

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380034

研究課題名（和文） 植物におけるRNAサイレンシング誘起および抑制の分子機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanisms of induction and suppression of RNA silencing in plants

研究代表者

飯 哲夫（MESHI TETSUO）

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域・領域長

研究者番号：40157813

研究成果の概要（和文）：RNAサイレンシングは、植物がウイルスに対して示す主要な防御反応のひとつである。RNA-induced silencing complex (RISC) は、RNAサイレンシングにおいて中核的な役割を果たす複合体である。本研究で我々は、AGO1タンパク質が分子シャペロンHSP90およびそのコシャペロンであるCYP40の助けを借りて2本鎖small interfering RNAをとりこむ過程を経てRISCを形成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：RNA silencing is one of major antiviral responses in plants. In RNA silencing, RNA-induced silencing complexes (RISCs) recognize target mRNAs to inhibit the expression of corresponding proteins. Here, we found that AGO1 protein binds double-stranded small interfering RNAs (siRNAs) with the help of a molecular chaperone HSP90 and its co-chaperone CYP40, and then, one of the siRNA strands is removed to form an active RISC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：RNAサイレンシング、植物、ウイルス

1. 研究開始当初の背景

RNAサイレンシングは、植物がウイルスに対して示す主要な防御反応のひとつである。その一方で、ウイルスは、自身がコードするRNAサイレンシングサプレッサー（以下、サプレッサー）の働きによりRNAサイ

レンシングを抑制し、増殖を遂げる。RNAサイレンシングの誘起とその抑制は、病徴の質や激しさを決める重要な要因となっている。従って、RNAサイレンシングの誘起と抑制の分子機構を理解することは、ウイルスによる病害の制御法を構築するために重要

な要素のひとつであると考えられる。RNAサイレンシングでは、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる、AGOタンパク質と1本鎖 small interfering RNA (siRNA)を含む複合体が、siRNAの相補配列をもつ標的RNAに結合し、それを分解あるいは翻訳阻害に導く。研究開始当初、我々は、タバコ BY-2 細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液 (BYL) で AGO1 mRNA を翻訳し、そこに2本鎖 siRNA を添加すると、対応する RISC が形成されることを明らかにしていた。また、トマトモザイクウイルス (ToMV) がコードする 130K タンパク質が ds-siRNA 結合活性をもつサプレッサーであることを見いだしていた。

2. 研究の目的

本研究では、BYL を用いた試験管内 RISC 構築系を利用して RISC 形成の分子機構、および、130K タンパク質による RISC 形成阻害機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

BYL を用いた試験管内翻訳・RISC 形成系を用いた。具体的には、試験管内合成した AGO1 mRNA (5' キャップ付加) を BYL で翻訳後、2本鎖 siRNA を添加してさらにインキュベートすることにより、RISC を形成させた。2本鎖 siRNA は、3'末端リボースの 2'水酸基にメチル化修飾を入れた合成品の 5'末端をリン酸化し、相補鎖とアニールして作製した。標的 RNA は試験管内転写により合成した。試験管内系に添加する 130K タンパク質も BYL を用いて合成した。

4. 研究成果

BYL 中で AGO1 タンパク質を対応する mRNA の翻訳反応により合成し、そこに 22ヌクレオチドの 2本鎖 siRNA を添加すると、そのうちの一方の鎖 (ガイド鎖) を捕捉した AGO1 タンパク質複合体が形成された。この複合体は、ガイド鎖と相補的な配列をもつ RNA に特異的に結合し切断する活性、すなわち RISC 活性を有していた。エンドヌクレアーゼ活性を失った変異 AGO1 タンパク質は2本鎖 siRNA を取り込んだが、1本鎖化できなかったことから、AGO1 タンパク質は2本鎖 siRNA を取り込んだあとに、不要な鎖 (パッセンジャー鎖) を切断することにより除去していることが示唆された。興味深いことに、エンドヌクレアーゼ活性を失った変異 AGO1 タンパク質は siRNA と異なり、ミスマッチをもつ2本鎖マイクロ RNA を取り込み、1本鎖化することができた。

この試験管内 RISC 形成反応が、熱ショックタンパク質 HSP90 の特異的阻害剤であるゲルダナマイシン (GA) の添加によって阻害されることを見いだした。HSP90 は、ATP を結合した状態で基質タンパク質に結合し、ATP の加水分解をきっかけに基質タンパク質を解離する。このサイクルにより基質タンパク質のコンフォメーション変化が誘導される。GA は HSP90 と 2本鎖 siRNA の AGO1 への結合を阻害した。また、難加水分解性 ATP 類縁体である ATP- γ S を添加すると、HSP90-AGO1-2本鎖 siRNA 複合体が蓄積した。このことから、AGO1 タンパク質が、ATP をもった HSP90 に結合した状態で2本鎖 siRNA をとりこみ、HSP90 による ATP の加水分解をきっかけに2本鎖 siRNA を1本鎖化して、保持した1本鎖 siRNA と相補的な RNA を切断する活性を獲得することを明らかにした。

