

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891004

研究課題名(和文)トランスポゾンの抑制に機能するpiRNAの3'末端形成機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of 3'-end formation mechanism of piRNAs involved in the silencing of transposons

研究代表者

泉 奈津子 (Izumi, Natsuko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50579274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：piRNA (PIWI-interacting RNA) は生殖細胞のゲノムをトランスポゾンの脅威から守る小分子RNAである。本研究では、これまで存在が予想されながら分子実体が不明であったpiRNA前駆体の末端を削りこみ、成熟型piRNAをつくりだすヌクレアーゼTrimmer (トリマー) を同定し、piRNAの成熟機構とその重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A class of small RNAs called PIWI-interacting RNAs (piRNAs) plays an important role in protecting the germline genome from the threat of transposons. This study identified "Trimmer" the enzyme that trims the 3' end of precursor piRNAs to generate mature piRNAs, and demonstrated the mechanism and significance of piRNA maturation.

研究分野：RNAサイレンシング

キーワード：RNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む生物ゲノムには、ゲノム上を自由に転移できるトランスポゾンとよばれる配列が存在する。トランスポゾンの無秩序な転移は、生物の遺伝情報を破壊する可能性があり、特に次世代の個体をつくり出す生殖細胞では、その活性を抑制することは極めて重要である。近年、piRNA (PIWI interacting RNA) と呼ばれる小分子 RNA が動物の生殖細胞に特異的に発現しており、生殖細胞でのトランスポゾンの発現抑制に中心的役割を担っていることが明らかになってきた。

piRNAはRNA切断活性を有するPIWIタンパク質と複合体を形成し、標的トランスポゾンの転写抑制やトランスポゾン RNA の切断を介して、トランスポゾンの活性を封じ込める。piRNAがどのようにしてつくられるのか、そのプロセスは未だ不明な点が多いが、生成の最終段階で、成熟型より長いpiRNA前駆体がPIWIタンパク質に取り込まれ、その末端が削りこまれることで成熟型piRNAがつくられると考えられている。

私たちの研究グループは、内在的にpiRNAを発現するカイコ卵巣由来のBmN4細胞を用いて、piRNAの生成過程の一部を試験管内で再現する方法を確立してきた。さらにこの実験系での解析から、piRNA前駆体の末端を成熟型の長さまで削りこむ活性（以降トリミング活性と呼ぶ）が細胞の不溶性画分に存在していることを見出し、その活性を担うと考えられる仮想上のヌクレアーゼを「Trimmer (トリマー)」と名付けた。しかし、細胞の不溶性画分からトリミング活性を可溶化できないという問題がTrimmerの同定を阻み、これまでその分子実体は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、生殖細胞のゲノムをトランスポゾンの脅威から守る小分子RNA、piRNAが前駆体から成熟する機構を明らかにすることを目的とする。特にその存在が予想されていないながら、実体が不明なpiRNAの3'末端形成を担うヌクレアーゼ Trimmer を同定し、Trimmerを中心とした解析からpiRNAの3'末端プロセッシング機構の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究は (1) Trimmer の同定 (2) piRNA 3'

末端形成に関わる因子と Trimmer の関係の解析という2つの内容から構成される。

(1) Trimmer の同定

Trimmer の同定を阻む最大の要因は、細胞の不溶性画分からトリミング活性を可溶化できないことにあった。予備実験の結果、ミトコンドリア粗精製画分を用いることで、一部のトリミング活性を可溶化できる条件を見出すことに成功した。この画分からTrimmerを同定するため、各種クロマトグラフィによりトリミング活性を分離し、piRNA前駆体に対するトリミング活性を指標に活性タンパク質の精製を試みる。最終的に得られた精製画分に含まれるタンパク質を質量分析により同定する。TrimmerはMg²⁺依存性3'-5'DNA/RNAエキソヌクレアーゼであることが示唆されていることから、これに合致する候補ヌクレアーゼを選別し、ノックダウン実験により細胞のトリミング活性が低下するか、内在のpiRNAの長さに影響を与えるかを検証する。

