

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06484

研究課題名(和文) PIWIタンパク質BmAgo3のリン酸化制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulation of BmAgo3 phosphorylation

研究代表者

泉 奈津子 (Natsuko, Izumi)

東京大学・定量生命科学研究所・技術専門職員

研究者番号：50579274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では当初、BmAgo3のリン酸化による制御を研究課題としていたが、研究開始後に関連する報告がなされたため、BmAgo3のリン酸化が亢進する、Siwi非存在下におけるBmAgo3複合体の解析を行った。その解析の中で、piRNA因子の一つとして知られるGtsf1のパラログ、Gtsf1LがSiwi非存在下でBmAgo3複合体に蓄積することを見いだした。さらなる解析の結果、カイコにおいて、Gtsf1、Gtsf1Lという2つのGtsfパラログが、Siwi、BmAgo3と特異的に相互作用し、各々の標的切断を促進することで、piRNA経路において独立に機能していることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAが産生できない動物個体は、配偶子形成が不全となり不妊となる。ヒトの無精子症においても、piRNA産生に関わる因子の変異が報告されてきており、piRNA産生の分子機構の解明は、不妊症の原因理解にもつながる社会的意義のある研究課題である。PIWIの標的切断はpiRNA産生の原動力となっていることから、本研究を契機に明らかとなった、カイコGtsfタンパク質によるPIWIの標的切断の促進は、piRNA産生機構の理解を大きく前進させるものといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we initially planned to analyze the regulation of BmAgo3 phosphorylation, but after the study was initiated, another group reported related results. Because of this, we changed the research topic and analyzed the BmAgo3 complex in the absence of Siwi, where the phosphorylation of BmAgo3 is enhanced. In this analysis, we found that Gtsf1L, a paralog of Gtsf1, one of evolutionarily conserved piRNA factors, accumulates in the BmAgo3 complex in the absence of Siwi. We obtained results suggesting that silkworm two Gtsf paralogs, Gtsf1 and Gtsf1L, independently function in the piRNA pathway by specifically interacting with Siwi and BmAgo3 respectively and promoting their target cleavage.

研究分野：RNAサイレンシング

キーワード：piRNA Siwi BmAgo3 Gtsf

## 1. 研究開始当初の背景

PIWI タンパク質は piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる 30 塩基程度の小さな RNA と共に、ゲノム中に存在する転移因子 (トランスポゾン) の活性を抑えることにより、生殖細胞のゲノムを守る重要な役割を担っている。piRNA 産生が損なわれた個体は、配偶子形成が正常に進行せず不妊となることがさまざまな動物種において報告されている。これらの知見は、生殖細胞における piRNA 経路の重要性を示しており、piRNA の生成機構の理解は生物学的に極めて重要な課題である。

piRNA の多くはトランスポゾン由来の配列をもち、PIWI タンパク質は結合している piRNA と相補的な配列をもつ RNA を標的として認識する。多くの PIWI タンパク質はエンドヌクレアーゼ活性をもち、主として標的 RNA の切断によりその発現を抑制する。PIWI タンパク質による標的 RNA の切断は、トランスポゾンの活性を抑制するだけでなく、piRNA の産生とも連動しており、標的 RNA の切断断片から新たな piRNA をつくりだす。従って、PIWI タンパク質による標的 RNA の切断は、新たな piRNA を生み出す原動力となっている。

カイコの卵巣から樹立された BmN4 は、piRNA を発現する数少ない培養細胞であり、piRNA 研究の優れたモデル系として利用されている。私はこれまで、BmN4 細胞を用いて、piRNA 産生の分子機構の解析に取り組んできた。カイコには、エンドヌクレアーゼ活性をもつ 2 つの PIWI タンパク質 Siwi、BmAgo3 が存在し、Siwi の標的切断は BmAgo3 piRNA を、BmAgo3 の標的切断は Siwi piRNA を作り出すという、互いが結合する piRNA を増幅する関係が知られている。一連の piRNA 産生の過程には、多数のタンパク質が介在するため、各因子が正しい順序で PIWI タンパク質に作用し、効率よく piRNA を産生するためにはさまざまな制御がはたらいっていることが予想されるが、分子機能が未だ不明な piRNA 因子も多く、piRNA 因子の制御については十分理解が進んでいない。これまでの研究から、PIWI タンパク質はジメチルアルギニン修飾をうけることが知られており、この修飾は piRNA 産生に不可欠な Tudor ドメインタンパク質との相互作用に必要であることが示されている。一方、piRNA 産生において、ジメチル化修飾以外の翻訳後修飾が PIWI タンパク質の制御に関わるという報告はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

piRNA 経路の中核因子である PIWI タンパク質 BmAgo3 を解析する過程で、BmAgo3 の一部がリン酸化されており、Siwi ノックダウン下において、BmAgo3 のリン酸化が亢進することを偶然見出した。タンパク質のリン酸化修飾は、タンパク質間の相互作用や局在、機能を可逆的に制御することから、BmAgo3 のリン酸化が、piRNA 経路において BmAgo3 の制御に関係している可能性を考えた。本研究では、BmAgo3 のリン酸化部位を同定し、BmAgo3 リン酸化の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

