

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02380

研究課題名(和文) SGS3と協調してRNA依存性RNAポリメラーゼを活性化するSDE5の機能解明

研究課題名(英文) Cooperative recruitment of RDR6 by SGS3 and SDE5 during siRNA amplification in plants

研究代表者

吉川 学 (Yoshikawa, Manabu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：80391564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物には小分子RNAとARGONAUTEを含む複合体RISCによって切断されたRNAを鋳型に二本鎖RNAが合成され、それをDICER-LIKEが切断し、新生siRNA(二次的siRNAと呼ばれる)を生成するRNAサイレンシング増幅機構がある。この機構は内在性の二次的siRNAであるtrans-acting siRNA生成やウイルス防御に機能する。本研究課題では、RNAサイレンシング増幅機構過程において、SGS3とSDE5が協調してRDR6を呼び込み二本鎖RNAが合成されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物のような免疫系を持たない植物では20-25塩基の長さの小分子RNAを介したRNAサイレンシングが、ウイルス抵抗性に重要なことがわかっている。我々は、この過程について生化学的な解析を行い、小分子RNAが増幅される分子機構の一端を明らかにした。ここでの成果は作物のウイルス抵抗性の付与に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：RNA-induced silencing complexes (RISCs) containing a siRNA and an ARGONAUTE protein play an important role in development, stress responses and virus defense. In plants, RISCs induce secondary siRNA production from their targets. In this research we investigated the molecular mechanisms of secondary siRNA production through in vitro analyses using plant extracts. Our data showed that SGS3 and SDE5 cooperatively recruit RDR6 that function in dsRNA formation.

研究分野：分子生物学

キーワード：siRNA miRNA Argonaute RDR6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物には 22 塩基長の miRNA や siRNA の小分子 RNA と ARGONAUTE1(AGO1)を含む複合体 RISC によって切断された RNA が、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RDR)によって二本鎖 RNA に変換され、それを DICER-LIKE(DCL) が切断して、二次的 siRNA と呼ばれる新生 siRNA を生じる RNA サイレンシング増幅機構がある。しかし、本研究課題申請当時、二本鎖 RNA 変換過程でどのような分子機構が介在するかについて不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、RNA サイレンシング増幅機構において、RDR による二本鎖 RNA 合成過程でその鋳型となる RNA が特異的に選択される際に、どのようなタンパク質が機能するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、タバコ脱液胞化細胞抽出液を使って、試験管内で小分子 RNA と AGO1 を含む RISC 複合体を形成させ、相補的な RNA を切断できる実験系を構築している。本研究課題では、この実験系をさらに、試験管内で RNA サイレンシングの増幅が起こる実験系に発展させ、その分子機構を調べた。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ細胞抽出液を使った二次的 siRNA 生成機構の解析

本研究課題を申請した時点で、我々は、22 塩基 siRNA-AGO1-RISC をタバコ脱液胞化細胞抽出液を用いて調製し、これを FLAG-tag によるアフィニティー精製し、シロイヌナズナ細胞抽出液と混ぜ、標的 RNA を加えると、RNA が切断され二次的 siRNA が生成する試験管内系を確立していた。そこで、この実験系を使って、植物における二次的 siRNA の分子機構の解析を始めた。その結果、大腸菌で発現させ精製した SDE5 組換えタンパク質を抽出液に加えると、二次的 siRNA の生成が著しく亢進されることがわかった(図1)。また、この実験系に RDR6 組換えタンパク質を加えると、SDE5 ほどでは

ないが、二次的 siRNA の生成量の亢進が観察され、両方を同時に加えると相乗的に二次的 siRNA が生じることが観察された。一方、活性中心に変異を導入し二本鎖 RNA 合成活性を失われた RDR6 組換えタンパク質を加えると、抽出液に含まれる RDR6 活性が阻害されることがわかった。これらのことから、この試験管内の実験系が生体内での現象を概ね反映していることが確認できた。次に、この二次的 siRNA が RISC 複合体によって切断された標的のどの領域から生成するか

