

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19687011

研究課題名 (和文) miRNA 機構の生化学的解析

研究課題名 (英文) Biochemical dissection of miRNA functions

研究代表者

泊 幸秀 ( TOMARI YUKIHIDE )

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：90447368

研究成果の概要 (和文)：我々は、ショウジョウバエ Ago1 は ATP 依存的な poly(A) の短縮化に加えて、cap 認識後の段階を阻害するのに対し、Ago2 は eIF4E と eIF4G の相互作用を阻害し cap 機能を遮断するというように、Ago1 と Ago2 による miRNA を介した翻訳抑制の様式に大きな違いがあることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We find that Ago1 represses translation primarily by ATP-dependent shortening of the poly(A) tail of its mRNA targets. Ago1 can also secondarily block a step after cap recognition. In contrast, Ago2 competitively blocks the interaction of eIF4E with eIF4G and inhibits the cap function. Thus, the two Ago proteins in flies regulate translation by different mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：核酸、蛋白質、発現制御、生体分子、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質をコードしない 21-24 塩基程度の「小さな RNA (small RNA)」が植物と動物の遺伝子発現の制御に大きな役割を演じていることが明らかになったのはつい最近のことである。

microRNA (miRNA)は、長いステムループ構造を持つ前駆体としてゲノムにコードされ、進化的に保存された小さな RNA である。一つの種あたり 200-1000 個程度は存在し、遺伝子全体の 1/3 以上を制御していると言われており、発生のタイミングや形態形成、アポトーシス・細胞増殖や癌化、稔性など、非常に重要な生物学的機能を緻密に制御していることが知られている。

このような背景にも関わらず、miRNA が実際にどのようにして働くのか、ということに対する我々の理解は驚くほど進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究は、miRNA 経路を素過程に分解し、それぞれの段階を緻密に解析することを目的とする。具体的には、特に理解の遅れていると考えられる次の 2 点についての研究を進める。

### (1) pre-miRNA の Dicer-1/Loqs による認識

これまでに、我々は、ショウジョウバエにおける R2D2 のパラログである Loquacious (Loqs)と名付けた二本鎖 RNA 結合タンパクが、Dicer-1 に結合しているパートナータンパク質であり、miRNA 前駆体(pre-miRNA)から、miRNA/miRNA\*二本鎖を切り出す活性に必須である、ということを示した。Dicer-1 は、それ単独では、pre-miRNA に対しては弱い切断活性しか示さず、また、本来は siRNA 経路の Dicer-2 の基質である長い二本鎖 RNA をも弱く切断できるが、二本鎖 RNA 結合タンパク質である Loqs とヘテロダイマーを形成することで、pre-miRNA への基質特異性と切断効率が著しく向上すると共に、長い二本鎖 RNA はもはや基質となり得なくなる、ということが知られている。

pre-miRNA は、約 70 塩基の一本鎖 RNA であり、25-30 塩基の相補性が不完全なステム部分と、比較的小さなループ部分、および 1-4 塩基の 3' 突出末端を持つ。おそらく、Dicer-1/Loqs はこのような pre-miRNA に共通の構造を認識していると考えられるが、具体的にそれぞれのタンパク質が pre-miRNA をどの様に認識しているのか、は全く分かっていない。

本研究では Dicer-1 と Loqs の組み換えタン

パク質を用い、様々な基質に対する結合強度と結合領域、および切断活性を生化学的に緻密に評価することで、Dicer による pre-miRNA の基質認識様式を明らかにすることを目的とする。

### (2) miRNA による翻訳抑制の in vitro での再構築とそのメカニズムの解析

miRNA による翻訳抑制は、siRNA によるターゲット切断に比べてかなり理解が遅れている。翻訳抑制の現象そのものを in vitro で再現できる系が構築できれば、siRNA によるターゲット切断がまさにそうであったように、メカニズムに対する理解が飛躍的に高まると期待される。

