

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05585

研究課題名(和文) piRNA生合成経路の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of the primary piRNA pathway

研究代表者

石津 大嗣 (Ishizu, Hirotsumu)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：40574588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ培養細胞株OSCでは、piRNAは一次生合成経路により生成され、Piwiタンパク質に結合する。piRNAは主に転移因子に由来するが、一部のpiRNAはmRNAの3'UTRにコードされている。これまでに、多くのpiRNAを産生するTraffic jam(Tj)の3'UTRにおいて、100塩基長のpiRNA生合成に必須のシス配列が同定された。SHAPE法と呼ばれるRNA二次構造解析法により、このシス配列が特異的な構造を持つことが示唆された。構造変異体ではpiRNA生合成活性が失われたことから、シス配列の構造的特徴がpiRNA生成に必須であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：piRNAs in *Drosophila* ovarian somatic cells (OSCs) are generated only through the primary processing pathway and are loaded onto Piwi, a member of PIWI proteins. piRNAs arise mainly from intergenic repetitive elements including transposable elements (TEs) and their remnants. Besides TEs, a subset of mRNAs gives rise to 'genic piRNAs', mainly from their 3' UTR, including Traffic jam (Tj) mRNA. Recently, we have identified a cis-acting 100-nt fragment in the Tj 3' UTR that is sufficient for producing artificial piRNAs from unintegrated DNA. SHAPE analysis showed that the Tj-cis element formed a specific structure. We found that point mutations within the cis element, which disrupted the proper structure, caused a failure of piRNA biogenesis from the downstream region. These results indicate that the piRNA cis element is characterized by RNA secondary structures.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Piwi CRISPR tj 翻訳

1. 研究開始当初の背景

小分子 RNA による遺伝子発現抑制機構は RNA サイレンシングと総称され、発生における分化制御や外来遺伝子からの防御機構などあらゆる生命現象に関与している。生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA である PIWI-interacting RNA (piRNA)は、PIWI タンパク質と RNA 誘導型サイレンシング複合体(RNA-induced silencing complex: RISC)を形成し、相補配列をもつ標的遺伝子の発現を負に制御する。piRNA の主な標的はレトロトランスポゾンであり、piRNA は次世代に遺伝情報を継承する生殖細胞において、転移因子からゲノムの安定性を護る役割を担っている。

piRNA の生合成経路及びサイレンシング機構は、主にショウジョウバエとマウスをモデルに解析が進んでいる。特にショウジョウバエを用いた遺伝学的解析から piRNA 経路に関与する複数の遺伝子が同定されている。申請者は、これらの遺伝子の生化学的解析を行うためにショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞株(ovarian somatic cell: OSC)を樹立し、機能解析を進めた結果、以下のような研究成果を得た。

(1) OSC において piRNA は、生殖細胞特異的に発現する Argonaute タンパク質である Piwi と結合することで piRNA 誘導型サイレンシング複合体 (piRISC) を形成する。レトロトランスポゾン抑制には piRISC の核移行が必須である(Saito and Ishizu et al. **Genes Dev** 2010)。

(2) piRNA 生合成に必須タンパク質因子として Armitage (Armi)、Fs(1)Yb (Yb)、Zucchini (Zuc)を同定した。Armi と Yb は、Yb body と呼ばれる細胞質顆粒構造体の構成タンパク質である。両者とも RNA ヘリカーゼドメインを持つ RNA 結合タンパク質であり、piRNA 生合成過程の中間体と結合することが示唆された。また、Zuc はミトコンドリア外膜上に局在し、piRNA 前駆体を切断し成熟型 piRNA を生成するヌクレアーゼであることを示した(Nishimasu and Ishizu et al. **Nature** 2012, Ishizu et al. **Genes Dev** 2012)。

(3) piRNA クラスターには、*flamenco* と呼ばれる X 染色体上の約 150 kb に渡る遺伝子座に代表されるレトロトランスポゾン断片配列が蓄積した領域と、特定の遺伝子の 3'非翻訳領域 (untranslated region : UTR) の 2 種類があり、後者は genic piRNA と呼ばれる。3'UTR に piRNA クラスターを持つ遺伝子として *traffic jam* (*tj*) が知られていた。*tj* 3'UTR が piRNA の前駆体として認識されるために必要十分な配列を絞り込んだ結果、1,467 塩基長の *tj* 3'UTR 中の 201~300 番目の 100 塩基が必要十分な *cis* エlementであることを明らかにした。さらに、この 100 塩基を組み込んだコンストラクトを作製し OSC で発現させることで、任意の配列を持った piRNA を人工的に産生できることが分か

