

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15039

研究課題名（和文）生殖顆粒形成と局在におけるRNAヘリカーゼVasaのアルギニンメチル化の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of the function of arginine methylation of the RNA helicase Vasa in germ granule formation and localization

研究代表者

山崎 啓也（Yamazaki, Hiroya）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教

研究者番号：60888105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：生殖組織特異的に働く小分子RNAであるpiRNAは、トランスポゾン抑制し不妊の原因となる生殖細胞でのゲノム損傷を防ぐ。piRNA生合成の場である生殖顆粒を形成するタンパク質として、生殖細胞特異的DEAD-box型RNAヘリカーゼVasaが知られるが、その生殖顆粒形成メカニズムは不明であった。本研究ではVasaのN末端領域の自己相互作用とヘリカーゼドメインのRNA結合が生殖顆粒の形成に必須であることが明らかになった。さらにVasa結合RNAの配列解析により、VasaがトランスポゾンRNAに優先的に結合することが分かった。これは、生殖顆粒内でのトランスポゾンの効率的な抑制に寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAの機能不全はトランスポゾンの抑制不全に繋がり、不妊の原因となる。生殖顆粒はpiRNA生合成の場であり、その形成メカニズムの解明は重要である。本研究は、RNAヘリカーゼタンパク質Vasaが自己相互作用とRNA結合依存的に生殖顆粒を形成し、トランスポゾンRNAを生殖顆粒に集め効率的なトランスポゾンの抑制に寄与することを明らかにした。本研究は生殖に関わる問題の解決に寄与するのみならず、近年様々な細胞内現象で広く見られることが知られるようになった、タンパク質相分離のメカニズムと機能について重要な知見をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：The germline-specific DEAD-box RNA helicase Vasa is known to form germ granules, the site of piRNA biogenesis, but the mechanism of germ granule formation has not been elucidated.

In this study, we found that self-interaction of the N-terminal region of Vasa and RNA binding via the helicase domain of Vasa are essential for the formation of germ granules. Furthermore, sequence analysis of Vasa-binding RNAs revealed that Vasa preferentially binds transposon RNAs. This may contribute to efficient repression of transposons in germ granules.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：液液相分離 生殖顆粒 トランスポゾン piRNA

## 1. 研究開始当初の背景

生殖組織特異的に働く PIWI サブファミリータンパク質 (PIWI) と小分子 RNA である piRNA は、複合体を形成してトランスポゾン抑制することで不妊の原因となる生殖細胞でのゲノム損傷を防ぐ (Siomi and Siomi, 2009)。piRNA 生合成経路は「一次生合成機構」と、トランスポゾン RNA の切断と共役した増幅経路の「二次生合成機構」(ピンポン経路) に大別される。ピンポン経路の必須因子は細胞質側の核膜周縁部に形成される「生殖顆粒」に局在する。生殖顆粒が形成されない個体はトランスポゾンの脱抑制や不妊の形質を示すことから (Durdevic and Ephrussi, 2019) 生殖顆粒の正常な形成は重要である。これまで申請者は、ピンポン経路の場として機能する生殖顆粒が液液相分離によって構築されることを明らかにしたが、詳細な機構や核膜周縁部に局在する仕組みは未だ不明である。

生殖顆粒構成タンパク質の一つとして、生殖細胞特異的 DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ Vasa がある。Vasa はヒトを含む多くの生物種において高度に保存されたタンパク質であり、PIWI が切断した RNA を、別の PIWI に受け渡すことでピンポン経路を駆動する。Vasa は生殖顆粒形成におけるヒエラルキーが高く、生殖顆粒形成とピンポン経路を通じたトランスポゾン抑制に必須の因子である。Vasa は天然変性領域に富む N 末端と C 末端、および RNA ヘリカーゼドメインからなる。N 末端はアルギニン (Arg) メチル化モチーフである RG/RGG リピートに富む。これまでの研究から、Vasa の Arg 残基はマウス、カエル、ハエにわたる広い生物種でジメチル化を受け、対称性ジメチルアルギニン (sDMA) または非対称ジメチルアルギニン (aDMA) となると知られている (Kirino et al., 2010) が、その機能的意義は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は Vasa-N のメチル化 Arg 残基に由来する相互作用が、生殖顆粒の形成や核膜周縁部局在およびトランスポゾン抑制に寄与するメカニズムを明らかにすることが目的である。Arg 残基の  $\pi$  電子や正電荷による  $\pi$ - $\pi$  相互作用や  $\pi$ -カチオン相互作用 (以下「Arg 相互作用」と呼ぶ) は液液相分離に大きく関わり、メチル化によって制御されることが知られている (Hofweber and Dormann et al., 2019)。Vasa は液液相分離により生殖顆粒を形成することから、Vasa のメチル化 Arg 残基が、液液相分離を誘導する Arg 相互作用を制御し、生殖顆粒の形成や局在に関わると考えた。

## 3. 研究の方法

### [1] Vasa の相分離に必須の因子の同定

piRNA 経路を保持するカイコ由来生殖細胞培養株 BmN4 細胞を用いて、免疫染色、共免疫沈降、piRNA 生合成レスキューアッセイにより Vasa の生殖顆粒形成に必須であるドメインを決定する。また、Vasa の N 末端のメチル化の顆粒形成への影響について変異体を使った解析により明らかにする。

### [2] piRNA 関連因子の Vasa 顆粒形成への影響の解析

これまでに同定された piRNA 関連因子を BmN4 細胞でノックダウンし、生殖顆粒形成への影響を解析する。

## 4. 研究成果

### [1] Vasa の各種変異体の解析

タンパク質の相分離に必要な多価相互作用においては、特定の高次構造を持たない天然変性領域 (IDR) が重要な役割を果たすことが多い。Vasa は N 末端と C 末端にヘリカーゼドメインを挟むようにして IDR が存在する。そこで、N 末端または C 末端を欠失させた変異体である N、C を作製した。内在の Vasa をノックダウンした BmN4 に野生型および変異体を発現させ、免疫染色を行なったところ、N では生

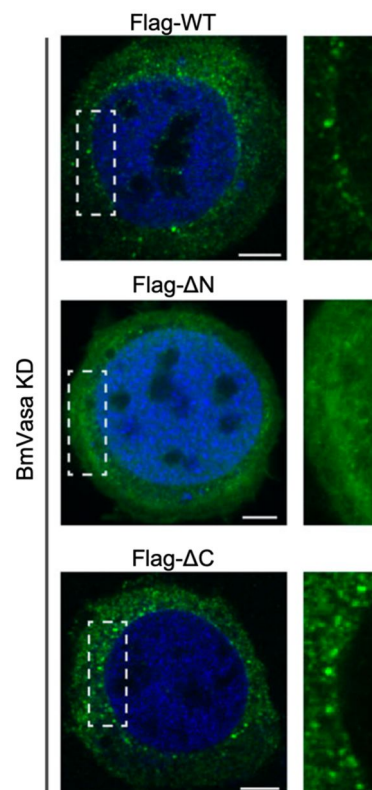


図1  
内在 Vasa ノックダウン BmN4 における、野生型(WT)、N、C の免疫染色 (緑色)、青: DAPI (核)。右に白点線枠の拡大図を示す。スケールバー: 5  $\mu$ m。Yamazaki et al., 2023 より。

殖顆粒の形成が見られなかった(図1)。これはN末端のIDRが相分離に必要な自己相互作用を担うことを示す。このことは共免疫沈降によっても支持された。

興味深いことに、ヘリカーゼドメインをEGFPに置換した変異体においても生殖顆粒の形成が見られなかった。ヘリカーゼドメインはRNAと相互作用することから、RNA結合を失う変異を導入したR470A変異体を作製し、BmN4で発現させた。R470Aも生殖顆粒の形成能をもたなかったことから、Vasaの相分離による生殖顆粒形成にはN末端の自己相互作用のみならず、RNA結合も必須であると明らかになった(図2)。また、N及びR470A変異体ではpiRNA生合成量の低下が見られ、Vasaの生殖顆粒形成がpiRNA生合成に必須であることが示された。

さらにVasaの相分離の分子メカニズムを明らかにするため、*in vitro*の相分離アッセイ系を構築した。このアッセイ系によりVasaの相分離へのRNAの長さ依存性や配列依存性を調べたところ、Vasaの相分離には2000塩基長程度の長いRNAが必要であるが、配列特異性はないことがわかった。

VasaのN末端のメチル化の顆粒形成への影響を調べるため、N末端のアルギニンを全てリシンに置換してBmN4で発現させ免疫染色を行った。しかしながらこの変異体は生殖顆粒への局在にも形成にも影響が見られなかった(図3)。EGFP標識したVasaの野生型またはリシン置換変異体をBmN4で発現させ、生細胞で光褪色後蛍光回復法により生殖顆粒内のVasaの流動性を調べたが両者に差はなく、VasaのN末端のメチル化は生殖顆粒の性質にも影響しないことがわかった。

最後に生殖顆粒内でVasaが結合するRNAの配列解析を行なった。その結果VasaはトランスポゾンRNAに優先的に結合することがわかった(図4)。この傾向をもたらす因子は未知であるが、生殖顆粒にトランスポゾンRNAを集積させ、効率的なトランスポゾン抑制を行っていることが示唆された。これらの結果はNat. Commun誌において発表した。

## [2] piRNA 関連因子の Vasa 顆粒形成への影響の解析

上記により、N末端領域はVasaの生殖顆粒形成に必須ではあるが、変異体を用いた解析から、そのメチル化は生殖顆粒局在及び形成に寄与しないことが分かった。そこで、Vasaの生殖顆粒形成に必須な因子をメチル化以外の面から迫ることとした。前年度に見出したTudorドメインを持つタンパク質Vretに加え、本年度は生殖顆粒形成に影響する別のタンパク質(未発表のためタンパク質名はXとする)も見出した。さらにこのタンパク質XのノックダウンがpiRNA生合成を低下させることも明らかになった。現在これらの機能メカニズムについて解析を進めている。また、N末端領域のメチル化の意義について、生殖顆粒形成以外の面から迫ることも行っており、現在までに生殖顆粒外のVasaの局在に影響する可能性を見出し、研究を進めている。

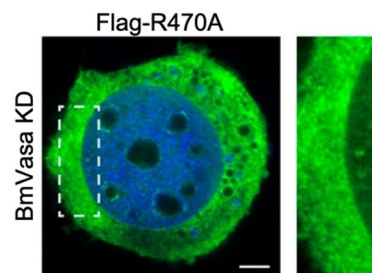


図2 内在VasaノックダウンBmN4における、R470Aの免疫染色(緑色)、青: DAPI(核)、右に白点線枠の拡大図を示す。スケールバー: 5 μm。Yamazaki *et al.*, 2023より。

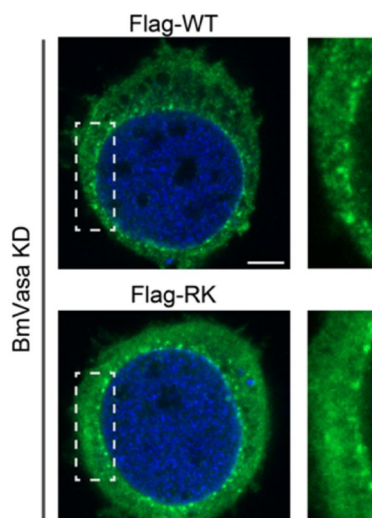


図3 内在VasaノックダウンBmN4における、野生型(WT)、リシン置換変異体(RK)の免疫染色(緑色)、青: DAPI(核)、右に白点線枠の拡大図を示す。スケールバー: 5 μm。Yamazaki *et al.*, 2023より。

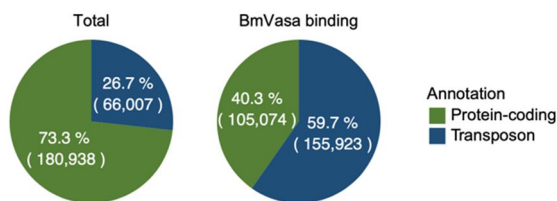


図4 BmN4細胞の、トータルRNA(Total)とVasa結合RNA(BmVasa binding)におけるタンパク質コードRNA(Protein-coding)とトランスポゾンRNA(Transposon)の割合。Yamazaki *et al.*, 2023より。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki H, Takagi M, Kosako H, Hirano T, Yoshimura SH.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell cycle-specific phase separation regulated by protein charge blockiness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	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/s41556-022-00903-1	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 -

1. 著者名 Yamazaki Hiroya, Namba Yurika, Kuriyama Shogo, Nishida Kazumichi M., Kajiya Asako, Siomi Mikiko C.	4. 巻 14
2. 論文標題 Bombyx Vasa sequesters transposon mRNAs in nuage via phase separation requiring RNA binding and self-association	5. 発行年 2023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/s41467-023-37634-2	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamazaki H, Nishida KM, Murakami R, Kuriyama S, Kajiya A, Siomi MC.
2. 発表標題 Characterization of DEAD-box RNA helicase Vasa in LLPS-mediated nuage formation in ovarian germ cells
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamazaki H, Nishida KM, Murakami R, Kuriyama S, Kajiya A, Siomi MC.
2. 発表標題 Characterization of the DEAD-box RNA helicase Vasa in LLPS-mediated formation of germ granules
3. 学会等名 EMBL Symposium: The Non-Coding Genome（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamazaki H, Nishida KM, Murakami R, Kuriyama S, Kajiya A, Siomi MC.
2. 発表標題 Characterization of the DEAD-box RNA helicase Vasa in LLPS-mediated formation of germ granule, which is the piRNA biogenesis center in ovarian germ cells
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 Yamazaki H, Namba Y, Nishida KM, Murakami R, Kuriyama S, Kajiya A, Siomi MC.
2. 発表標題 Characterization of the germline-specific DEAD-box RNA helicase Vasa in LLPS-mediated formation of germ granules
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------