

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18488

研究課題名(和文) piRNA生合成に関わる細胞質構造体Yb body及びFlam bodyの解析

研究課題名(英文) Analysis of Yb body and Flam body related with piRNA biogenesis

研究代表者

室田 友紀子(Murota, Yukiko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：30774707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、piRNA生合成の場であるYb bodyとFlam bodyに局在するタンパク質の機能を解明することを目的として行った。その結果、Yb body構成因子であるVretとsoYbタンパク質は直接相互作用することで、相互にタンパク質の安定化を促していること、一方、Armiという別の因子については、Vretとの相互作用にRNAを必要とすることが分かった。さらに、Yb bodyで生合成されたpiRNAはその場でPiwiと結合し、その後核内輸送因子であるImportin と結合することで核内へ輸送されることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was intended to elucidate a function of protein located in Yb body and Flam body which were piRNA biosynthetic place. As a result, Vret and soYb protein which are localized in Yb body promote stabilization of the protein mutually by interacting directly. On the other hand, about the different factor called Armi, it was revealed that the interaction of it and Vret needs RNA. Furthermore, piRNA composed in Yb body establishes piRISC with Piwi. And then, piRISC combined with Importin alpha of transportation factor in the nucleus and was transported to the nucleus.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Yb body Flam body

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

piRNA は、生殖組織特異的に発現する小分子 RNA で、PIWI タンパク質と結合することで、トランスポゾン等の遺伝子発現を抑制している。生殖組織におけるトランスポゾンの転移はゲノムの損傷を引き起こし、卵・精子形成不全や不稔を導くことが分かっている。piRNA は、一次経路と Ping-pong とよばれる二次経路により産生される。本研究において使用したショウジョウバエ卵巣由来体細胞株 OSC は、PIWI タンパク質の一つである Piwi が関与する一次経路のみが発現している。OSC における一次経路では、fs(1)Yb (Yb) と呼ばれるタンパク質が中核となる細胞質顆粒体 Yb body が piRNA の生合成の場であることが分かっており、Yb body には、Armi や Vret、SoYb といったタンパク質が局在することが報告されている。また、本研究代表者らは、細胞質内に piRNA 中間体が蓄積する場である Flam body が存在し、その形成に Yb body が必要であることを報告している。Yb body で生合成された piRNA は、その後 Piwi と結合し、核内へ輸送され、トランスポゾンを抑制している。これまでの当研究室の研究により、Piwi は piRNA と結合した時のみ、核へ輸送されることがわかっている。

2. 研究の目的

これまでの研究により、Armi や Vret、SoYb といった Yb body の構成因子については明らかになっている。しかし、個々のタンパク質の機能については不明な点が多い。また、Flam body と呼ばれる細胞質顆粒体が存在することも明らかにしたが、piRNA 中間体の蓄積する場である以外の機能や、局在する他の因子については明らかになっていない。そのため、Yb body 因子である Vret や SoYb の機能や Flam body に局在する因子の探索を進めることで、piRNA 合成経路の更なる解明を目指した。さらに、当研究室の研究により、piRNA が Piwi と結合した時のみ、Piwi は核内へ輸送されることを報告したが、piRNA-Piwi 複合体を核へ輸送する因子や、piRNA-Piwi 複合体を形成した時のみ、核へ輸送されるメカニズムについては、未だ明らかになっていない。そのため、piRNA-Piwi 複合体を核内へ輸送する因子の探索や、輸送メカニズムの解明を行う。これらを明らかにすることにより、piRNA の生合成経路を明らかにするだけでなく、piRNA のトランスポゾン抑制機構に対する新しい知見を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

(1) Vret と SoYb の相互作用の解析

OSC における、Yb body 構成因子である Vret と SoYb の相互作用を解析するために、まず抗 Vret 抗体や抗 SoYb 抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、上記2種類の抗体を用いて western blotting を行った。また、同じ抗体を用いて、Vret と SoYb の共

免疫染色を行うことにより、細胞内局在を確認した。さらに、RNase で処理した OSC 懸濁液を用いて、抗 Vret 抗体や抗 SoYb 抗体により共免疫沈降を行うことで、この2つのタンパク質の相互作用に RNA が介在するかを確認した。また、大腸菌により発現させた Vret や SoYb タンパク質を用いて、in vitro でのプルダウンアッセイも行い、これら2つのタンパク質が直接相互作用しているかについても確認を行った。その後、タンパク質の持つ各ドメインに着目し、ドメイン毎の変異体や一塩基置換変異体を作成し、同様に相互作用の確認を行った。また、Vret、SoYb をノックダウンした細胞を用いて、抗 Vret 抗体や抗 SoYb 抗体により western blotting を行い、これらのタンパク質の発現を調べることで、タンパク質の安定性を調べた。

(2) Vret と Armi の相互作用の解析

Vret と Armi の相互作用を確認するために、(1) 同様に OSC を用いて、抗 Armi 抗体または抗 Vret 抗体による免疫沈降法と共免疫染色、RNase 処理した OSC 懸濁液を用いた共免疫沈降を行った。

