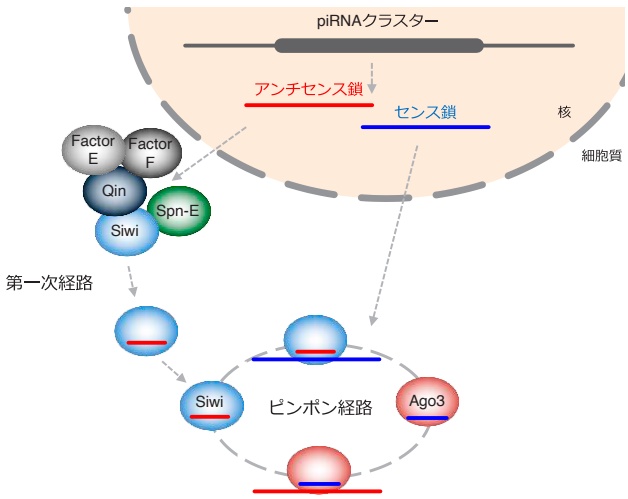
147　カイコpiRNA生合成経路因子Qin及びSpn-Eの機能解析	西田　知訓

【目的】piRNA（PIWI-interacting RNA）は、生殖細胞特異的に発現し、PIWI タンパク質と piRISC（piRNA-induced silencing complex）を形成し、トランスポゾン mRNA の発現を抑制する。piRNA は、始めに第一次生成経路で生成され、ピンポン経路で増幅される。piRNA の前駆体は、piRNA クラスターと呼ばれるゲノム領域から転写される。これまでに piRNA 生成経路に関与する因子は多数同定されてきた。しかし、これら因子の piRNA 生成経路における詳細な分子機能については未だよく判っていない。私は、カイコ卵巣生殖細胞由来である培養細胞 BmN4 を実験材料として用い、piRNA 生成経路の解明を試みた。カイコでは、2 種類の PIWI タンパク質（Siwi と Ago3）が piRNA と結合し、piRNA 生成経路も保存されている。これまでの解析から、Spn-E が第一次生成経路に関与し、Siwi と Qin とともに複合体を形成することを示した。さらに、Spn-E と Qin は第一次生成経路で異なる piRNA の生成を制御していることが示唆された。しかし、Spn-E と Qin は同じ複合体を形成するにも関わらず、異なる piRNA の生成で機能する仕組みは判らなかった。そこで、Spn-E と Qin による異なる piRNA を生成する仕組みを明らかにすることを目的とした。

【方法】piRNA の前駆体と結合すると考えられる Spn-E および Qin に対する抗体を用いた iCLIP 法により、piRNA 前駆体の種類の同定を試みた。また、Qin のノックダウンにより、piRNA 前駆体が蓄積することが示唆された。この piRNA 前駆体を同定することにより、piRNA 前駆体の塩基長及び特徴を明らかにできると考えられた。さらに、Spn-E 抗体及び Qin 抗体を用いた免疫沈降法により精製し、ショットガン分析によって網羅的に同定した。Spn-E 及び Qin と結合する新規因子は piRNA 生合成経路に関わるのかを明らかにするため、それら因子を RNAi でノック ダウンした BmN4 細胞を用いて piRNA 量やトランスポゾンの発現量をノザン解析及び qRT-PCR 法により網羅的にスクリーニングを試みた。

【結果】それぞれの抗体を用いて免疫沈降を行い、ショットガン解析を試みた。その結果、それぞれ約 300 因子が得られた。二段階のスクリーニングを行い、RNA 結合能または核酸結合能を持つ因子を更に 11（Qin 結合因子）と 15（Spn-E 結合因子）個選別した。これらの因子に対するノックダウンを行い、ノーザンブロット法を用いて piRNA の生成量を確認した。その結果、2 因子について、piRNA の量の劇的な減少が見られた。2019 年に Kawamoto らが報告した論文により、詳細にカイコゲノムが読まれ、データベースが整備された。そこで、私は、Siwi に結合する piRNA を新しいゲノム配列にマップすることで、piRNA クラスターの同定を試みた。その結果、2 つの染色体の一部の領域で、piRNA が多数マップされることが判った。おそらく、これらの領域から piRNA 前駆体が転写されていると考えられた。Spn-E および Qin 抗体を用いた iCLIP 法で得られた結果は解析中である。

