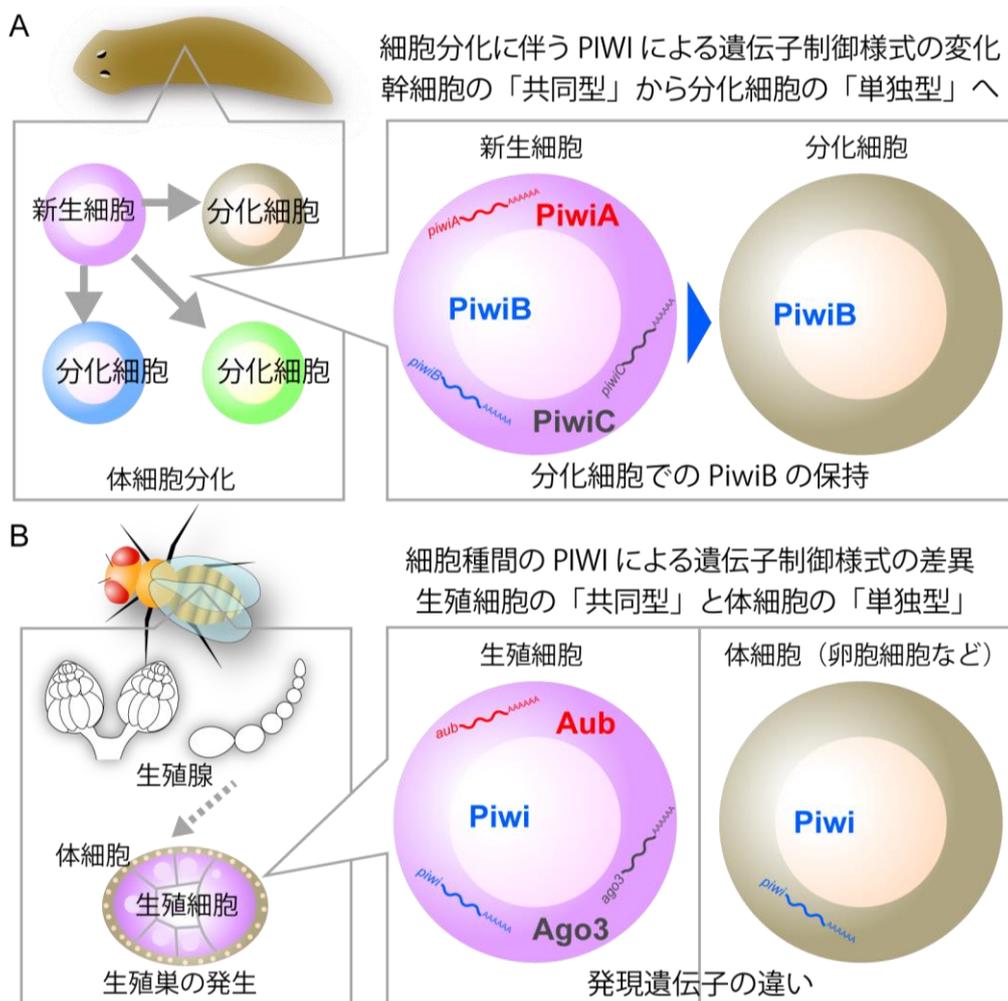


図 1-9 プラナリア多能性幹細胞システムとショウジョウバエの生殖巣でみられる PIWI による遺伝子発現制御の類似点 (A) プラナリアでは、新生細胞では 3 つの PIWI による「共同型」の遺伝子発現制御が、分化細胞では、DjPiwiB が分化細胞で分解されずに保持されることと *piwi* 遺伝子の発現がなくなること、分化細胞では「単独型」の PIWI による遺伝子発現制御が行われていると考えられる。(B) ショウジョウバエの卵巣では、生殖細胞で「共同型」の遺伝子発現制御が、卵細胞では「単独型」の遺伝子発現制御が行われている。

第二章 DJPwiB-piRNA 複合体による転移因子の抑制

序論

多能性幹細胞からの分化過程では、エピジェネティックな修飾の劇的な変化によって発現遺伝子群が大幅に変化することが知られている(Xie et al., 2013)。この過程では、細胞分化に必要な特定の遺伝子座でクロマチン構造が緩むと考えられる。そして、このユークロマチン化によって近傍に位置する転移因子の不意の活性化が起こると、ゲノムの統合性を脅かされる可能性が高い。それゆえに、細胞分化の過程では転移因子は常に抑制されなければならない。多能性幹細胞の分化時には、ヒストン修飾が転移因子の抑制に寄与していることが知られているが(Leung and Lorincz, 2012)、転移因子がどのようにして配列特異的に認識されて抑制をされているのかはいまだ明らかになっていない。

プラナリアの成体多能性幹細胞である新生細胞では、多くの生物の生殖細胞において転移因子を抑制することで次世代に安定してゲノムを伝えるのに重要な役割を担う *piwi* が発現している(Hayashi et al., 2010; Juliano et al., 2011; Nakagawa et al., 2011)。これらの遺伝子がコードしている PIWI は PIWI 結合 RNA (piRNA) をガイドとして利用することで、生殖細胞において配列特異的に転移因子の抑制を行うことが知られている(Iwasaki et al., 2015; Malone et al., 2009)。プラナリアにおいても、核酸の長さに基づいた分画によって得られ

た小分子 RNA の配列解析から、PIWI が転移因子を標的遺伝子としている可能性が示唆されており、新生細胞においても PIWI は転移因子の抑制に関与していると考えられている(Friedländer et al., 2009; Palakodeti et al., 2008)。しかし、プラナリアの新生細胞システムにおいて PIWI によって抑制されている転移因子はいまだ同定されていない。

第二章では *Dugesia japonica* の新生細胞システムにおいて PIWI が転移因子の抑制に実際に寄与しているのかどうかを明らかにすることを目指した。標的転移因子を同定するために、まず抗 DjPiwiB 抗体を用いた免疫沈降法によって得られた DjPiwiB 結合 piRNA の配列決定を行った。そして、piRNA との配列相補性から DjPiwiB 標的転移因子の同定に成功した。興味深いことに、DjPiwiB は、新生細胞自体における転移因子の抑制ではなく、保持された先の分化中の細胞における転移因子の抑制に寄与していた。

結果

DjPwiB 結合 piRNA の網羅的解析

PIWI の標的遺伝子は piRNA の配列依存的に決定されている。DjPwiB 結合 piRNA (以下、piRNA と表記する) の配列を決定するために、まず、抗 DjPwiB 抗体を用いた免疫沈降法によって、プラナリア正常個体から DjPwiB-piRNA 複合体を得た (図 2-1A)。免疫沈降物に含まれる RNA の多くはおよそ 32 塩基程の長さであった (図 2-1B)。ストランド特異的な⁶次世代シーケンスによって、免疫沈降によって得られた piRNA に由来する 4,177,817 リードの配列情報を得ることに成功した。 *D. japonica* ゲノムの断片配列 2,629,514,899 塩基 (予測されるゲノム全長の 2.9 倍に相当、An et al., unpublished) と *D. japonica* EST データベース(Nishimura et al., 2012, 2015)に対して、得られた piRNA 配列のマッピングを行った結果、74%に相当する 3,087,450 リードの piRNA がゲノムあるいは EST に完全に一致した。以後の解析にはこれらマッピングされた配列のみを用いた。得られた piRNA は 1,053,855 種類の配列を含み、ショウジョウバエやマウスの piRNA と同様に (Brennecke et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Li et al., 2003)、非常に多様であった (図 2-1C)。また、

⁶ 通常次世代シーケンスで得られる配列情報は方向性を持たないのに対して、ストランド特異的なシーケンスは配列の方向性の情報も含んでいる。

80%程度の piRNA は 5'末端がウラシル (1U) であり、典型的な一次 piRNA の特徴を持っていた (図 2-1D)。一方で、10A や 5'末端から 10 塩基の相補的な重なりといった ping-pong サイン(Iwasaki et al., 2015)は見出せなかった。

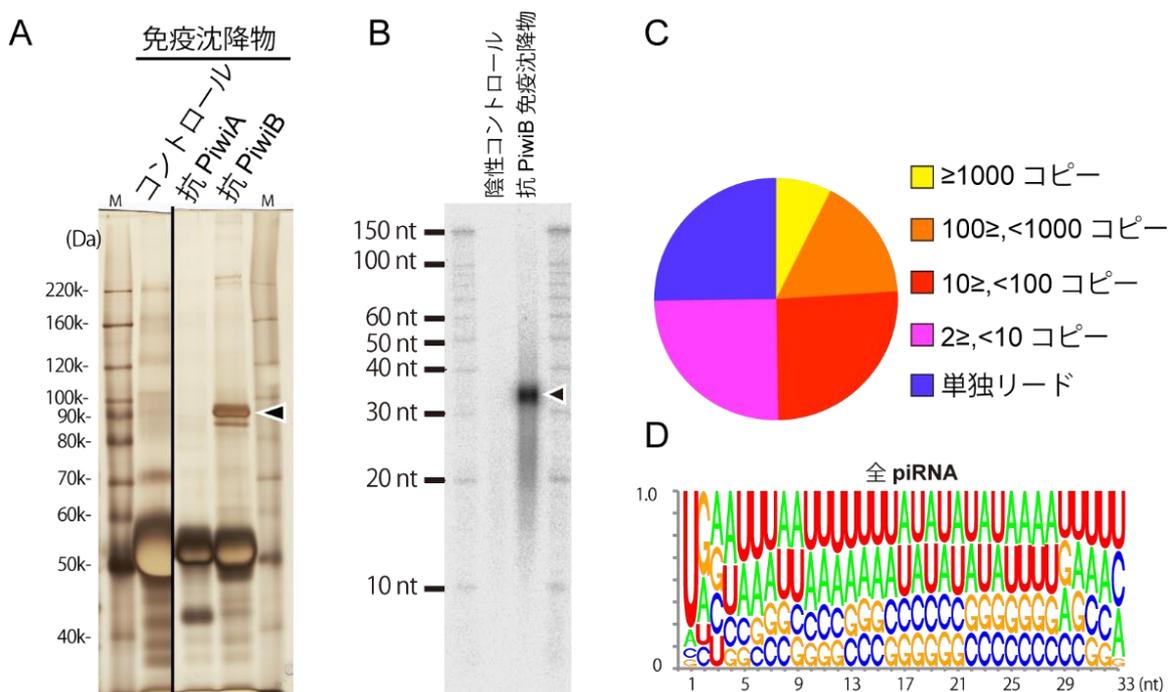


図 2-1 (A) SDS-PAGE と銀染色による、免疫沈降物の確認。免疫沈降はコントロール抗体、抗 DjPiwiA 抗体、抗 DjPiwiB 抗体を用いて行った。抗 DjPiwiB 抗体を用いた免疫沈降によって、DjPiwiB が優位に得られている。矢尻は DjPiwiB と予測される分子量のバンドを示している。(B) 免疫沈降物から抽出した RNA の電気泳動図。陰性コントロールはコントロール抗体を用いた免疫沈降によって得られた RNA を意味している。抗 DjPiwiB 抗体を用いた免疫沈降によって、小分子 RNA が優位に得られていた。(C) ストランド特異的な次世代シーケンスの結果のコピー数の内訳。半数の配列は 10 リード以上完全一致する配列が得ら

れていた。(D) 得られた DjPiwiB 結合 piRNA の seqLogo 解析の結果。およそ 80% のリードで 5' 末端の塩基がウラシルであった。

DjPiwiB 結合 piRNA のうち、206,992 リードは EST データベースに一致し (Nishimura et al., 2012)、そのうち 34%の piRNA は転移因子と配列の類似性を示す EST に一致していた (図 2-2A)。転移因子に一致した piRNA の内、54%、19%、15%がそれぞれ *polinton*、*penelope*、*gypsy* に分類される転移因子に特異的に一致していた (図 2-2A)。転移因子にセンスあるいはアンチセンス方向で一致する piRNA は共に 1U の傾向を示していたが、転移因子に対しては 60%の piRNA がアンチセンス方向で一致していた (図 2-2B、C)。転移因子以外を含む EST に一致する piRNA の場合は、アンチセンス方向に一致する piRNA が 48%であることを考慮すると (図 2-2B)、DjPiwiB-piRNA 複合体はアンチセンス piRNA を用いて転移因子を制御している可能性が示唆された。次に、アンチセンス piRNA を介した DjPiwiB による転移因子の制御が実際に行われているのかを検証するために、piRNA の配列と相補的な転移因子に注目して、*DjpiwiB* 機能阻害個体におけるそれら転移因子の発現量を、逆転写定量 PCR (RT-qPCR) を用いて調べた。その結果、71 リードのアンチセンス piRNA が一致する *gypsy*-

P1 (*Dj_aH208_K05*⁷) の発現量が *DjpiwiB* 機能阻害個体において増加することを見出した (図 2-2D)。*DjpiwiB* 機能阻害個体では、1 dpf において *gypsy-P1* の発現量はコントロール個体の 4 倍になっていた (図 2-2D)。その後 *gypsy-P1* の発現量は増加し続け、5 dpf では 8 倍にまで増加していた (図 2-2D)。

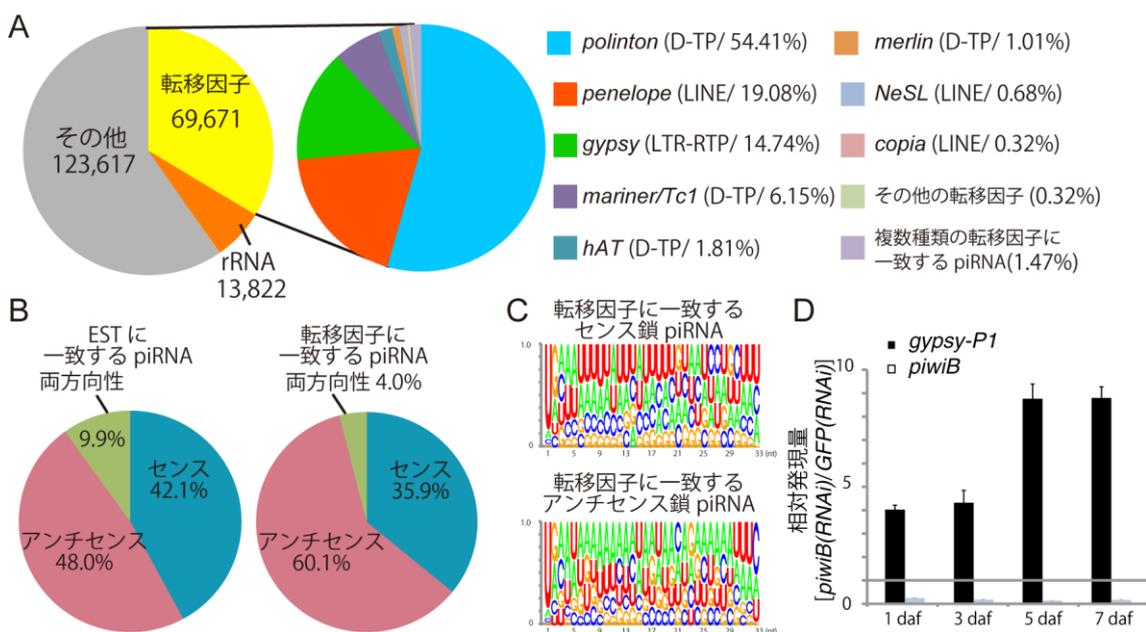


図 2-2 (A) piRNA が一致する転移因子の内訳。D-TP : DNA トランスポゾン、LINE : 長鎖散在反復配列 LTR-RTP : LTR 型レトロトランスポゾン。(B) 全 EST あるいは転移因子に一致する piRNA の方向性の内訳。(C) 転移因子に一致するアンチセンスあるいはセンス piRNA の seqLogo 解析の結果。どちらの場合でも、およそ 90% のリードで 5' 末端の塩基がウラシルであった。(D) 1-7 dpf のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体における *gypsy-P1* の発現量。エラーバーは標準

⁷ *D. japonica* の EST ライブラリーのクローン名。

誤差を表している。

DjPiwiB の喪失は、分化中の細胞での転移因子の抑制の解除を引き起こす

*DjpiwiB*機能阻害によって、どのような組織、細胞で *gypsy-P1* の発現が変化しているのか調べるために、*gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。2日の合間をあけて、2度の摂餌 RNAi を行い、2回目の摂餌 RNAi 後3日目（3 dpf）に機能阻害個体を観察したところ、コントロール個体では *gypsy-P1* の発現は検出されず、正常個体では *gypsy-P1* の発現は抑制されていることが示唆された。しかし、*DjpiwiB*機能阻害個体では、頭部領域、特に眼よりも前方側に集中して *gypsy-P1* 発現細胞が観察された（図 2-3A）。この領域は、通常新生細胞が存在しない領域であり（Shibata et al., 2010）、実際、*gypsy-P1* 発現細胞は DjPiwiA 陰性細胞であった（図 2-3B）。このことから、*gypsy-P1* の抑制解除は、新生細胞ではなく、分化細胞で起こっていることが示唆された。

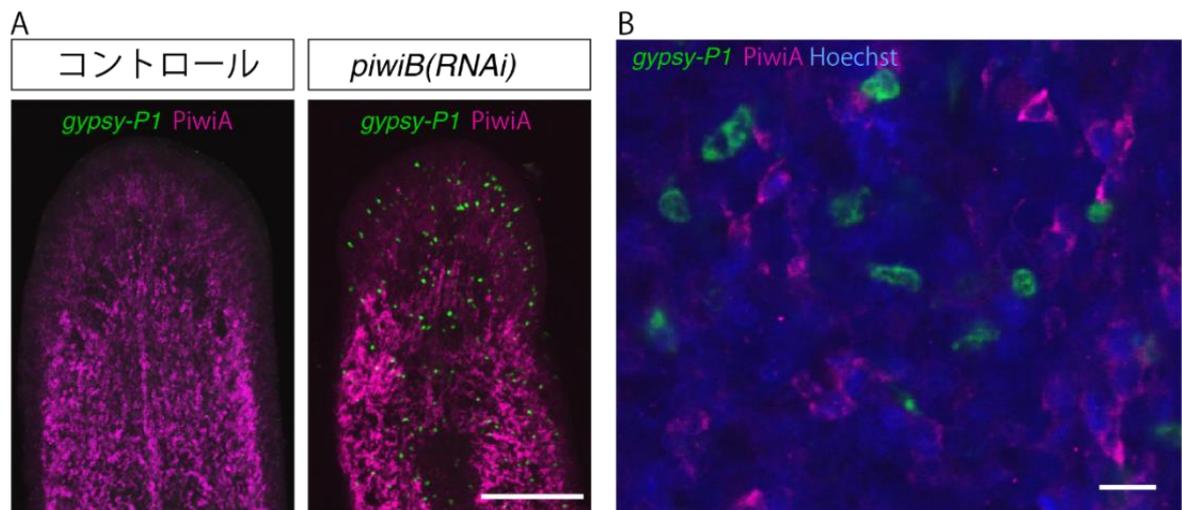


図 2-3 (A) 2 回目の摂餌 RNAi から 3 日目 (3 dpf) のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 DjPiwiA 抗体 (マゼンタ) を用いたホールマウント免疫染色。(B) A の *DjpiwiB* 機能阻害個体の強拡大図。Hoechst 33342 染色 (青)。*gypsy-P1* は基本的には DjPiwiA 陰性細胞で発現細胞していた。スケールバー: 500 μm (A)、10 μm (B)。

DjpiwiB 機能阻害個体において観察される *gypsy-P1* 発現細胞は RNAi 処理の前から存在する既存分化細胞なのか、あるいは RNAi 後に新規に新生細胞から分化した新規分化細胞であるのかを検証するために、X 線照射によって新生細胞を特異的に除去した *DjpiwiB* 機能阻害個体における *gypsy-P1* の発現を調べた (図 2-4A)。X 線照射 *DjpiwiB* 機能阻害個体では *gypsy-P1* 発現細胞は、コントロール個体同様に、観察されなかった (図 2-4A)。また、新生細胞からの細胞

分化を阻害する MEK 阻害剤である U0126(Tasaki et al., 2011a)で処理した *DjpiwiB* 機能阻害個体での *gypsy-P1* の発現を調べると、DMSO 処理個体と比べて劇的に *gypsy-P1* 発現細胞の数は減少していた (図 2-4B)。さらに、*DjpiwiB* 機能阻害個体における *gypsy-P1* の抑制解除と細胞分化の関係性を検証するために、*DjpiwiB* 機能阻害個体の再生個体 (再生中の個体) における *gypsy-P1* の発現を調べた (図 2-4C)。これは、再生個体では再生に必要な分化細胞を供給するために、新生細胞の分裂と分化が促進されるためである (Wenemoser et al., 2012)。3 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体の非再生個体では *gypsy-P1* の発現は胴部、特に咽頭後部では、ほとんど検出されないのに対して、胴部断片の再生個体では、特に尾部を含む切断面付近で、多くの *gypsy-P1* 発現細胞が検出された (図 2-4C)。以上の結果から、*DjpiwiB* 機能阻害個体における *gypsy-P1* 発現細胞は RNAi 後に新規に新生細胞から分化した細胞であると結論づけた。この結論と一致して、*DjpiwiB* 機能阻害個体における *gypsy-P1* 発現細胞は DjPiwiB 陰性細胞であり、DjPiwiB 陰性新生細胞から分化した細胞であると考えられた (図 2-5)。加えて、*DjpiwiB* 機能阻害個体においてごく稀に *gypsy-P1* を発現している DjPiwiA 陽性細胞が観察されたことから (図 2-5 矢尻)、*gypsy-P1* 発現細胞は分化中の細胞であることが示唆された。

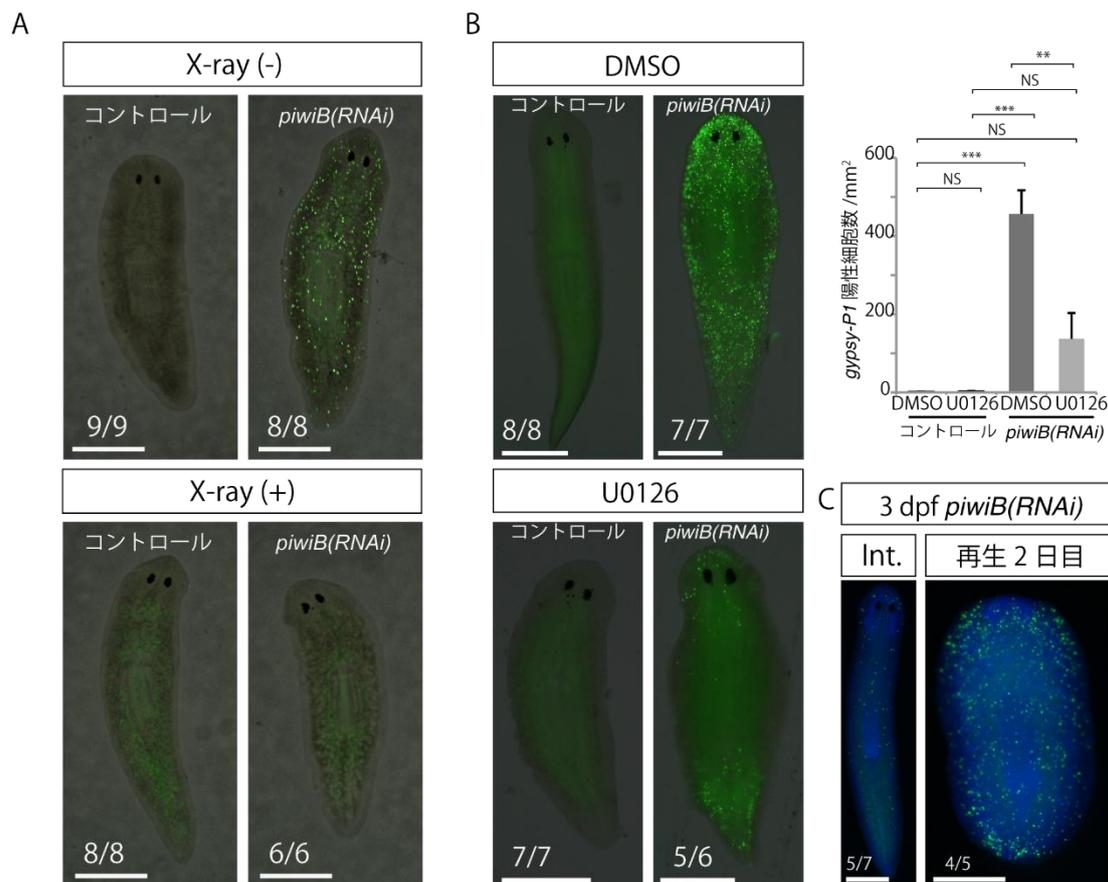


図 2-4 2 日の合間をあけて、2 度の摂餌 RNAi を行った。(A) X 線非照射あるいは X 線照射を行った、2 回目の摂餌 RNAi から 5 日目 (5 dpf) のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション。X 線照射を行った翌日に 1 度目の摂餌 RNAi を行った。数字は個体数。(B) DMSO 処理 (コントロール) あるいは U0126 処理を行った、5 dpf のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション。薬剤処理は 1 度目の摂餌 RNAi 直後から継続して行った。数字は個体数。棒グラフは各実験標本における *gypsy-P1* 発現細胞数を示している。** : $p < 0.01$ (t 検定)。*** : $p < 0.005$ (t 検定)。NS は統計的有意差がないことを示している。エラーバーは標準誤差を表している。(C) 3 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体の再生 2 日目の再生個体あるいは非再生個体の

gypsy-P1 のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑)。Hoechst 33342 染色 (青)。Int : 非再生個体。数字は個体数。スケールバー : 500 μ m。

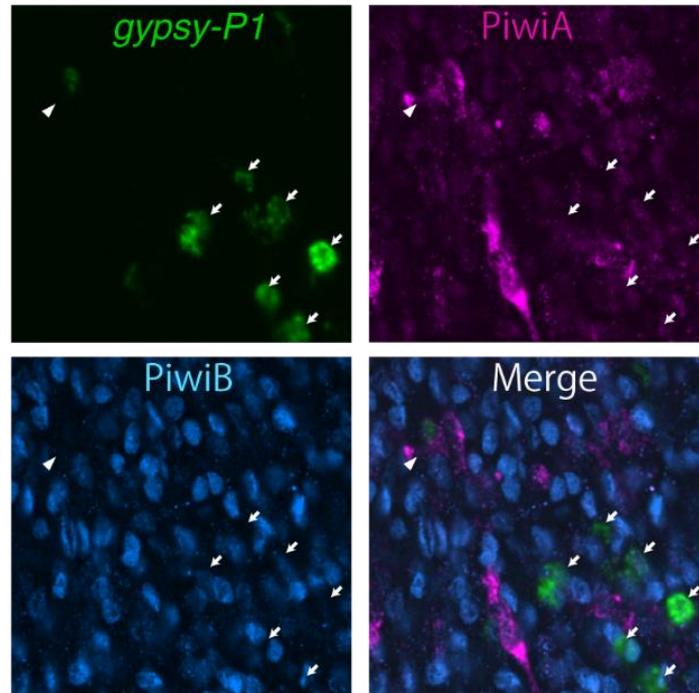


図 2-5 *gypsy-P1* 発現細胞は DjPiwiB 陰性であった。2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目 (7 dpf) の *DjpiwiB* 機能阻害個体の *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 DjPiwiA 抗体 (マゼンタ) あるいは抗 DjPiwiB 抗体 (青) 用いたホールマウント免疫染色。矢印は *gypsy-P1* を発現する DjPiwiA 陰性細胞を、矢尻は *gypsy-P1* を発現する DjPiwiA 陽性細胞を示している。スケールバー : 50 μ m。

