

反応場に着目した piRNA 経路の生化学的解析

Biochemical approaches to understanding the reaction platforms of the piRNA pathway

課題番号：18H05271

泊 幸秀 (TOMARI, Yukihide)

東京大学・定量生命科学研究所・教授



研究の概要（4行以内）

piRNA が機能する「反応場」を、正しく活性のある状態で試験管内に取り出し、piRNA が作られ標的を抑制するまさにその「現場」を生化学的に理解するとともに、その結果を生物情報学的に検証しさらに発展させることによって、未解明のまま残されている「piRNA はどの様に作られどの様に働くのか?」という基本的かつ本質的な問いを、分子レベルで正確に追求する。

研究分野：RNA 生化学

キーワード：piRNA, 小分子 RNA, 反応場, RNA サイレンシング, PIWI, Argonaute

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉の発見以来、小分子 RNA が働く分子メカニズムの理解は飛躍的に進んできた。しかし、小分子 RNA の中でも、次世代にゲノム情報を伝える生殖細胞をトランスポゾンから守るという重要な役割を果たす piRNA 経路の理解は大幅に遅れている。その最大の理由は、piRNA の生合成と機能が、細胞内の様々な「反応場」を必要とするため、遠心分離によって可溶性画分を調製する一般的な細胞抽出液や、精製タンパク質を用いた実験では、本来の活性や特異性が容易に失われてしまうからである。

トランスポゾンの転移は、遺伝情報を破壊する可能性があり、特に次世代をつくり出す生殖細胞では、その活性を抑えることが非常に重要である。実際、ハエからマウスに至るまでの様々なモデル動物において、piRNA 経路の破綻は、トランスポゾンの異常活性化を伴う配偶子形成の異常を引き起こすことが知られている。したがって、生殖細胞ゲノムを守る piRNA の働きを正しく理解することは、生物学において極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、piRNA が機能する「反応場」を、正しく活性のある形で試験管内に取り出し、piRNA が作られ標的を抑制するまさにその「現場」を丁寧に素過程に分けて生化学的に解析するとともに、その結果を生物情報学的に検証しさらに発展させることによって、これまででは状況証拠によって漠然と想像されたモデルに過ぎなかった piRNA の作動原

理を、分子レベルで正確に理解することを大きな目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するためには、生化学的アプローチと、生物情報学的アプローチの2つの側面が極めて重要となる。まず、生化学的アプローチでは、細胞内の「反応場」をできるだけ壊さない形で丸ごと試験管内に取り出し、piRNA 経路の素反応を忠実に再現する無細胞系を構築する。そして、その無細胞系を用いて、着目する反応に必要な因子を特定し、各因子の分子機能を明らかにする。一方、生物情報学的アプローチにおいては、次世代シーケンサーを活用し、生体内に存在する(あるいは無細胞系を用いて試験管内で生成された) piRNA またはその前駆体の配列を網羅的に取得した上で、その背後にある「ルール」をうまく抽出することによって、生化学的アプローチによって得られた知見の普遍性を検証するとともに、さらに実験的に検証可能な新しい仮説を生み出す。これら2つの相補的なアプローチを適切に組み合わせ、循環させることによって、研究の進展を相乗的に加速させることが可能となる。

4. これまでの成果

「PIWI-interacting RNA」という名前が示すとおり、piRNA は PIWI サブファミリータンパク質に結合する小分子 RNA の総称である。PIWI タンパク質が最初に取り込むのは、pre-pre-piRNA と呼ばれる 5'末端がモノリン酸化された長い一本鎖の RNA であると考え

られている。多くの動物において、PIWI に取り込まれた pre-pre-piRNA は、PIWI 結合領域よりも少し 3' 下流側の位置において、一度切断される。その後、Trimmer と呼ばれるエキソヌクレアーゼによって、26~30 塩基程度の長さまで削り込まれ、成熟体 piRNA が作り出される。我々は CRISPR/Cas9 システムを、カイコ卵巣由来 BmN4 細胞に適用し、Trimmer をノックアウトすることによって、蓄積した pre-piRNA を詳細に解析できる細胞を作出した。そして、Trimmer ノックアウト細胞から、ミトコンドリアを含む「反応場」を丸ごと試験管内に取り出し、PIWI と結合した pre-pre-piRNA と反応させることによって、Zucchini と呼ばれるエンドヌクレアーゼによるミトコンドリア外膜上での pre-piRNA 産生を忠実に再現する無細胞系の構築に成功し、これまで当該分野が抱えていた混乱を解消する統一的なモデルを提唱した。また、生化学的アプローチと生物情報学的アプローチを組み合わせた解析の結果、Zucchini による切断には、これまで知られていなかった配列モチーフが重要であることが明らかになった (*Nature* 2020)。

