

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06483

研究課題名(和文) 生殖ゲノムを守るpiRNAの生合成におけるQinおよびSpn-Eの機能解析

研究課題名(英文) Molecular function of Qin and Spn-E in piRNA biogenesis

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)・特任講師

研究者番号：10598436

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)：QinおよびSpn-Eは、生殖組織特異的なpiRNAの生合成に必須の因子である。本研究では、カイコ卵巣由来BmN4細胞を用いて、両者の分子機能と作用機序を解明することを目的とした。Qin発現抑制下では細胞質に多数のカプシド様構造が認められたことから、Qinはトランスポゾンカプシド様構造の形成を抑制することが明らかになった。さらに、QinはCdの発現を特異的に抑制する因子であることが示唆された。また、ノーザンブロットにより、Qin発現抑制下で蓄積するCd-piRNA前駆体を検出した。その結果、Cd-piRNA前駆体は、polyAが付いていること、Qinと複合体を形成していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Spn-EとQinが、第一次経路でどのようにして異なるpiRNAの生成で機能するのかに焦点をあてて解析を進め、piRNA生合成経路の解明をする。本研究の解析が進捗することにより、倫理的な面や材料の確保から解析が難しいヒトなどの哺乳類へpiRNA生合成経路への解明に繋がり、piRNA生合成経路を応用して不妊治療などの医療へと繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Qin and Spn-E are essential for piRNA biogenesis in germ cell. In this study, we aimed to clarify the molecular functions of both factors using silkworm ovary-derived BmN4 cells.

Under the downregulation of Qin, numerous capsid-like structures were observed in the cytoplasm, indicating that Qin suppresses the formation of transposon capsid-like structures. Furthermore, Qin was suggested to be a specific repressor of Cd expression. We also detected Cd-piRNA precursors that accumulated under the repression of Qin expression by Northern blotting. The results revealed that Cd-piRNA precursors were attached with polyA and formed a complex with Qin.

研究分野：RNA生物学

キーワード：piRNA Qin Spn-E トランスポゾン 生殖細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

piRNA は、生殖細胞で発現するトランスポゾン由来の小分子 RNA である。piRNA は PIWI タンパク質と複合体を形成し、トランスポゾン mRNA の遺伝子発現を抑制する。piRNA は、第一次経路で生成されたのち、第二次経路で増幅される。これまでの解析から piRNA 生合成経路に関与する多数の因子が同定されてきた。しかし、これら因子の piRNA 生合成経路における分子機能は、未だよく判っていない。

BmN4 は、カイコの生殖細胞から由来する培養細胞であり、2 種類の PIWI タンパク質 (Siwi と Ago3) が発現している。さらに、BmN4 は、現在に存在する唯一の生殖細胞由来の培養細胞であり、piRNA 生合成経路の解析で有効な材料である。

第二次経路については、関与する因子の分子機能も解析され次第に明らかになってきたが、第一次経路についての情報は乏しく謎のままであった。申請者は、RNA ヘリカーゼである Spn-E が第一次生合成経路において Siwi-piRNA の生成で重要な因子であること、Spn-E は Qin および Siwi と複合体を形成することを示した(Nishida et al. *Cell Reports* 2015)。これまでにショウジョウバエの Qin は、第二次経路で piRNA の生成に関与することは報告されていた(Zhao et al. 2011)。しかし、Qin が第一次経路において必要であるかどうかは知られていなかった。

2. 研究の目的

これまでの解析から、Siwi の欠失は Countdown (Cd) と名付けた新規 LTR 様トランスポゾンの劇的な発現上昇を引き起こすこと、Qin が Siwi に結合する piRNA の全体の生成量には影響しないが、Cd-piRNA の生成に関与すること、Spn-E は Siwi に結合する piRNA の全体の生成量に影響を与えるが、Cd-piRNA の生成に関与しないことを明らかにした。つまり、Qin と Spn-E は同じ複合体を形成しているにも関わらず、第一次生合成経路において異なる piRNA の生成に関与することが示唆された。しかし、Spn-E と Qin が、どのようにして異なる piRNA の生成で機能しているのかは判っていない。

本研究では、Qin および Spn-E を生化学的に解析することにより、第一次経路における piRNA 生成への仕組みの違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) カプシド様構造の観察

