

piRNA はどのようにつくられるのか?
～ 「Zucchini (ズッキーニ)」 による RNA 切断ルールの解明に成功 ～

発表者：

泉 奈津子 (東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野 助教)
庄司 佳祐 (東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野 特任助教 /
宇都宮大学農学部 日本学振振興会特別研究員 PD (研究当時) /
東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野 博士研究員 (研究当時))
泊 幸秀 (東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野 教授)

発表のポイント：

- ◆ Zucchini と呼ばれる RNA 切断因子による piRNA 前駆体の産生を、試験管内で、正確に再現することに初めて成功しました。
- ◆ Zucchini による切断に、これまで知られていなかった塩基配列上の好みが存在し、それが piRNA 産生に重要であることを発見しました。
- ◆ これまで研究者を混乱させてきた謎が解かれたことで、piRNA 研究がさらに加速することが期待されます。

発表概要：

piRNA (PIWI-interacting RNA) はわずか 30 塩基程度の小さな RNA (注 1) です。しかしこの小さな RNA は、生殖細胞のゲノムを守るという大きな役割を果たしており、人間を含めた動物が存続するためには必須の因子です。また近年では、piRNA が、ガンを含めたさまざまな生命現象に関わっていることも分かっています。このように piRNA の重要性は明らかである一方、どのように piRNA がつくられ機能するのかといった基本的な部分については、関与する個別の因子は分かりつつあるものの、それらの関係性や全体像の理解には未だ程遠い状況にあります。特に piRNA 産生の中核因子と目される切断因子「Zucchini (ズッキーニ)」は、生体内と試験管内でのふるまいが一見矛盾しており、そのことが piRNA 研究者を混乱させ、理解を妨げていました。

今回、東京大学定量生命科学研究所の泉 奈津子助教、庄司 佳祐特任助教、泊 幸秀教授らの研究チームは、Zucchini による piRNA 前駆体の産生を試験管内で正確に再現することに成功しました。さらに Zucchini がはたらく際に必要な新しいルールを発見しました。本研究成果は、piRNA 研究の分野でボトルネックになっていた問題を解消し、piRNA 産生メカニズムの統一的な説明を可能にするものであり、これにより piRNA 経路の理解が大きく前進することが期待できます。

発表内容：

ヒトを含む生物のゲノムには、トランスポゾンとよばれる転移性の配列が存在します。トランスポゾンはゲノム上を自由に動き回ることができ、それにより生物のもつ遺伝情報を破壊する可能性があります。そのため、特に遺伝情報が次世代に引き継がれる生殖細胞では、トランスポゾンの活性を抑制することは極めて重要です。生殖細胞において、このトランスポゾン抑制機構の中核をなすのが piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる 30 塩基程度の小さな RNA です。この小さな RNA は、RNA 切断活性をもつ PIWI と呼ばれる因子と結合し、その配列と相

補的な配列をもつ標的トランスポゾン RNA の活性を抑えこみます。piRNA を産生できなくなると、トランスポゾンの活性化がみられるだけでなく、正常な卵や精子の形成ができなくなり、不妊となることがさまざまな動物で報告されています。

piRNA は、長い RNA が多段階の切断反応を受けることで 30 塩基程度の成熟型になると考えられています。その反応の中で中心的な役割を果たすとされてきたのが Zucchini と呼ばれる因子です。Zucchini は、piRNA の正常な産生に必須であること、RNA を切断する活性を持つことが明らかとなっており、長い RNA をある程度の長さの RNA (piRNA 前駆体) に切断するのではないかと考えられていました。またこの切断は U (ウリジン、注 2) の 1 塩基前を好むであろうことが、過去の生物情報学的大規模データ解析から強く示唆されていました。しかし精製した Zucchini を使って、試験管内で RNA の切断反応を観察した場合には、塩基の好みが見られないということが、複数のグループから報告されていました。この矛盾は piRNA の研究分野を混乱させ、Zucchini が本当に piRNA 前駆体を産生しているのかどうか、確証が得られない状況が長らく続いてきました。そのため、Zucchini による RNA 切断がどのように起こるのかを、正確に調べ直す必要がありました。