PIWI サブファミリーは、AGO サブファミリーとともに、Argonaute ファミリーに属するタンパク質群であるが、これまでに、PIWI も AGO も、小分子 RNA と結合していない「空」の状態が続くと、選択的に分解されることが報告されていた。しかし、その分子メカニズムや生物学的な意義は不明なままであった。我々は、ショウジョウバエの Ago1 をモデルとして、空の状態の選択的な分解に関わる因子の探索を行った。その結果、「Iruka」と名付けた新規の E3 ユビキチンリガーゼが、空の Ago1 と選択的に結合し、その分解を誘導することを見出した。またこの選択的な分解が、細胞内の Ago1 の品質管理に重要であることも明らかとなった (*Mol Cell* 2019; *Cell Rep* 2019; *Autophagy* 2019)。

また、当初予見していなかった新たな展開もあった。PIWI を含めた Argonaute ファミリータンパク質は、単体では安定性が極めて低いという共通した性質を持つが、全長に渡って特定の構造を取らず煮沸にも耐える「超天然変性タンパク質」とも呼ぶべき機能未知タンパク質群 (Hero [HEat-Resistant Obscure] タンパク質と名付けた) によって、高度に安定化されることを明らかにした。Hero タンパク質は、Argonaute だけではなく、様々な「クライアント」タンパク質の安定性と機能を担保する働きがあり、一般的な酵素の機能を乾燥・熱・有機溶剤等による変性から保護したり、ALS などの神経変性疾患で見られる病原性凝集体の形成を強力に阻害したり、ショウジョウバエ個体の寿命を 3~4 割程度も延長したりする活性を持つことを示した (*PLOS Biol* 2020 [in press])。

5. 今後の計画

「piRNA 生合成の反応場」であるミトコンドリアについては、生物情報学的アプローチによって新たに浮上してきた大きな謎である Zucchini 切断モチーフの認識機構に焦点を当て、今後の解析を進める。また、「piRNA による標的抑制の反応場」である、核膜の周りに存在する非膜性凝集体ニューアージュについては、そのダイナミックな動態の異常が、piRNA やその標的にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

piRNA 関連因子の多くは、その配列の一部に天然変性領域を有しており、それらがゆるやかに相互作用することによって反応場が形作られていると考えられる。そこで、天然変性タンパク質の究極形として見る事ができる Hero タンパク質が、piRNA 生合成や標的抑制などに与える影響を解析し、天然変性領域を介した反応場の制御を理解する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

A widespread family of heat-resistant obscure (Hero) proteins protect against protein instability and aggregation.

*Tsuboyama K, Osaki T, Suzuki-Matsuura E, Kozuka-Hata H, Okada Y, Oyama M, Ikeuchi Y, Iwasaki S, *Tomari Y. *PLOS Biol.* 2020 [in press]

Zucchini consensus motifs determine the mechanism of pre-piRNA production.

Izumi N, Shoji K, Suzuki Y, Katsuma S, *Tomari Y. *Nature.* 2020 Feb;578(7794):311-316.

Identification of an AGO (Argonaute) protein as a prey of TER94/VCP

*Kobayashi H, *Tomari Y. *Autophagy.* 2019 Nov 12:1-3.

VCP machinery mediates autophagic degradation of empty Argonaute.

*Kobayashi H, Shoji K, Kiyokawa K, Negishi L, *Tomari Y. *Cell Rep.* 2019 Jul 30;28(5):1144-1153.e4.

Iruka eliminates dysfunctional Argonaute by selective ubiquitination of its empty state.

*Kobayashi H, Shoji K, Kiyokawa K, Negishi L, *Tomari Y. *Mol Cell.* 2019 Jan 3;73(1):119-129.e5.

7. ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/tomari/>