

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221101

研究課題名(和文)トランスポゾン侵略から生殖細胞ゲノムをまもるpiRNA動作原理の統合的理解

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of how piRNAs maintain the germline genome integrity from invasive mobile elements

研究代表者

塩見 美喜子(Siomi, Mikiko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：20322745

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 136,100,000円

研究成果の概要(和文): PIWI-interacting RNA (piRNA) は正しい遺伝情報を次世代へと受継ぐ使命を担う生殖細胞でDNA損傷を引き起こす転移性因子トランスポゾンから生殖細胞のゲノムをまもる役割を担う。しかし、その動作原理は未だ不明である。本研究課題では、特に[II] piRNA生合成と[III] piRNAによる核内サイレンシングの仕組みに焦点を絞り解析を進めることによってpiRNA機構の全貌解明を目指した。また、[III] 人工piRNAを産生する仕組みの構築および人工piRNAによる任意遺伝子の抑制も目指した。いずれの項目においても当初の計画以上の進展があり、複数の論文として発表することができた。

研究成果の概要(英文): piRNAs arm race with mobile transposons in the germline to maintain the genome integrity from injurious invasion of the transposable elements. However, the molecular mechanism underlying the piRNA pathway remains elusive. In this study supported by KIBAN-S, we focused on understanding [I] the mechanisms of piRNA biogenesis and [II] the mechanism of Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing. Moreover, [III] we aimed to establish a gene silencing system based on artificial piRNAs ectopically expressed in ovarian somatic cells. We made a lot of progress in this study; for example, we found that Yb body formation occurs in a hierarchical manner and that Vasa is necessary for releasing RNAs from Piwi-piRISC upon cleavage. Knock out of I(3)mbt induced the ping-pong machinery that was otherwise undetected in OSCs. We also solved the crystal structure of Piwi-piRISC. Moreover, we identified the cis-element necessary for producing piRNAs and its partner trans-acting protein, Yb.

研究分野：分子生物学

キーワード：PIWI piRNA トランスポゾン RNAサイレンシング ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

RNAi の発見以降、小分子 RNA を介した遺伝子発現抑制機構である RNA サイレンシングに関する研究は国内外で精力的に進められた。その結果、発生・分化や代謝など、個体形成や生体生命にとって不可欠な経路に関わる様々な因子が RNA サイレンシングによって巧妙に制御されていることが明らかとなった。トランスポソンの利己的な転移活性による生殖ゲノムの損傷は、不稔と共に次世代に誤った遺伝情報を継承するため、有性生殖を伴う動物は piRNA を中核因子とする RNA サイレンシング機構を自己防衛手段として獲得したと考えられる。しかし、その動作原理は未だ不明である。

2. 研究の目的

piRNA 機構のうち、主に [I] piRNA 生合成機構と [II] piRNA による核サイレンシング機構に焦点をあて、piRNA 機構を包括的に理解する事を目指す。さらには、[III]人工 piRNA 発現系の構築とその最適化を目指す。

3. 研究の方法

研究材料としては主に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。次世代シーケンサーや電顕、ライブイメージングなど学際最先端技術を相互創出しつつ、生化学・細胞生物学・生物情報学的側面から包括的に理解する事を目指す。

4. 研究成果

[I] piRNA 生合成機構：Yb body 形成機構の解析：piRNA 生合成の場合 Yb body 構造体の形成因子の同定を試みた。Yb body には Yb、Armi、Vret、SoYb が局在する。また、Yb を欠失すると Yb body が形成されなくなる。Yb 抗体や Armi 抗体で免疫沈降を行っても、全ての Yb body 因子の共沈降は観察されなかった。Vret 抗体を作製し免疫沈降を行ったところ、既知の Yb body 因子が共沈した。新規因子として Bor が得られたが、解析の結果、これは piRNA 生合成には関与しないという結果が得られた。Vret は SoYb を安定化する因子であること、二者は複合体として Yb body に取り込まれること、Yb body 形成のヒエラルキーは Yb > Armi > Vret/SoYb であることが判明した。  
 [II] piRNA 生合成機構：Ping-Pong サイクルにおける Vasa 機能：カイコ卵巣由来生殖細胞株 BmN4 を用いて BmVasa の機能解析をすすめた。Siwi-piRISC によって切断された標的 RNA は、AGO-RISC と異なり RISC 上に留まる。この RNA は二次 piRNA の前駆体として働くため RISC に留まった状態では二次 piRNA は作られない。Vasa は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ活性をもつため、BmVasa が Siwi-piRISC から切断された RNA を解離させる因子として機能するのではないかと考え、リコンビナントを作製し、RNA と結合した Siwi-piRISC に作

