

論文の内容の要旨

Antisense piRNA biogenesis in *Bombyx* germ cells

(カイコ生殖細胞における二種類のアンチセンス piRNA 生合成機構)

榊原 和洋

背景・目的

PIWI-interacting RNA (piRNA)は生殖組織に高発現する 23~30 塩基長の小分子 RNA であり、トランスポゾンの発現抑制を行う。piRNA の機能は生殖組織特異的 Argonaute タンパク質である PIWI タンパク質と複合体 piRISC を形成することで発揮されるが、piRNA の直接的な機能は相補的なトランスポゾン mRNA の認識および結合である。すなわちトランスポゾン抑制に直接的に働く piRNA は、トランスポゾン mRNA に対して逆鎖(アンチセンス鎖)由来のものに限られ、アンチセンス piRNA の生合成機構を理解することは重要であるといえる。生物はアンチセンス piRNA を作り出す方法を複数有しており、私はそのうち二種類の生合成機構に注目した。一つ目は piRNA クラスターと呼ばれるトランスポゾン断片の集積領域由来の転写物が成熟化を受け PIWI タンパク質と結合する一次経路。二つ目が一次経路で作られた piRISC により piRNA が増幅されるピンポンサイクルである。ピンポンサイクルは nuage と呼ばれる細胞質顆粒体で起こることが特徴である。

これらの生合成経路の分子メカニズム解明には、生殖細胞由来で唯一樹立されているカイコ卵巣由来培養細胞株 BmN4 が利用されている。BmN4 には Siwi, Ago3 の二種類の PIWI タンパク質が発現しており、一次経路とピンポンサイクルの二つの経路が機能している(図 1)。カイコ生殖細胞における piRNA 生合成は Siwi-piRNA の一次生合成から始まる。Siwi-piRISC はトランスポゾン mRNA を切断し、DEAD-box ヘリカーゼである Vasa がその切断産物を Ago3 へ積み込む。さらに成熟化を受けた Ago3-piRISC はトランスポゾンのアンチセンス転写物を切断し、その切断産物が Siwi-piRNA の前駆体として利用されると考えられている。

このようなモデルは、Siwi/Ago3 に結合する piRNA の情報学的解析によって確立されたが、その過程の分子メカニズムの詳細は理解されていなかった。そこで私は 1. 一次経路におけるアンチセンス piRNA 成熟化機構と 2. ピンポンサイクルにおける Ago3 依存的なアンチセンス piRNA 生合成機構の二つに注目し、その分子メカニズムを解明することを目指した。

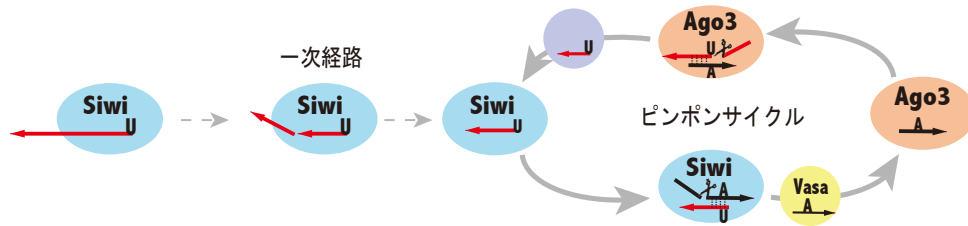


図 1. カイコ生殖細胞の piRNA 生合成機構

結果・考察

1. 一次経路においてエンドヌクラーゼ Zucchini (Zuc)がアンチセンス piRNA 成熟化を行う

先行研究により、piRNA 中間体と Apo 型 Siwi はミトコンドリア外膜上に局在する Papi というタンパク質上に集積することが明らかとなった。そこで私は Papi 上で piRNA の成熟化が起こると考え、それを担うヌクラーゼを同定することとした。Papi との相互作用を示すエンドヌクラーゼ Zuc をノックダウンすると成熟型 piRNA 量が減少し、中間体と思われる 70 塩基長ほどの RNA が蓄積することがわかった(図 2A)。さらに Papi, Siwi, Zuc の精製タンパク質を用いて *in vitro* 再構成実験を行ったところ、Zuc が 50 塩基長の RNA を成熟型 piRNA の長さである 30 塩基弱にまで切断することが明らかとなった(図 2B)。したがって、一次経路においてエンドヌクラーゼ Zuc がアンチセンス piRNA 成熟化を行うと結論づけた(図 2C)。

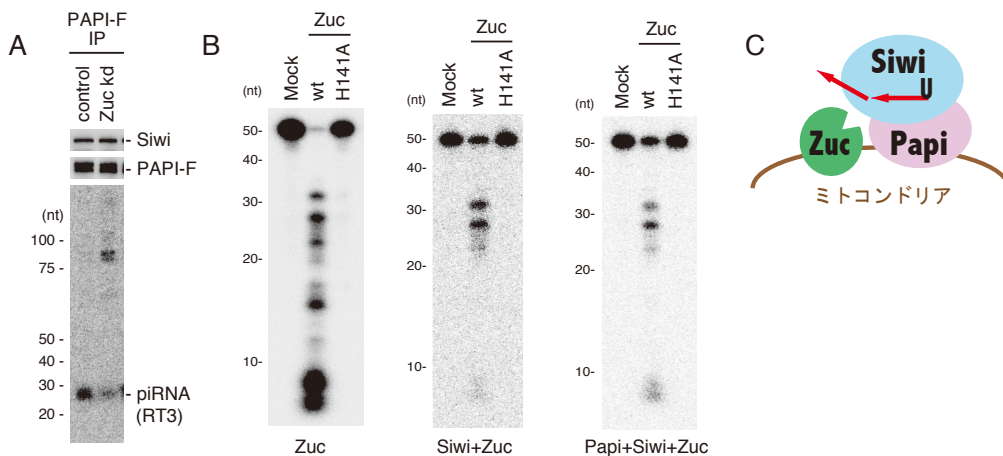


図 2. 一次経路における Siwi-piRNA 成熟化

A. Zuc knockdown(kd)で Siwi-piRNA 中間体が蓄積する. B. *in vitro* において、Zuc は Siwi,Papi 依存的に piRNA を成熟化する. C. Siwi-piRNA 成熟化モデル図

2. ピンポンサイクルにおいて Ago3-piRISC は Vreteno(Vret)による nuage 局在制御を受けながら、連続的に Siwi-piRNA 中間体を産生する