(2) piRNA 3'末端形成に関わる因子と Trimmer の関係の解析

PIWIタンパク質結合因子の一つであるPapiの機能阻害は、piRNAの伸長を引き起こすことから、piRNA前駆体の3'末端トリミングへの関与が示唆されていた。しかしPapi自体にはヌクレアーゼドメインが予想されず、トリミングにおけるPapiの役割や、Trimmerとの関係は不明であった。そこで、PapiノックダウンとTrimmerノックダウンでのpiRNAの長さに与える影響の比較や、Papiの機能ドメインの変異体を用いた解析から、piRNA前駆体のトリミングにおけるPapiの役割とTrimmerとの関係を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、PIWIタンパク質結合因子であるPapiの結合タンパク質の解析から、PARN (polyA specific ribonuclease) に類似したヌクレアーゼドメインを有する機能未知のヌクレアーゼ PNLDC1 (PARN like domain containing 1) をカイコのTrimmerとして同定した。Trimmerはミトコンドリア画分に多く存在し、膜貫通ドメインが予想されることから、ミトコンドリア膜タンパク質だと考えられた。興味深いことにTrimmerは単独では機能できず、Papiと協力してpiRNA前駆体の末端を削りこんでいることが明らかとなった。

さらに Papi の機能ドメインの変異体解析から、Papi の PIWI タンパク質との相互作用、核酸結合能がトリミングに必要であることも明らかとなった。これらの結果から、piRNA 前駆体トリミングのメカニズムとして、piRNA 前駆体を取りこんだ PIWI タンパク質を Papi がミトコンドリア膜上に引き寄せ、さらに piRNA 前駆体と結合することで、Trimmer が piRNA 前駆体を削りやすくしているというモデルが考えられた。

また、piRNA 前駆体を取りこんだ PIWI タンパク質に比べ、トリミング後の成熟型 piRNA を結合した PIWI タンパク質の方が、効率的に標的 RNA を切断できたことから、piRNA 前駆体がトリミングを受けて成熟型になることが、piRNA が機能を発揮する上で重要であることが示された。

本研究は、モデル系であるカイコ卵巣由来の BmN4 細胞を用いて行われたが、マサチューセッツ州立大学 Craig Mello 博士らによる解析から、線虫においても PARN のホモログが線虫 piRNA 前駆体の末端のトリミングにはたっていることが同時報告された。また、カイコ Trimmer のホモログはマウスやヒトにも保存されていることから、そのはたらきは種を超えた普遍的なものであると予測される。これらの研究結果は、piRNA が前駆体から成熟するしくみとその重要性を明らかにしたものであり、生殖細胞のゲノムを守る piRNA 生成メカニズムの理解を大きく前進させる成果といえる。

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 3 件)

1. Izumi N, Shoji K, Sakaguchi Y, Honda S, Kirino Y, Suzuki T, Katsuma S, Tomari Y: Identification and functional analysis of the pre-piRNA 3' Trimmer in silkworms. *Cell*, 164, pp962-73, 2016. doi:10.1016/j.cell.2016.01.008.

2. Wang W, Yoshikawa M, Han BW, Izumi N, Tomari Y, Weng Z, Zamore PD: The initial uridine of primary piRNAs does not create the tenth adenine that is the hallmark of secondary piRNAs. *Mol Cell.*, 56, pp708-16, 2014. doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.016.

3. Izumi N, and Tomari Y: Diversity of the piRNA pathway for nonself silencing:

worm-specific piRNA biogenesis factors. *Genes Dev.*, 28, pp665-71, 2014. doi: 10.1101/gad.241323.114.

[学会発表] (計 2 件)

1. Natsuko Izumi, Keisuke Shoji, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki, Susumu Katsuma, Yukihide Tomari: Identification of pre-piRNA trimming enzyme "Trimmer" in the silkworm (ポスター), 第 17 回日本 RNA 学会, ホテルライフオーソ札幌 (札幌).
2. Natsuko Izumi and Yukihide Tomari: A biochemical approach to identify "Trimmer", the pre-piRNA 3'-end processing enzyme (poster), jajRNA meeting 2014 (Sydney).

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

泉 奈津子 (IZUMI Natsuko)
東京大学 分子細胞生物学研究所 助教
研究者番号: 50579274

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：