用させたところ、予想通り RNA 解離活性があることが判明した。Vasa は、Ping-Pong サイクルの中核因子として機能する 2 種類の piRISC のうち、Siwi-piRISC のみに特異的に作用することによって二次 piRNA の産生を促進する因子であると考えられた (図 1)。

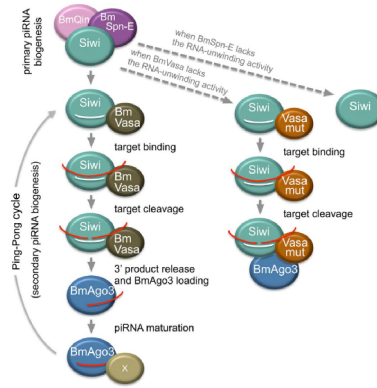


図 1 : Vasa は Ping-Pong サイクルの中核因子として機能する RNA helicase である

[I] piRNA 生合成機構：Ping-Pong サイクルを伴う新規ショウジョウバエ細胞株の作製：ショウジョウバエ生殖組織由来の細胞株で piRNA 増幅機構を有する生殖細胞株は存在しない。がん抑制転写因子 *1(3)mbt* に着目し、これを欠損した OSC 変異株を作成した。*1(3)mbt* 欠損型ショウジョウバエは脳腫瘍を形成し、その腫瘍には多くの piRNA 生合成因子が異所的に発現するという報告があったからである。*1(3)mbt* 欠損型 OSC 変異株 del ta-mbt-OSC においては piRNA 増幅場として知られる nuage が新たに形成され (図 2) しかも piRNA 増幅機構が活性化していることが判明した (図 3)。

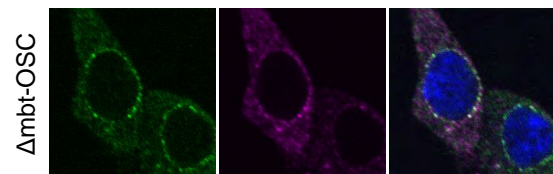


図 2 : del ta-mbt-OSC 細胞において piRNA 増幅場として知られる nuage の形成が観察された

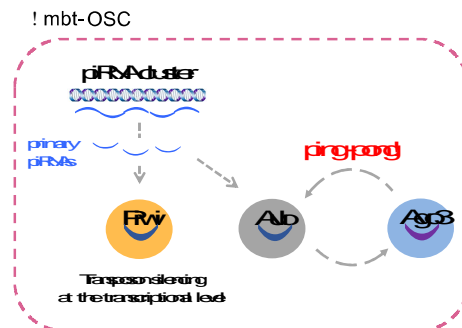


図 3 : piRNA 増幅 (Ping-Pong) 機構を獲得した新規細胞 del ta-mbt-OSC における piRNA 生合成機構の模式図

[I] piRNA 生合成機構：カイコ Siwi-piRISC の X 線構造解析：卵巣由来 BmN4 細胞から免疫沈降によって PIWI を piRISC として精製し、これを用いて piRISC 結晶構造の決定に世界で初めて成功した。また、立体構造から得られた知見をもとに各種変異体を作製し、piRNA と PIWI の結合、つまり piRISC 形成への要求性も理解することに成功した。

[II] 核サイレンシング機構：Maelstrom の X 線構造解析：Mael は piRNA による転写抑制反応に重要であるがその機能は不明である。Mael は N 末端に HMG ボックス、中央に MAEL ドメインを有する。リコンビナント MAEL ドメインを作製し、その X 線構造解析を行ったところ、RNase 活性を有するタンパク質群との高い類似性がみられた。活性残基は MAEL ドメインにおいては保存されていなかったため、Mael には RNase 活性はないと予想されたが、in vitro アッセイ系において MAEL ドメインは RNA 切断活性を維持していることが判った。

[II] 核サイレンシング機構：linker histon H1 の機能的寄与の解明 Piwi による核サイレンシング機構に関する因子の同定を試みたところ、linker histon H1 が得られた。Linker histon H1 の欠失条件下でも、Piwi 標的座標には HP1 が存在し、また、HP1 の欠失条件下でも Piwi 標的座標には H1 が存在したことから、この両者は独立して機能すると考えられた。既知因子であるが機能が不明な Mael に関して解析を進め、これが histon remodeler の活性を制御する因子であることを突き止めた。