BmAgo3 のリン酸化は Siwi 非存在下で亢進することから、通常条件下および Siwi 非存在下において BmAgo3 の免疫沈降を行い、質量分析解析により BmAgo3 のリン酸化部位の同定を試みる。次に質量分析解析によって同定されたリン酸化部位について変異体 (リン酸化型およびリン酸化非感受性型) を作製し、各変異体の発現量、細胞内局在、piRNA 結合量、および既知の典型的な相互作用因子との結合量を野生型 BmAgo3 と比較する。これにより野生型と異なる挙動を示した変異体のリン酸化部位を特定する。さらにリン酸化と piRNA 産生との関係を明らかにするため、表現型がみられたリン酸化変異体が結合する piRNA の性状を、次世代シーケンサーを用いて解析する。

また、BmAgo3 のリン酸化を司るキナーゼを同定するため、表現型がみられた BmAgo3 のリン酸化部位について、そのアミノ酸配列をもとに、まずはデータベースおよびリン酸化予測プログラムを利用し、キナーゼが特定できないかを検討する。さらに、BmAgo3 のリン酸化が亢進する Siwi 非存在下や、リン酸化非感受性変異体では、BmAgo3 とキナーゼの結合が増加する可能性が考えられることから、Siwi 非存在下においてリン酸化非感受性変異体を発現させ、その複合体中にキナーゼが含まれていないかを質量分析により調べる。キナーゼ候補が見つかった場合には、その阻害により BmAgo3 のリン酸化が低下するか、また、キナーゼ阻害下での BmAgo3 の挙動と BmAgo3 のリン酸化非感受性変異体の挙動が一致するかを検証する。さらに同定した候補キナーゼの精製タンパク質を準備し、BmAgo3 のリン酸化部位を含むペプチドに対するリン酸化能を *in vitro* アッセイにより評価する。

#### 4. 研究成果

BmAgo3 のリン酸化が亢進する Siwi ノックダウン下において免疫沈降した BmAgo3 の質量分析解析の結果、Ser116、Ser117、Ser140、Ser143、Ser145、Ser149 を含む多数のリン酸化ペプチドの同定に成功した。同定されたリン酸化部位の多くは、明確な構造をとらないことが予想されている N 末端領域に集中していた。次に上記リン酸化部位を含む、同定されたすべてのリン酸化部位に変異を導入し、リン酸化型およびリン酸化非感受性型の BmAgo3 を発現するコンストラクトを作製し、その挙動を野生型 BmAgo3 と比較した。その結果、リン酸化型変異体では、野生型に比べ発現量が低く、piRNA の結合量がやや少ない傾向がみられた。一方で、リン酸化非感受性型は野生型と同等の発現を示したが、piRNA の結合量はやや多い傾向がみられた。これらの結果から、BmAgo3 のリン酸化が BmAgo3 タンパク質の安定性や、piRNA 結合に影響する可能性が考えられた。そこで、リン酸化型およびリン酸化非感受性型 BmAgo3 が結合する piRNA のライブラリを作製し、野生型 BmAgo3 が結合する piRNA とその性状を比較した。しかし、いずれの変異体が結合する piRNA も野生型 BmAgo3 の結合する piRNA に比べやや長いという傾向があるものの、明確な質的相違は見い出せなかった。また、個別のリン酸化部位の変異体の解析から、リン酸化変異体と表現型の関係はある程度明らかとなったものの、BmAgo3 のリン酸化が亢進する Siwi ノックダウン下での BmAgo3 の挙動と、作製したリン酸化型変異体の挙動には一致しない点も多く、Siwi ノックダウン下での BmAgo3 の挙動がリン酸化そのものに起因するわけではないことが示唆された。さらに、Siwi ノックダウン下での BmAgo3 のリン酸化についての報告がなされたため (1)、リン酸化変異体の解析は一時中断し、BmAgo3 のリン酸化が亢進する Siwi ノックダウン下の BmAgo3 複合体に着目した解析を進めることにした。

