

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05271

研究課題名(和文) 反応場に着目したpiRNA経路の生化学的解析

研究課題名(英文) Biochemical approaches to understanding the reaction platforms of the piRNA pathway

研究代表者

泊 幸秀 (TOMARI, Yukihide)

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：90447368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 148,900,000円

研究成果の概要(和文)：piRNAが機能する「反応場」を、正しく活性のある形で試験管内に取り出し、そこで起こる生化学反応を詳細に解析するとともに、生物情報学を駆使することによってその反応の背後にある「ルール」を上手く抽出するという独自のアプローチによって、ミトコンドリア外膜上で起こるpiRNA前駆体から成熟体への生合成過程の分子メカニズムを解明した。また、カイコにおける新たなpiRNA反応場を発見し、その生物学的意義を明らかにした。さらには、piRNA生合成を大きく加速させる新規補助因子を発見した。また、piRNAが作られるゲノム領域である「piRNAクラスター」の詳細な性状解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAが機能する「反応場」を、正しく活性のある形で試験管内に取り出し、piRNAがはたらくまさにその「現場」を丁寧に素過程に分けて生化学的に解析するとともに、その結果を生物情報学的に検証しさらに発展させることによって、これまでにモデルに過ぎなかったpiRNAの成熟過程の分子メカニズムを正確に明らかにすることに成功した。また、これまでは、基本的には触媒作用を持つ酵素によってのみ再構成され理解されてきた生化学系に、「反応場」という観点を取り入れたことは、piRNA経路だけにとどまらず、細胞内の反応場に依存する他の様々な経路に広く適応可能であり、大きな波及効果を生み出すと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed unique biochemical systems that take out the entire "reaction platforms" for piRNAs from cells into test tubes with retaining their proper functions. We have also developed bioinformatic frameworks that can extract the "rules" behind those biochemical reactions. By combining these two approaches, we uncovered how piRNA precursors are processed into mature piRNAs on the outer membrane of mitochondria. Moreover, we discovered a new reaction platform for piRNAs in silkworms and proposed its biological significance. We have also identified novel accessory factors that highly accelerate the piRNA biogenesis reaction. Finally, we carefully characterized a representative "piRNA cluster," the genomic region from which piRNAs are produced.

研究分野：生化学

キーワード：piRNA PIWI-interacting RNA 反応場

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小分子 RNA は、Argonaute ファミリータンパク質に結合して RNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれるエフェクター複合体を形成し、標的となる mRNA の発現を負に制御することにより、様々な生物学的役割を果たしている。代表的な小分子 RNA としては、主に体細胞においてウイルスやトランスポゾンの RNA を切断して抑制する(=RNA 干渉) small interfering RNA (siRNA)、内在遺伝子の発現量を緻密に制御する microRNA (miRNA)、そして生殖細胞においてトランスポゾンを抑制する機能を持つ PIWI-interacting RNA (piRNA)の 3 つの種類が挙げられる。1998 年の RNA 干渉の発見以降、siRNA および miRNA の生合成過程や標的 mRNA の抑制過程については、その分子メカニズムの理解が飛躍的に進んできた。一方で、piRNA の作用機序については、少なくとも siRNA や miRNA とは大きく異なることが明らかとなっているが、その実態には未だ大きな謎が数多く残されている。

トランスポゾンの転移は、遺伝情報を破壊する可能性があり、特に次世代をつくり出す生殖細胞では、その活性を抑えることが非常に重要である。実際、ハエからマウスに至るまでの様々なモデル動物において、piRNA 経路の破綻は、トランスポゾンの活性化を伴う配偶子形成の異常、すなわち不稔を引き起こすことが知られている。したがって、生殖細胞ゲノムを守る piRNA の働きを正しく理解することは、生物学において極めて重要な課題であると言える。

piRNA の生合成や機能には、直接結合する PIWI タンパク質 (Argonaute ファミリーに属するタンパク質サブファミリー)だけではなく、数十にも上る多数の因子群が必要であることが明らかにされている。しかしながら、それぞれの因子が、piRNA 経路のどの段階でどのように機能しているのかということは、驚くほど分かっていない。これは、必要な因子群とそれら個別の分子機能が良く紐付けされている siRNA 経路や miRNA 経路とは、極めて対照的である。

