

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14621

研究課題名(和文) ピンポンサイクル経路を駆動する新奇RNAヘリカーゼの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel RNA helicase that drives the ping-pong cycle pathway

研究代表者

村上 僚 (Murakami, Ryo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：00783870

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)：カイコ生殖細胞において、Siwi、Ago3はpiRNAと結合し、ピンポンサイクル経路において互いが協調的に機能することでトランスポゾンRNAを切断し、不活化する。本研究課題では、Ago3の切断産物を解離させ、Siwiへと転移させるRNAヘリカーゼDDX43を同定し、その機能解析を行った。これまで、生殖組織特異的なRNAヘリカーゼであるDDX43の機能は不明であったが、DDX43はRNA結合ドメインであるKHドメインとATP加水分解依存的にRNAをほどくDEADドメインが協調的に働くことでAgo3から切断産物を解離しピンポンサイクル経路を駆動することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAは生殖細胞特異的な小分子RNAであり、にトランスポゾンを抑制することでゲノム情報の安定化に寄与している。piRNAの増幅とトランスポゾンの抑制を同時に行うピンポンサイクル経路は生物間で保存されており、この経路の理解はpiRNAの機能解明に重要である。本研究で同定したDDX43は、ピンポンサイクル経路の駆動に必要なRNAヘリカーゼであり、その機能解明は生殖細胞の発生機構の一端を明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：Siwi- and Ago3-piRNA induced silencing complex (piRISC) in silkworm germ cells cooperate the ping-pong cycle to produce Ago3- and Siwi-piRISC, respectively, by cleaving transposon transcripts, leading to transposon repression. In this study, we show that DEAD-box polypeptide 43 (DDX43) binds Ago3-piRISC and liberate RNAs from the complex to facilitate Siwi-piRISC production in the ping-pong cycle. Biochemical analysis using a series of DDX43 mutants revealed individual and collaborative functions of the two domains: The helicase core is responsible for Ago3 binding and ATP hydrolysis while the KH domain greatly enhances the ATPase activity owned by the helicase core. The full exertion of RNA-binding activity of DDX43 requires both KH domain and the helicase core. This study revealed the molecular function of DDX43 in germ-specific piRISC biogenesis and gained new insights into the roles of KH domain and the helicase core.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA RNAサイレンシング RNAヘリカーゼ Argonaute 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

20~30 塩基長の小分子 RNA が、Argonaute タンパク質ファミリーと結合することで遺伝子の発現を負に制御する機構を RNA サイレンシングと呼ぶ。RNA サイレンシングは、酵母からヒトに至るまで、真核生物に広く保存された機構であり、発生や代謝、ウイルス感染に対する防衛など、多くの生命現象を制御している。(Siomi and Siomi, 2009)。Argonaute タンパク質は、ほぼ全組織において恒常的に発現している AGO サブファミリーと、生殖細胞特異的に発現している PIWI サブファミリーに分類される (Kim et al., 2009)。PIWI サブファミリーは生殖細胞特異的に合成される 24~29 塩基長の小分子 RNA である piRNA と結合し、piRISC を形成し、機能する。piRNA は主にレトロトランスポゾンに由来しており、piRISC は piRNA の配列相補的なトランスポゾンの発現を抑制することでゲノムの品質管理を担っていることが明らかになってきた (Siomi and Kuramochi-Miyagawa, 2009)。

piRNA の産生経路は、AGO サブファミリーと結合する microRNA や siRNA の生合成機構とは基本的に独立しており、トランスポズンをコードする DNA 領域から転写された piRNA 前駆体が複数段階の成熟過程を経て成熟型 piRISC を形成するプライマリー経路と、プライマリー経路によって形成された piRISC を起点とし、トランスポゾン RNA の切断及び piRNA の生成を繰り返すピンポンサイクル経路といった 2 つの piRNA 産生モデルが提唱されている (Siomi et al, 2011)。

