

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830134

研究課題名(和文) 転移因子を抑制する新規小分子RNA機能の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of transposable element-regulating small RNAs

研究代表者

岩崎 由香 (Iwasaki, Yuka)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80612647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類生殖組織における小分子RNAを介したトランスポゾンの発現抑制に関しては未知の部分が多い。そこで、霊長類モデル生物マーモセットの小分子RNAを次世代シーケンサにより網羅的に解析した。その結果、マーモセット精巣において、トランスポゾン領域由来の新規miRNAなどを同定すると同時に、発現している小分子RNAの大部分がpiRNAに占められていることを見いだした。piRNAについて詳細な解析を進めたところ、多くがトランスポゾン類似配列やトランスポゾン自身に由来していた。さらに、トランスポゾンの転移能と発現するpiRNA量などの特徴を解析し、piRNAによるトランスポゾン抑制モデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Small RNAs mediate transposable element (TE) silencing by binding Argonaute/Piwi proteins. Here, we describe small RNA profiling of the adult testes of *Callithrix jacchus*, a model primate. We identified 353 novel miRNAs, which some originated from TEs. Meanwhile, the most abundant class of small RNAs in the adult testis was piRNAs. Therefore, we generated an antibody for MARWI, a marmoset PIWI protein, and performed high throughput sequencing analysis. MARWI-piRNAs show characteristics of mouse pachytene piRNAs, and are mostly derived from conserved clustered regions in the genome, known as piRNA clusters. Further analysis revealed that strand bias observed for piRNAs mapped to each TE subfamily correlates with the polarity of TE copies inserted in clusters. Also, more piRNAs map to TE subfamilies when they have copies in piRNA clusters. These findings suggest that TE insertions to pachytene piRNA clusters determine abundance and strand-bias of TE-derived piRNAs.

研究分野：分子生物学, ゲノム生物学

キーワード：小分子RNA トランスポゾン 遺伝子発現抑制 生殖組織 非コードRNA RNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

近年、「RNAサイレンシング」と呼ばれる20-30塩基長程の小分子RNAを介した遺伝情報の発現制御機構が、植物からヒトまで広範な生物種において、発生・分化・疾患等のさまざまな生命現象の根幹的な調節機構として機能していることが明らかとなった。小分子RNAは、PIWI-interacting RNA(piRNA)・microRNA(miRNA)・endogenous siRNA(esiRNA)の3種が知られており、異なる作用機構により標的遺伝子を制御している。miRNAおよびesiRNAはほぼ全組織で恒常的に発現し、Argonauteタンパク質と複合体を形成する一方、piRNAは生殖組織特異的に発現し、PIWIタンパク質と複合体を形成する。これら小分子RNAが制御対象とする遺伝子とその制御機構に関しては未だ不明な部分が多いが、piRNAおよびesiRNAは主にトランスポゾン(転移因子)領域から発現し、トランスポゾンを抑制すると考えられている。また、miRNAは様々なゲノム領域から転写され、標的となる遺伝子の主に3'UTR領域に部分的な相補性をもって結合することにより、翻訳を抑制すると考えられている。

細胞種や細胞の状態ごとにトランスポゾンの発現パターンが大幅に異なり、生命現象に大きく関与していることが知られているが、これがpiRNA・miRNA・esiRNAの発現パターンの違いに起因している可能性がある。例えば、piRNAに関しては、生殖細胞特異的な発現が知られているが、マウス精巣において生殖細胞と体細胞とではレトロトランスポゾンの発現パターンが異なる。また、ヒト癌細胞においてmiRNAの発現量は減少する一方で、トランスポゾンの発現量が上昇するという報告もある。三種類の小分子RNAによるトランスポゾンの発現抑制が示唆されるなか、これらがどのような関係性をもってトランスポゾンを抑制しているか、その詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

ゲノムの膨大な領域はレトロトランスポゾンによって占められており、その適切な制御がゲノムの品質管理の鍵となる。トランスポゾン制御因子としてpiRNAやesiRNAといった小分子RNA群が機能することが報告されている。一方で、予備解析として既存のショウジョウバエ生殖組織における小分子RNAのシーケンスデータを解析したところ、トランスポゾンに由来するmiRNA様小分子RNAを見いだした。すなわち、miRNAもトランスポゾンの抑制因子として働くことが示唆された。そこで本研究は、piRNA・esiRNA・miRNAといった小分子RNA群がどのように機能することでトランスポゾンの脅威からゲノムを防御しているかを包括的に理解する。

