

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22687014

研究課題名（和文）RNAi 複合体積み込み因子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of the RISC-loading complex

研究代表者

泊 幸秀（TOMARI YUKIHIDE）

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90447368

研究成果の概要（和文）： siRNA や microRNA などの小分子 RNA は、Argonaute と呼ばれるタンパク質と RISC と呼ばれるエフェクター複合体を形成して機能する。本研究では、小分子 RNA 二本鎖を Argonaute に取り込まれる際に、Hsc70/Hsp90 を中心とするシャペロンマシナリーの働きが必須であることを示し、さらに、シャペロンを含む 7 つの因子によって RISC の形成過程を試験管内で再構成することに成功した。

研究成果の概要（英文）： Small RNAs including siRNAs and microRNAs act through formation of RNA-induced silencing complex (RISC), the core component of which is Argonaute family proteins. Here we show that the Hsc70/Hsp90 chaperone machinery is essential for loading of small RNA duplexes into Argonaute. Moreover, we established an in vitro reconstitution system for RISC assembly composed of seven protein factors including the chaperone machinery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2012 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
総計	19,000,000	5,700,000	24,700,000

研究分野：生化学

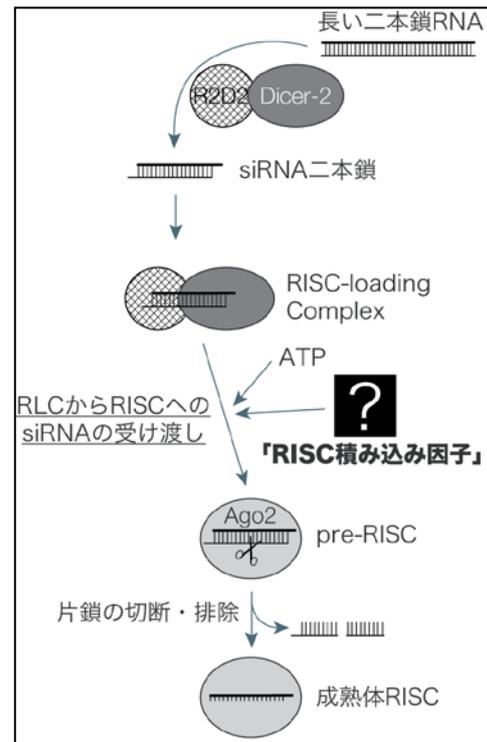
科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

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

small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) などの小分子 RNA が、一群の標的遺伝子の発現を抑制することによって、発生、分化、代謝、記憶などの高次生命現象におけるゲノム情報の発現制御に重要な役割を果たしていることが、近年急速に明らかになってきた。これらの小分子 RNA は、単独で機能するわけではなく、共通のエフェクター複合体である RISC (RNA-induced silencing complex) を介して、初めて標的の発現抑制が可能となる。よって、小分子 RNA の働きを考える時、RISC がどのようにして形成されるのか、そしてその形成にどのような因子が関与しているか、ということを明らかにすることは、喫緊の課題である。siRNA と miRNA は、共に 21 塩基程度の二本鎖 RNA であるが、siRNA は長い二本鎖 RNA から、miRNA はステムループ構造を取るヘアピン型 RNA から、それぞれ Dicer によって切り出される。これらの反応を総称して Dicing と呼ぶ。ショウジョウバエにおいて、siRNA 二本鎖は、まず RISC-loading complex (RLC) と呼ばれる複合体を形成する。RLC の役割は、文字通り、siRNA を RISC に積み込む(受け渡す)ことである。RLC には、Dicer-2(長い二本鎖 RNA から siRNA 二本鎖を切り出す酵素と同一のものである)と、R2D2 と呼ばれる二本鎖 RNA 結合タンパク質が含まれることが分かっているが、その他の構成因子は不明である。

RISC において中心的な役割を果たすのが、Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質である。ショウジョウバエでは、siRNA は Ago2 を核とする RISC に取り込まれる。RLC は、siRNA を二本鎖のまま Ago2 に積み込む(受け渡す)が、この二本鎖を含む状態を pre-RISC と呼ぶ。その後、Ago2 は片方の鎖を選択的に切断・排除し、もう片方の鎖が Ago2 内に残ることで、成熟体 RISC が作られる。siRNA による RISC 形成過程において、もっとも重要な段階は、Dicer-2 と R2D2 を含む RLC が、RISC の核となる Ago2 に siRNA 二本鎖を受け渡す段階である。実際、この反応には ATP が必要であり、RNA-タンパク質複合体のダイナミックな構造変化を伴うものであると予測される。しかしながら、この受け渡しが具体的にどのようなものであるかは全く分かっておらず、次項で述べる通り、この反応は既知因子だけでは起こらない。すなわち「RISC 積み込み反応」を触媒する因子は、大きな謎のまま残されていた。