特にピンポンサイクル経路は「トランスポゾン RNA の直接的な発現抑制」と「新規 piRISC の増幅」の 2 つを連続的に行うユニークな経路である (図 1)。ピンポンサイクル経路は高等真核生物に広く保存されており、カイク生殖細胞においては Siwi, Ago3 と呼ばれる 2 種類の PIWI タンパク質が RNA 切断、受け渡しを繰り返すことで piRISC を増幅すると考えられている。ピンポンサイクル経路の駆動には Vasa と呼ばれる RNA ヘリカーゼが必須であることが知られており、Vasa は Siwi 及び Ago3 と結合することで三者複合体を形成し、Siwi から切断後のトランスポゾン RNA を解離させ、Ago3 への piRNA 結合を促進する (Xiol et al., 2014; Nishida et al., 2015)。ピンポンサイクル経路は生殖細胞の正常な発生に必須であり、Vasa 遺伝子を欠失したショウジョウバエ個体が不妊になることから、ピンポンサイクル経路は生殖細胞の発達及び保全に必須である (Jeske et al., 2017)。しかしながら、Ago3 から切断後の RNA を解離させ、Siwi へと受け渡す因子は未だに同定されておらず、ピンポンサイクル経路による piRISC 増幅メカニズムは明らかにされていなかった。

近年、申請者はカイク生殖細胞培養細胞である BmN4 を用い、Vasa をはじめとする RNA ヘリカーゼが PIWI タンパク質に安定して結合する条件で免疫沈降実験及びショットガン質量分析を行うことで、Ago3 と相互作用する RNA ヘリカーゼである DDX43 を新たに単離・同定することに成功した。カイク DDX43 のホモログであるヒト DDX43 タンパク質を用いた生化学実験により、DDX43 は RNA 結合性であること、そして ATP 加水分解依存的に RNA ヘリカーゼ活性を示すことが知られている (Talwar et al., 2017)。しかし、生殖細胞における DDX43 の詳細な機能や生理的意義は不明であり、ピンポンサイクル経路の分子機構を理解するためには DDX43 の機能解析が必須である。

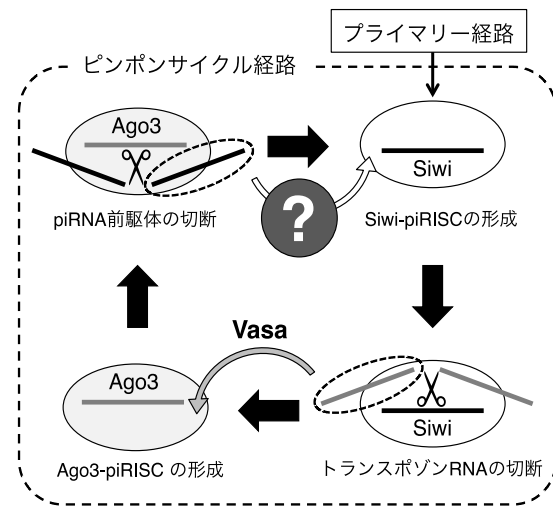


図 1 カイク生殖細胞におけるピンポンサイクル経路

2. 研究の目的

本研究の目的は、Ago3 結合性新奇 RNA ヘリカーゼとして同定された DDX43 の機能解析を行うことで、Ago3 が切断 RNA を解離し、Siwi へと受け渡す反応系を明らかにすることである。ピンポンサイクル経路に関する研究は、主に次世代シーケンサーを用いた分子遺伝学的な解析を軸に行われており、経路のモデル自体は 2007 年に提唱された (Gunawardane et al., Brennecke et al., 2007)。しかし、piRNA 経路に関与するタンパク質や RNA の分子的な作用機序については殆ど研究がなされていない。特にモデルが提唱されてから 10 年近く経過した現在においても、ピンポンサイクル経路の分子機構は不明な点が多く、Ago3 からの RNA 解離を促進する因子の同定が困難を極めていることから、分子レベルでは仮説の域を脱していないのが現状である。本研究は DDX43 の同定を基盤とし、ピンポンサイクル経路における PIWI 間の RNA 転移機構を分子レベル及び細胞レベルで解明することで piRNA 経路によるトランスポゾン抑制機構の一端を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、各種組み換えタンパク質及びカイコ生殖細胞由来培養細胞株である BmN4 細胞を用いる事で、カイコをモデル生物としたピンポンサイクル経路における DDX43 の分子機能を *in vitro* での ATP 加水分解活性測定、RNA 結合アッセイ、RNA 切断・解離アッセイ、*in vivo* での複合体解析やレポーターアッセイなどを行うことで明らかにする。また、DDX43 には、RNA 結合ドメインとして知られている KH ドメイン及び ATP 加水分解依存的な RNA ヘリカーゼ活性を持つ DEAD box ヘリカーゼドメインが存在することがホモロジー検索によって予測されている。そこで、DDX43 の RNA 結合能や ATP 加水分解活性といったタンパク質機能が piRNA 生合成にどのように寄与しているのかを明らかにするため、各ドメインに点変異を導入し、各種活性を欠失した DDX43 変異体を調製し、野生型の機能解析と並列して、その分子機構の解明に迫った。

