

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26711006

研究課題名(和文) piRNA 生合成の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of piRNA biogenesis

研究代表者

齋藤 都暁 (Saito, Kuniaki)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30423396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000 円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞(OSC)において、piRNA前駆体を *in situ* hybridization で検出した結果、flam bodyと命名した顆粒状構造体が存在することを報告した(Murota et al. Cell Reports 2014)。flam bodyは、piRNA生合成関連蛋白質群が局在するYb bodyと隣接して存在していた。また、Ybの機能消失によってflam bodyも消失することから、flam bodyとYb bodyはpiRNA生合成過程でなんらかの相互作用をすることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila* ovarian somatic cells (OSCs), we discovered a cytoplasmic granular body named as flam body, where piRNA precursors accumulate (Murota et al. Cell Reports 2014). flam body is closely localized and partially overlapped with Yb body. Disruption of Yb expression in OSCs abolished flam body signals, suggesting that flam body and Yb body are interacted with each other in the process of piRNA biogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：発現制御 遺伝子 RNA プロセッシング 輸送

1. 研究開始当初の背景

20~30塩基程度の小分子RNAによって引き起こされる遺伝子発現抑制機構をRNAサイレンシングと呼ぶ。RNAサイレンシングにおける中核因子はArgonauteである。Argonauteは小分子RNAと直接結合する事によってその塩基配列に従って標的RNAを認識し、それに作用する事によって標的RNAの発現を抑制する。ショウジョウバエは5種類のArgonauteタンパク質を発現する。AGO1とAGO2はほぼ全組織で恒常的に発現する一方、AGO3、Aubergine、Piwiは生殖細胞特異的に発現する(Brennecke et al. Cell 2007)。これらショウジョウバエArgonauteに結合する小分子RNAはお互い異なっており、さらには各Argonauteが機能するRNAサイレンシング経路は独立して存在する事が示されている。私はこれまでショウジョウバエArgonauteのうち、主にPiwiタンパク質に焦点をあて研究を進める事によって、Piwiが関わるRNAサイレンシング経路の存在を見出し、さらには本経路における必須、及び関連因子の同定およびそれらの機能解析を進めてきた。これら一連の研究を通して、Piwiは、レトロトランスポゾン由来の小分子RNAであるpiRNAと結合する事によってレトロトランスポゾンの発現を抑制する因子である事、piRNAの生合成にはAubergineとAGO3のSlicer活性が関わる事、これらSlicer活性依存的にpiRNA Amplification loopが成立し、様々な種類の、数多くのpiRNAが生成される事、またpiRNAはPimetによって3'末端メチル化修飾を受ける事、などを明らかにしてきた。一方で、ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞OSCを確立し、新しいpiRNA実験系の開発(Saito et al. Nature 2009)に成功した。それをもとにして生合成因子の同定した(Saito et al. Genes & Dev. 2010)。更に、piRNA生合成過程においてZucchiniがendoribonucleaseとして働くという仮説を提示した(Nishimasu and Ishizu et al. Nature 2012)。しかし、piRNA生合成の分子機構解明は道半ばであり、今後の解明が待たれている。

2. 研究の目的

ショウジョウバエpiRNAの生合成経路に焦点をあて、(1)piRNA前駆体の転写機構と他の遺伝子領域との相違点、(2)piRNA前駆体の構造・配列特性、(3)piRNA前駆体から成熟piRNAを作る分子の同定と機能解析、(4)成熟piRNAとPiwiの複合体が核移行する分子メカニズム、の解明を目指す。次に各達成項目について詳述する。

(1)piRNAは、現在同定されているだけでも数十万種類に及び、ゲノムに存在する各レトロトランスポゾン種に由来することが報告されている。一方、piRNAは、由来するレトロトランスポゾンを標的として発現抑制に機能する。この一見矛盾した発現制御システムには、これまでの転写機構とは異なった分子が関与すると予想される。そこでpiRNA及び

