

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02382

研究課題名(和文) microRNA作用メカニズムの統合的理解

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the molecular mechanisms of microRNA action

研究代表者

泊 幸秀 (Tomari, Yukihide)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90447368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：microRNAが、「翻訳の抑制」と「poly(A)鎖の分解」の2つの異なる経路を用いて標的遺伝子のサイレンシングを行う分子レベルのしくみに着目し、研究を展開した。その結果、microRNAがはたらくために必要な中核因子であるArgonauteタンパク質の品質を保證する、新しいE3ユビキチンリガーゼIrukaの同定に成功した。また、microRNAがCCR4-NOT脱アデニル化複合体を介してpoly(A)分解反応を促進する際の、各因子の特性やATPの要求性について生化学的に詳細な検証を行い、これまで知られていなかった新しい性質を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We conducted our research by focusing on how microRNAs mediate gene silencing of their target mRNAs by utilizing two distinct molecular mechanisms: "translational repression" and "poly(A) shortening". We identified a novel E3 ubiquitin ligase named "Iruka", which acts to ensure the quality of Argonaute proteins, the core factor in the microRNA pathway. Moreover, we revealed a series of new insights into the enzymatic properties and their ATP dependence of the deadenylase enzymes in the CCR4-NOT complex, which is recruited by microRNAs to mediate the poly(A) shortening of their target mRNAs.

研究分野：RNA機能研究分野

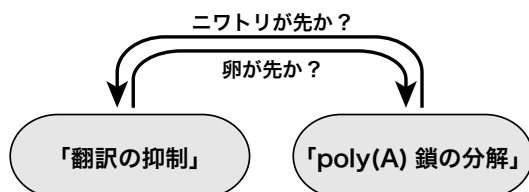
キーワード：microRNA 翻訳抑制 poly(A)分解 Argonaute

## 1. 研究開始当初の背景

代表的な機能性 RNA である microRNA は、ヒトゲノムに 2,000 種類以上存在し、自身と相補的な配列を持つ一群の標的 mRNA の発現を抑制することにより、発生や形態形成など様々な生命現象を緻密に制御している。また、microRNA による遺伝子発現制御の破綻が、癌を含む多くの疾患に関与していることも明らかになってきている。しかしながら、microRNA が標的 mRNA からのタンパク質合成を抑制する具体的なメカニズムについては、1999 年の Ambros らによる報告 (Olsen and Ambros, *Dev Biol* 1999) 以降、十数年に渡って世界中で研究が続けられているものの、これまで相矛盾するモデルが乱立しており、混乱を極めていた。

過去の研究から、microRNA は単独で働くわけではなく、Argonaute タンパク質と結合し、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるエフェクター複合体を形成することによって、初めて機能することが知られている。また RISC は、GW182 と呼ばれる足場タンパク質に結合し、さらに GW182 に結合する別の足場タンパク質 NOT1 を介して、CAF1 および CCR4 という 2 つの poly(A) 鎖分解酵素を誘導する。このようにして、microRNA は、少なくとも「翻訳の抑制」と「poly(A) 鎖の分解」の 2 つの異なる抑制経路を通して、標的 mRNA からのタンパク質合成を抑制する。

しかしやっかいなことに、poly(A) 鎖にはもともと翻訳を強く促進する働きがあるため、「poly(A) 鎖の分解」を受けた mRNA からの翻訳はおのずと抑制される。逆に、「翻訳の抑制」を受けた mRNA はリボソームによる保護を受けなくなるために不安定化し、poly(A) 鎖の分解が促進される。このように、miRNA が引き起こす 2 つの異なる抑制経路は、お互いに密接に影響を及ぼし合うため、典型的な「ニワトリが先か? 卵が先か?」というジレンマが生じてしまう。従来の研究では、これらの総和としての最終的な効果しか解析されて来なかったため、因果関係が明確ではなく、microRNA の標的抑制メカニズムの解明に大きな混乱が生じてきた。



## 2. 研究の目的

これまでの我々の研究から、microRNA が「翻訳の抑制」を行う経路は、さらに 2 つに分かれており、RISC が単独で (GW182 非依存的に) 働く経路と、GW182 を介して働く経路が存在すること、そしてその両方の経路が翻

