

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06948

研究課題名(和文)生殖細胞特異的小分子RNAであるpiRNAの生合成経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of piRNA biogenesis in silkworm germ line BmN4 cells

研究代表者

西田 知訓(Nishida, Kazumichi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：10598436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：piRNAは、PIWIタンパク質と相互作用することでトランスポゾンを抑制する。カイコ piRNAの生成にミトコンドリア因子Papiが関与することが示唆された。しかし、piRNA生成で中核因子のエンドヌクレアーゼZucがカイコのpiRNA生成で重要であるかは不明であった。Zucの欠失によりPapi複合体にpiRNA中間体が蓄積すること、PapiはPIWIとの相互作用と自身のリン酸化によりpiRNA中間体と結合することを見出した。これは、階層的に複合体形成が行われてpiRNAが生成されることを示唆する。また、piRNAの5'末端はPIWIにより、3'末端はZucにより形成されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：piRNAs bind PIWI proteins to control transposons to maintain germline genome integrity. piRNA intermediates are bound with PIWI anchored onto mitochondrial PAPI. However, whether Zucchini (Zuc) endonuclease, which play pivotal roles in *Drosophila* piRNA biogenesis, are required for this remains elusive. We show that loss of Zuc in *Bombyx* aberrantly accumulated piRNA intermediates within the PAPI complex. PAPI exerted its RNA-binding activity only when being bound with PIWI and phosphorylated, suggesting a hierarchical process of the complex assembly. Both 5' and 3' ends of piRNA intermediates showed the hallmark of PIWI-Slicer. The 5' end of *Bombyx* piRNA is formed by PIWI-Slicer, while the 3' end is formed by Zuc endonuclease. The *Bombyx* piRNA biogenesis is simpler than that of *Drosophila*, because *Bombyx* has no phased piRNAs.

研究分野：RNA生物学

キーワード：piRNA PIWIタンパク質 Papi Zucchini ミトコンドリア 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン、自分自身の複製物を他のゲノム領域に転移させる因子として知られている。このトランスポゾンの転移は、生物の多様性を生み出す進化のためにも重要であるが、転移を原因とする遺伝子の突然変異により生体に重大な悪影響を及ぼす。そのため、生体内でトランスポゾンの発現を抑制する機構が進化してきた (Siomi and Siomi, *Nature* 2009)。生殖細胞におけるトランスポゾンの遺伝子発現抑制は、生殖細胞が正常に形成される過程において非常に重要である。そのため、トランスポゾンの遺伝子発現抑制機構について研究を行うことは、生殖細胞形成及び維持を明らかにするために非常に意義がある。トランスポゾンの発現抑制は、PIWI タンパク質が piRNA と複合体 (piRNA-induced silencing complex; piRISC) を形成することにより引き起こされる。PIWI タンパク質の欠失は、piRNA が減少することによるトランスポゾンの過剰発現とその過剰発現の影響による生殖細胞形成不全を引き起こす (Siomi et al. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011)。piRNA は、第一次および第二次生合成経路により生成されると考えられている。第一次生合成経路においては、単方向のトランスポゾン転写物より第一次 piRNA が生合成される。第二次生合成経路においては、第一次 piRNA を基として piRNA の増幅が行われる。piRNA 増幅機構の基質となるのはトランスポゾン転写産物である。つまり、この増幅機構によってトランスポゾン転写産物は分解へと導かれ、その転移活性は抑制される (Gunawardane et al. *Science* 2007)。しかしながら、piRNA 生合成経路で機能するその他の因子については、よく判っていないのが現状である。

2. 研究の目的

カイコ卵巣由来の生殖細胞から樹立した培養細胞である BmN4 を実験材料として用いた。BmN4 では、2 種類の PIWI タンパク質 (Siwi と Ago3) が発現している (Kawaoka et al. *RNA* 2009)。Siwi から BmAGO3 への piRNA loading を BmVasa が行っている事を報告した論文が発表された (Xiol et al. *Cell* 2014)。申請者も Siwi-piRISC から piRNA 前駆体を解離する因子として、Vasa を同定した。さらに、Siwi-piRISC から Vasa が piRNA 前駆体を解離することを *in vitro* の assay 系を確立することに初めて成功した (Nishida et al. *Cell reports* 2015)。また、Siwi と相互作用する因子として Spindle-E (Spn-E) と Qin を同定した。この 2 つの因子は、ショウジョウバエやマウスの解析から piRNA 生合成経路に関与することが判っている。Spn-E は、RNA ヘリカーゼドメインを有するタンパク質であるが、分子機能については未だ不明である。Spn-E に対するモノクローナル抗体を用いて解析を行ったとこ