Siwi 発現抑制下では BmN4 細胞質内に多数認められる Cd の顆粒様構造が Qin 発現抑制下においても同様に検出されることを、Cd のモノクローナル抗体を用いた免疫染色法によって確認した。さらに、免疫染色法で検出される Cd の顆粒様構造がトランスポゾンカプシドであるかを明らかにするため、透過型電子顕微鏡を用いて Qin 発現抑制下における BmN4 細胞内の構造観察を行なった。

(2) Qin が抑制するトランスポゾンの網羅的な解析

Siwi によって抑制されるトランスポゾンのうち Qin 依存的に抑制されるものを同定することを目的として、次世代シーケンサーを用いた RNA sequencing により Qin 発現抑制下で発現する RNA の網羅的な配列解析を行った。

(3) Qin が生合成に寄与する piRNA の網羅的な解析とそれが生み出される Cd 相同領域の同定

Siwi に結合する piRNA のうち Qin 依存的に生合成されるものを同定することを目的として、次世代シーケンサーを用いた small RNA sequencing により Qin 発現抑制下で Siwi に結合する piRNA の網羅的な配列解析を行った。さらに、Qin 依存的に生合成される piRNA が

生み出される Cd 相同領域をカイコゲノムにおいて網羅的に探索した。

(4) Qin が結合する piRNA 前駆体の解析

Qin 依存的にプロセシングされる Cd-piRNA 前駆体を同定することを目的として、まず、Cd 断片配列を RNA probe として用いたノーザンプロットを行い、BmN4 細胞で発現する Cd-piRNA 前駆体を検出した。さらに Qin モノクローナル抗体を用いた RNA 免疫沈降法により、Qin 複合体中に Cd-piRNA 前駆体が含まれるかを検証した。

4. 研究成果

(1) カプシド様構造の観察

免疫染色法の結果、Siwi 発現抑制下と同様に Qin 発現抑制下でも細胞質に多数の Cd の顆粒様構造が検出された。さらに透過型電子顕微鏡観察の結果、Qin 発現抑制下では細胞質に多数のトランスポゾンカプシド様構造が認められた。今後は、このカプシド様構造が免疫染色法で検出された Cd の顆粒様構造と同一であることを、Cd のモノクローナル抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察によって明らかにする方針である。

(2) Qin が抑制するトランスポゾンの網羅的な解析

Siwi によって抑制されるトランスポゾンのうち、Qin 発現抑制下では Cd のみが顕著に脱抑制されることを見出した。従って、Qin は piRNA 経路において Cd の発現を特異的に抑制する因子であることが示唆された。

(3) Qin が生合成に寄与する piRNA の網羅的な解析とそれが生み出される Cd 相同領域の同定

Qin 依存的に生合成される piRNA を同定し、さらに、それらが生み出される Cd 相同領域をカイコゲノムにおいて複数候補同定した。しかし、カイコゲノム中の繰り返し配列の多さが障壁となり、項目 2. および 3. で得られた解析リソースから候補領域を絞り込むことは困難であった。そこで、項目 4. の解析を通じて目的達成を試みた。

(4) Qin が結合する piRNA 前駆体の解析

ノーザンプロットの結果、Qin 発現抑制下では polyA のついた Cd-piRNA 前駆体が蓄積することが判明した。さらに RNA 免疫沈降法の結果、この Cd-piRNA 前駆体が Qin と結合することが示唆された。現在、次世代シーケンサーを用いた PacBio Sequel II により BmN4 細胞で発現する RNA の全長配列について網羅的な解析を行っている。本解析は項目 2. と比較してより長い RNA 配列の解読が可能であり、項目 2. および 3. の結果と合わせることで Cd-piRNA 前駆体、およびそれらが生み出されるゲノム領域の同定につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishida KM, Sakakibara K, Sumiyoshi T, Yamazaki H, Mannen T, Kawamura T, Kodama T, Siomi MC.	4. 巻 39
2. 論文標題 Siwi levels reversibly regulate secondary piRISC biogenesis by affecting Ago3 body morphology in Bombyx mori	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020105130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田知訓
2. 発表標題 カイコpiRNA生合成経路におけるQinの機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田知訓、榊原和洋、住吉哲太郎、山崎啓也、萬年太郎、川村猛、児玉龍彦、塩見美喜子
2. 発表標題 カイコ生殖細胞におけるSiwiの発現量に依存した可逆的なAgo3 bodyの形態変化による2次piRNA生合成の制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020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
---------	---------