さらに、ATP- γ S 存在下で形成された AGO1-HSP90 複合体を、AGO1 に付したタグを用いてアフィニティー精製すると、いくつかのタンパク質が共精製されることを見いだした。共精製されたタンパク質を SDS-PAGE のゲルから切り出してトリプシン消化後液体クロマトグラフィー-タンデムマスマ解析に供したところ、その多くは HSP90 のコシャペロンとして知られる TPR タンパク質であることが判明した。試験管内 RISC 形成系に試験管内合成したこれらのタンパク質を添加する実験から、これらコシャペロンのうち cyclophilin 40 (CYP40) は RISC 形成を促進し、protein phosphatase 5 (PP5) は RISC 形成を阻害することが明らかになった。また、CYP40 阻害剤 cyclosporine A を用いた実験などから、CYP40 は HSP90 を介して AGO1 に結合し、2本鎖 siRNA の AGO1 への結合を促進あるいは安定化する可能性が示唆された。一方、完成した RISC には HSP90 と CYP40 は結合していなかったことから、HSP90 による ATP 加水分解後、これらの分子は AGO1 から解離することがわかった (図1)。

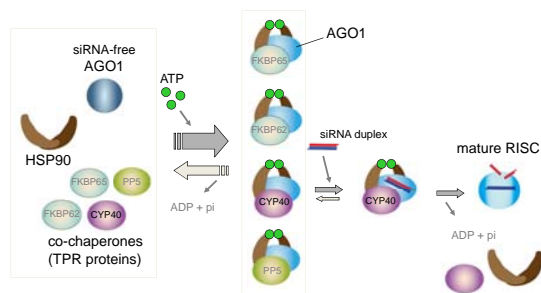


図1 植物 AGO1 RISC 形成機構モデル

また、BYL を用いた試験管内翻訳反応で合成した ToMV 130K タンパク質 (RNA サイレンシングサブプレッサー) を添加することにより、RISC 形成が阻害されることを示唆する結果を得た。これについて詳細に調べたところ、130K タンパク質により RISC 形成に必要な ATP が急速に分解されていることがその原因の少なくとも一部になっていることが判明し、ここでは生体内での RNA サイレンシング抑制機能との関連は明らかにできなかった。

本研究により、植物における RISC 形成の細かな分子機構がはじめて明らかになった。発表の時期を同じくして、ショウジョウバエの RISC 形成においても HSP90 が重要な役割を果たしていることが示され、これが動植物に共通の機構であることが示唆された。残念ながら、植物ウイルスによる RNA サイレンシングの抑制機構については深く掘り下げることができなかったが、解明に向けた準備は十分に整えられ、また新たに解明すべきポイントも明確になってきたことから、これらについては、発展的に計画した後継課題において追求したい。

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 3 件)

Taichiro Iki, Manabu Yoshikawa, Tetsuo Meshi, and Masayuki Ishikawa. (2012) Cyclophilin 40 Facilitates HSP90-mediated RISC Assembly in Plants. **EMBO J.** 31 (2): 267 – 278. (査読あり)

Taichiro Iki, Manabu Yoshikawa, Masaki Nishikiori, Mauren C. Jaudal, Eiko Matsumoto-Yokoyama, Ichiro Mitsuahara, Tetsuo Meshi and Masayuki Ishikawa. (2010) In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. **Mol. Cell** 39 (2): 282-291. (査読あり)

Atsushi Tamai, Koji Dohi, Masashi Mori, Tetsuo Meshi and Masayuki Ishikawa. (2010) Inducible viral inoculation system with cultured plant cells facilitates a biochemical approach for virus-induced RNA silencing. **Arch. Virol.** 155 (3): 297-303. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

Taichiro Iki, Manabu Yoshikawa, Tetsuo Meshi, and Masayuki Ishikawa.

Involvement of HSP90 and the cochaperones on plant RISC assembly. The 16th Annual Meeting of the RNA Society and the 13th Annual Meeting of the RNA Society of Japan. 2011 年 6 月 15 日、京都。

井木太一郎, 吉川学, 石川雅之. 植物 RISC 形成における HSP90 の役割 (招待講演). 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 2010 年 12 月 8 日、神戸。

Taichiro Iki, Manabu Yoshikawa, Masaki Nishikiori, Ichiro Mitsuahara, Tetsuo Meshi, Masayuki Ishikawa. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complex. EMBO Workshop 2010: Genomic approaches to interactions between plant viruses their hosts and their vectors. 2010 年 6 月 13 日、Fenestrelle (イタリア)。

井木太一郎, 吉川学, ジャウダル モーレン, 横山英子, 錦織雅樹, 光原一朗, 飯哲夫, 石川雅之. 植物における RNA-induced silencing complex の無細胞形成系の確立. 第 51 回日本植物生理学会年会. 2010 年 3 月 21 日、熊本。

[図書] (計 1 件)

井木太一郎, 石川雅之. 植物における無細胞 RISC 形成系の確立と分子シャペロン. HSP90 による RISC 形成の促進. ライフサイエンス新着論文レビュー (オンライン)。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯 哲夫 (MESHI TETSUO)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学
研究領域・領域長

研究者番号：40157813

(2)研究分担者

石川 雅之 (ISHIKAWA MASAYUKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学
研究領域・植物-微生物間相互作用研究ユニッ
ト・ユニット長

研究者番号：70192482

(3)連携研究者

なし