

令和 6 年 6 月 17 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：22K15082

研究課題名（和文）piRNAセンサーシステムを用いたpiRNAクラスターの成立条件の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the conditions for the establishment of piRNA clusters using the piRNA sensor system

研究代表者

庄司 佳祐（Shoji, Keisuke）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：30880116

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）：本研究では、transposonを記憶し、抑制するためのpiRNAの産生限となるpiRNAクラスターが、どのように成長するかを明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、まず、特異的に転移していたトランスポゾンが成長中のpiRNAクラスターの一例として扱えることを明らかにした。さらに、人工トランスポゾン由来のpiRNAとsiRNAは産生される領域が異なり、細胞内に存在するあり方が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

piRNAはゲノム中に存在する非自己因子であるトランスポゾンを選択的に抑制する。この際、piRNAクラスターと呼ばれるゲノム中の領域が一種の記憶装置として機能し、piRNAクラスター中のトランスポゾン断片からpiRNAを産生することでトランスポゾンの発現を抑制しているとされている。そのため、piRNAクラスターがどのようにトランスポゾン記憶できるのか、という問いは、生物がゲノム中に存在する非自己とどのように折り合いをつけてきたのかを明らかにすることに他ならない。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on piRNA clusters, which are the source of "piRNAs for transposon storage and repression. The goal of this study was to elucidate how piRNA clusters grow. As a result, we first found that specifically transposed transposons can be treated as an example of growing piRNA clusters in silkworm cultured cells. Furthermore, we found that artificial transposon-derived piRNAs and siRNAs differ in the regions in which they are produced and how they are located in the cell.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA トランスポゾン カイコ

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾンとは、ゲノム中に存在する利己的な転移因子であり、自身がコードする転移酵素を利用してゲノム中を飛び回り増殖する。また、ヒトゲノムでは五割程度を占める一方で、トランスポゾンの転移が遺伝子領域に起きると当該遺伝子は破壊される。そのため、次代へと伝わる生殖細胞においてはトランスポゾンの転移を特に抑制する必要がある。トランスポゾン抑制機構の中核をなすのが piRNA と呼ばれる小分子 RNA である。

しかし、通常の遺伝子とトランスポゾンは塩基配列という点では同じであり、トランスポゾン特異的な抑制の実現には、トランスポゾンのみを見分ける機構が必要である。それを実現するのが、piRNA クラスターと呼ばれるゲノム中の領域である。piRNA クラスターにはトランスポゾンの断片が集積されており、この断片を元に piRNA を産生するため、配列特異的にトランスポゾンを抑制できる。このように「今現存する piRNA クラスターがどのようなものか」はわかりつつある一方で「どのようにして新たに piRNA クラスターにトランスポゾンの断片を集積し、そこから piRNA を作るようになるのか」という過程は不明である。今年 Molecular Cell 誌に発表された論文では、piRNA クラスターの保存性は高くなく、進化的に不安定であることが示された (Gebert et al., 2021)。このことは、裏を返せば piRNA クラスターは生まれては消えていくことを繰り返しているゲノム領域であることを意味する。そこで、本研究では「どのようにして新たに piRNA クラスターになるのか」を中心的な問いに据える。

2. 研究の目的

本研究では、新規に transposon をトラップする piRNA クラスターに着目したゲノムワイドな探索を行う。これにより、成長中の若い piRNA クラスターを網羅的に同定し、piRNA クラスターが新たにトランスポゾンをトラップするための条件や、新たに piRNA クラスターになるための条件を一般化する。これらの達成を通じて、どのようにして新たな piRNA クラスターが成立し、成長していくのか、を明らかにする。

現在までの piRNA クラスターに関する研究は、「今現在存在している piRNA クラスター」を piRNA クラスターたらしめているものは何なのか、に着目した研究である。一方、本研究では、torimochi piRNA クラスターのような「成長中の piRNA cluster」に着目することで、「piRNA クラスターが新たに成立していくイベント」に着目した解析を行う。また、新たに存在するようになったことと、新規に transgene の転移を誘導し易いこととの間の関係にも着目する。申請者は、piRNA クラスターの発達の初期段階には、transgene の断片を収集する必要があるため、このような性状は比較的若い piRNA クラスターに存在する性状であると考えているが、そもそもその点を含めて piRNA クラスターの発達過程は不明である。本研究により、piRNA 研究に新たに時間軸を持ち込むことができると考えている。

3. 研究の方法

本研究では、新規に transgene をトラップし、そこから piRNA を産生するような piRNA クラスターを網羅的に同定する。具体的には、GFP 陽性細胞に対して新規に GFP 断片を転移させ、その