3. 研究の方法

既存のショウジョウバエ卵巣における小分子RNAシーケンスデータの予備解析結果より、生殖組織において、piRNA・esiRNA・miRNAといった小分子RNAが協調してトランスポゾンを抑制している可能性が示された。一方で、ヒトをはじめとした霊長類生殖組織においてどのような小分子RNAが発現し、トランスポゾンを抑制しているかについては未知の部分が多い。そこで、本研究では霊長類モデル生物コモンマーモセット(*Callithrix jacchus*)の精巣における小分子RNA並びにmRNAを次世代シーケンサにより網羅的に解析した。

コモンマーモセット精巣において、小分子RNAのうちpiRNAが主に発現している、という結果が得られた。これを受け、piRNAについてより詳細な解析を行うために、コモンマーモセットPIWIタンパク質である、MARWIに対するモノクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて免疫沈降を行うことにより、MARWIに結合しているpiRNAを抽出し、次世代シーケンサにより配列を決定した。さらに、piRNAがゲノム中のどのような配列に由来し、どういった特徴を有するかを情報学的に解析した。また、同定されたpiRNAの発現をノザンプロットングにより検証し、さらにMARWI-piRNA複合体が標的遺伝子の切断活性をもつことをスライサーアッセイにより生化学的に示した。

4. 研究成果

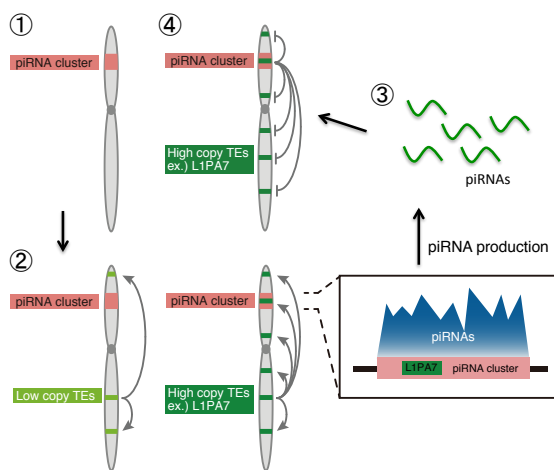
霊長類モデル生物コモンマーモセット(*Callithrix jacchus*)の精巣における小分子RNAを次世代シーケンサにより網羅的に解析した。miRNAについては、685種を同定し、うち353種に関しては、これまでに報告のない新規miRNAであった。とくに興味深い例として、X染色体に位置するmiRNAクラスターが挙げられる。通常、生殖細胞においてX染色体は、減数分裂機性染色体不活性化(MSCI)と呼ばれる機構により不活性化されている。しかしながら、このクラスター中のmiRNAに関しては、MSCIを逃れ、発現していることが明らかとなった。さらに興味深いことに、このmiRNAは、Medium Reiteration frequency(MER)と呼ばれるリピート配列に由来していることから、miRNAがリピートやトランスポゾンを標的としている可能性が示された。その一方で、esiRNAについては、既知の特徴を有するものを同定することが出来なかった。したがって、ショウジョウバエにおいてトランスポゾン抑制に大きく関与していると考えられているesiRNAは、霊長類ではほとんど発現していないと考えられる。

コモンマーモセット精巣における小分子RNA発現量の全体分布を解析した結果、miRNAおよびsiRNAに該当する配列長のものは全体

の6.3%程度であった。これに対し、piRNAに該当する配列長ものは全体の83.5%と大部分を占めていた。加えて、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行い、4種のArgonauteタンパク質および4種のPIWIタンパク質の発現量を確認した結果、PIWIタンパク質の一種であるMARWIの発現量が非常に高かった。これらのことから、コモンマーモセット精巣で主に発現しているのは、MARWIに結合するpiRNAであることが明らかとなった。

上記を受け、MARWIに結合するpiRNAをMARWIの免疫沈降により抽出し、これを次世代シーケンサにより解析した。同定されたpiRNAのなかには、グルタミン酸tRNAなど、特定のtRNAの5'末端や、偽遺伝子由来のものを含まれ、これらの領域からpiRNAが産生されていることが明らかとなった。また、マウスおよびショウジョウバエで報告があるような、mRNAの3'UTR領域から産生されるpiRNAも同定され、これらがタンパク質コード遺伝子の発現調節を担う可能性を見いだした。

一方で、同定されたpiRNAの多くは、piRNAクラスターと呼ばれる特定のゲノム領域やトランスポゾンに由来し、マウスのパキテンpiRNAと類似した特徴を有していた。各種トランスポゾンとpiRNAの関係性をさらに解析したところ、piRNAクラスターへの転移があるトランスポゾンほど多くのpiRNAを産生し、トランスポゾンがpiRNAクラスターへ挿入される方向性が産生されるpiRNAの方向性を規定していることが明らかとなった。これらのことから、トランスポゾンがpiRNAクラスターへ転移することにより、そのトランスポゾンを抑制するpiRNAが産生される、というモデルを提唱した(下図)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件) 内8件 全て査読有

