

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分  
平成28年3月15日現在

トランスポゾン侵略から生殖細胞ゲノムをまもる piRNA 動作原理の統合的理解

Elucidation of molecular mechanisms of how piRNAs maintain the germline genome integrity from invasive mobile elements

課題番号：25221101

塩見 美喜子 (SIOMI MIKIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

PIWI-interacting RNA (piRNA) は、正しい遺伝情報を次世代へと受継ぐ使命を担う生殖細胞で DNA 損傷を引き起こす転移性因子トランスポゾンから生殖細胞のゲノムをまもる。しかし、その動作原理は未だ不明である。本研究課題では、特に piRNA 生合成と piRNA による核内サイレンシングの仕組みに焦点を絞り、piRNA 機構の全貌解明を目指す。

研究分野：分子生物学

キーワード：PIWI, piRNA, トランスポゾン, RNA サイレncing, ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

RNAi の発見以降、小分子 RNA を介した遺伝子発現抑制機構である RNA サイレncing に関する研究は国内外で精力的に進められた。その結果、発生・分化や代謝など、個体形成や生体生命にとって不可欠な経路に関わる様々な因子が RNA サイレncing によって巧妙に制御されていることが明らかとなった。トランスポゾンの利己的な転移活性による生殖ゲノムの損傷は、不稔と共に次世代に誤った遺伝情報を継承するため、有性生殖を伴う動物は piRNA を中核因子とする RNA サイレncing 機構を自己防衛手段として獲得したと考えられる。しかし、その動作原理は未だ不明である。

2. 研究の目的

piRNA 機構のうち、主に [I] piRNA 生合成機構と [II] piRNA による核サイレンシング機構に焦点をあて、piRNA 機構を包括的に理解する事を目指す。さらには、[III] 人工 piRNA 発現系の構築とその最適化を目指す。

3. 研究の方法

研究材料としては主にショウジョウバエ卵巣由来体細胞株 OSC とカイコ卵巣由来生殖細胞株 BmN4 を用いる。次世代シーケンサーや電顕、ライブイメージングなど学際的最先端技術を相互創出しつつ、生化学・細胞生物学・生物情報学的側面から包括的に理解する事を目指す。

4. これまでの成果

[I] piRNA 生合成機構：Yb body 形成機構の解析：piRNA 生合成の場合 Yb body 構造体の形成因子の同定を試みた。Yb body には Yb, Armi, Vret, SoYb が局在する。また、Yb を欠失すると Yb body が形成されなくなる。Yb 抗体や Armi 抗体で免疫沈降を行っても、全ての Yb body 因子の共沈降は観察されなかった。Vret 抗体を作製し免疫沈降を行ったところ、既知の Yb body 因子が共沈した。この複合体は Yb body そのものに相当すると考えられたため、複合体中の未知タンパク質の MS 解析を行ったところ、新規因子 Bor が得られた。現在、Bor が piRNA 機構に必須か否か確認中である。Vret は SoYb を安定化する因子であること、二者は複合体として Yb body に取り込まれること、Yb body 形成のヒエラルキーは Yb > Armi > Vret/SoYb であることが判明した。

[I] piRNA 生合成機構：Ping-Pong サイクルにおける Vasa 機能：カイコ卵巣由来生殖細胞株 BmN4 を用いて BmVasa の機能解析をすすめた。Siwi-piRISC によって切断された標的 RNA は、AGO-RISC と異なり RISC 上に留まる。この RNA は二次 piRNA の前駆体として働くため RISC に留まった状態では二次 piRNA は作られない。Vasa は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ活性をもつため、BmVasa が Siwi-piRISC から切断された RNA を解離させる因子として機能するのではないかと考え、リコンビナントを作製し、RNA と結合した Siwi-piRISC に作用させたところ、予想通り RNA 解離活性があ

ることが判明した。Vasa は、Ping-Pong サイクルの中核因子として機能する 2 種類の piRISC のうち、Siwi-piRISC のみに特異的に作用することによって二次 piRNA の産生を促進する因子であると考えられた。

