

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05583

研究課題名(和文) 小分子RNAとクロマチン因子によるゲノムレベルの非自己認識機構

研究課題名(英文) Recognition of self and non-self in the genome by small RNAs and chromatin factors

研究代表者

岩崎 由香 (Iwasaki, Yuka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80612647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポゾンゲノムにおける「非自己」として選択的に抑制する仕組みが生物には必須である。piRNAと呼ばれる小分子RNAが核内でトランスポゾン領域のヘテロクロマチン化に関与し、発現抑制を担っていることが示唆されているが、その責任因子および分子機構は未解明である。本研究では(1) piRNAが3種類のPIWIタンパク質に振り分けられる仕組み、(2) Piwiタンパク質とpiRNAによるヘテロクロマチン誘導メカニズム、(3) Piwi-piRNA複合体による標的トランスポゾン認識機構、の3点を明らかにすることで「ゲノムにおける非自己」制御の分子基盤の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are germline-specific small RNAs, which form the effector complexes with PIWI proteins to preserve the genome integrity by repressing transposable elements (TEs). Among PIWI-clade proteins in *Drosophila*, Piwi is known to transcriptionally silence their targets via heterochromatin formation. In this study, following points were analyzed in order to reveal the molecular mechanism of RNA silencing by Piwi-piRNAs: how piRNAs are assigned to three different types of PIWI proteins, how heterochromatin is induced by Piwi-piRNAs, and how Piwi-piRNA complex is guided to their target locus. The results obtained from these analyses revealed the mechanism how small RNAs and chromatin factors can recognize self and non-self in the genome.

研究分野：分子生物学、バイオインフォマティクス

キーワード：小分子RNA piRNA トランスポゾン 転写制御 エピゲノム制御

1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノムはレトロトランスポゾンの無秩序増殖の脅威から自己防衛しつつ、生存に必須な遺伝子群の発現を確保している。ゲノムにコードされている生存に必須な遺伝子群を「自己」、生存に脅威となるトランスポゾンやリピート配列群を「非自己」と定義すれば、生命はこれらを明確に区別する分子機構を備えていると言える。近年、この区別に PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる 20-30 塩基長の小分子 RNA を中心とした RNA サイレンシングが主要な役割を果たすことが示唆された [Siomi et al. Nat Rev Mol Cell Biol (2011)]。piRNA は主にレトロトランスポゾンに由来し、PIWI タンパク質群 (ショウジョウバエでは Piwi, Aub, AGO3 の 3 種類) と複合体を形成する。PIWI 遺伝子変異個体や piRNA 生合成関連遺伝子の変異ハエ個体では、レトロトランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞発生異常が起こり、不稔となる。以上のことから、PIWI-piRNA 複合体はトランスポゾンやリピート配列群を「ゲノムにおける非自己」として認識し選択的に抑制するためのガイド分子として働くと考えられる。

piRNA の産生経路に関しては主に 2 つのモデル、プライマリー経路およびピンポンサイクルが提唱されている [Brennecke et al. Cell (2007); Gunawardane et al. Science (2007)]。トランスポゾンのアンチセンス鎖に由来する配列をもつ piRNA クラスター (piRNA 前駆体) が、プライマリー経路を介して短くプロセシングされ、Piwi および Aub と結合する。そのうち、アンチセンス piRNA と結合した Piwi は核へと移行しトランスポゾンの転写を抑制する。一方、アンチセンス piRNA と結合した Aub は相補的な配列をもつトランスポゾンの RNA を切断し、これによりピンポンサイクルが開始される。切断されたトランスポゾンの RNA の一部はセンス piRNA となり AGO3 と結合する。さらに、センス piRNA と結合した AGO3 は相補的な配列をもつ piRNA クラスター由来の RNA を切断し、その一部がアンチセンス piRNA として Aub と結合する。ピンポンサイクルは Aub と AGO3 の間で、RNA レベルでのトランスポゾンの抑制と piRNA の産生を同時に行う。この抑制機構が機能するには、3 種類の PIWI タンパク質がそれぞれ適した piRNA と複合体を形成する必要があるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

Aub および AGO3 が細胞質で RNA の切断により標的トランスポゾンを抑制する一方で、核に局在する Piwi は、piRNA と複合体を形成することにより、標的トランスポゾンの転写をクロマチンの修飾を介して制御することが知られている [Sienski et al, Cell (2012)]。このことから、Piwi タンパク質および piRNA は、新たなエピジェネティック制御因子として機能すると考えられるが、この現象の責任因子並びにこの過程を支える分子機構については未解明である。

