

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15051

研究課題名(和文) 選択的なpiRNA生合成経路の包括的解析

研究課題名(英文) Understanding of how the cell distinguishes piRNA precursors and transcripts from cellular counterparts

研究代表者

小野口 真広 (Onoguchi, Masahiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員

研究者番号：30645297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：piRNAは生殖細胞においてトランスポゾンの抑制に必要な小分子RNAであり、piRNA経路の破綻は不妊を引き起こす。piRNAは前駆体RNAから生成されるが、前駆体RNAが選定されるメカニズムは十分明らかでない。これまで前駆体RNA中にpiRNAの産生に必要な十分である決定配列が存在することが報告されているが、決定配列がどのようなタンパク質と結合するのかはほとんどわかっていない。本研究では、決定配列に結合するタンパク質をChIRP-MSという手法で網羅的に同定し、新規因子を含む192のタンパク質候補が得られた。これらのタンパク質はpiRNA産生の鍵となる有力な候補群となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は新しい研究手法を用いることで、piRNA生合成経路の各ステップに重要なタンパク質因子を横断的に明らかにする世界に先駆けた独創的な研究である。本研究は、piRNA生合成の特異性を決める分子メカニズムの理解に貢献し、piRNA生合成に重要な各遺伝子に関するこれまでの研究を線ですく重要な研究である。将来的には不妊治療の基礎研究として創薬や医学への応用と貢献につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：piRNA (PIWI-interacting RNA) is required for the suppression of transposons in the germline and disruption of the piRNA pathway leads to infertility. piRNAs are processed from piRNA precursors and key question is how RNAs are selected as piRNA precursors. Previous studies have shown that piRNA precursor have a determinant sequence that is necessary for and sufficient to the piRNA production. However, which proteins are associated with the determinant sequence remains elusive. Here we analyzed the proteins which associate with the piRNA determinant sequence in OSC cells. Using ChIRP-MS method, we identified 192 proteins which interact with the GFP-Flam-1st exon reporter. We found multiple novel proteins with unknown function as well as the proteins those are shown to be associated with PIWI and/or required for piRNA biogenesis. Our data will provide not only promising candidates for key proteins of piRNA precursor selection but also perspective of the whole piRNA biogenesis pathway.

研究分野：RNA生物学

キーワード：piRNA PIWI transposon RNA binding protein

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン(Transposon)は哺乳類ゲノムの約半分もの領域を占め、自己複製しゲノム上を転移する性質を持つ。トランスポゾンの活性化は遺伝子の変異や染色体異常の原因となるため、特に生殖細胞では、自己の遺伝情報を正確に次世代に伝えるためにトランスポゾンの活性を抑制するメカニズムが必要となる。piRNAは相補的な配列をもつ標的RNAの発現を特異的に抑制する小分子RNAであり、トランスポゾンの選択的な抑制に中心的な役割を果たす。piRNA経路の破綻は不妊になることが示されており、piRNAの仕組みの理解は不妊治療の基礎研究として重要であるだけでなく、「自己と非自己を選別する」という生物の本質的な性質の理解にも貢献する。piRNAはその前駆体の転写産物が生合成経路を経て産生されるが、どのような配列を持った転写産物がpiRNAとなるかは、排除する配列の決定、すなわち「非自己の認識」に直接つながる根源的な問題であり、世界的に重要な研究テーマとなっている。しかしながら、複数あるpiRNA前駆体が全転写産物の中からどのように選ばれてその生合成経路に誘導されるのか、選別の決め手となるメカニズムについては十分に分かっていない。

