

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710219
 研究課題名（和文） ショウジョウバエ piRNA 生合成経路における Tudor の機能解析
 研究課題名（英文） Functional Involvement of Tudor in the piRNA Processing Pathway in *Drosophila* Germlines
 研究代表者
 西田 知訓 (NISHIDA KAZUMICHI)
 慶應義塾大学・医学部・特任助教
 研究者番号：10598436

研究成果の概要（和文）：

カイコTud(BmTud)は、BmSpn-E及びSiwiが複合体を形成することが判った。BmSpn-EをRNAiで消失させた細胞では、piRNAが減少し、カイコPIWタンパク質であるSIWIへpiRNAがloadされなくなることが判った。さらに、BmSpn-E複合体には、piRNAと結合していない空のSiwiが含まれていることが判明した。これは、piRNAがloadされる前のSiwiがSpn-Eと結合していることが考えられる。つまり、BmSpn-EはSiwiへpiRNAをloadするために必要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We discovered that immunopurified BmTud complexes from BmN4 contain BmSpn-E and Siwi. Depletion of BmSpn-E also caused Siwi to be loaded with less piRNAs than that in naive BmN4 cells. We discovered that Siwi, in a form associated with BmSpn-E, is not significantly loaded with mature piRNAs. Our data suggest that BmSpn-E in BmN4 might be involved in piRNA loading to Siwi.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：piRNA 生合成・PIWI タンパク質・TUDOR ドメインタンパク質・生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

小分子 RNA を介した遺伝子発現抑制機構は RNA サイレンシングと総称される。RNA サイレンシングの代表例は RNAi である。この RNAi で、中核の因子として機能するのが小分子 RNA-Argonaute タンパク質の複合体であ

る。ショウジョウバエには、5種類の Argonaute タンパク質[AGO1, AGO2, AGO3, Aubergine (Aub), Piwi]が発現している。これらのタンパク質は、アミノ酸配列と発現領域の違いから AGO と PIWI サブファミリーに分類される。AGO サブファミリーの AGO1 と AGO2 は、

ほぼ全組織で恒常的に発現するのに対し、PIWI サブファミリーの AGO3、Aub や Piwi は、生殖細胞特異的に発現する (Williams and Rubin *PNAS* 2002)。AGO1 と AGO2 は、miRNA と siRNA 各々と特異的に結合し miRNA 経路と RNAi 経路でそれぞれ機能している。一方、PIWI サブファミリーについては、遺伝学的解析から生殖細胞の形成と維持そしてトランスポゾン由来の遺伝子発現抑制に関与していることが知られていた。近年、申請者らは、作製した PIWI タンパク質それぞれに対する抗体を用いた生化学的解析から、PIWI タンパク質はトランスポゾン由来の piRNA (PIWI-interacting RNA) と特異的に結合することを示した (Saito et al. *Genes & Dev.* 2006, Gunawardane et al. *Science* 2007, Nishida et al. *RNA* 2007)。piRNA 生合成経路には、第一次生成経路と第二次生成経路があると考えられている。しかし、piRNA 生合成経路については、未だ明らかになっていない点が多く存在する。最近、PIWI タンパク質は、種を超えてメチルトランスフェラーゼである PRMT5 によりアルギニンの対称的ジメチル化 (sDMA) 修飾を受けることが判明した。ショウジョウバエ *dprmt5* 欠失変異体では、piRNA が減少していた (Kirino et al. *NCB* 2009)。これらのことから sDMA 修飾は piRNA 生合成経路に重要であることが示唆された。また、sDMA 修飾を受けた PIWI タンパク質に特異的に結合する因子が piRNA 生合成経路に関与していると考えた。そこで、申請者は Aub-sDMA ペプチドを用いて卵巣抽出液から Pull-down 解析を行ったところ、TUDOR ドメインを有する Tud と結合することを明らかにした。さらに、Aub と AGO3 は、sDMA 修飾依存的に Tud と結合し三者複合体を形成することが判明した。この複合体には piRNA 前駆体が含まれていることから、Tud は piRNA 生合成経路のプラットフォームとして機能することが示唆された。Tud の欠失により、Aub

や AGO3 に受け渡す piRNA 量とトランスポゾン由来の piRNA の種類に影響を与える。これらの結果から、Tud は piRNA の受渡しに関与している (Nishida et al. *EMBO J.* 2009)。しかし、piRNA 生合成経路における Tud の詳細な分子機能、その他の因子については、未だ明らかになっていないのが現状である。そのため、Tud の詳細な分子機能を解析することが、piRNA 生合成経路の解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

piRNA は、生殖細胞特異的に発現する PIWI タンパク質と結合しトランスポゾンなどの遺伝子発現を抑制することで生殖細胞の形成維持と分化を正常に保っている。申請者の解析により、piRNA 生合成経路である増幅サイクルにおいて PIWI タンパク質の切断活性が必須であること、Tudor (Tud) がプラットフォームになること、Tud が piRNA の受渡しで機能していることを見出した。しかし、piRNA 生合成経路における Tud の詳細な分子機能、そしてその他の因子については、明らかになっていない。そこで、申請者は Tud についての詳細な解析を進める事により、piRNA 生合成経路を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

