

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17673

研究課題名(和文) piRNA末端形成における2つのヌクレアーゼの使い分けの解析

研究課題名(英文) Analysis of two exonucleases in the 3' end formation of piRNAs

研究代表者

泉 奈津子 (Izumi, Natsuko)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：50579274

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)：本研究では、カイコ卵巣由来のモデル細胞BmN4においてTrimmer KOラインを樹立し、Trimmerの基質であるpiRNA前駆体の生成機序を解析した。その結果、カイコのpiRNA前駆体は30～40 ntの長さであり、エンドヌクレアーゼBmZucおよびPIWIタンパク質による切断の両方の経路により産生されることが明らかとなった。さらにTrimmer KO細胞の抽出液を用いることで、BmZuc切断によるpiRNA前駆体の産生を再現できるin vitro実験系を確立し、BmZucが～35 nt程度のpiRNA前駆体を生成すること、これにはRNAヘリカーゼBmArmiが必要であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAを産生できない動物個体は、生殖巣の形成不全がみられ不妊となることから、生殖細胞におけるpiRNA経路の重要性は明白である。その一方で、どのようにしてpiRNAが作られるのか、その産生機構については未だ不明な点が多い。本研究はカイコのモデル細胞を用いてpiRNA産生過程の一端を明らかにしており、piRNA産生機構の理解を前進させるものとして学術的意義がある。また、本研究で確立した実験系や技術手法は、今後のpiRNA研究においても役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established Trimmer-KO BmN4 cells and investigated biogenesis mechanism of Trimmer substrates, pre-piRNAs in silkworms. We found that both two endo-cleavage pathways by endonuclease BmZuc and PIWI protein act in the production of silkworm pre-piRNAs. Furthermore, we established in vitro assay system to monitor BmZuc activity in the pre-piRNA production and demonstrated that BmZuc cleavage predominantly generates ~35 nt pre-piRNAs by the assistance of RNA helicase, BmArmi.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA RNAサイレンシング Trimmer Zucchini

1. 研究開始当初の背景

piRNA は生殖細胞においてトランスポソンの発現抑制に機能する小分子 RNA である。piRNA は、長い前駆体 RNA の 5'末端が PIWI タンパク質に取り込まれた後、その 3'末端がプロセシングされて成熟型となる。私たちはこれまでに、内在的に piRNA を発現するカイコ卵巣由来の BmN4 細胞を用いた生化学的解析から、カイコにおいて、piRNA 前駆体の末端を削り成熟型 piRNA をつくり出すヌクレアーゼ Trimmer を同定した。一方、ショウジョウバエには Trimmer の相同因子は存在せず、miRNA の末端を削る別のヌクレアーゼ Nibbler (Nbr) が piRNA 前駆体の末端トリミングに機能することが報告された。カイコにも Nbr 相同因子が存在することから、カイコ piRNA の末端形成に Trimmer と Nbr の両方が機能する可能性を考え、piRNA の末端形成における 2 つのヌクレアーゼの使い分けを明らかにすることを目的に研究を開始した。しかし、解析のために Nbr ノックアウト (KO) BmN4 細胞を樹立したところ、予想に反し、Nbr をノックアウトしても piRNA 全体の長さには明確な影響が認められなかった。このため、当初の研究計画を変更し、Nbr KO 細胞と並行して樹立した Trimmer KO 細胞の解析を進めることにした。

マウスやショウジョウバエにおける先行研究から、Trimmer の基質となる piRNA 前駆体は、piRNA 前駆体よりさらに長い piRNA 中間体が PIWI タンパク質に取り込まれた後、下流の領域で、エンドヌクレアーゼ Zucchini、または PIWI タンパク質の切断をうけて生成されることが予想された。piRNA 産生におけるこの 2 つの経路への依存度は、PIWI タンパク質の種類や種間で異なることが明らかされてきたが、カイコにおいてどのように piRNA 前駆体がつくられているのか、また PIWI タンパク質の種類により違いがあるのかは不明であった。さらに、最近の研究から、カイコ Zucchini が piRNA 前駆体ではなく、成熟 piRNA の末端を直接つくり出すというモデルが提唱されたことから、piRNA の末端形成におけるカイコ Zucchini と Trimmer の関係を明確にし、カイコにおいてどのように piRNA 前駆体が産生されているのかを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、piRNA 前駆体の末端トリミング因子である Trimmer の KO 細胞を樹立し、Trimmer KO 細胞での piRNA の性状解析から、以下の 3 点を明らかにすることを目的とした。