Ago3によるSiwi-piRNA産生機構の分子メカニズムを追うため、私はまずAgo3の結合因子であるVretに注目した。そしてAgo3ノックダウン時のSiwi-piRNAのデータ(Nishida et al., 2015)に基づくAgo3依存的(ピンポンサイクル依存的)なSiwi-piRNAのプローブを用いることでVretがAgo3依存的なアンチセンスpiRNA生合成に必須であることをノザンプロット法により明らかにした。さらにVretはAgo3-piRISC、Apo-Siwiと選択的に結合しnuageで共局在すること、Vret非存在下ではAgo3, Siwiがともに細胞質に拡散することを示した。これらの結果から、VretはAgo3-piRISCとApo-Siwiをnuageで係留することによってAgo3依存的なSiwi-piRNA生合成を促進していると結論づけた。

さらに詳しく Ago3 依存的な Siwi-piRNA 生合成を理解するために、Siwi ノックダウンによるピンポンサイクルの停止によりターゲット RNA 結合状態の AGo3-piRISC の単離を目指した。実際に Siwi ノックダウン条件下では Ago3 が nuage にて蓄積し、リン酸化を受けることが明らかとなった。そしてリン酸化 Ago3 に結合する RNA を調べると、16 塩基長の短い RNA と 50-100 塩基長の長い RNA を特異的に保持していた。シーケンス解析により両者とも Ago3-piRISC のターゲット RNA の一部であることがわかり、配列の末端位置を解析することで前者が副産物、後者が Siwi-piRNA 中間体であることが同定された。さらに興味深いことにその Siwi-piRNA 中間体は前駆体から連続的に産生されていることが示唆された。

以上をまとめると、ピンポンサイクルにおいて Ago3-piRISC は Vreteno (Vret) による nuage 局在制御を受けながら、連続的に Siwi-piRNA 中間体を産生すると結論づけることができた。(図3)

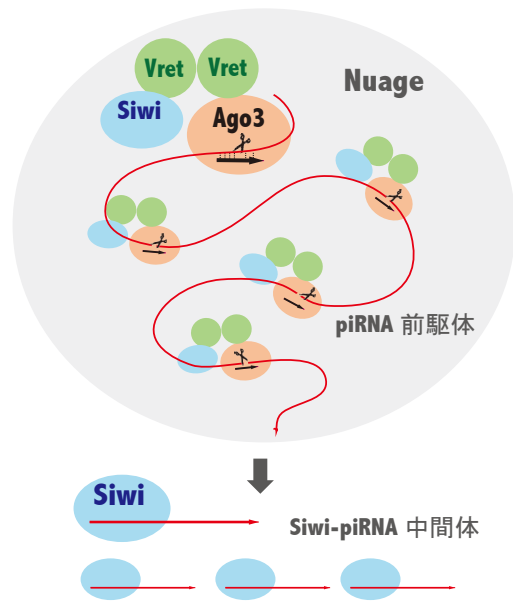


図 3. Ago3 依存的 Siwi-piRNA 中間体生合成機構

展望

本研究によって、一次経路とピンポンサイクルという二つの異なる経路由来のアンチセンス piRNA 生合成メカニズムの一端を解明することに成功した。その上で私が新たな興味を抱いているのが 1. もう一つの Vasa 様ヘリカーゼの同定、2. Siwi の状態の識別および制御の二点である。現在想定されているピンポンサイクルのモデルにおいて必須であり未同定因子が Ago3 によって切断された Siwi-piRNA 中間体を Siwi へ運ぶ Vasa 様のタンパク質である。Ago3 の機能を欠損させても Siwi-piRNA 量に変化が見られないため (Nishida et al., 2015)、Ago3 依存的な Siwi-piRNA 生合成を評価することが難しく、ピンポンサイクルの後半はほとんど研究がなされていなかった。しかし本研究によって特異的なプローブを用いることで Ago3 依存的な Siwi-piRNA が評価できることや、Ago3-piRISC の機能を補助する新規因子 Vret が同定されたことにより、研究の足がかりができたと言える。今後本研究が生かされ、目的因子が同定されることを期待している。

Siwi は一次経路でもピンポンサイクルでも必要とされ、Apo 型・piRISC 型二つの状態で存在する。また Vasa に結合する Siwi は piRISC 型であること (Nishida et al., 2015)、Vret に結合する Siwi は Apo 型であること (本研究) から、細胞内では最適な状態の Siwi が認識・選択されていることが示唆される。効率的な piRNA 生合成のために正しい Siwi の状態の識別および制御は非常に重要であると考えられるがそれを下支えする分子メカニズムは不明である。PIWI タンパク質と同一ファミリーに属する AGO タンパク質は小分子 RNA と結合することで大きな構造変化を起こすことが構造生物学的に示されていることから、Apo 型から piRISC 型の移行の際に PIWI タンパク質の相互作用面がダイナミックに変化する可能性が考えられる。構造生物学研究者との共同研究により上記の謎に迫ることは非常に有意義かつ魅力的なことであると考えられる。