(3) piRNA-Piwi 複合体の核内輸送因子の探索

代表的な核内輸送因子として、Importin があげられる。ショウジョウバエには、Importin 1 (Imp 1)、Importin 2 (Imp 2)、Importin 3 (Imp 3) の3種類が発現していることが知られている。そのため、まず3種類の Imp をそれぞれノックダウンした OSC での Piwi の細胞内局在を、抗 Piwi 抗体を用いた免疫染色法で確認することで、piRNA-Piwi 複合体の核内輸送に Imp が関与するかを確認した。その後、Imp 1、Imp 2、Imp 3、に対する抗体を作成した。これらの抗体を用いて、まず3種類の Imp の細胞内におけるタンパク質の存在比を調べた。存在比を調べるために、大腸菌で各 Imp を発現させ、その精製タンパク質と OSC の内在のタンパク質量を、western blotting により比較した。その後、OSC を用いて抗 Imp 2、Imp 3 抗体による免疫沈降を行った。さらに、Piwi の N 末端を削った変異体を作成し、免疫染色により各変異体の細胞内局在を確認することで、Imp が結合するドメイン (Nuclear localization sequence (NLS)) を特定した。

(4) piRNA-Piwi 複合体の核内輸送メカニズムの解明

Piwi は、piRNA と結合しないと核内へ輸送されないことは、これまでの当研究室の研究により報告したが、そのメカニズムは不明なままである。そこで、2つの仮説を立てた。piRNA が結合する前の Piwi に未知のタンパク質 X が結合し、Imp が Piwi に結合するのを阻害している。piRNA が Piwi に結合することで、Piwi タンパク質自

体の構造が変化し、Imp が結合できるようになる。これら2つの仮説のどちらが正しいかを立証するために、まず Piwi の NLS を典型的な NLS として知られる、SV40 NLS に置換したタグをつけた変異体を作成し、Yb をノックダウンした OSC に強制発現させ、その局在を抗タグ抗体により観察した。その後、この仮説を立証するために、Piwi と piRNA-Piwi 複合体を、タンパク質分解酵素であるキモトリプシンにより限定分解し、抗 Piwi 抗体を用いた western blotting により得られたバンドのパターンを比較した。piRNA と結合していない Piwi を得るために、piRNA が発現していないショウジョウバエの胚由来細胞である S2 細胞に Piwi を強制発現させ、その懸濁液より Piwi を抗 Piwi 抗体により単離した。また、piRNA-Piwi 複合体については、OSC 懸濁液を用いて、同様の方法で単離した。

4. 研究成果

(1) Vret と SoYb の相互作用の解析

OSC を用いて共免疫沈降を行った結果、Vret と SoYb が結合していることが分かった。さらに、共免疫染色を行うことで、Vret と SoYb が Yb body に局在することも確認できた。さらに、OSC の細胞懸濁液に RNase を処理した状態で共免疫沈降を行った。その結果、RNase を処理した状態でも Vret と SoYb の相互作用が確認できた。Vret と SoYb が直接相互作用していることをより明確にするために、それぞれのタンパク質を大腸菌により発現させ、その精製タンパク質を用いて、in vitro でのプルダウンアッセイを行った。その結果、in vitro でも Vret と SoYb が相互作用していることが分かった。このことから、Vret と SoYb が直接相互作用していることが分かった。その後、Vret と SoYb の各ドメインに着目し、ドメイン毎の変異体や一塩基置換変異体を用いて免疫沈降し、お互いのタンパク質が結合している部位の特定を行った。また、Vret や SoYb をノックダウンした細胞を、それぞれに対する抗体を用いた Western blotting により解析した結果、Vret をノックダウンすることにより SoYb の発現量が、SoYb をノックダウンすることにより Vret の発現量がそれぞれ減少することが分かった。これらの結果により、Vret と SoYb が相互に結合することにより、お互いを安定化することが明らかとなった。これまでの研究で、Vret と SoYb が Yb body に局在することについては報告されていたが、いずれもタグのついたタンパク質を強制発現させることにより解析が行われていた。しかし本研究では、当研究室で作成した、内在の Vret や SoYb に対する抗体を用いて解析を行っており、この点で他の報告よりもインパクトがある。

(2) Vret と Armi の相互作用の解析

(1) 同様に、Vret と Armi の相互作用解析を行った。その結果、OSC において、Vret と Armi は相互作用していることが分かった。しかし、Vret と SoYb の結果と違い、OSC の細胞懸濁液に RNase を処理すると、Vret と Armi の相互作用が失われた。このことから、Armi と Vret の結合は RNA を介していると考えられる。こちらの実験についても、抗 Vret 抗体、抗 Armi 抗体共に、当研究室で作成した内在のタンパク質に対する抗体を用いて解析を行っており、タグのついたタンパク質を強制発現させて解析を行っている報告よりもインパクトの高い結果である。