2. 研究の目的

トランスポゾンをゲノムにおける「非自己」として選択的に抑制する仕組みが生物には必須である。piRNA と呼ばれる小分子 RNA が核内でトランスポゾン領域のヘテロクロマチン化に関与し、発現抑制を担っていることが示唆されているが、その責任因子および分子機構は未解明である。本研究では (1) piRNA が 3 種類の PIWI タンパク質に振り分けられる仕組み、(2) Piwi タンパク質と piRNA によるヘテロクロマチン誘導メカニズム、(3) Piwi-piRNA 複合体による標的トランスポゾン認識機構、の 3 点を明らかにすることで「ゲノムにおける非自己」制御の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ卵巣由来の培養細胞 (OSC) は piRNA によるトランスポゾンの発現抑制が起こる培養細胞である [Saito et al. Nature (2009)]。OSC では siRNA によるノックダウンや過剰発現系が開発済みであり、生化学的解析が容易である。そこでこの培養細胞を基にした解析を進める。

(1) piRNA が 3 種類の PIWI タンパク質に振り分けられる仕組み

研究代表者は、これまでの研究成果から Krimper (Krimp) と呼ばれるタンパク質が PIWI タンパク質と相互作用すること、並びに Krimp ノックアウトショウジョウバエ個体では一部の PIWI タンパク質に結合する piRNA の種類が変化することを見出していた。このことから、PIWI タンパク質に結合する piRNA の種類を Krimp が制御している可能性を着想した。これを検討するために、OSC を用いた解析を行う。OSC では本来 Piwi 以外の PIWI タンパク質 (Aub 及び AGO3) は発現していないが、強制的に Aub 並びに AGO3 を発現させる。この条件下で Krimp の発現の有無で各 PIWI タンパク質にロードされる piRNA の種類や PIWI タンパク質および Krimp の局在にどのような影響があるかを検討する。

(2) Piwi タンパク質と piRNA によるヘテロクロマチン誘導メカニズム

核内で転写制御を行う Piwi と piRNA の複合体が形成するヘテロクロマチン状態とそれが誘導される機構を明らかにするために、Piwi と相互作用する因子を Piwi の免疫沈降および質量分析 (MS 解析) で同定する。さらに生化学的解析により、Piwi と関連因子との相互作用様式および、複合体の新規構成要素の同定を行う。一方で、各相互作用因子の役割およびヒエラルキーを検討するため、各因子を RNAi 法によってノックダウンし、複合体の相互作用様式を免疫沈降解析で、標的トランスポゾン領域のエピゲノム変化を ChIP-seq 解析により検討する。加えて、ATAC-seq 解析を用いて、Piwi-piRNA が結合するゲノム領域のクロマチン構造にどのような変化が起こるかを明らかにする。

(3) Piwi-piRNA 複合体による標的トランスポゾン認識機構

Piwi タンパク質がどのように標的トランスポゾンを選択するかを明らかにするために、Piwi 並びに既知の Piwi-piRNA 関連因子と相互作用する因子を免疫沈降および質量分析を用いて検出する。Piwi タンパク質の標的配列への誘導に寄与する因子の同定を目指し、検出された候補因子のなかでもとくに RNA 結合ドメインや DNA 結合ドメインをもつものに着目する。挙げられた候補因子並びに Piwi タンパク質が結合する核酸領域を、CLIP 法、ChIP 法、並びに Dam-ID 法を用いて同定し、Piwi-piRNA 複合体の標的認識エレメント及び機能プラットフォームを明らかにする。

4. 研究成果

(1) piRNA が 3 種類の PIWI タンパク質に振り分けられる仕組み

ショウジョウバエの卵巣では卵巣性体細胞においても piRNA が産生されているが、生殖細胞と異なり Piwi のみが発現し、プライマリー経路により Piwi と結合するアンチセンス piRNA のみが産生される。卵巣性体細胞においても Krimp は発現しており、Krimp 顆粒とよばれる細胞質顆粒体を形成する。

