

137. カイコ生殖細胞を用いた piRNA 生合成経路の解明

西田 知訓

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

Key words : piRNA, PIWI タンパク質, ミトコンドリア, 生殖細胞

緒言

piRNA は、生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA である。piRNA は、PIWI タンパク質と複合体を形成することで、標的であるトランスポソンの発現抑制をする。piRNA は、第一次経路と第二次経路により生成されることが知られている。しかし、それら経路の詳細な生成過程については未だ不明な点が多く存在する¹⁾。多くの piRNA 生合成関連因子が同定されており、それら因子は核周辺の細胞質で Nuage と呼ばれる顆粒体構造を形成しており、その顆粒体で piRNA 生合成が行われていると考えられている²⁾。

カイコ卵巣由来生殖細胞の培養細胞株である BmN4 は、piRNA 生合成経路を解析する上で有効なツールである。BmN4 では、Siwi と BmAgo3 の 2 種類の PIWI タンパク質が発現しており、piRNA との結合も見られている³⁾。zQin は、Zinc finger ドメインと TUDOR ドメインを有し、マウスからカイコまで広く保存された遺伝子で piRNA 生合成に必須な因子として同定された。これまでのショウジョウバエを用いた解析から、Qin の TUDOR ドメインは PIWI 及び Spn-E との結合に必要な領域であることが報告されている⁴⁾。当研究室の BmN4 を用いた解析からも、TUDOR ドメインが Siwi 及び BmSpn-E との結合に必要な領域であることを確認した。しかし、Qin が Nuage に局在するために必要なドメインは分かっていない。以前から、piRNA 生合成経路において Nuage とミトコンドリアに関連性があることが知られていた^{5,6)}。しかし、ミトコンドリア上でどのように piRNA が生成されていくのかはよく分かっていない。

本研究では、BmN4 細胞を用いて piRNA 生合成経路に必要な BmQin の機能及びミトコンドリア局在因子 BmPAPI の piRNA 生合成経路への関与について生化学的な解析を行うことで、piRNA 生合成経路の解明を試みた。

方法および結果

1. Nuage 局在に必要な BmQin のドメインの同定及び CLIP 法を用いた BmQin と BmSpn-E の RNA 結合能の解析

BmQin のそれぞれのドメインを欠失した Flag タグ付加変異体を作製し、BmN4 細胞で強制発現させた後に、抗 Flag 抗体と BmSpn-E 抗体を用いた免疫蛍光染色法により細胞内での BmQin の局在変化をコンフォーカル顕微鏡で観察した。野生型 (wt) の BmQin は、多数の Nuage で BmSpn-E と共局在することを確認した。一方、TUDOR ドメイン欠失変異体 (1-500) では、Siwi と複合体を形成できず BmQin が Nuage に局在できなかった。さらに、予想に反して、Zinc finger ドメイン欠失変異体 (501-1700) は、Siwi や Spn-E と相互作用しているにも関わらず、Nuage に局在することができなかった。Spn-E も Nuage に局在がみられなかった (図 1)。

