

論文の内容の要旨

Siwi cooperates with Par-1 kinase to resolve the autoinhibitory effect of Papi
for Siwi-piRISC biogenesis
(Siwi-piRISC 生合成において Siwi はリン酸化酵素 Par-1 と協調して
Papi の自己抑制効果を解除する)

山田紘実

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 piRISC (piRNA-induced silencing complex) 複合体を形成し、トランスポゾンの発現を抑制することで、生殖組織のゲノムの品質を管理する。piRNA の機能損失は、生殖組織のゲノムの不安定化を導き、不妊を引き起こすことが知られており、遺伝情報を次世代に正確に伝える必要のある生物にとって、piRNA によるトランスポゾンの抑制機構は非常に重要である。私は、現在唯一樹立されている生殖細胞由来の培養細胞である、カイコ卵巣由来の細胞株 BmN4 を用いて piRISC 生合成機構の理解を目指し研究を進めている。BmN4 細胞において、まず piRNA 前駆体は細胞質で段階的なプロセッシングを受け、カイコ PIWI メンバー Siwi と結合することによって Siwi-piRISC 前駆体となる。この前駆体を持つ piRNA 前駆体は成熟化 piRNA と比べ 3' 末端に余分な塩基を有するが、これはミトコンドリア局在型 RNA 切断酵素 Zucchini (Zuc) や Trimmer (Trim) によって切り落とされる。最近の研究から、この Zuc および Trim による piRISC 成熟化反応は、Zuc や Trim と同様にミトコンドリア表面に局在する Tudor ドメインタンパク質 Papi を足場として起こることが明らかになった。Papi は Tudor ドメインの他、RNA と結合する KH ドメイン及び C 末端領域の補助ドメインから構成される。piRNA 成熟化反応では、(1)まず Papi が Tudor ドメインを介して対称的ジメチル化 (sDMA) 修飾を受けた Siwi に相互作用し、これを機に(2)Siwi が piRNA 中間体の 5' 末端を認識して結合、piRISC 中間体が形成され、その後(3)Papi が piRNA 中間体の 3'

末端領域に KH ドメインを介して結合することも分かっている。興味深いことに、この 3 つ目の反応、つまり Papi と piRNA 中間体の結合は Papi のリン酸化修飾依存的であることも分かっている。しかし、その修飾残基や責任因子、さらには本機構の制御メカニズムは不明である。そこで本研究では、BmN4 細胞を用いた様々な生化学的解析を進めることにより、Papi のリン酸化修飾の制御機構および RNA 結合能の制御機構を解明することを目的とした。

初めに、Papi のリン酸化修飾残基を同定するため、BmN4 細胞から単離精製した Papi を質量分析に供したところ、Papi は 4 箇所のセリン残基においてリン酸化修飾を受けることが示唆された。これらのセリン残基をアラニンに置換したところ、S547A 変異体においてリン酸化が低下する傾向が見られた。また、S547A 変異体は野生型と異なり非常に弱い RNA 結合能を示し、内在性 Papi の欠損による piRNA 産生の低下を回復しないことも判明した。このことから Ser547 のリン酸化修飾が Papi の RNA 結合能の獲得および piRNA 生合成に必要であると結論づけた。

次に、Papi を標的とするリン酸化修飾酵素の同定を試みた。細胞質局在を示す Papi のミトコンドリア局在シグナルを欠失した変異体 (Δ MLS 変異体)では、リン酸化の程度が減少することが示された。そのため、リン酸化修飾酵素は Papi と同様、ミトコンドリアに局在すると考えられたため、まず BmN4 細胞からミトコンドリアを分画精製し、非リン酸化 Papi に対し *in vitro* リン酸化アッセイを行ったところ、活性が見られた。この画分から Papi と共沈するタンパク質を回収し、ショットガン MS 解析を行ったところ、6 つの候補因子が得られた。BmN4 細胞で各因子を欠失させ Papi のリン酸化状態を調べたところ、Par-1 を欠失した条件下においてのみ Papi のリン酸化が低下し、piRNA 生合成量が減少した。Par-1 は KIN2/PAR-1/MARK ファミリーに属する Ser/Thr キナーゼで、酵母からヒトに至るまで広く保存されている。Par-1 欠失による Papi のリン酸化の減少が Ser547 のリン酸化の減少によるものであるかを検証するため、Ser547 のリン酸化を特異的に認識する抗 Papi-pS547 モノクローナル抗体を作製し、Par-1 欠失条件下におけるリン酸化状態を調べた結果、Ser547 はリン酸化されていなかった。また、Par-1 を欠失した条件では、piRNA 産生の低下が見られた。これらの結果から、Par-1 は Par-Ser547 のリン酸化酵素であることが明らかとなった。