Zucchini が切断した piRNA 前駆体は、Trimmer (トリマー) とよばれる因子によってその末端が速やかに削りこまれ、成熟型 piRNA になります (図 1)。そのため、通常の細胞では piRNA 前駆体はすぐに無くなってしまい、正しくとらえることができません。そこで、私たちは Trimmer を欠損させることで、蓄積した piRNA 前駆体を検出できる細胞を作りました。私たちはこの細胞を用いて、生化学的なアプローチと生物情報学的なアプローチの両面から、Zucchini による piRNA 前駆体のつくられ方を詳しく解析することにしました。

生化学的なアプローチでは、細胞内で本来起きている反応を試験管内で再現することで、その生命現象の詳細な理解を目指しました。私たちは、Zucchini がミトコンドリア (注 3) の膜上に局在することに着目し、Zucchini がミトコンドリア膜上にある状態のままで反応に用いることで (図 1)、Zucchini による piRNA 前駆体の産生を試験管内で忠実に再現することに成功しました。また、この切断には Armitage や Gasz と呼ばれる piRNA 産生補助因子の存在が不可欠でした。これらの結果は、Zucchini が正しく機能するには、いくつかの補助因子と、それらが適切に配置されたミトコンドリア膜という「反応の場」が重要である、ということを示すものです。

生物情報学的なアプローチでは、次世代シーケンサーを使うことで、Zucchini によって切断されやすい配列を大規模に取得し、大量なものの全体の傾向から、ルールを抽出することを目指しました。私たちは、内在の piRNA 前駆体の大規模な解析から、piRNA 前駆体が「Zucchini による切断」と「PIWI による切断」という、2つの様式によってつくられることを見出しました (図 2、3)。では、この 2つの様式はどのようなルールによって使い分けられているのでしょうか? 私たちは、Zucchini が切断する領域をランダムな配列にして、数万通りあるそれらの配列を解析することで、Zucchini がどのような配列を好んで切断するのかを調べました。その結果、Zucchini の切断の際には、これまで知られていた切断箇所の 1 塩基後の U だけではなく、特定の位置に、これまで知られていなかったいくつかの塩基の好みが存在することが判明しました。さらに詳細な解析から、好みの塩基が特定の位置に存在するか

否かが、2つの様式のいずれで切断されやすいかを決めていることをつきとめました（図2、3）。

最後に、情報生物学的解析で得られた Zucchini による切断ルールを、生化学的アプローチで確認しました。Zucchini による切断の好みの配列を全て持ったような配列を用意し、ミトコンドリアを丸ごと用いた試験管内反応系で Zucchini によって切断される様子を観察したところ、予測されたまさにその位置で正確に切断を受けました。逆に、好みの塩基をもたないように配列を変更すると、その位置での Zucchini による切断が起こらなくなることも確認できました。このように、生化学と生物情報学の2つのアプローチをうまく組み合わせることで、Zucchini がミトコンドリアの膜上において、補助因子群の助けにより好みの配列を見つけ、piRNA 前駆体をつくりだしていることを明らかにし、これまで点と点であった知見を一本の線でつなぐことに成功しました。

本研究は、モデル系であるカイコ卵巣由来の培養細胞を用いて行われましたが、Zucchini は進化的に保存された piRNA 産生因子であり、そのはたらきは種を超えた普遍的なものであることがさまざまな状況証拠からも示唆されています。本研究成果によって、piRNA 研究分野が抱えていた大きな矛盾が解消され、piRNA 産生のメカニズムを統一的に説明できるようになりました。

今回の成果は piRNA 研究の中でも最も基礎に位置づけられるものであり、すぐに一般社会の役に立つものではありません。しかし、生殖細胞での piRNA の必要性やガンをはじめとする病態との関わりを考えると、今後、piRNA が医学的見地から重要になってくるのは間違いありません。本研究成果は、piRNA の基礎研究をさらに進展させるだけでなく、将来、piRNA 研究が医学応用される際の基盤としても貢献することが期待できます。

発表雑誌：

雑誌名：*Nature*

論文タイトル：Zucchini consensus motifs determine the mechanism of pre-piRNA production.