訳装置であるリボソームの呼び込みを抑制していることが明らかとなった (Fukaya and Tomari, *Mol Cell* 2012)。さらに、最近の解析により、これら二つの翻訳抑制経路は、RNA ヘリカーゼである eIF4A を含む特定の翻訳開始因子を標的 mRNA から引きはがし、翻訳開始複合体の形成を阻害していることを見いだした (Fukaya et al., *Mol Cell* 2014)。しかし、microRNA によって翻訳開始複合体形成がどのように阻害されるのか、その具体的な作用機序は不明なままである。本研究では、microRNA がタンパク質合成を制御する原理を明らかにすることを目指す。

一方、microRNA による「poly(A) 鎖の分解」については、RISC が Argonaute-GW182-NOT1-CAF1-CCR4 というタンパク質相互作用ネットワークを介して CAF1 と CCR4 という 2 つの poly(A) 鎖分解酵素を誘導する、というモデルでひとまず合理的な説明が可能であり、「翻訳の抑制」と比較すると理解が進んでいると言える。しかしながら、我々はこれまでに、RISC による poly(A) 鎖の分解反応には、ATP の加水分解が必須であるという不思議な現象を見いだしている (Iwasaki et al., *Mol Cell* 2009)。一方で、CAF1 と CCR4 は、それぞれ単独での poly(A) 鎖分解活性に ATP を必要としない (Temme et al., *EMBO J* 2004)。したがって、microRNA による poly(A) 鎖の分解は、現在想定されている単純なタンパク相互作用だけではなく、まだ未知の、ATP の加水分解を伴う能動的な反応段階の存在が仮定されるものの、その具体像は全く不明である。そこで本研究では、microRNA による poly(A) 鎖の分解に ATP を必要とする理由を解明し、その意義を明らかにする。

以上の通り、本研究では microRNA が「どのようにして翻訳を抑制しているのか」そして「どのようにして poly(A) 鎖の分解を引き起こしているのか」という根本的な 2 つの問題に対する答えを求め、microRNA の多面的な作用メカニズムを統合的に理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

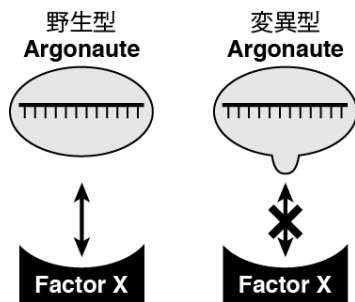
### (1) microRNA 依存的に m7G キャップ構造近傍に結合する因子の探索

真核生物における翻訳開始は、mRNA の m7G キャップ構造が翻訳開始因子 eIF4E によって認識されることによって始まる。eIF4E は、足場タンパク質である eIF4G に結合し、eIF4G を介して RNA ヘリカーゼである eIF4A を mRNA の 5' UTR に誘導する。また、eIF4E, eIF4G, eIF4A を合わせて eIF4F 複合体と呼ぶ。microRNA による「翻訳の抑制」については、これまでの研究から、GW182 非依存的な経路については eIF4F 複合体から RNA ヘリカーゼである eIF4A だけを特異的に標的 mRNA

から解離させるのに対し、GW182 依存的な経路については、eIF4E と eIF4A の両方(おそらく eIF4F 全体)を標的 mRNA から解離させるということが明らかとなった (Fukaya et al., Mol Cell 2014)。そこで、それらの解離を引き起こす責任因子を明らかにするため、4-thio-U や 5-iodo-U などの光架橋性修飾塩基を用い、microRNA 依存的に m<sup>7</sup>G キャップ構造近傍にリクルートされる因子の同定を試みる。また、放射性標識した標的 mRNA のキャップ構造末端にある m<sup>7</sup>G のリボースを過ヨウ素酸で酸化・開環してシスアルデヒドとし、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いて結合したタンパク質の遊離アミノ基と還元・架橋するという化学的架橋法(Sonenberg et al., PNAS 1978)も検討する。

