

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02401

研究課題名(和文) Tudorドメイン蛋白質群が関与するpiRNA生合成とヌアージュ形成機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of piRNA biogenesis and nuage formation involving Tudor domain proteins

研究代表者

甲斐 歳恵 (KAI, Toshie)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：40579786

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)：本研究課題では、生殖細胞特異的な非膜オルガネラ・ヌアージュに局在するTudorドメイン蛋白質(Tdrd)群の機能解析を行なった。dTdrd1はヌアージュに局在し、piRNA経路をより堅固にするために機能していることを明らかにした。また、ヌアージュに局在するRNAヘリカーゼTdrd9がTdrd5と相互作用し、ヌアージュ形成及びpiRNA前駆体ヌアージュへのリクルートを通じて、ピンポン増幅を推進することを明らかにした。また、ショウジョウバエ精巣に特異的に発現する、タンパク質コード領域RNA配列に由来する新たなpiRNA種を同定し、精子形成に機能する遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNA経路は、生殖細胞のゲノムの安定化によって任性を保証する、動物にとって必要不可欠な生理学的プロセスの1つである。本研究によってもたらされた、その分子機構は、ゲノム安定化の分子機構の全容解明に大きく貢献するものである。無精子症や不妊症の患者には、申請者らの研究によってヌアージュ形成の核となることが明らかとなったTdrd9を含む既知のヌアージュ因子の変異が近年頻繁に報告されており、患者数は増えつつある。本研究によって明らかとなったpiRNAの生合成機構は、生殖医学に重要な知見をもたらし、不妊症疾患の新たな原因や治療法の開発の糸口を提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted functional analysis of Tudor domain proteins, which localize to the non-membranous organelle. We found that dTdrd1 functions to reinforce the piRNA pathway. Additionally, we demonstrated that the RNA helicase Tdrd9, which also localizes to the nuage, interacts with Tdrd5, promoting the ping-pong amplification cycle through the formation of the nuage and the recruitment of piRNA precursors to it. Furthermore, we identified a new type of piRNAs derived from protein-coding RNA sequences that are specifically expressed in testes, and elucidated its role in controlling the expression of genes involved in spermatogenesis.

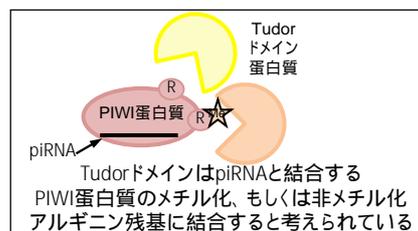
研究分野：小分子RNA

キーワード：生殖細胞 小分子RNA piRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

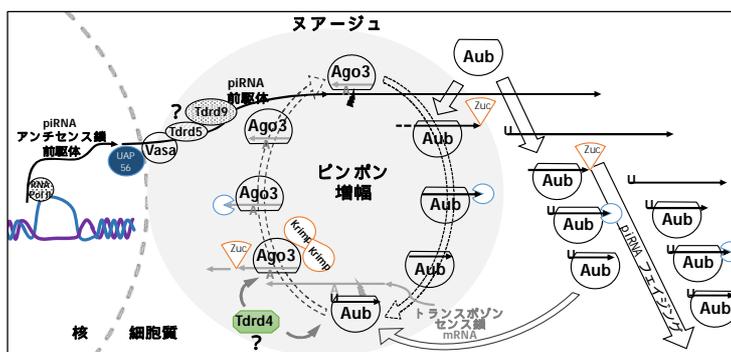
1. 研究開始当初の背景

ヒトではゲノムの 40% を占める転移因子やトランスポゾンの転移は、染色体の欠損や重複、遺伝子の挿入変異等の甚大なゲノム損傷を引き起こす。生殖細胞ゲノムの損傷を防ぐために、piRNA と呼ばれる 23~30 塩基長の小分子 RNA が、トランスポゾンの発現を抑制している。piRNA 経路はヒトやマウスなどの哺乳類でも保存されているが、遺伝学・生化学解析ツールが豊富なショウジョウバエが優れたモデル系となっている。申請者らは、遺伝学的な解析によって、生殖細胞での piRNA の産生に必要な不可欠な因子として複数の Tudor ドメイン蛋白質 (Tdrd) を報告してきたが、その多くの詳細な分子機能は不明である。本研究課題では、Tdrd 蛋白質群の機能解析を中心に、piRNA 生合成機構の包括的理解を目指した。



