

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15743

研究課題名(和文) ショウジョウバエ卵巣体細胞におけるpiRNA前駆体選別機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of piRNA precursor selection in Drosophila ovarian somatic cells

研究代表者

平形 樹生(Hirakata, Shigeki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：40844791

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)：動物の生殖組織に特異的な小分子RNAであるpiRNAは、トランスポゾン抑制し、生殖組織におけるゲノムの正確な継承を支えている。ショウジョウバエの卵巣体細胞では、piRNA前駆体のシス配列がRNA結合タンパク質Ybに認識されることで、piRNAの産生が開始される。しかし、シス配列の特性は不明であった。

本研究では、共同研究によりtj mRNAのシス配列の構造解析を行い、「T-ヘアピン」と名付けた新規構造を持っていることを明らかにした。さらに、この構造がプロセシングの開始において重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAは、自身の塩基配列と相補的な配列を持つ遺伝子の発現を抑制する。従って、piRNA前駆体を正確に選択し、そこから正しい配列のpiRNAを産生することは、有害なトランスポゾンのみを抑制し、生命の維持に必須な遺伝子を妨げないために不可欠である。本研究では、piRNA前駆体の選択において重要な機能を持つcis配列の特徴を世界で初めて明らかにした。

piRNA経路に異常が生じると様々な生物種で不妊となる。一方でトランスポゾンは進化の原動力とされる。piRNA経路の解明は、医療への応用や、生物とトランスポゾンとの関係性を理解するための基盤的知見をもたらす可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：piRNAs, small RNAs specific to animal reproductive tissues, repress transposons and support the accurate inheritance of the genome in reproductive tissues. In Drosophila ovarian somatic cells, the recognition of the cis elements of piRNA precursors by the RNA-binding protein Yb initiates their processing to produce piRNAs. However, the characteristics of the cis elements were unknown.

In this study, I performed a structural analysis of the cis element on tj mRNA by collaborative research and revealed that it has a novel structure, "T-hairpin". I also showed that this structure is important in the piRNA biogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Yb T-hairpin tj

1. 研究開始当初の背景

20~30塩基長の小分子RNAによる遺伝子発現抑制機構はRNAサイレンシングと呼ばれ、真核生物に広く保存されている。RNAサイレンシングの標的は、小分子RNAが配列相補性によって決定する。小分子RNAのうち、Piwiタンパク質と複合体を形成するものはpiRNAと呼ばれ、動物の生殖組織に特異的に発現してトランスポゾンの発現・転移を抑制する。piRNA経路の異常はゲノムの損傷による不妊をもたらすため、piRNA経路の研究は生殖医療への応用が期待されている。

piRNA経路の解析は、ショウジョウバエ卵巣体細胞由来の培養細胞株であるOvarian Somatic Cells (OSC)の樹立により、大きく進んだ(Hirakata and Siomi *Biochim Biophys Acta* 2016)。OSCを用いた研究によってpiRNA前駆体から、piRNA生合成の引き金となるcis-elementが同定された(Ishizu et al. *Cell Rep* 2015)。Cis-elementは、piRNA生合成に必要なタンパク質であるYbに認識される。piRNA前駆体の選定は、piRNAの配列、ひいては発現抑制の標的を左右するため、piRNA経路において極めて重要な段階である。しかし、Yb認識配列が持つ特徴は明らかになっていない。

OSCにおいて、トランスポゾンを標的とするpiRNAの多くは、遺伝子間領域flamに由来する。flamはトランスポゾンの断片配列に富んでおり、その大半はflamの転写方向に対して逆向きに挿入されているため、flam由来のpiRNAはトランスポゾンと相補的な配列を持つ。一方、タンパク質をコードするmRNAから作られるpiRNAも知られ、これらはgenic piRNAと呼ばれる。Genic piRNAはトランスポゾンと相補的な配列を持たず、その標的や機能は不明である。Ybタンパク質とflam RNAは液液相分離によってYb bodyと呼ばれる細胞質顆粒を形成し、flam RNAのプロセッシング効率を高める(Hirakata et al. *EMBO Rep* 2019)。一方、genic piRNAのプロセッシングはYb body非依存的に低効率で行われる。つまりYb bodyの形成は、トランスポゾンを標的とするflam piRNAを高効率で産生するために働く、2段階目のpiRNA前駆体選別機構と言える。しかしながら、Yb bodyの形成に必要なRNAの条件は未だ明らかでないため、なぜflam RNAがYb bodyを形成できるのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、piRNA生合成およびYb body形成をもたらすRNAの特徴を明らかにすることで、細胞質中の多くのRNAの中からpiRNA前駆体が選択され、その中でもflam piRNAの産生効率が特異的に高められるメカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 精製Ybタンパク質を用いた相互作用RNAの濃縮