また、7 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体の RNA-seq を用いた発現変動遺伝子解析によって、piRNA が一致し、かつ 7 dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体で発現量が増加する、*gypsy-P1* とは異なる、10 種類の転移因子を同定した (発現変動遺伝子

解析の詳細は第三章で紹介する。本解析では、*DjpiwiB*機能阻害において発現が上昇する *gypsy*、*polintone*、*NeSL* 以外の *DjPiwiB* 標的転移因子(*penelope* など)は同定されなかった。)。これらの遺伝子は、*gypsy-P1* 同様に、X 線照射や U0126 処理によって、*DjpiwiB* 機能阻害による発現量の上昇が抑制された (図 2-6)。以上の結果に基づいて、*DjpiwiB* 機能阻害個体における *gypsy-P1* を含めた転移因子の発現抑制の解除は、新生細胞においてではなく、新生細胞から分化した分化中の細胞で起こっていると結論づけた。

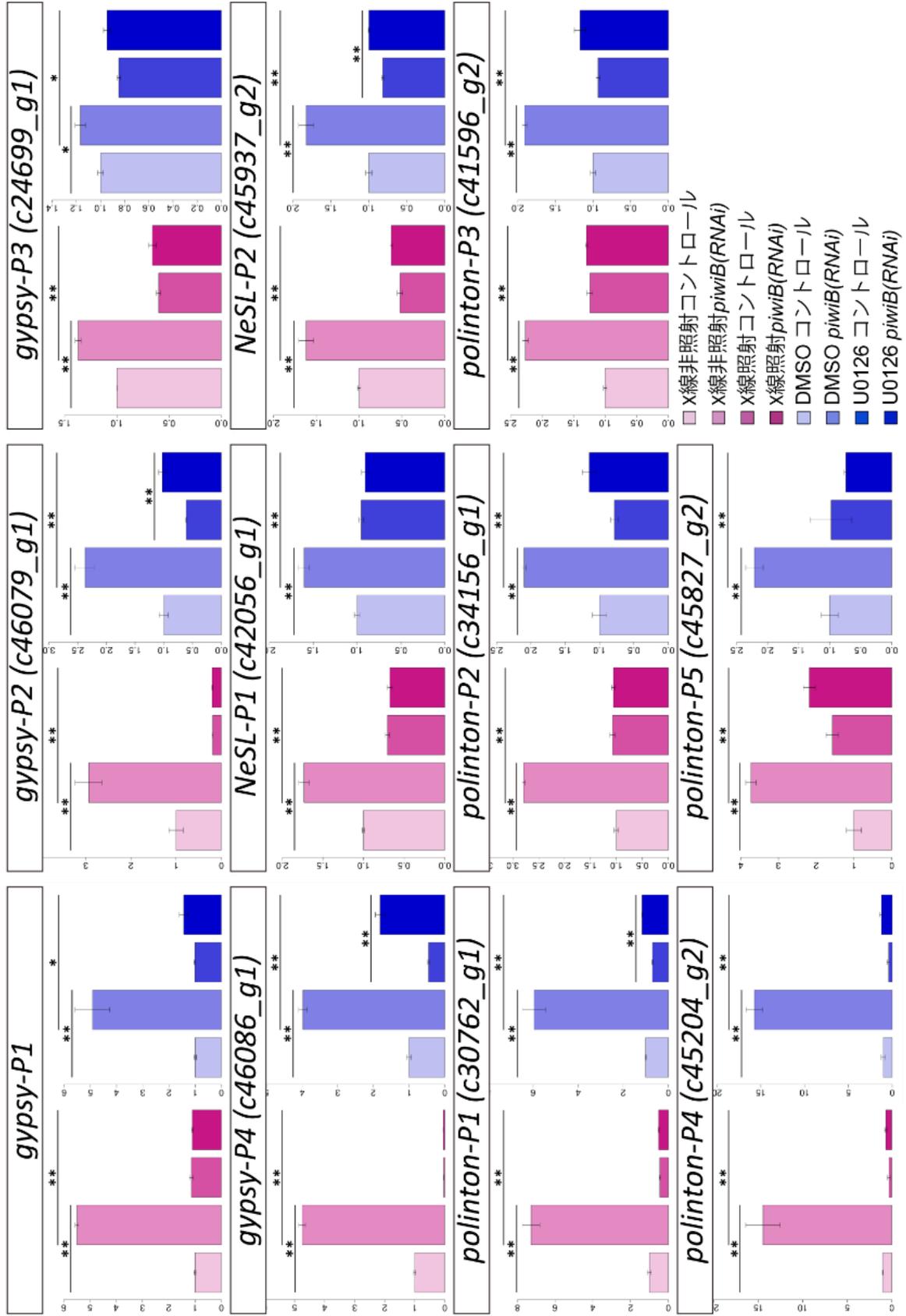


図 2-6 RNA-seq で同定された DjPiwiB 標的転移因子の *DjpiwiB* 機能阻害個体における発現への X 線照射や U0126 処理の影響を調べた。10 種類すべての転移因子で X 線照射あるいは U0126 処理によって、*DjpiwiB* 機能阻害による発現量の上昇が抑制された。機能阻害個体はすべて 2 回目の摂餌 RNAi 後 5 日目 (5 dpf) を用いている。X 線照射を行った翌日に 1 度目の摂餌 RNAi を行った。また、薬剤処理は 1 度目の摂餌 RNAi 直後から継続して行った。** : $p < 0.01$ (t 検定)。
* : $p < 0.05$ (t 検定)。エラーバーは標準誤差を表している。

*DjpiwiB*機能阻害は細胞分化の異常を引き起こす

次に、*DjpiwiB* 機能阻害個体において分化中の細胞で起こる転移因子の抑制の解除が細胞分化に与える影響を調べた。*gypsy-P1* 発現細胞は Hoechst 染色陰性細胞であったことから、*gypsy-P1* 発現細胞では、ゲノム DNA に何らかの異常が起こっていることが示唆された (図 2-7)。

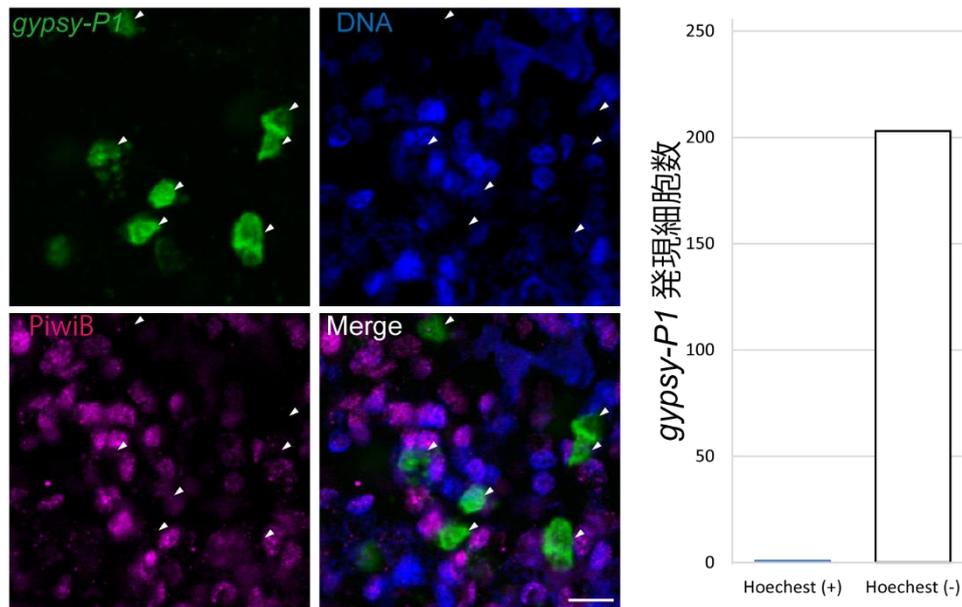


図 2-7 2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目 (7 dpf) の *DjpiwiB* 機能阻害個体の *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 *DjPiwiB* 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (マゼンタ)。Hoechst 33342 染色 (青)。矢尻は *gypsy-P1* 発現細胞を示している。スケールバー : 10 μ m。グラフは *gypsy-P1* 発現細胞の Hoechst 染色陽陰性に基づいた内訳。

また、2 回目の摂餌 RNAi 後 1 日目 (1 dpf) で切断した、再生 6 日目の *DjpiwiB*

機能阻害個体では、*S. mediterranea* の早期表皮前駆細胞マーカー遺伝子の相同遺伝子である *Dj_aH_000_05955HH*(Eisenhoffer et al., 2008; Josien C. van Wolfswinkel, Daniel E. Wagner and Reddien, 2014; Shibata et al., 2012)を発現している細胞数が再生領域において、コントロール個体と比べて、減少していた (図 2-8)。このことから、*DjpiwiB* 機能阻害個体では、細胞分化の初期で異常が起きていると考えられた。

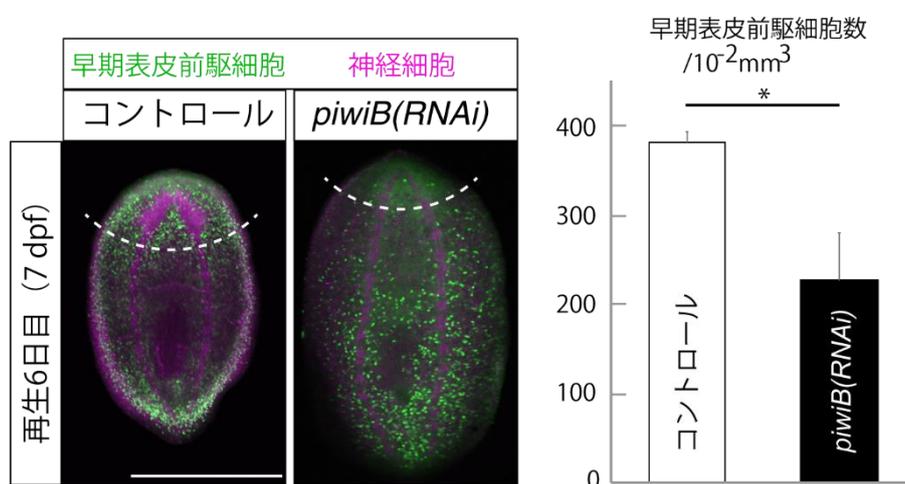


図 2-8 2 回目の摂餌 RNAi から 1 日目 (1 dpf) でコントロール個体あるいは *DjpiwiB* 機能阻害個体を咽頭前部及び後部で切断した再生 6 日目の再生個体の *Dj_aH_000_05955HH*(早期表皮前駆細胞マーカー)のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 Syt 抗体 (神経細胞マーカー) を用いたホールマウント免疫染色 (マゼンタ)。スケールバー : 500 μm 。点線は脳を含む再生部位の境界を、グラフは再生部位に含まれる早期表皮前駆細胞数を表している。* : $p < 0.05$ (t 検定)。エラーバーは標準誤差を表している。

さらに、転移因子の抑制の解除が細胞分化に与える影響を調べるために、摂餌 RNAi 後翌日に切断した再生 2 日目の再生個体の再生芽基部付近の細胞を、電子顕微鏡を用いて観察した。再生 2 日目の *DjpiwiB* 機能阻害個体の、再生芽基部では *gypsy-P1* 発現細胞が比較的多く存在している (図 2-4C)。Pellettieri らによて、プラナリアの再生初期では細胞死が起こることが報告されており (Pellettieri et al., 2010)、この報告と一致して、コントロール再生個体では変性細胞と思われる異常な核と細胞質を持つ細胞が観察された (図 2-9A、B)。同様の細胞は *DjpiwiB* 機能阻害個体の再生個体でも観察された (図 2-9C-F)。加えて、*DjpiwiB* 機能阻害個体の再生個体でのみ、核内にウィルス様粒子が存在する細胞が観察され (図 2-9E、G)、*gypsy-P1* などの転移因子が活性化している細胞ではおそらく細胞変性が起こっていることが示唆された。

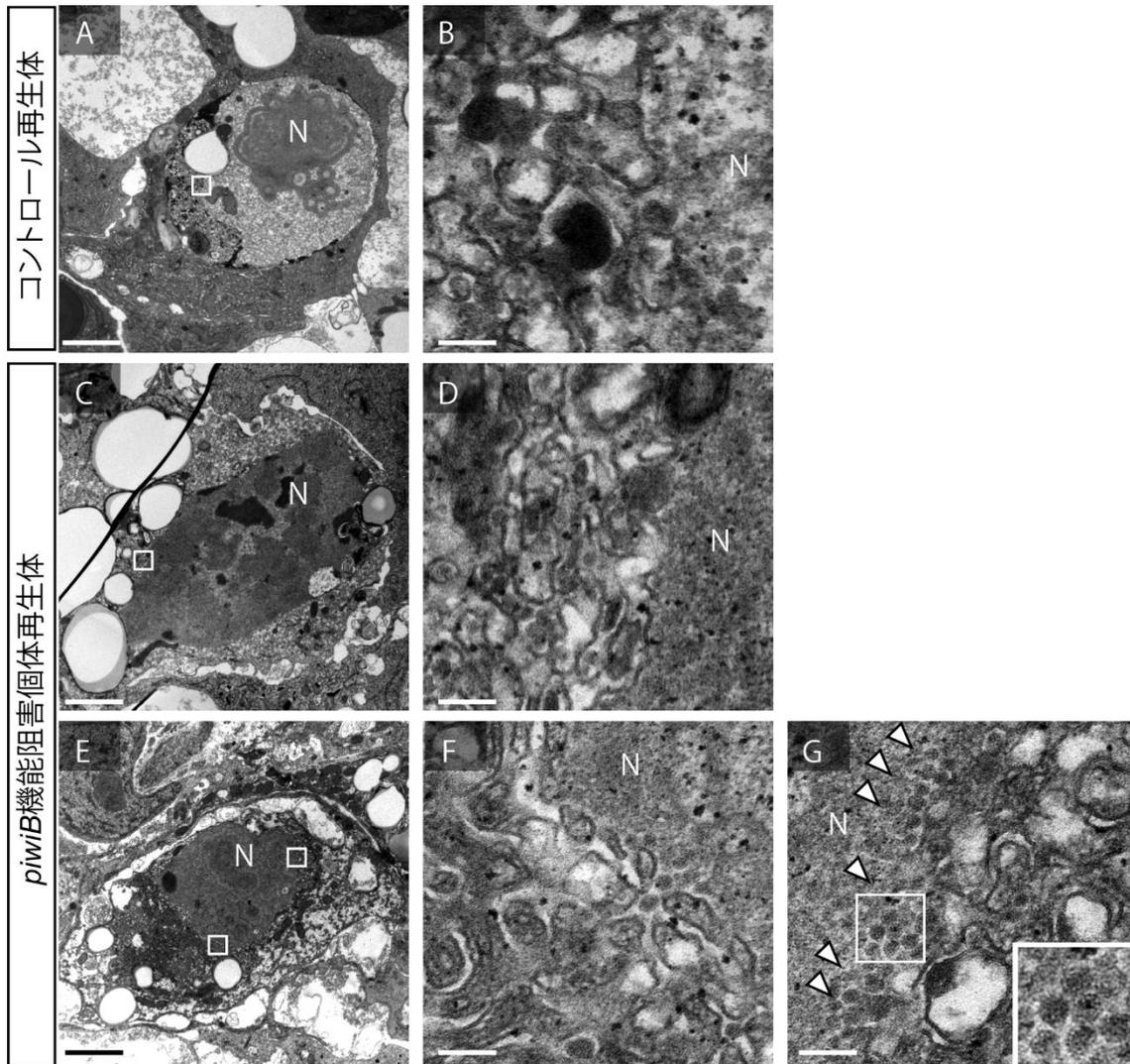


図 2-9 コントロール個体あるいは *DjpwiB* 機能阻害個体の再生個体における電子顕微鏡を用いた観察像。2 回目の摂餌 RNAi 後翌日に頭部と尾部切断し、再生 2 日目 (3 dpf) の個体を観察に用いている。(A) コントロール個体の再生芽基部で観察された異常な形態の核を持つ細胞。(B) A の細胞の細胞質の囲い部分の強拡大図。細胞質内に異常な構造が観察された。(C) *DjpwiB* 機能阻害個体の再生芽基部で観察された異常な形態の核を持つ細胞。(D) C の細胞の細胞質の囲い部分の強拡大図。細胞質内に B と同様な異常な構造が観察された。(E) *DjpwiB*

機能障害個体の再生芽基部で観察された異常な形態の核を持つ細胞。(F) E の細胞の細胞質の下側の囲い部分の強拡大図。細胞質内に B や D と同様な異常な構造が観察された。(G) E の細胞の細胞質の上側の囲い部分の強拡大図。矢尻は核に存在するウィルス様粒子を示している。N : 核 (A-G)。スケールバー : 2 μm (A、C、E)、0.1 μm (B、D、F、G)。

考察

生殖巣の発生と多能性幹細胞の細胞分化で保存された PIWI の役割

PIWI と piRNA による転移因子の抑制は、生殖細胞におけるゲノム統合性の維持を通じて次世代を残すための根源的な機構である。本章では、プラナリアの多能性幹細胞の細胞分化の過程における転移因子の抑制において、核 PIWI である DjPiwiB が重要な役割を担っていることを明らかにした。この結果は、生殖巣の発生と多能性幹細胞の細胞分化において PIWI の機能が保存されていることを示唆している。プラナリアの再生は無性生殖の一過程であり、有性生殖における生殖細胞のように、新生細胞は次世代を残すことに関して、重要な役割を担っている。多能性幹細胞での *piwi* の発現が、プラナリアの新生細胞に限ったことではなく、無性生殖を行う他の無脊椎動物の成体多能性幹細胞においても報告されていることから次世代を担う細胞での PIWI の重要性は示唆されている (Juliano et al., 2011)。今のところ確たる証拠はないが、次世代を残す過程において転移因子を抑制することは保存された PIWI の機能なのではないだろうか？少なくとも別種のプラナリアである *Dugesia ryukyuensis* では、新生細胞だけでなく、生殖細胞においても 3 種類の *piwi* が発現している (Nakagawa et al., 2011)。この事実は、PIWI が次世代を残す過程において重要な役割を担っていることを示唆しているように思われる。

なぜ、DjPiwiBのみが分化細胞へと保持されるのか？

*DjpiwiB*機能阻害個体において、新生細胞は正常に分裂し、また転移因子（少なくとも *gypsy-P1*）は抑制されていた（図 2-3B）。この結果は、新生細胞には DjPiwiB 以外の転移因子抑制機構が存在していることを示唆している。一つの可能性としては、DjPiwiA と DjPiwiC が転移因子を抑制していると考えられる。加えて、PIWI 以外の機構、例えば AGO ファミリータンパク質などによって転移因子の抑制が新生細胞では行われている可能性も考えられる。一方で、DjPiwiB タンパク質の喪失は *gypsy-P1* の活性化を分化中の細胞で引き起こす（図 2-4）。*gypsy-P1* 発現細胞は死につつある細胞と思われることから（図 2-7、9）、*DjpiwiB* 機能阻害個体では転移因子の活性化によって再生に必要な分化細胞の供給が起こらなくなり、結果として再生不全が引き起こされているのではないだろうか（図 2-10）。実際、*DjpiwiB*機能阻害個体では、早期前駆細胞の数が減少していた（図 2-8）。よって、分化中の細胞や分化細胞における DjPiwiB による転移因子の抑制は、再生時だけでなく組織恒常性の維持においても重要であると考えられるが、*DjpiwiB* の転写はそれらの細胞では起こっていない。DjPiwiB が分解されずに保持されるのは、分化中の細胞や分化細胞での転移因子抑制における DjPiwiB の必要性を満たすためであると考えられる。他の生物

でも、*piwi* の発現は体細胞では基本的に起こっていないことを踏まえると、プラナリアの体細胞で *piwi* の発現が見られないことは不思議ではない。そこで、プラナリアは細胞分化の過程で転移因子を抑制するために、DjPiwiB を分化細胞でも保持させるという機構を獲得したのではないだろうか。その一方で、DjPiwiA や DjPiwiC は完全に分化した細胞へは保持されない。DjPiwiB だけが保持される理由として考えられるのは、核 PIWI である DjPiwiB がおそらく転写レベルでの抑制が行えることであろう。1 種類の PIWI による転写抑制は、細胞質での ping-pong 経路を介した 2 種類の PIWI による転写後制御よりも、シンプルでありまた効果的に思われる。よって、分解されずに保持される DjPiwiB による転移因子の抑制は必要最低限でありかつ十分であると考えられる。

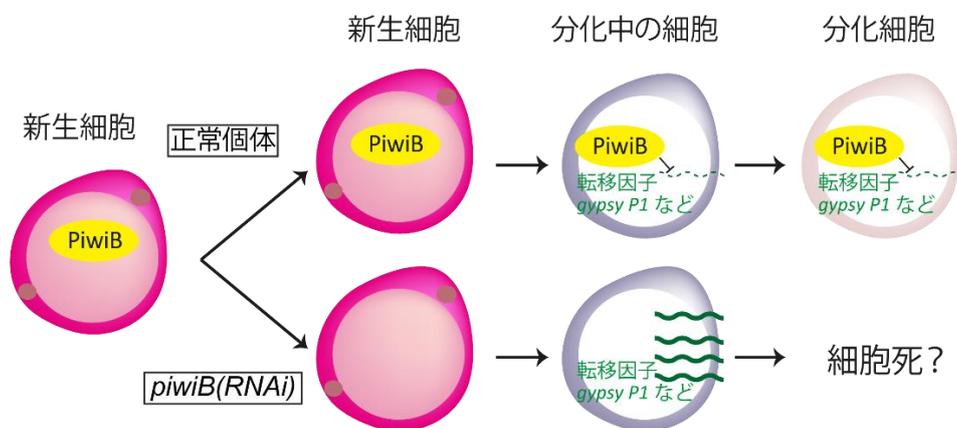


図 2-10 多能性幹細胞システムでの DjPiwiB のよる転移因子抑制のモデル。

第三章 DJPwiB-piRNA 複合体による非転移因子性タンパク質

コード遺伝子の制御

序論

幹細胞からの分化過程には、段階的な遺伝子発現の変化が求められる。胚性多能性幹細胞 (ES 細胞) (Martin, 1981)や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (Takahashi and Yamanaka, 2006)などの多能性幹細胞においては、多能性の維持に必要な遺伝子群はその発現が維持されなくてはならない(Martello and Smith, 2014)。一方で、分化の過程では細胞系譜に適した特定の遺伝子の発現が劇的かつ正確に変化する必要がある(Gan et al., 2014; Hayashi et al., 2012)。自己複製時や分化途上あるいは最終分化時などの細胞の状態に応じて、それら遺伝子群の発現が適切に制御されるためには、ヒストン修飾や DNA メチル化などの広範囲にわたるエピジェネティックな制御が多くの動物で重要な役割を担っていることが知られている(Boland et al., 2014)。しかし、どのような機構によって成体多能性幹細胞の分化時にゲノム中の特定の遺伝子が配列特異的に制御されているのかは完全には理解されていない。

最近の研究によって、小分子非コード RNA や長鎖非コード RNA とその共役タンパク質が配列特異的な遺伝子発現の制御に関わっていることが明らかになってきた(Chen and Aravin, 2015; Imamura et al., 2014)。それらの内、

小分子非コード RNA は Argonaute ファミリータンパク質と共役して非コード RNA が標的とする遺伝子の発現制御を行う (Chen and Aravin, 2015)。

Argonaute ファミリータンパク質は AGO サブファミリー (AGO) と PIWI サブファミリー (PIWI) に分類される。AGO とそのガイド RNA (miRNA や siRNA) は RNA 干渉 (RNAi) 経路に関与するだけでなく (Siomi and Siomi, 2009)、体細胞の核でヘテロクロマチン化を誘導することで機能性タンパク質コード遺伝子や転移因子を抑制することが知られている (Cernilogar et al., 2011; Janowski et al., 2006)。一方で、PIWI と piRNA は生殖細胞における転移因子抑制において主要な役割を担うことで有名である (Siomi et al., 2011)。特に核 PIWI-piRNA 複合体はヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな制御を介して、配列特異的に転移因子を抑制することが知られている (Aravin et al., 2008; Sienski et al., 2012)。

序章で紹介したように、近年、生殖細胞における転移因子の抑制に加えて、いくつかの体細胞での転移因子以外の遺伝子の核 PIWI-piRNA 複合体による制御が報告されている (Rajasethupathy et al., 2012; Saito et al., 2009)。第一章で明らかにしたように、DjPiwiB はプラナリア成体多能性幹細胞 (新生細胞) で産生され、分化細胞でも分解されずに保持される。興味深いことに、保持された DjPiwiB は分化中の細胞における転移因子の抑制に重要であった。

DjPiwiB 結合 piRNA の解析から、転移因子以外にも機能性タンパク質をコードする遺伝子が DjPiwiB-piRNA 複合体による制御を受ける可能性が示唆されたが、実際に DjPiwiB-piRNA 複合体が転移因子以外の遺伝子を新生細胞や分化中の細胞または分化細胞で制御しうるかは明らかになっていない。

そこで、本章では転移因子以外の DjPiwiB-piRNA 複合体標的遺伝子を同定するために RNAi 処理後 7 日目 (7 dpf) の *DjpiwiB* 機能阻害個体の RNA-seq に加えて、3 dpf、5 dpf の *DjpiwiB* 機能阻害個体の RNA-seq を行い、発現変動遺伝子解析を行った。転移因子の分化中の細胞での抑制と異なり、DjPiwiB は新生細胞において *Djmcm2* と *Djhistone h4* の発現量の調整を行っていた。また、DjPiwiB は *Djcalu* を新生細胞と分化細胞で抑制することで、分化中の細胞での *Djcalu* の一過的な発現の制御に寄与していることを明らかにした。本章では、DjPiwiB-piRNA 複合体が担う、自己複製時や細胞分化過程における段階的な遺伝子発現の制御について報告する。

