

論文の内容の要旨

Functional analysis of the RNA helicase, Armitage, in piRNA biogenesis

(piRNA 生合成に寄与する RNA ヘリカーゼ Armitage の機能解析)

木下達貴

生殖組織特異的に発現する小分子 RNA である PIWI-interacting RNA (piRNA)は、PIWI タンパク質と複合体を形成し、相補的な配列を持つトランスポゾンとを認識、抑制することでゲノムの安定性に寄与する。生殖組織におけるトランスポゾンの抑制は次世代へ正常なゲノムを引き継ぐために必須であり、piRNA 経路の異常は不妊を引き起こすことが、ショウジョウバエ個体を用いた研究で示されている。ショウジョウバエ卵巣において生殖細胞を取り囲む、体細胞 (Ovarian Somatic Cell; OSC)では、fs(1)Yb (Yb)、Armitage (Armi)、Zucchini (Zuc)などのタンパク質が piRNA 生合成に寄与する。Yb を主な構成因子とする細胞質顆粒 Yb body は、ミトコンドリアに近接しており、piRNA 生合成因子の多くが Yb body 及びミトコンドリア外膜上に局在することから、Yb body とミトコンドリアは piRNA 生合成の場であると考えられた。

piRNA の前駆体となる長鎖の 1 本鎖 RNA は、Yb タンパク質が特異的に結合するシスエレメント配列を持ち、Yb が結合することにより piRNA 生合成へ誘導されると考えられる。Armi は Yb 依存的に Yb body へ局在する piRNA 生合成因子であり、Yb 依存的に piRNA 前駆体へ結合することが先行研究により示されている。その後、piRNA 前駆体はミトコンドリア上へ輸送され、ミトコンドリア外膜上に局在するエンドヌクレアーゼ Zuc により 5' 側から 3' 側へ段階的に切り出されることにより、約 24-31 塩基の成熟型 piRNA となる。

上記の先行研究から、Yb は piRNA 経路において、piRNA 前駆体を集積し、Armi の piRNA 前駆体への結合を制御していると考えられた。また Armi は ATP 依存的な SF1 型 RNA ヘリカーゼドメインを持つため、Zuc による piRNA の段階的切り出しに Armi のヘリカーゼ活性が関与すると考えられたが、piRNA 生合成におけるヘリカーゼ活性の意義は明らかになっていなかった。本研究では、piRNA 生合成における Armi の作用点と機能を明らかにし、さらに、ヘリカーゼ活性の意義を明らかにすることを目的とした。

まず、Armi の piRNA 前駆体へ特異的に結合するか評価するために、crosslinking and immunoprecipitation (CLIP)法により Armi 結合 RNA を取得し、解析を行った。Armi は piRNA の前駆体となる配列へ特異的に結合しており、Armi が piRNA 前駆体を識別する機構が存在することが示唆された。

次に、Armi の piRNA 前駆体への結合が Yb へ依存するか調べるために、Yb ノックダウン条件下での CLIP を行った。先行研究と同様、Yb ノックダウン条件下では、Armi の piRNA 前駆体への結合は低下しており、さらに細胞質中の mRNA, rRNA など、非特異的な RNA への結合増加が認められ、Armi の piRNA 前駆体への結合特異性は Yb によって制御されたと考えられた。先行研究より、Yb ノックダウン条件下においても、わずかに piRNA が産生されることが知られており、この piRNA の配列を解析したところ、Yb ノックダウン条件下において Armi が結合する配列との相関性が認められた。このことから Armi は、結合した配列から piRNA を産生する活性を持ち、Yb は主に piRNA 前駆体の識別や集積に寄与することが示唆された。さらに Yb が piRNA 前駆体の識別のみならず、piRNA 生合成へも寄与するか検証した。λN ペプチドと BoxB ステムループ配列の親和性を利用し、λN ペプチドを付加した Armi を、BoxB 配列を含むレポーター転写産物上に係留させたところ、Yb ノックダウン条件下においても、レポーター由来の piRNA が産生された。以上より、Yb は piRNA 前駆体の認識を主に担っており、piRNA 生合成段階では Armi が piRNA 前駆体へ作用することで生合成へ寄与すると考えられた。