ではなぜ、piRNA 経路の理解がこれほどにまで進んでいないのだろうか? その最大の原因は、piRNA の生合成と機能が、細胞内の様々な「反応場」を必要とすることにある。したがって、一般的に生化学や分子生物学で用いられているような細胞抽出液(細胞を破壊したあと遠心分離によって可溶性画分を調製したもの)を用いた実験では、細胞内で機能していた「反応場」が失われてしまい、本来の活性を試験管内に取り出すことが極めて困難なのである。これは、siRNA や miRNA が基本的には細胞質で働いており、一般的な細胞抽出液の中において、その生合成から標的の抑制までの一連の過程がすべて再現できるという状況とは決定的に異なる。

以上のような背景から、「piRNA はどの様に作られ、どの様に働くのか?」という極めて基本的かつ本質的な「問い」にさえ、明確な答えが得られていない、という状況であった。

### 2. 研究の目的

上述の通り、piRNA 経路の理解は、既知因子の相互作用因子探索と、それによって見いだされた piRNA 関連因子の変異体の遺伝学的作出、そして、それら変異体における piRNA 発現プロファイルの情報学的解析が組み合わされることによって進展してきた。しかし、これら変異体の多くにおいては、piRNA 経路全体が破綻してしまい、単に「piRNA が作られない」という表現型だけが得られてしまう。あるいは、仮にある一群の piRNA が作られない様な特徴的な表現型が得られたとしても、それが直接の影響なのか、間接の影響なのかを見分けることは非常に難しい。これは細胞内においては、piRNA 経路が一つのシステムとして機能しており、その素過程の 1 つ 1 つを切り分けて解析することが困難なためである。

このような背景を踏まえ、本研究では、我々が独自に構築してきた試験管内系をさらに発展させ、piRNA が機能する「反応場」を、正しく活性のある形で試験管内に取り出し、piRNA が作られ標的を抑制するまさにその「現場」を丁寧に素過程に分け、生化学的にとらえることによって、これまでは状況証拠によって漠然と想像されたモデルに過ぎなかった piRNA の作動原理を、分子レベルで正確に理解することを大きな目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究課題を遂行するためには、生化学的アプローチと、生物情報学的アプローチの 2 つの側面が極めて重要となる。まず、生化学的アプローチでは、細胞内の「反応場」をできるだけ壊さない形で丸ごと試験管内に取り出し、piRNA 経路の素反応を忠実に再現する無細胞系を構築する。そして、その無細胞系を用いて、着目する反応に必要な因子を特定し、各因子の分子機能を明らかにする。一方、生物情報学的アプローチにおいては、次世代シーケンサーを活用し、生体

内に存在する(あるいは無細胞系を用いて試験管内で生成された) piRNA またはその前駆体の配列を網羅的に取得した上で、その背後にある「ルール」をうまく抽出することによって、生化学的アプローチによって得られた知見の普遍性を検証するとともに、さらに実験的に検証可能な新しい仮説を生み出す。これら 2 つの相補的なアプローチを適切に組み合わせ、循環させることによって、研究の進展を相乗的に加速させることを目指す。