を、次世代シーケンサーを使った small RNA sequencing を行った。その解析結果から、二次的 siRNA は主に標的の 3' 側から生じることがわかった。このことは、植物細胞内で報告されている結果と一致しており、この実験系が細胞内の分子機構を十分に反映することが確認できた。

(2) SDE5 の機能解析

次に、SDE5 が二次的 siRNA 生成のどの部分で機能を明らかにするために、シロイヌナズナ抽出液で 22 塩基 siRNA-AGO1-RISC によって切断された RNA が、RDR6 によって二本鎖 RNA へ変換される過程を、二本鎖 RNA に強い結合活性を持ち、Dicer 活性を抑制する Flock House ウイルスの B2 を使って解析した。その結果、抽出液中に SDE5 の添加することによって二本鎖 RNA の合成活性が高まることわかった。次に、N ペプチドと BoxB 配列を有する RNA との特異的な結合を利用する tethering 法を使った解析を行った。この実験では試験管内翻訳反応で調製した SGS3, SDE5, RDR6 を使って行った。その結果、RDR6 による二本鎖 RNA 合成活性を調べたところ、SGS3 または SDE5 のいずれかが RNA に結合し、SGS3 と SDE5 の両方が存在する場合に限り、RDR6 が活性化されることがわかった。さらに polyA 鎖を持つ BoxB-RNA と持たない BoxB-RNA を使って解

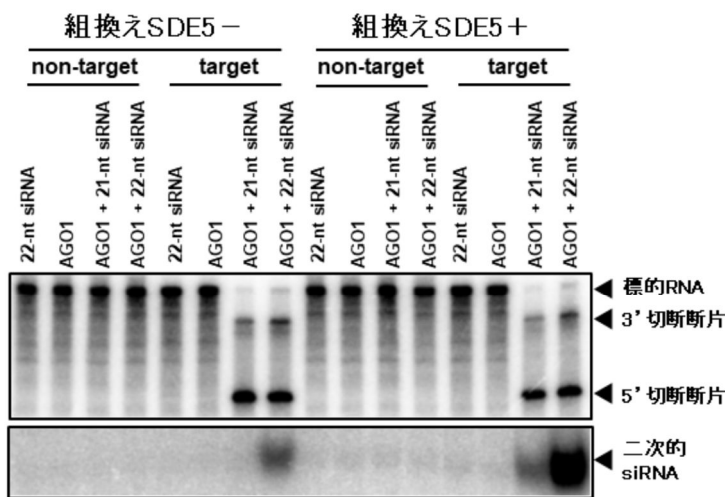


図1 シロイヌナズナ抽出液を用いた試験管内二次的siRNA生成

析したところ、精製したタンパク質による実験では polyA 鎖が RDR6 の活性に阻害的作用することがわかった。

(3) SDE5 の立体構造解析

図 1 で用いたとおり、大腸菌を使って発現させ、精製し、全長 SDE5 タンパク質が得られた。しかし、試験管内で生化学実験には十分なタンパク量は得られたが、X 線を使った構造解析に向けた結晶化の条件検討を行うには十分なタンパク量が得られなかった。そこで、SDE5 の N 末端側と C 末端側に分け、それぞれの組換えタンパク質を発現するプラスミドを作成し、可溶性タンパク質として、それらを精製し、十分なタンパク量が得られたため、結晶化の条件を調べたが、X 線解析可能な結晶化条件は見い出せなかった。そこで、それぞれをさらに細かいドメインに分けるために、それらのタンパク質をプロテアーゼで消化し、プロテアーゼに耐性を示す領域を調べた。その結果、C 末端側の SDE5 にプロテアーゼ耐性を示す領域が存在することがわかった。

(4) AGO1-RISC 複合体に含まれるタンパク質の探索

上記実験 1 の条件で AGO1-RISC 複合体に含まれるタンパク質を同定するために、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、SGS3 が共精製されることがわかった。また、それ以外にも RNA 代謝に関わるタンパク質も検出された。