カイコ piRNA 生合成経路



147. カイコ piRNA 生合成経路因子 Qin 及び Spn-E の機能解析

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，Qin, Spn-E，トランスポゾン，生殖細胞

緒　言

生殖細胞は、卵子と精子に分化し、染色体の組み合わせにより多様な子孫を作る。生殖細胞の異常な分化は、次世代に重篤な悪影響を及ぼすため、有性生物にとっては致命的である。この重篤な悪影響を及ぼす原因の1つとして、トランスポゾンの無作為な転移による遺伝子破壊が挙げられる。そのため、生物はトランスポゾンの発現を抑制する機構を進化させてきた。生殖細胞特異的に発現する25〜30塩基長のpiRNAは、PIWIタンパク質とpiRISCを形成し、piRNAの配列に相補的なトランスポゾンmRNAの発現を転写段階または転写後段階で抑制し、生殖ゲノムを守っている［1］。piRNAは、始めに第一次経路で生成された後、ピンポン経路で増幅される。piRNAの素となるpiRNA前駆体は、ゲノム上でトランスポゾン断片が挿入されたpiRNAクラスターと呼ばれる領域から転写される。これまでにpiRNA生成経路に関与する因子は多数同定されてきた。しかし、これら因子のpiRNA生成経路における詳細な分子機能については未だよく判っていない。

私は、カイコ卵巣由来の生殖細胞から樹立した培養細胞であるBmN4を実験材料として用い、piRNA生成経路の解明を試みた。カイコでは、2種類のPIWIタンパク質（SiwiとAgo3）がpiRNAと結合し、piRNA生成経路も保存されている［2］。これまでに、ピンポン経路においてSiwi-piRISCからAgo3へのpiRNA中間体（piRNA前駆体とpiRNAの　中間産物）の受渡しにRNAヘリカーゼであるVasaが必要であることを*in vitro*アッセイ系を用いた解析から示し［3］、Vasaがピンポン経路で重要な員であることが判明した［3，4］。さらに、ミトコンドリア局在因子であるPapiとエンドヌクレアーゼであるZucの機能により、ミトコンドリア上でpiRNA中間体からpiRNAが生成される新規piRNA生成経路のモデルを提唱した［5］。しかし、もう一つの経路である第一次経路については、どの因子がどのように機能してpiRNAを生成するのかは、ほとんど判っていなかった。

これまでに行った解析から、Spn-Eが第一次経路に関与し、SiwiとQinとともに複合体を形成することを示した［3］。Spn-Eは、ショウジョウバエやマウスにおいてpiRNA生成に重要な因子であることが判っているが［6］、分子機能については不明であった。Qinは、ショウジョウバエでピンポン経路で機能することは報告されていたが［7］、第一次経路で必要であるのかは不明であった。私が、SiwiをノックダウンしたBmN4でRNA seqを行ったところ、顕著に発現上昇が見られる新規LTR様トランスポゾンCountdown（Cd）を同定した。また、Qinは、Cd由来piRNAの生成に関与し、Cd mRNAの発現を抑制するために重要であることが判った。一方、Spn-Eは、Cd由来piRNAの生成に影響は無いが、その他のトランスポゾン由来piRNAの生成に関与した。つまり、Spn-EとQinは第一次経路で異なるpiRNAの生成を制御していることが示唆された。しかし、Spn-EとQinは同じ複合体を形成するにも関わらず、異なるpiRNAの生成で機能する仕組みは判らなかった。そこで、Spn-EとQinに特異的に結合する新規因子およびpiRNA前駆体を同定することで、同じ複合体を形成するにも関わらず、異なるpiRNAを生成する仕組みを明らかにすることを目的とした。

方　法

1.　QinまたはSpn-Eに結合する新規piRNA生合成経路因子の同定

Qin または Spn-E と特異的に結合する因子を同定することは、第一次経路の詳細を解明するために有効な手段である。複合体を形成する前に Spn-E または Qin と特異的に結合する新規因子を免疫沈降法により精製し、質量分析によって網羅的に検索し同定した。新規因子を RNAi でノックダウンした BmN4 細胞を用いて piRNA の発現量をノーザンブロット法により検討した。

2.　新規トランスポゾンpiRNAが由来するpiRNAクラスターの検索

私の先行研究により、Cd 由来の piRNA が生成されることが判った。そのため、ゲノム内には、Cd 断片を含んだ piRNA クラスターが存在すると推測された。しかし、カイコのデータベースが整備されておらず、piRNA クラスターについての解析は進んでいなかった。最近、カイコのゲノム配列が詳細に読まれ、未知のゲノム領域が明らかになった［8］。ショウジョウバエやマウスの解析から、piRNA クラスターは多種のトランスポゾンが混在している領域であることが判っている。そこで、これまでに得られた piRNA の情報と本研究で得られる piRNA 前駆体の情報を統合し、バイオインフォマティクス解析を行った。