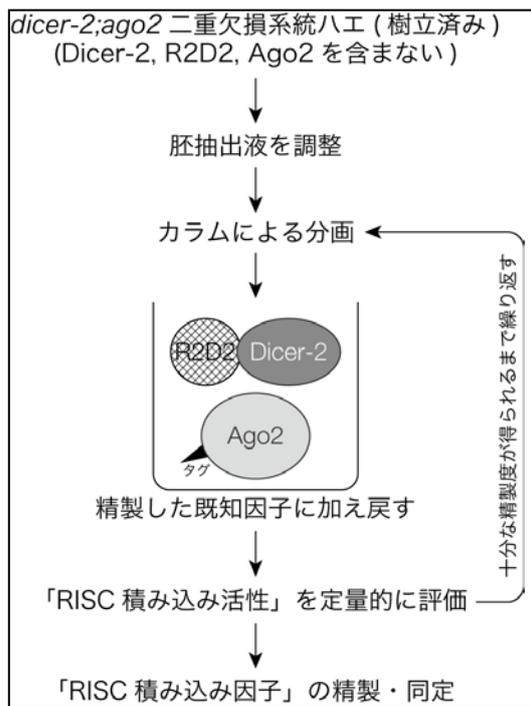


2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエにおいて RLC から RISC への siRNA の受け渡しを触媒している「RISC 積み込み因子」を同定し、その動作原理を解析することを目的とする。そのために、RISC 積み込み反応を定量的に評価できる独自の実験系と、カラムを用いた古典的な生化学的精製法を組み合わせることで、「RISC 積み込み因子」を直接精製する。さらには、ショウジョウバエ miRNA 経路における RISC 積み込み因子の探索・同定、およびヒト細胞における検証を行う。これらの研究により、RISC 形成過程における核心部分の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

これまでの我々の予備的知見から、ショウジョウバエ胚抽出液中に存在する未知因子が、siRNA の RISC 積み込み反応を直接触媒していることが明らかとなった。そこで、生化学的なカラム分画を行い、RLC の既知因子である Dicer-2 と R2D2 の二重欠失系統ハエ(樹立済み)由来の胚抽出液から、この「RISC 積み込み因子」を精製する。当該因子を精製後は、質量分析を用いて同定し、生化学的な機能解析を行う。



4. 研究成果

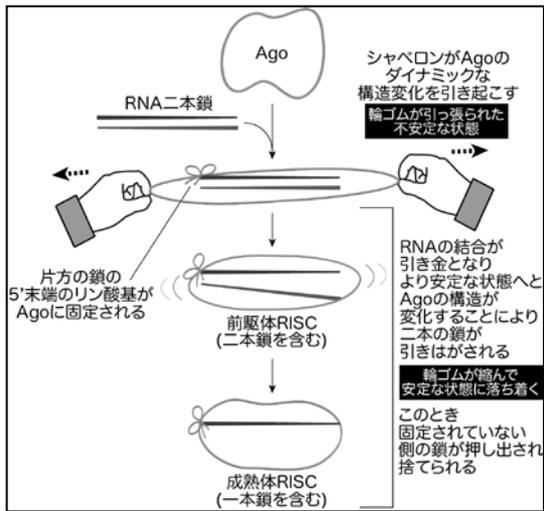
カラムクロマトグラフィーの結果、因子の単離にこそ至らなかったものの、精製の過程において Hsc70, Hsp90 およびそのコシャペロンが再現性良く観察され、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーこそが「RISC 積み込み因子」の本体であることが示唆された。そこで、Hsp70 や Hsp90 の阻害剤を用い、RISC 形成に与える影響を解析したところ、ATP 依存的な小分子 RNA 二本鎖の Argonaute への積み込みにはシャペロンマシナリーの働きが必須であるのに対し、積み込みの後の巻き戻し (片方の鎖が押し出され RNA 二本鎖が一本鎖化する過程) には、ATP もシャペロンマシナリーも必要では無いということが明らかになった。また、この現象は、ショウジョウバエとヒトにおける siRNA 経路と miRNA 経路の両方において保存された普遍的なものであることも明らかになった。