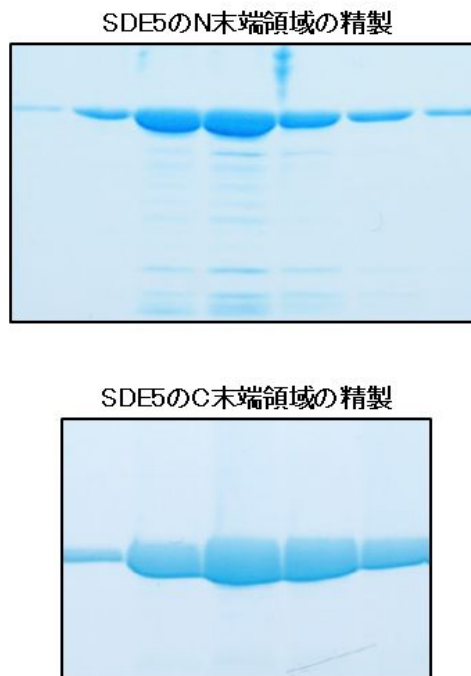


図2 SDE5のN末及びC末端領域のタンパク精製

以上の解析結果から、RDR6 は SGS3 と SDE5 が協調して、22 塩基 siRNA-AGO1-RISC 切断 RNA に呼び込むことを明らかにすることができた。また、SDE5 の立体構造の解明については、今後も継続する予定である。また、LC-MS/MS 解析で見いだされた AGO1-RISC 複合体に含まれるタンパク質についても今後、解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwakawa H, Lam AYW, Mine A, Fujita T, Kiyokawa K, Yoshikawa M, Takeda A, Iwasaki S, Tomari Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 Ribosome stalling caused by the Argonaute-1 miRNA-SGS3 complex regulates production of secondary siRNA biogenesis in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuriki Sakurai , Kyungmin Baeg , Andy Y.W. Lam, Keisuke Shoji, Manabu Yoshikawa, Yukihide Tomari, Hiro-oki Iwakawa
2. 発表標題 In vitro recapitulation of the secondary siRNA biogenesis in plants
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川 学、Kyungmin Baeg、櫻井 友理希、藤井 裕史、相澤 秀、西野 達哉、泊 幸秀、岩川 弘宙、石川 雅之
2. 発表標題 シロイヌナズナ培養細胞抽出液を用いた二次的siRNA生成機構の解析
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井 友理希、Baeg Kyungmin、Andy Y.W. Lam、庄司佳祐、吉川 学、泊 幸秀、岩川 弘宙
2. 発表標題 植物における二次的小分子RNA生成の試験管内再現
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川 学、Kyungmin Baeg、櫻井 友理希、藤井 裕史、相澤 秀、西野 達哉、泊 幸秀、岩川 弘宙、石川 雅之
2. 発表標題 シロイヌナズナ培養細胞抽出液を用いた22塩基小分子RNA-AGO1を含むRISC複合体による二次的siRNA生成機構の解析
3. 学会等名 第8回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuriki Sakurai, Kyungmin Baeg, Andy Y.W. Lam, Keisuke Shoji, Manabu Yoshikawa, Yukihide Tomari, Hiro-oki Iwakawa
2. 発表標題 In vitro recapitulation of the secondary siRNA biogenesis in plants
3. 学会等名 第8回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤秀、藤井裕史、吉川学、西野達哉
2. 発表標題 植物RNAサイレンシング増幅機構に関するSDE5の機能解析
3. 学会等名 Bio Inter-Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Baeg Kyungmin、櫻井友理希、吉川 学、泊幸秀、岩川弘宙
2. 発表標題 植物における二次的小分子RNA 生成の試験管内再現
3. 学会等名 第20回日本 RNA 学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井裕史、吉川学、西野達哉
2. 発表標題 植物RNAサイレンシング増幅機構に関するSDE5の機能解析
3. 学会等名 Bio Inter Conference 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西野 達哉 (Nishino Tatsuya) (50533155)	東京理科大学・基礎工学部生物工学科・准教授 (32660)	
研究分担者	韓 龍雲 (Han Yong-Woon) (50566297)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------