具体的な研究方法としては、カイコ卵巣由来培養細胞である BmN4 を主たるモデルとして、解析を進めた。piRNA の分子メカニズムの理解が進んでこなかった原因の一つとして、piRNA の発現が生殖細胞という極めて少ない細胞群に限局しており、解析に用いる材料を十分量取得することが困難であるということが挙げられる。我々は、東京大学農学生命科学研究科の勝間進教授らと共同で、BmN4 細胞がカイコ生殖系列 piRNA の生合成経路を完全に保持していることをいち早く見だし(*RNA* 2009)、それを用いた piRNA 経路の解析を積極的に進めてきた(*Mol Cell* 2011; *RNA* 2013; *Mol Cell* 2014; *Cell* 2016; *PNAS* 2017)。piRNA 研究は、歴史的にショウジョウバエでの遺伝学的解析が先行して進められてきたが、ショウジョウバエが持つ piRNA 関連因子は、他の種では保存されていないものも多く、提案されたモデルを一般化することがしばしば困難である。一方、カイコの piRNA 関連因子は、マウスやヒトなどの哺乳類との共通性が非常に高く、幅広い種で保存された普遍的な piRNA 経路を理解する上で、カイコは優れたモデルとなる。実際、我々がカイコで見いだした Trimmer のヒトホモログ PNLDC1 の変異が、ヒト無精子症の原因となりうることも報告されている (Nagirnaja et al., *N Engl J Med.* 2021)。このように、カイコを主なモデルとして用いることで生化学的アプローチを飛躍的に効率化し、生物情報学のアプローチと統合することによって、反応場に注目した piRNA 生合成経路の理解を進めた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Zucchini による piRNA 前駆体の切断メカニズムの解明

piRNA 経路においては、数百から数百キロ塩基にもおよぶ長い転写産物が段階的な加工を受け、最終的に 26~30 塩基程度の成熟体 piRNA が作られる。この過程において、RISC の核となる PIWI タンパク質が最初に取り込むのは、pre-pre-piRNA と呼ばれる 5'末端がモノリン酸化された長い一本鎖の RNA であると考えられている。多くの動物において、PIWI に取り込まれた pre-pre-piRNA は、PIWI が結合している領域よりも少し 3'下流側の位置において、一度切断される。その後、切断された RNA の 5'側の断片は、PIWI タンパク質に結合したままの状態、我々が最初にカイコで見いだしたエキソヌクレアーゼ Trimmer (PNLDC1)によって、26~30 塩基程度の長さまで削り込まれると同時に、Hen1 と呼ばれるメチルトランスフェラーゼによってその 3'末端が 2'-O-メチル化され、成熟体 piRNA が作り出される。

このような piRNA 生合成経路の過程において、残されていた最も大きな謎は、「Pre-pre-piRNA を切断し pre-piRNA を生み出している因子は何なのか?」ということであった。マウスやショウジョウバエなどを用いた遺伝学的・生物情報学的な解析からは、Zucchini と呼ばれるエンドヌクレアーゼがこの切断を担っているであろうということ、またその切断はウリジン(U)の 1 塩基前を好むであろうということが、強く示唆されていた(Han et al., *Science* 2015a; Mohn et al., *Science* 2015b)。しかし一方で、精製した Zucchini タンパク質を使って、試験管内で RNA の切断反応を観察した場合には、塩基の好みが見られないということが、複数のグループから報告されていた(Nishimasu et al., *Nature* 2012a; Ipsaro et al., *Nature* 2012b; Nishida et al., *Nature* 2018)。この遺伝学と生化学の大きな矛盾は、piRNA の研究分野を混乱させ、Zucchini が本当に pre-piRNA を産生しているのかどうか、確証が得られない状況が長らく続いていた。

ここで鍵となるのは、エンドヌクレアーゼである Zucchini も、エキソヌクレアーゼである Trimmer も、ともにミトコンドリアの外膜上に局在している、ということである。すなわち、piRNA の成熟化が秩序正しく行われるためには、ミトコンドリア外膜という「反応場」が必要不可欠であるため、精製タンパク質を用いたこれまでの生化学的解析では、生体内での反応を正しく再現・評価できていなかった可能性が高いと考えられた。

通常生体内においては、pre-pre-piRNA から pre-piRNA が作り出されたあと、Trimmer が速やかにその 3'末端を削り込むため、pre-piRNA が蓄積することは無く、その性状を解析することは極めて困難である。そこで、我々は CRISPR/Cas9 システムをカイコ BmN4 細胞に適用し、Trimmer をノックアウトすることによって、蓄積した pre-piRNA を詳細に解析できる細胞を作出した。そして、その Trimmer ノックアウト BmN4 細胞から、ミトコンドリアを含む画分を丸ごと試験管内に取り出し、PIWI タンパク質と結合させた pre-pre-piRNA と反応させることによって、Zucchini による pre-piRNA の産生を忠実に再現する無細胞系の構築に成功した。

