

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710218

研究課題名(和文) piRNA 生合成経路における Krimp 顆粒の役割

研究課題名(英文) Molecular function of Krimp in piRNA biogenesis in Drosophila

研究代表者

佐藤 薫 (Sato, Kaoru)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20548507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：piRNAは、生殖細胞特異的に産生される小分子RNAであり、PIWIタンパク質と特異的に結合する事によって、生殖細胞系において転移因子の遺伝子発現を抑制し、それらのゲノムへの侵略を防ぐ。piRNAは一次経路と二次経路によって産生され、ショウジョウバエPIWIタンパク質の一つAGO3のpiRNAは二次経路によってのみ産生される。本研究では、ショウジョウバエpiRNA因子KrimpがAGO3のpiRNAが二次経路によって産生されるよう制御する因子であることを明らかにした。また、Krimpは一次経路によって作られるpiRNAがAGO3へ行かないように制御していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：piRNA is a germline-specific class of small non-coding RNA, and functions by specifically interacting with PIWI proteins. In germline cells, piRNA thereby suppresses the expression of transposable elements, so piRNA is thought to protect the germline genome from such harmful element. piRNAs are thought to be produced by two distinct mechanisms, primary pathway and secondary pathway. A Drosophila PIWI protein AGO3 interacts with piRNAs produced only by the secondary pathway. In this study, I found that a Drosophila piRNA factor Krimper (Krimp) specifically interacts with AGO3 and regulates its piRNA production, indicating that Krimp is a factor regulating the secondary pathway. In addition, I found that Krimp regulates piRNAs are not loaded on AGO3 by the primary pathway.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：RNAサイレンシング piRNA トランスポゾン 生殖細胞 Krimp ショウジョウバエ RNA干渉 細胞内顆粒

1. 研究開始当初の背景

20 から 30 塩基長の小分子 RNA によって引き起こされる遺伝子発現抑制機構を RNA サイレンシングと呼ぶ。その代表例は RNA 干渉 (RNA interference、RNAi) である。RNAi の発見以来、RNA サイレンシングに関する基礎研究は飛躍的に進み、この機構が発生や代謝、ウイルス感染防御といった、生命に欠かせない多くの現象を遺伝子発現レベルで制御していることが明らかになってきた。RNA サイレンシングにおいて中核的な役割を担う因子は Argonaute タンパク質であり、これらは生殖細胞特異的に発現する PIWI サブファミリーとほぼ全組織で恒常的に発現する AGO サブファミリーに分類される (Williams and Rubin. *PNAS*. 2002. 99:6889-94)。PIWI サブファミリーは、piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる 24~29 塩基長の小分子 RNA と結合する事によって機能する。piRNA の多くは、ゲノム上の転移因子 (Transposable element; TE) 特にレトロトランスポゾンに由来し、PIWI サブファミリータンパク質と piRNA が特異的に結合する事によって、生殖細胞系において TE などの遺伝子発現を抑制し、それらのゲノムへの侵略を防ぎ、ゲノムの品質管理を行っている事が明らかになってきた。

piRNA 生合成経路のおおまかなモデルとして、PIWI サブファミリータンパク質複合体が TE 転写産物を切断し、その切断産物がそのまま piRNA になるといった「amplification loop (ping-pong cycle)」と、直接 piRNA が PIWI サブファミリータンパク質に結合する

「primary processing」が提唱されているが (図1、発表論文3, Gunawardane *et al. Science*. 2007. 315:1587-90; Brennecke *et al. Cell*. 2007. 128:1089-103) 今なお、piRNA 生合成とそれが機能する際の分子機構に関しては不明な点が多く残されている。

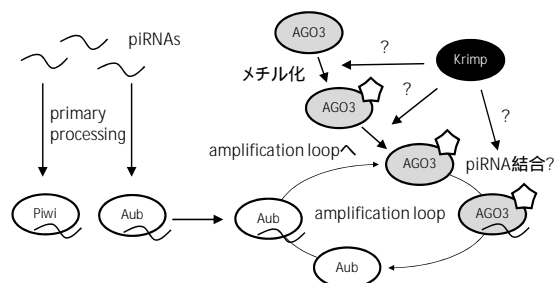


図 1. 2 つの piRNA 生合成経路と Krimp の関与
Krimp は、AGO3 と相互作用し、AGO3 依存的 piRNA 生合成経路に関与しているが、その作用機序は不明な点が多い。

ショウジョウバエには 3 つの Piwi サブファミリータンパク質 (Piwi、Aubergine (Aub)、AGO3) があり、Piwi、Aub へは「primary processing」によって piRNA が結合し、こ

