

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03632

研究課題名(和文) piRNA生合成経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of piRNA biogenesis pathway

研究代表者

石津 大嗣 (ISHIZU, Hirotsugu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40574588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：piRNAは、相補的な配列を持つ遺伝子の発現を抑制する生殖細胞特異的な機能性小分子RNAである。申請者は、ショウジョウバエを用いたpiRNA生合成因子探索の結果、ATP依存性RNAヘリカーゼであるArmitage (Armi) を同定した。本研究により、細胞内でArmiに結合するRNAをiCLIP法および独自に開発したCLIPPARE法により解析することで、これまで詳細な解析がされていなかったpiRNA生合成遷移過程を捉えることが可能となった。また、生化学的解析により、piRNA生合成経路の詳細な分子メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNA生合成経路は、関連因子が多い複雑な分子機構であり、その中間過程に関する知見が全容解明には不可欠である。本研究では、近年開発された技術を取り入れ、関連因子の細胞内局在と機能、プロセッシング過程の中間体配列に関する解析を行い、piRNA生合成経路の包括的な理解を深め、成果を上げてきた。さらに、本研究ではCLIP法を応用した新たな配列解析手法を確立した。この新たな手法による中間体解析が、今後もpiRNA生合成経路の全容解明に寄与すると期待している。

研究成果の概要(英文)：piRNAs are germ cell-specific functional small molecule RNAs that repress the expression of genes with complementary sequences. We identified an ATP-dependent RNA helicase, Armitage (Armi), as a piRNA biogenesis factor in *Drosophila*. By analyzing the RNA that binds to Armi in cells using iCLIP and CLIPPARE that we independently developed, we were able to capture the transition process of piRNA biogenesis, which has not been analyzed in detail. Biochemical analysis revealed a detailed molecular mechanism of the piRNA biogenesis pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Armi Piwi Zuc GasZ レトロトランスポゾン RNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

20~30 塩基長からなる機能性小分子 RNA による遺伝子発現抑制現象は、RNA サイレンシングと総称される。PIWI-interacting RNA (piRNA) は生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA であり、生殖細胞において PIWI と呼ばれる Argonaute タンパク質と結合することでレトロトランスポソンの発現抑制に働く。申請者は、piRNA 生合成経路が保存されたショウジョウバエ卵巣由来培養細胞株 OSC を用いた解析の結果、これまでに以下のような研究成果を得た。

- (1) OSC において piRNA は、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ことを示した (Saito and Ishizu et al. *Genes Dev* 2010)。
- (2) OSC を用いた RNAi スクリーニングの結果から、piRNA 生合成に必須のタンパク質として Armi、Fs(1)Yb (Yb)、Zucchini (Zuc) を同定した。Armi と Yb は、どちらも 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を示した (Murota and Ishizu et al. *Cell reports* 2014)。また、Armi と Yb は、piRNA の前駆体となる RNA とともに Yb body と呼ばれる細胞質顆粒体に局在することから、Yb body が piRNA 生合成及び Piwi-piRNA 複合体形成の場として機能することが示唆された。
- (3) piRNA はゲノム上の piRNA クラスターと呼ばれる領域にコードされており、この領域から転写された長鎖の一本鎖 RNA を前駆体とし、数十から数百塩基長の中間体を経て形成される。piRNA 生合成に必須の遺伝子として同定されていた zuc について、*in vitro* RNA 切断アッセイ及び X 線結晶構造解析を行った結果、Zuc が piRNA 中間体を切断し成熟型 piRNA を生成するエンドリボヌクレアーゼであることを示した (Nishimasu and Ishizu et al. *Nature* 2012)。
- (4) 細胞内で様々な種類の RNA が存在する中で、どのようにして piRNA の前駆体となる RNA が選別されて piRNA 生合成経路へと誘導されるのかについては不明な点が多い。申請者は、piRNA の前駆体となる RNA にコードされた *cis* エレメントを同定し、この配列が下流から piRNA を生成するために必須の領域であることを見出した (Ishizu et al. *Cell reports* 2015)。
- (5) Armi は piRNA 中間体に選択的に結合するが、ATPase 活性を低下させた変異体では Yb body への局在化及び piRNA 中間体への選択的結合が阻害され、piRNA が生成されなくなった。このことから ATPase 活性が piRNA 前駆体認識とプロセッシングに関与することが示唆された。

2. 研究の目的

piRNA 生合成経路では、前駆体から中間体を経て、Zuc により中間体の 5' 末端から 24~30 番目の塩基が切断されることで成熟型 piRNA が切り出されていく。先行研究により、Armi が Zuc による切断過程に関与することが示唆されており、Armi の RNA ヘリカーゼ活性が RNA を一本鎖にすることで、Zuc による切断が促進されることが予想されていたが、Armi がヘリカーゼ活性を持つかどうかは実験的に証明されておらず、また、Armi がどのようにして選択的に piRNA 中間体に結合しているのかも不明だった。Yb body は piRNA 生合成及び Piwi-piRNA 複合体形成の場として機能すると考えられるが、piRNA の前駆体となる RNA を選択的に局在化させるメカニズムや顆粒形成機構などは分かっていない。本研究では、どのようなメカニズムで piRNA 前駆体選別及びプロセッシングが行なわれているのかを解明するため、以下の研究目標を設定した。