この解析から、Siwi ノックダウン下で BmAgo3 への相互作用が増加する因子の一つとして、Gametocyte-specific factor 1 (Gtsf1) のパラログである Gtsf1-like (Gtsf1L) を同定した。Gtsf1 は、進化的に保存された piRNA 因子の一つであるが、種によって、piRNA 経路における機能に違いが報告されている。ショウジョウバエにおいて、Gtsf1/Asterix は、Piwi とともに核内でのトランスポゾンの転写抑制に機能し、piRNA 産生には関与しない (2)。一方、マウス Gtsf1 は Miwi2 piRNA の産生に不可欠であり、Gtsf1 KO マウスは Miwi2 KO マウスと同様の表現形を示す (3)。カイコにおいて Gtsf1 変異体は、piRNA の減少を伴う配偶子形成の異常、トランスポゾンの脱サイレンシングなどの表現形を呈し、piRNA 経路における必要性は明らかとなっているものの (4)、具体的な機能は不明である。また、カイコにおいて Gtsf1 のパラログである Gtsf1L についての報告はこれまでになされていない。最近になり、共同研究を行っていた Phillip D. Zamore 博士らのグループにより、マウス Gtsf1 に MILI や MIWI の標的切断を促進する活性があることが見いだされた (5)。同グループからの情報をもとに、同様の活性がカイコ Gtsf1 にもみられるかを調べた結果、カイコ Gtsf1 には Siwi の標的切断を促進する活性があることが明らかとなった (5)。一方、BmAgo3 の標的切断を促進する活性はみられなかった (5)。Gtsf1L は Gtsf1 と約 28% の相同性があることから、Gtsf タンパク質と PIWI タンパク質との相互作用を調べたところ、Gtsf1 は Siwi と、Gtsf1L は BmAgo3 とそれぞれ特異的に結合することが明らかとなった。また、BmAgo3 から Siwi への切断産物の受け渡しが阻害される Siwi ノックダウン下において、Gtsf1L と BmAgo3 との相互作用が増強したことから、Gtsf1L の BmAgo3 の標的切断への影響を解析したところ、Gtsf1L は BmAgo3 の標的切断を弱く促進する一方で、Siwi の標的切断活性には影響を与えなかった。従って、カイコにおいては、Gtsf1、Gtsf1L という 2 つの Gtsf パラログが 2 つの PIWI タンパク質、Siwi、BmAgo3 と特異的に相互作用し、各々の標的切断を促進することで、piRNA 経路において独立に機能していると考えられる。現在この仮説をさらに検証すべく、Gtsf1、Gtsf1L ノックダウン下での piRNA の産生状況や、カイコ個体でのノックダウン実験を進めており、今後、カイコ Gtsf タンパク質の piRNA 経路における機能の違いにフォーカスした論文をまとめる予定である。

#### < 引用文献 >

1. 2020 EMBO J., Nishida *et al.*, DOI: 10.15252/embj.2020105130.
2. 2013 Genes Dev., Dönertas *et al.*, DOI: 10.1101/gad.221150.113.
3. 2018 EMBO Rep, Yoshimura *et al.*, DOI: 10.15252/embr.201642054.
4. 2020 PLoS Genet., Chen *et al.*, DOI: 10.1371/journal.pgen.1009194.
5. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.04.442675v3>, Arif *et al.*, Nature in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chung Pui Yuen, Shoji Keisuke, Izumi Natsuko, Tomari Yukihide	4. 巻 22
2. 論文標題 Dynamic subcellular compartmentalization ensures fidelity of piRNA biogenesis in silkworms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202051342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Natsuko, Shoji Keisuke, Suzuki Yutaka, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide	4. 巻 578
2. 論文標題 Zucchini consensus motifs determine the mechanism of pre-piRNA production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 311～316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-1966-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigematsu Megumi, Kawamura Takuya, Morichika Keisuke, Izumi Natsuko, Kiuchi Takashi, Honda Shozo, Pliatsika Venetia, Matsubara Ryuma, Rigoutsos Isidore, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide, Kirino Yohei	4. 巻 12
2. 論文標題 RNase promotes robust piRNA production by generating 2',3'-cyclic phosphate-containing precursors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24681-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amena Arif, Shannon Bailey, Natsuko Izumi, Todd A. Anzelon, Deniz M. Ozata, Cecilia Andersson, Ildar Gainetdinov, Ian J. MacRae, Yukihide Tomari, Phillip D. Zamore	4. 巻 -
2. 論文標題 GTSF1 accelerates target RNA cleavage by PIWI-clade Argonaute proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Natsuko Izumi, Keisuke Shoji, Yukihide Tomari
2. 発表標題 In vitro analysis of BmZuc cleavage-mediated pre-piRNA generation in silkworms
3. 学会等名 日本RNA学会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	UMass Medical School	Thomas Jefferson University	