れにより piRNA を保持した Aub が引き金となり、Aub-AGO3 との間で「amplification loop」が生じることで二次的に piRNA が産生され、それぞれに結合する (図 1)。piRNA に関する研究の過程で、ショウジョウバエ卵巣において piRNA 量が著しく減少するといった、piRNA の生合成に異常のみられる変異体が多数見いだされている。それらの多くが Tudor ドメインをもつタンパク質であることが明らかとなってきた。Tudor ドメインは古くより、メチル化修飾されたアミノ酸 (アルギニン) 部位に相互作用することが知られている。当研究室では、Piwi サブファミリータンパク質がメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けていることをすでに明らかにしており、piRNA 生合成において、Tudor ドメインタンパク質が Piwi サブファミリータンパク質のメチル化修飾を介して何らかの役割を担っていることが示唆される。事実、これらの Tudor ドメインタンパク質に異常が生じると、piRNA 生合成能が低下し、Piwi サブファミリー遺伝子に変異を持つ個体と類似した表現型 (生殖組織の形成異常) を示すことから、piRNA 生合成に深く関与していることが強く示唆されるが、分子レベルでの作用機序はわかっていない。

当研究室では、piRNA 生合成機構を解明するため、ショウジョウバエ卵巣において piRNA 生合成に異常のみられる変異体に着目し、それらの責任分子がどのような分子と相互作用 (制御) しているのか、生化学的な解析を進めている。その中でも、特に krimp (krimp; クリンパー) 遺伝子は、Tudor ドメインをもつタンパク質をコードし、PIWI サブファミリータンパク質の AGO3 との特異的な相互作用が見られること、AGO3 の細胞内局在を制御していること、さらに、krimp 変異体卵巣では AGO3 依存的な piRNA 産生が著しく低下していることを発見し、AGO3 が関わる「amplification loop」経路を理解する上で重要な分子であると考えている。しかし、Krimp がどのような作用機序によって AGO3 依存的な piRNA 生合成に関与しているのか、未だ十分な知見は得られていない。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は、Krimp-AGO3 複合体に着目し、amplification loop による piRNA 生合成がどのような分子機構によって制御されているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究期間内では、以下の 3 点について明らかにする。

(1) Krimp と相互作用している AGO3 の分子状態 (piRNA の有無、翻訳後修飾) についてこれまでの解析で、krimp 変異体卵巣では AGO3 依存的な piRNA 産生が著しく低下することから、Krimp は AGO3 が amplification

loop に入る前に機能していることが示唆される。そこで、Krimp と相互作用している AGO3 の分子状態 (piRNA の有無、翻訳後修飾など) を調べることで、piRNA 生合成経路における Krimp の分子機能を明らかにする。

(2) AGO3 の細胞内局在、及び Krimp-AGO3 複合体形成を制御するドメインの同定
 これまでの解析から、卵巣において Krimp が AGO3 の細胞内局在を制御していることを明らかにしてきた。また、最近、卵巣性体細胞において、Krimp は顆粒状に局在しており (Krimp 顆粒, 図 2) そこに AGO3 を強制発現させると、Krimp 顆粒と共局在する。そこで、AGO3 の一部を欠失させた様々な変異型タンパク質を強制発現させ、Krimp との共局在に必要な部位を明らかにする。また、Krimp についても欠失型を作成し、Krimp 顆粒形成と AGO3 との相互作用に必要な部位を明らかにする。

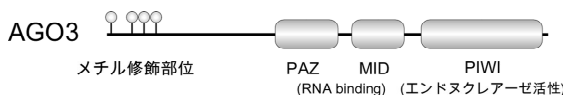
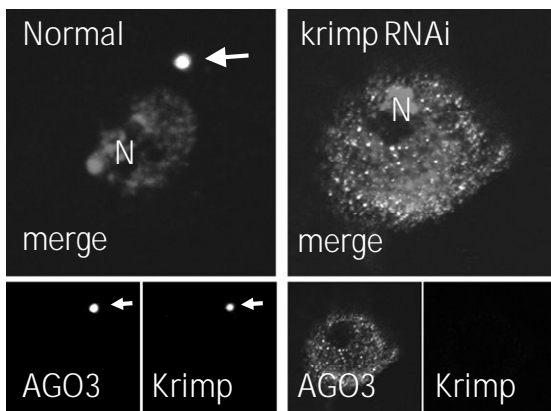


図 2. 卵巣性体細胞における Krimp 依存的 AGO3 の局在
 卵巣性体細胞において、Krimp は顆粒状に局在する (矢印)。AGO3 は顆粒状 Krimp と共局在し、krimp のノックダウン細胞 (krimp RNAi) では AGO3 は細胞質に分散してしまう。つまり、細胞内において AGO3 は Krimp 依存的に局在する。N は細胞核を示す。下図は AGO3 のドメインの図を示す。

(3) AGO3、及び Krimp 相互作用分子の同定と解析

AGO3 や Krimp を中心とした amplification loop による piRNA 生合成の作用機序を探るために、ショウジョウバエ卵巣細胞内において AGO3 や Krimp がどのような因子と相互作用しているのか、抗 AGO3 及び抗 Krimp モノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験と質量分析 (MS) 解析により、それらへの結合分子の同定を行う。