- (1) Individual-nucleotide resolution crosslinking-immunoprecipitation (iCLIP) 法により、piRNA 前駆体及び中間体に結合するタンパク質の RNA 結合モチーフ配列を探索する。また、piRNA 生合成因子が形成する複合体構成を明らかにする。
- (2) CLIP 法を応用して独自開発した手法により、Armi 結合 RNA の末端配列を決定し、バイオインフォマティクス解析により piRNA 中間体の特徴を調べる。
- (3) S2 細胞による組換えタンパク質発現システムを用いて全長 Armi の精製方法を確立する。野生型及び ATPase 活性を低下させた変異体のヘリカーゼ活性を測定する。

3. 研究の方法

(1) piRNA 生合成因子の RNA 結合部位同定

piRNA 生合成は、いくつかの素過程からなる経路であると予想されるが、どの段階でどのような複合体が形成されるかに関する知見はほとんどない。本研究では、piRNA 生合成に必須の因子である Armi と Yb について iCLIP 法による結合 RNA 配列同定を行うことで、piRNA 前駆体の特徴的なモチーフ配列を持つかどうかを検証した。

(2) piRNA 中間体配列解析

Armi に結合した piRNA 中間体の 5' 末端から 24~30 番目の塩基を Zuc が切断することにより、成熟型 piRNA が生成されるという仮説が立てられている。しかし、CLIP 法による解析ではその原理上、Armi が結合している部位は分かるものの、その RNA の長さや末端配列の情報などは失われてしまう。そのため、Armi が Zuc の基質となる最終段階の中間体に結合しているかどうかに関する直接的証明はされていなかった。そこで、従来の CLIP 法では失われる 5' 末端配列を同定する手法である CLIP followed by parallel analysis of RNA end (CLIP-PARE) 法を開発し、piRNA 中間体の配列的特徴を明らかにした。

(3) Armi の生化学的解析

Armi は SF1 ファミリーに属する ATP 依存性 RNA ヘリカーゼである。Armi の酵素活性について *in vitro* での生化学的解析するために、組換えタンパク質の精製を行う。SF1 ファミリーに属する ATP 依存性 RNA ヘリカーゼは 5' から 3' の方向に移動しながら RNA 二次構造をほぐすことが知られている。Zuc による piRNA 生成も 5' 側から 3' 方向へ順次切り出されていくことから、Armi に関しても RNA 上を 5' から 3' 方向にのみ移動することが予想される。この活性をヘリカーゼアッセイにより調べた。

(4) Armi の相互作用タンパク質解析

Armi はミトコンドリア周辺に局在化することから、ミトコンドリア外膜上の Zuc と複合体を形成することが示唆されていた。OSC を用いた共免疫沈降法により、Armi と Zuc が相互作用するかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) piRNA 生合成因子の RNA 結合部位同定

OSC を用いた Armi に対する iCLIP 法により、Armi 結合 RNA を同定した。先行研究で Yb が piRNA 前駆体に結合することが示唆されたが、Armi と Yb の結合領域は一致していることがわかった。また、Yb を RNAi によりノックダウンして Armi iCLIP を行った結果、Armi の piRNA 前駆体への選択的な結合が阻害され、RNA 転写量に応じた非特異的な結合パターンを示すことがわかった。この結果から、Armi の piRNA 前駆体への結合は Yb 依存的であることが明らかとなった。また、Yb ノックダウン条件下では、Armi が結合した piRNA 前駆体ではない RNA から piRNA が生成されていた。このことから、Yb は piRNA 前駆体選別に必須であるが、piRNA 生合成には関与しないことが示唆された。以上の結果から、piRNA 前駆体はまず Yb によって認識され、Yb と相互作用する Armi に RNA が受け渡されることで、piRNA 生合成が開始されるというモデルを提唱するに至った。

(2) piRNA 中間体配列解析

Armi に結合する RNA の 5' 末端を同定するために、独自に開発した CLIPPARE 法を行った。その結果、Armi 結合 RNA の 5' 末端と piRNA の 5' 末端が有意に一致することがわかった。このことから、Armi が結合する RNA は、Zuc によって 5' 末端から成熟型 piRNA が切り出される過程の piRNA 中間体であることが示唆された。興味深いことに、Zuc をノックダウンした条件下で Armi CLIPPARE を行った場合でも、Armi に結合する piRNA 中間体と piRNA の 5' 末端は一致することがわかった。このことは、Zuc 以外にも piRNA 前駆体から中間体を切り出すヌクレアーゼが存在することを示唆している。これまでに同定された piRNA 生合成必須因子には、Zuc 以外のヌクレアーゼは同定されておらず、未発見の因子が存在することが予想された。

piRNA は約 80% が 5' 末端に U を持つことが知られている。今回同定された Armi 結合 piRNA 中間体の 5' 末端 U は約 40% しかないことがわかった。このことから、Piwi タンパク質が 5' 末端に U を持つ piRNA を選択的に取り込むことが示唆された。これを検証するために、*in vitro* piRNA loading assay を行った結果、Piwi が 5' 末端に U を持つ RNA を選択的に取り込むことが明らかとなった。