1. Sato K., **Iwasaki Y.W.*** (* equally contributed), Shibuya A., Carninci P., Tsuchizawa Y., Ishizu H., Siomi M.C., Siomi H.: Krimper enforces an antisense bias on piRNA pools by

binding AGO3 in the *Drosophila* germline. *Mol Cell, in press*

2. **Iwasaki Y.W.**, Siomi M.C., Siomi H.: PIWI-interacting RNA: Its biogenesis and functions. *Annu Rev Biochem*, 84:25.1-25.29 (2015) DOI:10.1146/annurev-biochem-060614-034258
3. Nishida K., **Iwasaki Y.W.**, Murota Y., Nagao A., Mannen T., Kato Y., Siomi H., Siomi M.: Respective Functions of Two Distinct Siwi Complexes Assembled during PIWI-Interacting RNA Biogenesis in Bombyx Germ Cells. *Cell Rep*, 10: 193-203 (2015) DOI:10.1016/j.celrep.2014.12.013
4. Hirano T.*, **Iwasaki Y.W.*** (* equally contributed), Lin Z.Y., Imamura M., Seki N.M., Sasaki E., Saito K., Okano H., Siomi M.C., Siomi H.: Small RNA profiling and characterization of piRNA clusters in the adult testes of the common marmoset, a model primate. *RNA*, 20: 1223-1237 (2014), DOI:10.1261/rna.045310.114
5. Murota Y., Ishizu H., Nakagawa S., **Iwasaki Y.W.**, Shibata S., Kamatani M.K., Saito K., Okano H., Siomi H., Siomi M.C.: Yb integrates piRNA intermediates and processing factors into perinuclear bodies to enhance piRISC assembly. *Cell Rep*, 8: 103-113 (2014), DOI:10.1016/j.celrep.2014.05.043
6. Kiga K., Mimuro H., Suzuki M., Shinozaki-Ushiku A., Kobayashi T., Sanada T., Kim M., Ogawa M., **Iwasaki Y.W.**, Kayo H., Fukuda-Yuzawa Y., Yashiro M., Fukuyama M., Fukao T., Sasakawa C.: Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nat Commun*, 5: 4497 (2014), DOI:10.1038/ncomms5497
7. Ohtani H., **Iwasaki Y.W.**, Shibuya A., Siomi H., Siomi M.C., Saito K.: DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the *Drosophila* ovary. *Genes Dev*, 27:1656-1661 (2013), DOI:10.1101/gad.221150.113
8. **Iwasaki Y.W.**, Kiga K., Kayo K., Fukuda-Yuzawa Y., Weise J., Inada T., Tomita M., Ishihama Y., Fukao T.: Global microRNA elevation by inducible Exportin5 regulates cell cycle entry. *RNA*, 19: 490-497 (2013), DOI:10.1261/rna.036608.112

〔学会発表〕（計 5 件）

1. **Iwasaki Y. W.**, Ishizu H., Shibuya A., Iyoda Y., Siomi M. C, Siomi H., Saito K. Piwi-piRNA regulates association of linker histone H1 with target transposon loci in *Drosophila*. 2015, 5/26-31, 20th Annual Meeting of the RNA Society, Madison, WI, USA
2. **Iwasaki Y. W.**, Shibuya A., Ohtani H., Siomi M. C., Siomi H., Saito K. Piwi-piRNA regulates histone H1 association to the target chromatin loci. 2014, 10/19-21, Cell Symposia: Regulatory RNAs, Berkeley, CA, USA
3. **岩崎由香**、平野孝昌、Lin ZY、今村公紀、關菜央美、佐々木えりか、齋藤都暁、岡野栄之、塩見美喜子、塩見春彦. 霊長類生殖組織におけるトランスポゾン抑制小分子 RNA の解析. 日本遺伝学会第 86 回大会ワークショップ, 2014, 9/17-19, 長浜バイオ大学, 滋賀県長浜市
4. **岩崎由香**、平野孝昌、Lin ZY、今村公紀、佐々木えりか、岡野栄之、齋藤都暁、塩見美喜子、塩見春彦. 霊長類生殖組織における小分子 RNA の統合的解析. 第 36 回日本分子生物学会年ワークショップ, 2013, 12/3-6, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
5. **岩崎由香**. PIWI タンパク質と piRNA による遺伝子発現調節. 第 123 回生命環境科学セミナー, 2013, 9/6, 東京大学駒場キャンパス, 東京都目黒区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 由香 (IWASAKI YUKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 80612647