[I] piRNA 生合成機構：Ping-Pong サイクルを伴う新規ショウジョウバエ細胞株の作製：ショウジョウバエ生殖組織由来の細胞株で piRNA 増幅機構を有する生殖細胞株は存在しない。がん抑制転写因子 *I(3)mbt* に着目し、これを欠損した OSC 変異株を作成した。*I(3)mbt* 欠損型ショウジョウバエは脳腫瘍を形成し、その腫瘍には多くの piRNA 生合成因子が異所的に発現するという報告があったからである。*I(3)mbt* 欠損型 OSC 変異株  $\square$ mbt-OSC においては piRNA 増幅場として知られる nuage が新たに形成され、しかも piRNA 増幅機構が活性化していることが判明した。

[II] 核サイレンシング機構：Maelstrom の X 線構造解析：Mael は piRNA による転写抑制反応に重要であるがその機能は不明である。Mael は N 末端に HMG ボックス、中央に MAEL ドメインを有する。リコンビナント MAEL ドメインを作製し、その X 線構造解析を行ったところ、RNase 活性を有するタンパク質群との高い類似性がみられた。活性残基は MAEL ドメインにおいては保存されていなかったため、Mael には RNase 活性はないと予想されたが、in vitro アッセイ系において MAEL ドメインは RNA 切断活性を維持していることが判った。

[III] 人工 piRNA 発現系の確立：*tj* mRNA 3' UTR を由来とするジェニック piRNA の発現に必須なシス配列 (100 塩基長) を決定した。Yb body の中核因子 Yb に結合する RNA を同定するため CLIP 解析をすすめたところ、*tj* シス配列に Yb が結合することが判明した。Yb は、まず、piRNA 前駆体のシス配列に特異的に結合することによって Yb body にそれを収束させ、その後、下流領域にさらに結合 (移動) することによって piRNA を産生する領域を決定する因子であることが示唆された。

## 5. 今後の計画

当初の計画に沿ってなるべくスムーズに研究目的を達成するように心がける。ラボミーティング等で進捗および問題点を研究室内で密に共有し、問題点を長い間放置することなく解決策を論じることによって、なるべくスムーズに研究目的を達成するように心がける。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
Sato K, Iwasaki YW, Shibuya A, Carninci P, Tsuchizawa Y, Ishizu H, **Siomi MC** and Siomi H. Krimper enforces an antisense bias on piRNA pools by binding AGO3 in the *Drosophila* germline. *Molecular Cell* 59:553-563. 2015

Liang C, Wang Y, Murota Y, Liu X, Smith D, **Siomi MC** and Liu Q. TAF11 assembles the RISC loading complex to enhance RNAi efficiency. *Molecular Cell* 59:807-818. 2015

Ishizu H, Iwasaki YW, Hirakata S, Ozaki H, Iwasaki W, Siomi H and **Siomi MC**. Somatic primary piRNA biogenesis driven by cis-acting RNA elements and trans-acting Yb. *Cell Reports* 12:429-440. 2015

Matsumoto N, Sato K, Nishimasu H, Namba Y, Miyakubi K, Dohmae N, Ishitani R, Siomi H, **Siomi MC\*** and Nureki O\*. Crystal structure and activity of the endoribonuclease domain of the piRNA pathway factor Maelstrom. *Cell Reports* 11:366-375. 2015 (\* double corresponding)

Iwasaki YW, **Siomi MC\*** and Siomi H\*. PIWI-interacting RNA: Its biogenesis and functions. *Annual Review of Biochem.* 2015 (\* double corresponding)

Nishida KM, Iwasaki YW, Murota Y, Nagao A, Mannen T, Kato Y, Siomi H and **Siomi MC**. Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells. *Cell Reports* 10:193-203. 2015

Ohtani H, Iwasaki YW, Shibuya A, Siomi H, **Siomi MC\*** and Saito K\*. DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the *Drosophila* ovary. *Genes Development* 27:1693-1705. 2013 (\* double corresponding)

Nishida KM, Miyoshi K, Ogino A, Miyoshi T, Siomi H and **Siomi MC**. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Molecular Cell* 49:680-669. 2013

など

ホームページ等

<http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>