

令和元年6月25日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15416

研究課題名(和文) 翻訳後修飾を介した植物マイクロRNA生成の分子基盤

研究課題名(英文) Analysis of Arabidopsis microRNA biogenesis via posttranslational modification

研究代表者

岩田 雄二 (Iwata, Yuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80704965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのmicroRNA(miRNA)生成において中心的な役割を果たすDicer-Like1(DCL1)タンパク質と協調して機能するタンパク質であるSERRATE(SE)の機能解析を行った。その結果、SEの末端領域が高度にリン酸化されており、miRNA生成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、シロイヌナズナDCL1によるmiRNA前駆体切断機構について解析を行った。その結果、miRNA前駆体のステムに存在する複数のミスマッチ領域がそれぞれ異なる働きをしており、DCL1によるmiRNA前駆体切断反応における効率と正確性を規定していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物におけるmiRNA生成機構は国内外の多くの研究者によって解析されている。miRNA生成に関与するタンパク質は多数同定されているが、それらがどのように協調してmiRNA生成に寄与しているかに関する詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。特に、miRNA生成におけるタンパク質の翻訳後修飾の役割を示した例は少なく、本研究はそれを明らかにした点で意義深いといえる。

研究成果の概要(英文)：miRNA is a 20-22 nucleotide long non-coding RNA that regulates gene regulation via nucleotide complementarity. In plants, miRNA is generated from precursor RNA called pri-miRNA by endonucleolytic cleavage by the RNaseIII family enzyme Dicer-like 1 (DCL1). In the present study, we analyzed the function of Arabidopsis SERRATE (SE), a zinc-finger domain-containing protein that interacts with DCL1. We also performed biochemical characterization of pri-miRNA processing reaction by DCL1 in vitro and clarified the recognition and cleavage mechanisms by which DCL1 cleaves a single-stranded RNA that forms a hairpin structure.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：microRNA Dicer シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は真核生物における重要な遺伝子発現調節因子である。miRNA は塩基配列依存的に mRNA に結合し mRNA 分解または翻訳阻害を引き起こすことで遺伝子発現を抑制する。植物においては、正常な発達、様々なストレス応答など多様な生命現象を制御する重要な遺伝子発現制御因子であることが明らかになっている。

植物において、miRNA はゲノム DNA にコードされている miRNA 遺伝子から RNA ポリメラーゼ II により一本鎖の miRNA 前駆体として転写される。ミスマッチを含む不完全な二本鎖折りたたみ構造をとり、5'キャップ構造や Poly(A) tail が付加されるのが特徴である。miRNA 前駆体は核内で Dicer-Like 1 (DCL1) タンパク質により二段階切断を受け、miRNA/miRNA* 二本鎖が生成される。その後、片方の鎖 (miRNA) が Argonaute 1 (AGO1) タンパク質に取り込まれ RNA Induced Silencing Complex (RISC) を形成し、細胞質において mRNA に結合することで mRNA の分解や翻訳阻害を引き起こすことで機能を発揮する (図を参照)。

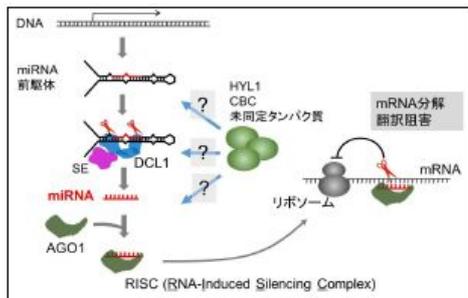


図 植物における miRNA 生成・機能のモデル図

シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析により、DCL1 による miRNA 前駆体のプロセッシングには、二本鎖 RNA 結合タンパク質である HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)、ジンクフィンガードタンパク質である SERRATE (SE)、RNA の 5'キャップに結合するタンパク質であるキャップ結合タンパク質複合体 (Cap-binding complex, CBC)、その他多くのタンパク質が必要であることが明らかになっている。一方、それらタンパク質がどのように協調して miRNA 生成に関与しているかについては不明な点が多い。また、DCL1 を中心とするタンパク質群が、miRNA 前駆体のどのような構造を認識しているかについても不明である。

2. 研究の目的

申請者は、シロイヌナズナの miRNA 生成に関与する複数のタンパク質のうち、SERRATE (SE) タンパク質の翻訳後修飾に着目した。SE タンパク質がリン酸化されるか調べ、その役割を調べることで miRNA 生成の分子メカニズムの解明を目指した。SE はジンクフィンガードメインを持つ核タンパク質であり、miRNA 前駆体を切断する RNaseIII ファミリーに属する RNA 分解酵素である DCL1 と協調して働くことが明らかにされている。SE はジンクフィンガードメインの他、SE の機能に重要であると予想される複数のドメインからなる。具体的には、N 末端側のプロリン残基やアルギニン残基に富んだ領域や、C 末端側のモチーフがあることがアミノ酸配列解析により明らかにされており、これらの特徴は植物の他の SE タンパク質にも保存されている。申請者により、ジンクフィンガードメインは DCL1 と相互作用し、DCL1 の活性上昇に寄与することが明らかにされているが、その他のドメインの機能は必ずしも明らかではない。

