

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840004

研究課題名(和文) piRNA経路の分子メカニズム解明と新規遺伝子ノックダウン法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the piRNA pathway and development of novel gene knock-down method

研究代表者

石津 大嗣 (Ishizu, Hirotugu)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40574588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： piRNAは相補的な配列を持つ転移因子の発現を負に制御する機能性小分子RNAである。申請者らは、ショウジョウバエpiRNA生成機構に関する研究の過程で人工的に配列設計したpiRNAを生成できることを見出した。本研究では、人工piRNAによる遺伝子ノックダウン法の開発を目指した。ショウジョウバエ卵巢由来培養細胞において任意の配列を持ったpiRNAを生成することができる発現ベクターを作製し、内在遺伝子を標的とした人工piRNAを生成することで遺伝子発現が抑制されるかどうかを調べた。その結果、内在遺伝子のサイレンシングに成功し、この抑制がpiRNA経路により転写レベルで起こることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： PIWI proteins, germline-specific members of the Argonaute family, function in RNA silencing in the gonad by associating specifically with PIWI-interacting RNAs (piRNAs). We found that it is possible to generate piRNAs that were artificially designed, using drosophila ovarian somatic cells. In this research, we developed the novel gene knockdown method using artificial piRNAs. We constructed the piRNA expression vectors that produces artificial piRNAs targeting optional genes, and examined the silencing effect by artificial piRNAs. As a result, artificial piRNAs succeeded in silencing of the endogenous gene, and we found that this suppression was occurred at the transcriptional level by piRNA pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード： piRNA Piwi RNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

20~30塩基長からなる機能性小分子 RNA による遺伝子発現抑制現象は、RNA サイレンシングと総称される。RNA サイレンシング機構の中核となる分子は、マイクロ RNA (microRNA : miRNA) を始めとして、RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) を誘起する small interfering RNA (siRNA) や、生殖細胞特異的に発現する PIWI-interacting RNA (piRNA) などがある。これらの小分子 RNA は Argonaute 蛋白質と結合することにより、相補的な配列を持つ標的 RNA の分解を促進する RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex : RISC) を形成する。RNA サイレンシングは、動植物に幅広く備わった機構であり、発生や疾患など様々な生命現象に関与している。

申請者はこれまでショウジョウバエをモデルとして、piRNA がどのように生成され、どのようなメカニズムで遺伝子発現を抑制するのかを研究してきた。piRNA はゲノム上の piRNA クラスターと呼ばれる領域にコードされており、この領域から転写された長い RNA がプロセシングされることで成熟型の piRNA が生成される。このような piRNA 生合成経路が保存されたショウジョウバエ卵巣体細胞由来の培養細胞株 (ovarian somatic cell : OSC) を用いた生化学的解析から、申請者らはこれまでに以下のような研究結果を得ている。

(1) piRNA 生合成に必須の蛋白質因子として Armitage (Armi)、Fts(1)Yb (Yb)、Zucchini (Zuc) を同定した。Armi と Yb は、Yb body と呼ばれる細胞質顆粒構造体の構成蛋白質である。両者とも RNA ヘリカーゼドメインを持つ RNA 結合蛋白質であり、piRNA 生合成過程の中間体と結合することが示唆された。また、Zuc はミトコンドリア外膜上に局在し、piRNA 前駆体を切断し成熟型 piRNA を生成するヌクレアーゼであることを示した。

(2) piRNA クラスターには、*flamenco* と呼ばれる X 染色体上の約 150 kb に渡る遺伝子座に代表されるレトロトランスポゾン断片配列が蓄積した領域と、特定の遺伝子の 3'非翻訳領域 (untranslated region : UTR) の 2 種類がある。3'UTR に piRNA クラスターを持つ遺伝子として *traffic jam* (*tj*) を同定した。*tj* mRNA は、Tj 蛋白質を産生すると同時に、piRNA の前駆体にもなる。

2. 研究の目的

申請者らは、piRNA 生合成経路及びサイレンシング機構に関する研究の過程で、人工的に配列設計した piRNA を生成できることを見出し、このシステムを用いた遺伝子発現抑制法の着想に至った。本研究では、piRNA による制御機構の理解を深めるとともに、人工

piRNA による遺伝子発現抑制の可否を検証し、新たな遺伝子ノックダウン法の開発を目指した。具体的には以下の研究項目を設定した。

(1) piRNA の発現に必須な *cis* エlement を同定する。

(2) piRNA 生成に必須の *cis* エlement に相互作用する蛋白質を明らかにする。

(3) OSC において任意の遺伝子の発現を人工 piRNA により抑制できるかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) piRNA の発現に必須な *cis* エlement の同定

EGFP の下流に *tj* 3'UTR 全長配列を付加したレポーター遺伝子を OSC に導入し発現させると、発現ベクター由来の piRNA が 3'UTR から合成されることがわかってきた。この発現ベクターの *tj* 3'UTR の部分欠失変異体を作製し、piRNA 生成能への影響を調べ piRNA 生成に必須の配列領域を同定した。piRNA はノーザンブロット法により検出した。また、*tj* 以外の 3'UTR に piRNA をコードする遺伝子についても同様に必須領域を特定した。

(2) piRNA *cis* エlement に相互作用する蛋白質の同定

piRNA 生合成に関与する因子として、Piwi、Armi、Yb、Zuc を同定している。High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP) 法を用いて、これらの RNA 結合蛋白質が結合する RNA 配列を同定し、*cis* エlement との結合を検証した。

