

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 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：25840041

研究課題名(和文)カイコ生殖細胞BmN4を用いたin vitro piRNA生合成経路の再構成

研究課題名(英文)Reconstruction of in vitro piRNA biogenesis using silkworm germ line BmN4 cells

研究代表者

西田 知訓(NISHIDA, Kazumichi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10598436

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、生殖細胞特異的に発現する小分子RNAで、PIWIタンパク質と複合体を形成し遺伝子発現を抑制する。piRNAは、第一次と第二次経路で生成される。しかし、piRNA生合成経路については、未だ不明な点が存在する。そこで、カイコ生殖細胞であるBmN4を用いて、piRNA生合成経路の解明を試みた。PIWIタンパク質であるSiwiとBmVasaと結合していることが判った。さらに、第二次piRNA生合成経路において、BmVasaタンパク質のタンパク質からRNAを解離する機能が重要であることを明らかにした。また、BmSpn-Eと呼ばれるタンパク質は、第一次生合成経路で機能していることも判明した。

研究成果の概要(英文): piRNAs associate with PIWI proteins and silence selfish transposable elements. piRNA biogenesis consists of two sequential steps; primary piRNA processing and the Ping-Pong cycle. However, piRNA biogenesis remains elusive. We aimed to elucidate about piRNA pathway. A Bombyx mori germ cell line, BmN4, is an excellent tool to investigate the molecular pathways of piRNA biogenesis. BmN4 expresses two PIWI proteins (Siwi and BmAgo3). We show that Siwi binds with BmVasa. BmVasa is DEAD-box RNA helicase protein. A lack of BmVasa abolishes the Ping-Pong cycle. Also, Siwi is associated with BmSpn-E. BmSpn-E, unlike BmVasa, is necessary for primary piRNA production. We propose a new model for piRNA biogenesis, where the BmSpn-E function in primary piRNA processing, whereas BmVasa is important for the Ping-Pong cycle.

研究分野: RNA生物学

キーワード: piRNA生合成 PIWIタンパク質 RNAヘリカーゼタンパク質 生殖細胞 カイコ

1. 研究開始当初の背景

RNAサイレンシングと呼ばれる20-30塩基長の小分子RNAが引き起こす遺伝子発現抑制機構が存在する。このRNAサイレンシングの代表例がRNAi機構である。このRNAi機構で中心的な役割を果たしている因子がArgonauteタンパク質である。Argonauteタンパク質は、AGOとPIWIの2種類のサブファミリーに分類される。

PIWIタンパク質は、生殖細胞特異的に発現し、piRNA (PIWI-interacting RNA) と複合体を形成することでトランスポゾンなどの遺伝子発現を抑制し、生殖細胞内でゲノムの品質管理を行っている。piRNAは、まずPrimary pathwayで作られ、その後Ping-pong cycleで増幅される。Ping-pong cycleでは、PIWIタンパク質自身がpiRNAの生成に関与している。これまでpiRNA生成経路に関与する因子が、多く同定されてきた。しかし、それらの因子がどの段階で、どのように機能することでpiRNA生成経路が成り立っているのかについては未だよく判っていないのが現状であった。

piRNA生合成経路を理解するためには継代可能な生殖細胞由来細胞株が有用であるが、ショウジョウバエやマウス、魚などの動物種においては入手不可能である。しかし、カイコには卵巣由来生殖細胞から樹立した培養細胞であるBmN4が存在する。BmN4では、2種類のPIWIタンパク質 (SiwiとBmAgo3) が発現していること、PIWIタンパク質がpiRNAと結合すること、piRNA生合成経路を持つことが判っている。

2. 研究の目的

私は、作製したSiwi及びBmAgo3に対する特異的なモノクローナル抗体を用いた解析からSiwi及びBmAgo3は多数のタンパク質因子と相互作用していることが判明した。これまでに相互作用する因子としてショウジョウバエのSpindle-E (Spn-E) ホモログであるBmSpn-EとショウジョウバエのQinホモログであるBmQinを同定した。この2つの因子は、ショウジョウバエやマウスの解析からpiRNA生合成経路に関与することが判っている。しかし、これら因子の分子機能については未だ不明である。生化学的な解析することで、piRNA生合成経路におけるこれら因子の分子機能を明らかにする。

また、これまでin vitroにおいてpiRNA生合成経路 (Ping-pong cycle) を再構成したという報告はない。in vitroにおけるpiRNA生合成経路の再構成はpiRNA生合成経路を理解するために重要である。そこで、申請者はカイコ生殖細胞由来培養細胞BmN4を用いてin vitro piRNA生合成経路を再構成し、piRNA生合成経路の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 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。BmSpn-E複合体及びBmQin複合体に含まれるpiRNA前駆体を同定する抗BmSpn-E抗体を用いたCrossLinking ImmunoPrecipitation (CLIP) 法により、piRNA前駆体の精製を行い、piRNA前駆体のライブラリーを作成する。その後、次世代シーケンサの使用とバイオインフォマティクス解析により、piRNA前駆体を同定する。

(2) piRNAは、主にトランスポゾンを標的として発現を抑制することで生殖細胞ゲノムの品質管理を担っている。piRNA生合成経路に関与する因子を同定する上で、トランスポゾン遺伝子の脱抑制は判断基準になる。Siwi-piRNA複合体によるトランスポゾンの発現抑制を明らかにするために、Siwiに対するsiRNAを用いてノックダウンしたBmN4を用意し、RNA seqによって、どのトランスポゾンが発現上昇するかをみる。