また、DCL1 は分子内でヘアピン構造をとった一本鎖 RNA を切断することによる miRNA を生成するが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。本研究では、miRNA 前駆体のステム上に複数存在するミスマッチ領域に着目し、これらの DCL1 による miRNA 前駆体切断における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) タンパク質のリン酸化を検出するために Phos-tag SDS-PAGE を用いた。具体的には、3xFLAG タグを付加した SE タンパク質を発現する se-3 変異体からタンパク質を抽出したのち、Phos-tag SDS-PAGE により電気泳動を行い、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い SE タンパク質を検出した。比較対照として、抽出したタンパク質をアルカリフォスファターゼと反応させ脱リン酸化を行い、同時に Phos-tag SDS-PAGE に供し、電気泳動度の違いを比較することでリン酸化の有無を判断した。
- (2) 本研究では、シロイヌナズナの SE 遺伝子の第 1 エキソンに T-DNA が挿入された変異体 se-3 を用いることとした。se-3 は形態異常、生育異常など様々な表現型を示す変異体であり、miRNA 生成に異常を示し、miRNA 蓄積が減少している。この se-3 変異体に、N 末端領域を欠失させた SE タンパク質を発現させ、形質転換体を作成し、表現型の回復度合いを調べることで、欠失させたドメインの機能を推定するというアプローチを取った。

- (3) SE cDNA をクローニングし、5' 末端に FLAG タグをコードする DNA 配列を PCR により付加し、SE プロモーターの制御下で発現させるコンストラクトを作製した。次に、ジンクフィンガードメイン、N 末端ドメイン、C 末端ドメインを欠失させた同様のコンストラクトを作製した。得られたバイナリベクターをアグロバクテリウムに導入し、フローラルディップ法によりシロイヌナズナ se-3 変異体に導入した。得られた種子を除草剤耐性によりスクリーニングを行い、得られた個体を T1 個体とし、それぞれの T1 個体から T2 種子を得た。その後、得られた T3 ホモ個体を解析に用いた。それぞれのコンストラクトにつき複数のラインを以降の詳細な解析に用いた
- (4) miRNA 前駆体 RNA や miRNA の定量は、植物から全 RNA を抽出した後、リアルタイム PCR を用いた定量 RT-PCR により行った。なお、miRNA 前駆体 RNA の定量の際にはランダムプライマー、miRNA の定量の際には各 miRNA に特異的なステムループ RT プライマーを用いて逆転写反応を行った後、得られた cDNA を用いて定量 PCR を行った。FLAG-SE (野性型もしくは欠失型) の検出にはウエスタンブロットを用い、定法に従ってタンパク質抽出、SDS-PAGE を行い、抗 DDDDK 抗体 (MBL 社) を用いて検出した。
- (5) シロイヌナズナ由来の精製 DCL1 タンパク質は既報の方法により調製した。すなわち、ヒスタグ、Strep-tag II、SUMOstar タグを N 末端側に付加した DCL1 タンパク質を昆虫細胞株 Sf9 で発現させた。粗タンパク質抽出液を調製し、ニッケルカラムとストレプトタクチンカラムを用いて精製した後 SUMOstar プロテアーゼ (Lifesensor 社) で切断した。再度ニッケルカラムにかけ、SUMOstar タグを除去すると共に SUMOstar タグを持たない DCL1 タンパク質を素通り画分に回収した。さらにゲル濾過カラムにかけ目的タンパク質を精製し、透析によりバッファー交換を行った。
- (6) miRNA 前駆体である Pri-miR167a 遺伝子、Pri-miR164a 遺伝子、Pri-miR399a 遺伝子はシロイヌナズナ Col-0 のゲノム DNA を鋳型に PCR 法により増幅した。T7 プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応により RNA を調製した。その後、変性 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) により全長の miRNA 前駆体を含むゲル片を切り出し RNA を抽出し精製した。
- (7) *In vitro* での miRNA 前駆体切断反応は、基本的には以下の条件で行った。10 μ l の反応系 (20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 150 nM miRNA 前駆体, 50 nM DCL1, 240 nM SE) で 37 °C で 20 分間反応させた後、エタノール沈殿により RNA を回収した。変性 12%PAGE に供し、SYBR Gold (Life Technologies 社) 染色により RNA を検出した。