2. 研究の目的

piRNA は、トランスポゾンの残骸が集積するゲノム領域から前駆体が転写され、一次プロセシングまたはフェイジングと呼ばれる過程によって一次 piRNA が産生される。その後、一次 piRNA は PIWI ファミリー蛋白質の Aub に積み込まれ、Aub-piRNA 複合体がトランスポゾン転写産物を切断する。その切断された RNA 断片から二次 piRNA が産生され、Ago3 に積み込まれる。Ago3 は piRNA 前駆体を切断し、その切断断片から piRNA が産生される。ピンポン増幅とも呼ばれるこの二次生合成経路では、PIWI ファミリー蛋白質でエキソヌクレアーゼ活性を有する Aub と Ago3 が中核的な役割を果たす。しかし、それだけでは不十分で、Aub と Ago3 上にあるアルギニン残基と相互作用する Tdrd 蛋白質群が不可欠である。これらの蛋白質は、生殖細胞に存在する「ヌアージュ」と呼ばれる構造体に局在し、協働して piRNA を産生する。その中の Tdrd 蛋白質群は、Tudor ドメインに加えて特異な機能ドメインを有し、piRNA のピンポン増幅において個別の役割を担っていると考えられる。Tdrd5 は RNA 結合モチーフと考えられる LOTUS ドメインを、Tdrd9 は RNA ヘリカーゼモチーフを、Tdrd4 はユビキチン化経路に関与する E3 リガーゼの特徴である RING finger モチーフを保持している。これらの Tdrd 蛋白質はよく保存されており、マウスおよびショウジョウバエでの piRNA 産生に必須であるが、詳細な分子機能は不明であった。本課題では、遺伝学・細胞生物学および生化学的解析に適したショウジョウバエをモデル系として、TDRD タンパク質の piRNA 生合成における分子機能を解明し、piRNA による生殖細胞のゲノム保全機構の全貌の解明に取り組んだ。



3. 研究の方法

(1) piRNA ピンポン増幅における Tdrd5 の機能解析

ヌアージュに局在する RNA ヘリカーゼ・Vasa は、核内で転写された piRNA 前駆体を細胞質側にあるヌアージュへ受け渡すプロセスを仲介する役割を担っており、Vasa の欠損はその後のプロセスの停滞をもたらす。一方、Vasa 同様に RNA ヘリカーゼモチーフを持つ Tdrd9 は、ヌアージュでの piRNA のピンポン増幅に必要であるが、その分子機能は不明であった。また、その Tdrd9 と遺伝学、生化学的に相互作用する Tdrd5 の分子機能も詳細はわかっていなかった。本課題では、その複合体の形成機構や、piRNA 生合成における Tdrd5 の分子機能の解明に取り組んだ。

以前、Tdrd5 の LOTUS ドメインが、RNA ヘリカーゼの Vas と相互作用し、Vaa の ATPase 活性を亢進する機能を持つことが報告された (Jeske, et al., 2017)。本研究課題では、このモチーフ

に加え、新たに Tdrd5 がもう1つの RNA ヘリカーゼ・Tdrd9 と、SRS (Spn-E recruiting site)と呼ばれる保存されたモチーフで相互作用することを明らかにした。このモチーフは培養細胞内でも生体内でも Tdrd9 をリクルートするために機能しており、piRNA プロセッシングとヌアージュ形成に必須であることを明らかにした。