4. 研究成果

まず、Ago3 へ DDX43 が直接的に結合することを明らかにするため、His-tag の融合した DDX43 を組み換えタンパク質として調製し、プルダウンアッセイにより相互作用を解析した (図 2)。その結果、DDX43 は他の因子を介さずとも Ago3 に結合できることが明らかになった。また、BmN4 細胞を用いた相互作用解析により、DDX43 は Ago3 のみならず、Siwi にも結合することが明らかになった。ピンポンサイクル経路のモデルでは piRNA の結合した Ago3-piRISC が切断した切断産物がアポ型の Siwi に導入されると考えられるため、DDX43 に結合する Siwi を単離し、その形状を確認した。その結果、DDX43 に結合する Siwi の大部分はアポ型であり、DDX43 はアポ型の Siwi を Ago3 上に誘導することでピンポンサイクル経路による piRNA 増幅機構を促進していることが示唆された (図 3)。次に、DDX43 が Ago3 依存的な Siwi piRNA 産生に寄与していることを明らかにするため、Ago3-piRISC によって切断を受ける人工レポーターアッセイ系を構築し、細胞内におけるピンポンサイクル経路の活性を検証した。Siwi-piRNA はピンポンサイクル経路以外にも一次生合成経路によって合成されることから、Siwi-piRNA を単離するだけではどちらの経路由来の piRNA であるかを判別することが不可能だが、レポーター系を用いることでピンポンサイクル経路に依存した Siwi-piRNA のみを検出することができる (図 4 上)。その結果、DDX43 をノックダウンした細胞では、Ago3 ノックダウン時と同様にレポーター由来の piRNA が減少したことから、生殖細胞内で DDX43 がピンポンサイクル依存的な piRNA 産生に寄与していることが示された (図 4 下)。

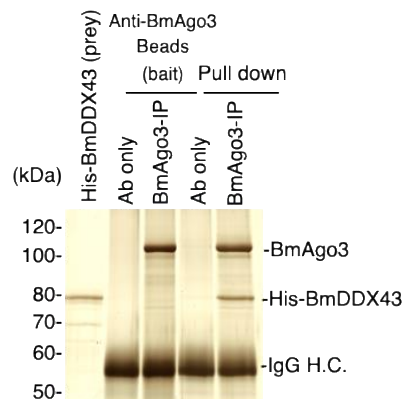


図 2 プルダウンアッセイ

磁気ビーズに結合させた Ago3 を精製 DDX43 と混合。両者が存在するときのみビーズ上に DDX43 が検出された。

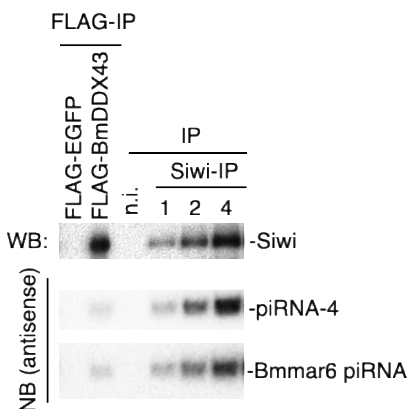


図 3 DDX43 結合 Siwi はアポ型である
DDX43 に結合した Siwi における piRNA (piRNA-4, Bmmer6 は代表的な Siwi-piRNA) を検出。