次に、Armi のヘリカーゼ活性が piRNA 生合成へ寄与するか調べた。細胞から精製した Armi 組換えタンパク質と 2 本鎖 RNA を反応させたところ、Armi は RNA を 5'側から 3'側へ解く活性を示したが、SF1 型 RNA ヘリカーゼファミリーに保存されている残基へ変異を導入した変異体では、ヘリカーゼ活性を示さなかった。また内在 Armi をノックダウンした OSC において Armi 変異体を発現させたところ、piRNA は生合成されず、Armi のヘリカーゼ活性が piRNA 生合成へ寄与することが示された。Armi 変異体は piRNA の段階的な切り出しにおいて、生合成を阻害すると予想されたが、CLIP により Armi 変異体の結合 RNA

を解析したところ、Yb ノックダウン時と同様、細胞質中 RNA へ非特異的に結合した。Armi は結合 RNA への配列特異性を持たないことから、細胞質中 RNA にも結合しうるが、ヘリカーゼ活性によって解離することで、非特異的な結合が減少している可能性が考えられた。実際に組換えタンパク質を用いた解析を行ったところ、Armi は ATP 依存なヘリカーゼ活性によって RNA から解離したことから、Armi の Yb body への局在にはヘリカーゼ活性を用いた非 piRNA 前駆体からの解離が必須であるというモデルを提唱した。

これまでの解析より、Armi のヘリカーゼ活性は、非標的 RNA からの解離および Yb body への局在に必要であることが明らかとなった。また、Armi は自身のヘリカーゼ活性を用いることで piRNA 前駆体上を 5'側から 3'側へ移動し、前駆体を解くことで、piRNA の段階的な切り出し生合成を促していることが示唆された。

次なる問題点として、(1) Armi が piRNA 前駆体に結合した際に、ヘリカーゼ活性による RNA からの解離がどのように抑制されているか、その詳細な活性制御機構は不明である。Armi の同じファミリーに属するヘリカーゼは相互作用因子により活性制御を受けており、Armi も同様に相互作用因子による活性制御を受けるか、さらなる解析が期待される。また、(2) 先行研究において、Zuc 非存在下においても piRNA 前駆体が断片化されることが報告されており、piRNA 前駆体のプロセッシングには Zuc 以外のヌクレアーゼも関与すると考えられるが、そのような piRNA 生合成因子は同定されていない。Armi は Yb 非存在下においても、結合した RNA からの piRNA 生合成を行うため、Armi の相互作用因子が piRNA の 5'末端決定に関わる可能性が示唆されており、さらなる解析が期待される。

要旨

背景・目的

生殖組織特異的に発現する小分子 RNA である PIWI-interacting RNA (piRNA)は、PIWI タンパク質と複合体を形成し、相補的な配列を持つトランスポゾンとを認識、抑制することでゲノムの安定性に寄与する。生殖組織におけるトランスポゾンの抑制は次世代へ正常なゲノムを引き継ぐために必須であり、piRNA 経路の異常は不妊を引き起こすことが、ショウジョウバエ個体を用いた研究で示されている。ショウジョウバエ卵巣において生殖細胞を取り囲む、体細胞 (Ovarian Somatic Cell; OSC)では、fs(1)Yb (Yb)、Armitage (Armi)、Zucchini (Zuc)などのタンパク質が piRNA 生合成に寄与する。Yb を主な構成因子とする細胞質顆粒 Yb body は、ミトコンドリアに近接しており、piRNA 生合成因子の多くが Yb body 及びミトコンドリア外膜上に局在することから、Yb body とミトコンドリアは piRNA 生合成の場であると考えられた (図 1)。

piRNA の前駆体となる長鎖の 1 本鎖 RNA は、Yb タンパク質が特異的に結合するシスエレメント配列を持ち、Yb が結合することにより piRNA 生合成へ誘導される。Armi は Yb 依存的に Yb body へ局在する piRNA 生合成因子であり、Yb 依存的に piRNA 前駆体へ結合することが先行研究により示されている。その後、piRNA 前駆体はミトコンドリア上へ輸送され、ミトコンドリア外膜上に局在するエンドヌクレアーゼ Zuc により 5'側から 3'側へ段階的に切り出されることにより、約 24-31 塩基の成熟型 piRNA となる (図 1)。