結果

新規の DjPiwiB 標的遺伝子を同定するために、*DjpiwiB* RNAi 処理後複数の時点で RNA を抽出し、発現変動遺伝子解析を行った。まず *D. japonica* のトランスクリプトーム配列のデータベースの拡充を行った。DjPiwiB の機能の一つは *gypsy-P1* の場合と同様に発現抑制であると考えられる。そのため、DjPiwiB が機能している正常個体に由来する現行の EST データベース(Nishimura et al., 2012)には DjPiwiB 標的遺伝子の配列が含まれていないと考えられた。そこで、当研究室に存在する Roche 454 及び Miseq によって得られた再生個体や新生細胞特異的遺伝子の機能阻害個体の RNA-seq データを用いて、*de novo* トランスクリプトームアセンブリーを行った (表 3-1)。*de novo* トランスクリプトームアセンブラー Trinity による配列復元の結果(Grabherr et al., 2011)、137,201 コンティグからなる 108,676 遺伝子が予測された。

表 3-1 *de novo* トランスクリプトームアセンブリーに用いた RNA-seq の一覧

| サンプル | 登録番号 | 使用系統 | リード数 | 使用機器 | シーケンスタイプ |
|---|-----------|-----------|-----------|--------------|----------|
| 1 再生一日目: 頭部断片 | DRR047187 | GI | 581,608 | 454 Titanium | シングルエンド |
| 2 再生一日目: 頭部側再生芽 | DRR047188 | | 533,023 | | |
| 3 再生一日目: 尾部側再生芽 | DRR047189 | | 497,359 | | |
| 4 <i>Djago2</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復1) | DRR047190 | SSP | 197,390 | | |
| 5 <i>Djcbc-1</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復1) | DRR047191 | | 287,995 | | |
| 6 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復1) | DRR047192 | | 282,221 | | |
| 7 コントロール個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復1) | DRR047193 | | 294,538 | | |
| 8 <i>Djago2</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復2) | DRR047194 | | 304,520 | | |
| 9 <i>Djcbc-1</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復2) | DRR047195 | | 276,059 | | |
| 10 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復2) | DRR047196 | | 267,904 | | |
| 11 コントロール個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復2) | DRR047197 | | 272,732 | | |
| 12 <i>Djago2</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復3) | DRR047198 | | 280,122 | | |
| 13 <i>Djcbc-1</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復3) | DRR047199 | | 236,200 | | |
| 14 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復3) | DRR047200 | | 235,017 | | |
| 15 コントロール個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復3) | DRR047201 | | 280,346 | | |
| 16 コントロール個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復4) | DRR047202 | | 229,302 | | |
| 17 コントロール個体、RNAi処理後7日目、頭部なし (技術的反復5) | DRR047203 | | 305,185 | | |
| 18 コントロール個体、RNAi処理後3日目 | DRR047204 | | 1,802,558 | | |
| 19 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後3日目 | DRR047205 | 2,063,133 | | | |
| 20 コントロール個体、RNAi処理後7日目 | DRR047206 | 1,930,893 | | | |
| 21 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目 | DRR047207 | 1,656,492 | | | |
| 22 コントロール個体、RNAi処理後11日目 | DRR047208 | 1,711,547 | | | |
| 23 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後11日目 | DRR047209 | 1,820,447 | | | |
| 24 18-23の混合サンプル | DRR047210 | | 970,561 | | |

第一章で明らかにしたように *DjpiwiB* 機能阻害後プラナリアは再生能力を失う。2 度目の摂餌 RNAi 後 7 日目 (7 dpf) では分裂能を持った新生細胞を持つが、その後においては新生細胞が消失する個体が観察される (データ非公開)。新生細胞の消失は新生細胞特異的遺伝子の全体的な発現減少を引き起こすと考えられたので、DjPiwiB-piRNA 複合体の直接の標的候補遺伝子を得るために、RNAi 後初期の機能阻害個体に注目した。発現変動遺伝子解析を行うために、3、5、7 dpf のコントロール個体 (以下、図中では *gfp(RNAi)* と表記する) と *DjpiwiB* 機能阻害個体 (以下、図中では *piwiB(RNAi)* と表記する) から得た RNA から、オリゴ dT ビーズを用いたポリ A 精製によって得られた RNA の配列決定を行った (図 3-1) (表 3-2)。

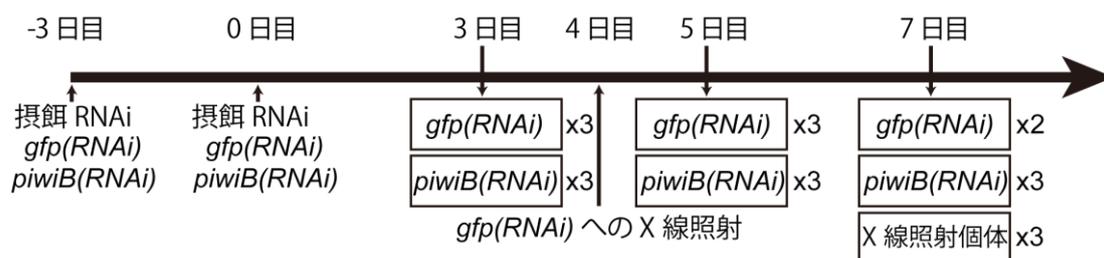


図 3-1 *DjpiwiB* 機能阻害個体の発現変動遺伝子解析に用いた実験個体の RNAi

処理日程。2 回の摂餌 RNAi 処理のち、3、5、7 日目に、コントロール個体

(*gfp(RNAi)*)、*DjpiwiB*機能阻害個体 (*DjpiwiB(RNAi)*) から RNA 抽出を行って

いる。また、X 線照射個体も同時に用意した (詳細は後述)。

表 3-2 *DjpiwiB*機能阻害個体の発現変動遺伝子解析に用いた RNA-seq 一覧

| サンプル | 登録番号 | 使用系統 | リード数 | 使用機器 | シーケンスタイプ |
|--|-----------|------|------------|--------------------------|----------|
| 25 コントロール個体、RNAi処理後3日目(生物学的反復1) | DRR047211 | SSP | 14,911,694 | HiSeq2500 (50 cycles) | シングルエンド |
| 26 コントロール個体、RNAi処理後3日目(生物学的反復2) | DRR047212 | | 15,598,213 | | |
| 27 コントロール個体、RNAi処理後3日目(生物学的反復3) | DRR047213 | | 14,725,665 | | |
| 28 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後3日目(生物学的反復1) | DRR047214 | | 9,215,181 | | |
| 29 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後3日目(生物学的反復2) | DRR047215 | | 12,350,462 | | |
| 30 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後3日目(生物学的反復3) | DRR047216 | | 13,393,351 | | |
| 31 コントロール個体、RNAi処理後5日目(生物学的反復1) | DRR047217 | | 19,118,789 | | |
| 32 コントロール個体、RNAi処理後5日目(生物学的反復2) | DRR047218 | | 19,231,469 | | |
| 33 コントロール個体、RNAi処理後5日目(生物学的反復3) | DRR047219 | | 15,720,750 | | |
| 34 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後5日目(生物学的反復1) | DRR047220 | | 13,059,345 | | |
| 35 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後5日目(生物学的反復2) | DRR047221 | | 15,872,266 | | |
| 36 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後5日目(生物学的反復3) | DRR047222 | | 12,038,567 | | |
| 37 コントロール個体、RNAi処理後7日目(生物学的反復1) | DRR047223 | | 18,379,271 | | |
| 38 コントロール個体、RNAi処理後7日目(生物学的反復2) | DRR047224 | | 15,258,316 | | |
| 39 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目(生物学的反復1) | DRR047225 | | 12,834,890 | | |
| 40 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目(生物学的反復2) | DRR047226 | | 12,905,532 | | |
| 41 <i>DjpiwiB</i> 機能阻害個体、RNAi処理後7日目(生物学的反復3) | DRR047227 | | 10,347,172 | | |
| 42 コントロール個体、X照射3日目、RNAi処理後7日目(生物学的反復1) | DRR047228 | | 17,324,915 | | |
| 43 コントロール個体、X照射3日目、RNAi処理後7日目(生物学的反復2) | DRR047229 | | 14,969,297 | | |
| 44 コントロール個体、X照射3日目、RNAi処理後7日目(生物学的反復3) | DRR047230 | | 11,847,787 | | |

結果、3 dpf の *DjpiwiB* 機能阻害個体において高発現している遺伝子 (Highly-Differentially-Expressed Genes : H-DEGs) を 236 遺伝子、低発現している遺伝子 (Lowly-Differentially-Expressed Genes : L-DEGs) を 135 遺伝子検出した (図 3-2A)。また、5 dpf において、585 個の H-DEGs と 637 個の L-DEGs を、7 dpf において、324 個の H-DEGs と 329 個の L-DEGs を検出した (図 3-2A)。*gypsy-P1* の発現上昇は、2 回目の摂餌 RNAi 後 1 日目で観察され、5 日目まで発現量が上昇し、7 日目でも高い発現量が維持されていることから (図 2-2D)、発現変動遺伝子のうち、少なくとも H-DEG は複数の時点 (特に 5 dpf と 7 dpf) で共通して検出されることが期待された。しかし、3、5、7 dpf の三時点で共通して検出された DEGs は全 H-DEG の内、わずか 9%であり、5 dpf と 7 dpf に二点で共通して検出された H-DEGs でさえ 19%であった (図 3-2B)。

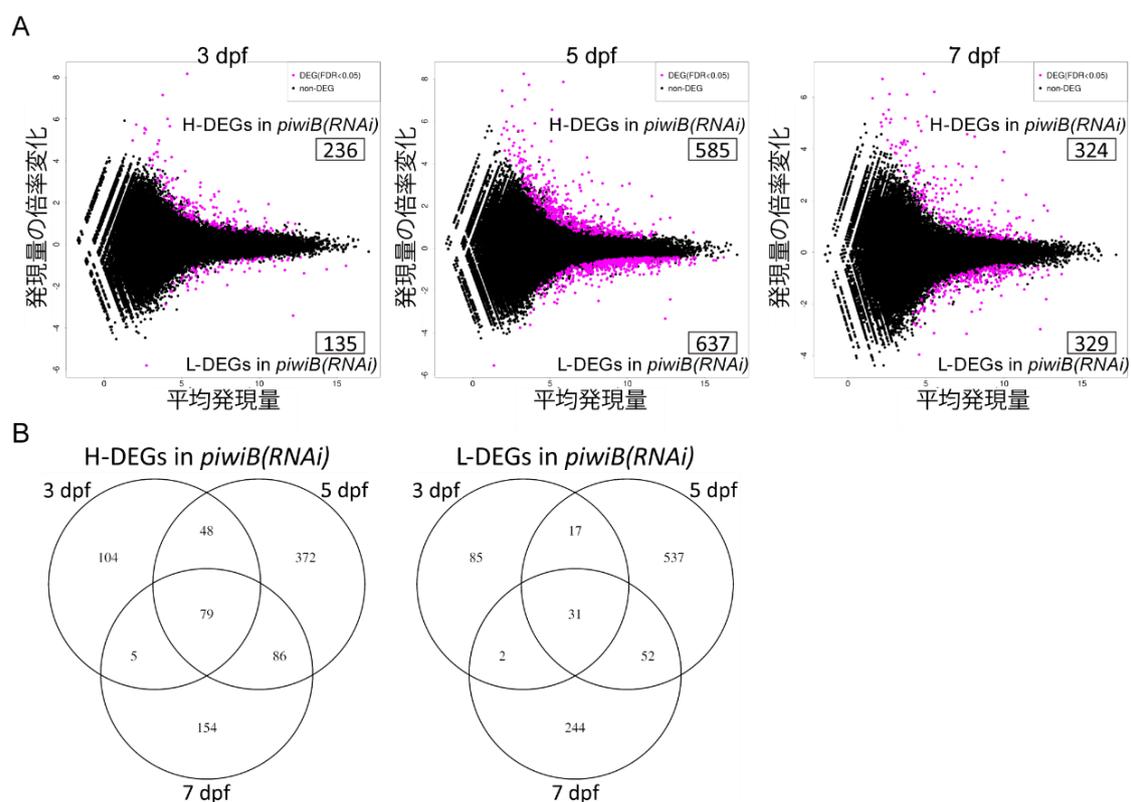


図 3-2 (A) RNAi 後各時点におけるコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の RNA-seq の結果の MA プロット⁸。発現変動遺伝子解析の結果から、FDR (偽陽性率) < 0.05 の遺伝子をマゼンタでプロットしている。プロット上の数値は各時点での *DjpiwiB* 機能阻害個体での H-DEGs と L-DEGs の個数を示している。(B) 各時点での *DjpiwiB* 機能阻害個体での H-DEGs と L-DEGs の重なりを示したベン図。dpf : 2 回目の摂餌 RNAi からの日数。

⁸ RNA-seq での発現変動遺伝子解析で用いられるプロット図。縦軸の M は「二標本群間の \log_2 変換された遺伝子発現量の差」であり、横軸の A は「二標本群間の \log_2 変換された遺伝子発現量の平均値」を表す。

RNAi 処理後複数の時点で共通して検出されている DEG（共通 DEG）は比較的大きな倍率変化を示し、DEG 検出における統計的閾値（FDR(偽陽性率 < 0.05)）から離れた部分にプロットされていた（図 3-3）。対照的に、RNAi 後に一過的にしか検出されない DEG（特異的 DEG）は比較的小さな倍率変化を示し、DEG 検出における統計的閾値の近傍に位置していた（図 3-3）。このことから、統計的有意ではないために DEG として検出されてはいないが、共通して発現が変動している遺伝子は実際に検出された以上に多いと考えられた。

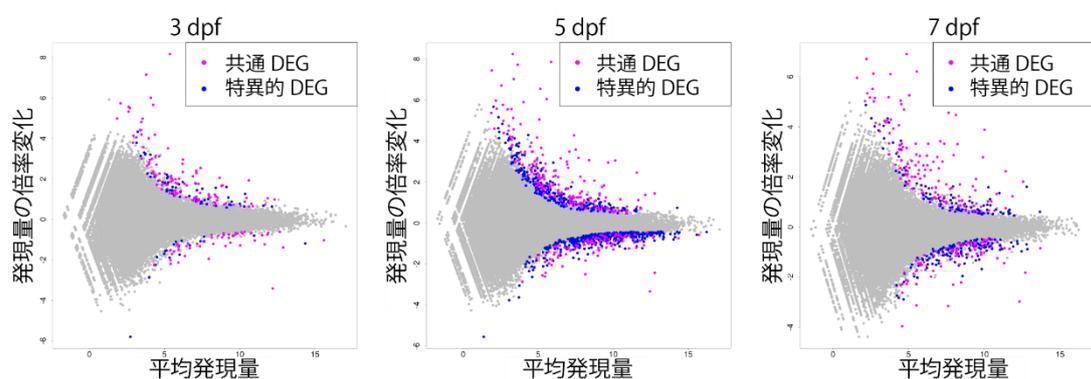


図 3-3 RNAi 後各時点におけるコントロール個体と *DjpiwiB*機能阻害個体の RNA-seq の結果の MA プロット。発現変動遺伝子解析の結果検出された DEG の内、複数の時点で検出された「共通 DEG」をマゼンタで、一時点のみで検出された「特異的 DEG」を青でプロットしている。共通 DEG の方が、特異的 DEG よりも大きな倍率変化を示し、DEG の検出境界よりも離れた位置にプロットされる傾向があった。

次に得られた DEG の発現制御への DjPiwiB 結合 piRNA (以下、piRNA と表記する) の関与を調べるために、前述の *de novo* トランスクリプトームアセンブリーで得られたトランスクリプトームリファレンスへの、第二章で得られた piRNA のマッピングを行ない、どの遺伝子 (EST) に piRNA が何リード一致するのかを調べた。そして、RNAi 後の各時点において、DEG の内の何割が piRNA と一致するのかを調べた。また、全遺伝子の内の何割が piRNA に一致するのかを比較対象として評価した (図 3-4)。5 リード以上の piRNA が一致する遺伝子の割合が全遺伝子では 18%であるのに対して、*DjpiwiB*機能阻害個体における H-DEG では各時点で 40-50%であった (図 3-4)。一方で、*DjpiwiB*機能阻害個体における L-DEG の内 5 リード以上の piRNA が一致する遺伝子の割合は各時点で 20-25%と、全遺伝子の場合に近い割合を示した (図 3-4)。この結果は、DjPiwiB による標的遺伝子の抑制は piRNA の配列依存的に起こっていることを強く示唆している。

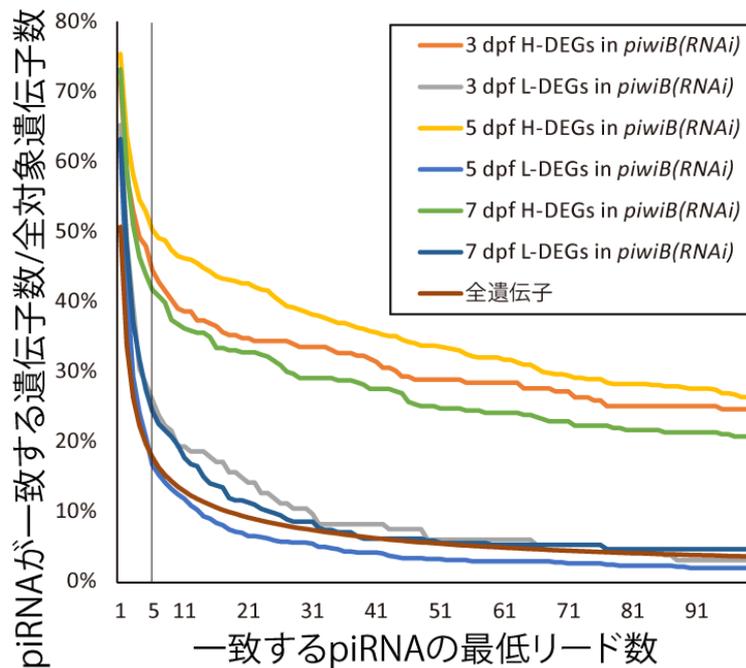


図 3-4 piRNA が一致する遺伝子の割合を、各時点の DEG や全遺伝子で表している。L-DEG の内 piRNA が一致する遺伝子の割合は、全遺伝子中の piRNA が一致する遺伝子の割合に近く、piRNA 非依存的な発現変動であることを示唆している。一方で、H-DEG は piRNA が一致する遺伝子を多く含む傾向があり、piRNA 依存的に DjPiwiB によって制御されていることを示唆している。dpf : 2 回目の摂餌 RNAi からの日数。

DjPiwiB-piRNA 複合体標的候補遺伝子の絞り込み

続いて、DjPiwiB-piRNA 複合体の標的遺伝子を同定するために、いくつかの H-DEGs の *DjpiwiB* 機能阻害個体における発現パターンを調べた。7dpf における *DjpiwiB* 機能阻害個体の H-DEGs の一つである *D. japonica granulin homolog A* (*DjgrnA*; *c34759_g1*⁹) 陽性細胞は、7 dpf の *DjpiwiB* 機能阻害個体において数の増加が見られるものの、*DjgrnA* 陽性細胞はすべて DjPiwiB 陽性細胞であった (図 3-5A: 矢尻)。そのため、*DjgrnA* には 1 リードの piRNA が一致するものの、*DjgrnA* の発現上昇は DjPiwiB の消失によって直接的に引き起こされたものではないと考えられた。このことから、新生細胞への処理によって二次的に特定の遺伝子の発現が上昇していることが推測された。実際、X 線照射によって引き起こされる新生細胞の消失の過程でいくつかの遺伝子発現が上昇することが報告されている (Solana et al., 2012)。予測した通り、X 線照射後 3 日目の個体でも、*DjgrnA* 陽性細胞の増加が観察された (図 3-5B: 矢尻)。

⁹ Trinity によるアセンブルされた各遺伝子配列に与えられる仮の配列名

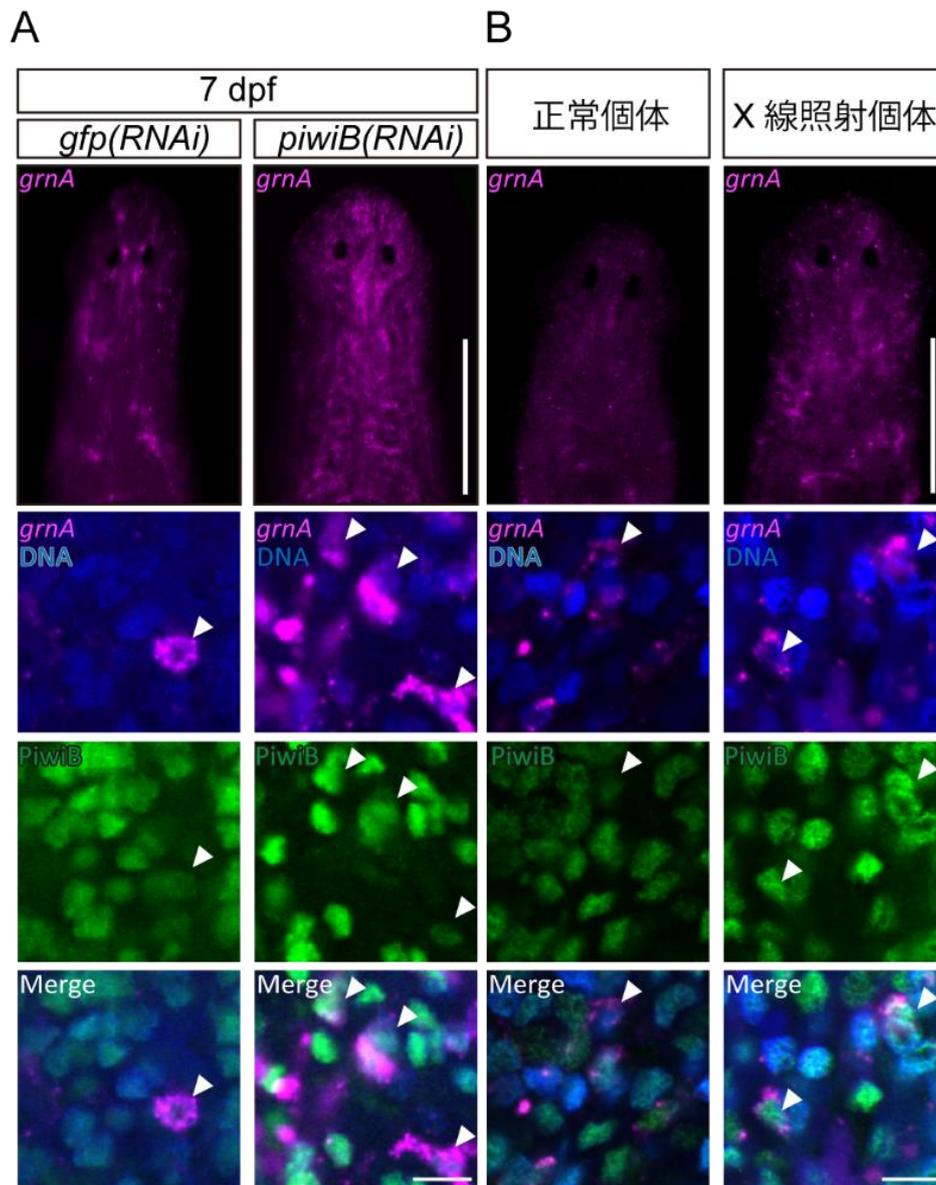


図 3-5 *DjgrnA*のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（マゼンタ）。抗 DjPiwiB 抗体を用いた免疫組織染色（緑）、Hoechst 33342 染色（青）。矢尻は *DjgrnA* 発現細胞を表している。（A）2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目（7 dpf）のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体。（B）正常個体と X 線照射後 3 日目の個体。スケールバー：（最上段）500 μ m、（下段）10 μ m。

*DjpiwiB*機能阻害によって副次的に発現量が上昇する遺伝子を候補遺伝子から除くために、X線照射3日目(3 dpi)の個体のRNA-seqも行った(図3-1)。

結果として、X線照射個体における2777個のH-DEGを検出した。*DjgraA*の*in situ*ハイブリダイゼーションの結果と一致して、RNA-seqの結果は3 dpiのX線照射個体と7 dpfの*DjpiwiB*機能阻害個体における*DjgraA*の発現量の上昇を検出していた。X線照射個体と*DjpiwiB*機能阻害個体で共通して検出されるH-DEGsの数は、7 dpfの*DjpiwiB*機能阻害個体において劇的に増加しており、3 dpfや5 dpfのH-DEGsに比べて多くの*DjpiwiB*機能阻害によって副次的に発現が上昇する遺伝子を、7 dpfのH-DEGsが含むことが示唆された。

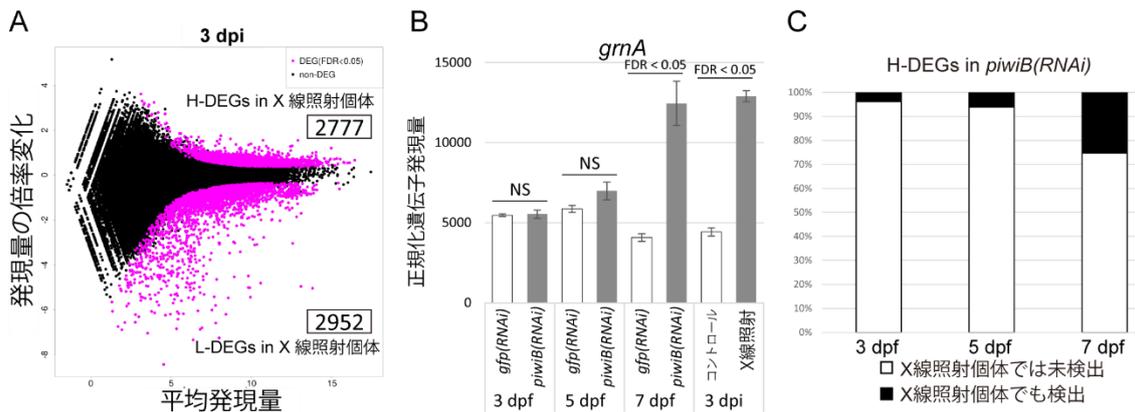


図 3-6 (A) コントロール個体と X 線照射 3 日目の個体の RNA-seq の結果の MA プロット。発現変動遺伝子解析の結果から、FDR (偽陽性率) < 0.05 の遺伝子をマゼンタでプロットしている。プロット上の数値は X 線照射個体での H-DEGs と L-DEGs の個数を示している。(B) RNA-seq に基づく、*DjgrnA* の発現量。(C) X 線照射個体と RNAi 後各時点における *DjpiwiB* 機能阻害個体で共通して検出される H-DEGs の割合。dpf : 2 回目の摂餌 RNAi からの日数。エラーバーは標準誤差を表している。

以上の結果を踏まえて、より確度の高い DjPiwiB-piRNA 複合体の標的遺伝子候補を得るために、さらなる絞り込みを行った。*gypsy-P1* で得た知見から、統計的に有意でなくとも、7 dpf までは *DjpiwiB* 機能阻害個体においてコントロール個体と比べて高い標的遺伝子の発現が観察されると考えられた。また、*DjpiwiB* RNAi 処理後、徐々に DjPiwiB が消失していくことから (図 3-7)、DjPiwiB の標的遺伝子には 3 dpf では DEG として検出されないものが含まれる