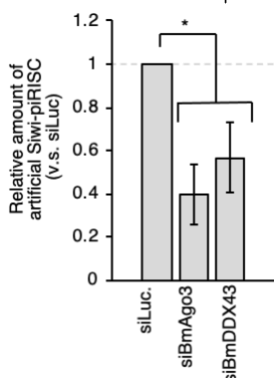
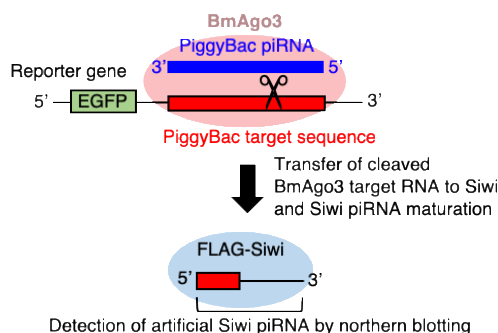


図 4 *in vivo* レポーターアッセイ

上: 系の模式図。Ago3 特異的な piRNA である PiggyBac に相補的な標的 RNA を発現させ、レポーター由来の人工 Siwi piRNA を検出

下: 人工 Siwi piRNA 量の比較

次に、レポーターアッセイの結果を踏まえ、DDX43の機能ドメインに注目し、どのようにしてDDX43がAgo3から切断産物を解離するのかを明らかにするため、DDX43の変異体を調製し、その活性を検証した。DDX43はRNA結合ドメインの一種であるKHドメイン、ATP依存的に二本鎖RNAを解離させるDEAD-boxドメインを持つことが予測されている(図5)。まず、ATP加水分解活性に対する各ドメインの機能を検証した(図6)。DEAD-boxドメインに保存されているアスパラギン酸(D399)、グルタミン酸(E400)はATP加水分解の中心であることが報告されており、それらを変異させた場合、ATP加水分解活性が著しく低下したことから、DDX43も他のDEAD-box型RNAヘリカーゼと同様の様式でATPを加水分解することが示唆された。興味深いことに、KHドメインを欠いたDDX43もATP加水分解活性を欠いており、KHドメインはDEAD-boxにおけるATP加水分解が必要であることが明らかになった。DEAD-box型RNAヘリカーゼについて、ATP加水分解に他のドメインを必要とするものは殆ど報告されていないことから、今回の発見は新たなATP加水分解制御機構を示唆するものである。また、これらの変異体を用いてAgo3からのRNA解離活性を*in vitro*で検証した。この系では、磁気ビーズに固定したAgo3を調製し、標的RNAを切断させることで、Ago3結合RNA(ビーズ画分)と遊離RNA(水層画分)を分離することができる(図7左)。この結果、野生型DDX43はAgo3から切断RNAを解離することができるのに対し、変異体では解離活性が著しく低下した(図7右)。このことから、DDX43はKHドメインとDEADドメインが共役することで活性を持ち、Ago3からRNAを解離させることが可能になることが明らかになった。

以上の結果から、DDX43はアポ型Siwi、Ago3に結合し、KHドメインとDEADドメインの両方によってATP加水分解活性を発揮することでAgo3に結合した切断産物を解離し、ピンポンサイクル依存的なSiwi-piRISC産生に寄与することが示された。DDX43はヒトやマウスにも保存されたRNAヘリカーゼであり、本研究で得られた知見はpiRNA経路の普遍的なメカニズムの解明につながるものだと考えられる。



図5 DDX43のドメイン配置

DDX43はN末端側にKHドメイン(緑)、C末端側にDEADドメイン(橙)を有する。

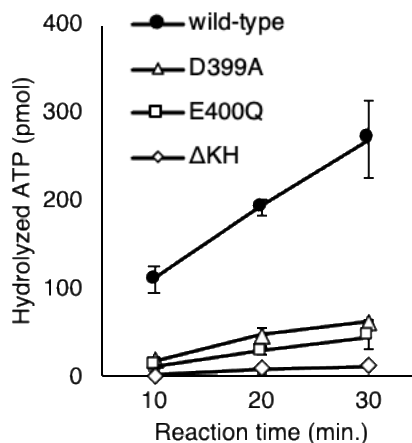


図6 DDX43変異体のATP加水分解活性

この系では、磁気ビーズに固定したAgo3を調製し、標的RNAを切断させることで、Ago3結合RNA(ビーズ画分)と遊離RNA(水層画分)を分離することができる(図7左)。

この結果、野生型DDX43はAgo3から切断RNAを解離することができるのに対し、変異体では解離活性が著しく低下した(図7右)。このことから、DDX43はKHドメインとDEADドメインが共役することで活性を持ち、Ago3からRNAを解離させることが可能になることが明らかになった。