[III] 人工 piRNA 発現系の確立：piRNA の発現に必須なシス配列を決定した。Yb body の中核因子 Yb に結合する RNA を同定するため CLIP 解析をすすめたところ、tj シス配列に Yb が結合することが判明した。Yb は、まず、piRNA 前駆体のシス配列に特異的に結合することによって Yb body にそれを収束させ、その後、下流領域にさらに結合（移動）することによって piRNA を産生する領域を決定する因子であることが示唆された（図 4）。人工 piRNA によって任意の遺伝子の発現を抑制することができることも確認できた。

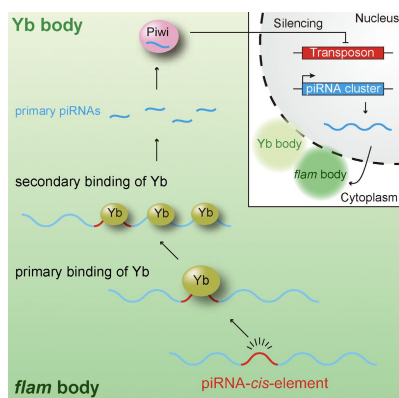


図 4 : piRNA 生合成機構におけるシス配列とトランス因子 Yb 機能の模式図

## 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 25 件 ) ( すべて査読あり )

1 Matsumoto N, Nishimasu H, Sakakibara K, Nishida KM, Hirano T, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC\* and Nureki O\*. Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA. *Cell* 67: 484-497. 2016. (\*double corresponding authors) doi: 10.1016/j.cell.2016.09.002.

2 Sumiyoshi T, Sato K, Yamamoto H, Iwasaki YW, Siomi H and Siomi MC. Loss of *l(3)mbt* leads to acquisition of the ping-pong cycle in *Drosophila* ovarian somatic cells. *Genes Development*. 30: 1617-1622.2016

doi: 10.1101/gad.283929.116

3 Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H and Saito K. Piwi modulates chromatin accessibility by regulating multiple factors including histone H1 to repress transposons. *Molecular Cell* .63: 1-12. 2016

doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.008

4 Shibata N, Kashima M, Ishiko T, Nishimura O, Rouhana L, Misaki K, Yonemura S, Saito K, Siomi H, Siomi MC and Agata K. Inheritance of a nuclear PIWI from pluripotent stem cells by somatic descendants ensures differentiation by silencing transposons in planarian. *Developmental Cell* 37: 226-237. 2016

doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.009.

5 Sato K, Iwasaki YW, Shibuya A, Carninci P, Tsuchizawa Y, Ishizu H, Siomi MC and Siomi H. Krimper enforces an antisense bias on piRNA pools by binding AGO3 in the *Drosophila* germline. *Molecular Cell* 59:553-563. 2015

doi: 10.1016/j.molcel.2015.06.024

6 Liang C, Wang Y, Murota Y, Liu X, Smith D, Siomi MC and Liu Q. TAF11 assembles the RISC loading complex to enhance RNAi efficiency. *Molecular Cell* 59:807-818. 2015

doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.006

7 Ishizu H, Iwasaki YW, Hirakata S, Ozaki H, Iwasaki W, Siomi H and Siomi MC. Somatic primary piRNA biogenesis driven by cis-acting RNA elements and trans-acting Yb. *Cell Reports* 12:429-440. 2015.

doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.035

8 Nishida KM, Iwasaki YW, Murota Y, Nagao A, Mannen T, Kato Y, Siomi H and Siomi MC. Respective functions of two

distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells. *Cell Reports*

10:193-203. 2015 .  
doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.013  
9 Ohtani H, Iwasaki YW, Shibuya A, Siomi H, **Siomi MC\*** and Saito K\*. DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the *Drosophila* ovary. *Genes Development* 27:1693-1705. 2013 .  
(\*double corresponding authors )  
doi: 10.1101/gad.221515.113  
10 Nishida KM, Miyoshi K, Ogino A, Miyoshi T, Siomi H and **Siomi MC**. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Molecular Cell* 49:680-669. 2013.  
doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.024  
など

[学会発表](計 35 件)