卵巣性体細胞である OSC を用いて Aub を異所的に発現させると、体細胞性のプライマリー経路により産生されるアンチセンス piRNA と結合するが、AGO3 を異所的に発現させても Aub のようにアンチセンス piRNA との結合はみられなかった。それぞれの細胞における局在について調べてみると、Aub は細胞質の全体に分布していたのに対し、AGO3 は Krimp が形成する顆粒に局在していることが明らかになった。さらに、Krimp をノックダウンしたところ、AGO3 が細胞質全体へ拡散し、体細胞性のプライマリー経路により産生されたアンチセンス piRNA と結合した。したがって、AGO3 はプライマリー経路により産生されたアンチセンス piRNA ともと結合しうるが、これは Krimp により抑制されていることが示唆された。また、この条件下では AGO3 に本来 Piwi に結合すべき piRNA がロードされることにより、Piwi に結合する piRNA 量が減少し、Piwi のトランスポゾン抑制能が低下することが明らかとなった。これらの結果から、Krimp は Piwi と結合する piRNA が誤って他の PIWI タンパク質に取り込まれることを防ぐ機能をもつことを明らかにした [Sato and Iwasaki et al. Mol Cell (2015)]。

(2) Piwi タンパク質と piRNA によるヘテロクロマチン誘導メカニズム

Piwi-piRNA 複合体の核内での転写抑制機構解明に向けて、免疫沈降を用いた関連因子群の同定およびエピゲノム解析を行った。その結果、核内における Piwi タンパク質の新たな相互作用因子として、リンカーヒストンである Histone H1 を同定した。Piwi と H1 は共通のトランスポゾンを抑制し、標的トラン

スポゾン領域における H1 結合量は Piwi により規定されることを見出した。これまでに、Piwi-piRNA 複合体はトランスポゾン領域の抑制性ヒストンマーク (H3K9me3) の形成に必須であることが明らかにされてきた [Sienski et al. Cell (2012)]。一方で、H1 を介した Piwi 標的トランスポゾンの抑制は、Piwi による抑制性ヒストンマークの形成と並行して機能することを示した。さらに、Piwi-piRNA 複合体が H1 および抑制性ヒストンマークの制御を介してクロマチン構造を凝集させることが、Piwi-piRNA 複合体によるエピジェネティックなトランスポゾン発現抑制の実態であることを明らかにした。これらの結果から、Piwi-piRNA 複合体は抑制性ヒストンマークの形成に加え、リンカーヒストンの位置情報を規定することで、クロマチン構造を凝集させトランスポゾンの発現を抑制する、という Piwi-piRNA 複合体による新たなエピゲノム制御モデルを提唱した [Iwasaki et al. Mol Cell (2016)]。

(3) Piwi-piRNA 複合体による標的トランスポゾン認識機構

Piwi の Dam-ID 解析、ChIP-seq 解析、CLIP 解析を試みたが、標的トランスポゾン特異的なシグナルは得られなかった。そこで Piwi が未知因子を介して標的遺伝子を認識している可能性を検討するために、Piwi 並びに piRNA 経路関連因子と複合体を形成する因子に着目し、解析を進めた。

Panoramix (Panx) は Piwi によって標的トランスポゾン領域へ係留され、ヘテロクロマチンを形成すると考えられている [Yang et al. Science (2015); Sienski et al. Genes Dev (2015)]。そこで Panx に対するモノクローナル抗体を作製し、免疫沈降および質量分析によって Panx の相互作用因子を解析した結果、Piwi に加えて新たに Nxf2 を同定した。Nxf2 は卵巣特異的に発現することが知られており、ユニバーサルに発現する RNA 核外輸送因子 Nxf1 と類似したドメイン構造をもつが、その機能は明らかになっていない。Nxf2 の発現を抑制したショウジョウバエ個体を用いた解析結果から、Nxf2 が Piwi と同様に不妊の原因遺伝子であることを見出した。RNA-seq および ChIP-seq 解析により、Nxf2 が Piwi-piRNA 経路で H3K9me3 修飾以前に機能し、トランスポゾンを抑制することを明らかにした。さらに、Nxf2 を人工的にレポーター遺伝子にテザリングする実験系を用いた解析により、Nxf2 は H3K9me3 修飾非依存的に転写制御を引き起こすことを示した。これらの結果から、Nxf2 は Piwi-piRNA 経路でヒストン修飾より前段階で転写を抑制していると考えられる。また、NXF ファミリーのなかでも RNA 輸送因子としての機能が知られている Nxf1 の RNA 結合ドメイン (ロイシンリッチリピート) が Nxf2 に保存されており、この領域を欠損した Nxf2 変異体はトランスポゾンを抑制することが出来ないことが示さ

