

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870112

研究課題名(和文) piRNA生合成におけるMaelstromの分子作用機序の解明

研究課題名(英文) Molecular function of Maelstrom in germline piRNA biogenesis pathway in Bombyx mori

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞特異的に産生される小分子RNAであるpiRNA (PIWI-interacting RNA)はトランスポゾンなどの発現抑制に寄与する。本研究では、カイコ生殖細胞におけるpiRNA生合成経路に焦点を当て、その生合成必須因子Maelstromの分子機能の解明を目的とし、Mael相互作用RNA()及びタンパク質()の解析を進めた。 については、CLIP法の条件を整え、現在Mael相互作用RNAの解析を進めている。 については、抗Mael抗体などを用いた免疫沈降により結合タンパク質を同定した。現在Maelとの機能的な相互作用機序の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：piRNA (PIWI-interacting RNA) is a subset of small RNAs specifically produced in animal gonad, and associates with PIWI proteins to suppress the expression of transposons. BmN4 cell is derived from silkworm ovarian germ cell, and is a useful culture system to studying germline piRNA biogenesis. In this project, I examined the molecular function of an piRNA factor Maelstrom (Mael) in the germline piRNA biogenesis in silkworm. Especially, I aimed to identify the Mael-interacting RNA and proteins. First, to isolate the Mael-interacting RNAs, I performed CLIP analysis using anti-Mael antibody, and detected RNAs which was crosslinked with Mael. Now, I am trying to prepare the RNA library for deep sequence. Next, I identified a silkworm PIWI protein Siwi and two piRNA factors, BmSpn-E and BmQin in the Mael-complexes. Now, I am analyzing Mael-complex formation and cellular localization when each piRNA factor is depleted in BmN4 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：piRNA Maelstrom Transposon RNA silencing Germline Silkworm Piwi RNAi

1. 研究開始当初の背景

20~30 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 (Kim et al. 2009)。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。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 (Kim et al. 2009; Siomi et al. 2011)。piRNA の多くは、ゲノム上の転移因子 (Transposable element; TE) 特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 (Siomi et al. 2011)。

piRNA 生合成経路のおおまかなモデルとして、長い前駆体 piRNA から何らかの切断過程を経て生成された piRNA が PIWI に結合する「プライマリー経路」と、それを素にできた piRNA-PIWI 複合体が TE 転写産物を切断し、その切断産物がさらに短く切断され、新たな piRNA になる「ピンポン経路」が提唱されている (図 1) (Gunawardane et al. 2007; Brennecke et al. 2007)。これらの経路は、脊椎動物から昆虫など、様々な動物でよく保存されているが、その分子機構は不明な点が多く残されている。カイコの培養細胞株 BmN4 は生殖細胞由来の細胞株であり、

piRNA 生合成の分子機構を生化学的に解析するうえで非常に強力なツールとなっている (Nishida 2015)。カイコは SIWI と BmAGO3 の 2 つの PIWI タンパク質をもち、SIWI へはプライマリー経路によって piRNA が結合し、これにより piRNA を保持した SIWI が引き金となり、SIWI-BmAGO3 との間でピンポン経路が生じることで二次的に piRNA が産生される。

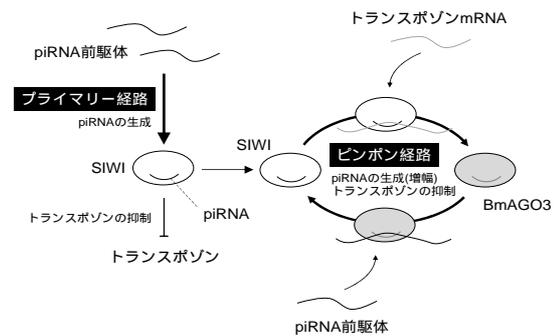


図 1. piRNA 生合成過程 piRNA はプライマリー経路とピンポン経路の 2 つの機構によって作られる。ここではカイコの PIWI タンパク質 (SIWI と BmAGO3) を例に用いる。プライマリー経路ではトランスポゾン mRNA と相補的な配列をもつ一本鎖の長い RNA (piRNA 前駆体) が短くプロセシングされ、SIWI へ結合する。この一部がピンポン経路の引き金となり、切断されたトランスポゾン mRNA 断片が短くプロセシングされ、BmAGO3 へ結合する。BmAGO3 はさらに相補的な piRNA 前駆体を認識・切断し、SIWI の piRNA を生み出す。