4. 研究成果

(1) Krimp と相互作用している AGO3 の分子状態について

Krimp 複合体を免疫沈降により単離し、相互作用している AGO3 のメチル化修飾量を抗メチル抗体 SYM11 を用いて調べた。その結果、Krimp 複合体に含まれる AGO3 はほとんどメチル化修飾されていないことを明らかにした。このことは、Krimp がメチル化修飾を受けていない AGO3 に主に相互作用していることを示唆する。さらに、Krimp 複合体に含まれる AGO3 の piRNA レベルを piRNA のノーザンプロット法を用いて調べたところ、piRNA のシグナルが得られなかった。つまり、Krimp は piRNA をもつ前の AGO3 と相互作用していることを示唆する。

(2) AGO3 の細胞内局在、及び Krimp-AGO3 複合体形成を制御するドメインの同定

卵巣性体細胞 OSC において、AGO3 を強制発現させると Krimp 顆粒に局在する (図 2)。これは、AGO3 の N 末を介して起こる現象であることを明らかにした (図 3)。また、AGO3 の N 末はメチル化修飾されることが知られているが、Krimp 顆粒への局在にはメチル化は関与しないことを明らかにした。

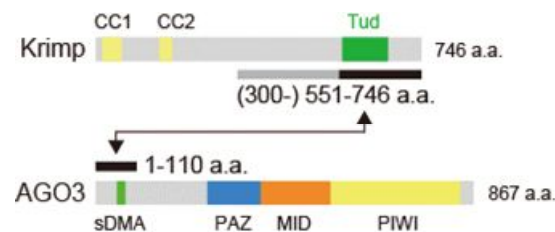


図 3. Krimp 及び AGO3 のドメイン構造と相互作用部位
 AGO3 は N 末を介して、Krimp の Tud ドメインを含む領域と相互作用する。また、中央付近とも弱く相互作用している。AGO3 は Krimp との相互作用に N 末のメチル修飾を必要としない。

さらに、もう一つの生殖細胞特異的な PIWI タンパク質である Aub に AGO3 の N 末を付加するだけで、Aub を Krimp 顆粒へ局在誘導できることがわかった。このことは、AGO3 の N 末わずか 100 アミノ酸程度で amplification loop が制御されていることを示唆する。Krimp は、生殖細胞では核膜周辺の細胞質に局在している (Nuage) が、OSC では Krimp 顆粒を形成する。生殖細胞では、Krimp を Krimp 顆粒状の局在から Nuage へと変化させる因子が存在していると考えられる。Krimp の N 末領域にはタンパク質相互作用に関与するとされるコイルドコイルドメインがみられ (図 3, CC1 及び CC2)。今後、それらに相互作用する因子を同定していく予定である。

(3) AGO3、及び Krimp 相互作用分子の同定と解析

抗 AGO3 及び抗 Krimp モノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験を行い、現在、結合分子の同定を行った結果、 γ -tubulin リング複合体が同定された。 γ -tubulin リング複

体と piRNA 生合成機構との関連は全く報告されていない。今後、これらが piRNA 生合成に関与しているのか調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

佐藤薫、岩崎由香、渋谷あおい、Piero Carninci、石津弘嗣、塩見美喜子、塩見春彦
Essential roles of a Tudor domain-containing protein, Krimper, in piRNA biogenesis in Drosophila ovaries
2014 Keystone Symposia Conference - A9: RNA Silencing
January 31 - February 5, 2014
Sheraton Seattle Hotel, Seattle, Washington, USA

佐藤薫、難波祐里香、塩見美喜子、塩見春彦
Distinctive functions of Maelstrom in the piRNA pathway in the germline and ovarian somatic cells
分子生物学会
December 3-6, 2013
神戸ポートアイランド・神戸

佐藤薫、岩崎由香、渋谷あおい、Piero Carninci、石津弘嗣、塩見美喜子、塩見春彦
ショウジョウバエ卵巣における piRNA 生合成機構
日本遺伝学会第 85 回大会
September. 19, 2013.
慶應義塾大学日吉キャンパス・神奈川

Kaoru Sato, Naoki Matsumoto, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Haruhiko Siomi and Mikiko C Siomi
Functional analyses of Maelstrom in the piRNA pathway in Drosophila
CSHL meeting Regulatory & Non-Coding RNAs
August 28 - September 1, 2012
Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

Kaoru Sato, Naoki Matsumoto, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Haruhiko Siomi and Mikiko C Siomi
Functional analyses of Maelstrom in the piRNA pathway in Drosophila
Seminars on Germline Stem Cell
July 17, 2012
慶應義塾大学信濃町キャンパス・東京

[その他]

ホームページ等

<http://www-siomilab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者 佐藤 薫 (SATO, kaoru)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：20548507