可能性も考えられた。

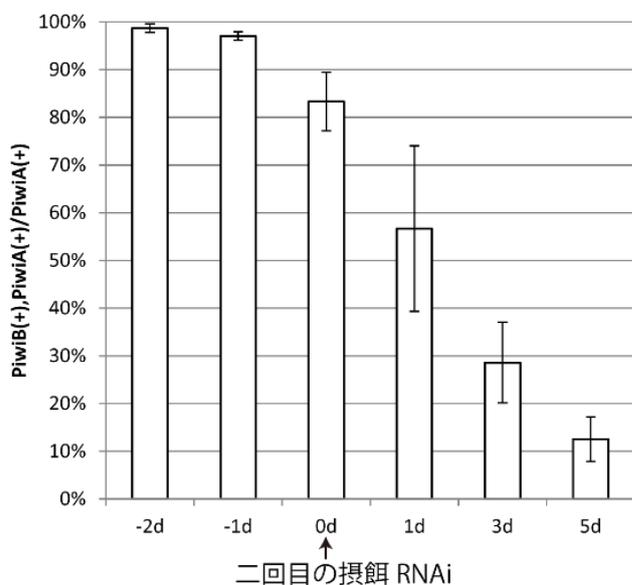


図 3-7 *DjpiwiB* RNAi 処理後の DjPiwiB 陽性新生細胞の割合を、抗 DjPiwiB 抗体と抗 DjPiwiA 抗体を用いたホールマウント免疫染色によって得た。エラーバーは標準誤差を表している。

そのため、3 dpf の H-DEGs と 5 dpf の H-DEGs の内、H-DEG として検出された時点以降は *DjpiwiB* 機能阻害個体でコントロール個体に比べて、FDR に関わらず、高発現している遺伝子 (3-7 dpf H-DEGs と 5-7 dpf H-DEGs)、545 個の遺伝子を PiwiB の標的遺伝子候補として選択した。この際に 7 dpf でのみ H-DEGs として検出された遺伝子は、*DjpiwiB* 機能阻害の副次的な影響による発現変動を示している可能性があるため (図 3-6C)、今回の標的遺伝子の解析には用いなかった。さらに 3 dpi の H-DEGs や一致する piRNA が 5 リード未満の遺伝子 (227 個の遺伝子) も DjPiwiB-piRNA 複合体標的遺伝子としての信頼性が低いと考え除いた。結果として、DjPiwiB-piRNA 複合体標的遺伝子の候補と

して、281 個の遺伝子を得た。さらに、転移因子のデータベースである Repbase に対して blastx 検索を行い、転移因子がコードするタンパク質と類似性を示さない 223 個の遺伝子を選出した。最終的に、タンパク質のデータベースである Swiss-Prot に対して、blastx 検索を行い、転移因子以外のタンパク質をコードする可能性がある 8 種類の遺伝子を得ることに成功した。

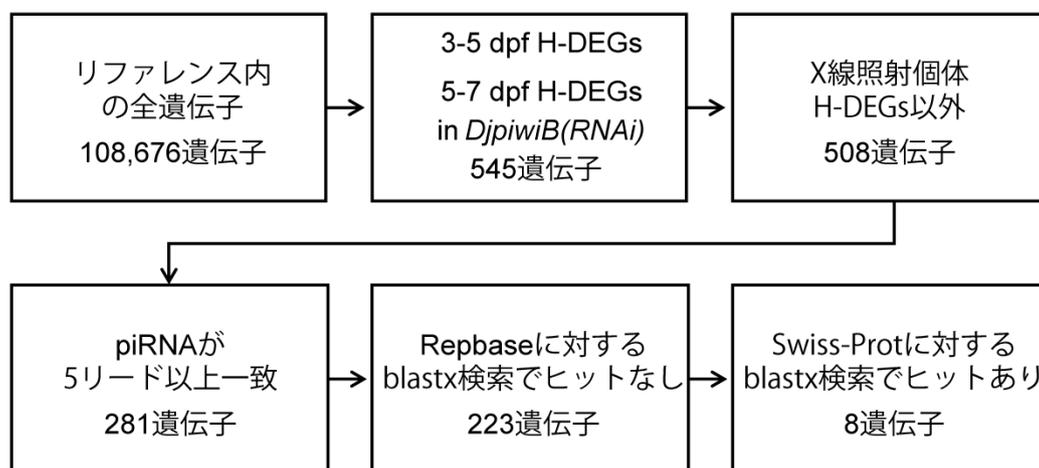


図 3-8 RNA-seq や piRNA の配列に基づいた DjPiwiB-piRNA 複合体標的遺伝子

候補の選出手順。dpf : 2 回目の摂餌 RNAi から日数。

次に、定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) によって、*DjpiwiB*機能阻害個体における、得られた 8 種類の遺伝子の発現量を確認した。また、X 線照射によって新生細胞を特異的に除去した *DjpiwiB* 機能阻害個体における上記の遺伝子の発現量も調べた。その結果、4 種類の遺伝子に関しては RNA-seq の結果と一致して 5 dpf の *DjpiwiB*機能阻害個体での発現の上昇が確認された(図 3-8)。*c35065_g3* (*Djhistone h4*) と *c45097_g1* (*Djmcm2*) の発現量は *DjpiwiB* 機能阻害個体では、コントロール個体に比べ、それぞれ、5.2 倍と 1.6 倍に上昇していた(図 3-8)。また、これら 2 種類の遺伝子の発現量は X 線照射個体では劇的に低下していた。これは 3 dpi の RNA-seq の結果とも一致するもので、先行研究とも一致して(Hayashi et al., 2010; Salvetti et al., 2000; Wang et al., 2007)、両遺伝子の新生細胞特異的な発現を示唆するものである。本研究で新たに同定された新規遺伝子である *D. japonica calumenin* 相同遺伝子 (*Djcalu*) の発現量は *DjpiwiB*機能阻害個体では、コントロール個体に比べ、3.7 倍に上昇していた(図 3-8)。また、X 線照射 *DjpiwiB* 機能阻害個体でも、X 線照射コントロール個体に比べて、2.1 倍の *Djcalu* の発現量の上昇が観察された。さらに、X 線照射によって *DjpiwiB* 機能阻害個体での *Djcalu* の発現の上昇量は減少することを確認した(図 3-8)。*C44080_g1* (新規の *D. japonica* AGO ファミリータンパク質をコードする遺伝子) は X 線照射コントロール個体と X 線照射 *DjpiwiB*機能阻

害個体の両方で、X線非照射 *DjpiwiB* 機能阻害個体よりも高い発現量を示した (図 3-8)。この結果に一致して、3 dpi の RNA-seq でも、FDR が高いために DEG として検出されてはいなかったが、*C44080_g1* の発現量の X 線照射個体での上昇が確認できたことから、この遺伝子の発現量の上昇は *DjpiwiB* RNAi の副次的な影響であると結論づけた。以上の解析結果にもとづき、DjPiwiB-piRNA 複合体によって抑制される標的遺伝子として *Djhistone h4*、*Djmcm2*、*Djcalu* の 3 遺伝子を同定した。以後はこれらの遺伝子についての詳細な解析を行った。

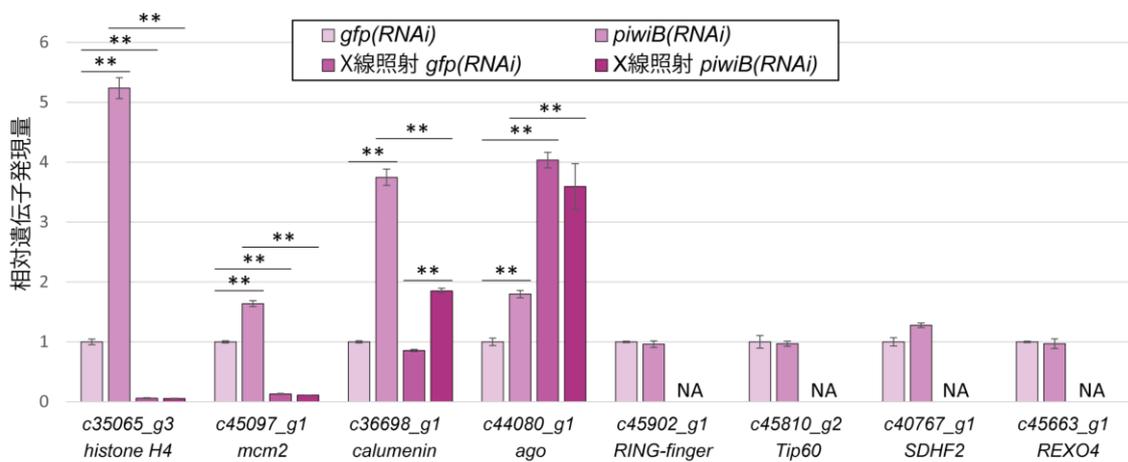


図 3-8 DjPiwiB-piRNA 複合体の標的タンパク質コード候補遺伝子の RT-qPCR の結果。コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体、X 線照射コントロール個体と X 線照射 *DjpiwiB* 機能阻害個体におけるそれぞれの発現量を示している。すべて RNAi 後 5 日目の個体を使用し、X 線照射の一日後に 1 度目の摂餌 RNAi を行った。** : $p < 0.01$ (t 検定)。エラーバーは標準誤差を表している。

DjPiwiB は *Djmcm2* と *Djhistone h4* の新生細胞での適切な遺伝子発現に寄与している

まず、すでに新生細胞特異的に発現することが明らかになっている *Djmcm2* と *Djhistone h4* について調べた。*Djmcm2* に関しては、piRNA は転写産物の配列の主に CDS の 3' 末端及び 3' UTR にセンス鎖・アンチセンス鎖両方向で一致していた (図 3-9)。また、*Djhistone h4* に関しては、piRNA は転写産物の配列の主に 5' UTR にセンス鎖方向に一致していた (図 3-9)。

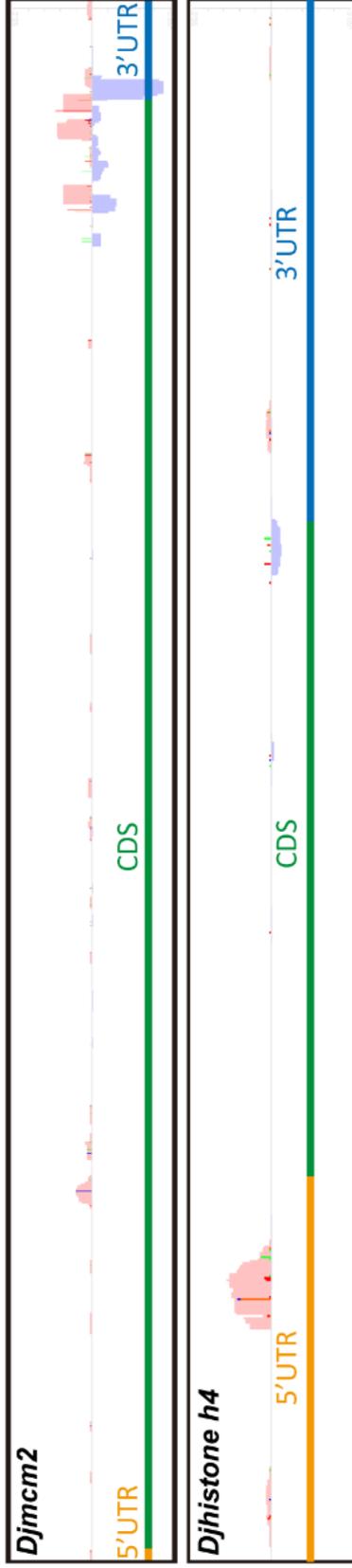


図 3-9 *Djmcm2* 及び *Djhistone h4* 転写産物に対する *DjPwiB* 結合 piRNA のマッピングの結果。各転写産物の塩基上でのセンス鎖方向に一致する piRNA のリード数は赤 (図では遺伝子上側の側に累積) で、アンチセンス鎖方向に一致する piRNA のリード数は青で示されている (図では遺伝子の下側に累積)。縦軸の最大値は 50 リードである。

両遺伝子はコントロール個体だけでなく、*DjpiwiB* 機能阻害個体においても新生細胞特異的に発現していたことと（図 3-8、10 A、B、D、E）、これらの遺伝子の発現量の上昇は新生細胞で起こっていると考えられた。*Djmcm2* は S 期から M 期にかけての一部の新生細胞で発現していることが Hayashi らによって報告されている (Hayashi et al., 2010)。実際、コントロール個体では *Djmcm2* 陽性細胞は DjPiwiA 陽性細胞の 57%であった。しかし、5dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体では、コントロール個体と比べて、*Djmcm2* 陽性細胞の数が 140%まで増加していた（図 3-10C）。また、*Djhistone h4* 陽性細胞は、コントロール個体では DjPiwiA 陽性細胞の 87%であったのに対して、5dpf *DjpiwiB* 機能阻害個体では、コントロール個体と比べて、*Djhistone h4* 陽性細胞の数は 107%まで増加していた（図 3-10F）。一方で、5 dpf の時点では M 期の細胞である pH3 陽性細胞の数はコントロール個体では変化しておらず（図 3-10G）、また、他の細胞分裂関連遺伝子（*Djmcm3* や *Djpcna*）あるいはヒストン遺伝子（*Djhistone h1*、*h2a*、*h2b*、*h3*）の発現量もコントロール個体に比べて *DjpiwiB* 機能阻害個体で上昇していなかった（図 3-10H）。

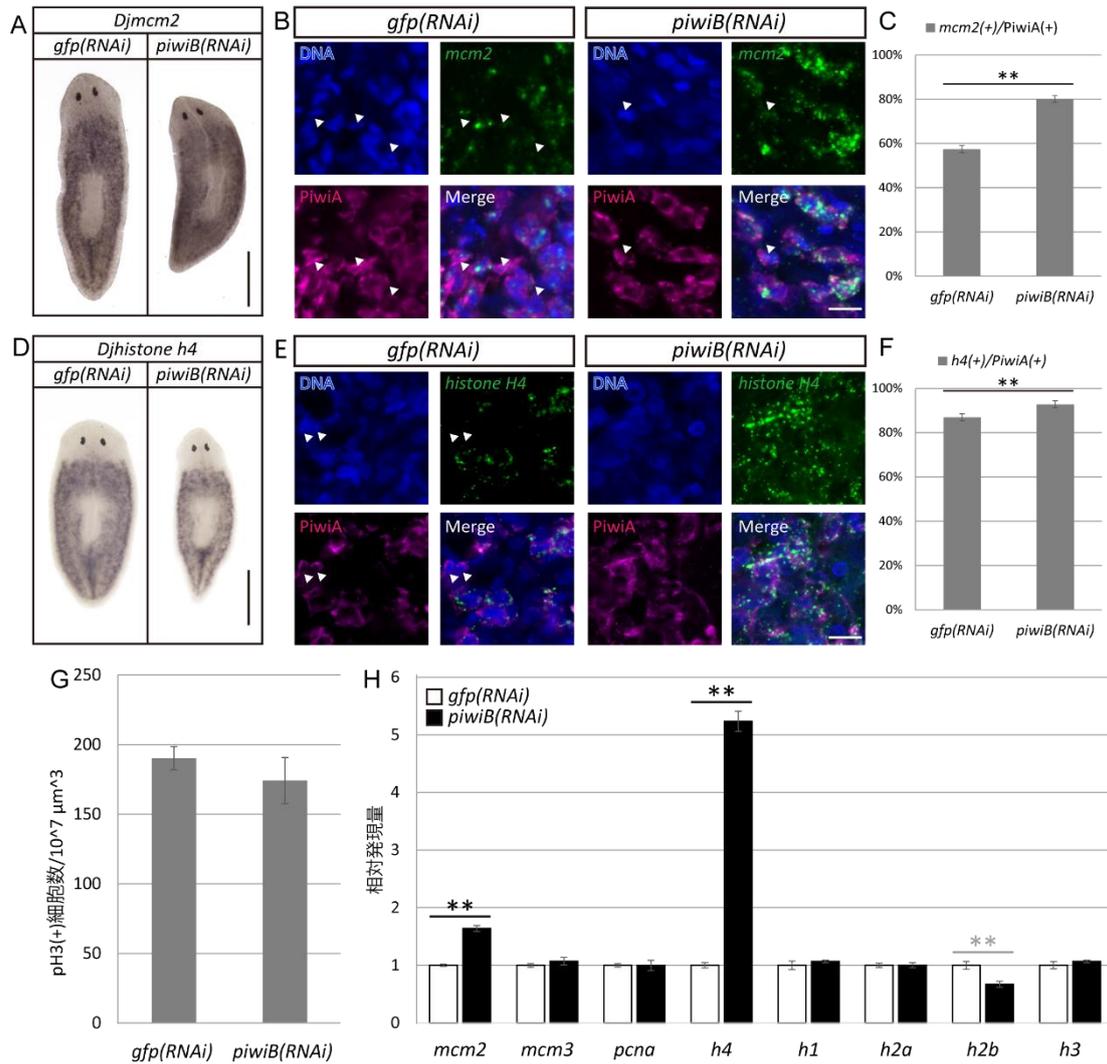


図 3-10 (A) 2 回目の摂餌 RNAi から 5 日目 (5 dpf) の コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *Djmcm2* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。(B) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *Djmcm2* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 DjPiwiA 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (マゼンタ)。Hoechst 33342 染色 (青) (C) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体における、DjPiwiA 陽性細胞中の *Djmcm2* 陽性細胞の割合。(D) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の

*Djhistone h4*のホールマウント *in situ*ハイブリダイゼーション。(E) 5 dpf
コントロール個体と *DjpiwiB*機能阻害個体の *Djhistone h4*のホールマウント蛍
光 *in situ*ハイブリダイゼーション (緑) と抗 DjPiwiA 抗体を用いたホールマ
ウント免疫染色 (マゼンタ)。Hoechst 33342 染色 (青)。(F) 5 dpf コントロー
ル個体と *DjpiwiB*機能阻害個体における、DjPiwiA 陽性細胞中の *Djhistone h4*
陽性細胞の割合。(G) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB*機能阻害個体におけ
る、pH3 陽性細胞の数。(H) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB*機能阻害個体
における、細胞周期関連遺伝子とヒストン遺伝子の発現量。スケールバー: (A, D)
500 μm , (B, E) 10 μm 。**: $p < 0.01$ (t 検定)。エラーバーは標準誤差を表し
ている。

***Djcalu*は再生時に分化細胞で一過的に発現する**

Djcalu は今回 DjPiwiB の標的遺伝子として新規に同定された遺伝子であり、その発現細胞は未知であった。そこで、*Djcalu* の発現細胞を調べるために、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。正常個体では、特に明瞭な *Djcalu* の発現は観察されなかった (図 3-11A)。しかし、興味深いことに、再生個体では再生芽において *Djcalu* の発現が観察された (図 3-11B)。再生芽は切断面付近に形成される頭部先端部の分化中の細胞の塊である (Tasaki et al., 2011a)。まず、切断後 12 時間において、胴体断片の頭部側と尾部側両方の切断面で *Djcalu* の発現が観察された (図 3-11B : 矢尻)。その後継続的に再生芽細胞及び再生芽基部¹⁰で発現が検出された (図 3-11B : 矢尻)。そして、再生 7 日目には *Djcalu* の発現は観察されなくなった (図 3-11B)。

¹⁰ 再生芽の基部に位置し、再生芽に細胞を供給するために新生細胞の分裂が活発に行われている領域 (Baguna et al., 1989; Tasaki et al., 2011b)。

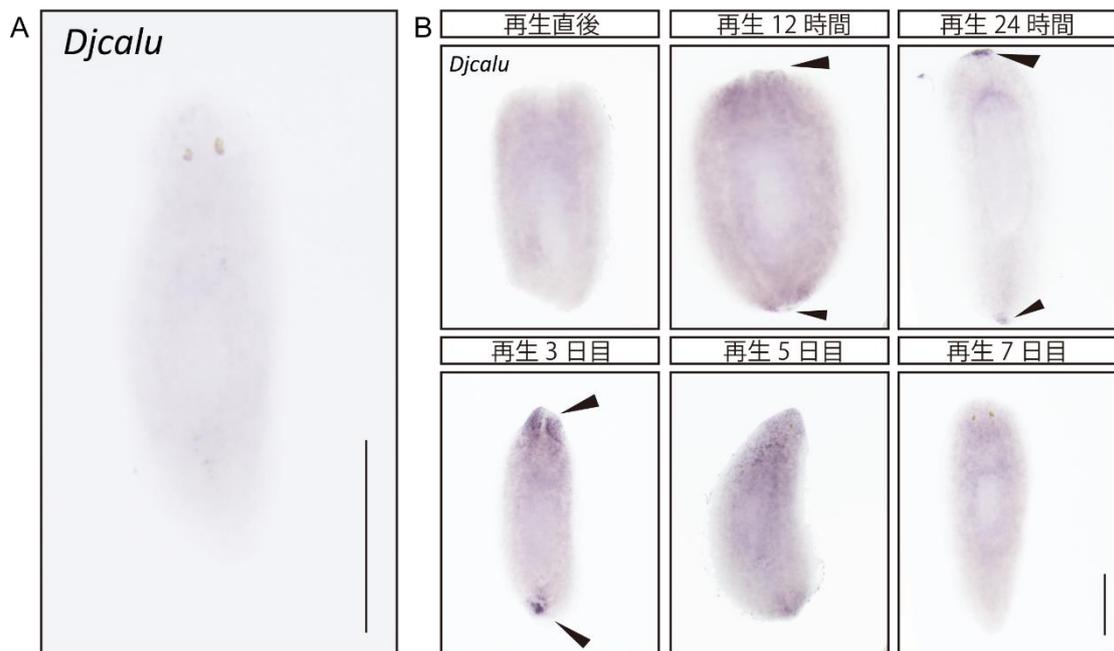


図 3-11 (A) 正常個体を用いた *Djcalu* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。(B) 再生個体を用いた *Djcalu* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。スケールバー : 500 μ m。

この再生過程における発現の変化は、*Djcalu* の一過的な発現が新生細胞からの分化途上にある再生芽細胞で起こっていることを示唆している。そこで、*Djcalu* 発現細胞が新生細胞に由来する分化中の細胞であるのかを検証するために、切断後 24 時間の X 線非照射再生個体と X 線照射再生個体における *Djcalu* の発現を調べた。X 線非照射再生個体では、*Djcalu* は再生芽の先端部分に存在する分化中の細胞(DjPiwiA タンパク質陽性/*DjpiwiA* mRNA 低発現細胞 : Tasaki et al., 2011a)で特異的に発現していた。一方で、X 線照射再生個体では、

Djcalu の発現は全く観察されなかった。これらの結果は *Djcalu* 発現細胞が新生細胞に由来する分化中の細胞であることを明瞭に示している。つまり、再生過程において、*Djcalu* は分化中の細胞では発現する一方で、新生細胞や分化細胞では発現が抑制されていることが明らかとなった。

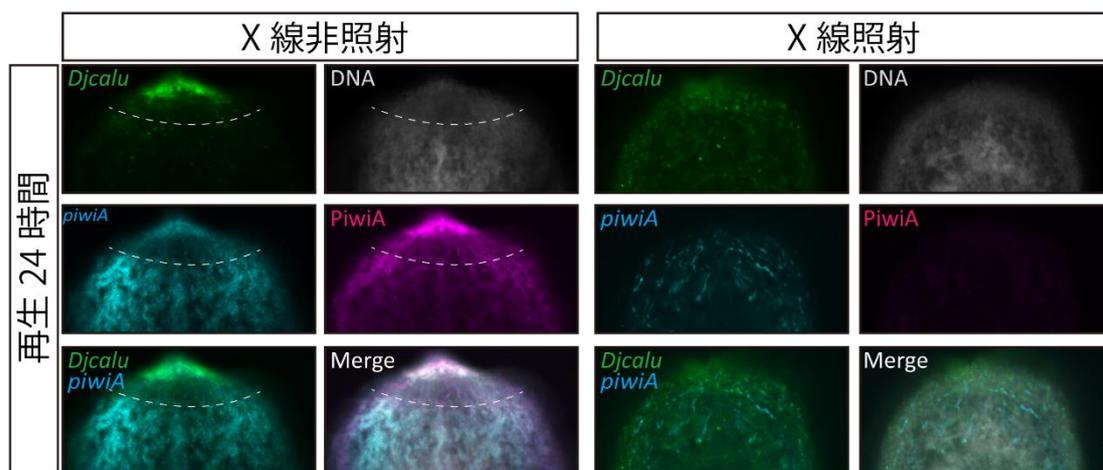


図 3-12 切断後 24 時間の X 線非照射再生個体と X 線照射再生個体 (X 線照射後 7 日目に切断した個体) を用いた、*Djcalu* (緑) 及び *DjpiwiA* (シアン) のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションと抗 DjPiwiA 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (マゼンタ)。Hoechst 33342 染色 (白)。破線は *DjpiwiA* から予測される再生芽の境界を示している。スケールバー : 50 μm 。

DjPwiB は新生細胞と分化細胞で *Djcalu* の発現を抑制する

piRNA は *Djcalu* の転写産物の 3' UTR にセンス鎖方向に一致していた (図 3-13)。

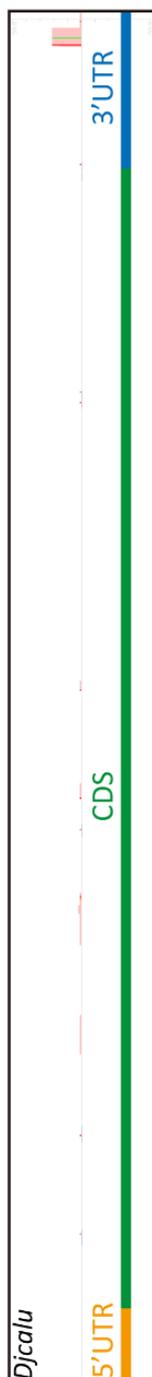


図 3-13 *Djcalu* 転写産物に対する DjPwiB 結合 piRNA のマッピングの結果。転写産物上でセンス鎖方向に一致する piRNA のリード数は赤 (図では遺伝子を示す線の上側に累積) で、アンチセンス鎖方向に一致する piRNA のリード数は青 (図では遺伝子を示す線の下側に累積) で示されている。縦軸の最大値は 50 リードである。

*DjpiwiB*機能阻害個体での *Djcalu* の発現パターンを調べたところ、コントロール個体では *Djcalu* の明瞭な発現が観察されなかったのに対して、*DjpiwiB*機能阻害個体では新生細胞の分布に類似した発現パターンが観察された (図 3-14)。