Maelstrom (Mael) はヒトからカイコまで広く保存された piRNA 生合成因子の一つであり、Mael の機能に異常が生じると piRNA が産生されなくなる。Mael は HMG 様ドメインと機能未知の MAEL ドメインをもち、これまでの当研究室における構造的・生化学的な解析から、HMG 様ドメインが一本鎖 RNA と物理的な親和性を持つこと、また、MAEL ドメインは、それ自体に RNA 結合能はないが、一本鎖 RNA を切断するヌクレアーゼ活性をもっていることを明らかにしてきた (Matsumoto et al. 2015; Sato and Siomi. 2015)。これらの結果は、Mael が前駆

体 piRNA や TE 転写産物と相互作用し、それらの切断過程を制御していることを強く示唆する。

2. 研究の目的

piRNA 生合成に関わる Mael は一本鎖 RNA 結合性をもつヌクレアーゼであり、この結果は、Mael が前駆体 piRNA や TE 転写産物の切断過程に関与することを強く示唆する。

本研究の具体的な目的は、Mael-RNA 複合体に着目し、Mael がどのような分子機構によって piRNA 生合成を制御しているのかを明らかにすることである。そこで、以下の2点について明らかにする。

(1) HITS-CLIP 法を用いた Mael 相互作用 RNA の解析

これまでの解析で、我々は Mael が HMG 様ドメインを介して RNA と相互作用することを明らかにしてきた。そこで、HITS-CLIP 法を用いて Mael と相互作用している RNA を単離・解析することで、Mael がどのような RNA を標的としているのかを明らかにする。

(2) 免疫沈降法を用いた Mael 相互作用タンパク質の同定と解析

Mael による piRNA 生合成の作用機序を探るために、Mael がどのような因子と相互作用しているのか、抗 Mael 抗体などを用いた免疫沈降実験と質量分析(MS)解析により、それらへの結合タンパク質の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) HIT-CLIP 法を用いた Mael の HMG 様ドメイン相互作用 RNA の解析

抗 BmMael 抗体を用いて CLIP 法により、BmN4 細胞から Mael 相互作用 RNA を単離する。また、BmN4 細胞内で Myc タグ付きの Mael 全長などを強制発現し、抗 Myc 抗体を用いた RNA の単離を行う。

(2) 免疫沈降法を用いた Mael 相互作用タンパク質の同定

BmN4 細胞内で、抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。免疫沈降により回収したタンパク質は SDS-PAGE により分離後、銀染色を行い、シグナルを検出する。ネガティブコントロールとして non-immune IgG 抗体を用いた免疫沈降を行い、抗 Mael 抗体でのみ得られる特異的なシグナル(バンド)を切り出し、Mael 相互作用タンパク質を回収する。その後、質量分析(MS)解析を行うことで、その分子を同定する。