4. 研究成果

- (1) 3xFLAG-SE を発現する se-3 変異体 (以下、3xFLAG-SE 植物と呼ぶ) の緑葉からタンパク質を抽出し、Phos-tag SDS-PAGE によりタンパク質を分離したのち、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロット解析を行った結果、SE タンパク質がリン酸化されていることが示された。この SE タンパク質のリン酸化は、N 末端領域を欠失する変異型タンパク質を発現する植物においては見られなかったことから、SE タンパク質の N 末端領域がリン酸化されていることが明らかにされた。
- (2) この N 末端領域を欠失させた SE タンパク質を発現するシロイヌナズナの解析を行った結果、複数の miRNA の蓄積量が野生型株と比較して減少しており、逆に miRNA 前駆体の蓄積量は増加していた。また、この植物は、se-1 変異体と同様の表現型異常が見られた。このことから、N 末端領域のリン酸化が SE タンパク質の機能に重要である可能性が考えられた。
- (3) 精製 DCL1 タンパク質と、Pri-miR167a を *in vitro* で反応させ切断断片を検出したところ、miRNA を生成すると予想される切断位置で切断された RNA 断片が検出された。これは他の miRNA 前駆体である Pri-miR164a や Pri-miR399a においても同様であった。さらに、21 塩基に相当するシグナルの部分から RNA を抽出し、T4 RNA Ligase を用いたクローニングを行いシーケンス解析を行ったところ、大部分は miRNA もしくは miRNA* に相当していた。このことから、DCL1 は *in vitro* において正確な位置で miRNA 前駆体を切断できることが分かった。
- (4) Pri-miR167a のステム上に存在する複数のミスマッチをそれぞれ閉じた変異型 Pri-miR167a を作製し、上記と同様に *in vitro* プロセッシングアッセイを行った。その結果、閉じるミスマッチの位置により、DCL1 による miRNA 前駆体切断はさまざまに影響を受けた。具体的には、miRNA/miRNA* duplex の基部側に隣接するミスマッチを閉じると、DCL1 による切断の効率が減少した。また、miRNA/miRNA* duplex 領域から離れた領域のミスマッチを閉じると、本来の位置での切断が起こるのみならず、本来の位置とはずれた位置で DCL1 による切断が起こっていた。これらの結果は、変性 Urea PAGE による切断 RNA のサイズの検出と、切断 RNA のクローニング、シーケンス解析により確かめられた。
- (5) Pri-miR167a で見られたミスマッチ構造の重要性は、ほかの miRNA 前駆体である Pri-miR164a や Pri-miR399a においてもみられた。このことから、miRNA 前駆体のステムに存在する複数のミスマッチの重要性は、複数の miRNA 前駆体に当てはまることであるということが分かった。さらに、miRNA 前駆体上のミスマッチを全て閉じた変異型

Pri-miR167a と DCL1 を反応させたところ、本来の位置での切断は見られず、miRNA ではない 21 塩基長の small RNA が生成されたことから、ミスマッチ構造の重要性が更に確かめられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 平田梨佳子, 真壁智哉, 三柴啓一郎, 小泉望, Samir M. Hamdan, 岩田雄二「シロイヌナズナ Dicer-Like1 による microRNA 前駆体切断機構の解析」第 60 回日本植物生理学会年会(名古屋) 2019 年 3 月 15 日
2. 平田梨佳子, 真壁智哉, 三柴啓一郎, 小泉望, Samir M. Hamdan, 岩田雄二「植物 DCL1 による microRNA 前駆体の切断位置を決定する RNA 二次構造の特徴」第 41 回日本分子生物学会年会(横浜) 2018 年 11 月 29 日
3. 岩田雄二「植物における microRNA の機能発現機構」シンポジウム第 504 回農芸化学会支部例会(大阪) 2018 年 7 月 14 日
4. 平田梨佳子, 真壁智哉, 三柴啓一郎, 小泉望, Samir M. Hamdan, 岩田雄二「植物 DCL1 による microRNA 前駆体の切断位置を決定する RNA 二次構造の特徴」第 20 回日本 RNA 学会(大阪) 2018 年 7 月 10 日
5. 平田梨佳子, 真壁智哉, 三柴啓一郎, 小泉望, Samir M. Hamdan, 岩田雄二「シロイヌナズナ Dicer-Like 1 による miRNA 前駆体切断機構の解析」第 40 回日本分子生物学会年会(神戸) 2017 年 12 月 8 日
6. Rikako Hirata, Tomoya Makabe, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi, Samir M. Hamdan, Yuji Iwata「Biochemical characterization of microRNA precursor processing by Dicer-Like 1 in Arabidopsis」, Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (Taipei, Taiwan), 2017 年 11 月 5 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/pmb/member/iwata_articles/

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。