その結果、pre-pre-piRNA の切断による pre-piRNA の産生の少なくとも一部は、確かに Zucchini

によって行われていることが確認された。重要なことに、この無細胞系での pre-pre-piRNA の切断は、U の 1 塩基前を好むということ、そして、切断には Zucchini 自身だけではなく、ATP 依存性ヘリカーゼである Armitage を含め、ミトコンドリアに局在する少なくとも 3 種類の piRNA 産生補助因子の存在が不可欠であることも明らかとなった。これらの結果は、Zucchini が正しく機能するには、いくつかの補助因子と、それらが適切に配置されたミトコンドリア外膜という「反応場」こそが重要である、ということを実験的に実証するものであり、従来の遺伝学と生化学との矛盾を解消するものである。

平行して、Trimmer ノックアウト BmN4 細胞に蓄積した内在の pre-piRNA の性状を、生物情報学的なアプローチで注意深く解析したところ、pre-piRNA が「Zucchini による切断」と「(別の)PIWI による切断」という、2 つの異なる様式によって産生されていることを見いだした。この背後にある「ルール」を抽出するため、我々は、Zucchini が切断する領域をランダムな配列にデザインして、Zucchini がどのような配列を好んで切断するのかを網羅的に解析した。その結果、Zucchini による切断には、切断位置の 1 塩基後の U だけではなく、その前後の位置に存在するこれまで知られていなかった新たな配列モチーフが重要であることが明らかになった。さらに詳細な解析から、この配列モチーフが存在するか否かが、2 つの様式のいずれで切断されやすいかを決定していることを突き止めた。

最後に、情報生物学的アプローチで得られた Zucchini による切断ルールを、生化学的アプローチで検証した。具体的には、Zucchini が好むモチーフを全て持つような配列を用意し、ミトコンドリアを丸ごと用いた無細胞系で Zucchini によって切断される様子を観察したところ、予測されたまさにその位置で正確に切断を受けた。逆に、好みの塩基をもたないように配列を変更すると、その位置での Zucchini による切断が起こらなくなることも確認できた。以上のように、生化学と生物情報学の 2 つのアプローチをうまく組み合わせることで、これまでの混乱を解消し、点と点を一本の線でつなぐことに成功した (*Nature* 2020)。

## (2) 新たな piRNA 反応場の発見とその生物学的意義

ミトコンドリア外膜と並んで重要な piRNA 生合成の細胞内反応場として、核膜のまわりに存在する「ニューアージュ」と呼ばれる顆粒状の非膜性構造体が知られている。実際、カイコが持つ 2 つの PIWI タンパク質である Siwi と BmAgo3 は、ともに定常状態においてはニューアージュに局在している。しかし、ミトコンドリア外膜という別の piRNA 反応場が細胞内に存在することを考えれば、piRNA 関連因子の多くは、異なる反応場間をダイナミックに移動していることが想定される。そこで我々は、これら 2 つの PIWI タンパク質や、他のいくつか代表的な piRNA 関連因子に、触媒活性を失わせる変異を導入することによって、それらのダイナミックな動きを「フリーズ」させ、超解像顕微鏡を用いてその局在や動態の変化を詳しく観察した。

その結果、カイコにおける第 3 の piRNA 反応場として、piP-body という細胞内構造体の存在が明らかとなった。piP-body には、もともと RNA 分解経路に関わることが知られていた Processing body (P-body) を構成する因子群と、RNA ヘリカーゼなどいくつかの重要な piRNA 関連因子群が共局在しているということが判明した。重要なことに、Siwi は、通常の定常状態ではニューアージュに局在している一方で、標的切断ができなくなった変異体では piP-body に誤って蓄積し、他の様々な piRNA 因子をその場にトラップしてしまうことが明らかとなった。これらの結果から、Siwi をはじめとするカイコの piRNA 因子群は、piRNA 産生の過程で、ニューアージュと piP-body という異なる piRNA 反応場の間を行き来していることが強く示唆された。