4. 研究成果

(1) HIT-CLIP 法を用いた Mael の HMG 様ドメイン相互作用 RNA の解析

CLIP は一般に、細胞に紫外光(254 nm)を照射し、タンパク質-RNA 架橋(UV-crosslink)を行う手法と、PAR-CLIP と呼ばれる 4-thiouridine (4-SU)を細胞に取り込ませた後に、紫外光(365 nm)を照射し、タンパク質-4-SU RNA 架橋(UV-crosslink)を行う手法が使われ(Hafner et al. 2010)どの手法が有用であるかは、細胞の種類、免疫沈降するタンパク質によって異なり、それぞれについて条件検討を行う必要がある。そこで、まず、抗 BmMael 抗体による CLIP 法を行うに当り、CLIP 及び PAR-CLIP の条件検討を行った。それぞれの細胞を UV-crosslink 後、抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降を行い、回収した RNA を CIP-PNK 処理による 5' end labeling 法により RI 標識した。得られた RI 標識サンプル(Mael-RNA 複合体)を SDS-PAGE で分離し、RI 標識シグナルを調べた結果、いずれの場合も Mael のタンパク質サイズに非常に弱いながらシグナルがみられた(図 2)。

また、BmN4 細胞から Mael 相互作用 RNA を単離する別の方法として、RNA 免疫沈降

(RNA-IP)も試みた。BmN4 細胞内で Myc タグ付きの Mael 全長、及び、MAEL ドメイン変異体を強制発現したところ、MAEL ドメイン変異体において RNA の強いシグナルが得

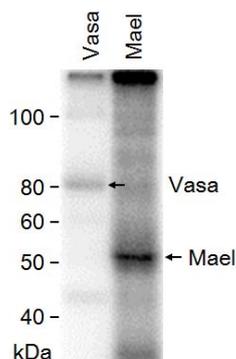


図 2. CLIP による Mael 結合 RNA の単離
Mael 結合 RNA を CIP-PNK 処理したところ、Mael タンパク質サイズ (およそ 52 kDa) に RNA のシグナルが検出された。Vasa はポジティブコントロール。

られた。

(2) 免疫沈降法を用いた Mael 相互作用タンパク質の同定

抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。免疫沈降により回収したタンパク質は SDS-PAGE により分離後、銀染色を行い、シグナルを検出した。結果、特異的なシグナル (バンド) がいくつか得られた。それらのバ

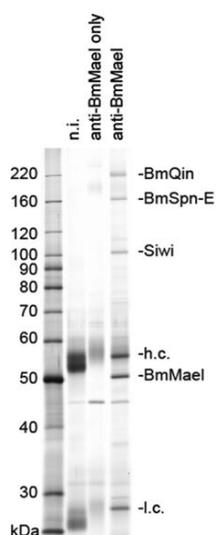


図 1. 抗 Mael モノクローナル抗体を用いた免疫沈降による Mael (BmMael) 複合体の単離
Mael 複合体には Siwi, Spn-E, Qin が含まれていた。h.c.、l.c.は抗体のバンドを示す。

ンドに含まれるタンパク質を MS 解析により同定したところ、カイコ PIWI タンパク質である Siwi、piRNA 生合成に關与する BmSpn-E, BmQin が含まれていた(図 3)。これらのタンパク質に対する抗体は取得済みであったため(Nishida et al. 2015)、ウェスタンブロット法により、Mael とこれらのタンパク質との相互作用を確認し、Mael 複合体の構成タンパク質が明らかとなった。

本研究では、Mael-RNA 複合体に着目し、Mael がどのような分子機構によって piRNA 生合成を制御しているのかを明らかにすることを旨とした。具体的に、HIT-CLIP 法を用いた Mael の HMG 様ドメイン相互作用 RNA の解析、免疫沈降法を用いた Mael 相互作用タンパク質の同定、の 2 点について解析を進めた。

まず、については、抗 Mael 抗体を用いた CLIP 法の条件検討を行い、CLIP、PAR-CLIP とも RNA のシグナルはみられたが、非常に弱いものであった。この条件では、ライブラリー作成に必要な RNA 量を集めることは困難であると判断されるため、今後、収率を向上させるための検討が必要である。具体的には、免疫沈降の条件 (バッファー、細胞 Lysate 量など) を検討し、抗 Mael 抗体が有効に働く CLIP の条件を整えていく。それらの条件が整い次第、CLIP により Mael 相互作用 RNA を単離し、その Mael 結合性 RNA の配列を、次世代型シーケンサーを用いて解析する予定である。解読した RNA 配列は、piRNA 前駆体や TE 転写産物と比較し、Mael がどのような部分と相互作用しているのか、さらに、結合配列特異性などについて明らかにしていく。