著者：Natsuko Izumi*, Keisuke Shoji*, Yutaka Suzuki, Susumu Katsuma and Yukihide Tomari. (*同等貢献)

DOI 番号：10.1038/s41586-020-1966-9

問い合わせ先：

東京大学 定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野
教授 泊 幸秀 (とまり ゆきひで)

用語解説：

(注1) RNA：リボ核酸。一般的に知られる mRNA は、DNA（デオキシリボ核酸）がコードするタンパク質の設計図として働く。一方、小さな RNA はタンパク質の設計図にはならず、RNA として機能する。

(注2) ウリジン：RNA を構成する塩基のひとつ。

(注3) ミトコンドリア：二重の生体膜からなる細胞小器官。エネルギー産生やアポトーシス等多彩な生命現象に関わる。

9. 添付資料 :

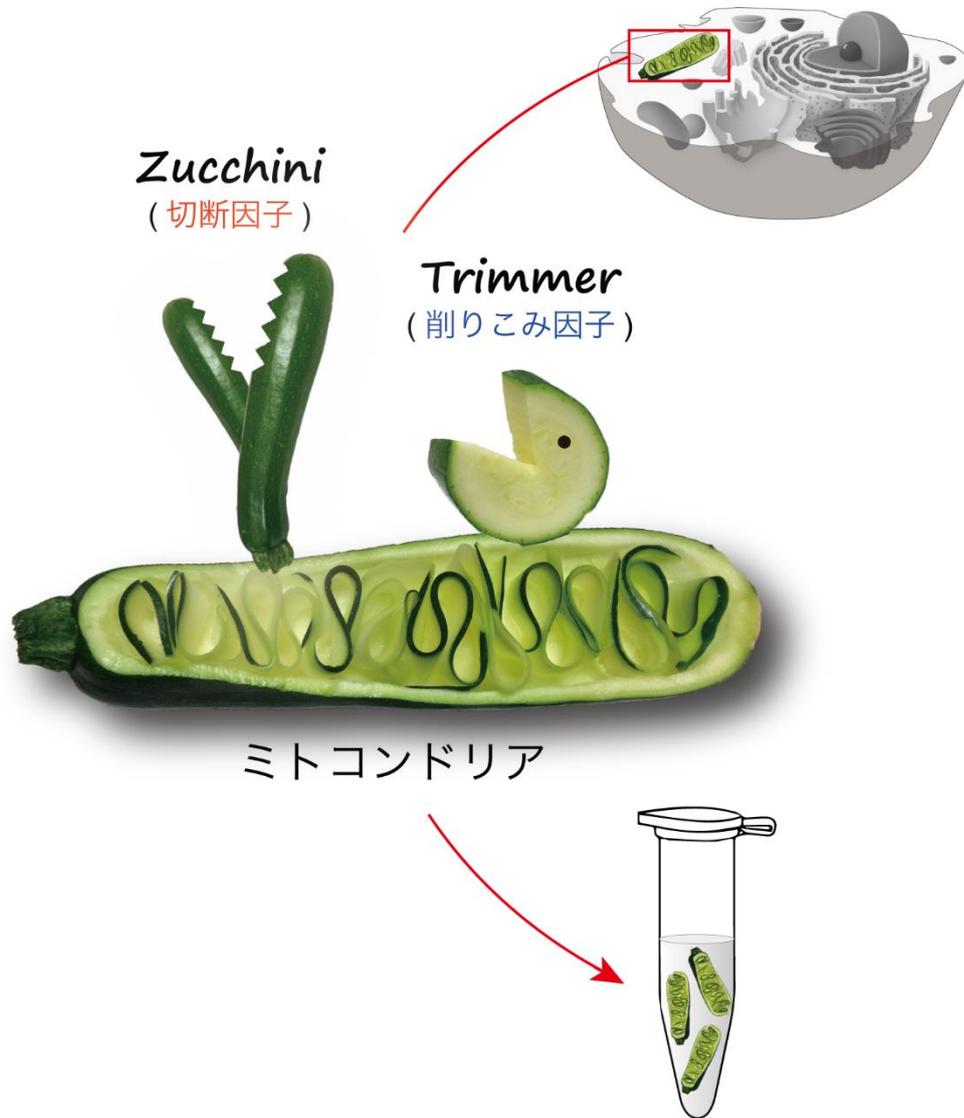


図1 : ミトコンドリアを用いた試験管内反応