## (2) Argonaute の種々の変異体を活用した相互作用タンパク質の探索

上記の責任因子は、必然的に microRNA エフェクター複合体である RISC の中核因子 Argonaute を介して呼び込まれるはずであるため、Argonaute と相互作用するタンパク質因子を探索すれば、同定できる可能性が高い。しかしながら、Argonaute は細胞内に多く存在する分子シャペロンを始めとした多数の因子と相互作用することが分かっており、通常の方法ではバックグラウンドが高すぎるものが考えられる。そこで、我々がこれまで行ってきた Argonaute の系統的変異解析から、例えば、5'ヌクレオチドポケットに変異を入れることによって microRNA を取り込む事が出来ない Argonaute の変異体や、GW182 に結合できない Argonaute の変異体を用い、野生型と変異型の Argonaute に相互作用する因子を網羅的に同定し、その「差分」を取ることで、Argonaute の機能に特異的な相互作用因子を感度良く同定することを試みる。



## (3) microRNA による poly(A)分解における ATP の意義

microRNA による「poly(A)の分解」については、RISC が poly(A)鎖分解酵素群を誘導するまでの過程に着目して、解析を進める。前述の通り、CAF1、CCR4 という二つの poly(A)鎖分解酵素は、それら単独での poly(A)鎖分解活性に全く ATP を必要としない(Temme et al., EMBO J 2004)。一方で、我々は、microRNA が CAF1 と CCR4 を誘導し poly(A)鎖の分解を

行う際には、ATP の加水分解が必須であるという一見奇妙な実験結果を得ていた(Iwasaki et al., Mol Cell 2009)。また、microRNA と同様に CCR4-NOT 複合体を誘導する Smaug などの RNA 結合タンパク質による poly(A)分解反応についても、細胞抽出液を用いた実験から、やはり ATP が必要であるということが報告されていた(Jeske et al., J Biol Chem 2006)。そこで、この ATP の要求性について、試験管内の poly(A)分解系を用いて ATP や ADP、AMP の存在量を丁寧に定量しながら、poly(A)分解活性を測定し、その相関性を改めて検証することにより、microRNA や Smaug などの RNA-タンパク質複合体による poly(A)分解反応になぜ ATP が必要なのか(あるいはなぜそのように見えるのか)を明らかにする。

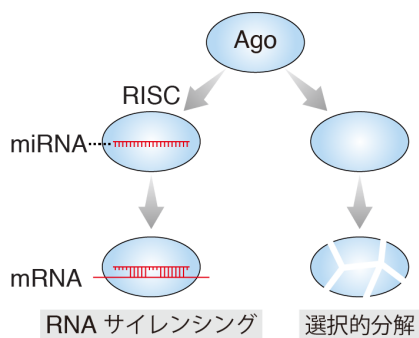
## 4. 研究成果

microRNA による「翻訳の抑制」については、標的 mRNA から翻訳開始因子の解離を引き起こすために必要であると想定される因子の同定を目指し、過去に実績のある 4-thio-U だけではなく、5-iodo-U などの様々な光架橋剤を標的 RNA に導入、または化学的架橋法を用いて、クロスリンク実験を行った。その結果、4-thio-U で検出されたバンドに加え、いくつかの新しいバンドの検出に成功した。種々の抗体を用いた免疫沈降実験を行い、それらのバンドの同定を目指したが、これまで 4-thio-U で検出していた因子群に加えて、新規因子を同定するまでには至らなかった。

また、Argonaute の野生型、GW182 結合能欠損変異体、そして microRNA 取り込み能欠損変異体に対して結合するタンパク質を、免疫沈降と質量分析を用いて網羅的かつ半定量的に解析したところ、それぞれ特異的に結合する一群の因子が同定された。そこで、野生型と GW182 結合能欠損変異体の差分に相当する因子について、ショウジョウバエ S2 細胞を用いて、1 つ 1 つあるいは複数同時にノックダウンを行い、レポーターを用いて microRNA による標的サイレンシングに対する効果を解析した。その結果、有意にサイレンシングが解除されるような因子群を見いだすことができた。さらに、それらの各因子に  $\lambda$ N 配列を付与し、Box-B 配列を介してレポーター RNA に強制的につなぎ止めた(テザリング)場合も、有意なサイレンシング効果が観察された。しかしながら、ノックダウン時のサイレンシングの解除、およびテザリング時サイレンシング効果の両方について、その程度は比較的弱いものであり、同定した因子群が、microRNA による標的の翻訳抑制にどの程度寄与しているのかを結論づけることはできなかった。