ろ、Spn-E、Qin 及び Siwi は三者複合体を形成しうるということが判った。Siwi をノックダウンした BmN4 を用いて mRNA-seq を行ったところ、顕著に上昇すると新規 LTR 様トランスポゾンが存在することが判った。Qin をノックダウンした BmN4 において、新規 LTR 様トランスポゾン由来 piRNA が減少し、新規 LTR 様トランスポゾンの脱抑制がみられた。一方、Spn-E のノックダウンで、新規 LTR 様トランスポゾン由来 piRNA の量変化はみられないが、その他のトランスポゾン由来 piRNA が減少することが判った。つまり、Qin と Spn-E によって合成される piRNA 種が異なることが示唆された。これら因子のドメイン変異体を用いた解析を進めることにより、piRNA 生合成経路の解明に繋がると考える。さらに、これら複合体を用いて *in vitro* における piRNA 生合成経路の再構成を目指す。

3. 研究の方法

Qin 及び Spn-E の機能、piRNA loading assay 系の確立、*In vitro* piRNA 生合成経路の再構成により、piRNA 生合成経路を明らかにすることが目的である。本研究には、カイコ BmN4 細胞を用いて解析を進める。piRNA 前駆体は、piRNA 生合成経路を理解する上で重要な要素である。そのため、(1) Spn-E 複合体に含まれる piRNA 前駆体を同定する。Spn-E は、RNA ヘリカーゼドメインを持つ。よって、Spn-E 複合体には、piRNA 前駆体が含まれる可能性がある。次世代シーケンサの使用とバイオインフォマティクス解析により、piRNA 前駆体を同定する (2) piRNA 生合成経路に関わる Qin に結合する新規因子が piRNA 生合成に関与しているかを piRNA 量及びトランスポゾン発現量の変化により検討する。Qin と特異的に結合する因子を同定することは、Qin 及び piRNA 生合成経路の詳細を解明するために有効な手段である。Qin と特異的に結合する新規因子を免疫沈降法により精製し、質量分析によって同定する。 (3) 第二次生合成経路における Ago3 から Siwi への piRNA loading 関与因子の同定及び piRNA loading assay 系を確立する。Vasa と同様に、RNA 高次構造や RNA タンパク質複合体の構造を融解する活性があるヘリカーゼタンパク質が考えられる。AGO3 複合体を免疫沈降法により精製し、特異的な因子の同定を試みる。 (4) *in vitro* piRNA 生合成経路の再構成。以上の結果を総括することにより、piRNA 生合成経路のモデル化をする。

4. 研究成果

piRNA 生合成経路は、数多くの因子が関与している。しかし、それら因子の生化学的な機能について未だ不明な点が多く存在する。それら因子の一つである Spn-E は、RNA ヘリカーゼドメインを持つことから、RNA と結合することが考えられる。そこで、Spn-E の

CLIP を行った。その結果、予想した通り RNA が結合していることが判った。さらに、生合成経路因子の Qin でも同様に CLIP を行ったところ、RNA が結合していた。現在、それらの RNA をクローニングし、解析中である。これら因子に結合する RNA を同定することで機能の違いを明らかにする糸口になると考えられる。piRNA 生合成経路は、未だ同定されていない新規因子が存在していると考えられる。そこで、Spn-E 及び Qin に結合する新規因子の同定のため、それぞれの抗体で免疫沈降実験を行い、ショットガン解析により新規因子の同定を進めている。Qin の Nuage への局在に Zinc finger ドメインと TUDOR ドメインの両方必要なことが判ってきた。現在、piRNA 生合成へのこれら 2 つのドメインの必要性を明らかにしようとしている段階である。

Argonaute ファミリータンパク質は、Ago タンパク質と PIWI タンパク質に分類される。これまでに Ago タンパク質の全長の構造は解かれている。しかし、PIWI タンパク質の部分的な構造は明らかになっているが、全長の構造がどのようになっているのかは判っていない。また、Human の Ago タンパク質である Ago2 は小分子 RNA と結合した状態では、プロテアーゼに対しても安定的な構造を取っていることが判っていた。そこで、BmN4 細胞から Siwi 抗体を用いて精製した Siwi-piRISC をサーモリシンにより処理してみたところ、抗体から 10kDa ほど低い位置に Siwi-piRISC と思われるタンパク質を単離できた。単離した Siwi が piRISC を形成しているのかを確認するために、RNA を抽出後に RI でラベルしたところ piRNA の位置にシグナルが検出された。次に、この単離した Siwi-piRISC を 2.4 の解像度で構造を決定した。単離された Siwi-piRISC は、N 末が 120 アミノ酸程度削れたものであることが判った。さらに、構造解析から得られた情報を元に、どのアミノ酸が piRNA との結合に重要であるのかを明らかにするために、多種類のアミノ酸の点変異体を作成した。生化学的な解析を行い、piRNA の 5'末端及び 3'末端と結合するために重要なアミノ酸が構造解析で得られた結果と一致することが判った。以上の知見を統合して論文を発表した (Matsumoto et al. *Cell* 2016)。