(3) Ping-pong cycleにおけるSiwiからBmAgo3 (または逆) へのpiRNA受渡しのin vitro assay系を確立する。

(4) この受渡しに関わる因子を同定する。

(5) piRNA生合成経路におけるBmSpn-Eの機能解析
以上の結果を総括することにより、piRNA生合成経路のモデル化をする。

4. 研究成果

(1) 作製したBmSpn-Eに対するモノクローナル抗体を用いて、CLIP法を行ったところ、BmSpn-EがRNAと結合していることが判明した。さらに、BmQinもCLIP法により、RNAと結合している結果を得た。現在、結合するRNAの同定を進めている。

(2) BmN4細胞でBmAgo3をノックダウンした条件下でSiwiを発現されるとSiwiにはpiRNAがloadされていた。一方、Siwiをノックダウンした条件下でBmAgo3を発現されるとBmAgo3にはpiRNAがloadされていなかった。この結果は、SiwiにはPrimary pathwayで生成されたpiRNAがloadされ、BmAgo3にはping-pong cycleで生成されたpiRNAがloadされると示唆された。Siwiに対するsiRNAを用いてノックダウンしたBmN4において、一部のトランスポゾンが上昇することが判った。特に急上昇する1種類の新規のトランスポゾンが存在することも明らかにした。このトランスポゾンはLTR型に分類されるものであった。

(3) PIWIタンパク質-piRNA複合体は、piRNAの配列をガイドとして標的RNAを探し出し、PIWIタンパク質のRNAを切断す

る活性(slicer 活性)により標的 RNA を切断することで遺伝子発現を抑制している。さらに、この活性は、ping-pong cycle において、piRNA の生成のために重要であることが知られている。

Siwi 抗体の用いた免疫沈降法により精製した Siwi-piRNA 複合体の標的 RNA への slicer 活性実験を行った結果、Siwi に slicer 活性が保存されていることが確認できた。さらに、切断後の標的 RNA は、Siwi 複合体に結合したままであることが明らかになった。しかし、AGO サブファミリーであるショウジョウバエ Ago2 は、標的 RNA を切断後、解離することが判った。以上の結果から、ping-pong cycle を円滑に進めるために Siwi 複合体は切断後の標的 RNA を保持していることが示唆された。

(4)ショウジョウバエ Vasa ホモログであるマウス MVH の解析から、MVH が ping-pong cycle に関与していることが示唆されていた。Vasa は、DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼと呼ばれる RNA やタンパク質などの高次構造を解きほぐす機能が有ると言われているタンパク質である。そこで、Siwi 複合体から標的 RNA を解離される因子の候補因子として、Vasa に注目した。カイコにも Vasa のホモログ(BmVasa)が発現していることも報告されている。まず、BmVasa の抗体を作製して、免疫沈降法により Siwi との結合を確認し、複合体を形成していることが判った。さらに、切断後の標的 RNA を保持した Siwi 複合体に、BmVasa を加えたところ、標的 RNA が解離した。この解離は、BmVasa のヘリカーゼ活性が重要であることも明らかにした。BmVasa をノックダウン条件下で、Siwi または BmAgo3 を発現させて piRNA の有無をみたところ、Siwi は piRNA と結合しているのに対し、BmAgo3 は piRNA が load されていなかった。これらの結果から、BmVasa のヘリカーゼ活性が、ping-pong cycle のために必須であることが判明した。

(5)Siwi は、BmVasa との複合体とは異なる BmSpn-E 及び BmQin と複合体を形成している。BmSpn-E をノックダウンして、piRNA の発現量をみたところ、Siwi に結合している piRNA が減少していた。この結果は、BmSpn-E が Primary pathway で機能していることを示す。

本研究により、piRNA 生合成経路における新たなモデルを提唱することができた。

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)

Kazumichi M. Nishida, Yuka W. Iwasaki, Yukiko Murota, Akihiro Nagao, Taro

Mannen, Yumiko Kato, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi.

Respective Functions of Two Distinct Siwi Complexes Assembled during PIWI-Interacting RNA Biogenesis in *Bombyx* Germ Cells

Cell Reports. 2015. 10: 193-203. 査読有

[学会発表](計4件)

Kazumichi M. Nishida, Yuka W. Iwasaki, Yukiko Murota, Taro Mannen, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi.

Respective functions of two distinct Siwi, a silkworm PIWI, complexes assembled during piRNA biogenesis in insect germ cells.

日本分子生物学会、
2014年11月25日~2014年11月27日、
パシフィコ横浜(横浜市)

Kazumichi M. Nishida, Yuka W. Iwasaki, Yukiko Murota, Taro Mannen, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi.

Respective functions of two distinct Siwi, a silkworm PIWI, complexes assembled during piRNA biogenesis in insect germ cells.

Joint Australia and Japan RNA,
2014年11月2日~2014年11月5日、
University of Technology Sydney
(Australia)

Kazumichi M. Nishida, Yuka W. Iwasaki, Yumiko Kato, Masakazu Motomiya, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi.
BmVasa involve discharge of cleavage product from piRISC in silkworm piRNA biogenesis.

第14回東京大学生命科学シンポジウム、
2014年4月26日
東京大学(東京都)

西田 知訓、加藤 弓子、岩崎 由香、渋谷 あおい、齋藤 都暁、塩見 春彦、塩見 美喜子、カイコ piRNA 生合成経路における BmQin の機能解析

第15回日本 RNA 学会年会、
2013年7月24日~2013年7月26日、
ひめぎんホール(愛媛県)

[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.a
c.jp/index.html](http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

西田 知訓 (NISHIDA, Kazumichi)

東京大学大学院理学系研究科

特任助教

研究者番号：10598436