転移先と piRNA 産生、GFP 発現量の対応を取得する。GFP の断片は GFP タンパク質にならないが、piRNA の材料となった場合、元々存在する GFP を *in trans* に抑制することが可能である。すると、転移させた配列の一部は piRNA クラスターに挿入され、GFP の断片に由来する piRNA の産生量に応じて GFP が抑制される。そこで、GFP の発現量を指標に FACS で細胞を回収し、long read シークエンサーを用いて GFP 抑制時に特異的な挿入箇所を同定し、さらにその際の piRNA の産生量を small RNA seq によって大規模に収集する。これらのデータを詳細に解析することで、**新規の piRNA 産生に寄与するゲノム中の領域を網羅的に特定する。**また、transgene に薬剤耐性遺伝子を導入することで、piRNA を産生し易いゲノム中の領域（transgene があり、GFP 蛍光がない）と、piRNA を産生しにくいゲノム中の領域（transgene があり、GFP 蛍光がある）を別々に同定することができる。これによって、transgene が挿入されやすい場所と piRNA を産生しやすい場所を分けて議論することが可能になる。

次に、piRNA を産生しやすい領域と産生しにくい領域について、その違いを説明する特徴を、様々なデータベースを用いた横断的なバイオインフォマティクス解析によって明らかにする。これらの達成によって、新たに piRNA クラスターになりつつある配列の網羅的同定と、それらの特徴を一般化することで、**どのようにして新たな piRNA クラスターが成立し、成長していくのか、を明らかにする。**

また、新規にトランスポゾンをつまみ取るような piRNA クラスターを持つ特徴を明らかにするとともに、培養細胞中のトランスポゾンの状態の網羅的な解析を行い、細胞内の piRNA クラスターとトランスポゾンの関係を明らかにする。

4 . 研究成果

本研究では、transposon を記憶し、抑制するための piRNA の産生限となる piRNA クラスターが、どのように成長するかを明らかにすることを目的に研究を行なった。その結果、まず、成長中の piRNA クラスターの一例として、torimochi と呼ばれる piRNA クラスターが研究に用いたカイコ培養細胞中において特異的に転移していたトランスポゾンであったことが明らかになった。さらに、人工トランスポゾン由来の piRNA 産生に応じて GFP が抑制されるような実験系を作出し、新規に transposon をつまみ取る piRNA クラスターに着目したゲノムワイドな探索を行った。ただし、GFP が抑制される様な細胞では、piRNA のみならず siRNA も産生されてしまっていた。解析の結果、piRNA を産生するトランスポゾンの状態と siRNA を産生するトランスポゾンの状態は異なることが判明した。具体的には、piRNA は適切にトランスポゼースで転移したカセットから産生されていた一方で、siRNA は導入に用いたプラスミド全体から産生されていた。そのため、プラスミドの配列に分別するレポーター配列をさらに加えることで、これらを分別することが可能であると考えた。そこで、現時点では、これらを見分けるためにさらに改良したレポーターを作出し、複数回の条件検討とセルソートを経て、予想通りの蛍光を示す細胞が得られた。今後は、これらの細胞を詳細に解析する予定である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Izumi Natsuko, Shoji Keisuke, Negishi Lumi, Tomari Yukihide	4. 巻 -
2. 論文標題 The dual role of Spn-E in supporting heterotypic ping-pong piRNA amplification in silkworms	5. 発行年 2024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） 10.1038/s44319-024-00137-2	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 -

1. 著者名 Shoji Keisuke, Umemura Yusuke, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide	4. 巻 19
2. 論文標題 The piRNA cluster torimochi is an expanding transposon in cultured silkworm cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1010632	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 Izumi Natsuko, Shoji Keisuke, Kiuchi Takashi, Katsuma Susumu, Tomari Yukihide	4. 巻 29
2. 論文標題 The two Gtsf paralogs in silkworms orthogonally activate their partner PIWI proteins for target cleavage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 18～29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.079380.122	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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 漆嘯・庄司佳祐・泊幸秀
2. 発表標題 カイコにおけるpiRNAクラスターが種内で保存される条件の解明
3. 学会等名 令和6年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第94回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 庄司佳祐、泉奈津子、泊幸秀
2. 発表標題 全転写産物に由来する低頻度なpiRNAの産生
3. 学会等名 第46回分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Shoji, Yukihide Tomari
2. 発表標題 The piRNA cluster torimochi is an expanding transposon in cultured silkworm cells.
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 庄司佳祐
2. 発表標題 Torimochiは外来配列を捕獲するpiRNA clusterであると同時に、カイコ培養細胞において最も活発に転移しているトランスポゾンである
3. 学会等名 転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化（第6回転移因子研究会）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 庄司佳祐、泊幸秀
2. 発表標題 Torimochiは外来配列を捕獲するpiRNA clusterであると同時に、カイコ培養細胞において最も活発に転移しているトランスポゾンである
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 庄司佳祐、泊幸秀
2. 発表標題 Torimochiは外来配列を捕獲するpiRNA clusterであると同時に、カイコ培養細胞において最も活発に転移しているトランスポゾンである
3. 学会等名 令和 5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 93 回大会
4. 発表年 2023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
---------	---------