1 荒川耕平, 石津大嗣, **塩見美喜子**. piRNA 生合成過程における中間体 RNA の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.  
2 **Mikiko Siomi**. Molecular Mechanism Underlying piRNA Biogenesis. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.  
3 Kohei Arakawa, **Hirotsugu Ishizu**, **Mikiko Siomi**. Genic piRNA biogenesis in *Drosophila* Ovarian Somatic Cells; its molecular mechanism and meaning. CSHA conference on RNA Biology. 2016.  
4 **Mikiko Siomi**. PIWI-interacting RNAs in animals. CNAF 2016(招待講演).  
5 Kazuhiro Sakakibara, Naoki Matsumoto, Hiroshi Nishimasu, Kazumichi Nishida, Haruhiko Siomi, Osamu Nureki, and **Mikiko Siomi**. X-ray structure of *Bombyx mori* PIWI protein Siwi with piRNA. Regulatory & non-Coding RNAs. 2016.  
6 Tetsutaro Sumiyoshi, Kaoru Sato, Hitomi Yamamoto, Yuka Iwasaki, Haruhiko Siomi, **Mikiko Siomi**. Loss of l(3)mbt leads to acquisition of the ping-pong cycle in *Drosophila* ovarian somatic cells. Regulatory & non-Coding RNAs. 2016.  
7 **Mikiko Siomi**. Biogenesis of PIWI-interacting RNA. Regulatory & non-Coding RNAs(招待講演). 2016.  
8 Yumi Miyata, Kazumichi Nishida, Yuka Iwasaki, Haruhiko Siomi and **Mikiko Siomi**. Functional analysis of a piRNA factor BmQin in BmN4 cells. RNA2016.  
9 Haruna Yamashiro, Horoki Kawamura, **Hirotsugu Ishizu**, **Mikiko Siomi**. Analysis of mitochondrial piRNA factors in *Drosophila* ovarian cells. RNA2016.  
10 Ryu Yashiro, Yukiko Murota, **Mikiko Siomi**. Regulatory mechanism underlying the nuclear localization of the Piwi-piRNA complex in ovarian somatic cells. RNA2016.  
11 Ryo Onishi, Kaoru Sato, **Mikiko Siomi**.

Immunoisolation and component analysis of Piwi-piRISC functioning in transcriptional silencing in *Drosophila* ovarian somatic cells. RNA2016.

12 **Mikiko Siomi**. Biogenesis of PIWI-interacting RNA. Regulatory & non-Coding RNAs(招待講演). 2016.

13 **Mikiko Siomi**. Activation of the ping-pong cycle in *Drosophila* ovarian somatic cells. EMBO Workshop(招待講演). 2016.

14 **Mikiko Siomi**. piRNA Biogenesis in *Drosophila*. Keystone Symposia 2016(招待講演). 2016.

15 **Mikiko Siomi**. PIWI-interacting RNA in *Drosophila*; its biogenesis and function. 40th FEBS Congress(招待講演). 2015.

16 **Mikiko Siomi**. Primary piRNA biogenesis in *Drosophila* ovarian somatic cells. The World of Regulatory RNAs(招待講演). 2015.

17 **Mikiko Siomi**. Maelstrom, an endonuclease necessary for both initiation and effector phases in the piRNA pathway. 10th Microsymposium on small RNAs(招待講演). 2015.

18 **Mikiko Siomi**. Biogenesis of PIWI-interacting RNAs in *Drosophila* germline. ComBio2014(招待講演). 2014.

19 **Mikiko Siomi**. Functions of Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. the Regulatory & Non-Coding RNAs(招待講演). 2014.

20 **Mikiko Siomi**. Maelstrom, an endonuclease necessary for both initiation and effector phases in the piRNA pathway. 10th Microsymposium on small RNAs(招待講演). 2015.

21 Yukiko Murota, **Hirotsugu Ishizu**, Shinichi Nakagawa, Yuka W. Iwasaki, Shinsuke Shibata, Miharuru K. Kamatani, Kuniaki Saito, Hideyuki Okano, Haruhiko Siomi and **Mikiko Siomi**. Yb integrates piRNA intermediates and processing factors into perinuclear bodies to enhance piRISC assembly. JAJRNA Meeting. 2014.

22 **Mikiko Siomi**. Biogenesis of PIWI-interacting RNAs in *Drosophila* germline. ComBio2014(招待講演). 2014.

23 **Mikiko Siomi**. Functions of Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. the Regulatory & Non-Coding RNAs(招待講演). 2014.

24 平形樹生, 石津大嗣, **塩見美喜子**. primary piRNA 生合成に働く cis-element の探索. 第 16 回日本 RNA 学会年会. 2014.

25 難波祐里香, 佐藤薫, 松本直樹, 西増弘志, 濡木理, 塩見春彦, **塩見美喜子**. piRNA 生合成関連因子 Maelstrom の機能解析. 第 16 回日本 RNA 学会年会. 2014.

など

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

塩見美喜子 (SIOMI, Mikiko)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号：20322745

### (2)研究分担者

なし

研究者番号：

### (3)連携研究者

石津大嗣 (ISHIZU, Hirotugu)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
(平成 30 年 1 月まで)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
(平成 30 年 2 月から)  
研究者番号：40574588