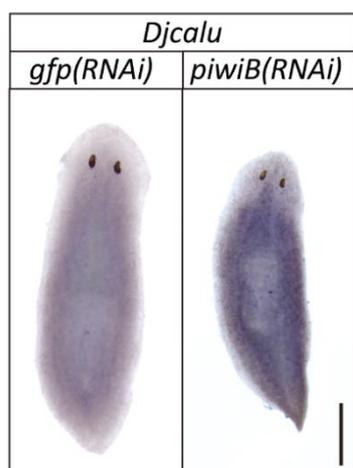


図 3-14 2回目の摂餌 RNAi から 5 日目 (5 dpf) のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *Djcalu* のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。スケールバー : 500 μ m。

再生過程での *Djcalu* の発現パターンから、正常個体においても *Djcalu* は分化中の細胞で一過的に発現しているのではないかと考えられた。そこで、コントロール個体を詳細に観察すると期待通り、稀にはあるが、*Djcalu* の発現が DjPiwiA 陽性細胞と陰性細胞の両方で観察された (図 3-15A)。この観察結果は、再生過程だけでなく、正常個体においても *Djcalu* の一過的な発現が分化中の細胞で起こっていることを示唆している。一方で、*DjpiwiB*機能阻害個体では、コントロール個体と比べて 28 倍もの数の *Djcalu* 発現細胞が観察された (図 3-15 A、B)。興味深いことに、*DjpiwiB* 機能阻害個体においても、*Djcalu* の発現は DjPiwiA 陽性細胞と陰性細胞の両方で観察された (図 3-15 A、B)。また、*DjpiwiB*

機能阻害個体で観察された *Djcalu* 陽性細胞はそのほとんどが DjPiwiB 陰性細胞で、DjPiwiB 陽性細胞であっても、DjPiwiB のシグナルが弱い細胞であった (図 3-15A、C)。このことから、*Djcalu* は DjPiwiB によって抑制されていることが強く示唆された。つまり、DjPiwiB は新生細胞だけでなく、DjPiwiA 陰性細胞 (分化中の細胞あるいは分化細胞) においても *Djcalu* の発現を抑制していると考えられた。

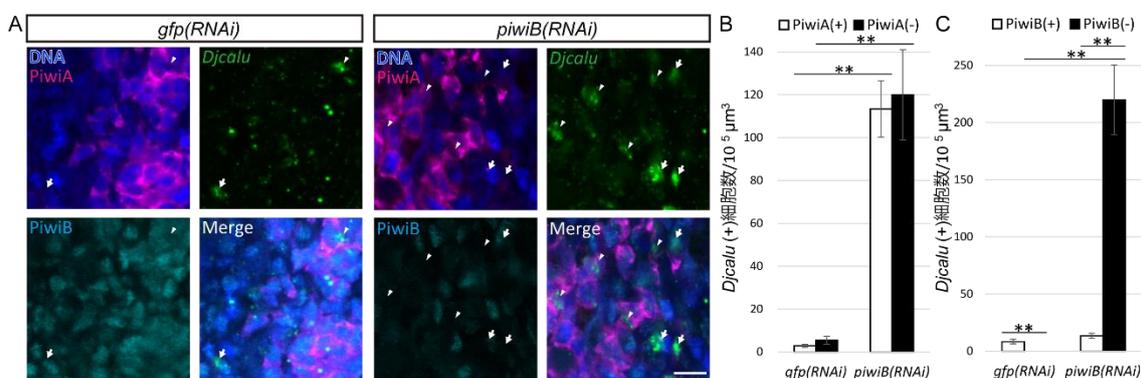


図 3-15 (A) 2 回目の摂餌 RNAi から 5 日目 (5 dpf) の コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *Djcalu* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 DjPiwiA 抗体 (マゼンタ) と抗 DjPiwiB 抗体 (シアン) を用いたホールマウント免疫染色。Hoechst 33342 染色 (青)。矢印は DjPiwiA 陽性細胞、矢尻は DjPiwiA 陰性細胞を示している。(B) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体における DjPiwiA 陰性細胞あるいは DjPiwiA 陽性細胞に中の *Djcalu* 発現細胞数。(C) 5 dpf コントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体における DjPiwiB 陰性細胞あるいは DjPiwiB 陽性細胞に中の *Djcalu* 発現細胞

数。スケールバー：10 μm 。**： $p < 0.01$ (t 検定)。エラーバーは標準誤差を表している。

最後に、*DjpiwiB* 機能阻害個体において、*Djcalu* を発現している DjPiwiA 陰性細胞は分化中の細胞のみなのか、あるいは、分化細胞で異所的に *Djcalu* が発現しているのかどうかを調べた。DjPiwiB 陰性分化細胞での *Djcalu* の発現を調べるために、*DjpiwiB* 機能阻害個体の再生個体における DjPiwiB 陰性新生細胞に由来する DjPiwiB 陰性分化細胞に注目した。第一章で示したように、*DjpiwiB* 機能阻害個体も RNAi 初期では不完全ながら再生することができる。そこで、コントロール RNAi あるいは *DjpiwiB* RNAi 処理後 1 日目に処理個体の頭部を切断し、6 日間再生させた (図 3-16A)。予測通り、コントロール再生個体の再生部位では、すべての細胞で DjPiwiB タンパク質が存在し、*Djcalu* 発現細胞は少数しか観察されなかった (図 3-16B)。一方、*DjpiwiB* 機能阻害再生個体の再生部位では、再生した眼が観察されるにもかかわらず、多くの DjPiwiB 陰性細胞が存在していた (図 3-16B)。そして、興味深いことに、その領域では多くの *Djcalu* 発現 DjPiwiB 陰性細胞が観察された (図 3-16B)。さらに咽頭内部の分化細胞でも、コントロール個体では観察されない *Djcalu* を発現している DjPiwiB 陰性分化細胞が観察され (図 3-16C)、DjPiwiB が存在しない分化細胞

では、異所的に持続して *Djcalu* の発現が起こっている可能性が強く示唆された。

以上の結果から、DjPiwiB-piRNA 複合体は *Djcalu* を新生細胞で抑制し、さらに分化細胞でも抑制することで、分化中の細胞における *Djcalu* の一過的な発現に寄与していると考えられた。

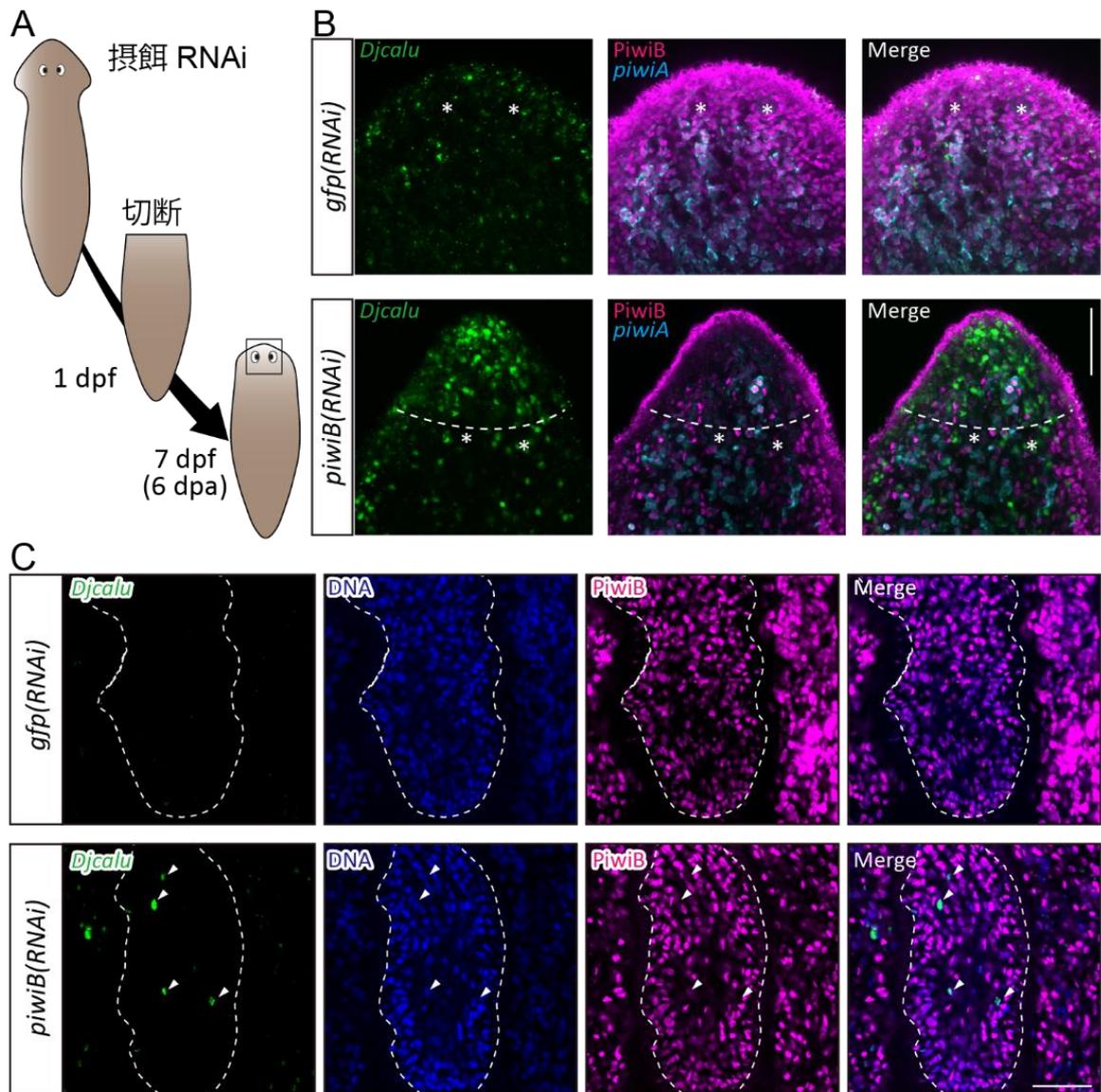


図 3-16(A)2 回目の摂餌 RNAi 後 1 日目にプラナリアを咽頭前部領域で切断し、
 胴部断片からの再生 6 日目の個体を観察した。(B) 再生 6 日目のコントロール
 個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *Djcalu* (緑) と *DjpiwiA* (シアン) のホールマ
 ウント蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーションと抗 DjPiwiB 抗体 (マゼンタ) を
 用いたホールマウント免疫染色。破線は DjPiwiB 陰性分化細胞からなる再生し

たと予測される領域と既存の組織の境界を表す。(B) 再生 6 日目のコントロール個体と *DjpiwiB* 機能阻害個体の *Djcalu* ホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (緑) と抗 DjPiwiB 抗体 (マゼンタ) を用いたホールマウント免疫染色。Hoechst 33342 染色 (青)。破線は咽頭を表す。スケールバー: 50 μm 。

考察

プラナリアの核 PIWI-piRNA 複合体は転移因子以外のタンパク質コード遺伝子を、おそらく転写レベルで制御する

近年、いくつかの先行研究によって PIWI が単に転移因子の発現を抑制しているだけでなく、その他のタンパク質をコードしている遺伝子を標的として制御しうるということが明らかにされてきた(Kiuchi et al., 2014; Rajasethupathy et al., 2012; Rouhana et al., 2014; Saito et al., 2009; Zhang et al., 2015)。例えば、カイコガの細胞質 PIWI は雌特異的な piRNA と共役して、転写因子をコードする遺伝子を抑制することで性決定を行っている(Kiuchi et al., 2014)。また、アメフラシの中樞神経系では、核 PIWI が抑制性転写因子を制御することで、記憶に関わる神経の可塑性を制御していることが示されている(Rajasethupathy et al., 2012)。加えて、最近の海産性の扁形動物を用いた研究では、PIWI が転移因子の抑制以外に多能性幹細胞の維持に重要な役割を持っていることが示唆された(Zhou et al., 2015)。しかし、プラナリアの新生細胞においては、別種のプラナリアである *S. mediterranea* を用いて、*histone h4* が細胞質 PIWI の標的遺伝子として報告されたのみであった(Rouhana et al., 2014)。本研究では、*Djhistone h4* だけでなく、*Djmcm2* と *Djcalu* を新生細胞の核 PIWI によって制御される機能性タンパク質コード遺伝子として初めて同定した。興味深いこと

に、これらの遺伝子のエキソンに一致する piRNA はプラナリアだけでなく、マウスやショウジョウバエの相同遺伝子でも存在していた (図 3-17)。このことは、*mcm2* や *histone h4*、*calumenin* が PIWI の保存された標的遺伝子であることを示唆している。

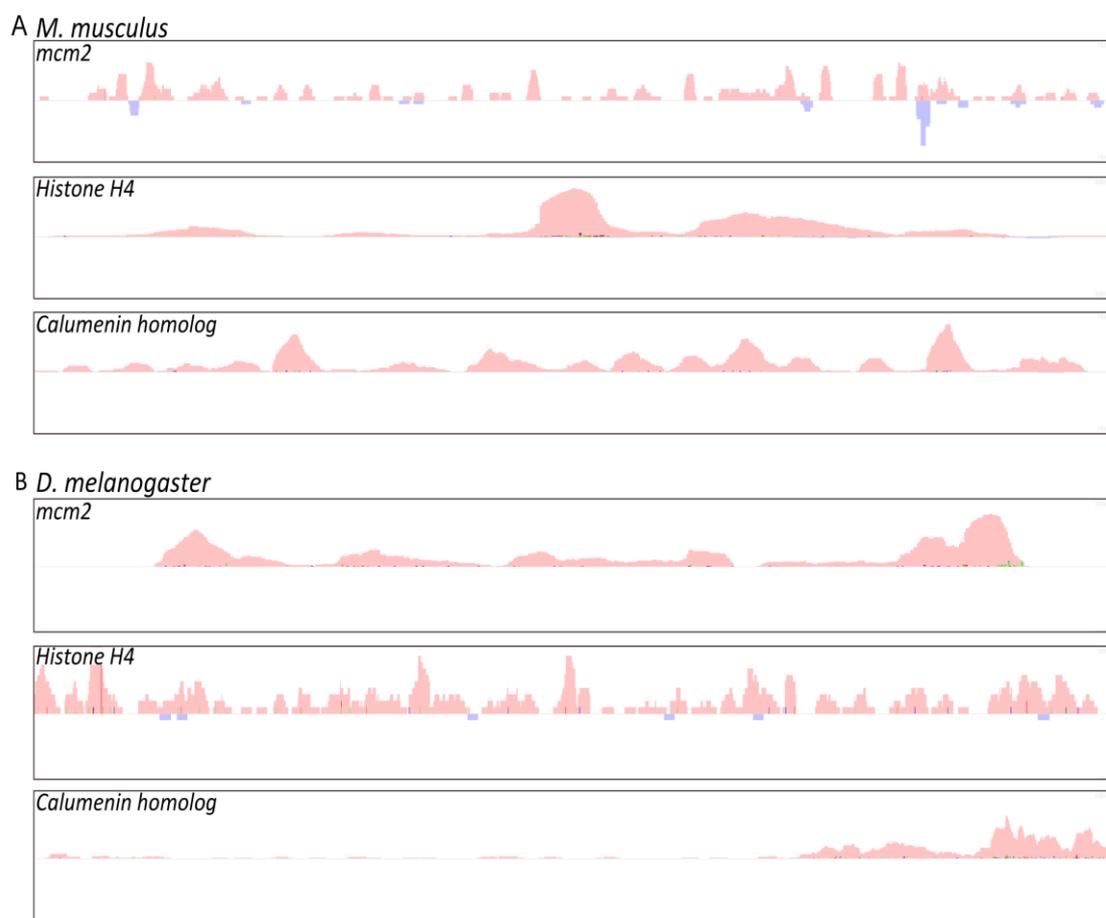


図 3-17 *mcm2*、*histone h4*、*calumenin* 相同遺伝子の転写産物に対するマウスあるいはショウジョウバエ piRNA のマッピングの結果。転写産物上でセンス鎖方向に一致する piRNA のリード数は赤 (図では遺伝子を示す線の上側に累積) で、アンチセンス鎖方向に一致する piRNA のリード数は青 (図では遺伝子を示す

線の下側に累積)で示されている。縦軸の最大値 50 リードである。(A) マウス。

(B) ショウジョウバエ。

興味深いことに、これらの遺伝子に一致する piRNA は、マウスやショウジョウバエなどでも主にセンス鎖であった (図 3-17)。核 PIWI はセンス鎖 piRNA やアンチセンス鎖 piRNA と共役して標的遺伝子を転写レベルで抑制している一方で、細胞質 PIWI はアンチセンス鎖 piRNA と共役して転写後レベルで標的遺伝子を抑制していると考えられている(Iwasaki et al., 2015)。この説に基づくと、*mcm2* や *histone h4*、*calumenin* に一致するセンス鎖 piRNA はこれらの遺伝子の転写レベルでの抑制に寄与していると考えられる。実際に、公開されている *Mmmiwi2* をノックアウトした生殖細胞を用いた ChIP の結果では(Manakov et al., 2015; Zhang et al., 2014b)、*Mmmiwi2* をノックアウトした生殖細胞において、抑制性のヒストン修飾 (H3K9me3) が *Mmmcm2* の遺伝子座やゲノム中に複数ある *Mmhistone h4* の一部の遺伝子座で減少していた (図 3-18)。これらのことから、PIWI-piRNA 複合体による *mcm2* や *histone h4*、そしておそらく *calumenin* のエピジェネティックな制御が他の動物でも保存されていると考えられた。

図 3-18 第一列は一致する piRNA、第二列は抗 H3K9me3 抗体を用いた *Mmmiwi2* ヘテロ接合体由来の生殖細胞の ChIP-seq の結果、第三列は抗 H3K9me3 抗体を用いた *Mmmiwi2* ホモ接合体由来の生殖細胞の ChIP-seq の結果、第四列は各遺伝子の CDS を示している。ChIP-seq の結果は黒い程高密度で H3K9me3 が存在していることを示している。*Mmmiwi2* ホモ接合体由来の生殖細胞では H3K9me3 が減少している傾向がみられる。(A) *Mmcalu*。(B) *Mmmcm2*。(C) *Mmhistone h4*。

DjPiwiB-piRNA 複合体は新生細胞の自己複製に合わせた遺伝子の発現を適切に制御している

S. mediterranea において、新生細胞と分化中の細胞の細胞質特異的な RNA-タンパク質複合体であるクロマトイド小体(Morita et al., 1969)上への *histone h4* RNA の局在は 2 種類の細胞質 PIWI (SMEDWI-1、SMEDWI-2) によって制御されていることが示されており、この制御がプラナリアにおける *histone h4* の転写後制御に重要であると考えられている(Rouhana et al., 2014)。*S. mediterranea* では、これら 2 つの細胞質 *piwi* 遺伝子の機能阻害によって、*pcna* や *histone h4* を含むヒストン遺伝子群の発現が上昇する(Rouhana et al., 2014)。対照的に、核内 PIWI タンパク質をコードする *DjpiwiB* 機能阻害個体では、*Djmcm2* と *Djhistone h4* の発現のみが特異的に上昇し、他の細胞周期関連遺伝

子やヒストン遺伝子群の発現上昇やM期の新生細胞の数に変化は見られなかった(図3-10)。このことは、核内DjPiwiBによる*histone h4*の制御が他の細胞質PIWIによる制御とは異なることを示唆している。では、DjPiwiBは新生細胞においてどのように*Djmcm2*や*Djhistone h4*の遺伝子発現を制御しているのでしょうか?両遺伝子とも、細胞周期に依存して転写されることが他の動物で知られていることから(Marzluff and Duronio, 2002; Tye and Chang, 2004)、*D. japonica*においてもこれらの遺伝子の発現は細胞分裂の進行に沿って制御されていると考えられる。実際、これらの遺伝子の発現は一部の新生細胞でのみ観察される(図3-10 B,C,E,F, Hayashi et al., 2010)。*DjpiwiB*機能阻害個体では、細胞分裂が正常に進行していると思われる一方で、*Djmcm2*や*Djhistone h4*陽性細胞数は増加していた(図3-10 B,C,E,F)。このことから、通常はDjPiwiBによって両遺伝子の発現が抑制されるはずの特定の細胞周期の新生細胞で、両遺伝子の異所発現が起こっていることが示唆された。すなわち、DjPiwiBは細胞周期依存的な一過的遺伝子発現の適切な制御に重要であると考えられる。

*DjpiwiB*の機能阻害は、*Djmcm2*と*Djhistone h4*の発現上昇を特異的に引き起こす一方で、他の細胞周期関連遺伝子の発現上昇は引き起こさない。なぜ、この2つの遺伝子だけがDjPiwiBによる制御を受けているのであろうか?この両遺伝子の過剰発現が分裂能を有する細胞のアポトーシスを引き起こすことが報

告されている(Hasegawa et al., 2009; Singh et al., 2010; Suzuki et al., 2012)。

このことから、*D. japonica* のゲノムにおいてこれらの遺伝子コピー数が偶発的に増加しており、発現量の補償が必要である可能性が考えられる。少なくとも DjPiwiB による *Dj histone h4* の発現量の補償が新生細胞で起こっている可能性は高い。*DjpiwiB* 機能阻害個体において、コントロール個体と比べて、*Djhistone h4* 陽性細胞の数は 1.1 倍しか増加していないのに対して、その発現量は 4 倍まで増加していた。この結果は、DjPiwiB の喪失によって各新生細胞における *Djhistone h4* の最大発現量が増加していることを示唆するものである。つまり、DjPiwiB-piRNA 複合体は、一部の *Djhistone h4* 遺伝子の抑制に寄与していると推測される。多くの動物でヒストン遺伝子は遺伝子クラスターを形成し、ゲノム中に複数コピーが存在することから、おそらく *D. japonica* においてもゲノム中に元々クラスターとして複数コピー存在すると考えられる。そのため、*Djhistone h4* 遺伝子のコピー数の増加の影響が、通常はゲノム中にコピーしか存在しない *Djmcm2* 遺伝子のコピー数増加よりも顕著に見られたのではないであろうか？実際、*D. japonica* のドラフトゲノムを調べたところ、興味深いことに、*Djmcm3* と *Djpcna* に相当するコンティグは一つずつしか存在していなかったのに対して、*Djmcm2* 遺伝子のみが、一部分しか含まないものも含めると、5 つの異なるコンティグ上に確認された。この結果は、ドラフトゲノ

ムであるため断定はできないが、*Djmcm2* 遺伝子がゲノム中で複製されている可能性を示唆するものである。

なぜ、*Djcalu*は DjPiwiB-piRNA 複合体によって新生細胞および分化細胞で抑制されなければならないのか？

本研究では、新規に同定した遺伝子 *Djcalu* が DjPiwiB によって新生細胞と分化細胞で抑制され、分化中の細胞では発現することを見出した (図 3-11-16)。

では、何故 *Djcalu* の発現は、DjPiwiB-piRNA 複合体によって厳密の制御されなければならないのであろうか？分化中の細胞における *Djcalu* の機能を明らかにするために *Djcalu* の機能阻害実験を行ったが、今のところ顕著な表現型は得られていない。また、プラナリアでは遺伝子導入技術が樹立されておらず、新生細胞や分化細胞で異所的に発現する *Djcalu* の機能に迫ることも困難である。しかし、Calumenin は線虫からヒトまで保存されたタンパク質であり、シャペロンや転写因子として、小胞体の機能や細胞移動などに関わる非常に多機能なカルシウム結合性タンパク質であることが知られている (Zheng et al., 2015)。加えて、マウスの脳では神経前駆細胞で特異的に発現しており、神経細胞の細胞移動や細胞分化に関わっていることが示唆されている (Vasiljevic et al., 2012)。

Djcalu はプラナリアの再生時でも、おそらく細胞移動を行っている再生芽を形

成する分化中の細胞で特異的に発現している（図 3-11,12）。新生細胞や分化細胞における異所的な *Djcalu* の発現は不適切な細胞移動や不完全な細胞分化を引き起こすのではないだろうか。このように、DjPiwiB-piRNA 複合体は転移因子の抑制のみならず、新生細胞の増殖制御や新生細胞からの適切な細胞分化に重要な機能を担っていると考えられる。

DjPiwiB-piRNA 複合体は新生細胞からの分化細胞に至る過程で、細胞状態に合わせて遺伝子発現の制御に関わっている

第二章において、DjPiwiB が分化を開始した細胞において転移因子を抑制すること明らかにした（図 2-4、5）。本章では、それに加えて、新生細胞において DjPiwiB が *Djmcm2* や *Djhistone h4* の発現制御に関与していることを見出した（図 3-19）。先に考察した様に、これら両遺伝子の制御は細胞周期に関連していると考えられる。おそらく、細胞周期の進行に合わせて、新生細胞特異的な遺伝子発現の制御機構によって両遺伝子の転写は活性化し、その後、DjPiwiB-piRNA 複合体によって、再び不活性化するのではないであろうか。もしそうであるならば、*DjpiwiB* 機能阻害個体において、新生細胞以外ではこれら両遺伝子の発現が観察されないのは、転写自体は新生細胞特異的な制御機構に依存しているためであると考えられる。対照的に、正常個体において *Djcalu* は、新生細

胞と分化細胞では DjPiwiB-piRNA 複合体によって抑制されているために、分化中の細胞でのみ発現が観察される (図 3-19)。このように、新生細胞における *Djmcm2* や *Djhistone h4* の制御や細胞分化の過程における *Djcalu* の制御の両方の場合において、DjPiwiB-piRNA 複合体による抑制と細胞状態依存的な転写活性化機構のせめぎ合いによって段階的な遺伝子発現が実現していると思われる。DjPiwiB-piRNA 複合体が新生細胞で産生され、分化細胞でも分解されずに保持されることを考えると (第二章)、おそらく、DjPiwiB-piRNA 複合体はプラナリア成体多能性幹細胞システムにおいて抑制されるべき遺伝子のエピジェネティックな記憶媒体として機能していると言えるのではないだろうか。

本章では、PIWI-piRNA 複合体が、自己複製過程や分化途上、分化後などの各細胞状態依存的に、転移因子以外のタンパク質コード遺伝子を制御していることを見出すことに成功した。このように、本研究は多能性幹細胞システムにおける PIWI-piRNA 複合体に機能について新たな観点を与えるものと考えている。