レトロトランスポゾンの転写に関わる因子群を同定し、それが他の遺伝子とどのように異なるか理解する。(2)piRNAは長い前駆体RNAとして転写される、と考えられている。しかし、その構造的特徴(5' Cap構造、3' poly A配列など)に関する報告はなされていない。そこで、piRNA前駆体やレトロトランスポゾンの転写産物の構造的特性や配列特性を理解する。(3)piRNA前駆体から、成熟piRNAを作る因子群を同定する。個々の因子の具体的役割、例えば、piRNA前駆体を認識する蛋白質や、前駆体RNAを切断し、成熟型とする因子の同定と分子機構の理解を目指す。(4)piRNAとPiwiの複合体は細胞質で形成され、核へと移行する。piRNAの生合成阻害によってPiwiの核への局在が消失することから、piRNA依存的に核移行複合体が形成されることが示唆されている(Saito et al. Genes Dev. 2010)。そこで、核移行の責任因子を生化学的に同定し、Piwiの細胞内動態を制御する因子を明らかにする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞OSC(Saito et al. Nature 2009)は、RNAi法による遺伝子ノックダウンや過剰発現系が確立されている。piRNAを発現し、生化学的実験系が充実した培養細胞はOSC以外に例がなく、申請者は格段に優位な状況にある。そこでOSCを用いた以下の研究を中心に据え、piRNAの生合成機構を明らかにする。

(1)piRNAの転写装置の同定と機能解明

piRNAは一旦、長い前駆体RNAとして転写される。piRNA前駆体は、蛋白質コードmRNAと同様にPolIIIによって転写され、170kb以上におよぶ長鎖RNAである。申請者は、piRNA前駆体配列のポリA付加シグナル配列を探索した結果、316箇所(その中の50箇所が"AAUAAA")にも及ぶことを見いだした。すなわち、piRNA前駆体には、ポリA付加やスプライシングを積極的に回避する機構が働くと予測された。先行研究において、U1-snRNPは、スプライシングに加え、新規の転写産物を異常な切断とポリA化から保護するという機能をもつことが知られている。そこで、U1-snRNPに対するモルフォリノオリゴによって、piRNA前駆体の伸長が阻害されるか否か検討する。これと同時に、OSCの核内で機能している可能性が高い遺伝子をシグナル配列の探索および、Gene Ontologyを用いたデータマイニングにより抽出し、RNAi法でノックダウンする。piRNA量をノザンプロット法で評価するとともに、piRNA前駆体の下流領域の合成に対する影響をRT-PCR法を用いて検討する。以上の解析を通じて、piRNA前駆体の転写装置、及び、ポリA配列の付加回避装置を見いだす。

(2)piRNA生合成因子の機能解明

OSCにおいてPiwiをノックダウンすると、piRNA量の減少と、レトロトランスポゾンの発現上昇(脱抑制)が起こる。これまでにPiwi

相互作用蛋白質として Armitage と Yb と呼ばれる生殖巣形成に必須な蛋白質を見いだしている(Saito et al. Genes Dev. 2010)。Yb は Yb body と呼ばれる顆粒状構造体の中心因子であり、これをノックダウンするとやはり piRNA の減少が認められる。従って、Yb body は piRNA 生合成の場であると考えられる。そこで、Yb に対するモノクローナル抗体を作製し免疫沈降することで、Yb body 構成因子の同定を行う。一方、Zucchini と呼ばれる遺伝子が piRNA の生合成に関与することが明らかになっている。申請者はすでに Zucchini がミトコンドリアのサイトゾル側膜上に局在し、endoribonuclease 活性を持つことを示している(Nishimasu et al. Nature 2012)。そこで、Zuc と相互作用する蛋白質因子を免疫沈降法で単離し、質量分析で同定する。この中には新規 piRNA 生合成因子が含まれると期待されることから、同定した遺伝子をノックダウンし、piRNA が減少するかをノザンプロット法で検討し、生合成因子か否かを評価する。

