

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔令和3(2021)年度 中間評価用〕

令和1年度採択分  
令和3年3月31日現在

piRNA 機構の動作原理の統合的理解

Comprehensive understanding of mechanisms  
underlying the piRNA pathway

課題番号：19H05466

塩見 美喜子 (SIOMI Mikiko)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要（4行以内）

piRNA はトランスポゾンを抑圧することによってその転移による DNA 損傷から生殖ゲノムを守る。piRNA の機能欠損は不妊を引き起こすことからその重要性は明白である一方動作原理は不明である。本研究では piRNA 機構の動作原理の統合的理解を目指す。本成果は生殖システムの包括的理解や自己・非自己の識別分子機構の理解、生殖医療へと繋がる。

研究分野：RNA 生物学、生化学、細胞生物学

キーワード：piRNA、トランスポゾン、PIWI、サイレンシング、生殖

1. 研究開始当初の背景

生殖組織特異的な piRNA 機構を分子レベルで理解するには大量の卵巣・精巣を必要とする。また、生殖組織内の細胞は単一でなく必ずしも生化学的解析に適さない。我々は独自に樹立した卵巣由来体細胞株を用いて piRNA 研究を進め多大な成果を挙げた。並行して卵巣由来生殖細胞株を用いることによって piRNA 増幅や成熟化に関する新規モデルを提唱した。*l(3)mbt* 欠損による脳腫瘍では piRNA 因子が異所的に発現するが、これに発想を得て新規細胞株の樹立にも成功した。このような創造性や独自性高い研究材料、豊富な経験や知識を生かせば世界に先駆けて「piRNA 機構の動作原理の統合的理解」を達成できると判断した。

2. 研究の目的

本研究は、piRNA 機構の動作原理の統合的理解を目的とする。主たる研究項目は、[I]生殖系体細胞における piRNA 生合成機構の解明、[II]生殖細胞における piRNA 生合成機構の解明、[III]生殖系体細胞の piRNA による転写制御機構の解明、[IV]piRNA 因子の立体構造解析、[V]マウス胎児期生殖細胞におけるクロマチン動態の解析、である。我々が独自に樹立したショウジョウバエ卵巣由来体細胞株 OSC とカイコ卵巣由来生殖細胞株 BmN4 を用いる。クロマチン動態に関する研究はマウス胎児を用いて行う。

3. 研究の方法

[I]生殖系体細胞における piRNA 生合成機構の解明：piRNA 生合成因子として知られる Gasz、Mino、SoYb、Vret、Daed に焦点をあてる。これまでの研究からトランスポゾン抑制型と非抑制型 piRNA プロセッシング反応場が異なることを見出したが、その詳細を分子レベルで解明する。

[II]生殖細胞における piRNA 生合成機構の解明：本機構の全容解明を目指す。特に機能未知な Spn-E 及び Qin の機能解明に焦点をあてる。Qin は特定のトランスポゾンの抑制に必要であるためその仕組みを理解する。piRNA 生合成の足場因子 Papi のリン酸化の意義を解明する。

[III]生殖系体細胞の piRNA による転写制御機構の解明：Mael など piRNA 因子の機能解析を進める。さらなる新規因子の同定を試みると共に人工 piRNA 発現系を利用し各因子の機能、分子ヒエラルキーを理解する。

[IV]piRNA 因子の立体構造解析：Pwi-piRISC や Yb body 構成因子複合体に焦点を当てる。piRNA と結合しない Apo-PIWI の単離精製及びその構造解析を試みる。

[V]マウス胎児期生殖細胞におけるクロマチン動態の解析：マウス胎児期生殖細胞における DNA メチル化非依存的クロマチン化に PIWI-piRNA が関わる可能性が浮上したため分子レベルで解明する。

#### 4. これまでの成果

[I]生殖系体細胞における piRNA 生合成機構の解明：Yb body は Yb とその長鎖 RNA 結合能で液-液層分離を介して形成されることを見出すとともに、Yb がもつ複数のドメインの機能の相違を明らかにした<sup>8)</sup>。Armi は Yb body とミトコンドリアを行来する RNA ヘリケースであり、Yb body で Piwi-piRISC 前駆体に結合しそれをミトコンドリア局在因子 Gasz ヘエスコートする因子であることが判明した<sup>5)</sup>。一方、Gasz は Armi に結合することによって piRNA 成熟化反応の足場として機能する。Gasz と同様、ミトコンドリア局在因子 Mino は Piwi と結合し phased piRNA 生成の足場となるという結果が得られた(執筆中)。