piRNA前駆体は核外輸送後、細胞質で構造体を形成し、Ybタンパク質などによって加工され成熟した小分子piRNAを産生する。先行研究では、piRNA前駆体の1つであるmRNAに存在する特定のRNA部分がpiRNAの選択的な産生に極めて重要であることが示されている。さらにこの部分は細胞質局在タンパク質であるYbに結合することが明らかにされている(Ishizu et al., Cell Reports, 2015)。これらの結果からpiRNAの選択的な生合成にはpiRNA前駆体の特定のRNA配列が、決定因子となるタンパク質と結合することが重要であると仮説を立てた。しかしながらpiRNA産生に重要な配列がどこでどのタンパク質と結合することがpiRNA前駆体の選択につながるのか、その全貌は明らかではない。この問題を解決するためには、これまでのような特定のタンパク質に注目した解析ではなく、piRNAの前駆体RNAに注目し相互作用因子の解析を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究ではpiRNA前駆体がどのように選択的に加工されるのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。これを達成するため、目的のRNAに結合するタンパク質を網羅的に解析できる新しい手法、ChIRP-MSの実験系を構築する。この手法を用いてpiRNA前駆体の核内及び細胞質での包括的なpiRNA生合成経路を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では任意のRNAに結合するタンパク質をin vivoで網羅的に解析することができる画期的な手法、ChIRP-MSを導入する(Chu et al., Cell, 2015)。この手法は長鎖非コードRNAの相互作用因子の解析のために開発された手法であり、目的のRNAを相補的なオリゴプローブを用いて特異的に沈降し、共沈されるタンパク質をMS解析することで目的のRNAのin vivoでの相互作用因子を網羅的に同定するものである。本研究ではこの手法がpiRNA前駆体の解析に活用できることに着目した。この手法を用いてpiRNA前駆体に結合するタンパク質を網羅的に探索し、核内から細胞質に至るまでの包括的なpiRNA生合成経路の分子メカニズムとその特異性の理解を目指す。

### 4. 研究成果

piRNA生合成経路の網羅的解析を行うため、ショウジョウバエpiRNA前駆体であるflamenco(flam)に対しChIRP-MSを行い、flamと相互作用するタンパク質因子を網羅的に同定することを試みた。まず、十分なシグナルを得るために、flamのpiRNA産生に必要なRNA領域を3'UTRにもつGFPを恒常的に発現するハエの細胞株をOvarian Somatic Cell(OSC)を用いて作成した。先行研究により、このGFPの3'UTRからpiRNAが産生されることが確認されている。次に、ChIRP-MSの実験系の最適化として、細胞数、細胞固定法及びソニケーションの条件検討を行った。その結果、本研究で使用する細胞株に最適な条件を見出した。さらに、作成したOSC株を用いて、flamに対するプローブを複数設計してChIRP-MSを行ったところ、コントロールに比べ有意に複数のタンパク質が検出された。これらのタンパク質群にはすでにpiRNA生合成経路に必須であることが報告されているArmiやPIWI結合因子を多数含んでおり、実験系がうまく機能していることが確認された。さらにこれまでに報告のない未知の因子も複数同定された。これらは核外輸送タンパク質、EJC complex, splicing factor, ER局在タンパク質、ミトコンドリア局在タンパク質、クロマチン結合因子などその局在と機能は多岐にわたっていた。先行研究から考察すると、これらの結果はpiRNA生合成に重要な経路を網羅していると推測される。以上の結果より、ChIRP-MSが本研究の狙い通りpiRNA生合成経路の網羅的解析に非常に有効であることが示唆された。そこでさらに実験を複数回を行い、統計的に有意な結果を得た。これらのタンパク質が実際にpiRNAの機能に必要なかを検討するため、ノックダウンを行い、トランスポゾンの発現が上昇するかを検討した。その結果、いくつかのタンパク質において、ノックダウンによりトランスポゾンが脱抑制することが示唆された。これらのタンパク質はいずれもこれまでpiRNAの生合成経路としては報告がないものであるため、piRNAの生合成経路あるいはトランスポゾンの抑制に新たな経路が関与する可能性が示された。さらにこれらのタンパク質因子の結合ネットワークや機能予測および関連経路解析をバイオインフォマティ

クスの手法により解析した。その結果 piRNA 前駆体の結合因子には mRNA の品質管理および翻訳に關与するタンパク質群が多数含まれるという結果を得た。これらの結果を合わせて考察すると、piRNA の生合成経路あるいはトランスポソンの抑制に mRNA 品質管理経路が關与する可能性が示された。

[引用文献]

Ishizu H, Iwasaki YW, Hirakata S, et al. Somatic Primary piRNA Biogenesis Driven by cis-Acting RNA Elements and trans-Acting Yb. *Cell Rep.* 2015;12(3):429-440. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.035

Chu C, Zhang QC, da Rocha ST, et al. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. *Cell.* 2015;161(2):404-416. doi:10.1016/j.cell.2015.03.025

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野口真広、足達俊吾、塩見春彦
2. 発表標題 細胞がトランスクリプトームからpiRNA前駆体を識別する仕組みの理解
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 牛島俊和, 眞貝洋一, 塩見春彦/編, 小野口真広, 他/著	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 398(274-286)
3. 書名 エビジェネティクス実験スタンダード	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	塩見 春彦  (Siomi Haruhiko)		
研究協力者	足達 俊吾  (Adachi Shungo)		