

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06056・19K21182

研究課題名(和文) RNAサイレンシング制御因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of regulatory factors for RNA silencing

研究代表者

三好 啓太 (Miyoshi, Keita)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教

研究者番号：20423395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNAサイレンシングとは、小分子RNAによって誘導される塩基配列特異的な遺伝子発現抑制機構の総称であり、生物種間で高度に保存され、細胞内プロセスにおいて非常に重要な役割を担っている。ショウジョウバエRNAサイレンシング活性中心因子Ago1に相互作用する新規因子としてTdrd3を同定した。そこで、Tdrd3の分子機能解明のため、抗Tdrd3抗体を作成した。さらにTdrd3ノックアウト(Tdrd3 KO)ショウジョウバエを作製した。これらを用いた詳細な解析により、Tdrd3によるRNAサイレンシング制御因子としての分子機構を明らかにすることがと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAサイレンシングは、生物種間で高度に保存された遺伝子発現制御機構である。ヒトRNAサイレンシングの異常は、がんを含む疾患の原因として知られる。つまり、RNAサイレンシングの分子解明は、ヒト疾患の解明・治療に繋がる。昨今の研究により、RNAサイレンシングの基本的な分子機構は明らかにされた。しかし、試験管内RNAサイレンシング再構成系における活性効率は、細胞内のそれらに比べ非常に低い。このことは、未知の機能因子の関与が示唆される。本研究によるRNAサイレンシング新規関連因子の同定および機能解明は学術的な意義に留まらず、人為的な効率化およびその制御による疾患治療としての社会的意義を持つと考える。

研究成果の概要(英文)：RNA silencing is a gene silencing mechanism that is dependent on the complementary of small RNAs to target mRNAs. This mechanism is highly conserved among biological species and plays a critical role in intracellular processes. I identified Tdrd3 as a novel factor that interacts with Drosophila RNA silencing active factor Ago1. I generated an anti-Tdrd3 antibody to elucidate the molecular function of Tdrd3. Furthermore, I generated a Tdrd3 knockout (Tdrd3 KO) fly by the CRISPR/Cas9 system. Detailed analyses using these tools will elucidate the molecular mechanism of Tdrd3 as a regulator of RNA silencing.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：RNAサイレンシング microRNA RNAi piRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

20~30塩基からなる小分子 RNA によって引き起こされる塩基配列特異的な遺伝子発現抑制機構を、包括的に RNA サイレンシングと呼ぶ。RNA サイレンシングは、生物種間で高度に保存され、発生や細胞周期、ウイルスからの生体防御など様々な生体内プロセスに必須である。RNA サイレンシングの引き金因子となる小分子 RNA は、その由来や作用様式によって分類され、miRNA や small interfering RNA (siRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) などと呼ばれる。小分子 RNA は、サイレンシング活性を持つ作動複合体 (RNA induced silencing complex: RISC) を標的 RNA へと導く役割を担う。RISC は、標的 RNA と小分子 RNA の相補性に基づき、標的 RNA の切断または翻訳抑制などを介した発現抑制を行う。RNA サイレンシングの分子作用機序の理解において、個体や培養細胞の扱いやすさや RNA サイレンシング機構の単純さなどの理由から、ショウジョウバエをモデル生物として用いた研究は他の生物種の研究と比較し優位な点が多い。ショウジョウバエの RNA サイレンシング機構は、miRNA 機構、siRNA による RNAi 機構や piRNA によるトランスポゾン発現抑制機構が存在する。miRNA はゲノムにコードされた miRNA 遺伝子から発現し、プロセシングされたのちに miRNA に成熟する。miRNA-RISC 複合体は mRNA の発現を抑制し、細胞内遺伝子群の発現制御ネットワーク制御機構として機能する。siRNA は、ウイルスなどに由来した外来性二本鎖 RNA か染色体上に存在するトランスポゾンなどの反復配列から発現した内在性二本鎖 RNA に由来する。特に、内在性 siRNA は endogenous siRNA と呼ばれ、トランスポゾンの発現抑制やゲノム改変を抑制する。piRNA は主にトランスポゾンに相補的な配列を持ち、トランスポゾンの発現を転写レベルや転写後レベルで抑制する。特に、二本鎖 RNA の人為的導入による RNAi は、遺伝子解析手法として重要な役割を担うとともに、疾患治療法の一つとして期待されている。各種の小分子 RNA は大きさこそ似ているが、生合成過程や関連因子、RISC の作用機序は異なる。また、同じ種類の小分子 RNA であっても、標的 RNA に対する作用効果は異なる。つまり、各小分子 RNA は、配列、時期、場所、生合成過程、RISC 構成因子、標的 RNA、標的 RNA の状態などに依存して、作用効果が異なると考えられる。実際、RNAi や miRNA 機構の効果を検出するために、人為的にレポーター遺伝子を細胞に導入すると、各小分子 RNA によって抑制効果は異なる。これまでに、研究代表者を含めた研究者が、既知の RISC 主要構成タンパク質をそれぞれ精製し、RISC の再構築に成功したが、その効果も内在の活性に比べれば、非常に活性が低いものである。これらの結果は、未知の RISC 活性化因子や制御因子の存在を示唆していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエをモデル動物として用い、RNA サイレンシングの制御に関わる因子の同定および機能解析を行い、RNA サイレンシングの詳細な分子機構の解明を目的とする。さらに、本研究は、RNA サイレンシングの人為的な効率化およびその制御にも応用できると期待する。