Tdrd5 欠損変異体もしくは SRS モチーフ欠損変異体で Tdrd9 は核内に蓄積することから、RNA ヘリカーゼ Tdrd9 は piRNA 前駆体に結合し、Tdrd5 と協働して前駆体を細胞質側のヌアージュへ輸送し、プロセッシングへと導入していると考えられた。架橋処理した野生型卵巣から Tdrd9 を免疫沈降し、結合している RNA を回収できたが、残念ながら、質的・量的な問題から、次世代シーケンシング解析によって中間体と考えられる結合 RNA の配列を得ることはできなかった。しかしながら、蛍光標識を用いた高感度の in situ ハイブリダイゼーション法 (HCR-in situ hybridization) によって、Tdrd5 欠損変異体では piRNA 前駆体がヌアージュ近傍に蓄積することを明らかにした。また、Tdrd5 は2つの RNA ヘリカーゼ Vas や Tdrd9 と相互作用するが、それぞれの相互作用ドメインを欠いた場合においても、欠損変異体同様に piRNA 前駆体がヌアージュ近傍に蓄積することを明らかにした。

また、Tdrd5 は天然編成領域を持つが、この領域がヌアージュにおける Vas のダイナミクスを亢進することやトランスポゾンの抑制に関与することを明らかにした。以上のことから、Tdrd5 はヌアージュ形成や piRNA プロセッシングの核となる重要な因子であることを突き止めた。

(2) piRNA 生合成における Tdrd1 の機能解析

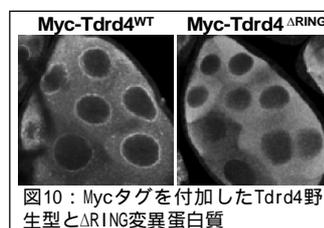
ヌアージュに局在する Tdrd1 の分子機能はこれまで知られていなかった。Tdrd1 変異体は雌雄ともに不妊は示さないが、本研究課題では、次世代シーケンサー解析によって、精巣及び卵巣では piRNA 生合成が若干損なわれており、その結果として、トランスポゾンが弱い過剰発現を示すことが明らかとなった。しかし、ヌアージュにおける piRNA 生合成に特徴的なピンポンシグニチャーは損なわれておらず、Tdrd1 はヌアージュにおける piRNA プロセッシングを亢進する機能を持つと考えられる。

(3) 精巣における非標準的なコード領域からプロセッシングされる piRNA の発見

精巣における Tudor ドメインタンパク質の機能解析を行っている過程で、ショウジョウバエの精巣 piRNA の中に、タンパク質コード領域の RNA からプロセッシングされるものを見出し、CDS-piRNA と名付けた。すなわち、コード RNA から非コード RNA が産生される「非コード化」現象を見出した。CDS-piRNA の産生は特定の miRNA によって惹起されること、および非コード化により産生される CDS-piRNA がクロマチン制御やスプライシング因子を制御し、精子形成時における遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした。

(4) piRNA 経路における Tdrd4 の機能解析

piRNA ピンポン増幅に機能する Tdrd 蛋白質の1つ Tdrd4 は、ユビキチン化経路に関与する E3 リガーゼの特徴である RING finger モチーフを有している。Tdrd4 の Tudor ドメインが Ago3-Aub 間の piRNA のピンポン増幅に必須であることがわかっている一方、RING finger の機能、特に E3 リガーゼとしての役割は未だ不明である。申請者らは RING finger モチーフ内のシステイン残基をアラニンに置換した Myc タグ付き変異 Tdrd4 (Tdrd4^{ΔRING}) を生殖細胞内で発現させた。野生型 Tdrd4 はヌアージュに局在し、トランスポゾンの発現を抑制したのに対して、Tdrd4^{ΔRING} は細胞質中に分散し、トランスポゾンを抑制できなかった。すなわち、Tdrd4 の RING finger は、ヌアージュへの局在と piRNA 経路に必須であることが示唆された。本課題では試験管内でのユビキチン活性の測定系立ち上げを試みたが、Tdrd4 は難溶性のタンパク質であり、反応に必要な精製タンパク質を得るのが困難な状況にある。今後は昆虫細胞を用いた発現系を用いてさらに検証する予定である。



4. 研究成果

Tdrd1 タンパク質(Kotsubu)は非膜オルガネラ・ヌアージュに局在するが、PIWI ファミリータンパク質欠損体などでは、その局在が失われる。また、Tdrd1 欠損変異体の卵巣や精巣では piRNA が減少することなどから、Tdrd1 は、piRNA 経路をより堅固にするために補助的に機能していることを明らかにした。この成果は 2022 年 3 月に国際ピアジャーナルの *Front Mol Biosci* に掲載