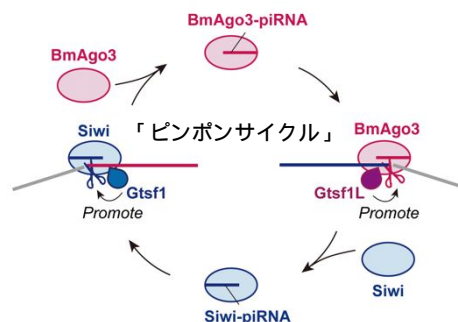
さらに、Siwi の切断活性変異体によって piRNA 因子群の細胞内動態をフリーズさせ、適切な細胞内区画化が阻害された際に、piRNA 産生にどのような影響が生じるのかを、次世代シーケンサーを用いた生物情報学的な解析によって網羅的に調べた。するとこのような細胞では、トランスポゾンではなく、生存に必須な自己の mRNA 由来の piRNA が顕著に増加していることが明らかとなった。すなわち、piRNA 経路の細胞内反応場の区画化が異常になると、piRNA 産生の品質管理機構が自己の遺伝子を「非自己」として誤認識し、そこから piRNA を作り始めてしまったと考察できる。これらの結果は、ニューアージュと piP-body という piRNA 反応場の適切な区画化が、非自己であるトランスポゾンだけに対応する正確な piRNA の産生に重要であることを示している。piP-body の存在自体は、これまでマウスやショウジョウバエで知られていたが、その生物学的意義は不明であった。本研究成果は、piRNA 経路における自己非自己認識の正確性と反応場区画化の重要性をはじめと結びつけたものであると言える (*EMBO Rep.*, 2021)。

## (3) ピンポンサイクルを大きく加速させる補助因子 GTSF1 の発見

piRNA 経路の大きな特徴として、piRNA が相補的な標的 RNA を切断すると、その切断断片が別の PIWI タンパク質に取り込まれ、新たな piRNA が生合成されるということが挙げられる。

これを、センス鎖とアンチセンス鎖の間で互いに繰り返すことにより、トランスポゾン RNA の切断を行いながら、トランスポゾンを認識できる piRNA が増幅される「ピンポンサイクル」が作動する。これまで、ピンポンサイクルに関わるとされる数多くの因子が同定されているものの、実際の反応をとらえた研究は 1 例も無く、2007 年にモデルが提唱されてから約 15 年が経過した今日もなお、その実体はおぼろげなままである。すなわち、ピンポンサイクルの分子メカニズムの正確な理解は、piRNA 研究分野における至上命題であると言える。

しかしながら、上述の通り細胞内反応場に依存した反応であるピンポンサイクルの試験管内系の構築は極めて困難である。特に、試験管内での piRNA による標的 RNA の切断効率はあまりにも低く、切断後にさらに別の PIWI タンパク質に取り込まれる過程を捕捉するためには、感度が圧倒的に不足しているというのが研究開始当初の現状であった。我々は、米国 University of Massachusetts の Phillip Zamore 研究室、および Scripps Research Institute の Ian MacRae 研究室と共同で、PIWI タンパク質の標的切断活性を大きく加速させる新たな補助因子として GTSF1 を同定した (*Nature* 2022)。GTSF1 は、PIWI タンパク質に結合するタンデム CHHC 型の Zn フィンガータンパク質である。生化学的な解析から、GTSF1 による piRNA 標的切断活性の加速には、1) GTSF1 と RNA が直接結合すること、2) GTSF1 と PIWI タンパク質が直接結合することの両方が必要であることが明らかとなった。標的 RNA を認識した PIWI タンパク質/piRNA 複合体は、そのままでは標的を切断できない状態をとっているが (pre-catalytic state)、GTSF1 がその状態に結合することによって、PIWI タンパク質が標的切断触媒活性を持つ状態 (catalytic state) への構造変化を促進していると考えられる。興味深いことに、GTSF1 は、多くの種において複数のパラログが存在する。例えばマウスには GTSF1、GTSF1L、GTSF2 の 3 つ、カイコには Gtsf1 と Gtsf1-like (Gtsf1L) の 2 つが存在する。我々は、生化学的アプローチと生物情報学的アプローチを組み合わせることによって、カイコの Gtsf1 が Siwi による標的 RNA 切断を、そして Gtsf1L が BmAgo3 による標的 RNA 切断を、それぞれ直交的・特異的に加速させることを見ていただいた (*RNA* 2022)。これら一連の GTSF1 に関する発見は、piRNA 研究分野における「究極の目標」とも言えるピンポンサイクルの試験管内完全再構成に向けた大きな足がかりとなるものである。