3.　Spn-EまたはQinに結合するpiRNA前駆体の同定

Spn-E 抗体または Qin 抗体を用いた iCLIP 法により Spn-E と Qin のそれぞれが RNA と結合することを明らかにした。しかし、piRNA 前駆体のどのような種類そして、どれくらいの塩基長が結合しているのかは不明であった。また、これら因子がどのようにして、piRNA 前駆体を認識しているのかは謎である。本研究では、piRNA 前駆体の種類そして結合部位については抗体を用いた iCLIP 法を行った。piRNA 前駆体の塩基長については Qin をノックダウンした BmN4 細胞から抽出した total RNA を用いたノーザンブロット法、または次世代シーケンサの使用とバイオインフォマティクス解析により、piRNA 前駆体の特徴を同定する。

結　果

1.　Qin または Spn-E に結合する新規 piRNA 生合成経路因子の同定

Spn-E と Qin は、同じ複合体を形成するにも関わらず、異なる piRNA を生成することがわかった。しかし、この異なる仕組みが未だ明らかになっていないため、この複合体形成よりも上流過程で Qin または Spn-E に結合する新規 piRNA 生合成経路因子の同定を試みた。コントロールまたはそれぞれの因子を RNAi でノックダウンしたサンプルから、それぞれの抗体を用いて免疫沈降を行い、ショットガン解析を試みた。その結果、それぞれ約 300 因子が得られた。一段階目のスクリーニングとして、これら因子をノックダウンしたサンプルと比較して、タンパク質の量比のスコアが 1.5 以上ある因子をそれぞれ 56（Qin 結合因子）と 71（Spn-E 結合因子）個抽出した。二段階目の スクリーニングとして、RNA 結合能または核酸結合能を持つ因子を更に 11（Qin 結合因子）と 15（Spn-E 結合因子）個選別した（図 1）。これらの因子に対する dsRNA を作製し、BmN4 細胞を用いた RNAi 法によりノックダウンを行い、ノーザンブロット法を用いて piRNA の生成量を確認した。その結果、2 因子（タンパク質 E と F）について、RT3 piRNA の量に変化が見られないが、CD piRNA の量の劇的な減少が見られた（図 2）。

2.　新規トランスポゾン piRNA が由来する piRNA クラスターの検索

カイコのデータベースは、整備されておらず不完全なゲノム配列しか判っていなかった。そのため、piRNA の基となる piRNA 前駆体を転写する piRNA クラスターを同定することは、非常に困難であった。最近、Kawamoto らが報告した論文により、詳細にカイコゲノムが読まれ、データベースが整備された。そこで、私は、Siwi に結合する Cd piRNA を新しいゲノム配列にマップすることで、Cd piRNA クラスターの同定を試みた。その結果、2 つの染色体の一部の領域で、Cd 断片が挿入されており、piRNA がマップされることが判った。おそらく、これらの領域から piRNA 前駆体が転写されていると考えられた。

3. Spn-EまたはQinに結合するpiRNA前駆体の同定

Spn-E および Qin 抗体を用いた iCLIP 法を行い、結合する RNA の cDNA ライブラリーを作製して、イルミナ社の miseq で deep sequence を行った。現在、得られた結果を解析中である。

Qin をノックダウンした BmN4 細胞から抽出した total RNA を用いたノーザンブロット法を行った結果、5,000 nt の位置にアンチセンス鎖の Cd のバンドが検出された。このバンドを同定するために、total RNA をアガロースゲルで泳動後、RNA 抽出キットを用いて、目的サイズを精製した。精製効率を確認するために、このサンプルと total RNA を用いて、ノーザンブロット法を行った。しかし、total RNA では Cd RNA のバンドが検出されるが、精製したサンプルではバンドが消失した。この Cd のバンドが RNA であることを明らかにするために、RNaseA または DNase I 処理を行ったところ、RNase 処理ではバンドが消えず、DNase 処理で消失することが判った。この結果より、Cd mRNA を基に逆転写酵素により逆転写されたアンチセンス鎖の cDNA が、mRNA とアニーリングした状態であることから、RNA と一緒に total RNA に含まれていたと考えた。

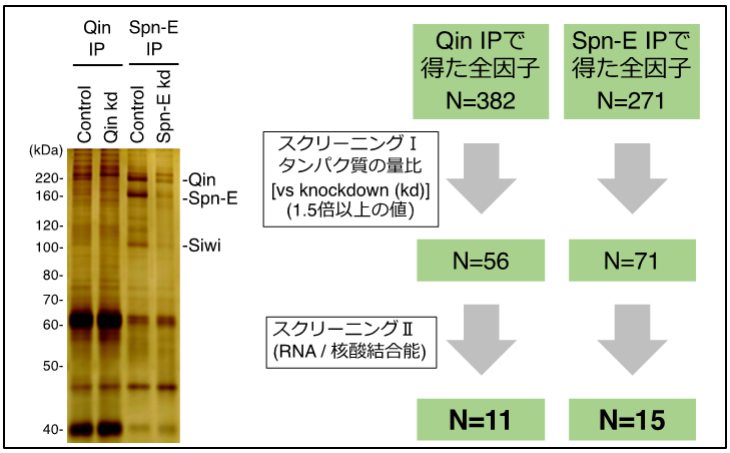


図 1. 相互作用因子のスクリーニング

コントロール、Qin kd、そして Spn-E kd の BmN4 から、Qin 又は Spn-E 抗体を用いて、免疫沈降を行い、ショットガン解析を行った。得られた結果を、2 段階のスクリーニングにより新規 piRNA 生合成因子の候補を選別した。