そこで、RISC 形成の試験管内再構成を試みた。リコンビナントタンパク質としてショウジョウバエ Hsc70-4 と Hsp90 を発現・精製し、すでに調製済みであった Dicer-2/R2D2 ヘテロダイマーと共に、免疫沈降精製した Argonaute2 に加えることで、RISC が形成されるかどうかを調べたところ、これらのタンパク質だけでは、小分子 RNA 二本鎖の Argonaute2 への取り込みは起きないことが明らかとなった。また、Argonaute2 に結合するタンパク質を網羅的に探索した際に同定された、Hop (Hsp70/Hsp90 organizing

protein) および DnaJ2 (J ドメインタンパク質の一種) という二つの Hsc70/Hsp90 のコシャペロンについても、リコンビナントタンパク質を調製し、反応系に加えたところ、わずかながら RISC 形成活性が確認された。しかし、その活性は、ショウジョウバエ胚あるいは S2 細胞の粗抽出液のものに比べてかなり低く、さらに不足する因子が存在することが示唆された。

そこで、RISC 形成と同様に Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーを必要とするステロイドホルモン受容体の成熟化の例を参考に、p23 と呼ばれる Hsp90 のコシャペロンをリコンビナントタンパク質として作成し、上記因子に加えて RISC 形成能を調べたところ、細胞粗抽出液と同程度の活性を呈するということが明らかとなった。すなわち、ショウジョウバエ Ago2 の RISC 形成は、Ago2, Dicer-2, R2D2 という既知因子に加え、Hsc70-4, Hsp90, Hop, DnaJ2 および p23 というシャペロン・コシャペロンを含む、合計 7 つの因子によって試験管内で再構成されるということが分かった。これにより、本研究の大きな目的である「RISC 積み込み因子」の同定は達成されたと考えられる。

なぜシャペロンマシナリーが小分子 RNA 二本鎖の Argonaute への積み込みに必要なのだろうか？ ATP の加水分解が必要であるということから考えて、積み込みという反応は単なるタンパク質と RNA の結合ではない。ATP と積み込みの関係を考察する上で参考になるのが、近年解かれた高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の Argonaute の立体構造である。この立体構造の解析からは、21 塩基程度の A-form helix を組む小分子 RNA 二本鎖は Argonaute に対して大きすぎ、小分子 RNA 二本鎖が取り込まれるはずの位置には収まりきらない、ということが示唆される。よって、Argonaute が 21 塩基程度の小分子 RNA 二本鎖を取り込むためには Argonaute の大規模な立体構造変化が必要であることが推察される。我々は、ATP の加水分解が、まさにこの Argonaute の大規模な立体構造変化を引き起こす駆動力になっている、というモデルを提唱した(次ページ)。



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4件)

1. Kawamata T, Tomari Y. **Making RISC.** *Trends Biochem Sci.* 査読有, 2010. 35, 368-376.
2. Iwasaki S, Kobayashi M (equal contribution), Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. **Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes.** *Mol Cell.* 査読有, 2010. 39, 292-299.
3. Kawamata T, Tomari Y. **Native gel analysis for RISC assembly.** *Methods Mol Biol.* 査読有, 2011. 725, 91-105.
4. Tsutsumi A, Kawamata T, Izumi N, Seitz H, Tomari Y. **Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1.** *Nat Struct Mol Biol.* 査読有, 2011. 18, 1153-1158.

[学会発表] (計5件)

1. Iwasaki S, Tomari Y. Chaperone Machinery is Required for RISC-loading. 19th CDB Meeting / RNA Sciences in Cell and Developmental Biology, 2010, 5/10-12, Riken CDB, Kobe, Japan
2. Tomari Y. Chaperoning RISC Assembly. Keystone Symposia Mechanism and Biology of Silencing, 2011, 3/20-25, Monterey, USA
3. Iwasaki S, Tomari Y. In vitro Reconstitution of RISC Assembly Mediated by Hsc70/Hsp 90 Chaperone Machinery. The 16th Annual Meeting of RNA Society, 2011, 6/14-18, Kyoto,

Japan

4. Tomari Y. How to make RISC. Furano Conference, 2012, 3/4-8, Furano, Japan

5. 泊 幸秀. RNA サイレンシング複合体の形成と機能. アンチセンス・遺伝子・デリバリー合同シンポジウム, 2012, 9/24-26, 仙台市民会館, 宮城県, 日本

6. 研究組織

(1)研究代表者

泊 幸秀 (TOMARI YUKIHIDE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号: 90447368