これまで、唯一の報告として、ウサギレティキュロサイトの in vitro 翻訳系において、miRNA 様の配列依存的な翻訳抑制が起こることが示されている。しかし、RISC (Argonaute)依存性が示されておらず、また miRNA をターゲット mRNA にあらかじめアニーリングしないと翻訳抑制が再現されない(miRNA による RISC 形成過程そのものが全く無視され欠落している)という致命的な欠陥があるため、RISC による翻訳抑制とは全く別の現象を見ている可能性がある。

miRNA が標的 mRNA の翻訳を抑制するしくみに関しては、数多くの報告がなされてきたが、1. cap 構造認識段階での阻害 2. cap 構造認識後の後期翻訳開始段階での阻害 3. 翻訳伸長段階での阻害 4. poly(A)の短縮と mRNA の不安定化 5. P-body (mRNA の分解と貯蔵を司る細胞質顆粒)への移行 等、様々な仮説が提唱されており、混乱を極めている。

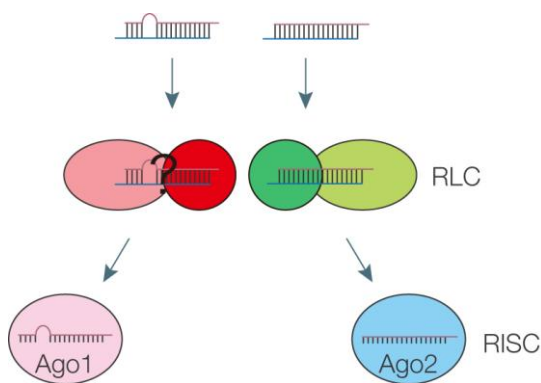
本研究では、ショウジョウバエの胚、卵巣、あるいは S2 細胞の抽出液を用いて、翻訳阻害を in vitro で再現できる系を構築し、そのメカニズムを詳細に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) モデルとなる基質としては、いくつかの天然に存在する pre-miRNA の配列をもとに、ステム部分のミスマッチを閉じて完全に相補的にしたもの(いわゆる short-hairpin RNA [shRNA])や、逆に shRNA のステム部分の様々な位置にシステマティックにミスマッチを導入したものをを用い、Dicer-1 単独あるいは Dicer-1/Loqs 複合体による切断能を定量する。さらには、ステム、ループ、突出末端の長さを変えたものや配列を変えたもの、欠損したもの等の変異体に対する切断能の評価を行う。同時に、ネイティブゲル等の手

法を用いることにより、酵素と基質の直接の結合能の評価を行い、切断能との比較を行う。さらには、化学的・酵素的プロービングを行い、pre-miRNA 上の各タンパク質によって認識されている部分をマッピングする。以上のアプローチから Dcr-1/Loqs による基質認識様式を明らかにする。

(2) ショウジョウバエでは、miRNA はその中間体の構造に従って、Ago1 と Ago2 の間に分配される。これを「small RNA 振り分け機構」と呼ぶ。我々は、miRNA が取り込まれる Argonaute の種類によって、その翻訳抑制作用が異なるのではないかと、という仮説を立てた。ショウジョウバエの「small RNA 振り分け機構」を利用すれば、その生合成を考慮しなくとも、ミスマッチの位置をデザインすることで、Ago1-RISC と Ago2-RISC を、ほぼ排他的に形成させることが可能となる。



よって、適切にデザインした small RNA 二本鎖を用い、全く同じ配列をガイド鎖として持つような Ago1-RISC と Ago2-RISC を、ショウジョウバエ胚抽出液中で形成させる。レポーターとしては、ガイド鎖と部分相補的な標的配列を複数持つシフェラーゼ遺伝子を用い、翻訳抑制の程度を定量する。同時に、ノーザンブロットング等により、mRNA 量を直接定量することにより、真に翻訳段階の抑制であるか、標的 mRNA の分解を伴うものであるかを検証する。さらに、翻訳抑制中の poly(A) の長さをモニターすることにより、脱アデニル化の有無を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 前述の方法により、様々な構造を持った pre-miRNA を基質として使い、まず Dcr-1 単独による切断能の解析を行ったところ、