#### (4) piRNA クラスタ「torimochi」の実体の解明

piRNA は、主に「piRNA クラスタ」と呼ばれる、過去に飛び回ったトランスポゾンの残骸が集積したようなゲノム領域(「トランスポゾンの墓場」とも呼ばれる)から作られ、その配列情報を用いて、今なお転移活性のあるトランスポゾンを認識し抑制していると考えられてきた。我々は、カイコ卵巣由来培養細胞である BmN4 細胞において、torimochi と名付けた piRNA クラスタが、トランスジーンなどの新たな配列を「とりもち」の様にクラスタ内部に捕獲し、そこからその配列情報を持つ piRNA を作り出す活性を持つことを報告していたが (*RNA* 2012)、当時のカイコゲノムには多くの未アノテーション領域が含まれており、torimochi の全体配列やその実体は不明であった。今回、2019 年に更新された新しいカイコゲノムの情報と、MinION を用いた長鎖 DNA シーケンシングの情報を組み合わせることによって、torimochi の性状を詳しく再解析した。その結果、実は torimochi は活性のある全長の LTR 型トランスポゾンそのものであり、BmN4 細胞において急激にコピー数を増やしているものであるということが明らかとなった。また、このように活性のあるトランスポゾンでありながら piRNA を産生する能力を獲得したものを新たに 6 つ同定することに成功した。それらの中でも torimochi は、BmN4 細胞において最もコピー数を増やしたトランスポゾンであり、極めて高い piRNA 産生能を示した。これは、torimochi が、トランスポゾンの墓場のような成熟した piRNA クラスタになる前の段階の、まだ成長中の若い piRNA クラスタであることを示すものである (*PLOS Genetics* 2023)。実際、近年の研究から、ショウジョウバエにおいても、成熟した piRNA クラスタをゲノムから大きく欠損させても、トランスポゾンの抑制はほぼ正常に行われることが示されており、piRNA クラスタから産生された piRNA が標的トランスポゾンをトランスに抑制するという古典的な図式だけではなく、活性のあるトランスポゾンからシスに piRNA が産生され、それ自身を抑制しているという新たな概念が浮上してきている(Gebert et al., *Mol Cell* 2021)。torimochi はそのような活性のあるトランスポゾンでありながら成長中の若い piRNA クラスタでもあるものの典型例であると考えられ、piRNA システムがゲノム中の自己配列と非自己配列をどのように見分け、どのように piRNA 産生を決定しているのか? という当該研究領域における根源的な問題に対する糸口となるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Chen Shirui, Liu Wei, Naganuma Masahiro, Tomari Yukihide, Iwakawa Hiro-oki	4. 巻 50
2. 論文標題 Functional specialization of monocot DCL3 and DCL5 proteins through the evolution of the PAZ domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4669 ~ 4684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac223	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 Yamaguchi Sonomi, Naganuma Masahiro, Nishizawa Tomohiro, Kusakizako Tsukasa, Tomari Yukihide, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu	4. 巻 607
2. 論文標題 Structure of the Dicer-2?R2D2 heterodimer bound to a small RNA duplex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 393 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04790-2	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 -
1. 著者名 Arif Amena, Bailey Shannon, Izumi Natsuko, Anzelon Todd A., Ozata Deniz M., Andersson Cecilia, Gainetdinov Ildar, MacRae Ian J., Tomari Yukihide, Zamore Phillip D.	4. 巻 608
2. 論文標題 GTSF1 accelerates target RNA cleavage by PIWI-clade Argonaute proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 618 ~ 625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05009-0	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 該当する
1. 著者名 Shen Shuting, Naganuma Masahiro, Tomari Yukihide, Tadakuma Hisashi	4. 巻 2022;2509
2. 論文標題 Revisiting the Glass Treatment for Single-Molecule Analysis of ncRNA Function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 209 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2380-0_13	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 該当する