(3) piRNA-Piwi 複合体の核内輸送因子の探索

Imp 1、Imp 2、Imp 3 をノックダウンした OSC を、抗 Piwi 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Imp 2、Imp 3 をノックダウンすることにより、Piwi の核移行が阻害される結果を得た。そこで、Imp 1、Imp 2、Imp 3 に対する抗体を作成した。その結果、western blotting や免疫沈降、免疫染色に用いることが可能な質の良い抗体を得ることができた。これまで、ショウジョウバエの Imp に対する抗体はいくつか報告されているが、いずれも免疫染色に向かない、免疫沈降ができない等の問題があった。今回当研究室で得られた抗体は、全ての解析に適した抗体であるため、この点でもインパクトが高いと考えられる。これらの抗体を用いて、まず OSC における、Imp 1、Imp 2、Imp 3 のタンパク質存在比を調べた。その結果、Imp 2 の存在量が一番多く、ついで Imp 3 が多いことが分かった。また、Imp 1 に至っては、4%ほど、ほとんど発現していないことが分かった。そのため、Imp 1 をノックダウンした際に Piwi の核移行が阻害されなかったのは、Imp 1 が核移行に関与していないのではなく、存在量が極端に少ないため、ほとんど影響がみられなかったためと考えられる。次に、OSC を用いて、作成した抗 Imp 2 抗体や抗 Imp 3 抗体により免疫沈降を行った。その結果、Piwi と Imp 2 や Imp 3 が相互作用していることが確認できた。これらの結果より、piRNA-Piwi 複合体の核内輸送因子として、Imp を同定した。これまで、piRNA-Piwi 複合体を核内へ輸送する因子についての報告はなく、本研究により初めて同定された。さらに、Piwi の N 末端を削った変異体を作成し、免疫染色により各変異体の細胞内局在を調べた。その結果、N 末端 36 アミノ酸を削ると、Imp が存在するにも関わらず、Piwi の核輸送が阻害された。この結果より、Piwi の N 末 36 アミノ酸が NLS であると考えられる。

(4) piRNA-Piwi 複合体の核内輸送メカニズムの解明

研究の方法に記載の仮説を検証するために、Piwi の NLS を SV40 NLS に置換した変異体を作成し、Yb をロックダウンした OSC に強制発現させた。その後、免疫染色によりこの変異体の細胞内局在を調べた。もし、仮説が正しければ、Piwi の NLS に結合するタンパク質 X は、この変異体に結合できず、Yb をロックダウンして、piRNA-Piwi 複合体を形成できない状態であっても、NLS が露出できるため、Piwi は Imp により核へ輸送されるはずである。免疫染色の結果、Piwi と同様にこの変異体についても、Yb をロックダウンすることで、Piwi の核移行が阻害された。この結果より、仮説にあるタンパク質 X は存在しない可能性が高いことが示唆された。次に、仮説を検証するために、Piwi と piRNA-Piwi 複合体をタンパク質分解酵素であるキモトリプシンにより限定分解し、抗 Piwi 抗体を用いた western blotting により解析した。Piwi と同じ Argonaute タンパク質に属する、人の AGO2 タンパク質を用いた研究により、miRNA が結合する AGO2 と結合していない AGO2 を、タンパク質分解酵素であるサーモリシンでそれぞれ処理すると、分解パターンが違うということが報告されている (Elkayam et al. 2012)。この結果は、miRNA の結合の前後で AGO2 タンパク質の構造が変化していることを示唆している。この研究と同様に、Piwi と piRNA-Piwi 複合体についても、キモトリプシンにより限定分解を行った。人の AGO2 の研究においては、AGO2 を大腸菌により発現させ、そのタンパク質を精製し、限定分解に用いていた。しかし、Piwi については、大腸菌から精製することができなかった。そのため、piRNA を発現していない S2 細胞に Piwi を強制発現させ、抗 Piwi 抗体により精製することで、piRNA と結合していない Piwi を得た。また、piRNA-Piwi 複合体については、OSC より、抗 Piwi 抗体を用いて精製した。精製された 2 つのタンパク質をキモトリプシンにより処理し、抗 Piwi 抗体を用いて western blotting を行った。その結果、piRNA と結合していない Piwi はいろいろなサイズに分解されているのに対し、piRNA と結合した Piwi は N 末から数十アミノ酸が削れる以外は分解されないことが分かった。この結果より、Piwi は AGO2 同様 piRNA の結合前後で構造を変化させていることが分かった。Piwi タンパク質が piRNA の結合の前後で構造を変えているという報告は今までになく、この結果が初めてであるため、インパクトが高いと考えられる。しかし、限定分解による結果は、タンパク質の構造が変化しているという間接的な結果である。さらにインパクトのある報告とするために、Piwi の構造を明らかにする必要がある。しかし、これまで Piwi タンパク質の構造に関する報告はない。さらに、当研究室におい

ても構造の解明を試みたものの、未だに結晶化に成功していない。そのため、クライオ電顕などの新しい技術を用いて、Piwi の構造や piRNA が結合する前後の Piwi の構造の変化を明らかにする手法の構築が必要である。

<参考文献>

Elkayam E1, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. Cell. 2012 150:100-10.

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 1 件)

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, 査読有り, Vol.555, 2018, pp 260-264, DOI: 10.1038/nature25788

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

室田 友紀子 (Murota Yukiko)

東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員

研究者番号：30774707

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()