[II]生殖細胞における piRNA 生合成機構の解明：RNA ヘリケース DDX43 が Ago3 によって切断された RNA を ATP 加水分解依存的に解離し、Siwi-piRISC 生成を促す因子であることが判明した<sup>1)</sup>。2次 Siwi-piRISC の成熟化反応は Ago3 body で起こることを見出した。Ago3 body の形成には Ago3-piRISC と Vret の両者が必要である<sup>3)</sup>。

[III]生殖系体細胞の piRNA による転写制御機構の解明：Piwi-piRISC によるトランスポゾンのヘテロクロマチン化には Egg によるヒストンメチル化反応が必要であるが、それに先立って Egg は Ub 修飾を受ける。この修飾における Egg 補因子 Wde の重要性を明らかにした<sup>6)</sup>。Piwi-piRISC 及び Mael に相互作用する核因子の解析からクロマチン理モデル Brm が浮上した。OSC において Piwi の制御を受ける大半のトランスポゾンはまず Brm 活性によって転写が開始する。この転写産物に Piwi-piRISC が作用することによって転写抑制が促されるが、これは Piwi 補因子 Mael が Brm に働きかけ、標的 DNA から Brm と RNA Pol II の量を減少させることによることが明らかとなった<sup>2)</sup>。Gtsf1 は Piwi と Mael など Piwi 補因子の橋渡しの役割を担うことも分かった。Piwi 補因子 Panx に結合するタンパク質の解析から Nxf2 を見出した。Nxf2 は p15 と複合体を形成し Piwi-piRISC の標的 RNA への結合を安定化する機能を持つ<sup>7)</sup>。

[IV]piRNA 因子の立体構造解析：ショウジョウバエ Piwi-piRISC の立体構造を明らかにした。内在性 Piwi は Slicer 活性を発揮するために必要なアミノ酸を持たないが、その生理学的意義、すなわち Piwi が Slicer 活性を持つと、標的 RNA から解離しやすくなるため、転写抑制活性をうまく発揮できなくなることを解明した<sup>4)</sup>。

#### 5. 今後の計画

[I]生殖系体細胞における piRNA 生合成機構の解明：Gasz の結合因子である Daed に焦点を当てた解析を進める。[II]生殖細胞における piRNA 生合成機構の解明：特定のトランスポゾンの制御に関わる Qin に焦点を当てた解析を進める。[III]生殖系体細胞の piRNA による転写制御機構の解明：Gtsf1 の解析をさらに進める。各々の Gtsf1 ホモログは各々の Piwi ホモログと機能する可能性がありその機能的意義を探索する。[IV]piRNA 因子の立体構造解析：SoYb/Vret 複合体の解析を進める。[V]マウス胎児期生殖細胞におけるクロマチン動態の解析：Miwi2 結合候補因子の解析を進める。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む) 原著論文(抜粋)

(1) Murakami *et al.* DEAD-box polypeptide 43 facilitates piRNA amplification by actively liberating RNA from Ago3-piRISC. *EMBO Rep.* e51313. 2021. (2) Onishi *et al.* Piwi suppresses transcription of Brahma-dependent transposons via Maelstrom in ovarian somatic cells. *Sci. Adv.* 6:eaa7420. 2020. (3) Nishida *et al.* Siwi levels reversibly regulate secondary piRISC biogenesis by affecting Ago3 body morphology in *Bombyx mori*. *EMBO J.* 39:e105130. 2020. (4) Yamaguchi *et al.* Crystal structure of *Drosophila* Piwi. *Nature Com.* 11:858. 2020. (5) Yamashiro *et al.* Armitage determines Piwi-piRISC processing from precursor formation and quality control to inter-organelle translocation. *EMBO Rep.* 21:e48796. 2019. (6) Osumi *et al.* Essential roles of Windei and nuclear monoubiquitination of Eggless/SETDB1 in transposon silencing. *EMBO Rep.* 20:e48296. 2019. (7) Murano *et al.* Nuclear RNA export factor variant initiates piRNA-guided co-transcriptional silencing. *EMBO J.* 38:e102870. 2019. (8) Hirakata *et al.* Requirements for multivalent Yb body assembly in transposon silencing in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 20:e47708. 2019

#### 7. ホームページ等

<http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>