一方、microRNA 取り込み能欠損変異体の Argonaute について丁寧に解析を進めたところ、そのような変異体つまり microRNA が入らずに空のままの Argonaute は、microRNA を

取り込む能力を有する野生型の Argonaute と比較して、選択的にタンパク質分解を受けていることが明らかとなった。そこで、ショウジョウバエ S2 細胞を用いて、microRNA 取り込み能欠損変異体 Argonaute の選択的分解機構について解析を行った。まず、Argonaute のユビキチン化状態を解析したところ、Argonaute は microRNA 非結合時に選択的にユビキチン化されることが判明した。そこで次に、この選択的ユビキチン化を担う分子基盤の同定を目指して、microRNA 結合型・非結合型 Argonaute について LC-MS/MS 質量分析法による網羅的結合因子探索を行った。その結果、microRNA 非結合型 Argonaute に選択的に結合する新規ユビキチン E3 リガーゼを同定することに成功した。Argonaute タンパク質ファミリーは、もともと Argonauto と呼ばれる貝殻をもつタコの仲間(アオイガイ)になぞらえて名付けられたものであり(Bohmert et al., EMBO J 1998)、またイルカがアオイガイを大量に捕食するという報告がなされていた(Blanco et al., Sci. Mar. 2006)ことから、我々はこの新規 E3 リガーゼを Iruka (Iru) と名付けた。Iru をノックダウンすると、microRNA 非結合型 Argonaute のユビキチン化と分解が顕著に抑制された。さらに、ユビキチン化ペプチド解析の結果、Iru は microRNA 非結合時のみタンパク質表面に露出すると考えられる特定のリシン残基をユビキチン化の標的とすることが判明した。また、Iru のノックダウンによって、Argonaute タンパク質の品質が低下し、microRNA を取り込むことができなくなり、標的遺伝子のサイレンシングが広範囲に脱抑制されるということも明らかとなった。以上の結果から、Iru は、空の Argonaute を構造的に選別し、選択的にユビキチン化してその分解を誘導することにより、Argonaute タンパク質の品質を保証しているということが示された。この発見は、膨大な数の標的遺伝子の発現を緻密に制御する microRNA 経路において、その中核因子としての Argonaute タンパク質の品質がどのように担保されているのかという重要な問題に答えを与えるものである。



microRNA による「poly(A)鎖の分解」に関しては、その反応の中核を担う CCR4-NOT 複合体に焦点を当てた解析を進めた。モデルとなる基質 mRNA の検討を進めていたところ、CCR4-NOT 複合体は、これまでに知られ

ていた 3'末端に poly(A)鎖を持つ mRNA だけではなく、poly(A)配列のさらに下流に A 以外の塩基が付加された様な基質に対しても作用するということが明らかになった。また、細胞内においても試験管内においても、poly(A)配列の下流に A 以外の塩基配列が存在する場合には、CCR4-NOT 複合体による poly(A)の分解は阻害される一方で、上流の poly(A)配列の長さをより長くすると、その阻害効果はキャンセルされた。また、CCR4-NOT 複合体に含まれる CCR4 と CAF1 という 2 つの脱アデニル化酵素の両方が、このような性質を有することが確認された。つまり、CCR4 と CAF1 という microRNA による脱アデニル化反応を担う酵素群は、共にアデニン塩基を好むエクソヌクレアーゼであるにも関わらず、poly(A)配列の長さとその下流の A 以外の塩基配列のバランスに依存して、その活性強度が変化するという性質を内在的に持ち合わせるという新たな知見を得るに至った。近年、生体内においても、poly(A)鎖はその下流にウラシルやグアニンなどの塩基が付加されているという報告が成されており、poly(A)配列の下流に存在する A 以外の配列も除去できるという CCR4-NOT 複合体の酵素学的性質は、microRNA 研究にとどまらず、poly(A)鎖およびその付加配列の制御を考える上で興味深い。