った。

(4) Yb body 近傍に piRNA の前駆体となる RNA が局在化することを見出し、Yb body が piRNA 生合成の場として機能していることを示した (Murota and Ishizu et al. **Cell Reports** 2014)。

2. 研究の目的

tj 3'UTR 由来の genic piRNA の解析から、piRNA 前駆体は構造的特徴をもった *cis* エlementをコードしていることが示唆された。しかし、その他の genic piRNA コード遺伝子や *flamenco* 由来の転写産物にも同様の *cis* エlementが存在するか、共通の識別機構が働いているかどうかは解明に至っていない。本研究では、piRNA 生合成経路において、piRNA クラスター由来の転写産物が選別される共通原理を解明し、どのようにして成熟型 piRNA が生成されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) piRNA 前駆体にコードされた *cis* エlementの二次構造解析

これまでに、*tj* 3'UTR にコードされた piRNA の生成に必須の *cis* エlementが、二次構造予測によりステムループ構造を取ることが示唆された。しかし、*in vivo* での構造は確かめられておらず、*tj* 以外の piRNA コード遺伝子で共通の構造が見られるかは不明である。本研究では、塩基対を形成しない 2'-OH 基を選択的にアシル化したのちプライマー伸長によりアシル化部位を特定することで、1 塩基レベルで RNA 二次構造を解析する手法である selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE)法を用いて piRNA 前駆体にコードされた *cis* エlementの二次構造の特徴を探索した。

(2) piRNA 生合成経路による翻訳制御の可能性を探る

genic piRNA コード遺伝子にとって、piRNA 生合成経路は 3'UTR の分解を促進する機構でもある。本研究では、piRNA 生合成経路による新たなタンパク質量制御機構の可能性を検討する。piRNA 生合成経路存在下、あるいは piRNA 生合成必須因子を RNAi 法によりノックダウンした条件で *tj* mRNA の半減期を測定し、piRNA 生合成経路による mRNA 安定性への影響を調べた。半減期は、Actinomycin D 処理により転写を阻害し、数分ごとに回収した細胞から抽出した mRNA を qPCR で定量することで測定した。

(3) CRISPR-Cas9 システムによる OSC ノックイン細胞株の樹立

申請者は、CRISPR-Cas9 システムによる OSC のノックアウト細胞株の作製方法を確立したが、ノックイン細胞株の作製について

は検討していなかった。OSC を用いてドナーベクターを導入することで相同組換えによるタグタンパク質の付加が可能かどうか検証した。

4. 研究成果

(1) piRNA 前駆体にコードされた cis エLEMENTの二次構造解析

tj 3'UTR にコードされた 100 塩基長の *cis* エLEMENTに対して SHAPE 法による二次構造解析を行った結果、再現性のあるバンドパターンが観察され、特異的な構造を持つことが示唆された。二次構造予測ソフトを用いた予測結果とは合致する部分が少なく、予測ソフトでは想定していない pseudoknot や triplex 構造を持つ可能性がある。SHAPE 法では、塩基対を形成している塩基を特定できるが、どの塩基同士が対となっているかまでは明らかにできず、詳細な 3 次元構造については不明である。

tj cis エLEMENTにおいて、塩基対を形成している塩基を置換し、部分的に構造を変異させた状態で、piRNA 生合成ができるかどうかを検証した。SHAPE 法により、構造変化したことが確認できた変異体を用いて、piRNA 生合成の活性を調べた結果、構造変異体では piRNA を生成できなくなることがわかった。このことから、*cis* エLEMENTの構造的特徴が piRNA 前駆体として識別されるために重要であることが示唆された。これまで、piRNA をコードする前駆体に特徴的なモチーフ配列は見出されていないが、3 次元構造的な共通性を持つかどうかは不明である。

(2) piRNA 生合成経路による翻訳制御の可能性を探る

これまでの解析から、piRNA 生合成経路に必須のタンパク質である Yb をノックダウンすると、*tj* mRNA から生成される piRNA 生合成過程の中間体 RNA が生成されなくなることが示唆されていた。そこで、Yb をノックダウンした条件下で、*tj* mRNA の半減期を測定した。その結果、EGFP をノックダウンしたコントロールは 23.7 分だった半減期が Yb ノックダウンでは 53.3 分となり、分解スピードが遅くなることがわかった。これは、piRNA 生合成経路が働かなくなったことで、piRNA 前駆体として分解される *tj* mRNA の量が減ったためと考えられる。一方で、同じ piRNA 経路で働くが、piRNA 生合成には関与せず、核内での piRISC による標的転写抑制に関与することがわかっている Mael をノックダウンした場合、半減期は 33 分だった。このことから、piRNA 生合成経路が piRNA の前駆体となる mRNA の分解を促進することが示唆された。

