

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02375

研究課題名(和文) Tudorドメイン蛋白質群が関与するpiRNA生合成経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of piRNA biogenesis involving Tudor domain proteins

研究代表者

甲斐 歳恵 (Kai, Toshie)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：40579786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、生殖巣でトランスポゾンを抑えている小分子piRNAの生合成に機能する、Tudorドメインを持つ蛋白質(Tdrd蛋白質)群の機能解析を行った。Tdrd1変異体精巣ではpiRNA生合成が損なわれており、その結果、Stellateタンパク質が強発現していることや、Tdrd1蛋白質はPiwiファミリー蛋白質と相互作用することを明らかにした。また、RNAヘリカーゼモチーフと核局在化配列を持つショウジョウバエTdrd9は、他のTdrd蛋白質の天然変性領域に依存して細胞質へと移行することや、Vasa蛋白質とは異なるpiRNAプロセッシング複合体を形成していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポゾンを抑え、生殖細胞のゲノムを保護するpiRNAの生合成に関わるTudorドメインタンパク質(Tdrd)群の機能解析を行い、ショウジョウバエTdrd1の機能を明らかにした。またTdrd9が核から細胞質へ移行する機構の一端も明らかにした。これらの機能が破綻すると、ゲノムが不安定になり、生殖細胞の発生が損なわれ、動物は不妊となる。

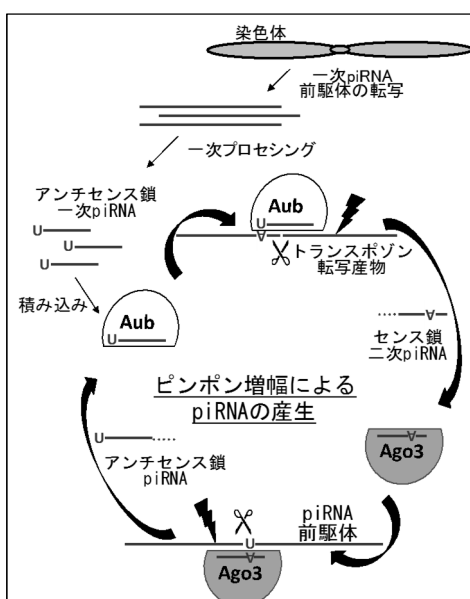
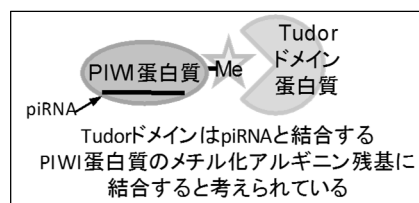
研究成果の概要(英文)：In this research project, we analyzed the functions of Tudor domain proteins (Tdrd) that function in the biogenesis of a class of gonad specific small RNAs, called piRNA, those suppress transposons. In tdrd1 mutant testes, piRNA biogenesis was affected, causing upregulation of Stellate protein. As expected, Tdrd1 protein physically interacted with Piwi family proteins. In addition, it turned out that Drosophila Tdrd9, an RNA helicase containing functioning in piRNA pathway, translocated to the cytoplasm depending on the intrinsically disordered region of other Tdrd proteins, and forms a piRNA processing complex different from that with the other RNA helicase, Vasa.

研究分野：生殖生物学

キーワード：piRNA Drosophila meganogaster germline

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの40%を占める転移因子・トランスポゾンの転移は、染色体の欠損や重複、遺伝子の挿入変異等の甚大なゲノム損傷を引き起こす。生殖細胞ゲノムの損傷を防ぐために、piRNAと呼ばれる23~30塩基長の小分子RNAが、トランスポゾンの発現を抑制している。piRNA経路はヒトやマウスなどの哺乳類でも保存されているが、遺伝学・生化学解析ツールが豊富なショウジョウバエがすぐれたモデル系となっている。piRNA産生機構の詳細が徐々に明らかになってきたが、多くの未解決の問題が残されている。応募者は、遺伝学的な解析によって、生殖細胞でのpiRNAの産生に必要な不可欠な因子として複数のTudorドメイン蛋白質を報告してきたが(右図参照)、その多くは分子機能が未解明のままである。本研究課題では、Tudorドメイン蛋白質群の機能解析を中心に、piRNA生合成機構の包括的理解を目指す。



