

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14666

研究課題名(和文)細胞質RNA顆粒体Yb bodyのプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic mapping of Yb body in live OSCs via APEX tagging

研究代表者

石津 大嗣(Ishizu, Hirotsugu)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：40574588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の細胞内には様々な種類のRNA顆粒が存在している。これらのRNA顆粒は、タンパク質とRNA間の多価結合によって生じる液液相転換により形成される。Yb bodyはショウジョウバエ卵巣体細胞においてpiRNA前駆体とpiRNA生合成因子から成る膜を持たない顆粒構造体であり、piRNA生合成に関与することが知られている。しかし、Yb bodyの機能や構成因子の全容は未解明である。本研究では、細胞内での特異的なタンパク質間ネットワークを調べるために用いられるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APEX)を融合したYbをOSCで発現し、Yb body局在化タンパク質を特異的に標識することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cells contain many kinds of RNP granules; P bodies, stress granules, etc. Several observations suggest that liquid-liquid phase separation is the molecular basis for RNP granule assembly. Weak multivalent interactions between RNA-binding proteins and ssRNAs play a role in RNP granule assembly. Yb bodies are non-membrane-bound organelles consisting of precursor piRNA transcripts and piRNA factor proteins in *Drosophila* ovarian somatic cells, and are involved in piRNA biogenesis. However, the composition and function of Yb bodies are largely unknown. Ascorbic acid peroxidase (APEX) has been used to interrogate specific protein networks. In this study, APEX was fused to Yb to capture components of Yb bodies in OSCs. We found that APEX proximity labeling was able to enrich protein components of Yb bodies.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Yb body RNA granule APEX

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。PIWI-interacting RNA (piRNA)は、生殖細胞特異的に発現する小分子RNAであり、生殖細胞においてPIWIと呼ばれるArgonauteタンパク質と結合することでレトロトランスポソンの発現を抑制し、転移因子による有害変異から自身のゲノムを護る役割を担っている。piRNAが関与するRNAサイレンシングは、次世代に遺伝情報を継承する生殖細胞が利己的転移因子に対して構築した防御機構であり、この防御機構の背景には分子レベルで自己非自己の識別を可能にする巧妙なシステムの存在が予想されている。これまでに、piRNA生合成経路が保存されたショウジョウバエ卵巣由来培養細胞OSCを用いてpiRNA生合成経路の解析を行なった結果、RNA結合タンパク質であるArmitage (Armi)とFs(1)Yb (Yb)がpiRNA前駆体と相互作用することでpiRNA生合成に関与することを見出した。さらに、piRNA生成に必須の因子としてZucchini (Zuc)と呼ばれるミトコンドリア外膜に局在するRNA分解酵素を同定した。ArmiとYbは、piRNAの前駆体となるRNAとともにYb bodyと呼ばれる膜を持たない細胞質顆粒体に局在している。piRNA生合成に必須のタンパク質としてその他にもいくつかの因子が同定されており、これらの因子もYb bodyに局在することが分かっていた。また、Yb抗体を用いた免疫電顕法による観察から、Yb bodyがミトコンドリアに隣接することが明らかとなり、ZucとYb body構成タンパク質との相互作用が示唆された。以上のことから、Yb bodyはpiRNA生合成及び、サイレンシングに作用するPiwi-piRNA複合体形成の場として機能すると考えられる。しかし、Yb body構成因子の全容は不明であり、piRNAの前駆体となるRNAを選択的に局在化させるメカニズムや顆粒形成機構などはわかっていない。

真核生物の細胞内にはP bodyやStress granuleなど、Yb bodyに類似したタンパク質とRNAの凝集体が複数種類存在している。これらのRNA顆粒体は、mRNAの貯蔵や分解に働くことで細胞状況に応じて遺伝子発現を制御している。転写後発現制御において、一群のRNAを選択的に特定の場所に局在化させるRNA顆粒体の重要性は明らかである。しかし、免疫沈降法などでの精製が困難であることから生化学的な解析は十分進んでおらず、その形成メカニズムや構成因子のダイナミクスに関しては不明な点が多い。そこで本研究では、近年開発されたアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX)を用いたプロテオーム解析により、Yb body局在化タンパク質を網羅的かつ定量的に同定し、Yb body形成機構及びpiRNA生合成機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

piRNAは、相補的な配列を持つレトロトランスポソンの発現を負に制御する生殖細胞特異的な機能性小分子RNAである。ショウジョウバエ生殖細胞において、piRNAはYb bodyと呼ばれる細胞質顆粒構造体で生成されることが示唆されている。Yb bodyは複数種のタンパク質とpiRNA前駆体となるRNAにより構成されるRNA顆粒体であるが、その構成因子や形成機構に関しては不明な点が多い。本研究では、プロテオーム解析による細胞内RNA顆粒体の網羅的かつ定量的な解析プラットフォームを構築し、Yb body構成因子を同定することでYb bodyにおけるpiRNA生合成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞株OSCを用いて、細胞質顆粒構造体Yb bodyの局在タンパク質を同定するために、APEXによる*in vivo*タンパク質ビオチン標識を行った。APEXは過酸化水素水存在下でフェノール誘導体のラジカル化を触媒する。その触媒作用はチラミドシグナル増幅法に用いられるHRPと同様であるが、APEXはHRPと異なり生細胞内においても活性が維持されるため、生細胞内での標識が可能となる。本研究では、Yb bodyに局在するタンパク質をAPEXによりビオチン標識し、ストレプトアビジンビーズを用いたプルダウン法によりYb body局在タンパク質を単離した。