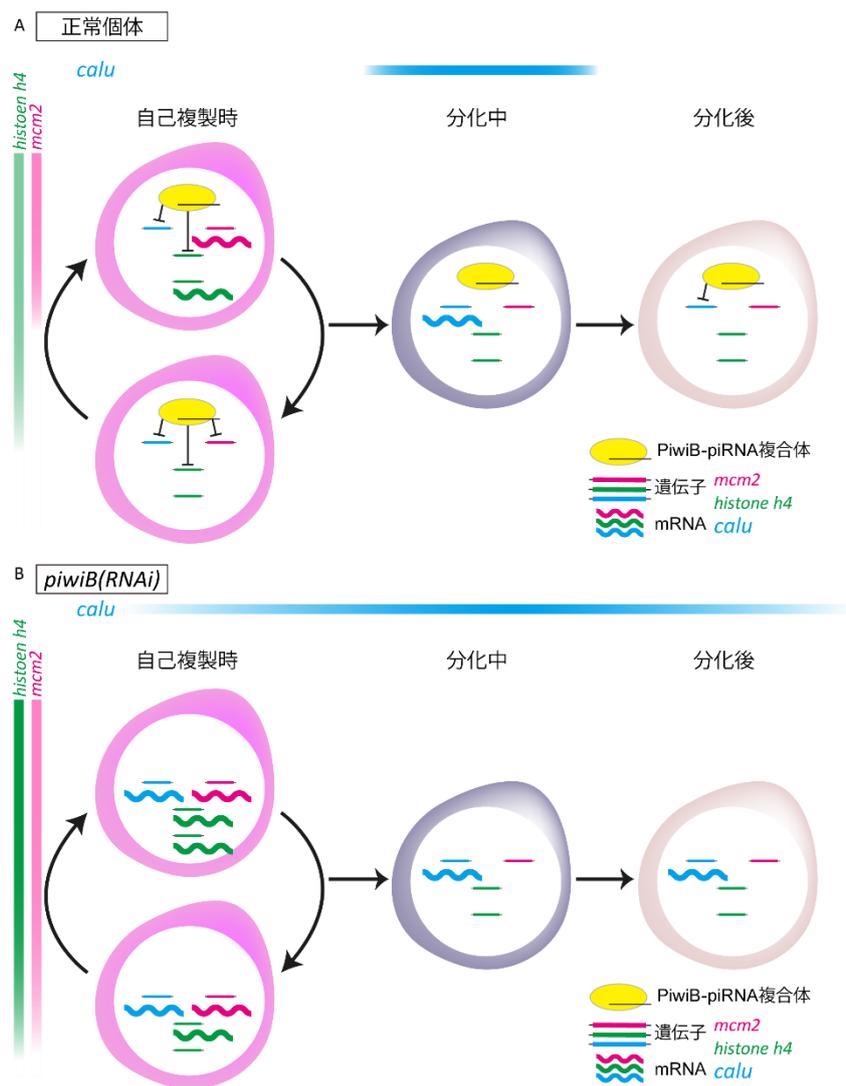


図 3-19 DjPiwiB-piRNA 複合体による遺伝子発現制御のモデル (A) 正常個体での各細胞状態における *Djmcm2*、*Djhistone h4*、*Djcalu* の発現を示している。(B) *DjpiwiB* 機能阻害個体での各細胞状態における *Djmcm2*、*Djhistone h4*、*Djcalu* の発現を示している。DjPiwiB の喪失によって、普段遺伝子発現が見られない細胞で異所発現が起こる。

第四章 細胞質 PIWI ファミリータンパク質による転移因子の

抑制

序論

新生細胞の形態的特徴として、クロマトイド小体が知られている。クロマトイド小体は新生細胞と分化中の細胞の細胞質に見られる膜構造を持たない高電子密度構造体であり、RNA-タンパク質複合体であると考えられている(Auladell et al., 1993; Coward, 1974; Hori, 1982)。また、クロマトイド小体は、他の生物の生殖細胞で観察される生殖顆粒に似た形態的特徴を持っている(Gao and Arkov, 2013; Hori, 1982; Shibata et al., 2010; Voronina et al., 2011)。生殖顆粒は PIWI などの RNA 結合タンパク質や Tudor ドメインを含むタンパク質、そして RNA を含む高電子密度構造体であることが知られている(Gao and Arkov, 2013)。次世代を担う生殖細胞における生殖顆粒が担う重要な役割として、転移因子の抑制を介したゲノム統合性の維持があげられる。例えば、マウスの pi 小体や piP 小体、ショウジョウバエの Yb 小体などの生殖顆粒に局在する PIWI が転移因子の抑制に関与していることが報告されている(Aravin et al., 2008; Murota et al., 2014; Qi et al., 2011; Siomi et al., 2011)。

クロマトイド小体と生殖顆粒の類似性に注目した免疫電子顕微鏡観察を用いた先行研究によって、クロマトイド小体の構成タンパク質として、プラナリアの

Me31B/Dhh1/RCK/p54 相同タンパク質である DjCBC-1 (*Dugesia japonica* Chromatoid-Body-Component-1)を同定した(Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。
また、近年、Rouhana らによって、対称性メチル化アルギニン (sDMA) を認識する Y12 抗体が、*Schmidtea mediterranea* の新生細胞内でクロマトイド小体に結合することが免疫電子顕微鏡を用いて示された(Rouhana et al., 2012)。
さらに、ウェスタンブロッティングにおいて Y12 抗体が SMEDWI-3 を認識することと、*smedwi-3* 機能阻害個体では、クロマトイド小体への *histone h4* の mRNA の局在が異常を示すことから、SMEDWI-3 がクロマトイド小体の構成タンパク質であることが示唆されていた(Rouhana et al., 2012, 2014)。しかし、SMEDWI-3 のクロマトイド小体への局在は直接的には示されておらず、また *histone h4* の mRNA のクロマトイド小体への局在を制御する以外の機能に関しては未知であった。

第四章では、SMEDWI-3 の *D. japonica* における相同タンパク質であり、第一章で細胞質の顆粒構造体への局在が示唆された DjPiwiC の機能を明らかにすることを旨とした。免疫染色の結果、DjPiwiC が、DjCBC-1 陽性クロマトイド小体ではなく、Y12 抗体免疫応答性クロマトイド小体に局在することが明らかとなった。また、*DjpiwiC* 機能阻害実験を通じて、DjPiwiB-piRNA 複合体による転移因子の抑制への DjPiwiC の寄与を示唆する結果を得たので報告する。

結果

S. mediterranea での報告と一致して(Rouhana et al., 2012)、新生細胞 (DjPiwiA 陽性細胞) の細胞質特異的に、Y12 抗体の顆粒状のシグナルが観察され (図 4-1A)、*D. japonica* においても Y12 抗体がクロマトイド小体を認識していることを支持する結果を得た。次に、第一章で報告した DjPiwiC が局在する顆粒構造が Y12 抗体によって認識されるクロマトイド小体であるかを検証するために、Y12 抗体と抗 DjPiwiC 抗体を用いたホールマウント免疫共染色を行い、ほぼすべての Y12 抗体の顆粒状のシグナルが抗 DjPiwiC 抗体の強いシグナルと一致することを見出した (図 4-1B、C)。ただし、前述のように抗 DjPiwiC 抗体の弱いシグナルは新生細胞の細胞質の広範囲に検出された (図 4-1B、C)。定量化したところ、全体として 89%の顆粒状のシグナルは両方のシグナル陽性であった (図 4-1D)。また、Y12 抗体が DjPiwiC を認識しているのか確認するために、ウエスタンブロッティングを行った。*DjpiwiCRNAi* によって、DjPiwiA の減少は確認されない一方で、DjPiwiC は減少していた (図 4-1E)。また、Y12 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって、Y12 抗体は複数の *D. japonica* のタンパク質を認識していることが示された (図 4-1F)。そして、*DjpiwiC* 機能阻害個体では、*S. mediterranea* を用いた先行研究と一致して (Rouhana et al., 2012)、分子量から DjPiwiC と予測されるバンドが劇的に減少

していた（図 4-1F）。これら結果は、SMEDWI-3 の sDMA 同様に(Rouhana et al., 2012)、DjPiwiC の sDMA(対称性メチル化アルギニン)が Y12 抗体によって認識されていることに加えて、DjPiwiC が Y12 抗体免疫応答性クロマトイド小体に局在することを示唆している。

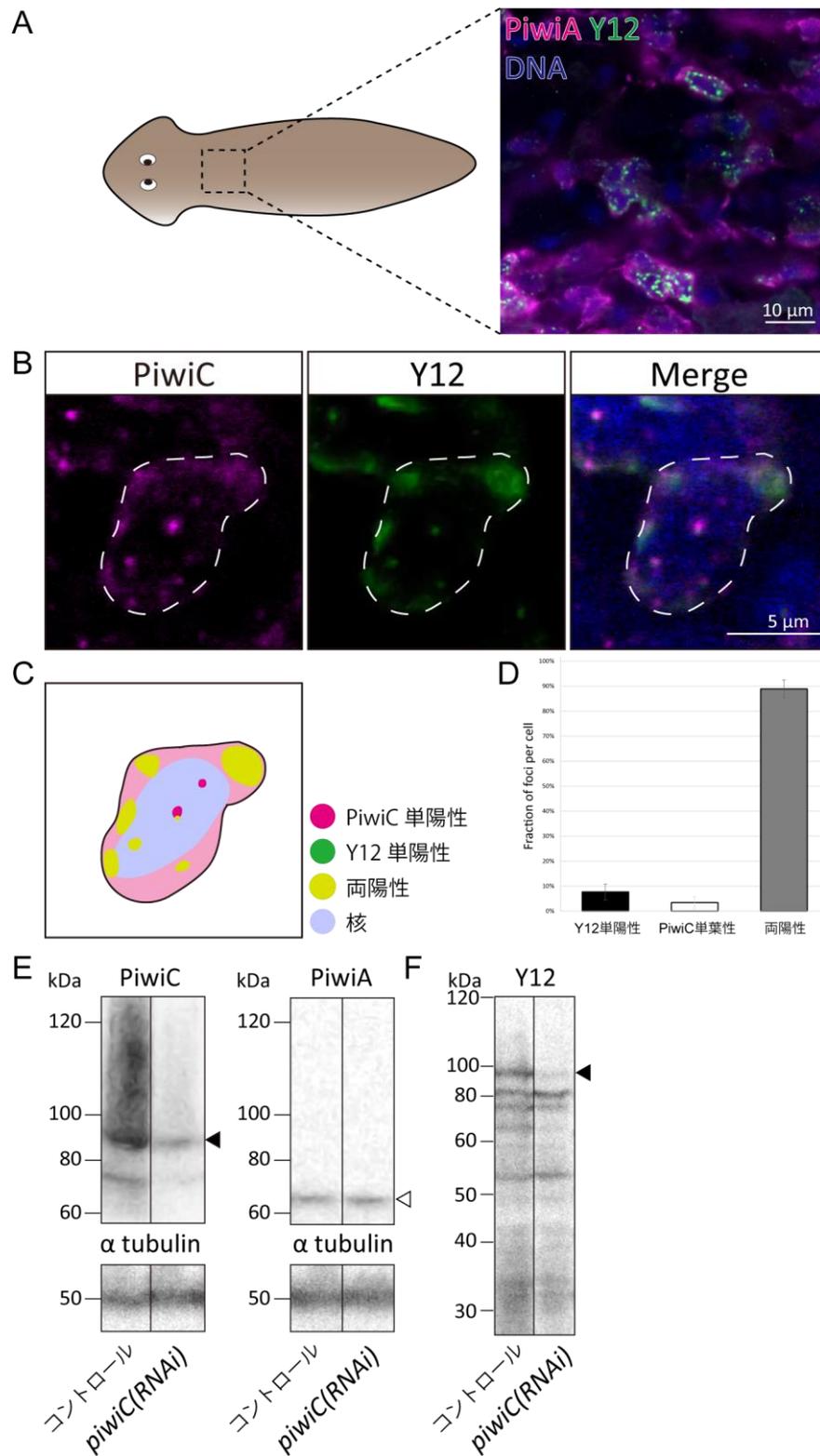


図 4-1 (A) 抗DjPiwiA抗体（マゼンタ）とY12抗体（緑）を用いたホールマウ

ント免疫共染色。Hoechst 33342 染色（青）。(B) 抗 DjPiwiC 抗体（マゼンタ）と Y12 抗体（緑）を用いたホールマウント免疫共染色。Hoechst 33342 染色（青）。(C) B の細胞の模式図。(D) 22 個の新生細胞における Y12 抗体単陽性顆粒、DjPiwiC 単陽性顆粒、両陽性顆粒の数。(E) 抗 DjPiwiC 抗体あるいは抗 DjPiwiA 抗体を用いた、コントロール個体と *DjpiwiC* 機能阻害個体のウエスタンブロッティング。 α tubulin はインターナルコントロール。黒矢尻は DjPiwiC の予測分子量の位置を、白矢尻は DjPiwiA の予測分子量の位置を表している。(F) Y12 抗体を用いた、コントロール個体と *DjpiwiC* 機能阻害個体のウエスタンブロッティング。黒矢尻は DjPiwiC の予測分子量の位置を表している。スケールバー：10 μ m (A) 、5 μ m (B)。エラーバーは標準誤差を表している。

次に、先行研究で報告されている DjCBC-1 陽性クロマトイド小体(Yoshida-Kashikawa et al., 2007)と Y12 抗体免疫応答性クロマトイド小体が同一のクロマトイド小体であるのか異なるクロマトイド小体であるのかを検証するために、抗 DjCBC-1 抗体と Y12 抗体を用いたホールマウント免疫共染色を行った。先行研究での結果と一致して、DjCBC-1 の弱いシグナルは細胞質に広がって観察された一方で、顆粒状の強いシグナルが観察された（図 4-2A）。DjCBC-1 のシグナルと Y12 のシグナルは基本的には重なっていなかった（図 4-2A、B）。定量

化したところ、41%が DjCBC-1 単陽性、49%が Y12 単陽性、そして、わずか10%が両陽性であった (図 4-2C)。この結果から、基本的には DjPiwiC が局在する Y12 免疫応答性クロマトイド小体 (y/pCBs) と DjCBC-1 陽性クロマトイド小体 (cCBs) が異なる構造体であると結論づけた。

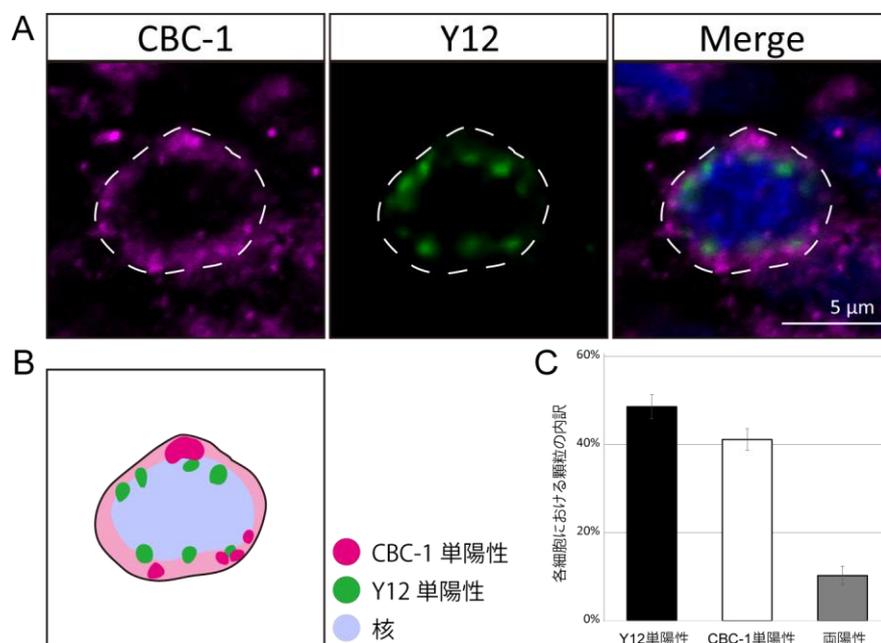


図 4-2 (A) 抗 DjCBC-1 抗体 (マゼンタ) と Y12 抗体 (緑) を用いたホールマウント免疫共染色。Hoechst 33342 染色 (青)。(B) B の細胞の模式図。(C) 22 個の新生細胞における DjCBC-1 単陽性顆粒、Y12 抗体単陽性顆粒、両陽性顆粒の数。スケールバー: 5 μm。エラーバーは標準誤差を表している。

***gypsy-P1* のアンチセンス鎖 RNA は新生細胞で発現している**

ショウジョウバエでは、一次 piRNA は *flam* などの piRNA クラスターに由来する長鎖一本鎖 RNA から産生される (図 0-2) (Iwasaki et al., 2015)。例えば、*flam* の転写産物には *gypsy* などの転移因子の配列がアンチセンス方向に存在している (図 0-5) (Zanni et al., 2013)。*flam* RNA は Flam 小体と呼ばれる顆粒構造体の構成要素であり、Yb 小体に受け渡され、piRNA へと加工されていく (図 0-2) (Nishida et al., 2014)。これらの知見から、プラナリアにおいても転移因子のアンチセンス鎖 RNA を用いて PIWI による転移因子の抑制が行われているのではないかと推測した。この可能性を検証するために、第二章で同定された *gypsy-P1* のアンチセンス鎖 RNA の発現をホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた。第二章で得られた結果と一致して、*gypsy-P1* の発現は正常個体では検出されなかった (図 4-3A-D)。対照的に、*gypsy-P1* のアンチセンス鎖 RNA (*as-gypsy-P1*) の発現は弱いものの明瞭に検出された (図 4-3E)。*as-gypsy-P1* の発現パターンは DjPiwiC の免疫染色によって可視化された新生細胞の分布に似たものであった (図 4-3E-G)。高倍率で観察してみると、*as-gypsy-P1* のシグナルは DjPiwiC 陽性の新生細胞で観察された (図 4-3H)。*as-gypsy-P1* のシグナルの特異性を検証するために、二本鎖 RNA を用いて機能阻害を行い、*gypsy-P1* のセンス鎖 RNA プローブを用いてホール

マウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*gypsy-P1* 機能阻害個体（図中では *gypsy-P1(RNAi)*）では、*as-gypsy-P1* のシグナルは検出されず（図 4-3I-L）、プローブの特異性が示された。よって、*D. japonica* の新生細胞では *as-gypsy-P1* が発現していると結論づけた。

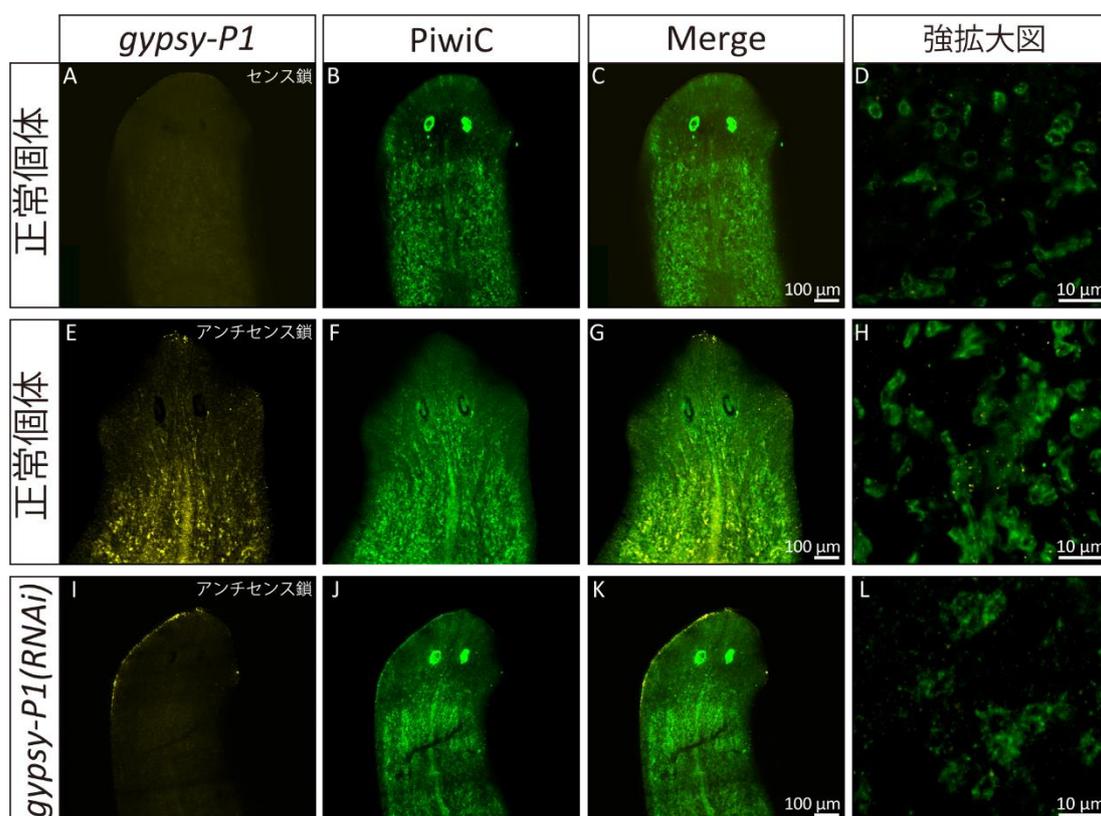


図 4-3 (A-H) 正常個体。(I-L) 2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目 (7 dpf) の *gypsy-P1* 機能阻害個体。(A) *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (黄)。(E, I) *as-gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (黄)。(B, F, J) 抗 DjPiwiC 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (緑)。(C) A と B の重ね合わせ図。(G) E と F の重ね合わせ図。(K) I と J の

重ね合わせ図。(D) C の強拡大図。(H) G の強拡大図。(L) K の強拡大図。スケールバー：100 μm (C、G、K)、10 μm (D、H、L)。

***gypsy-P1* アンチセンス鎖 RNA は新生細胞内の顆粒構造に存在する**

次に、*as-gypsy-P1* の細胞内局在を調べるために、*as-gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション及び Y12 抗体を用いたホールマウント免疫染色を行った。*as-gypsy-P1* は新生細胞において、ショウジョウバエの Flam 小体内の *flam* RNA のように、基本的には細胞質に存在する顆粒状のシグナルとして観察され、y/pCB(DjPiwiC が局在する Y12 免疫応答性クロマトイド小体)と隣接あるいは y/pCB 内に存在する傾向が確認された (図 4-4A)。*as-gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション及び抗 DjPiwiC 抗体を用いたホールマウント免疫染色でも同様の観察結果が得られた (図 4-4B)。全 *as-gypsy-P1* 陽性顆粒のうち、15%は y/pCB と共局在し、28%が y/pCB に隣接していた (図 4-4C)。これらの結果は *as-gypsy-P1* 陽性顆粒と y/pCB が何らかの関係を持っていることを示唆している。

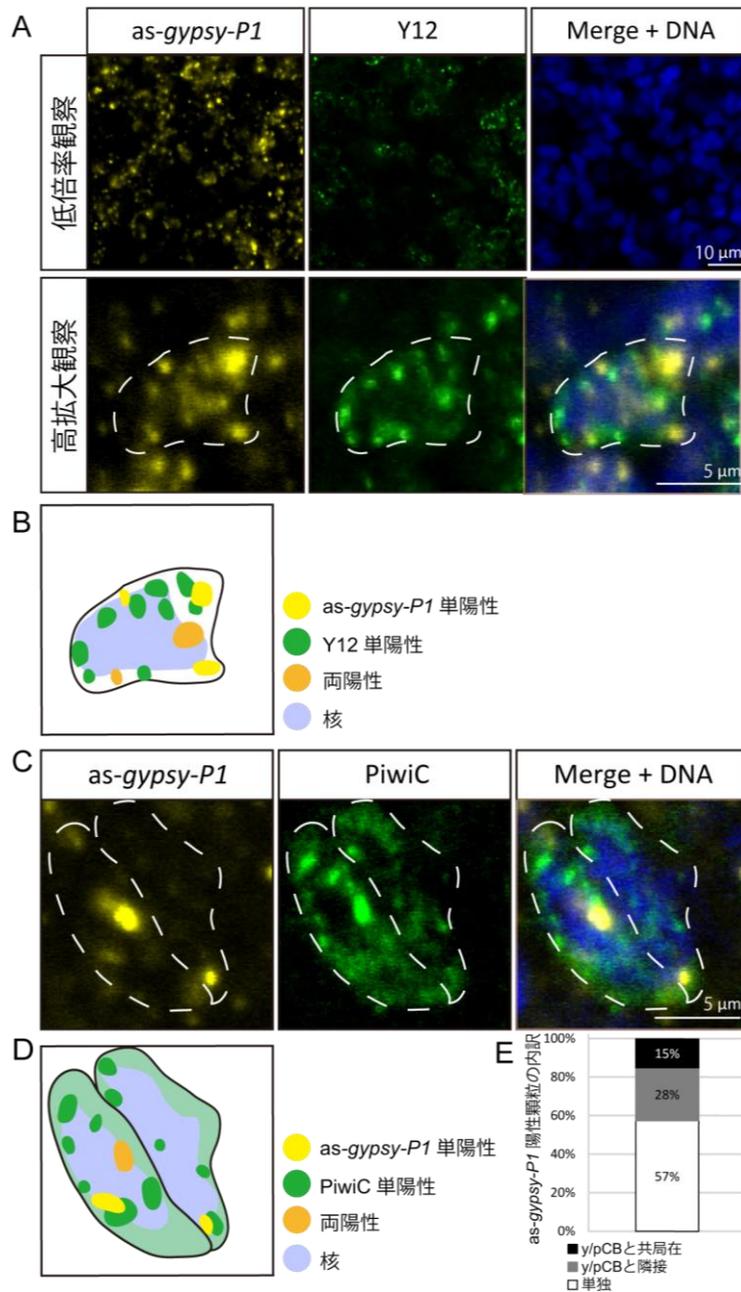


図 4-4 (A) *as-gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (黄) と Y12 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (緑)。Hoechst 33342 染色 (青)。(B) A の模式図 (C) *as-gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (黄) と抗 DjPiwiC 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (緑)。Hoechst 33342 染色 (青)。(D) C の模式図。(E) y/pCB との位置関係に

基づく *as-gypsy-P1* 陽性顆粒の内訳。スケールバー：10 μm (A 上段)、5 μm (A 下段、B)。

また、*y/pCB* の場合と同様に、*cCB*(*CBC-1* 単陽性クロマトイド小体)と *as-gypsy-P1* 陽性顆粒の関係についても調べた (図 4-5)。全 *as-gypsy-P1* 陽性顆粒のうち、10%は *cCB* と共局在し、18%が *cCB* に隣接しており (図 4-5C)、*y/pCB* は *cCB* よりも *as-gypsy-P1* 陽性顆粒の近傍に存在する傾向が示唆された。

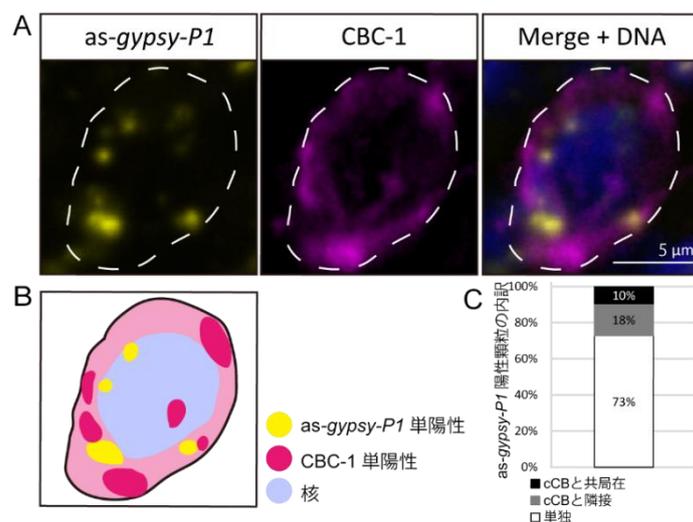


図 4-5 (A) *as-gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (黄) と抗 *DjCBC-1* 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (マゼンタ)。Hoechst 33342 染色 (青)。(B) A の模式図。(C) *cCB* との位置関係に基づく *as-gypsy-P1* 陽性顆粒の内訳。スケールバー：5 μm。