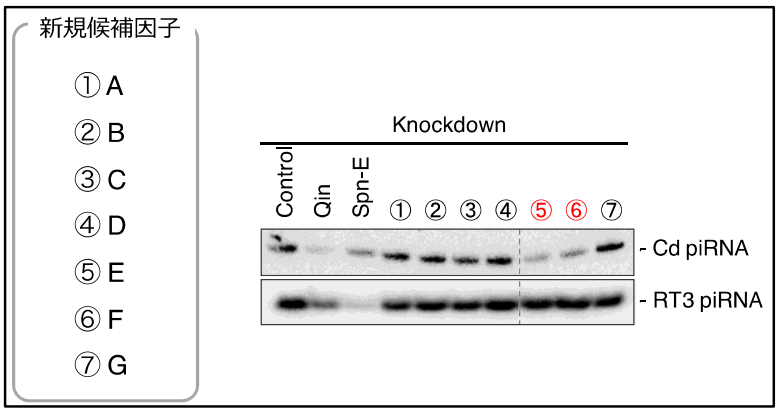


図 2. 新規因子 E と F は Cd piRNA の生成に関与する

それぞれの新規因子についてノックダウンした BmN4 細胞から抽出した total RNA を用いて、Cd piRNA と RT3 piRNA に対するノーザンブロット解析を行った。

考　察

本研究で、piRNA 生合成に関与する新規因子を同定するに至った。更に、カイコの Cd piRNA クラスターと推測されて領域の情報も得ることができた。これら因子の生化学的機能を明らかにすることで、piRNA 生合成経路を更に明らかにすることができると考える。

現在、同定した新規 piRNA 生合成因子の機能を明らかにするため、トランスジーンを用いた生化学的解析を試みている。更に、内在の同定された新規因子の機能を解析するために、抗体作製そして作製した抗体を用いた生化学的解析を進める予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である東京大学大学院理学系研究科塩見研究室の修士過程 2 年生鍛治屋麻子氏に感謝いたします。さらに、研究を進めるに当たって、討論や助言をいただいた塩見研究室の皆様に感謝いたします。

文　献

1) Yamashiro H, Siomi MC (2018) PIWI-Interacting RNA in Drosophila : Biogenesis, Transposon Regulation, and Beyond. Chem Rev 118: 4404–4421. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00393.

2) Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y, Abe H, Sugano S, Tomari Y, Shimada T, Katsuma S (2009) The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. RNA 15: 1258–1264. doi: 10.1261/rna.1452209.

3) Nishida KM, Iwasaki YW, Murota Y, Nagao A, Mannen T, Kato Y, Siomi H, Siomi MC (2015) Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in Bombyx germ cells. Cell Rep 10: 193–203. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.013.

4) Xiol J, Spinelli P, Laussmann MA, Homolka D, Yang Z, Cora E, Couté Y, Conn S, Kadlec J, Sachidanandam R et al. (2014) RNA clamping by Vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts. Cell 157: 1698–1711. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.018.

5) Nishida KM, Sakakibara K, Iwasaki YW, Yamada H, Murakami R, Murota Y, Kawamura T, Kodama T, Siomi H, Siomi MC (2018) Hierarchical roles of mitochondrial Papi and Zucchini in Bombyx germline piRNA biogenesis. Nature 555: 260–264. doi: 10.1038/nature25788.

6) Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, et al. (2009) The TDRD9-MIWI2 Complex Is Essential for piRNA-Mediated Retrotransposon Silencing in the Mouse Male Germline. Dev Cell 17: 775-787. doi: 10.1016/j.devcel.2009.10.012.

7) Zhang Z, Xu J, Koppetsch BS, Wang J, Tipping C, Ma S, Weng Z, Theurkauf WE, Zamore PD (2011) Heterotypic piRNA Ping-Pong Requires Qin, a Protein with Both E3 Ligase and Tudor Domains. Mol Cell 44: 572–584. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.011.

8) Kawamoto M, Jouraku A, Toyoda A, Yokoi K, Minakuchi Y, Katsuma S, Fujiyama A, Kiuchi T, Yamamoto K, Shimada T (2019) High-quality genome assembly of the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 107: 53-62. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.02.002.