- (1) カイコの piRNA 末端形成における Trimmer の必要性を再検証する。
- (2) カイコの piRNA 末端形成における Zucchini の役割を明らかにする。
- (3) Trimmer が基質とする piRNA 前駆体の生成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

まず CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により、Trimmer-KO BmN4 細胞を樹立した。次に Trimmer-KO 細胞から small RNA ライブラリを作製し、piRNA の性状解析を行った。また、これまで確立してきた *in vitro* アッセイ系を応用し、樹立した Trimmer-KO 細胞由来の抽出液を用いて、piRNA 前駆体の生成反応を *in vitro* で再現できないか検討した。

4. 研究成果

(1) piRNA 末端形成における Trimmer の必要性の検証

樹立した Trimmer-KO 細胞において、カイコの PIWI タンパク質である Siwi および BmAgo3 に結合している RNA を検出したところ、Trimmer-KO 細胞では、27-28 nt の成熟型 piRNA に代わり、30-40 nt の長い piRNA が PIWI タンパク質に結合していることが明らかとなった。また、Trimmer-KO 細胞より作製した small RNA ライブラリの解析においても、Trimmer-KO 細胞では piRNA の長さが全体的に伸長し、広範囲に分布していることが確認された。これらの結果から、カイコの piRNA 前駆体は 30-40 nt の長さであり、Trimmer はこれらを成熟型の長さまで削りこむことでカイコの piRNA 末端形成に不可欠な役割を果たしていることが強く支持された。

(2) カイコ Zucchini と Trimmer の関係性および piRNA 前駆体の生成機構の解析

Trimmer-KO 細胞より作製した small RNA ライブラリの解析から、Trimmer-KO 細胞で検出された piRNA は、長さに関わらず、末端が 2'-O-メチル化修飾をうけていることがわかった。次に 2'-O-メチル化修飾を受けた piRNA において、各 piRNA の長さのピークを算出し、ピークの長さの分布を調べたところ、成熟型とほぼ変わらない 27 nt 付近にピークをもつ piRNA の一群と、36 nt 付近に長さのピークをもつ piRNA の一群が存在することが明らかとなった (前者を unextended グループ、後者を extended グループと定義した)。PIWI

タンパク質とこの2つのグループとの関係を調べたところ、Siwi、BmAgo3のいずれも両方のグループの piRNA と結合しており、PIWI タンパク質の種類による明確な偏りはみられなかった。ショウジョウバエやマウスでの解析から、Zucchini による切断部位には強い+1U バイアスが見られ、切断部位の直後から phased piRNA が産生されることが知られている。extended グループの piRNA は、伸長した piRNA 末端の次の塩基に+1U バイアスがあり、末端の次の塩基から産生される phased piRNA が顕著に多いこと、カイコ Zucchini (BmZuc) のノックダウンにより伸長したピークが減少したことから、BmZuc の切断により生じた piRNA 前駆体だと考えられた。一方で、unextended グループは、末端の次の塩基に+1U バイアスをもたず、phased piRNA がほとんどみられないこと、BmZuc ノックダウンにより影響をうけにくいことから、pre-piRNA の産生において BmZuc 切断の依存度が小さいことが示唆された。unextended グループの pre-piRNA が下流領域での PIWI タンパク質による切断により産生される可能性を検証するため、下流領域にマップされる逆鎖の piRNA の存在量を調べたところ、unextended グループの piRNA は下流の 43-51 nt の領域に存在する逆鎖の piRNA が extended グループの piRNA に比べ顕著に多いことが明らかとなった。下流の 43-51 nt の領域に存在する逆鎖の piRNA は、unextended グループ piRNA の下流 33-41 nt を切断するため、33-41 nt の長さの pre-piRNA を産生することが予想された。