piRNAは、トランスポゾンの残骸が集積する領域からpiRNAの前駆体が転写され、一次プロセッシングによって一次piRNAが産生される(左図参照)。一次piRNAはPIWIファミリー蛋白質のAubに積み込まれ、そのAubがトランスポゾン転写産物を切断する。その切断されたRNA断片から二次piRNAが産生され、Ago3に積み込まれる。Ago3はpiRNA前駆体を切断し、その切断断片からpiRNAが産生される。ピンポン増幅とも呼ばれるこの二次生合成経路では、PIWIファミリー蛋白質であるAubとAgo3が中核的な役割を果たすが、それだけでは不十分で、AubとAgo3上にあるメチル化アルギニン残基と相互作用するモチーフを持つ、複数のTudorドメイン蛋白質

が不可欠である(*Pek, Anand and **Kai**, 2012 Development; *Lim and **Kai**, 2015 Sem Cell Dev Biol.)。

ピンポン増幅に関与する多くの蛋白質は、細胞質中の「ヌアージュ」と呼ばれる構造体に集積し、協調してpiRNAを産生すると考えられている。ヌアージュに局在するTudorドメイン蛋白質の一つ、Tdrd5を欠損したマウスやショウジョウバエではピンポン増幅が顕著に損なわれるが(Patil and **Kai**, 2009 Current Biol)、Tdrd5がどのような分子機能を持っているかはわかっていない。また、ヌアージュに局在する別のTudorドメイン蛋白質・Tdrd9は、他グループらによって一次piRNA生合成経路での機能が報告されているが、ピンポン増幅で機能しているかどうかは不明である。

2. 研究の目的

我々の予備的解析によって、Tdrd5とTdrd9は、PIWIファミリー蛋白質のAgo3およびそのパートナーであるKrimpと相互作用し、協調して卵巣でのピンポン増幅を推進することを示唆している。本申請課題では、卵巣におけるTdrd5とTdrd9の分子機能を明らかにする。また、ショウジョウバエのpiRNA生合成経路に関するほとんどの知見は、

卵巣をモデル系とした解析結果の集約であり、精巣でどのように piRNA が産生されているかは不明である。ショウジョウバエゲノムには Tdrd1 のホモログが2つコードされているが、そのうちの一つである CG9925 蛋白質（以下、Tdrd1）と、Tudor ドメイン蛋白質・Tdrd7 は、ヌアージュに局在し、それらの変異体精巣では piRNA 産生が顕著に損なわれている。本申請課題では、精巣 piRNA 経路での Tdrd1 と Tdrd7 の分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)piRNA ピンポン増幅における Tdrd5 と Tdrd9 の機能

piRNA 生合成に機能する RNA ヘリカーゼ・Vasa の変異体では、ヌアージュでのピンポン増幅による piRNA 産生が阻害される。Vasa は、Aub によって切断された RNA を Ago3 へ受け渡すプロセスを仲介するので、Vasa の機能欠損はその後のプロセスの停滞をもたらす。その Vasa 変異体では、正常ならば核近傍のヌアージュに存在するはずの Tdrd5, Ago3, Krimp や Tdrd9 が細胞質顆粒へと局在変化することを予備的成果として得ている。このことは、Tdrd5 と Tdrd9 は Krimp と Ago3 を含む複合体を形成し、ピンポン増幅での二次 piRNA 生合成に機能することを示唆している。その複合体の形成機構や piRNA 生合成における Tdrd5 と Tdrd9 の機能を解析する。