(3) 人工 piRNA による遺伝子サイレンシング

(1) で同定した *cis* エlement を用いて任意の配列を持った人工 piRNA 発現ベクターを作製し、OSC の内在遺伝子を標的とした piRNA を生成し発現抑制されるかどうかを調べた。遺伝子発現量は、転写レベルの変化を定量 RT-PCR、翻訳レベルの変化をウェスタンブロット法により定量した。

4. 研究成果

(1) piRNA の発現に必須な *cis* エlement の同定

tj 3'UTR 全長配列 1467 bp の部分欠失変異体を作製した結果、202-301 bp の 100 bp の領域が、下流から piRNA を生成するために必要十分な *cis* エlement 配列であることが分かった。この *cis* エlement の下流に任意の配列を挿入し、この配列に由来する piRNA ができるかどうかをノーザンブロット法で調べた結果、任意の配列から人工的な piRNA

が発現することが分かった。一方で、*cis* エレメントの上流からは piRNA は生成されなかった。このことから、*cis* エレメントは下流にのみ作用して piRNA を生成することが示唆された。

tj とは別の piRNA コード領域である *flamenco* についても、同様に piRNA 生合成に必須の *cis* エレメントが存在するかどうかを検証した。*flamenco* は全長 150 kb 以上の長い転写領域を持つが、*flamenco* 転写産物は複数のスプライスバリエーションを持つことが知られており、特に上流に位置するエキソン 1 とエキソン 2 が高頻度に現れることが分かっていた。*tj cis* エレメントが下流に作用するという知見から *flamenco* 転写開始位置に近いエキソン 1 とエキソン 2 を選んで、piRNA 生成能を調べた。その結果、これらの領域が piRNA 生成能を持つことが分かった。また、*tj* と同様に蛋白質コード遺伝子の 3'UTR に piRNA をコードするいくつかの遺伝子について同様の実験を行い、これらの遺伝子にも *cis* エレメントが存在することを確認した。本研究により複数の piRNA *cis* エレメントを同定したが、これらの配列あるいは構造的な共通性については不明である。

(2) piRNA *cis* エレメントに相互作用する蛋白質の同定

OSC を用いた解析から、これまでに piRNA 生合成に必須の RNA 結合蛋白質として同定されていた Yb について HITS-CLIP 法を用いて結合 RNA を網羅的に同定した。その結果、Yb 結合領域が piRNA コード領域に一致することがわかった。Yb は RNA ヘリカーゼドメインを持つ蛋白質であり、ヘリカーゼドメインのモチーフ配列の変異体を作製したところ、RNA と結合できなくなることが分かった。また、この変異体では piRNA が生成できなくなることが分かった。このことから、Yb による piRNA 前駆体となる RNA への結合が piRNA 生成に必須であることが示唆された。

HITS-CLIP による解析から、Yb の結合モチーフ配列の同定を試みたが、Yb に結合配列特異性は見られなかった。このことから、Yb が *cis* エレメントに特異的に結合する *trans*-acting factor であるかどうかは明らかになっていない。しかし、RNA ヘリカーゼによる RNA 上を移動する活性によって、配列特異性が見られなくなっている可能性が考えられた。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用いて OSC の *tj cis* エレメントの欠失変異体を作製し、Yb HITS-CLIP を行うことで、*tj* 3'UTR 全体での Yb 結合に影響が見られるかどうかを調べた。その結果、*tj cis* エレメント欠失変異体では、Yb の 3'UTR 全体への結合量が低下していた。このことから、Yb はまず、*cis* エレメントに結合し、RNA ヘリカーゼ活性により下流に移動しながら piRNA 生成に作用するというモデルが示唆された。

しかし、Yb とは別の *trans*-acting factor が存在する可能性は否定できない。

(3)人工 piRNA による遺伝子サイレンシング
(1)で作製した人工 piRNA 発現ベクターを用いて内在遺伝子を標的とする piRNA を設計し、OSC において発現させた。ここでは内在遺伝子として *krimper* と呼ばれる遺伝子を選んだ。*krimper* の 5'UTR、CDS、3'UTR のそれぞれに対して相補的な人工 piRNA を発現させ、その抑制効果をウェスタンブロットと免疫染色により調べた。その結果、全ての標的において蛋白質発現が抑制されていることが分かった。とくに、開始コドン付近を標的とした場合と、3'UTR を標的とした場合で、高い抑制効果が見られた。この抑制が転写レベルで起こっているかどうかを確認するために、Pol ChIP を行った結果、Pol 結合量が低下していることが分かった。また、Piwi をロックダウンして、piRNA 経路を働かなくした場合、*krimper* の発現抑制は見られなくなることが分かった。これらのことから、人工的に発現させた piRNA により転写レベルでのサイレンシングが可能であることが示された。

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)

Murota Y, Ishizu H, Nakagawa S, Iwasaki YW, Shibata S, Kamatani MK, Saito K, Okano H, Siomi H. and *Siomi MC. Yb Integrates piRNA Intermediates and Processing Factors into Perinuclear Bodies to Enhance piRISC Assembly. **Cell reports**, 8(1), 103–113, (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.05.043

[学会発表](計 3 件)

石津大嗣、人工 piRNA 発現システムを用いた piRNA 生合成機構の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

石津大嗣、人工 piRNA 発現システムを用いた piRNA 生合成機構の解析、第 16 回日本 RNA 学会年会、2014 年 7 月 23 日、ウインクあいち(愛知県名古屋)

石津大嗣、人工 piRNA 発現システムを用いた RNA サイレncing 機構の解析、2013 年 7 月 25 日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)

[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：
出願年月日：
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

石津 大嗣 (ISHIZU, Hirotugu)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：40574588

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：