れた。したがって、Nxf2 が Piwi と複合体を形成し、標的 RNA の選択を担う可能性を着想し、現在これを CLIP 法により検証している。以上の内容をまとめ、現在論文を執筆している。

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 15 件)

- ① Nishida K.M., Sakakibara K., Iwasaki Y.W., Yamada H., Murakami R., Murota Y., Kawamura T., Kodama T., Siomi H., *Siomi M.C.: Hierarchical roles of mitochondrial Papi and Zucchini in Bombyx germline piRNA biogenesis. *Nature*, 査読有 555:260-264 (2018) DOI:10.1038/nature25788
- ② Murano K., Iwasaki Y.W., *Siomi H.: Profiling open chromatin structure in the Ovarian Somatic Cells using ATAC-seq. *Methods in Molecular Biology*, 査読無 1680:165-177 (2018) DOI:10.1007/978-1-4939-7339-2_11
- ③ Iwasaki Y.W., Ishino K., *Siomi H.: Deep sequencing and high-throughput analysis of PIWI-associated small RNAs, *Methods*, 査読有 126:66-75 (2017) DOI:10.1016/j.ymeth.2017.05.020
- ④ Iwasaki Y.W., Murano K., Ishizu H., Shibuya A., Iyoda Y., Siomi M.C., *Siomi H., *Saito K.: Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. *Molecular Cell*, 査読有 63: 408-419 (2016) DOI:10.1016/j.molcel.2016.06.008
- ⑤ Sumiyoshi T., Sato K., Yamamoto H., Iwasaki Y.W., Siomi H., *Siomi M.C.: Loss of l(3)mbt leads to acquisition of the ping-pong cycle in *Drosophila* ovarian somatic cells. *Genes & Development*, 査読有 30: 1617-1622 (2016) DOI:10.1101/gad.283929.116
- ⑥ 岩崎由香, 塩見春彦, 齋藤都暁: Piwi はヒストン H1 を介したクロマチンの構造の制御により標的となるトランスポゾンを抑制する. *First author's ライフサイエンス新着論文レビュー*, 査読無 オンライン (2016) DOI:10.7875/first.author.2016.081
- ⑦ *Sato K., #Iwasaki Y.W. (#: co-first author), Shibuya A., Carninci P., Tsuchizawa Y., Ishizu H., *Siomi M.C., *Siomi H.: Krimper Enforces an Antisense Bias on piRNA Pools by Binding AGO3 in the *Drosophila* Germline. *Molecular Cell*, 査読有 59: 553-563 (2015) DOI 10.1016/j.molcel.2015.06.024
- ⑧ Iwasaki Y.W., *Siomi M.C., *Siomi H.: PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 査読有 84: 405-433 (2015) DOI:10.1146/annurev-biochem-060614-034258
- ⑨ Ishizu H., Iwasaki Y.W., Hirakata S., Ozaki H., Iwasaki W., Siomi H., *Siomi M.C.: Somatic Primary piRNA Biogenesis Driven by cis-Acting RNA Elements and trans-Acting Yb. *Cell Reports*, 査読有 12: 429-440 (2015) DOI:10.1016/j.celrep.2015.06.035
- ⑩ Nishida K.M., Iwasaki Y.W., Murota Y., Nagao A., Mannen T., Kato Y., Siomi H., *Siomi M.C.: Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells. *Cell Reports*, 査読有 10: 193-203 (2015) DOI:10.1016/j.celrep.2014.12.013
- ⑪ Parrish N.F., Fujino K., Shiromoto Y., Iwasaki Y.W., Ha H., Xing J., Makino A., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Siomi H., Honda T., *Tomonaga K.: piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA*, 査読有 21: 1691-1703 (2015) DOI:10.1261/rna.052092.115
- ⑫ Sato K., Iwasaki Y.W., *Siomi H., *Siomi M.C.: Tudor-domain containing proteins act to make the piRNA pathways more robust in *Drosophila*. *Fly*, 査読有 9: 86-90 (2015) DOI:10.1080/19336934.2015.1128599
- ⑬ 岩崎由香: piRNA クラスタ. *実験医学増刊*, 査読無 33: 3252-3253 (2015) <https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103510/>
- ⑭ 岩崎由香, 岩崎渉: ncRNA のバイオインフォマティクス解析. *実験医学増刊*, 査読無 33: 3379-3385 (2015) <https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103510/>
- ⑮ 佐藤 薫, 岩崎由香, 塩見美喜子, 塩見春彦: Krimp は AGO3 とセンス piRNA との相互作用を制御することによりアンチセンス piRNA の産生を促進する. *First author's ライフサイエンス新着論文レビュー*, 査読無 オンライン (2015) DOI:10.7875/first.author.2015.099