された (DOI: 10.3389/fmolb.2022.81830)

非膜オルガネラ・ヌアージュの構造因子である Tdrd5(Tej)は、他のヌアージュタンパク質、Vasa、Tdrd9 (SpnE)とそれぞれ LOTUS と SRS という別個のモチーフを通じて相互作用し、それらをヌアージュヘリクルートしていることを明らかにした。またそれらのタンパク質の Tdrd5 によるヌアージュへのリクルートは、piRNA 前駆体をヌアージュヘリクルートするために必須である。すなわち、Tdrd5 は、ヌアージュ形成と piRNA 前駆体のプロセッシングの中核を担う因子として機能していることが明らかとなった。この成果は 2023 年 10 月に国際ピアジャーナルの *JCB* に掲載された (DOI: 10.1083/jcb.202303125)

また、ショウジョウバエの精巣生殖細胞で観察されるタンパク質コード領域から piRNA と呼ばれる非コード RNA が産生される「非コード化」現象を見出した。この非コード化には Ago2 と Dcr2 が関与し、特定の miRNA が相互作用して非コード RNA の産生を誘導すること、および非コード化により産生される CDS-piRNA がクロマチン制御やスプライシング因子を標的にすることを明らかにした。この成果は国際ピアジャーナルの *Science Advances* 誌に掲載された (DOI: 10.1126/sciadv.adh0397)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Lim Lin-Xenia, Isshiki Wakana, Iki Taichiro, Kawaguchi Shinichi, Kai Toshie	4. 巻 9
2. 論文標題 The Tudor Domain-Containing Protein, Kotsubu (CG9925), Localizes to the Nuage and Functions in piRNA Biogenesis in <i>D. melanogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	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) 10.3389/fmolb.2022.818302	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 Kazuharu Arakawa, Tetsuro Hirose, Toshifumi Inada, Takuhiro Ito, Toshie Kai, Masaaki Oyama, Yukihide Tomari, Takao Yoda, Shinichi Nakagawa	4. 巻 28(8)
2. 論文標題 Nondomain biopolymers: Flexible molecular strategies to acquire biological functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 539-552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13050	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 Taichiro Iki, Shinichi Kawaguchi, Toshie Kai	4. 巻 9(29)
2. 論文標題 miRNA/siRNA-directed pathway to produce noncoding piRNAs from endogenous protein-coding regions ensures <i>Drosophila</i> spermatogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.adh0397	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 Yuxuan Lin, Ritsuko Suyama, Shinichi Kawaguchi, Taichiro Iki, Toshie Kai	4. 巻 222(10)
2. 論文標題 Tejas functions as a core component in nuage assembly and precursor processing in <i>Drosophila</i> piRNA biogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	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) 10.1083/jcb.202303125	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Lin Yuxuan
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるTejasとSpn-EによるpiRNA生合成のためのヌアージュ構築の分子基盤
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井木太一郎
2. 発表標題 Proximity-dependent Proteome Reveals Physical and Functional Cyclophilin 40-client Interactions in Drosophila Spermatogenesis
3. 学会等名 The 10th International Conference on The Hsp90 Chaperone Machine（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井木太一郎
2. 発表標題 A Pathway to Produce piRNAs from Endogenous Protein-coding Sequences Supports Drosophila Spermatogenesis
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 LIM LIN XENIA
2. 発表標題 piRNAによるゲノムの安定化機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一色和奏
2. 発表標題 ショウジョウバエ卵巣でのpiRNA経路に関わる新規因子のBioID法による同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲斐歳恵
2. 発表標題 生殖細胞特異的な皮膜オルガネラ・ヌアージュの構造と機能
3. 学会等名 第33回フォーラム・イン・ドージン（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 一色和奏
2. 発表標題 Discovering novel factors in piRNA pathway by proximity proteome screening in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第1回細胞生物コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 一色和奏
2. 発表標題 BioID法によるpiRNA経路新規因子の探索と同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------