1. ステム部分のミスマッチの有無は Dcr-1 による切断に影響を与えない

2. ステム部分の長さおよびループ部分の大

きさは Dcr-1 による切断に大きな影響を与える

ということが明らかとなった。また、切断反応を指標にした時と、直接の結合を指標にした時では、その結果に強い相関が見られた。このことは、Dicer による pre-miRNA の基質認識様式を知る上で非常に重要な知見であり、Loqs との関係性を含め、今後さらなる解析を進める予定である。

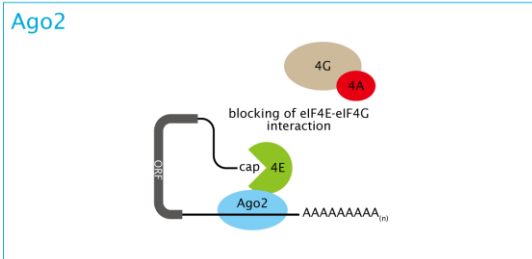
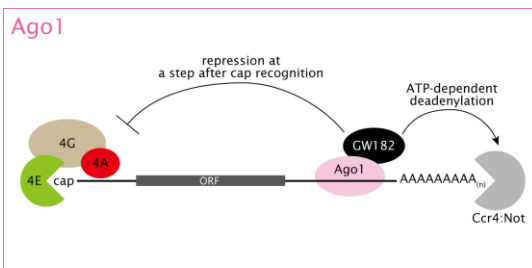
(2) 前述の方法により、Ago1 と Ago2 による作用を個別に評価し、それらの翻訳抑制の様式を丹念に調べた結果、Ago1 も Ago2 も標的部位の個数依存的に、mRNA 量そのものに変化を与えることなく、翻訳そのものを抑制することが明らかになった。ただし、

1. Ago1 は ATP 依存的に標的 mRNA の poly(A) を分解するが、Ago2 はしない

2. Ago1 は (poly(A) 分解と独立して) cap 認識後の段階を阻害するが、Ago2 は cap を認識する eIF4E と eIF4G との相互作用を特異的に阻害する

3. Ago1 の働きには P-body 構成要素である GW182 が必要であるが、Ago2 には必要ではない

という様に、Ago1 と Ago2 の働きには大きな違いがあるということが明らかになった。よって、これまでの矛盾した結果の少なくとも一部は、別々の Argonaute の活性を混同して評価していたためであると考えられる。この研究成果は *Molecular Cell* 誌に発表した。



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 2 件)

1. 岩崎信太郎、泊幸秀  
Argonaute-mediated  
translational repression (and activation)  
*Fly* 14, 2009,205-208 (査読有り)

2. 岩崎信太郎、川俣朋子、泊幸秀  
*Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2  
employ distinct mechanisms for  
translational repression. *Molecular Cell* 34,  
2009,58-67 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. 泊幸秀 Mechanisms of translational  
repression by miRNAs. RNA Silencing  
2009: Mechanisms and Applications,  
2009.11.香港、中国

2. 泊幸秀 microRNA による翻訳抑制機  
構、第 68 回日本癌学会学術総会、2009.10.  
横浜、日本

3. 泊幸秀 *Drosophila* Argonaute1 and  
Argonaute2 employ distinct mechanisms  
for translational repression. 第 31 回日本分  
子生物学会年会・第 81 回日本生化学学会大  
会・合同大会 2008.12.神戸、日本

4. 泊幸秀 Biochemical dissection of  
RISC assembly and function, 第 10 回日本  
RNA 学会年会、2008.7.札幌、日本

5. 岩崎信太郎、川俣朋子、泊幸秀  
*Drosophila*  
Argonaute proteins employ distinct  
mechanisms for translational repression.  
Keystone Symposium (RNAi, MicroRNA,  
and Non-Coding RNA), 2008.3.Whistler,  
CANADA

6. 研究組織

(1)研究代表者

泊幸秀 (TOMARI YUKIHIIDE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号：90447368

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：