Ybが結合するcis-elementを網羅的に探索することを目的とし、精製Ybタンパク質を用いたPull-down assayを行った。Ybタンパク質は、ショウジョウバエ胚由来の培養細胞株S2細胞から精製した。条件検討に用いるRNAとして、既知のcis-element配列および、cis-elementとして機能しない配列を用いた。

(2) 既知cis-elementの解析

既知のcis-elementであるtj mRNA上の100塩基長の配列について、共同研究によって部分構造の決定を行った。また、構造解析によって明らかとなった特徴について、piRNA生合成経路における機能を解析するため、OSCにおけるpiRNA産生駆動能を評価した。構造解析はNMR法、piRNA産生駆動能の解析には先行研究で確立した人工piRNAアッセイ(Ishizu et al. *Cell Rep* 2015)を、それぞれ用いた。

(3) Yb bodyの単離

Yb body内に含まれるRNAの網羅的な同定を目指し、OSCの破碎液からYb bodyを単離する条件を探索した。蛍光タンパク質を融合させたYbタンパク質の所在を指標に、遠心分離法と免疫沈降法を組み合わせた精製条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 精製Ybタンパク質を用いた相互作用RNAの濃縮

精製Ybタンパク質と既知cis-element配列を有するRNAが特異的に相互作用する条件を見出した。次のステップとして、Ybと多様な配列を持つRNAライブラリとの相互作用をBind-n-Seq法あるいは共同研究における新規手法によって解析し、より網羅的なデータを得ることを計画した。しかし、網羅的な解析を行うために十分な量のタンパク質を得る上で、精製タンパク質の保存下の不安定さ、収量および品質のばらつきが障壁となった。このため、Ybタンパク質精製条件の改良を行いつつ、(1)の優先度を下げて(2)および(3)の遂行を優先した。

(2) 既知 cis-element の解析

Tj cis-element には特徴的な新規 3 次元構造が見出され、これを「T-hairpin」と命名した。また、この構造に変異を導入すると cis-element としての機能を喪失することが判明し、T-hairpin が piRNA 生合成に必要であることが明らかとなった (Takase et al. RNA 2022)。なお、この構造が他の piRNA 前駆体にも含まれているかは現時点では不明である。また、T-hairpin 以外にも piRNA 生合成に必須な領域が cis-element 上に存在することが判明しており (Takase et al. RNA 2022)、この領域の解析も今後の課題となる。

(3) Yb body の単離

蛍光タンパク質を融合した Yb を OSC に過剰発現させ、蛍光を発する Yb body を単離する手法を確立した。単離した Yb body には、既知の Yb body 構成タンパク質のうち RNA 結合タンパク質 Armi が含まれることを確認した。また、蛍光タンパク質を Yb 遺伝子にノックインした OSC を CRISPR-Cas9 システムによって樹立し、Yb の過剰発現によるアーティファクトを回避できる材料を用意した。今後は、単離した Yb body に含まれる RNA を次世代シーケンサーによって同定し、Yb body 内に濃縮される RNA の特徴を明らかにする予定である。

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 Takase Naomi, Otsu Maina, Hirakata Shigeki, Ishizu Hirotsugu, Siomi Mikiko C., Kawai Gota	4. 巻 28
2. 論文標題 T-hairpin structure found in the RNA element involved in piRNA biogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 541 ~ 550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.078967.121	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平形 樹生, 巴 裕美子, 塩見 美喜子
2. 発表標題 ショウジョウバエ卵巣体細胞におけるPiwiタンパク質のYb body局在機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀 結花, 根岸 茉由, 平形 樹生, 塩見 美喜子
2. 発表標題 ヘテロ二量体足場タンパク質によるpiRISC前駆体ミトコンドリア繫留機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田 博和, 平形 樹生, 齋藤 緒, 塩見 美喜子
2. 発表標題 piRNAクラスターの選択性に関わる因子群の核局在と顆粒形成
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

塩見研究室ホームページ
<http://www-siomi lab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>

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
---------	---------