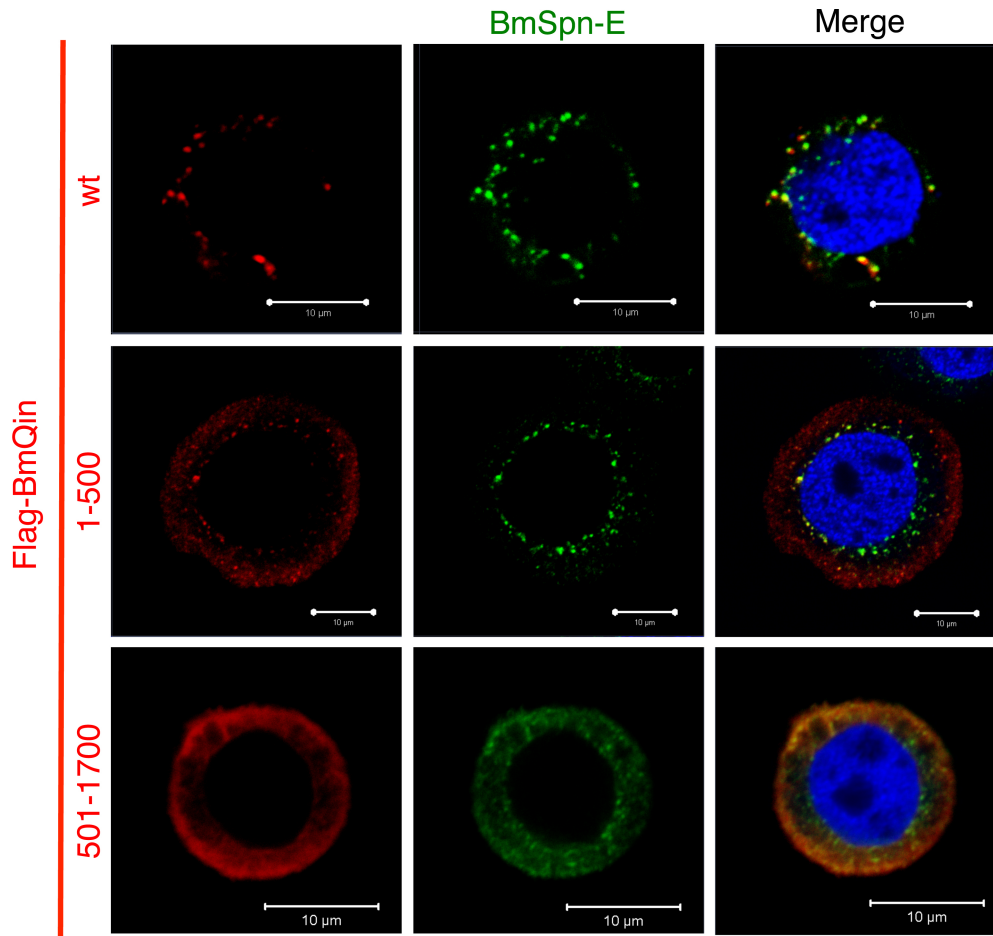


図1. Nuage局在に必要なBmQinのドメイン

Flag抗体とBmSpn-E抗体を用いた共免疫蛍光染色。野生型(wt)はBmSpn-EとNuageで共局在する。TUDOR欠失変異体(1-500)とZinc finger欠失変異体(501-1700)はNuageに局在することができない。

次に、それぞれのBmQinとBmSpn-E抗体を用いて、BmN4からCLIP法によりRNA結合能を検討した。BmQinとBmSpn-Eそれぞれで、弱いながらもRNAのシグナルを検出されることが判った。

2. ミトコンドリア局在因子PAPIの機能解析

PAPIは、RNA結合能を持つKHドメインとTUDORドメインそしてミトコンドリア局在シグナル(MLS)を有する因子である(図2A) [5](#))。カイコを用いた解析から、PAPIはTUDORドメイン依存的にSiwiと結合することが分かっていた [6](#))。抗PAPI抗体を作製し、BmN4の抽出液から免疫沈降法によりPAPI複合体を生成し、SDS-PAGEで展開後Western blot法でPAPIとSiwiの相互作用及びRNAの5'末端RIラベルによりpiRNAとの結合量を確認した。Western blotの結果、予想通りに、PAPIは、Siwiと相互作用していることが判った。さらに、この複合体には、piRNAの末端形成に関わるミトコンドリア局在因子のヌクレアーゼZucも含まれていることが明らかになった。PAPIに結合したSiwiは、Siwi単独を免疫沈降した時と比較して成熟型piRNAと10%程度しか結合していないことが判明した。さらに、この複合体には、piRNA前駆体様のシグナルが検出された(図2B)。ZucをノックダウンしたBmN4からPAPI抗体で精製した複合体には、piRNA前駆体様のシグナルが増加することが明らかになった(図2C)。