続いて Par-1 による Papi-Ser547 のリン酸化修飾の制御機構の解明を試みた。抗 Papi-pS547 モノクローナル抗体を用いて Papi の Δ MLS 変異体のリン酸化状態を検証した結果、Ser547 はリン酸化を受けていなかったため、Papi-Ser547 はミトコンドリア上でリン酸化されることが明らかとなった。しかしながらマウスやショウジョウバエなどの先行研究から、Par-1 は細胞質局在タンパク質であることが報告されていたため、BmN4 細胞での細胞内局在を調べた結果、他の種と同様に細胞質に局在していることが判明した。このことから、Par-1 は他の因子によって細胞質から Papi が局在するミトコンドリア上に誘導されていると予想され、Par-1 を誘導する因子として Siwi を考え、その仮説を検証した。Siwi を欠失させ

た状態で Papi と Par-1 の相互作用が欠失したこと、内在性 Papi のリン酸化が S547A 変異体と同様に減少することが示された。また、細胞質で Par-1 は Siwi と相互作用することが判明した。これらの結果から、Par-1 は Siwi によってミトコンドリア上に誘導され、Papi-Ser547 をリン酸化していることが明らかとなった。

最後に、Papi の RNA 結合能の制御機構を明らかにするため、Papi の部位欠失変異体を作製し、Siwi との相互作用と RNA 結合を解析した。KH ドメインのみを持つ Papi1-222 変異体は、Siwi と相互作用しないが RNA を結合することが明らかとなった。結合する RNA の配列を CLIP-seq により検証したところ、1-222 変異体は野生型と比較して piRNA 前駆体との結合率が優位に減少していたことから、Papi の Tudor ドメインと補助ドメインは結合する RNA の特異性を制御していることが示唆された。また、補助ドメインのみを欠失した Papi1-480 変異体では、Siwi とは相互作用するものの、RNA との結合は見られなかった。これらの結果から、Papi の RNA 結合は Siwi との相互作用のみならず、補助ドメインも必要であることが明らかとなった。

本研究の成果に基づき、Siwi-piRISC 生合成に必要な Papi の RNA 結合能は、Tudor ドメインを介した Siwi との相互作用と Par-1 による C 末端補助ドメインのリン酸化という 2 つの反応によって制御されているというモデルを提唱する。まず、piRNA 前駆体をロードした pre-Siwi-piRISC は、sDMA 修飾依存的に Papi の Tudor ドメインと相互作用する。この結合は、Papi KH ドメインに piRNA 前駆体を供給すると共に、Par-1 による Papi C 末端補助ドメインの Ser547 のリン酸化を促進し、このリン酸化修飾により Papi KH ドメインの RNA 結合能を高められる。以上のように、Siwi-piRISC 生合成に必要な Papi KH ドメインの RNA 結合能は、Tudor ドメインを介した Siwi との相互作用と Par-1 による補助ドメインのリン酸化という 2 つの反応が協調することで、もともとは分子内で抑制されている RNA 結合能が解除されているという制御メカニズムが明らかとなった。

このモデルによる Papi の RNA 結合能の制御は、Papi の構造的な変化によってもたらされている可能性が考えられる。この仮説を検証するために、さらなる解析として、Cryo/EM などを用いた Siwi-Papi 複合体の構造解析により Papi のリン酸化・非リン酸化状態で構造の変化が見られるかを明らかにしたい。