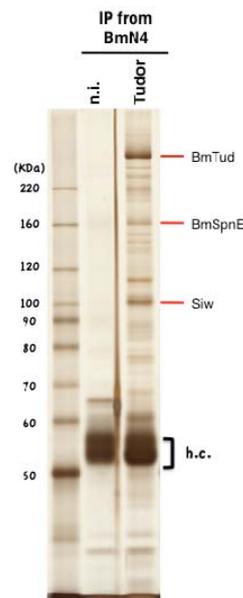
Tud の piRNA 生合成経路において詳細な piRNA 受渡しの作用機序を明らかにする。本研究は、ショウジョウバエ野生型そして欠失変異体卵巣を用いて解析を試みる。piRNA 前駆体は、piRNA 生合成経路を理解する上で重要な要素である。そのため、(1) Tud 複合体へ受渡しされる piRNA 前駆体を同定する。そして、(2) Tud の詳細な機能を明らかにするため、Tud と特異的に結合する新規因子を同定する。(3) 新規因子が piRNA 生合成に関与しているかを piRNA 量の変化により検討する。(4) 新規因子に対するモノクローナル抗体を作製

する。(5) piRNA 生合成経路への関与が認められた場合、新規因子の欠失変異体を用いて、Tud への piRNA 前駆体の受渡しの影響を検討する。(6) piRNA 受渡し assay 系を確立する。以上の結果を総括することにより、piRNA 生合成経路における Tud の piRNA 前駆体の受渡し機構をモデル化する。

4. 研究成果

生殖細胞特異的に発現する piRNA は、PIWI タンパク質と結合しトランスポゾンの発現を抑制すること生殖細胞を正常に保つことが知られている。piRNA を生成する経路は、2 種類(第一経路と第二経路)存在する。しかし、piRNA 生成経路はよく判っていないのが現状である。Tud の piRNA 生合成経路における詳細な作用機序の解明を目的とする。Tud の詳細な作用機序を明らかにするため、Tud と特異的に結合する新規因子の同定を試みた。ショウジョウバエ Tud の N 末 150 アミノ酸を抗原にしてモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いて免疫沈降を行ったが新規因子の同定には至らなかった。同時期に作製したカイコ Tud (BmTud) に対するモノクローナル抗体を用いて、カイコ生殖細胞由来の培養細胞である BmN4 から免疫沈降を行ったところ、他の生物において piRNA 生合成経路で関与する Spindle-E (Spn-E) のホモログ (BmSpn-E) を同定した。しかし、Spn-E の piRNA 生合成経路における詳細な機能については不明である。この BmSpn-E も TUDOR ドメインを持つ因子である。BmSpn-E の解析を進めることは、Tud タンパク質が piRNA 生合成経路でどの様に働いているかを解明するための手助けになると考えられる。BmTud 免疫沈降物には、カイコの PIWI タンパク質である Siwi も含まれることから、BmTud、BmSpn-E 及び Siwi は、複合体を形成する(図)。BmTud と相互作用を確認するため、BmSpn-E に対するモノクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて、

BmTud 免疫沈降物のウェスタンブロット解析を行うと BmSpn-E 及び Siwi のバンドが検出された。この結果より、BmTud と BmSpn-E の相互作用を確認できた。TUDOR ドメインタンパク質である。BmSpn-E の RNAi で消失させた細胞では、piRNA が減少し、カイコ PIW タンパク質である SIWI へ piRNA が load されなくなることが判った。さらに、BmSpn-E 複合体には、piRNA と結合していない空の Siwi が含まれていることが判明した。これは、piRNA が load される前の Siwi が Spn-E と結合していることが考えられる。つまり、BmSpn-E は Siwi へ piRNA を load するために必要な因子であることが示唆された。現在、BmSpn-E のどのような機能が Siwi への piRNA の load に必要であるのかを明らかにするため解析を進めている。



Krimper が卵巣と精巣において機能している段階が異なっていることを明らかにした論文に関わった (Frontiers in GENETICS, 2011) (第三著者)。この論文の中で、卵巣と精巣において piRNA 生合成経路関連因子が蓄積する Nuage 形成の階層関係が異なっていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Akihiro Nagao, Kaoru Sato, Kazumichi M. Nishida, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi. Gender-specific hierarchy in nuage localization of PIWI-interacting RNA factors in *Drosophila*. 査読有 *frontiers in GENETICS* 2011. 2: 1-9

[学会発表] (計 5 件)

①第 34 回日本分子生物学会年会

西田 知訓、Functional involvement of BmSpn-E in the piRNA biogenesis in silkworm germ line BmN4 cells, 2013 年 12 月 12 日、福岡 福岡国際会議場・マリメッセ福岡

②Keystone Symposia

Kazumichi Nishida, piRNA biogenesis in silkworm germ line BmN4 cells, 2013 年 3 月 20 日, Whistler, British Columbia Canada

③第 16 回 RNA Society Meeting

Kazumichi Nishida, piRNA processing in silkworm germline cell BmN4, 2011 年 6 月 16 日, Kyoto International conference center

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.siomilab.med.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 知訓 (NISHIDA KAZUMICHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：10598436