1. 著者名 Izumi Natsuko, Shoji Keisuke, Kiuchi Takashi, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide	4. 巻 29
2. 論文標題 The two Gtsf paralogs in silkworms orthogonally activate their partner PIWI proteins for target cleavage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 18 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079380.122	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 -

1. 著者名 Liu Wei, Shoji Keisuke, Naganuma Masahiro, Tomari Yukihide, Iwakawa Hiro-oki	4. 巻 50
2. 論文標題 The mechanisms of siRNA selection by plant Argonaute proteins triggering DNA methylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 12997 ~ 13010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac1135	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 Shoji Keisuke, Umemura Yusuke, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide	4. 巻 19
2. 論文標題 The piRNA cluster torimochi is an expanding transposon in cultured silkworm cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010632	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 -

1. 著者名 Iwakawa Hiro-oki, Lam Andy Y.W., Mine Akira, Fujita Tomoya, Kiyokawa Kaori, Yoshikawa Manabu, Takeda Atsushi, Iwasaki Shintaro, Tomari Yukihide	4. 巻 35
2. 論文標題 Ribosome stalling caused by the Argonaute-microRNA-SGS3 complex regulates the production of secondary siRNAs in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109300 ~ 109300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109300	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 Naganuma Masahiro, Tadakuma Hisashi, Tomari Yukihide	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-molecule analysis of processive double-stranded RNA cleavage by Drosophila Dicer-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24555-1	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 Shigematsu Megumi, Kawamura Takuya, Morichika Keisuke, Izumi Natsuko, Kiuchi Takashi, Honda Shozo, Pliatsika Venetia, Matsubara Ryuma, Rigoutsos Isidore, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide, Kirino Yohei	4. 巻 12
2. 論文標題 RNase promotes robust piRNA production by generating 2',3'-cyclic phosphate-containing precursors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24681-w	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 Sakurai Yuri, Baeg Kyungmin, Lam Andy Y. W., Shoji Keisuke, Tomari Yukihide, Iwakawa Hiro-oki	4. 巻 118
2. 論文標題 Cell-free reconstitution reveals the molecular mechanisms for the initiation of secondary siRNA biogenesis in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2102889118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102889118	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 Iwakawa Hiro-oki, Tomari Yukihide	4. 巻 82
2. 論文標題 Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 30~43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.11.026	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 -



1. 著者名 Brechtin Vincent, Shinohara Fumikazu, Saito Jun-ichi, Seitz Herve, Tomari Yukihide	4. 巻 27
2. 論文標題 Mechanistic analysis of the enhanced RNAi activity by 6-mCpG-purine at the 5' end of the siRNA guide strand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 151 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.073775.119	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 -

1. 著者名 Shinohara Fumikazu, Oashi Taiji, Harumoto Toshimasa, Nishikawa Tomoyuki, Takayama Yuki, Miyagi Hikaru, Takahashi Yuichi, Nakajima Takahiro, Sawada Takashi, Koda Yasuo, Makino Asana, Sato Atsuko, Hamaguchi Kaori, Suzuki Michihiko, Yamamoto Junichiro, Tomari Yukihide, Saito Jun-Ichi	4. 巻 27
2. 論文標題 siRNA potency enhancement via chemical modifications of nucleotide bases at the 5' -end of the siRNA guide strand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 163 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.073783.119	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 -

1. 著者名 Kobayashi Hotaka, Shoji Keisuke, Kiyokawa Kaori, Negishi Lumi, Tomari Yukihide	4. 巻 28
2. 論文標題 VCP Machinery Mediates Autophagic Degradation of Empty Argonaute	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1144 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.07.003	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 Kobayashi Hotaka, Tomari Yukihide	4. 巻 16
2. 論文標題 Identification of an AGO (Argonaute) protein as a prey of TER94/VCP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 190 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2019.1691351	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 -

