

論文の内容の要旨

Requirements of Yb-driven multivalent phase separation in production of transposon-repressible piRNAs

(トランスポゾン抑制性 piRNA の生合成には多価性相互作用による Yb タンパク質の相分離が必要である)

氏名 平形 樹生

背景・目的

生殖組織特異的な小分子 RNA である PIWI-interacting RNA (piRNA) は、相補的な配列を持つトランスポゾンを抑制し、ゲノムを保護する。piRNA の前駆体は長鎖一本鎖 RNA であり、これが細胞質でのプロセッシングを経て成熟型 piRNA となる (図 1)。ショウジョウバエ卵巣の体細胞 (OSC) において、トランスポゾンを標的とする piRNA の大部分は遺伝子間領域である *flamenco* (*flam*) の転写産物に由来する。一方、タンパク質をコードする遺伝子の mRNA から機能未知の piRNA が作られており、これらは *genic piRNA* と呼ばれる。

これまでの研究で、OSC における piRNA 生合成因子が複数同定されている。このうち、*fs(1)Yb* (Yb) や *Armitage* (Armi)、*Vreteno* (Vret)、*Sister of Yb* (SoYb) は Yb body と呼ばれる細胞質顆粒に局在する。その他の生合成因子はミトコンドリア上に局在するが、Yb body はミトコンドリアに隣接するため、Yb body が piRNA 前駆体のプロセッシングの場と考えられてきた。しかしながら、Yb body の構成機構の詳細は未解明であった。

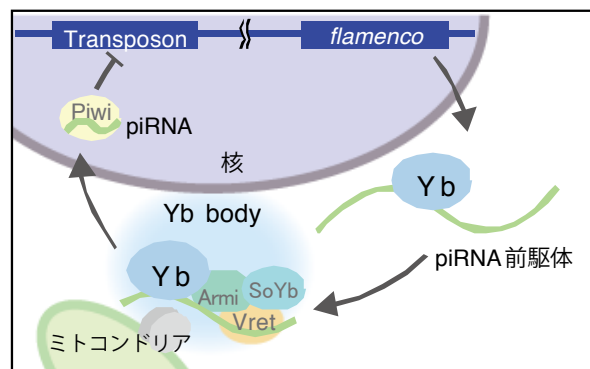


図 1. OSC の piRNA 経路

RNA 結合タンパク質である Yb は、piRNA 前駆体と選択的に結合することで、piRNA プロセッシング経路における基質の選別を担う。また、Yb は Armi と相互作用し、Armi を Yb body へリクルートする。アミノ酸配列に基づく予測では、Yb は Helicase-C terminal (Hel-C) ドメイン、extended Tudor (eTud) ドメイン、RNA helicase ドメインを持つとされる。このうち helicase ドメインは、RNA との結合や Yb body への局在に必要であることが報告されている。一方、helicase ドメインの C 末端側半分と相同な構造を取る Hel-C ドメインや、タンパク質間相互作用に関わるとされる eTud ドメインについては、piRNA 生合成経路における機能が不明である。そこで本研究では、Yb の Hel-C ドメインと eTud ドメインの機能、および、Yb body の構成機構の解明を目的とした。

結果・考察

まず、Yb body の階層性を解析するため、RNAi 法により OSC の各 Yb body 構成因子をノックダウンした。この細胞を用いて共免疫沈降法を行ったところ、Yb と Armi は Vret や SoYb に依存せずに結合すること、Vret は Armi 依存的に Yb と相互作用すること、Armi-Vret-SoYb の 3 者は Yb 非依存的に複合体を形成することが示された。さらに免疫染色法により、Yb body への局在化には Yb、Armi、Vret/SoYb の順に階層性があることが明らかとなった。以上の結果から

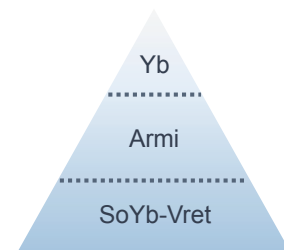


図 2. Yb body の階層性

ら Yb は、他のタンパク質に依存せずに Yb body を形成する最上流因子であり、Armi との結合を介して他の因子を Yb body へリクルートすることが明らかとなった(図 2)。