(3)piRNA 前駆体の同定

piRNA は一本鎖の RNA 分子であり、トランスポゾンから作られる。piRNA は長い前駆体 RNA として転写され、細胞質へと輸送された後、トリミングされ、成熟型 piRNA となり、特異的に Piwi と結合する。言い換えれば、piRNA 前駆体は、mRNA のように翻訳装置に取り込まれることがない、と言える。すなわち piRNA は転写段階、生合成段階において、他の mRNA とは識別されている、と言える。従って、piRNA 前駆体には、識別を可能にするなんらかの「マーク」が存在すると考えられる。そこで、この「マーク」を調べるために、piRNA 前駆体を濃縮、単離し、塩基修飾や配列情報を質量分析や次世代型シーケンサーを用いた配列解析によって検討する。piRNA 前駆体の候補として Armitage 結合 RNA が考えられる。これまでの解析から、Armitage は piRNA よりも長い 30 から 100 塩基長の RNA と結合することが分かっている。従って、これが piRNA の前駆体である可能性が高い。そこで Armitage に対するモノクローナル抗体を用いて piRNA 前駆体様 RNA を抽出・濃縮し、その配列特性や特殊な修飾構造の有無などをシーケンサーや質量分析、薄層クロマトグラフィーによって検討する。

4 . 研究成果

ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞(OSC)において piRNA 前駆体を検出するため、in situ hybridization を行った。成熟 piRNA と前駆体 piRNA を区別するため、500 塩基程度の長い塩基プローブを用いることとした。piRNA 遺伝子座の一つである Flamenco locus を対象としたプローブを作製し、実験を行った結果、OSC 細胞質内に顆粒状のシグナルが認められた。これを、flam body と命名し、その特性を解析した(Murota et al. Cell Reports 2014)。Yb body 構成因子である

fs(1)Yb 蛋白質や Armitage (Armi)に対する抗体と in situ hybridization を同時に行った結果、Flam body は、Yb body と隣接、もしくは一部オーバーラップして存在することが明らかとなった。従って、flam body と piRNA 生合成マシナリーになんらかの相互作用があることが示唆された。次に、Yb の機能消失によって flam body が影響されるか否かを検討した結果、予測どおり、Yb body の消失によって flam body も消失することが明らかとなった。以上のことから、flam body は piRNA 前駆体の貯蔵場として働く可能性が示唆された。以上の知見を統合し、piRNA 生合成過程における Yb body と flam body の関連を示唆する論文を発表した(Murota et al. Cell Reports 2014)。

一方、OSC において、Piwi の核移行システムの解明を試みた。これまで Piwi が核に移行するには piRNA と複合体を形成する必要があることを示してきた。この RNA 分子依存的な核移行システムを in vitro で再現可能か検討するため、OSC から Piwi-piRNA 複合体の大量精製を行った。その結果、in vitro アッセイに必要な量を精製することに成功した。上記精製 Piwi-piRNA 複合体と OSC 細胞抽出液、更に、ジギトニン処理した OSC 核を用いて、in vitro 核移行アッセイを行った。しかし、この実験系では Piwi の核移行を観察するには至らなかった。従って、piRNA 依存的な核移行を in vitro で再構成することは困難であると判断した。そこで、これまでの解析から明らかにした Piwi の核移行シグナル部分に結合するタンパク質因子を同定することで、核移行レセプターの単離を試みた。Piwi の核移行シグナルは N 末端から 72 アミノ酸残基に存在することから、全長の Piwi と 72 アミノ酸残基を欠失させた変異体を発現するベクターをそれぞれ構築し、OSC にて結合タンパク質群の比較を行うこととした。銀染色によって、結合タンパク質の比較を行ったところ、数種のタンパク質に相当するシグナルに差異が認められた。この中には Piwi の核移行レセプターが含まれることが期待されることから現在、質量分析に十分な量を確保するため実験を継続して行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Murota Y, Ishizu H, Nakagawa S, Iwasaki YW, Shibata S, Kamatani MK, Saito K, Okano H, Siomi H, Siomi MC. Yb integrates piRNA intermediates and processing factors into perinuclear bodies to enhance piRISC assembly. Cell Reports, 査読有, 8, 103-113, 2014

〔学会発表〕(計 1 件)

Saito K. Molecular mechanisms of

piRNA-mediated transposon silencing. 日本遺伝学会年会, 2014年9月17日, 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 都暁 (SAITO Kuniaki)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 30423396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし