

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15056

研究課題名（和文）細胞質液滴Yb bodyにおけるShu排除の解明と液滴特異的プロテオームへの応用

研究課題名（英文）Elucidation of Shu exclusion in cytoplasmic droplet Yb bodies and its application to droplet-specific proteomes

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエ卵巣体細胞において、ShuはPiwiを細胞質顆粒Yb bodyにリクルートするものの、自身はそこから離脱する。本研究ではその機構に迫り、離脱にはShu同士の反発が重要であることを明らかにした。また、Shuの離脱が、後の過程でPiwiがYb bodyを離れるために必須であることもわかった。Shu同士の反発に働く領域の同定に至ったほか、新規トランスポゾン抑制因子を発見しその解析も進行している。さらに、piRNA生合成経路におけるフィードバック制御の存在や、ヒト無精子症で報告された変異がShuの離脱を妨げることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、piRNA生合成経路の全容解明、特に、PiwiがpiRNAの生合成過程に応じて細胞内局在を変えていく機構を理解する上で重要である。加えて、Shuの反発に働く領域を同定できたため、今後はこれを応用してYb body特異的の近接依存標識法の確立に取り組むことができる。また、当初想定していなかった成果として、ヒト不妊の原因変異がもたらすpiRNA経路の異常について新しい知見が得られた。本成果は医療応用、特に不妊治療への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In *Drosophila* ovarian somatic cells, Shu recruits Piwi to the cytoplasmic granule Yb body, but Shu quickly leaves the granule. In this study, I investigated the mechanism of this process and clarified that repulsion between Shu is important for Shu release. I also found that Shu release is essential for Piwi to leave the Yb body in a later process, and I have identified a region responsible for Shu repulsion. In addition, I found the existence of feedback regulation in the piRNA biogenesis pathway and that a mutation reported in human azoospermia prevents the release of Shu.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Shutdown トランスポゾン 無精子症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の生殖組織では、piRNA と呼ばれる小分子 RNA がトランスポゾンの発現を抑制する。この経路に異常が生じると、多くの生物種で不妊となる。ショウジョウバエ卵巣細胞(OSC)の piRNA は、長鎖 RNA を前駆体として、細胞質の非膜系オルガネラ Yb body におけるプロセッシングを経て作られる。Yb body は、RNA 結合タンパク質 Yb の液-液相分離(LLPS)によって形成される。Yb body を構成するタンパク質は、Yb を頂点とした階層性のある結合ネットワークによって液滴へ局在する。例えば、piRNA 結合タンパク質 Piwi は、Shu タンパク質を介して Yb 結合タンパク質 Armi と相互作用することで Yb body に局在する。しかし、Shu は Yb body にとどまらずに排除され、Piwi を Yb body 内に留める機能は Vret および SoYb という別のタンパク質が担う。Yb body が Shu を排除する機構と生理的意義は不明であった。

生体分子が集合して液滴を形成する LLPS は、細胞内で非膜系オルガネラを形成するメカニズムとして近年脚光を浴びている。LLPS で形成された非膜系オルガネラには、その外部と比べ高濃度で特定の生体分子が集積している。これにより、生体分子の貯蔵や生化学反応の促進がもたらされる。一方、特定の生体分子が非膜系オルガネラから排除される現象も知られ、これによって生化学反応の抑制や基質特異性の向上がもたらされる。液滴内に特定の分子が蓄積されるメカニズムについては、分子間相互作用の解析を通して解明が進んでいるが、特定の分子が液滴から排除される機構については不明な点が多い。

また、既知の piRNA 因子だけでは OSC が持つ piRNA 経路を説明しきれず、未知のトランスポゾン抑制因子の存在が疑われる。例えば Yb body においても、piRNA 前駆体切断酵素が存在することが長らく指摘されているが、未だ同定に至っていない。その背景として、液滴形成因子とその相互作用因子を網羅的に回収しただけでは、液滴外での相互作用因子も多く回収されバックグラウンドシグナルをもたらすという技術的課題が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、Shu が Yb body から排除される機構を解明するとともに、この機構を応用して、Shu の排除が持つ生理的意義の解明や Yb body 特異的なタンパク質標識技術の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Shu 排除機構の解明

OSC において、Shu の多様な変異体を発現させ、その細胞内局在をもとに Shu が排除されなくなる条件を探索した。得られた結果をもとに、Shu 同士の反発が重要であるという仮説を得て、精製タンパク質や OSC を用いて検証を行った。

(2) Shu 排除が持つ生理的意義の解明

(1)の結果を踏まえ、Shu 同士を人為的に結合させた状態で OSC の piRNA 経路に生じている影響を解析した。主に、免疫染色法を用いてタンパク質局在の変化を調べた。

(3) Yb body 特異的なタンパク質標識技術の確立と新規トランスポゾン抑制因子の探索

Split-TurboID を用いた近接依存標識において、Yb body 外における活性を抑制することを目指し、Shu タンパク質が持つ、Yb body 離脱に機能する領域を絞り込んだ。これと並行してノックダウン法による新規トランスポゾン抑制因子の探索も行った。

4. 研究成果

(1) Shu 排除機構の解明

Shu 同士の反発が Yb body からの離脱に重要であることが明らかになった。また、Yb body 構成タンパク質にヒト無精子症で報告された変異を導入することで Shu との相互作用が強固になり、Shu の離脱が妨げられることも見出した。さらに、本研究の過程で Shu タンパク質の量を piRNA 生合成経路によって負に制御するネガティブフィードバック経路が存在することが明らかになった。

(2) Shu 排除が持つ生理的意義の解明

Shu の排除が、Piwi が Yb body を離れてミトコンドリアへ移行するために必須であることが明らかになった。ミトコンドリアは piRNA 成熟化の場として知られており、Piwi のミトコンドリア移行が妨げられることで piRNA 生合成が阻害された。

(3) Yb body 特異的タンパク質標識技術の確立と新規トランスポゾン抑制因子の探索
Shu 同士の反発に働く約 80 残基の領域を同定した。また、ロックダウン法によって新規トランスポゾン抑制因子を発見した。新規因子は piRNA 生合成段階ではなく、トランスポゾンの抑制段階に寄与していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Koga Yuica, Hirakata Shigeki, Negishi Mayu, Yamazaki Hiroya, Siomi Mikiko C	4. 巻 -
2. 論文標題 Diptera-specific Daedalus controls Zucchini endonucleolysis in piRNA biogenesis independent of exonucleases	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2024.06.02.596995	査読の有無 無
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 平形 樹生, 藤田 あおい, 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piRNA生合成の場Yb bodyへのPiwi局在化機構とその制御
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shigeki Hirakata, Aoi Fujita, Yumiko Tomoe, Mikiko C. Siomi
2. 発表標題 Mechanism and regulation of Piwi localization to Yb body, the site of piRNA biogenesis in Drosophila ovarian somatic cells
3. 学会等名 The 28th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平形 樹生, 藤田 あおい, 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piRNA生合成の場Yb bodyへのPiwi局在化のメカニズムとその制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigeki Hirakata, Aoi Fujita, Yumiko Tomoe, Mikiko C. Siomi
2. 発表標題 Mechanism and regulation of Piwi localization to Yb bodies the piRNA biogenesis center in Drosophila ovarian somatic cells
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〕

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