***DjpiwiC*機能阻害は *gypsy-P1* の抑制解除を引きおこす**

次に、*DjPiwiC* と *gypsy-P1* の制御の関係性を調べるために、*DjpiwiC*機能阻害個体における *gypsy-P1* の発現をホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた。*as-gypsy-P1* の発現には変化が見られない一方で、*DjpiwiB*機能阻害個体と同様に、*gypsy-P1* の発現が *DjpiwiC*機能阻害個体で検出された (図 4-6A)。定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) を用いて、*DjpiwiC*機能阻害個体における *gypsy-P1* の発現量を調べると、コントロール個体と比べて 3.5 倍に発現量が増加していた (図 4-6B)。一方で、*Djcbc-1*機能阻害個体では、*gypsy-P1* の発現量の増加は観察されず (図 4-6B)、*y/pCB* と *cCB* が異なる機能を担っていることを示唆する結果を得た。驚くべきことに、*DjpiwiC*機能阻害個体における *gypsy-P1* 陽性の細胞は *DjPiwiC* が発現している *DjPiwiA* 陽性細胞ではなく、*DjPiwiA* 陰性の細胞であった (図 4-6C)。このことから、*DjpiwiC*機能阻害個体においても *DjpiwiB*機能阻害個体同様に、*gypsy-P1* の抑制解除が新生細胞以外の細胞、おそらく分化中の細胞で起こることが示唆された。

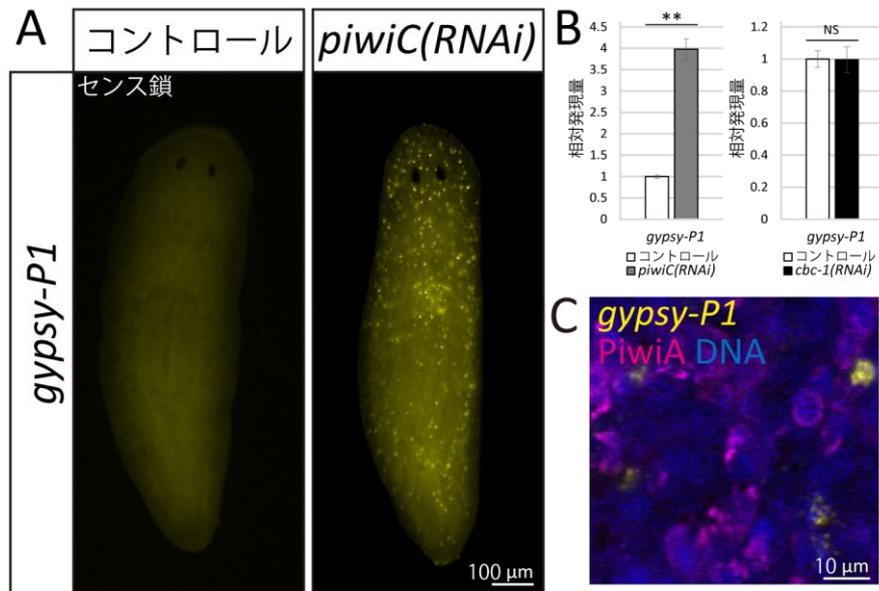


図 4-6 (A) 2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目 (7 dpf) の コントロール個体と *DjpiwiC*機能阻害個体の *gypsy-P1*のホールマウント蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション (黄) (B) 7 dpf コントロール個体と *DjpiwiC*機能阻害個体、*Djcbc-1*機能阻害個体における *gypsy-P1*の発現量。(C) A の強拡大図。抗 *DjPiwiA* 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (マゼンタ)。Hoechst 33342 染色 (青)。スケールバー : 100 μ m (A)、10 μ m (B)。** : $p < 0.01$ (t 検定)。NS は統計的有意差がないことを示している。エラーバーは標準誤差を表している。

DjPiwiC は DjPiwiB による遺伝子発現制御に重要である

では、新生細胞で発現する DjPiwiC はどのようにして *gypsy-P1* の抑制に関与しているのでしょうか？興味深いことに、*DjpiwiC* 機能阻害個体における DjPiwiB のホールマウント免疫染色を行ったところ、*gypsy-P1* 発現細胞のうち、約半数が DjPiwiB 陰性であった一方で、残りは DjPiwiB 陽性細胞であった（図 4-7A、B）。このことから、*DjpiwiC* 機能阻害個体では *gypsy-P1* は DjPiwiB によって抑制されていないことが示唆された。また、第二章及び第三章で同定された他の DjPiwiB-piRNA 複合体標的遺伝子の *DjpiwiC* 機能阻害個体における発現量を調べたところ、*DjpiwiB* の発現量に変化がないにもかかわらず、*polinton-P1* を除くすべての転移因子でコントロール個体と比べて有意な発現量の上昇が確認された（図 4-7C）。一方で、転移因子以外のタンパク質コード遺伝子に関しては、*Djhistone h4* を除いて、発現量の上昇は見られなかった（図 4-7C）。これらの結果から、DjPiwiB-piRNA 複合体標的遺伝子の制御には DjPiwiC 依存的なものと非依存的なものが存在することを示唆された。

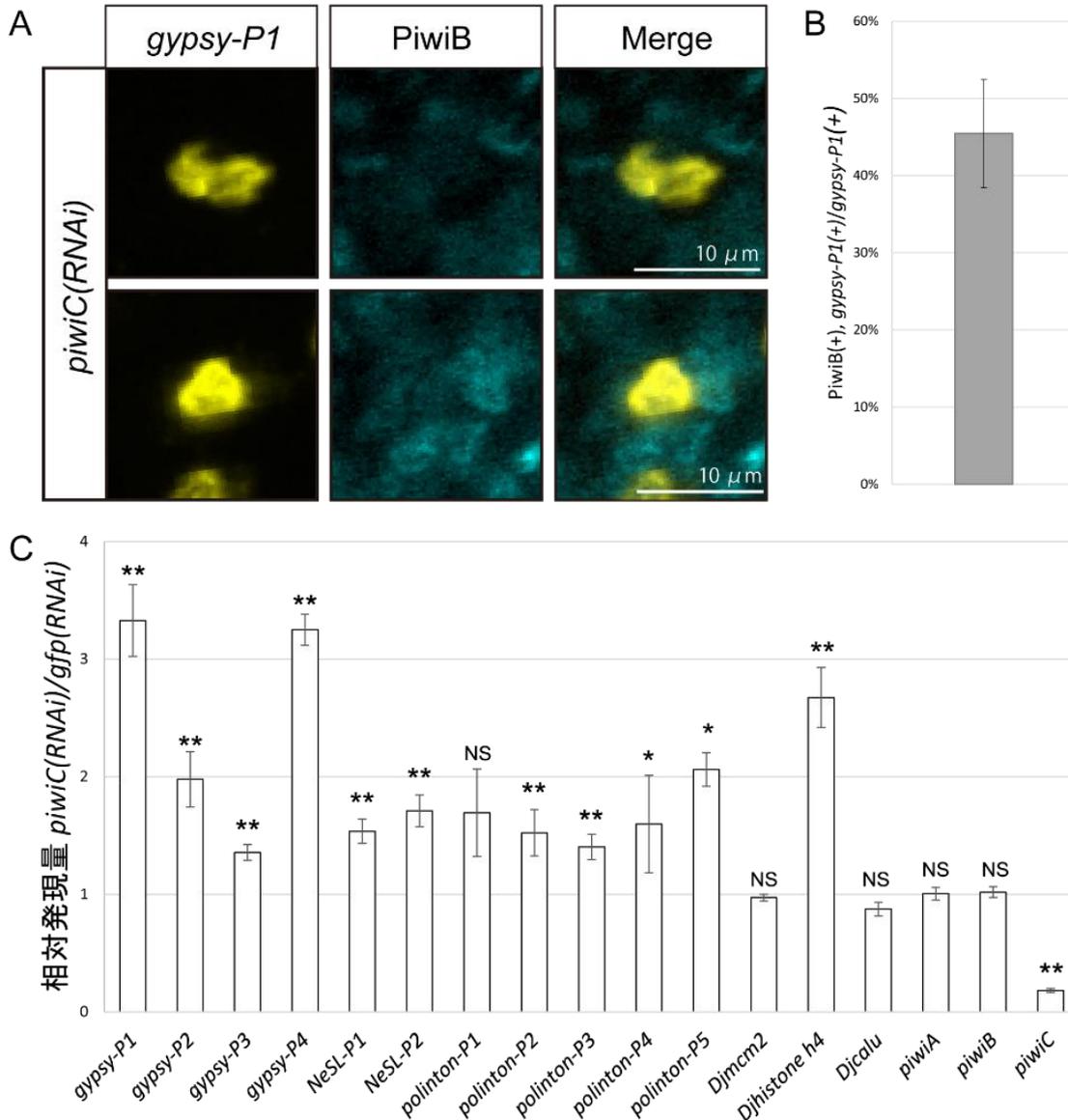


図 4-7 (A) 2 回目の摂餌 RNAi から 7 日目 (7 dpf) の *DjpiwiC* 機能阻害個体の *gypsy-P1* のホールマウント蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (黄) と抗 DjPiwiB 抗体を用いたホールマウント免疫染色 (シアン)。上段は DjPiwiB 陰性の細胞。下段は DjPiwiB 陽性の細胞。(B) 7 dpf *DjpiwiC* 機能阻害個体における *gypsy-P1* 発現細胞の内 DjPiwiB 陽性細胞の割合。(C) 7 dpf コントロール個体と *DjpiwiC* 機能阻害個体における DjPiwiB 標的遺伝子の発現量。スケールバー:

10 μm 。 ** : $p < 0.01$ (t 検定)。 * : $p < 0.05$ (t 検定)。 NS は統計的有意差がないことを示している。 エラーバーは標準誤差を表している。

考察

Y12 抗体は新生細胞のクロマトイド小体内の DjPiwiC の対称性メチル化アルギニンを認識する

S. mediterranea においては、Y12 抗体が sDMA-SMEDWI-3 や他の sDNA を持つタンパク質を認識することが、ウエスタンブロッティングを用いて示されている(Rouhana et al., 2012)。ショウジョウバエでは、PIWI ファミリータンパク質の sDMA はアルギニンメチル基転移酵素である DmPRMT5 によって付加され、sDMA が piRNA の生合成に関わる Tudor ドメインを持つタンパク質との結合に必須であることが知られている(Kirino et al., 2009; Liu and Paroo, 2010; Nishida et al., 2009; Siomi et al., 2010, 2011; Vagin et al., 2009)。 *S. mediterranea* においても、PRMT5 の相同遺伝子が SMEDWI-3 の sDMA を制御していると考えられている(Rouhana et al., 2012)。本研究では、Y12 抗体と抗 DjPiwiC 抗体を用いたホールマウント免疫染色を行い、2 つの抗体の顆粒状のシグナルが重なり合うことを見出した(図 4-1B-D)。また、ウエスタンブロッティングによって、Y12 抗体によって認識される DjPiwiC に相当するバンドが、*DjpiwiC* RNAi によって減少することを示し(図 4-1F)、Y12 抗体が DjPiwiC を認識していることを明らかにした。DjPiwiC のアミノ酸配列中には、SMEDWI-3 同様に、GRGR や GRGRG といった sDMA を受けうる配列が含ま

れており (図 4-8) (Hayashi et al., 2010; Rouhana et al., 2012)、この配列中のアルギニンがメチル化されたのち Y12 抗体によって認識されていると考えられる。以上のことから、DjPiwiC は Y12 抗体免疫応答性クロマトイド小体 (y/pCB) の構成タンパク質であると結論づけることができた。

```

MSGSSGI GRGRSRGLLMQKFLNKDVPVPSVESLEDKALNKLGI PPPGSTTEKTTESSSISSGDSSSKLKL 70
QDSDIENKNITIVKRPLSCI GRGRGLSNPSSLATSSGQSDKIAEIDETNQVKKVI GRGRGLLSSQKECSN 140
STPSEISNELKDLKLSNDDKMTVSSVEDKSFENSEKPTTSKFRRREHPTQIKEACNTRNDQSPSIIILSA 210
NYVKVYTTQPHIYQYHVSAFPTIDSRLMRIKIVQGLSEDQLGVVKEARAFDGMNLYIPGQLKKNKETVIKV 280
NKPTDNTSVDVKIVFTNNVNFSECPMVYNVLFKRIENSLRMVKIGRDYFYPEKKIVLDRRMEIWPGYVT 350
SIQNFDDGLLLQCDVSHKVI RNDSVYDIMMEINKSVNNKGQMQTAAINQLLGQIVLTPHNRRNYRITDID 420
WTKNCLSEFDKSGEKISYRDYFKNTYGLQIRDLEQPLIVSKSNSRGPGRKGSKDADGGLVYLIPELCML 490
TGLTDDMIKDFRLMRELHEHCRVTPKKRHEALLEFVDNIYNCEEANKLLGYWGITIEKDTVNIKACKMNP 560
EMIFYGNEASVSAGENAIEFKQALAHNRVIGIRIENWVLVAPKSLMTKANGLLQALMSKSPKIGVNF SKP 630
RIIEMNDRTEEYIKELKRNVTSSVQLVVTILSAVREDRYNAIKKHCVDCPVPSQVVLAQTLKEGPKLN 700
SVAVNIALQINAKLGGELWAVKIPIKFMVVGLDVWHDAK GRGRSVGAVVGSTNALCTRWF SKSHLQEHD 770
KEIVYVLQSCMLSLLKAYFEENNFLPDTIFMYRDGVSDGQLGYVQKTEIEQFFKVFESFSADYKPNMVYN 840
VVQKRINTRLYVSDPKNKGVNNPNPGTIVDHTVTRANLYDFFLVSVQSVRQGTVTPHYVVLCDNSRYTP 910
HQVQLMAYKTCHIYYNWPVTVRVPAPCMYAHKLAYMVGQNLKAEP SHLLCDRLFYL 966

```

図 4-8 DjPiwiC のアミノ酸配列。黄色は予測される sDMA の候補配列を示している。

***gypsy-P1* のアンチセンス鎖 RNA は新生細胞内に顆粒構造を形成している**

gypsy-P1 のアンチセンス鎖 RNA (*as-gypsy-P1*) が新生細胞で優位に発現していることを本研究では見出した (図 4-3)。*as-gypsy-P1* は新生細胞の細胞質中の顆粒構造に存在しており、y/pCBs と隣接あるいは共局在する傾向にあった (図 4-4)。

ショウジョウバエの卵胞由来体細胞 (OSC) では、*gypsy* の配列を複数含む *flamenco* 遺伝子 (*flam*) (Zanni et al., 2013) から *flam* RNA が転写され、piRNA に加工された後、DmPiwi に結合することで、核内での転移因子の抑制に寄与していることが知られている (Murota et al., 2014)。この過程で、*flam* RNA は Yb 小体の主要な構成タンパク質である Yb と結合し、Yb 小体に隣接する Flam 小体を形成する (Murota et al., 2014)。このことから、Flam 小体は piRNA の生合成に重要であると考えられている。

今回、*D. japonica* で観察された顆粒構造を形成する *as-gypsy-P1* RNA がゲノム中の *gypsy-P1* それ自体に由来するのか、あるいはショウジョウバエの *flam* のような *gypsy-P1* の配列を含む別の遺伝子座に由来するのかは、未だ不明である。しかし、本研究で得られた知見から、ショウジョウバエで見られる piRNA の生合成経路と似た仕組みで、プラナリア新生細胞においても piRNA 産生が行

われている可能性が示唆された。

Y12 免疫応答性クロマトイド小体の機能

本研究では、構成タンパク質の違いから、新生細胞には少なくとも 2 種類のクロマトイド小体 (cCB、y/pCB) が存在することを示した。cCB は、構成タンパク質である DjCBC-1 の他の生物における相同タンパク質の機能から、mRNA の翻訳の制御や RNA の輸送を行っていると考えられている (Agata and Watanabe, 1999; Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。一方で、y/pCB の主な機能の一つは piRNA の生合成であると考えられる。ショウジョウバエの生殖細胞では ping-pong 経路を介して、転移因子の転写後抑制と piRNA の生合成が PIWI によって行われており、DmAgo3 と DmAub の細胞内局在からこれらの機能は RNA-タンパク質複合体である nuage で行われていると考えられている (Brennecke et al., 2007)。また、ショウジョウバエの OSC では RNA-タンパク質複合体である Yb 小体が piRNA の生合成と転移因子の抑制に重要であることが明らかになっている (Murota et al., 2014; Saito et al., 2010)。マウスの始原生殖細胞においても、RNA-タンパク質複合体と考えられている pi 小体と piP 小体において、転移因子の抑制と核 PIWI と結合する piRNA の生合成が行われている (Aravin et al., 2008; Ishizu et al., 2011)。これらの事実は、RNA-タンパク

質複合体は piRNA の生合成や転移因子の抑制に重要であること示唆している。実際、プラナリアの新生細胞では、DjPiwiC は y/pCB に局在していた (図 4-1)。また、as-*gypsy-P1* 陽性顆粒は y/pCB に隣接あるいは共局在する傾向があった (図 4-4A-E)。そして、*DjpiwiC* 機能阻害個体では *gypsy-P1* の抑制の解除が DjPiwiB 陽性細胞でも起こっていた (図 4-6,7)。さらに、DjPiwiB-piRNA 複合体の標的遺伝子として同定されたほとんどすべての転移因子の発現が、*DjpiwiC* 機能阻害個体で上昇していた (図 4-7C)。加えて、*S. mediterranea* において、*smedwi-3* を機能阻害すると、piRNA と予測される小分子 RNA が減少することから、SMEDWI-3 は piRNA 産生において重要な役割を担っていると考えられている (Palakodeti et al., 2008)。以上を踏まえると、y/pCB の主な機能は、おそらく転移因子のアンチセンス鎖 RNA からの DjPiwiB 結合 piRNA 産生を介した、転移因子の抑制であると考えられる (図 4-9)。

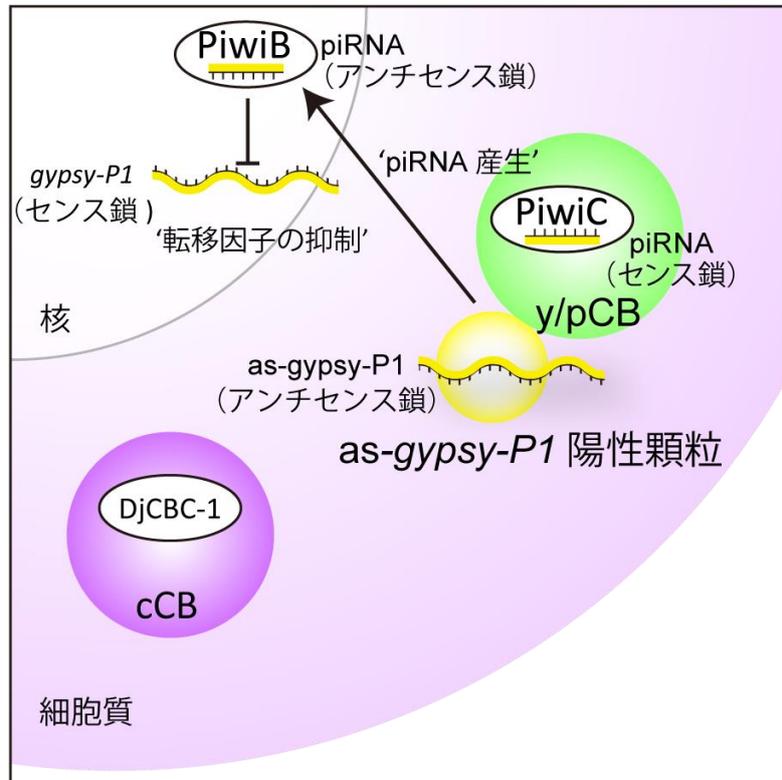


図 4-9 Y12 抗体免疫応答性クロマトイド小体 (y/pCB) の機能モデル。y/pCB は DjCBC-1 陽性クロマトイド小体とは異なる構造体である。y/pCB に局在する DjPiwiC を介して、as-gypsy-P1 陽性顆粒に存在する転移因子のアンチセンス鎖 RNA から DjPiwiB 結合 piRNA が産生され、DjPiwiB-piRNA 複合体によって転移因子が抑制されると考えられる。

一方で、*S. mediterranea* において、*histone* RNA の y/pCB への局在が近年

報告されている(Rouhana et al., 2014)。この先行研究では、*histone* RNA に一致する小分子 RNA の存在とともに、*histone* RNA の局在制御への SMESWI-1 と SMEDWI-3 の関与が示され、クロマトイド小体における PIWI の多様な機能が示唆されている。DjPiwiA は、CB には局在することなく、新生細胞の細胞質に偏在している(Shibata et al., 2010; Yoshida-Kashikawa et al., 2007)。そのため、DjPiwiA と DjPiwiC は細胞質の広範囲で共局在しており、おそらく何らかの物理的な相互作用を伴って、piRNA の産生や *histone* RNA の局在の制御に 2 種類の細胞質 PIWI は関与していると考えられる。

smewi-1 と *smewi-3* を同時に機能阻害すると、*histone h4* のクロマトイド小体への局在が乱れるとともに、発現量が上昇することが報告されている(Rouhana et al., 2014)。それらのことから、本研究で観察された *DjpiwiC* 機能阻害個体での *Djhistone h4* の発現量の増加は、*Djhistone h4* のクロマトイド小体への局在の異常によって、DjPiwiB 非依存的に引き起こされた可能性が高い。もしそうであるとするならば、DjPiwiB-piRNA 複合体による（少なくとも本研究で同定された）転移因子以外のタンパク質コード遺伝子の制御は DjPiwiC 非依存的であることになる。転移因子とそれ以外の遺伝子で、DjPiwiC の依存性に違いが見られるのは非常に興味深い。DjPiwiC による piRNA の産生を介するメリットは、ping-pong 経路を介した piRNA の増幅が行われることであると考

えられる。特定の細胞状態で適切に発現しなければならないタンパク質コード遺伝子とは異なり、転移因子は、ゲノム統合性を維持するために、常に抑制されなければならない。そのために、y/pCB に局在する DjPiwiC は ping-pong 経路を通じて、実際に転写されている転移因子の量に応じて piRNA を産生することで、効率的な DjPiwiB による転移因子の抑制を実現しているのではないだろうか。今後、*DjpiwiC* 機能阻害が与える DjPiwiB 結合 piRNA への影響を調べることで、y/pCB の機能がさらに明らかになることが期待できる。加えて、y/pCB や *gypsy-P1* 陽性顆粒の機能を理解する為に、それらに局在する新規タンパク質や RNA を同定が求められる。

結章

本研究では、多能性幹細胞における PIWI の機能を明らかにするために、プラナリアの多能性幹細胞システムにおける PIWI の機能の解明を目指した。結論として、プラナリアの多能性幹細胞システムにおける PIWI による遺伝子制御機構とショウジョウバエの生殖線などで見られる PIWI による遺伝子制御機構には下記のような類似性が存在することが示唆された。

1. 次世代を残すために重要な細胞（有性生殖における生殖細胞と無性生殖における多能性幹細胞）で機能している点（第一章）（Juliano et al., 2011; Siomi et al., 2011）。
2. 1 種類の核 PIWI と 2 種類の細胞質 PIWI による「共同型」の遺伝子制御機構と 1 種類の核 PIWI による「単独型」の遺伝子制御機構が存在する点（第一章、第四章）（Brennecke et al., 2007）。
3. PIWI は転移因子の抑制にかかわる点（第二章）（Siomi et al., 2011）。
4. 転移因子の制御に関わる piRNA の産生に細胞質の顆粒構造が関わっている点（第四章）（Iwasaki et al., 2015）。

一方で、類似性だけでなく、核 PIWI が細胞分化の過程で分解されずに保持さ

れていくという多能性幹細胞システム特異的な点も本研究は明らかにした。最近の先行研究によって、ショウジョウバエの受精卵から初期胚（生殖細胞から体細胞）にかけての母性 PIWI の保持が報告されており (Mani et al., 2014)、その生物学的意義の共通項と差異を明らかにすることは今後の課題の一つである。

また、DjPiwiB 結合 piRNA の解析から、DjPiwiB は転移因子の抑制のみならずその他のタンパク質コード遺伝子の制御も行っていることが明らかとなった。様々な生物で piRNA の解析から、PIWI による転移因子以外のタンパク質コード遺伝子制御の可能性は示唆されていたが (Lim et al., 2014; Zhou et al., 2015)、実際の報告例は少なく、特に多能性幹細胞においては細胞質 PIWI の標的として *histone h4* が同定されていたのみであった (Rouhana et al., 2014)。第三章では、DjPiwiB の標的タンパク質コード遺伝子として、*Djhistone h4* を含む 3 種類の遺伝子を同定した。興味深いことに、これら 3 つの遺伝子は *calumenin* を含めて (Honoré and Vorum, 2000)、動物界で非常に保存された遺伝子である。また、これらの遺伝子に一致する piRNA がショウジョウバエやマウスでも存在していた (図 3-17)。これらに加えて、前述した多能性幹細胞システムにおける PIWI と生殖細胞における PIWI の類似性を考慮すると、この 3 種類の遺伝子は、プラナリア多能性幹細胞システム特異的な標的ではなく、他の生物の多能性幹細胞システムやあるいは生殖細胞においても、共通の標的遺伝子であること

は十分に考えられる。実際、マウスの生殖細胞において、*mcm2* や *histone h4* の制御への MIWI2 の関与を示唆する結果が存在しており (図 3-18)、その可能性が強く示唆されている。

以上のように、本研究は多能性幹細胞システムと生殖細胞での保存された PIWI の機能を明らかにしただけでなく、多能性幹細胞システムにおける PIWI の新たな知見は生殖細胞や他の体細胞での PIWI の機能を理解するうえで、新たな着眼点を与えうるものであると考えている。

参考文献

- Agata, K. (2003). Regeneration and gene regulation in planarians. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 492–496.
- Agata, K., and Watanabe, K. (1999). Molecular and cellular aspects of planarian regeneration. *Cell Dev. Biol.* *10*, 377–383.
- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y., and Watanabe, K. (1998). Structure of the Planarian Central Nervous System (CNS) Revealed by Neuronal Cell Markers. *Zoolog. Sci.* *15*, 433–440.
- Agata, K., Nakajima, E., Funayama, N., Shibata, N., Saito, Y., and Umesono, Y. (2006). Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *17*, 503–509.
- Alié, A., Leclère, L., Jager, M., Dayraud, C., Chang, P., Le Guyader, H., Quéinnec, E., and Manuel, M. (2011). Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore: Ancient association of “germline genes” with stemness. *Dev. Biol.* *350*, 183–197.
- Alié, A., Hayashi, T., Sugimura, I., Manuel, M., Sugano, W., Mano, A., Satoh, N., Agata, K., and Funayama, N. (2015). The ancestral gene repertoire of animal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201514789.