以前から、Nuage とミトコンドリアに関連性があることが報告されていた。しかしながら、どのようにミトコンドリア上で piRNA 生合成が生じているのかは、よく判っていなかった。カイコにおいて、ミトコンドリア局在因子のエクソヌクレアーゼ Trimmer (Trim) が piRNA の 3'末端形成に関与すること、piRNA 中間体はミトコンドリア因子である Papi 上の PIWI に結合していることが示唆された。ショウジョウバエの piRNA 生合成経路で中核の役割を持つエンドヌクレアーゼ Zucchini (Zuc) がカイコの piRNA 生合成経路

において重要であるかは不明であった。また、Nbr はショウジョウバエの piRNA 生合成経路に関与することが報告されているが、カイコにおいて必要であるかは判っていない。まず始めに、Papi、Trim そして Nbr をノックダウンした条件下で強制発現させた Flag-Siwi または Flag-Ago3 に結合する piRNA を確認した。Papi のノックダウンにより、Flag-Siwi と Flag-Ago3 に結合する piRNA の量は劇的に減少したが、Nbr をノックダウン条件下ではほぼ影響がなかった。Trim のノックダウンにより、piRNA が 1 塩基程度伸長している結果が得られたが、piRNA の種類や strand bias に変化は見られなかった。次に、Papi 抗体を作製し、Papi 複合体を精製したところ、予想通り Siwi との結合が見られた。さらに、ミトコンドリア因子で piRNA 生合成に関与するヌクレアーゼである Zuc もこの複合体に含まれることが判った。この複合体内の Siwi は piRNA とほぼ結合していないことを見出した。また、この複合体には 60-70 塩基の piRNA 中間体が含まれることが判った。Zuc の欠失により Papi 複合体に piRNA 中間体が顕著に蓄積することを見出した。一方、Trim の欠失では piRNA 中間体の蓄積はみられなかった。つまり、piRNA 生合成において、Trim よりも Zuc の方が重要であることが示唆された。piRNA 生合成の場として、Papi が重要な足場になっていることが判った。Papi の KH ドメインは、piRNA 中間体と結合するために必要である。さらに、Papi は PIWI との相互作用と自身のリン酸化により RNA 結合能を獲得することで piRNA 中間体と結合する。これは、階層的に複合体形成が行われて piRNA が生成されることを示唆する。Papi 複合体に含まれる piRNA 中間体の 3' と 5' 末端は、PIWI のスライサー活性により形成されている。Zuc の欠失は、この piRNA 中間体の 3' と 5' 末端形成にほぼ影響を与えない。つまり、成熟型 piRNA の 5' 末端は PIWI のスライサー活性により形成され、一方で 3' 末端は Zuc のエンドヌクレアーゼ活性により形成されることが示唆された。カイコの piRNA 生合成経路は、ショウジョウバエでみられる Phased piRNA によるサイレンシング機構が無いことからショウジョウバエよりも単純な経路であることを明らかにした。以上の知見を統合して論文を発表した (Nishida et al. *Nature* 2018)。

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2件)(すべて査読有り)

Nishida KM, Sakakibara K, Iwasaki YW, Yamada H, Murakami R, Murota Y, Kawamura T, Kodama T, Siomi H, Siomi MC. Hierarchical roles of

mitochondrial PAPI and Zucchini in *Bombyx* germline piRNA biogenesis. *Nature* 555: 260-264. (2018)
doi: 10.1038/nature25788.
Matsumoto N, Nishimasu H, Sakakibara K, Nishida KM, Hirano T, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC, Nureki O. Crystal Structure of Silkworm PIWI-Clade Argonaute Siwi Bound to piRNA. *Cell* 167: 484-497. (2016)
doi: 10.1016/j.cell.2016.09.002.

〔学会発表〕(計1件)

西田 知訓

カイコ piRNA 生合成経路における BmZuc の機能解析 第 17 回日本 RNA 学会年会 2015

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 知訓 (NISHIDA Kazumichi)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：10598436