

機能性小分子 RNA による遺伝子発現抑制機構の解明

東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 塩見研究室
石津 大嗣

1. はじめに

20~30塩基長からなる機能性小分子RNAによる遺伝子発現抑制現象は、RNAサイレンシングと総称される。PIWI-interacting RNA (piRNA) は、生殖細胞特異的に発現する小分子RNAであり、生殖細胞においてPIWIと呼ばれるArgonauteタンパク質と結合することでレトロトランスポソンの発現を抑制する。piRNAは、次世代に遺伝情報を継承する生殖細胞において、レトロトランスポソンの転移による有害変異から自身のゲノムを守る役割を担っている。これまでの変異体を用いた遺伝学的解析等から、piRNAはmiRNAやsiRNAといったその他の種類の小分子RNAとは異なる生合成経路により作られていることが判明していたが、生化学的実験に適した生殖細胞系の培養細胞がなかったことから詳細な解析が遅れていた。そこで、私たちはpiRNA生合成経路が保存されたショウジョウバエ卵巣体細胞由来の培養細胞株 (ovarian somatic cell : OSC) を用いてpiRNA生合成経路の生化学的解析を進めてきた。OSCを用いた解析の結果、piRNA生成に必須の因子としてZucchini (Zuc) と呼ばれるエンドリボヌクラーゼを同定した。さらに、RNAヘリカーゼドメインを持つRNA結合タンパク質であるArmitage (Armi) とFs(1)Yb (Yb) がpiRNA前駆体と相互作用することでpiRNA生合成に関与することを見出した。ArmiとYbは、Yb bodyと呼ばれる細胞質顆粒構造体の構成因子であり、Yb bodyにおいてpiRNA生合成が行われていることが示唆された。しかし、piRNA前駆体がこれらの因子とどのような相互作用を経て成熟型に至るのか詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで、本研究では近年開発されたRNA結合タンパク質解析法であるHigh-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP)法を用いて、Zuc, Armi, Yb及びその他関連因子によるpiRNA前駆体認識機構の解明を目指した。

2. 方法

(1) HITS-CLIP法によるArmi, Yb結合RNAの同定

OSCに対し200 mJ/cm²の紫外線(254 nm波長)を照射し、*in vivo*においてタンパク質とRNAを架橋した後、モノクローナル抗体を用いてArmiとYbをそれぞれ免疫沈降法により単離した。得られた蛋白質RNA複合体を5U/μLのRNaseT1で処理し、RNA5'末端を放射性標識した後、SDS-PAGEにより分離した。ゲルからタンパク質RNA複合体を抽出し、結合RNAをクローニングしてcDNAライブラリーを作製した。Illumina HiSeq2000を用いてシーケンスを行い、得られたCLIP-tag配列をショウジョウバエゲノムにマッピングした。

(2) piRNAコード遺伝子を特異的に欠失させた細胞株の作製と解析

これまでの研究から、piRNAの前駆体となるRNAは、piRNA前駆体として識別される*cis*-elementを持つことが示唆されている。piRNA前駆体に結合するArmiとYbのHITS-CLIP解析から同定された*cis*-elementをCRISPR/Cas9 systemを用いて特異的に欠失させた細胞株を作製し、piRNA生成への影響を検討した。ここでは、3'非翻訳領域(UTR)にpiRNAをコードする遺伝子*traffic jam* (*tj*)が持つ*cis*-elementを標的とした。

3. 結果

(1) HITS-CLIP法によるArmi, Yb結合RNAの同定

piRNAはX染色体上の *flamenco* とよばれるトランスポゾン断片配列が密にコードされた約150 kbにおよぶ領域から生成される。この領域から転写されたRNAが細胞質においてプロセッシングされることにより成熟型のpiRNAが形成されると考えられている。ArmiとYbのCLIP-tag配列をマッピングした結果、*flamenco* 領域に多くマッピングされており、そのマッピングパターンもpiRNAをマッピングした結果と類似していることが分かった。また、*tj* 遺伝子領域においてもpiRNAマッピング結果と同様に、3'UTRにArmiとYbのCLIP-tag配列がマッピングされ、翻訳領域にマッピングされなかった。これらのことからArmiとYbはpiRNAの前駆体となるRNAに結合することが明らかとなった。

次に、ArmiとYbをRNAi法によりノックダウンして、それぞれYbとArmiに対するHITS-CLIPを行い、結合するRNAにどのような影響があるか調べた。その結果、Ybをノックダウンした状態でArmiに結合したRNAをHITS-CLIP法により同定した結果、コントロールに比べてマッピングされたリード数が約22%に減少した。特に、piRNAが生成されるトランスポゾン領域へのマッピング数が47%から30%に減少していたことから、ArmiのpiRNA前駆体との結合にはYbが必須であることが示唆された。一方で、Armiをノックダウンした場合、Ybのトランスポゾン領域へのマッピング結果に変化は見られなかった。このことから、YbはArmi非依存的にpiRNA前駆体と結合することが示唆された。以上の解析から、piRNA前駆体はYbとの結合を経た後にArmiに受け渡されることが示唆された。

(2) piRNAコード遺伝子を特異的に欠失させた細胞株の作製と解析

Yb HITS-CLIP解析から *tj* 3'UTRでYbが強く結合した100塩基長の領域が同定され、この領域にpiRNAの前駆体として識別される *cis*-elementが存在することが示唆された。そこで、近年開発されたゲノム編集法であるCRISPR/Cas9 systemを用いて、この領域を欠失した細胞株を作製しpiRNA生成への影響をノーザンブロット法により解析した。その結果、欠失変異株では下流から生成されるpiRNAが減少することが明らかとなった。

4. 考察

二本鎖RNAを前駆体とするmiRNAやsiRNAと異なり、piRNAの前駆体は明確な配列的構造的特徴が不明であり、その識別機構が不明であった。本研究により、YbがpiRNA前駆体にコードされた *cis*-elementに結合する *trans*-acting factorとして働くというモデルが提唱された。piRNA前駆体がどのようなプロセッシング経路を経て30塩基長程度の成熟型piRNAになるのかは不明だが、ArmiはYbとの結合を経てプロセッシングされたpiRNA中間体と結合し、piRNA成熟化及びPiwiへのローディングに関与することが予想される。この過程でpiRNA中間体の切断活性を担うとされるZucが作用すると考えられる。また、piRNA生合成に関わるその他のタンパク質としてVreteno, Sister of Yb, Shutdownなどが同定されているが、これらがどのように関与するかは不明であり、その解明は今後の課題である。今後、これらの因子のノックダウンによりArmiとYbに結合するpiRNA中間体にどのような影響があるかをHITS-CLIP法で調べることで、これらの因子の働きを明らかにしていきたい。

5. 発表論文、参考文献

Murota Y, Ishizu H, Nakagawa S, Iwasaki YW, Shibata S, Kamatani MK, Saito K, Okano H, Siomi H, Siomi MC, 2014. Yb Integrates piRNA Intermediates and Processing Factors into Perinuclear Bodies to Enhance piRISC Assembly. *Cell reports*, 8(1), pp.103-113.