Aravin, A. a, Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K., and Hannon, G.J. (2007). Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* *316*, 744–747.

Aravin, A. a., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Mol. Cell* *31*, 785–799.

Auladell, C., Garcia-Valero, J., and Baguna, J. (1993). Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique. *J. Morphol.* *216*, 319–326.

Baguna, J., Saló, E., and Auladell, C. (1989). Regeneration and pattern formation in planarians. III. that neoblasts are totipotent stem cells and the cells. *Development* *107*, 77–86.

Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 268–277.

BERRILL, N.J. (1947). The structure, development and budding of the

ascidian, *Eudistoma*. *J. Morphol.* *81*, 269–281.

Bode, H.R. (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell Sci.* *109* (Pt 6), 1155–1164.

Boeckmann, B. (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* *31*, 365–370.

Boland, M.J., Nazor, K.L., and Loring, J.F. (2014). Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ. Res.* *115*, 311–324.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* *30*, 2114–2120.

Brennecke, J., Aravin, A. a., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* *128*, 1089–1103.

Carmell, M. a., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc’his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Dev. Cell* *12*, 503–514.

Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, a. M., Parsi,

K.M., Breiling, A., Sardo, F. Lo, Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., et al.

(2011). Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature* *480*, 391–395.

Chen, Y.-C.A., and Aravin, A. a. (2015). Non-coding RNAs in Transcriptional Regulation. *Curr. Mol. Biol. Reports* 10–18.

Coward, S.J. (1974). Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behavior during mitosis. *Anat Rec* *180*, 533–545.

Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., and Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by. *Genes Dev.* 3715–3727.

Cox, D.N., Chao, a, and Lin, H. (2000). Piwi Encodes a Nucleoplasmic Factor Whose Activity Modulates the Number and Division Rate of Germline Stem Cells. *Development* *127*, 503–514.

Darricarrere, N., Liu, N., Watanabe, T., and Lin, H. (2013). Function of Piwi, a nuclear Piwi/Argonaute protein, is independent of its slicer activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 1297–1302.

Deng, W., Lin, H., and Carolina, N. (2002). miwi , a Murine Homolog of piwi , Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *2*, 819–

830.

Eisenhoffer, G.T., Kang, H., and Alvarado, A.S. (2008). Molecular Analysis of Stem Cells and Their Descendants during Cell Turnover and Regeneration in the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* *3*, 327–339.

Friedländer, M.R., Adamidi, C., Han, T., Lebedeva, S., Isenbarger, T. a, Hirst, M., Marra, M., Nusbaum, C., Lee, W.L., Jenkin, J.C., et al. (2009). High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11546–11551.

Frost, R.J.A., Hamra, F.K., Richardson, J.A., Qi, X., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2010). MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11847–11852.

Funayama, N. (2013). The stem cell system in demosponges: Suggested involvement of two types of cells: Archeocytes (active stem cells) and choanocytes (food-entrapping flagellated cells). *Dev. Genes Evol.* *223*, 23–38.

Funayama, N., Nakatsukasa, M., Mohri, K., Masuda, Y., and Agata, K. (2010). Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges:

insights into the stem cell system in demosponges. *Evol. Dev.* *12*, 275–287.

Gan, L., Schwengberg, S., and Denecke, B. (2014). Transcriptome analysis in cardiomyocyte-specific differentiation of murine embryonic stem cells reveals transcriptional regulation network. *Gene Expr. Patterns* *16*, 8–22.

Gao, M., and Arkov, A.L. (2013). Next generation organelles: Structure and role of germ granules in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* *80*, 610–623.

Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D. a, Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* *29*, 644–652.

Guo, T., Peters, A.H.F.M., and Newmark, P. a. (2006). A bruno-like Gene Is Required for Stem Cell Maintenance in Planarians. *Dev. Cell* *11*, 159–169.

Hasegawa, M., Kurata, M., Yamamoto, K., Yoshida, K., Aizawa, S., and Kitagawa, M. (2009). A novel role for acinus and MCM2 as host-specific signaling enhancers of DNA-damage-induced apoptosis in association with viral protein gp70. *Leuk. Res.* *33*, 1100–1107.

Hatem, A., Bozdağ, D., and Çatalyürek, Ü. V. (2011). Benchmarking short sequence mapping tools. *Proc. - 2011 IEEE Int. Conf. Bioinforma. Biomed.*

BIBM 2011 109–113.

Hayashi, R., Ishikawa, Y., Ito, M., Kageyama, T., Takashiba, K., Fujioka, T., Tsujikawa, M., Miyoshi, H., Yamato, M., Nakamura, Y., et al. (2012).

Generation of Corneal Epithelial Cells from Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Dermal Fibroblast and Corneal Limbal Epithelium. *PLoS One* 7, 1–10.

Hayashi, T., Asami, M., Higuchi, S., Shibata, N., and Agata, K. (2006).

Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Dev. Growth Differ.* 48, 371–380.

Hayashi, T., Shibata, N., Okumura, R., and Kudome, T. (2010). Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its “index sorting” function for stem cell research. 131–144.

Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M. a., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.

Henschel, R., Nista, P.M., Lieber, M., Haas, B.J., Wu, L.-S., and LeDuc, R.D.

(2012). Trinity RNA-Seq assembler performance optimization. Proc. 1st Conf. Extrem. Sci. Eng. Discov. Environ. Bridg. from Extrem. to Campus beyond - XSEDE '12 8.

Honoré, B., and Vorum, H. (2000). The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca²⁺-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett.* *466*, 11–18.

Hori, I. (1982). An Ultrastructural Study of the Chromatoid Body in Planarian Regenerative Cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* *31*, 63–72.

Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D. V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., et al.

(2007). A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish. *Cell* *129*, 69–82.

Houwing, S., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2008). Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J.* *27*, 2702–2711.

Imamura, T., Uesaka, M., and Nakashima, K. (2014). Epigenetic setting and reprogramming for neural cell fate determination and differentiation.

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *369*, 1652.

Ishizu, H., Nagao, A., and Siomi, H. (2011). Gatekeepers for Piwi-piRNA

complexes to enter the nucleus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 484–490.

Ito, H., Saito, Y., Watanabe, K., and Orii, H. (2001). Epimorphic regeneration of the distal part of the planarian pharynx. *Dev. Genes Evol.* *211*, 2–9.

Iwasaki, Y.W., Siomi, M.C., and Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 405–433.

Janic, A., Mendizabal, L., Llamazares, S., Rossell, D., and Gonzalez, C. (2010). Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in *Drosophila*. *Science* *330*, 1824–1827.

Janowski, B. a, Huffman, K.E., Schwartz, J.C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D.S., Minna, J.D., and Corey, D.R. (2006). Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 787–792.

Josien C. van Wolfswinkel, Daniel E. Wagner, and Reddien, P.W. (2014). Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell* *15*, 326–339.

Juliano, C., Wang, J., and Lin, H. (2011). Uniting Germline and Stem Cells: The Function of Piwi Proteins and the piRNA Pathway in Diverse

Organisms. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 447–469.

Juliano, C.E., Reich, A., Liu, N., Götzfried, J., Zhong, M., Uman, S., Reenan, R. a, Wessel, G.M., Steele, R.E., and Lin, H. (2014). PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs function in Hydra somatic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 337–342.

Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, a., Klonowski, P., Kohany, O., and Walichiewicz, J. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet. Genome Res.* *110*, 462–467.

Kalmykova, A.I., Klenov, M.S., and Gvozdev, V. a. (2005). Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2052–2059.

Kawaoka, S., Izumi, N., Katsuma, S., and Tomari, Y. (2011). 3' End Formation of PIWI-Interacting RNAs In Vitro. *Mol. Cell* *43*, 1015–1022.

Khurana, J.S., and Theurkauf, W. (2010). piRNAs, transposon silencing, and *Drosophila* germline development. *J. Cell Biol.* *191*, 905–913.

Khurana, J.S., Wang, J., Xu, J., Koppetsch, B.S., Thomson, T.C.,

Nowosielska, A., Li, C., Zamore, P.D., Weng, Z., and Theurkauf, W.E. (2011). Adaptation to P Element Transposon Invasion in *Drosophila*

melanogaster. *Cell* *147*, 1551–1563.

Kirino, Y., Kim, N., de Planell-Saguer, M., Khandros, E., Chiorean, S., Klein, P.S., Rigoutsos, I., Jongens, T. a, and Mourelatos, Z. (2009). Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat. Cell Biol.* *11*, 652–658.

Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Ishihara, G., Kawaoka, S., Sugano, S., Shimada, T., et al. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* *509*, 633–636.

Klattenhoff, C., Bratu, D.P., McGinnis-Schultz, N., Koppetsch, B.S., Cook, H. a., and Theurkauf, W.E. (2007). *Drosophila* rasiRNA Pathway Mutations Disrupt Embryonic Axis Specification through Activation of an ATR/Chk2 DNA Damage Response. *Dev. Cell* *12*, 45–55.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., et al. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* *131*, 839–849.

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A.,

Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* *22*, 908–917.

Lee, H.C., Gu, W., Shirayama, M., Youngman, E., Conte, D., and Mello, C.C. (2012). *C. elegans* piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. *Cell* *150*, 78–87.

Leung, D.C., and Lorincz, M.C. (2012). Silencing of endogenous retroviruses : when and why do histone marks predominate ? *Trends Biochem. Sci.* *37*, 127–133.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *25*, 1754–1760.

Li, C., Vagin, V. V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H., Seitz, H., Horwich, M.D., Syrzycka, M., Honda, B.M., et al. (2009). Collapse of Germline piRNAs in the Absence of Argonaute3 Reveals Somatic piRNAs in Flies. *Cell* *137*, 509–521.

Li, M. a, Alls, J.D., Avancini, R.M., Koo, K., and Godt, D. (2003). The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* *5*, 994–1000.

Lim, A.K., and Kai, T. (2007). Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6714–6719.

Lim, R.S.M., Anand, A., Nishimiya-fujisawa, C., Kobayashi, S., and Kai, T. (2014). Analysis of Hydra PIWI proteins and piRNAs uncover early evolutionary origins of the piRNA pathway. *Dev. Biol.* *386*, 237–251.

Liu, Q., and Paroo, Z. (2010). Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 295–319.

Malone, C.D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W.R., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2009). Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the *Drosophila* Ovary. *Cell* *137*, 522–535.

Manakov, S.A., Pezic, D., Marinov, G.K., Pastor, W.A., Sachidanandam, R., and Aravin, A.A. (2015). MIWI2 and MILI Have Differential Effects on piRNA Biogenesis and DNA Methylation. *Cell Rep.* *12*, 1234–1243.

Mani, S.R., Megosh, H., and Lin, H. (2014). PIWI proteins are essential for early *drosophila* embryogenesis. *Dev. Biol.* *385*, 340–349.

Martello, G., and Smith, A. (2014). The Nature of Embryonic Stem Cells.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 647–678.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 7634–7638.

Marzluff, W.F., and Duronio, R.J. (2002). Histone mRNA expression: Multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. Curr. Opin. Cell Biol. 14, 692–699.

Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T., and Gorovsky, M.A. (2002). Analysis of a piwi-Related Gene Implicates Small RNAs in Genome Rearrangement in Tetrahymena. Cell 110, 689–699.

Morgan, T.H. (1898). Experimental studies of the regeneration of Planaria maculata. Arch. Für Entwicklungsmechanik Der Org. 7, 364–397.

Morita, M., Best, J.B., and Noel, J. (1969). Electron microscopic studies of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblasts in Dugesia dorotocephala. J. Ultrastruct. Res. 27, 7–23.

Muerdter, F., Olovnikov, I., Molaro, a., Rozhkov, N. V., Czech, B., Gordon, a., Hannon, G.J., and Aravin, a. a. (2012). Production of artificial piRNAs in flies and mice. Rna 18, 42–52.

De Mulder, K., Pfister, D., Kuaes, G., Egger, B., Salvenmoser, W., Willems, M., Steger, J., Fauster, K., Micura, R., Borgonie, G., et al. (2009). Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms. *Dev. Biol.* *334*, 198–212.

Murota, Y., Ishizu, H., Nakagawa, S., Iwasaki, Y.W., Shibata, S., Kamatani, M.K., Saito, K., Okano, H., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2014). Yb Integrates piRNA Intermediates and Processing Factors into Perinuclear Bodies to Enhance piRISC Assembly. *Cell Rep.* *8*, 103–113.

Nakagawa, H., Ishizu, H., Hasegawa, R., Kobayashi, K., and Matsumoto, M. (2011). Drpiwi-1 is essential for germline cell formation during sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Dev. Biol.* *361*, 167–176.

Newmark, P. a, and Sánchez Alvarado, a (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev. Biol.* *220*, 142–153.

Nishida, K.M., Okada, T.N., Kawamura, T., Mituyama, T., Kawamura, Y., Inagaki, S., Huang, H., Chen, D., Kodama, T., Siomi, H., et al. (2009). Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *Embo J* *28*, 3820–3831.

Nishida, K.M., Iwasaki, Y.W., Murota, Y., Nagao, A., Mannen, T., Kato, Y., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2014). Respective Functions of Two Distinct Siwi Complexes Assembled during PIWI-Interacting RNA Biogenesis in Bombyx Germ Cells. *Cell Rep.* *10*, 1–11.

Nishimura, O., Hirao, Y., Tarui, H., and Agata, K. (2012). Comparative transcriptome analysis between planarian *Dugesia japonica* and other platyhelminth species. *BMC Genomics* *13*, 289.

Nishimura, O., Hosoda, K., Kawaguchi, E., and Yazawa, S. (2015). Unusually Large Number of Mutations in Asexually Reproducing Clonal Planarian *Dugesia japonica*. 1–23.

Noto, T., Kurth, H.M., Kataoka, K., Aronica, L., DeSouza, L. V, Siu, K.W.M., Pearlman, R.E., Gorovsky, M. a, and Mochizuki, K. (2010). The *Tetrahymena* argonaute-binding protein Giw1p directs a mature argonaute-siRNA complex to the nucleus. *Cell* *140*, 692–703.

Olovnikov, I., Aravin, A.A., and Fejes Toth, K. (2012). Small RNA in the nucleus: the RNA-chromatin ping-pong. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 164–171.

Önal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G.,

Wang, Y., Rahn, H.-P., Chen, W., Kempa, S., et al. (2012). Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J.* *31*, 2755–2769.

Orii, H., Sakurai, T., and Watanabe, K. (2005). Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev. Genes Evol.* *215*, 143–157.

Palakodeti, D., Smielewska, M., Lu, Y.-C., Yeo, G.W., and Graveley, B.R. (2008). The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians. *RNA* *14*, 1174–1186.

Pane, A., Wehr, K., and Schüpbach, T. (2007). zucchini and squash Encode Two Putative Nucleases Required for rasiRNA Production in the *Drosophila* Germline. *Dev. Cell* *12*, 851–862.

Pedersen, K.J. (1959). Cytological studies on the planarian neoblast. *Zeitschrift Fuer Zellforsch. Und Mikroskopische Anat.* *50*, 799–817.

Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D.R., and Sánchez Alvarado, A. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev. Biol.* *338*, 76–85.

Peng, J.C., and Lin, H. (2013). Beyond transposons: The epigenetic and

somatic functions of the Piwi-piRNA mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 190–194.

Perrat, P.N., DasGupta, S., Wang, J., Theurkauf, W., Weng, Z., Rosbash, M., and Waddell, S. (2013). Transposition-Driven Genomic Heterogeneity in the *Drosophila* Brain. *Science* (80-). *340*, 91–95.

Qi, H., Watanabe, T., Ku, H.Y., Liu, N., Zhong, M., and Lin, H. (2011). The Yb body, a major site for Piwi-associated RNA biogenesis and a gateway for Piwi expression and transport to the nucleus in somatic cells. *J. Biol. Chem.* *286*, 3789–3797.

Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., and Tuschl, T. (2012). A Role for Neuronal piRNAs in the Epigenetic Control of Memory-Related Synaptic Plasticity. *Cell* *149*, 693–707.

Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C., and Sánchez Alvarado, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* *310*, 1327–1330.

Reuter, M., Berninger, P., Chuma, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C., Antony, C., Sachidanandam, R., and Pillai, R.S. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing.

Nature *480*, 264–267.

Rink, J.C. (2013). Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol.* *223*, 67–84.

Rinkevich, Y., Rosner, A., Rabinowitz, C., Lapidot, Z., Moiseeva, E., and Rinkevich, B. (2010). Piwi positive cells that line the vasculature epithelium , underlie whole body regeneration in a basal chordate. *Dev. Biol.* *345*, 94–104.

Ross, R.J., Weiner, M.M., and Lin, H. (2014). PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature* *505*, 353–359.

Rouhana, L., Shibata, N., Nishimura, O., and Agata, K. (2010). Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Dev. Biol.* *341*, 429–443.

Rouhana, L., Vieira, A.P., Roberts-galbraith, R.H., and Newmark, P.A. (2012). PRMT5 and the role of symmetrical dimethylarginine in chromatoid bodies of planarian stem cells. *1094*, 1083–1094.

Rouhana, L., Weiss, J. a, King, R.S., and Newmark, P. a (2014). PIWI homologs mediate Histone H4 mRNA localization to planarian chromatoid bodies. *Development* *141*, 2592–2601.

Saito, K., Inagaki, S., Mituyama, T., Kawamura, Y., Ono, Y., Sakota, E., Kotani, H., Asai, K., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2009). A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature* *461*, 1296–1299.

Saito, K., Ishizu, H., Komai, M., Kotani, H., Kawamura, Y., Nishida, K.M., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* *24*, 2493–2498.

Sakurai, T., Lee, H., Kashima, M., Saito, Y., Hayashi, T., Kudome-Takamatsu, T., Nishimura, O., Agata, K., and Shibata, N. (2012). The planarian P2X homolog in the regulation of asexual reproduction. *Int. J. Dev. Biol.* *56*, 173–182.

Salvetti, A., Rossi, L., Deri, P., and Batistoni, R. (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Dev. Dyn.* *218*, 603–614.

Salvetti, A., Rossi, L., Lena, A., Batistoni, R., Deri, P., Rainaldi, G., Locci, M.T., Evangelista, M., and Gremigni, V. (2005). DjPum, a homologue of *Drosophila* Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance.

Development *132*, 1863–1874.

Sánchez Alvarado, A., and Yamanaka, S. (2014). Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell* *157*, 110–119.

Sánchez Alvarado, A., Newmark, P. a, Robb, S.M., and Juste, R. (2002). The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* *129*, 5659–5665.

Sarot, E., Bucheton, A., and Pe, A. (2004). Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *1321*, 1313–1321.

Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., and Agata, K. (1999). Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev. Biol.* *206*, 73–87.

Shibata, N., Rouhana, L., and Agata, K. (2010). Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev. Growth Differ.* *52*, 27–41.

Shibata, N., Hayashi, T., Fukumura, R., Fujii, J., Kudome-Takamatsu, T., Nishimura, O., Sano, S., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., et al. (2012). Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a

planarian, *Dugesia japonica*. *Int. J. Dev. Biol.* *56*, 93–102.

Sienski, G., Dönertas, D., and Brennecke, J. (2012). Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* *151*, 964–980.

Singh, R.K., Liang, D., Gajjalaiahvari, U.R., Kabbaj, M.H.M., Paik, J., and Gunjan, A. (2010). Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle* *9*, 4236–4244.

Siomi, H., and Siomi, M.C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* *457*, 396–404.

Siomi, M.C., Mannen, T., and Siomi, H. (2010). How does the royal family of tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway? *Genes Dev.* *24*, 636–646.

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., and Aravin, A. a (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 246–258.

Siong, W., Goh, S., Falciatori, I., Tam, O.H., Burgess, R., Meikar, O., Kotaja, N., Hammell, M., and Hannon, G.J. (2015). piRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. 1032–1044.

Solana, J., Lasko, P., and Romero, R. (2009). Spoltud-1 is a chromatoid body

component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev. Biol.* *328*, 410–421.

Solana, J., Kao, D., Mihaylova, Y., Jaber-Hijazi, F., Malla, S., Wilson, R., and Aboobaker, A. (2012). Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNAi and irradiation approach. *Genome Biol.* *13*, R19.

Soper, S.F., van der Heijden, G.W., Hardiman, T.C., Goodheart, M., Martin, S.L., de Boer, P., and Bortvin, A. (2008). Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Dev Cell* *15*, 285–297.

Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and Kadota, K. (2013). TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics* *14*, 219.

Suwińska, A., Czołowska, R., Ożdżeński, W., and Tarkowski, A.K. (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: Expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev. Biol.* *322*, 133–144.

Suzuki, S., Kurata, M., Abe, S., Miyazawa, R., Murayama, T., Hidaka, M.,

Yamamoto, K., and Kitagawa, M. (2012). Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: Association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia. *Exp. Mol. Pathol.* *92*, 160–166.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663–676.

Tan, Y., Liu, L., Liao, M., Zhang, C., Hu, S., Zou, M., Gu, M., and Li, X. (2015). Emerging roles for PIWI proteins in cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *47*, 315–324.

Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K., et al. (2011a). ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* *138*, 2417–2427.

Tasaki, J., Shibata, N., Sakurai, T., Agata, K., and Umesono, Y. (2011b). Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev. Growth Differ.* *53*, 389–400.

Tye, B.K., and Chang, V.K. (2004). Dual functional regulators coordinate DNA replication and gene expression in proliferating cells. *Front. Biosci.* a

J. Virtual Libr. *9*, 2548–2555.

Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Gvozdev, V., and Zamore, P.D. (2006). A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science* (80-). *313*, 320–324.

Vagin, V. V., Wohlschlegel, J., Qu, J., Jonsson, Z., Huang, X., Chuma, S., Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., and Aravin, A. a. (2009). Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev* *23*, 1749–1762.

Vasiljevic, M., Heisler, F.F., Hausrat, T.J., Fehr, S., Milenkovic, I., Kneussel, M., and Sieghart, W. (2012). Spatio-temporal expression analysis of the calcium-binding protein calumenin in the rodent brain. *Neuroscience* *202*, 29–41.

Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P., and Nagamori, I. (2011). RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* *3*, a002774.

Wagner, D.E., Wang, I.E., and Reddien, P.W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* *332*, 811–816.

Wang, X., Jiang, C., Fu, B., Zhu, R., Diao, F., Xu, N., Chen, Z., Tao, W., and Li, C.-J. (2015). MILI, a PIWI family protein, inhibits melanoma cell migration through methylation of LINE1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *457*, 514–519.

Wang, Y., Zayas, R.M., Guo, T., and Newmark, P. a (2007). Nanos Function Is Essential for Development and Regeneration of Planarian Germ Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5901–5906.

Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., et al. (2011). MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Dev. Cell* *20*, 364–375.

Wenemoser, D., and Reddien, P.W. (2011). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev. Biol.* *344*, 979–991.

Wenemoser, D., Lapan, S.W., Wilkinson, A.W., Bell, G.W., and Reddien, P.W. (2012). A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev.* *26*, 988–1002.

Wolff, E., and Dubois, F. (1948). Sur la migration des cellules de

régénération chez les planaires. *Rev. Suisse Zool.* *55*, 218–227.

Xie, W., Schultz, M.D., Lister, R., Hou, Z., Rajagopal, N., Ray, P., Whitaker, J.W., Tian, S., Hawkins, R.D., Leung, D., et al. (2013). Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell* *153*, 1134–1148.

Xiol, J., Cora, E., Koglgruber, R., Chuma, S., Subramanian, S., Hosokawa, M., Reuter, M., Yang, Z., Berninger, P., Palencia, A., et al. (2012). A Role for Fkbp6 and the Chaperone Machinery in piRNA Amplification and Transposon Silencing. *Mol. Cell* *47*, 970–979.

Yoshida-Kashikawa, M., Shibata, N., Takechi, K., and Agata, K. (2007). DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons. *Dev. Dyn.* *236*, 3436–3450.

Zanni, V., Eymery, A., Coiffet, M., Zytnicki, M., and Luyten, I. (2013). Distribution, evolution, and diversity of retrotransposons at the flamenco locus reflect the regulatory properties of piRNA clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 19842–19847.

Zeng, A., Li, Y.Q., Wang, C., Han, X.S., Li, G., Wang, J.Y., Li, D.S., Qin,

Y.W., Shi, Y., Brewer, G., et al. (2013). Heterochromatin protein 1 promotes self-renewal and triggers regenerative proliferation in adult stem cells. *J. Cell Biol.* *201*, 409–425.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014a). PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* *30*, 614–620.

Zhang, P., Si, X., Skogerbo, G., Wang, J., Cui, D., Li, Y., Sun, X., Liu, L., Sun, B., Chen, R., et al. (2014b). piRBase: a web resource assisting piRNA functional study. *Database* *2014*, bau110.

Zhang, P., Kang, J.-Y., Gou, L.-T., Wang, J., Xue, Y., Skogerboe, G., Dai, P., Huang, D.-W., Chen, R., Fu, X.-D., et al. (2015). MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res.* *25*, 193–207.

Zheng, P., Wang, Q., Teng, J., and Chen, J. (2015). Calumenin and fibulin-1 on tumor metastasis: Implications for pharmacology. *Pharmacol. Res.* *99*, 11–15.

Zhou, X.I.N., Battistoni, G., Demerdash, O.E.L., Gurtowski, J., Wunderer, J., Falciatori, I., Ladurner, P., Schatz, M.C., Hannon, G.J., and Wasik, K.A. (2015). Dual functions of Macpiwi1 in transposon silencing and stem cell

maintenance in the flatworm *Macrostomum lignano*. 1–13.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院理学研究科分子発生学講座教授・阿形清和博士ならびに京都大学霊長類研究所研究員・柴田典人博士に深く感謝いたします。

抗 DjPiwiB 抗体を用いた免疫沈降実験に関して、ご指導・ご協力をしていただきました慶應義塾大学医学部分子生物学教室教授・塩見晴彦博士、齋藤 都暁博士ならびに東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻教授・塩見美喜子博士、京都大学大学院理学研究科分子発生学講座研究員・Labib Rouhana 博士に、クロマトイド小体関する共同研究を行った京都大学大学院理学研究科分子発生学講座・熊谷信是さんに、Roche 454 シークエンサー及び Miseq によるシークエンスを行っていただきました、京都大学大学院理学研究科グローバル COE プログラム研究員・矢澤重信博士ならびに川口恵理さんに、in silico 解析についてのご指導・ご協力をいただいた理化学研究所発生・再生研究センター分子配列比較解析ユニット技術職員・西村理さんに、電子顕微鏡観察を行っていただいた理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター生命動態情報研究グループ超微形態研究チーム・米村重信博士ならびに美崎佳寿代さんに、論文投稿にあた

り英文校正をしてくださいました京都大学大学院理学研究科分子発生学講座研究員・中島エリザベス博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり多大なご助力をいただきました京都大学大学院理学研究科分子発生学講座のみなさまに深く感謝いたします。