4. 研究成果

Yb bodyに局在化するタンパク質をビオチン標識するために、Ybタンパク質のN末端側にAPEXを融合した組換えタンパク質ベクターを作製し、OSCにトランスフェクションすることで一過的にAPEX融合Ybを発現させた。また、NESを付加したAPEX融合EGFP発現ベクターを作製し、ネガティブコントロールとして用いた。トランスフェクション後、48時間培養したOSCにビオチンフェノール及び過酸化水素を添加することで、APEXによるタンパク質ビオチン標識を行った。細胞を固定し、蛍光標識ストレプトアビジンによるビオチン化タンパク質の染色とanti-Yb抗体を用いた免疫染色を組み合わせた二重染色を行った結果、Yb bodyとビオチン化タンパク質のシグナルが共局在した。また、ビオチン化処理した細胞からストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化タンパク質を精製した結果、既知のYb body局在因子であるYb及びArmiが含まれていることをウェスタンブロットティングにより確認した。以上の結果から、OSCにおいてYb body局在化タンパク質を特異的にビオチン化できることがわかった。

トランスフェクションによる一過的な発

現により,OSCにおいてAPEXを用いたYb body 局在化タンパク質のピオチン標識法を確立できた。しかし,トランスフェクションでは導入効率が低くプロテオーム解析に十分な量のピオチン化タンパク質が得られず,また,過剰発現によるバックグラウンドの増加が問題となった。そこで,APEX融合Ybの発現量を内在Ybと同じにするために,APEXをノックインしたOSC細胞株を作製した。ノックインはCRISPR-Cas9システムを用いて行った.N末端にAPEXが付加されるようにドナー配列を設計し,Cas9発現ベクター及びsgRNA発現ベクターと共にOSCに導入した。薬剤選択と希釈培養によるクローニングにより,目的のノックインOSC細胞株を作製できた。この細胞を用いて,最適なピオチン標識条件を確立した。今後,この細胞株を用いてiTRAQ法による定量プロテオーム解析を行う予定である。

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)

Ishizu H, Sumiyoshi T, *Siomi MC. Use of the CRISPR-Cas9 system for genome editing in cultured *Drosophila* ovarian somatic cells. *Methods*. 査読有, 2017 May;126:186-192. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.05.021>

Guida V, Cernilogar FM, Filograna A, De Gregorio R, Ishizu H, Siomi MC, Schotta G, Bellenchi GC, Andrenacci D. Production of Small Noncoding RNAs from the *flamenco* Locus Is Regulated by the gypsy Retrotransposon of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 査読有, 2016 Oct;204(2):631-644. <http://doi.org/10.1534/genetics.116.187922>

Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H, Saito K. Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. *Molecular Cell*. 査読有, 2016 Aug 4;63(3):408-419. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.008>

[学会発表](計 4 件)

木下 達貴, 石津 大嗣, 塩見 美喜子
primary piRNA 生合成における RNA
ヘリカーゼ Armitage の機能解析

2017 年度生命科学系学会合同年次大会
(兵庫県神戸市), 2017 年 12 月 6 日

山城はるな, 石津 大嗣, 塩見 美喜子
primary piRNA 生合成における RNA
ヘリカーゼ Armitage の機能解析

2017 年度生命科学系学会合同年次大会
(兵庫県神戸市), 2017 年 12 月 6 日

Ishizu, H., Kinoshita, T., Siomi, MC
Role of the RNA helicase, Armitage, in
the primary piRNA biogenesis pathway
The 43rd Naito Conference on
“NoncodingRNA: Biology, Chemistry,
& Diseases”, CHATERAISE Gaueaux
Kingdom SAPPORO (北海道札幌市),
2017 年 6 月 27 日

Ishizu, H., Kinoshita, T., Siomi, MC.
Role of the RNA helicase, Armitage,
in the primary piRNA biogenesis
pathway
The 2016 joint annual meeting of the
RNA Society and the RNA Society of
Japan, 国立京都国際会館(京都府京都
市), 2016 年 6 月 28 日

[図書](計 2 件)

石津 大嗣, 塩見 美喜子
CRISPR-Cas システムの多様性と応
用技術の拡大
和光純薬時報 Vol.86 No.1, 和光純
薬工業株式会社, 2018, p.2-4

石津 大嗣

既知タンパク質に結合する RNA の網羅
的解析手法 FAST-iCLIP
実験医学 別冊「エピジェネティクス実
験スタンダード」, 羊土社, 2017,
p.251-273

〔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 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.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

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：

(4)研究協力者

()