[学会発表] (計 19 件) 主要 10 件記載

- ① 岩崎由香: 新たな疾患・老化原因因子としてのトランスポゾンとその制御メカニズム. 産と学をつなぐ SENRI の会, 2018 年

- ② **岩崎由香**：生殖組織特異的に発現する小分子 RNA による転移因子の発現制御。10th Symphony, 2017 年
- ③ **岩崎由香**：Piwi-piRNA によるトランスポゾンの転写制御機構。第 5 回 NGS 現場の会, 2017 年
- ④ **Iwasaki Y.W.**： Modulation of three-dimensional chromatin structure by Piwi-piRNAs. Japan-Russia Symposium, 2017 年
- ⑤ **Iwasaki Y.W.**： Modulation of 3D Chromatin Organization by Piwi-piRNAs. JSPS-CAS Joint Research Program Meeting, 2017 年
- ⑥ **Iwasaki Y.W.**： Piwi modulates chromatin accessibility for transcriptional regulation of transposons. International Symposium “Clues to Non-coding RNA Taxonomy”, 2016 年
- ⑦ **Iwasaki Y.W.**, Murano K., Ishizu H., Shibuya A., Iyoda Y., Siomi M.C., Siomi H., Saito K. : Piwi-piRNA complex regulates linker histone H1 for transcriptional silencing of their target transposons in the nucleus. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年
- ⑧ **Iwasaki Y.W.**, Murano K., Ishizu H., Shibuya A., Iyoda Y., Siomi M.C., Siomi H., Saito K: Piwi-piRNA promotes epigenetic silencing by regulating association of linker histone H1 with target transposon loci. The 40th Naito Conference on “Epigenetics; From Histone Code to Therapeutic Strategy”, 2015 年
- ⑨ **Iwasaki Y.W.**, Ishizu H., Shibuya A., Iyoda Y., Siomi M.C., Siomi H., Saito K: Piwi-piRNA regulates linker histone H1 for transcriptional silencing of their target transposable elements. 第 17 回日本 RNA 学会年会, 2015 年
- ⑩ **Iwasaki Y.W.**, Ishizu H., Shibuya A., Iyoda Y., Siomi M.C., Siomi H., Saito K. : Piwi-piRNA regulates association of linker histone H1 with target transposon loci in *Drosophila*. RNA2015: The Twentieth Annual Meeting of the RNA Society, 2015 年
- [図書] (計 1 件)
- ① **岩崎由香**：内在性小分子 RNA の網羅的解析手法。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: 311-322 (2017)
- [その他]
- (アウトリーチ活動 計 8 件)
- ① 広報誌「あいみつく」記事執筆「この人・この研究：小さな RNA の作られ方と働き方」, 2018 年
- ② 慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス受験生向けパンフレット記事取材「自分の学びを深める」, 2018 年
- ③ 広報誌「内藤財団時報」記事執筆「第 43 回内藤コンファレンス参加印象記：第 43 回内藤コンファレンスに参加して」, 2018 年
- ④ 慶應ライフサイエンスシンポジウム (医・薬・理工・環境情報・文学部間研究交流イベント) 実行委員, 2017 年
- ⑤ 広報誌「内藤財団時報」記事執筆「第 40 回内藤コンファレンス参加印象記：内藤コンファレンスに参加して」, 2016 年
- ⑥ 慶應義塾大学医学部ホームページでの論文紹介記事掲載「今月のサイエンス」<http://www.med.keio.ac.jp/spotlight/2015/12/58-17942/>, 2015 年
- ⑦ 愛知県立明和高校スーパーサイエンスハイスクール 高校生対象講演「コンピュータでひもとく生命の仕組み」, 2015 年
- ⑧ 早稲田塾バイオプログラム 高校生対象講演「小さな RNA の働きを研究する」, 2015 年
- (学会活動 計 2 件)
- ① 日本 RNA 学会 男女共同参画委員 (年会における男女共同参画ランチョンセミナーの実施等) 2016 年-2018 年
- ② 日本 RNA 学会 国際化担当 (英語版学会ホームページの作成等) 2014 年-2016 年 (ホームページ)
- <http://siomilab.med.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 由香 (IWASAKI, Yuka)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号：80612647