(3) Armi の生化学的解析

ショウジョウバエ培養細胞である S2 細胞で FLAG-tag を付加した全長 Armi を発現する安定発現株を作製し、リコンビナント Armi を精製した。これを用いて、*in vitro* ATPase assay を行った結果、Armi が ATPase 活性を持つことがわかった。野生型と同時に ATPase 活性ドメインの保存されたアミノ酸を置換した変異体を作製し、これらが ATPase 活性を持たないことを確認した。RNA unwinding assay を行った結果、野生型 Armi は 5' から 3' 方向に二次構造を解きながら RNA 上を移動することがわかった。3' から 5' の方向に移動する活性は見られなかった。また、変異体ではいずれの方向にも移動する活性は見られず、Armi は ATP 依存的に 5' から 3' 方向に移動することが明らかとなった。また、ATPase 変異体は野生型に比べて RNA 結合が強いことがわかった。このことから、ATPase 活性は RNA から解離することにも関与することが示唆された。同じ変異体を用いて iCLIP 法を行った結果、piRNA 前駆体に選択的に結合する野生型と異なり、非特異的な RNA への結合が多くなることがわかった。これらのことから、Armi の ATPase 活性は、piRNA 生合成だけでなく、細胞内で非特異的な RNA との結合を防ぐためにも必須であることが示唆された。

(4) Armi の相互作用タンパク質解析

Armi は成熟型 piRNA の切り出しに関わる Zuc と協調的に働くことが予想されたが、Armi と Zuc の細胞内での相互作用は示されていない。これまで、Zuc に対する抗体が作製できなかったことから、内在の Armi と Zuc の相互作用を確認することができなかった。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用いて、Zuc の C 末端に FLAG-tag を付加したノックイン細胞を作製した。ノックイン OSC を用いた共免疫沈降法により、内在の Armi と Zuc が相互作用することを明らかにした。また、Zuc と同様にミトコンドリア外膜上に局在する piRNA 生合成必須因子 GasZ が、Armi と相互作用することを明らかにした。GasZ は Armi をミトコンドリア周辺に局在化させることで Zuc による piRNA 生合成を促すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mikhaleva, E. A., Leinsoo, T.A., Ishizu, H., Gvozdev, V. A., Klenov, M.S.	4. 巻 27
2. 論文標題 The nucleolar transcriptome regulates Piwi shuttling between the nucleolus and the nucleoplasm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 141-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-018-9595-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirakata, S., Ishizu, H., Fujita, A., Tomoe, Y., Siomi, M. C.	4. 巻 20
2. 論文標題 Requirements for multivalent Yb body assembly in transposon silencing in Drosophila	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201947708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishizu, H., Kinoshita, T., Hirakata, S., Komatsuzaki, C., Siomi, M. C.	4. 巻 21
2. 論文標題 Distinct and collaborative functions of Yb and Armitage in transposon-targeting piRNA biogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishizu H, Sumiyoshi T, Siomi MC	4. 巻 126
2. 論文標題 Use of the CRISPR-Cas9 system for genome editing in cultured Drosophila ovarian somatic cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods	6. 最初と最後の頁 186-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymeth.2017.05.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murano, K., Iwasaki, YW., Ishizu, H., Mashiko, A., Shibuya, A., Konko, S., Adachi, A., Suzuki, S., Saito, K., Natsume, T., Siomi, MC., Siomi, H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Nuclear RNA export factor variant initiates piRNA-guided co-transcriptional silencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019102870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashiro, H., Negishi, M., Kinoshita, T., Ishizu, H., Ohtani, H., Siomi, MC.	4. 巻 21
2. 論文標題 Armitage determines Piwi - piRISC processing from precursor formation and quality control to inter organelle translocation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石津大嗣
2. 発表標題 一次piRNA生成経路におけるRNAヘリカーゼArmitageの機能
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotsugu Ishizu
2. 発表標題 Role of the RNA helicase, Armitage, in the primary piRNA biogenesis pathway
3. 学会等名 Keystone Symposia, Small Regulatory RNAs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishizu, H., Kinoshita, T., Siomi, MC
2. 発表標題 Role of the RNA helicase, Armitage, in the primary piRNA biogenesis pathway
3. 学会等名 The 43rd Naito Conference on "NoncodingRNA: Biology, Chemistry, & Diseases" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石津大嗣、塩見美喜子
2. 発表標題 piRNA生合成経路によるmRNA分解制御
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部分子生物学教室のwebサイト http://siomilab.med.keio.ac.jp/ 東京大学理学部生物化学科塩見研究室ホームページ http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考