上記の一連の解析などから、Trimmer が基質とする piRNA 前駆体は、PIWI タンパク質の種類に関わらず、30-40 nt 程度の長さで、BmZuc 切断または PIWI タンパク質による切断という両方の経路により産生されていることが示唆された。また BmZuc による切断は、成熟型 piRNA の末端を直接つくり出すのではなく、カイコの場合も、BmZuc 切断によりまず piRNA 前駆体がつくられたのち、Trimmer が成熟型の長さまで削りこむという、マウスの MitoPLD、PNLDC1 (Zucchini および Trimmer のマウス相同因子) と同様な様式で piRNA が産生されることが示唆された。

(3) in vitro における BmZuc による piRNA 前駆体産生の再現

これまでの研究において、Trimmer による piRNA 前駆体の末端トリミングを in vitro で再現できる実験系を確立してきた。Trimmer、BmZuc はいずれもミトコンドリア外膜タンパク質であることから、この実験系を応用し、Trimmer-KO 細胞の抽出液を用いることで、piRNA 前駆体を産生する BmZuc の活性を in vitro で再現できるのではないかと考えた。piRNA 中間体を模した長い1本鎖 RNA を PIWI タンパク質のひとつである Siwi に取りこませ、Trimmer-KO 細胞の抽出液を加えたところ、予想通り、BmZuc の活性依存的に~35 nt 程度の長さの切断産物が検出された。この in vitro の切断反応は ATP 依存的であったことから、Zucchini とともに piRNA 産生に働くことが示唆されている ATP 依存的 RNA ヘリカーゼ Armitage の関与を調べたところ、カイコ Armitage (BmArmi) をノックダウンすると BmZuc 切断が顕著に阻害され、逆に BmArmi 高発現では促進する様子がみられた。また、BmArmi の ATP 結合変異体の高発現では、BmZuc 切断の促進はみられず阻害されたことから、BmZuc 切断には、BmArmi およびそのヘリカーゼ活性が必要であることが示唆された。

前述のように、in vivo での Zucchini の切断部位には強い+1U バイアスが見られることから、Zucchini はウリジンの 5' 側を好んで切断するのではないかと考えられている。一方で、精製した Zucchini タンパク質は、1本鎖 RNA 切断において、ウリジンへの明確な嗜好性を示さないことが報告されている。Trimmer-KO 細胞の抽出液を用いた BmZuc 切断反応がウリジンへの嗜好性を示すかを調べたところ、他の塩基に比べ、ウリジンの 5' 側での切断効率がやや高いことがわかった。これらのことから、本研究で確立した BmZuc の切断アッセイは、細胞内の反応を忠実に再現した実験系であることが支持された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Nishimura T, Nagamori I, Nakatani T, Izumi N, Tomari Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T. : PNLDC1, mouse pre-piRNA Trimmer, is required for meiotic and post-meiotic male germ cell development. *EMBO Rep.* 19, e44957, 2018. (査読有り)

Katsuma S, Kawamoto M, Shoji K, Aizawa T, Kiuchi T, Izumi N, Ogawa M, Mashiko T, Kawasaki H, Sugano S, Tomari Y, Suzuki Y, Iwanaga M. : Transcriptome profiling reveals infection strategy of an insect maculavirus. *DNA Res.* 25, pp 277-86, 2018. (査読有り)

泉 奈津子, 泊 幸秀 「piRNA の生成機構および作用機序」

領域融合レビュー, 7, e003 (2018) DOI: 10.7875/leading.author.7.e003 (査読有り)

Zhang H, Liu K, Izumi N (equally contributed), Huang H, Ding D, Ni Z, Sidhu SS, Chen C, Tomari Y, Min J. : Structural basis for arginine methylation-independent recognition of PIWIL1 by TDRD2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 114, pp 12483-88, 2017.
(査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

Natsuko Izumi, Keisuke Shoji, Yukihide Tomari : Analysis of 3'-end formation of silkworm piRNAs using Trimmer knockout cell line (ポスター発表), 第20回日本RNA学会年会, 2018. 7.9-11, 大阪

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/tomari/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：庄司 佳祐

ローマ字氏名：SHOJI, Keisuke