3. 研究の方法

① ショウジョウバエ S2 培養細胞から RNA サイレンシング作動複合体 RISC および RISC 前駆体 (RISC loading complex: RLC) の新規構成因子群を試みた。この同定は、自作のモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により行なった。これらの抗体作製においては、特異性および反応性が高い抗体を選択し、独自性の高い有用な抗体を取得した。

② RISC や RLC 構成因子として同定した新規因子 (Tdrd3) の分子機能解析のために、これに対する抗体を作製した。新規因子と GST の融合タンパク質を大腸菌で発現させたのち精製し、これを抗原としてマウスに免疫した。これにより得られた抗体を用いて、RISC/RLC に新規因子が含まれることを確認した。

③ CRISPR/Cas9 システムを利用し、Tdrd3 ノックアウト (KO) ショウジョウバエを作製した。

④ RNA サイレンシングの一つである「piRNA を介した転写レベルの遺伝子発現抑制機構」に関与する遺伝子の同定および解析を行なった。本機構は、piRNA を介して主にトランスポゾンの発現抑制を行う。過去の知見を参考に関連因子候補を挙げ、所属研究室が樹立した卵巣性体細胞 (OSC 培養細胞) を用いたスクリーニングにより、関連遺伝子として同定した。さらに、同定因子に対する抗体を作製し、本抗体を用いた免疫沈降法により、同定因子と既知の piRNA 機構因子との相互作用を解析した。さらに、同定因子がどの様にトランスポゾンの転写抑制に寄与しているかを明らかにするために、ChIP 解析によりトランスポゾン領域におけるヒストンの修飾を解析した。

4. 研究成果

① 今回、新たに RNA サイレンシング作動複合体 RISC および RLC の新規構成因子群の同定を行なった。具体的には、miRNA を介した遺伝子発現機構において RISC 構成因子として機能する Ago1 および GW182 に対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降法により、それらの複合

体を精製し、質量分析法によって各タンパク質を同定した。これまでは、免疫沈降物を SDS-PAGE および銀染色を行なったのち、各タンパク質のバンドを質量分析により同定した。一方、今回は、免疫沈降物に含まれるタンパク質のすべてにおいて質量分析を行い、含まれるタンパク質を同定した。これは、質量分析機器の進歩により、より解像度の高い解析が可能になったことによる。これにより、既知の相互作用タンパク質や研究代表者が過去に同定したタンパク質の他にも、新たなタンパク質を新規相互作用因子として同定した。

② Ago1 および GW182 の相互作用因子として、Tudor-domain を有する Tdrd3 を同定した。そこで、抗 Tdrd3 抗体をマウスを用いて作製した。また、Tdrd3 を RNAi 法によりノックダウンした S2 培養細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティングにより、その特異性を確認した (図 1)。さらに、S2 培養細胞抽出液から抗 Ago1 抗体を用いて得た免疫沈降物について、抗 Tdrd3 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、その相互作用を確認した (図 2)。