1. 著者名 Izumi Natsuko, Shoji Keisuke, Suzuki Yutaka, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide	4. 巻 578
2. 論文標題 Zucchini consensus motifs determine the mechanism of pre-piRNA production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 311 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1966-9	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 -

1. 著者名 Tsuboyama Kotaro, Osaki Tatsuya, Matsuura-Suzuki Eriko, Kozuka-Hata Hiroko, Okada Yuki, Oyama Masaaki, Ikeuchi Yoshiho, Iwasaki Shintaro, Tomari Yukihide	4. 巻 18
2. 論文標題 A widespread family of heat-resistant obscure (Hero) proteins protect against protein instability and aggregation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 3000632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000632	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 Tsuboyama Kotaro, Tadakuma Hisashi, Tomari Yukihide	4. 巻 70
2. 論文標題 Conformational Activation of Argonaute by Distinct yet Coordinated Actions of the Hsp70 and Hsp90 Chaperone Systems	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 722 ~ 729.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2018.04.010	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 -

1. 著者名 Kobayashi Hotaka, Shoji Keisuke, Kiyokawa Kaori, Negishi Lumi, Tomari Yukihide	4. 巻 73
2. 論文標題 Iruka Eliminates Dysfunctional Argonaute by Selective Ubiquitination of Its Empty State	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 119 ~ 129.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2018.10.033	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13件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 13件）

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Small RNAs
3. 学会等名 RNA2022, Colorado, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 The two Gtsf paralogs in silkworms orthogonally activate their partner PIWI proteins for target cleavage
3. 学会等名 The "Argonautes" conference, Regensburg, Germany (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 A canonical chaperone and a heat-resistant obscure (Hero) protein mediate similar aggregation suppression and conformational extension of TDP-43
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, RNA Biology, AWAJI, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Assembly of the RNA Silencing Complex (and Beyond)
3. 学会等名 2021 RNA Biology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Hero proteins: widespread protectors against protein instability
3. 学会等名 MBSJ 2020 Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 The mechanism of pre-piRNA production
3. 学会等名 UTRs in Development and Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Assembly of the RNA-induced silencing complex and beyond
3. 学会等名 RiboClub the 20th Anniversary (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Assembly and function of the RNA silencing complex
3. 学会等名 FASEB SRC The RNA Localization and Local Translation Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 3'-end maturation of silkworm piRNAs
3. 学会等名 Keystone Symposia Small Regulatory RNAs (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 A conserved step-wise maturation mechanism of piRNAs
3. 学会等名 EMBO Workshop: piRNAs and PIWI proteins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Biochemical and biophysical dissection of RNA silencing
3. 学会等名 RNA-REG: Regulatory Circuits in RNA Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Iruka ensures the quality of Argonaute by selective ubiquitination of its empty state
3. 学会等名 CSH Asia Meeting on RNA Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泊 幸秀
2. 発表標題 Iruka ensures the quality of Argonaute by selective ubiquitination of its empty state
3. 学会等名 Joint Australia-Japan RNA Meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 クライアントタンパク質を保護するタンパク質のスクリーニング方法並びに生理活性タンパク質安定化タンパク質および該タンパク質を含む医薬組成物	発明者 泊 幸秀、岩崎 信太郎、坪山 幸太郎、他4名	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/24515	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Protein stabilization by fully unstructured proteins	発明者 坪山 幸太郎、岩崎 信太郎、泊 幸秀	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、No.62/734,329	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	中川 真一 (NAKAGAWA Shinichi) (50324679)	北海道大学・薬学研究院・教授  (10101)	

	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	泉 奈津子 (IZUMI Natsuko) (50579274)	東京大学・定量生命科学研究所・技術専門職員  (12601)	
研究協力者	庄司 佳祐 (SHOJI Keisuke) (30880116)	東京大学・定量生命科学研究所・助教  (12601)	

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			
米国	University of Massachusetts	Thomas Jefferson University	Scripps Research	
中国	上海科技大学	Chinese Academy of Sciences		