

## 130. piRNA 生合成因子 Maelstrom の分子機能解明

佐藤 薫

Key words : piRNA, Maelstrom, Transposon,  
RNA サイレンシング, 生殖細胞

\*東京大学 大学院理学系研究科  
生物化学専攻

### 緒 言

20 から 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<sup>1)</sup>。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<sup>1,2)</sup>。piRNA の多くは、ゲノム上の転移因子 (Transposable element: TE)、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<sup>3)</sup>。

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、それを素にしてできた 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)<sup>3,4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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。

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<sup>5,6)</sup>。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 (図 1)。

そこで本研究では、まず、BmN4 から HIT-CLIP 法を用いて Mael の HMG 様ドメインと相互作用している RNA を単離し、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 (①)。また、免疫沈降法を用いて Mael と相互作用しているタンパク質を単離し、Mael を中心とした機能性複合体を明らかにする (②)。

## 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 を単離した。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 の単離を行った。

### 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、シグナルを検出した。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した。その後、質量分析 (MS) 解析を行うことで、その分子を同定した。

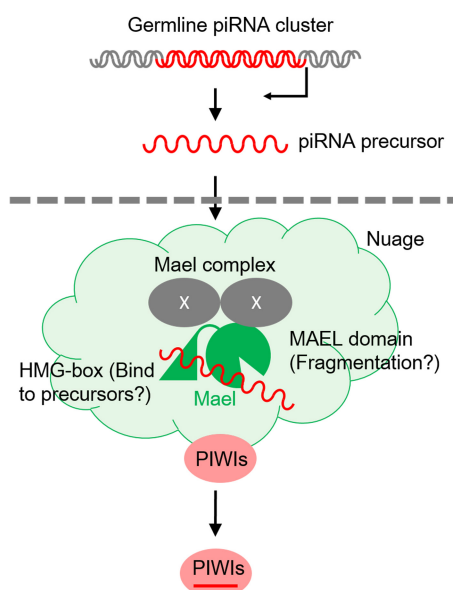


図 1. Mael の分子機能モデル。

Mael は piRNA 生合成経路において、HMG ドメインを介して RNA (piRNA 前駆体?) をつかみ、MAEL ドメインによりプロセッシング (断片化) を行っていると考えられる。Nuage は生殖細胞における piRNA 因子の局在する細胞内顆粒体を示す。Nuage は piRNA 生合成の場であると考えられている。

## 結果

### 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、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 法を行うに当たり、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 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。

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 生合成に関与する BmSpn-E, BmQin が含まれていた（図 2）。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、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。

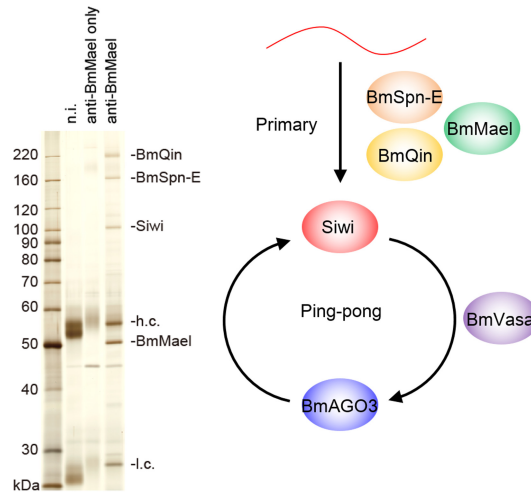


図 2. Mael 複合体の同定.

左) 抗 Mael 抗体を用いた免疫沈降。右) BmN4 における piRNA 生合成経路と BmMael の作用ポイント。BmMael はプライマリー経路において、BmSpn-E や BmQin とともに Siwi の piRNA の生合成に関与すると考えられる。

## 考 察

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目指した。具体的に、①HIT-CLIP 法を用いた Mael の HMG 様ドメイン相互作用 RNA の解析、②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、①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、ライブラリー作製に必要な 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、②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<sup>8)</sup>。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。

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. : Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10** : 126-139, 2009.
- 2) Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. & Aravin, A. A. : PIWI-interacting small RNAs : the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12** : 246-258, 2011.
- 3) Gunawardane, L. S., Saito, K., Nishida, K. M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M. C. : A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*, **315** : 1587-1590, 2007.
- 4) Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R. & Hannon, G. J. : Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, **128** : 1089-1103, 2007.
- 5) Matsumoto, N., Sato, K., Nishimasu, H., Namba, Y., Miyakubi, K., Dohmae, N., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, M. C. & Nureki, O. : Crystal structure and activity of the endoribonuclease domain of the piRNA pathway factor maelstrom. *Cell Rep.*, **11** : 366-375, 2015.
- 6) Sato, K. & Siomi, M. C. : Functional and structural insights into the piRNA factor Maelstrom. *FEBS Lett.*, **589** : 1688-1693, 2015.
- 7) Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M. & Tuschl, T. : PAR-CLIP--a method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins. *J. Vis. Exp.*, **41** : 2034, 2010.
- 8) Nishida, K. M., Iwasaki, Y. W., Murota, Y., Nagao, A., Mannen, T., Kato, Y., Siomi, H. & Siomi, M. C. : Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in Bombyx germ cells. *Cell Rep.*, **10** : 193-203, 2015.