以上の結果から、DDX43はアポ型Siwi、Ago3に結合し、KHドメインとDEADドメインの両方によってATP加水分解活性を発揮することでAgo3に結合した切断産物を解離し、ピンポンサイクル依存的なSiwi-piRISC産生に寄与することが示された。DDX43はヒトやマウスにも保存されたRNAヘリカーゼであり、本研究で得られた知見はpiRNA経路の普遍的なメカニズムの解明につながるものだと考えられる。

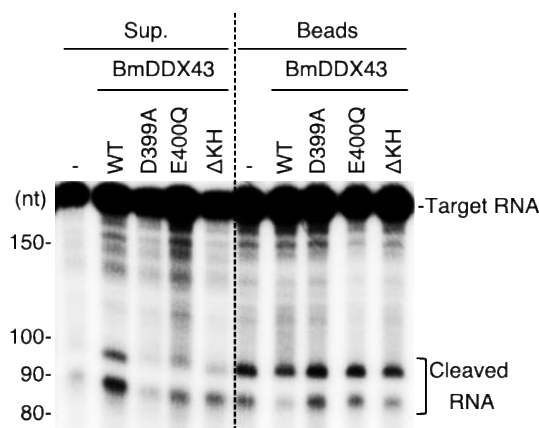
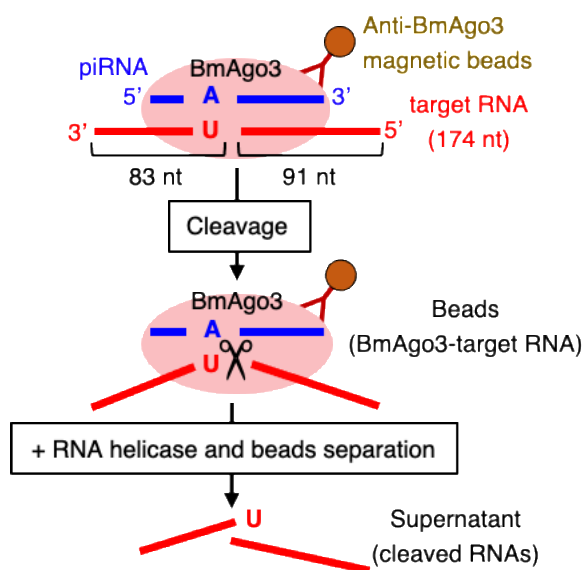


図7 *in vitro* RNA解離アッセイ

左: 反応系の模式図

右: DDX43変異体のRNA解離活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村上 僚、竹村 明香里、根岸 瑠美、塩見 美喜子
2. 発表標題 新規ピンポンサイクル駆動RNAヘリカーゼの同定と機能解析
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 僚、竹村 明香里、根岸 瑠美、塩見 美喜子
2. 発表標題 新規ピンポンサイクル駆動RNAヘリカーゼDDX43の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 僚、竹村 明香里、根岸 瑠美、塩見 美喜子
2. 発表標題 ピンポンサイクル経路を駆動する新規RNAヘリカーゼDDX43の機能解析
3. 学会等名 CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域第七回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Murakami, Akari Takemura, Lumi Negishi and Mikiko C. Siomi
2. 発表標題 RNA helicase DDX43 drives piRNA amplification cycle in silkworm germline
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience RNA Neobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 僚、竹村 明香里、根岸 瑠美、塩見 美喜子
2. 発表標題 Ago3結合性RNAヘリカーゼDDX43の分子機能解析
3. 学会等名 転移因子研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 僚、竹村 明香里、根岸 瑠美、塩見 美喜子
2. 発表標題 カイコpiRNA増幅経路ピンポンサイクルにおけるRNAヘリカーゼDDX43の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Murakami, Akari Takemura, Lumi Negishi, Mikiko C. Siomi
2. 発表標題 RNA helicase DDX43 drives Ago3-dependent piRNA biogenesis in ping-pong cycle
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (ICSB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 僚、竹村 明香里、根岸 瑠美、塩見 美喜子
2. 発表標題 RNAヘリカーゼDDX43はAgo3依存的なpiRNA生合成を促進しピンポンサイクルを駆動する
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----