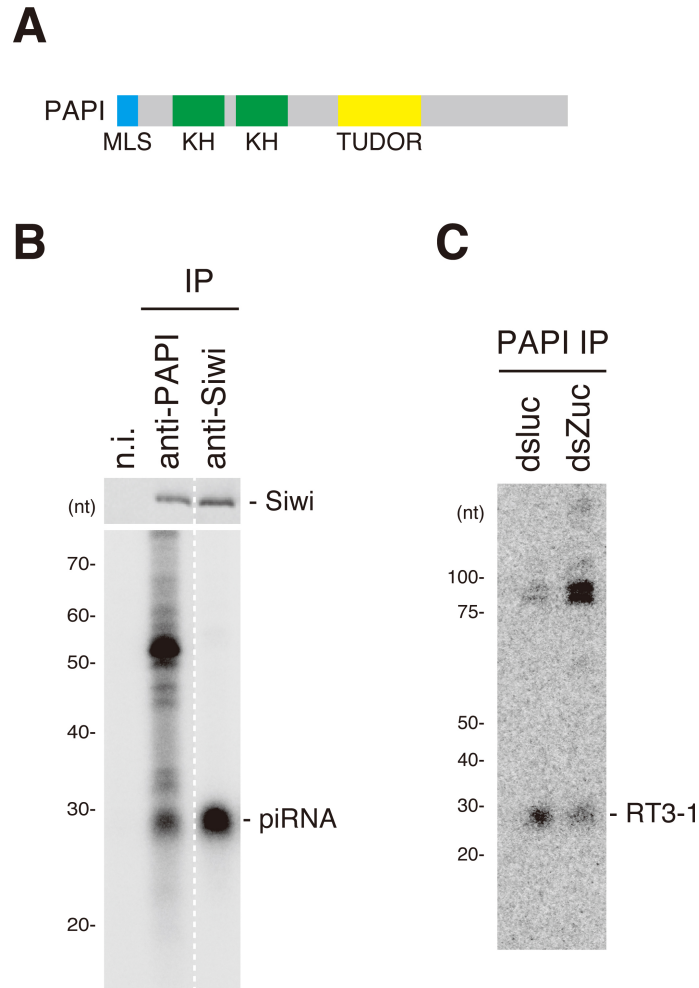


図2. PAPI 複合体には piRNA 中間体が load される

(A) PAPI のドメインマップ。

(B) PAPI 複合体に含まれる Siwi は成熟型 piRNA とほぼ結合していない。

(C) Zuc ノックダウンにより PAPI 複合体に piRNA 中間体が蓄積する。

考 察

本研究では、カイコの生殖細胞由来培養細胞株 BmN4 を用いて、piRNA 生合成経路の解明を試みた。piRNA 生合成経路に必要な BmQin 及び BmSpn-E は、CLIP 法を用いた解析により、RNA と結合していることが判明した。これらの RNA は、成熟化される前の piRNA 中間体であると考えられる。そのため、今後 CLIP 法により得られた RNA を次世代シーケンス後バイオインフォマテック解析を行うことでどのような種類の RNA そしてどの領域の RNA と結合しているかが明らかになると考えられる。

BmQin が Nuage に局在するためには Zinc finger そして TUDOR ドメインの両方が必要であることが判った。今後、内在の BmQin をノックダウン後これら変異体を強制発現し、piRNA 生合成がレスキューされるかを明らかにすることにより、piRNA 生合成経路で重要なドメインを明確にできる。

次に、PAPI が Siwi と Zuc と複合体を形成し、その複合体には piRNA 中間体が含まれることが判明した。さらに Zuc のノックダウンにより、piRNA 中間体が増加することから、ミトコンドリア上の PAPI を基盤として piRNA 生合成が生じているモデルが示唆された。

更なる解析を進めることにより piRNA 生合成における Nuage とミトコンドリアの関連性を明らかにしていくことができると期待される。

文 献

- 1) Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:405-33. PubMed PMID:25747396
- 2) Nagao A, Sato K, Nishida KM, Siomi H, Siomi MC. Gender-specific hierarchy in nuage localization of PIWI-interacting RNA factors in *Drosophila*. *Front. Gene.* 2011, 2:55. PubMed PMID:22303351
- 3) Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y, Abe H, Sugano S, Tomari Y, Shimada T, Katsuma S. The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA.* 2009 15:1258-64. PubMed PMID:19460866
- 4) Anand A, Kai T. The tudor domain protein kumo is required to assemble the nuage and to generate germline piRNAs in *Drosophila*. *EMBO J.* 2012 31:870-82. PubMed PMID:22157814
- 5) Honda S, Kirino Y, Maragkakis M, Alexiou P, Ohtaki A, Murali R, Mourelatos Z, Kirino Y. Mitochondrial protein BmPAPI modulates the length of mature piRNAs. *RNA.* 2013 19:1405-18. PubMed PMID:23970546
- 6) Izumi N, Shoji K, Sakaguchi Y, Honda S, Kirino Y, Suzuki T, Katsuma S, Tomari Y. Identification and Functional Analysis of the Pre-piRNA 3' Trimmer in Silkworms. *Cell.* 2016 164:962-73. PubMed PMID:24696451