次に、Yb の Hel-C ドメインと eTud ドメインのタンパク質間相互作用を解析するため、Hel-C ドメインを欠失した変異体 (Δ Hel-C) と eTud ドメインを欠失した変異体 (Δ eTud) の発現ベクターを OSC に導入し、共免疫沈降法を行った。その結果、 Δ eTud は Armi との相互作用が見られなかったものの、内在の野生型 Yb との相互作用が認められた。一方、 Δ Hel-C では Armi との相互作用が認められたが、内在 Yb との相互作用は見られなかった。これらの結果より、Yb は Hel-C ドメインを介して自己会合すること、および、eTud ドメインを介して Armi と相互作用することが強く示唆された。さらに、両ドメインの Yb body 形成への寄与を明らかにするため、内在 Yb をノックダウンした OSC に各変異体を発現させて細胞内局在を観察した。その結果、どちらの変異体でも Yb body を形成できなかった。Yb body が形成されない原因を探るため、CLIP 法により各変異体と RNA との相互作用を解析したところ、 Δ Hel-C は野生型と同程度に RNA と相互作用したが、 Δ eTud では相互作用する RNA 量が著しく減少していた。これらの結果から、Hel-C ドメインを介した自己会合、および、eTud ドメインと RNA helicase ドメインを介した RNA との結合が Yb body の形成に必須であることが示唆された。

さらに、Hel-C ドメインと eTud ドメインの piRNA 経路への寄与を明らかにするため、内在 Yb のノックダウンにより piRNA を産生できなくなった OSC に各変異体を発現させ、piRNA 量やトランスポゾン発現量を解析した。ΔeTud 変異体を発現させた場合には piRNA 量は回復せず (図 3)、トランスポゾンの発現量も上昇したままであった。一方、ΔHel-C 変異体を発現させた場合には piRNA 量が回復したものの (図 3)、トランスポゾンの発現量は依然上昇したままであった。そこで、ΔHel-C 変異体発現時の piRNA の配列を解析したところ、野生型 Yb を発現させた場合と比較してトランスポゾンを標的とする piRNA の割合が低下し、genic piRNA の割合が相対的に上昇していた。以上の結果から、Yb の Hel-C ドメインを介した Yb body 形成は、トランスポゾンを標的とする piRNA の産生に必須であることが明らかになった。さらに、Yb body は、genic piRNA の産生には必要ではないが、flam の効率的なプロセシングに必須であることが示唆された。

先行研究により、flam RNA が Yb body の形成に必要であることや、flam 上には複数の Yb 結合部位があることが示されていた。これらの知見から Yb body の形成には、Yb の自己会合や flam と Yb の結合に見られる多価性相互作用がもたらす液-液相分離 (LLPS) が関わっていると推測した。そこでライブセルイメージングにより GFP タグ付きの Yb body を観察したところ、分裂や融合といった液滴様の挙動が認められ、Yb body が LLPS によって生じることが判明した。

以上の結果から、Yb の eTud ドメインは、Armi との結合を介して他のプロセシング因子と相互作用するとともに前駆体 RNA との結合を担うこと、ならびに、Hel-C ドメインは自己会合を担うことが明らかとなった。また、Yb の自己会合および、flam RNA との結合が、LLPS による Yb body の形成をもたらすというモデルの提唱に至った。さらに、Yb body の機能についても、flam RNA のプロセシングを効率化することで、piRNA によるトランスポゾンの抑制に寄与している可能性が示唆された (図 4)。

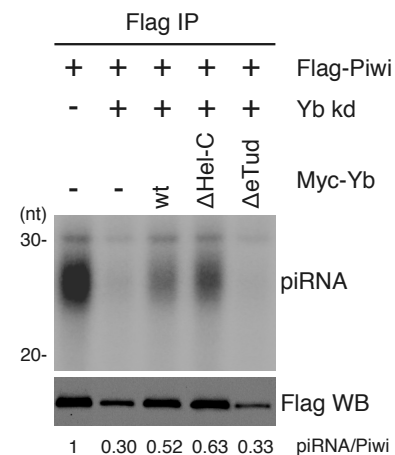


図 3. ドメイン欠失変異体発現時の piRNA 量

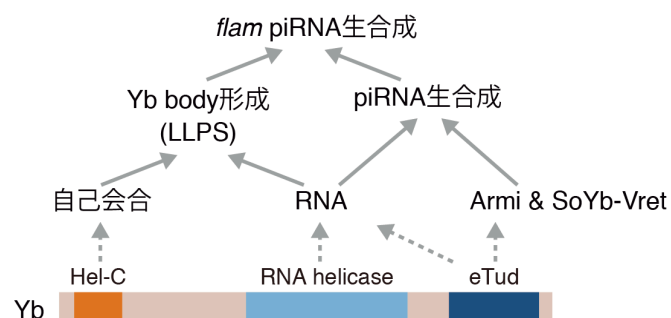


図 4. Yb による flam piRNA 生合成モデル