また、microRNA や Smaug による poly(A)分解における ATP の意義については、ADP を ATP に再生するクレアチンキナーゼ、ATP を ADP に分解するヘキソキナーゼ、さらに AMP をアデノシンとリン酸に分解する 5'ヌクレオチダーゼなどを組み合わせ、様々な脱アデニル化反応条件における ATP, ADP, AMP の存在比と poly(A)分解の反応効率を詳細に比較して検討したところ、細胞抽出液を用いた実験系では、ATP の再生系非存在下において、ATP はすみやかに AMP に分解されることが明らかとなった。重要なことに、そのような条件において、さらに 5'ヌクレオチダーゼによって AMP をアデノシンとリン酸に分解すると、poly(A)分解反応はほぼ完全に回復したことから、通常の反応時に細胞抽出液内に蓄積したその AMP が poly(A)分解反応を強力に阻害しているということが判明した。つまり、microRNA や Smaug による脱アデニル化反応においては、「ATP の枯渇」ではなく「AMP の蓄積」が反応を阻害していたことが示された。これは、過去の報告の解釈を 180 度転換する必要性を提示するものであり、microRNA だけではなく Smaug など脱アデニル化反応を誘導する RNA 結合タンパク質の動作原理を考える上で極めて重要な知見だと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Silencing messages in a unique way. (査読有り)

\*Iwakawa HO, \*Tomari Y.  
*Nat Plants*. 2017 Oct;3(10):769-770.  
doi: 10.1038/s41477-017-0028-2

② In vitro analysis of ARGONAUTE-mediated target cleavage and translational repression in plants. (査読有り)

Tomari Y., \*Iwakawa HO.  
*Methods Mol Biol*. 2017;1640:55-71.  
doi: 10.1007/978-1-4939-7165-7\_4

③ ATP is dispensable for both miRNA- and Smaug-mediated deadenylation reactions. (査読有り)

Niinuma S, \*Tomari Y.  
*RNA*. 2017 Jun;23(6):866-871.  
doi: 10.1261/rna.060764.117

④ The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing. (査読有り)

Baeg K, \*Iwakawa HO, \*Tomari Y.  
*Nat Plants*. 2017 Mar 20;3:17036.  
doi: 10.1038/nplants.2017.36

⑤ CCR4 and CAF1 deadenylases have an intrinsic activity to remove the post-poly(A) sequence. (査読有り)

Niinuma S, Fukaya T, \*Tomari Y.  
*RNA*. 2016 Oct;22(10):1550-9.  
doi: 10.1261/rna.057679.116

⑥ Codon usage and 3' UTR length determine maternal mRNA stability in zebrafish. (査読有り)

\*Mishima Y, Tomari Y.  
*Mol Cell*. 2016 Mar 17;61(6):874-85.  
doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.027

⑦ The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. (査読有り)

Iwakawa HO, \*Tomari Y.  
*Trends Cell Biol*. 2015 Nov;25(11):651-65.  
doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011

[学会発表] (計 4 件)

① Dissection of RNA silencing pathways  
Tomari Y.  
KSBMB International Conference 2017

② Iruka mediates selective ubiquitination of unloaded Argonaute  
Tomari Y.  
The 26th KOGO Annual Conference 2017

③ A clade of plant AGO proteins prefer to bind DNA (rather than RNA) targets  
Tomari Y.  
CSHL Regulatory & Non-coding RNA 2016

④ Exonucleases in the small RNA pathways  
Tomari Y.  
Keystone Symposia "Small RNA Silencing: Little Guides, Big Biology" 2016

[図書] (計 1 件)

1. 植物と動物における microRNA による翻訳制御機構  
岩川 弘宙、泊 幸秀  
化学と生物 2015 Vol.53 No.8 Page. 510-514

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泊 幸秀 (Yukihide TOMARI)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
研究者番号: 90447368