次に、翻訳効率への影響を調べるために、ウェスタンブロット法による *tj* タンパク質の定量を行った。Yb をノックダウンすると、mRNA が安定化されることから、タンパク質

量も増加すると考えられたが、予想に反してタンパク質量が低下することがわかった。このことは、*cis* エLEMENTが mRNA の分解を促進する一方で、翻訳の安定化に寄与することを示唆した。翻訳効率を安定化させる原因として、*cis* エLEMENTによって誘導された Yb などの RNA 結合タンパク質が、その他の抑制的に作用するタンパク質や miRNA などの因子の結合に干渉することが考えられた。*tj* 3'UTR に *cis* エLEMENT以外の制御エLEMENTがあるかどうかは不明だが、miRNA 標的予測ソフトでは、いくつかの miRNA が *tj* 3'UTR を標的とすることが予想されている。また、CRISPR-Cas9 システムにより *tj cis* エLEMENTを欠失した変異体を作製した結果、これらの *tj* タンパク質量は減少していることがわかった。これらのことから、piRNA 前駆体となる mRNA は、piRNA 生合成経路により分解される一方で、その他の翻訳抑制因子の影響を受けにくくなることが考えられる。*tj* 以外の piRNA をコードする mRNA でも同様のことが起こっているかは不明である。

(3) CRISPR-Cas9 システムによる OSC ノックイン細胞株の樹立

CRISPR-Cas9 システムを用いて、OSC で相同組換えによるノックインが可能かどうかを検証した。ここでは、piRNA 生合成において成熟型 piRNA を切り出す酵素である Zucchini(Zuc)に FLAG タグを付加した安定発現株の作製を試みた。C 末端に 3×FLAG タグが付加されるようにドナー配列を設計し、非相同末端結合に関与する Ku70 をノックダウンした OSC に導入した。薬剤選択と希釈培養によるクローニングにより、目的のタグ配列が挿入されたノックイン OSC 株を複数得ることに成功した。Zuc は、これまで特異的な抗体の作製に成功しておらず、過剰発現による解析しかできていなかったが、本研究で作製した Zuc 安定発現株を用いることで、免疫染色や免疫沈降法などの抗体を用いた内在タンパク質の解析が可能となった。また、今回構築したゲノム改変 OSC 株作製法により、タグやレポーターの付加だけでなく、遺伝子変異の導入なども可能になり、piRNA 生合成機構の解析に大きく寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Guida V, Cernilogar FM, Filograna A, De Gregorio R, Ishizu H, Siomi MC, Schotta G, Bellenchi GC, Andrenacci D. Production of Small Noncoding RNAs from the *flamenco* Locus Is Regulated by the gypsy

Retrotransposon of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 査読有, 2016 Oct;204(2):631-644.
<http://doi.org/10.1534/genetics.116.187922>

Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H, Saito K. Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. *Molecular Cell*. 査読有, 2016 Aug 4;63(3):408-419.
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.008>

石津大嗣

人工 piRNA の発現と応用
実験医学増刊、査読無、2015、vol. 33-No.20、p. 62-63

Sato, K., Iwasaki, YW., Shibuya, A., Carninci, P., Tsuchizawa, Y., Ishizu H, Siomi, MC., and Siomi, H. Krimper Enforces an Antisense Bias on piRNA Pools by Binding AGO3 in the *Drosophila* Germline. *Molecular Cell*. 査読有, 2015; 59(4):553-563 .
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.024>

Ishizu H, Iwasaki, YW., Hirakata, S., Ozaki, H., Iwasaki, W., Siomi, H., and Siomi, MC. Somatic Primary piRNA Biogenesis Driven by cis-Acting RNA Elements and trans-Acting Yb. *Cell Reports*. 査読有, 2015; 12(3):429-440.
<http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.035>

[学会発表](計 4 件)

Ishizu H, Kinoshita, T., Siomi, MC.

Role of the RNA helicase, Armitage, in the primary piRNA biogenesis pathway

The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2016年6月28日

Ishizu H, Siomi, H., Siomi, MC.

Elucidation of the primary piRNA pathway in *Drosophila* ovarian somatic cells

EMBO | EMBL Symposium: The Non-coding Genome, EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany, Oct 19, 2015,

石津大嗣、平形 樹生、塩見 春彦、塩見 美喜子

人工 piRNA 発現システムを用いた piRNA 生合成機構の解析

第17回日本RNA学会年会、ホテルライフォート札幌(北海道札幌市) 2015年7月15日

石津大嗣

piRNA 生合成における前駆体 RNA 認識機構の解析

NGS 現場の会第四回研究会、つくば国際会議場(茨城県つくば市) 2015年7月1日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
<http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

石津 大嗣 (ISHIZU, Hirotsugu)

東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：40574588

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()