(2)Tdrd1 と Tdrd7 の精巣 piRNA 産生経路における機能

精巣では、反復配列にコードされている Stellate 蛋白質の発現は、piRNA 経路によって抑制されている。予備的解析から、Tdrd1 と Tdrd7 蛋白質は両方とも精巣ヌアージュに局在し、それらの変異体で Stellate が高発現しており、Tdrd1 と Tdrd7 は精巣 piRNA 経路に機能すると考えられる。本研究課題では、不明な点が多いショウジョウバエ精巣における piRNA 経路を明らかにするために、Tdrd1 と Tdrd7 の機能を解析する。

4. 研究成果

Tdrd1 変異体精巣では piRNA 生合成が損なわれており、その結果、Stellate タンパク質が強発現していることや、Tdrd1 蛋白質は Piwi ファミリー蛋白質と相互作用することを明らかにした。また、RNA ヘリカーゼモチーフと核局在化配列を持つショウジョウバエ Tdrd9 は、他の Tdrd 蛋白質の天然変性領域に依存して細胞質へと移行することや、Vasa 蛋白質とは異なる piRNA プロセシング複合体を形成していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Teo Ryan Yee Wei, Anand Amit, Sridhar Vishweshwaren, Okamura Katsutomo, Kai Toshie	4. 巻 9
2. 論文標題 Heterochromatin protein 1a functions for piRNA biogenesis predominantly from pericentric and telomeric regions in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-03908-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iki T, Takami M, Kai T	4. 巻 33
2. 論文標題 Modulation of Ago2 Loading by Cyclophilin 40 Endows a Unique Repertoire of Functional miRNAs during Sperm Maturation in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108380-393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Niwa R, Kai T	4. 巻 37
2. 論文標題 Stem cells orchestrate oogenesis: a lesson from the fruit fly, <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Insect Sci.	6. 最初と最後の頁 3-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cois.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ritsuko Suyama, Nicolas Cetraro, Joanne Y. Yew, Toshie Kai
2. 発表標題 腸内微生物による卵形成亢進機構の解明
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taichiro Iki, Moe Takami, Toshie Kai
2. 発表標題 Tissue-specific regulation of RISC loading by Hsp90 cochaperone Cyclophilin 40
3. 学会等名 RNA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河口 真一、アナンド アミット、甲斐 歳恵
2. 発表標題 ショウジョウバエ生殖幹細胞に特異的な発現遺伝子、スプライシング、RNA塩基修飾の探索
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須山 律子、セトラロ ニコラス、イウ ジョアンヌ、甲斐 歳恵
2. 発表標題 微生物が誘導するショウジョウバエ卵形成促進機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高見 萌、井木 太郎、甲斐 歳恵
2. 発表標題 Hsp90 コシヤペロン Cyclophilin 40 はショウジョウバエにおける精子形成に必須の役割を果たす
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井 将也
2. 発表標題 BED タイプジンクフィンガーをコードする、キイロショウジョウバエの適切な分化とメスの生殖系列細胞の維持に必要な stand still 遺伝子
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshie Kai
2. 発表標題 dTdrd1 functions in piRNA pathway in Drosophila
3. 学会等名 Asia Pacific Drosophila Research Conference 5 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河口 真一、Amit Anand、甲斐 歳恵
2. 発表標題 選択的スプライシングによって制御される生殖幹細胞のトランスクリプトーム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植木 美月、河口 真一、甲斐 歳恵
2. 発表標題 ショウジョウバエのdMarf1は、NanosのmRNAに結合し、減数分裂の再開を引き起こす
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院 生命機能研究科 時空生物学講座 生殖生物学研究室（甲斐研究室）ウェブサイト
http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/kai/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井木 太一郎 (Iki Taichiro) (20774011)	大阪大学・生命機能研究科・助教 (14401)	
研究協力者	河口 真一 (Kawaguchi Shinichi) (40321749)	大阪大学・生命機能研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------