上記の先行研究から、Yb は piRNA 経路において、piRNA 前駆体を集積し、Armi の piRNA 前駆体への結合を制御していると考えられた。また Armi は ATP 依存的な SF1 型 RNA ヘリカーゼドメインを持つため、piRNA 生合成段階に Armi のヘリカーゼ活性が関与すると考えられたが、piRNA 生合成におけるヘリカーゼ活性の具体的な役割は明らかになっていなかった。本研究では、piRNA 生合成における Armi の作用点と機能を明らかにし、さらに、ヘリカーゼ活性の意義を明らかにすることを目的とした。

結果・考察

まず、Armi が piRNA 前駆体へ特異的に結合するか評価するために、crosslinking and immunoprecipitation (CLIP)法により Armi 結合 RNA を取得し、解析を行った。Armi は piRNA の前駆体となる配列へ特異的に結合しており、Armi が piRNA 前駆体を識別する機構が存在することが示唆された。

次に、Armi の piRNA 前駆体への結合が Yb へ依存するか調べるために、Yb ノックダウン条件下での CLIP を行った。先行研究と同様、Yb ノックダウン条件下では、Armi の piRNA 前駆体への結合は低下しており、さらに細胞質中の mRNA, rRNA など、非特異的な RNA への結合増加が認められ、Armi の piRNA 前駆体への結合特異性は Yb によって制御されると考えられた。先行研究より、Yb ノックダウン条件下においても、わずかに piRNA が産生されることが知られており、この piRNA の配列を解析したところ、Yb ノックダウン条件下において Armi が結合する配列との相関性が認められた。このことから Armi は、結合した配列から piRNA を産生する活性を持ち、Yb は主に piRNA 前駆体の識別や集積に寄与することが示唆された。さらに Yb が piRNA 前駆体の識別のみならず、piRNA 生合成へも寄与するか検証した。λN ペプチドと BoxB ステムループ配列の親和性を利用し、λN ペプチドを付加した Armi を、BoxB 配列を含むレポーター転写産物上に係留させたところ、Yb ノックダウン条件下においても、レポーター由来の piRNA が産生された (図 2)。以上より、Yb は piRNA 前駆体の認識を主に担っており、piRNA 生合成段階では Armi が piRNA 前駆体へ作用することで生合成へ寄与すると考えられた。

次に、Armi のヘリカーゼ活性が piRNA 生合成へ寄与するか調べた。細胞から精製した Armi 組換えタンパク質と 2 本鎖 RNA を反応させたところ、Armi は RNA を 5'側から 3'側へ解く活性を示したが、SF1 型 RNA ヘリカーゼファミリーに保存されている残基へ変異を導入した変異体では、ヘリカーゼ活性を示さなかった。また内在 Armi をノックダウンした OSC において Armi 変異体を発現させたところ、piRNA は生合成されず、Armi のヘリカーゼ活性が piRNA 生合成へ寄与することが示された。Armi 変異体は piRNA の段階的な切り出しにおいて、生合成を阻害すると予想されたが、CLIP により Armi 変異体の結合 RNA を解析したところ、Yb ノックダウン時と同様、細胞質中 RNA へ非特異的に結合した。Armi は結合 RNA への配列特異性を持たないことから、細胞質中 RNA にも結合しうるが、ヘリカーゼ活性によって解離することで、非特異的な結合が減少している可能性が考えられた。実際に組換えタンパク質を用いた解析を行ったところ、Armi は ATP 依存なヘリカーゼ活性によって RNA から解離したことから (図 3)、Armi の Yb body への局在にはヘリカーゼ活性を用いた非 piRNA 前駆体からの解離が必須であるというモデルを提唱した (図 4)。