Zucchini (切断因子)、Trimmer (削りこみ因子) は、いずれもミトコンドリアの膜上に存在している。このことから、ミトコンドリア膜は piRNA がつくられる「反応の場」として重要だと考えられている。Zucchini による piRNA 前駆体の産生を忠実に再現するには、Zucchini がミトコンドリア膜上に存在している状態が重要だと考え、細胞から取り出したミトコンドリアを丸ごと用いて、試験管内反応を行った。

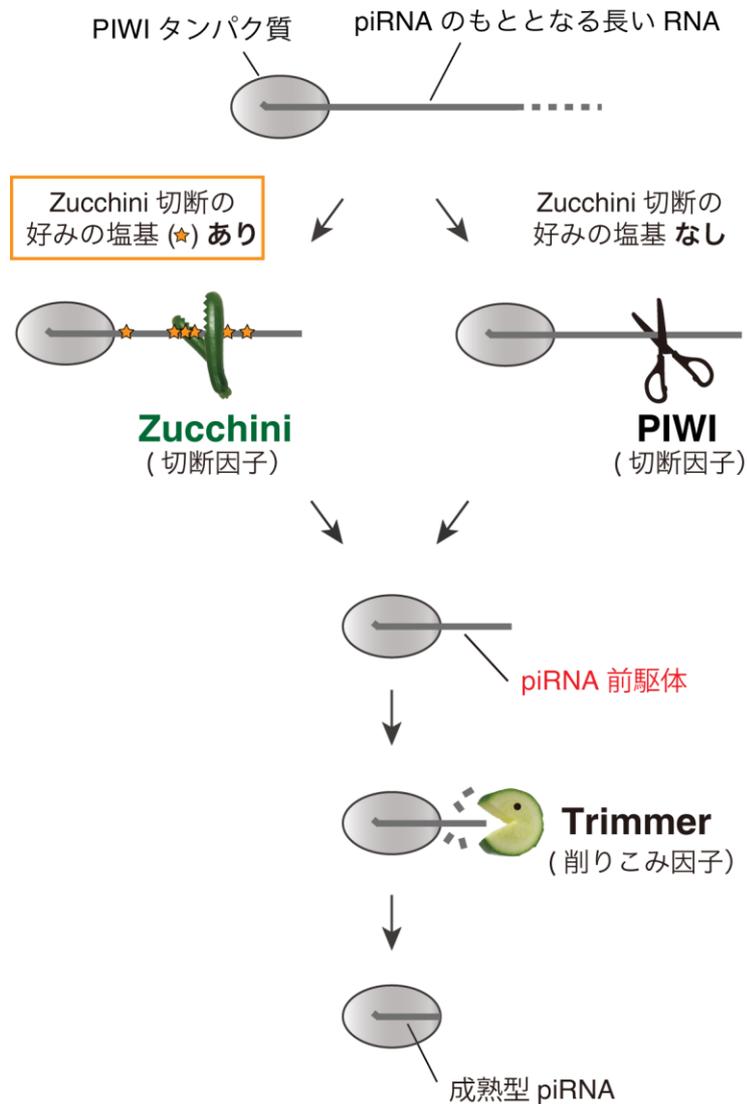


図2 : piRNA 前駆体がつくられるしくみ

piRNA のもととなる長い RNA は、PIWI タンパク質に取りこまれたあと、「Zucchini」または「PIWI」に切断されて piRNA 前駆体となる。特定の位置に好まれる塩基が存在していた場合（黄色の星印）、Zucchini による切断により piRNA 前駆体がつくられる。いずれの切断様式によりつくられた piRNA 前駆体も Trimmer により削りこみを受けて、成熟型の piRNA となる。



図3：2つの切断因子による piRNA 前駆体の産生と切断のルール（イメージ図）
piRNA 前駆体は、「Zucchini（さそり）による切断」または「PIWI（カニ）による切断」によりつくられる。Zucchini（さそり）は、特定の位置に好みの塩基（黄色の星）があるものを切断する。