今後、抗 Tdrd3 に対する抗体を用いた免疫沈降法による Tdrd3 を含む RISC の同定、それに含まれる miRNA の同定、CLIP 法を用いた標的 mRNA の同定を進める。これら解析により、Tdrd3 が普遍的な miRISC 制御因子であるか、もしくは特異的な miRISC 制御因子であるかを明確にする。これらにより、miRNA 機構の人為的な応用利用に繋がると期待する。

③ Tdrd3 ノックアウトショウジョウバエを CRISPR/Cas9 システムを利用した方法により作製した。本ショウジョウバエの卵巣 (Ovary) について、②で作製した抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Tdrd3 発現欠損を確認した (図 1)。今後、本ノックアウトショウジョウバエと miRNA 機構を評価するためのレポーター遺伝子を持ったショウジョウバエを用いることで、個体における Tdrd3 の重要性を確認する。

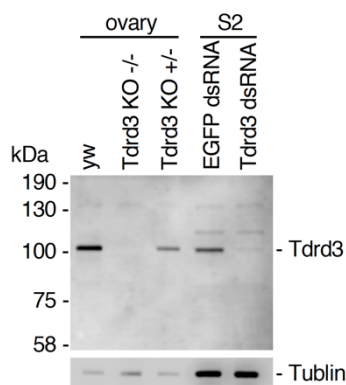


図 1 抗 Tdrd3 抗体の作製

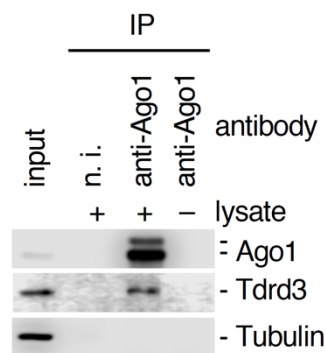


図 2 抗 Ago1 抗体による免疫沈降法による Ago1 と Tdrd3 の相互作用の確認

④ 「piRNA を介した転写レベルの遺伝子発現抑制機構」に関与する遺伝子として、CG14438 を同定した。本タンパク質は、Zn フィンガードメイン有するタンパク質であるが、その詳細な分子機能は明らかにされていない。OSC 培養細胞において、CG14438 をノックダウン (KD) するとトランスポゾンの転写量が上昇した。OSC 培養細胞抽出液を用いた抗 CG14438 抗体による免疫沈降法により、CG14438 と Piwi との相互作用が観察されたことから、CG14438 は、既知の piRNA を介した転写抑制機構に関与することが示唆された。さらに、CG14438 ノックダウン OSC 細胞におけるトランスポゾン領域におけるヒストン修飾を ChIP 法により解析した結果、CG14438 ノックダウンは転写抑制マークの変化は観察されなかったが、転写活性化マークであるヒストン H3 の Lys4 のジメチル化 (H3K4me2 化) を誘導していることが明らかとなった。このことから、CG14438 は H3K4me2 化の抑制に機能していると示唆された。今後、その詳細な分子機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三好啓太
2. 発表標題 レトロトランスポソンの発現抑制機構におけるクロマチン制御因子の働き
3. 学会等名 熊本大学 発生医学研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好啓太、猪谷紗来、齋藤都暁
2. 発表標題 レトロトランスポソン抑制におけるクロマチン制御因子の機能解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好啓太、猪谷紗来、齋藤都暁
2. 発表標題 A novel gene is involved in the silencing of transposable elements in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第20回 武田科学振興財団生命科学シンポジウム RNAネオバイオロジー（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪谷紗来、三好啓太、齋藤都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエsmall ovary(Sov)によるトランスポソン抑制機構
3. 学会等名 第1回 日本遺伝学会春季分科会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好 啓太
2. 発表標題 ショウジョウバエ卵巣性体細胞におけるトランスポゾン由来細胞外粒子の同定
3. 学会等名 転写因子研究会 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪谷紗来、三好啓太、齋藤都暁
2. 発表標題 ショウジョウバエのトランスポゾン抑制因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
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