次に、については、抗 Mael 抗体などを用いた免疫沈降実験と MS 解析により結合タンパク質を同定できた。さらに、これらのタンパク質については、それぞれの抗体を用い

たウェスタンブロットにより、相互作用を確認できた。今回、Mael 相互作用タンパク質には、Siwi、BmSpn-E、BmQin が含まれており、これらは Siwi のプライマリー経路による piRNA 生合成に関わる因子である (Nishida et al. 2015)。しかし、その経路における BmSpn-E、BmQin の分子的な役割は明らかになっていない。今後、ノックダウン法を用いて、それぞれの相互作用の変化や、細胞内局在パターンの変化などを解析し、piRNA 生合成における Mael 複合体の分子機能を明らかにしていく。

<引用文献>

- Brennecke et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1089-103.
- Gunawardane et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*. 2007 Mar 16;315(5818):1587-90.
- Hafner et al. PAR-CLIP--a method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins. *J Vis Exp*. 2010 Jul 2;(41). pii: 2034. doi: 10.3791/2034.
- Kim et al. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Feb;10(2):126-39. doi: 10.1038/nrm2632.
- Matsumoto et al. Crystal Structure and Activity of the Endoribonuclease Domain of the piRNA Pathway Factor Maelstrom. *Cell Rep*. 2015 Apr 21;11(3):366-75. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.030.
- Nishida et al. Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells. *Cell Rep*. 2015 Jan 13;10(2):193-203. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.013.
- Sato and Siomi. Functional and structural insights into the piRNA factor Maelstrom. *FEBS Lett*. 2015 Jun 22;589(14):1688-93. doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.023.
- Siomi et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Apr;12(4):246-58. doi: 10.1038/nrm3089.

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)

[雑誌論文](計2件)

Sato K, Siomi MC. Functional and structural insights into the piRNA factor Maelstrom. *FEBS Lett*. 2015 Jun 22;589(14):1688-93.

査読あり

doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.023.

Matsumoto N, Sato K, Nishimasu H, Namba Y, Miyakubi K, Dohmae N, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC, Nureki O. Crystal Structure and Activity of the Endoribonuclease Domain of the piRNA Pathway Factor Maelstrom. *Cell Rep*. 2015 Apr 21;11(3):366-75.

査読あり

doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.030.

[学会発表](計4件)

Sato K, Namba Y, Oonishi R, Siomi MC. Distinctive functions of Maelstrom in the piRNA pathway in germline and ovarian somatic cells. *RNA Japan 2015*.

発表年月日: July 15-17, 2015.

発表場所: ホテルライフオーポート札幌(北海道札幌市)

佐藤薫、塩見美喜子、ショウジョウバエ生殖細胞における piRNA 生合成機構、分子研究学会「細胞核内反応の分子科学」

発表年月日: 2014年9月27日

発表場所: 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Namba Y, Sato K, Matsumoto N, Nishimasu H, Nureki O, Siomi H, Siomi MC. Molecular functions of Maelstrom in the piRNA pathway. *RNA Japan 2014*.

発表年月日: July. 23-25, 2014.

発表場所: ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

Sato K, Namba Y, Siomi H, Siomi MC. Distinctive functions of Maelstrom in the piRNA pathway in *Drosophila* germline and ovarian somatic cells. *IIAS Research Conference 2014 Chromatin Decoding*.

発表年月日: May 12-15, 2014

発表場所: 国際高等研究所(京都府木津川市)

[図書](計1件)

大西遼、佐藤薫、塩見美喜子 ナノ学会誌、PIWI-interacting RNA を介したトランスポゾン転写抑制機構、ナノ学会、2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし