

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770174

研究課題名（和文） 内在性小分子 esiRNA 機能にかかわる核内外輸送機構の役割

研究課題名（英文） The molecular mechanism of the endogenous siRNA biogenesis

研究代表者

三好 啓太 (MIYOSHI KEITA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20423395

研究成果の概要（和文）：本研究では、内在性小分子 RNA の一種である endogenous siRNA (esiRNA) 生合成機構の解明を目指した。esiRNA は主にトランスポゾンの発現抑制に機能し、ゲノム品質管理に必須な因子と考えられている。小分子 RNA 研究に優れたモデル生物であるショウジョウバエを用い、esiRNA 生合成因子の細胞内局在性とその機能との関連を明らかにした。また esiRNA 生合成関連因子の変異体を作成し、各因子の局在及び機能における重要領域を同定した。

研究成果の概要（英文）：Small RNAs provide specificity to protein effector complexes that repress mRNA transcription or translation, or catalyze mRNA destruction. In this research program, we tried to gain a better understanding of the molecular mechanisms underlying the endogenous siRNA (esiRNA) biogenesis. Using *Drosophila* cell, we found a novel cytoplasmic granules which contains the esiRNA biogenesis proteins and that this granule is necessary for the specific association between esiRNA and the effector complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA サイレンシング、RNA 干渉、細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

塩基配列特異的な遺伝子発現抑制機構である RNA サイレンシングは、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。本機構の引き金因子となる小分子 RNA は、サイレンシング活性を持つ作動複合体 RISC (RNA induced silencing complex) を標的 RNA へと導く役割を担う。

内在性小分子 RNA の一種である esiRNA は、

ゲノム上のトランスポゾン (TE) 領域もしくは反復配列領域から転写された二本鎖 RNA からプロセッシングを受けて、約 21 塩基の一本鎖小分子 RNA に成熟し、RISC 中核因子である Argonaute 蛋白質の一つ AGO2 に取り込まれる。esiRNA/AGO2 複合体 (esiRISC) は、esiRNA 配列に対して相補鎖を含む標的 RNA を特異的に認識し、切断する。esiRNA を介した遺伝子発現抑制機構は、主に TE 抑制によるゲノム品質管

理機構である。

これまでにショウジョウバエ *esiRNA* 生合成関連因子として、*Dcr-2*、*R2D2*、*Loqs* および *AGO2* が同定されていた。これまでに *Dcr-2* および *Loqs* が細胞質における *esiRNA* 前駆体のプロセシングに、*Dcr-2* *R2D2* 複合体が *esiRNA* の *AGO2* への受け渡しに必須であることが明らかになっていた。しかし、それらの細胞内局在性や細胞内輸送、他の RNA サイレンシング機構である *microRNA* (*miRNA*) 機構との交差性などの詳細については明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生化学的および細胞生物学的手法を用いて、新規 *esiRNA* 生合成因子の同定および既知因子 (*Dcr-2* と *R2D2*) の細胞内局在性の観察を行い、どのように *esiRNA* 生合成が細胞内で行われているのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 既知 *esiRNA* 生合成因子と相互作用する新規関連因子の同定および機能解析: *esiRNA* 生合成因子である *Dcr-2* および *R2D2* に対するモノクローナル抗体を所属研究室で作成し、免疫沈降法により、*Dcr-2* 複合体および *R2D2* 複合体の単離・精製を行った。その後、質量分析法によりそれぞれの相互作用蛋白質の同定を行った。新規因子の機能解析の為、各因子を RNA 干渉法 (*RNAi*) により、ショウジョウバエ *S2* 培養細胞内で欠失させ、*esiRNA* の生合成量の変化をノザン解析により観察し、それらが *esiRNA* 生合成に関与するかを解析した。

(2) *Dcr-2* および *R2D2* の細胞内局在性の観察とその局在性の役割:

抗 *Dcr-2* および抗 *R2D2* モノクローナル抗体を用いて、細胞内局在性の観察を行った。これらにより細胞質において顆粒状構造体に共局在することを明らかにした。そこで、本顆粒状構造体と既知の細胞質顆粒状構造体の比較を行うとともに、どのように顆粒体が形成されるのか、顆粒状構造体形成の意味について、*Dcr-2* 及び *R2D2* 欠失変異体を作成し、分子生物学的手法によりそれらの顆粒状構造体形成と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 既知 *esiRNA* 生合成因子と相互作用する新規関連因子の同定および機能解析:
抗 *Dcr-2* 抗体を用いた免疫沈降解析から、核

膜孔因子 *Nup214/Nup88* および核細胞質輸送因子 *RanPB5* を同定した。*esiRNA* はゲノムからの転写産物を前駆体とし、細胞質において *Dcr-2* によるプロセシングを受けて 21 塩基程度の二本鎖 *esiRNA* に切断される。その後、細胞質において *Dcr-2* *R2D2* *AGO2* 複合体により一本鎖化された *esiRNA* が *AGO2* と複合体を形成し活性中心複合体 *esiRISC* が合成される。これまで *esiRNA* 前駆体の同定や核内における *esiRNA* プロセシングの有無については明らかにされていない。*Dcr-2* 結合因子として、細胞質側に局在する核膜孔蛋白質 (*Nup214/88*) を取得したことから、*esiRNA* 生合成における核外輸送経路の解明が期待された。しかしながら *RNAi* による各因子ノックダウン *S2* 細胞では、*esiRNA* 生合成量の変化は観察されなかった。つまり、*Dcr-2* の核膜への局在は *esiRNA* 生合成以外に必要であると考えられる。最近、*Dcr-2* が核内に局在し、*AGO2* と共に転写レベルの遺伝子発現制御に関与することを報告した(発表論文①)。本機構における *Dcr-2* の核内移行に、*Nup214/88* および *RanBP5* が関与する可能性が予測される。

一方、*R2D2* 免疫沈降物から、数種の相互作用因子を同定した。これらの中に *Dcr-2* は含まれていたが、核膜孔関連因子は含まれていなかった。同定した相互作用因子について、*RNAi* 法によるノックダウンを行い、*esiRNA* の存在量を解析したが、大きな変化は観察されなかった。これらの因子群は、*esiRNA* 生合成後の *esiRISC* の機能に関与すると考えられる。

(2) *Dcr-2* および *R2D2* の細胞内局在性の観察とその局在性の役割:

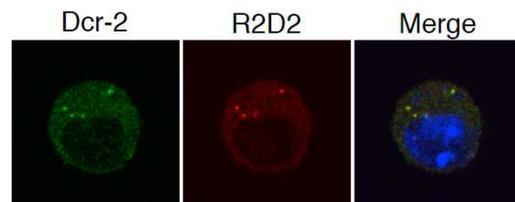


図1 D2-body

Dcr-2 が核膜孔蛋白質と結合することから、ショウジョウバエ *S2* 細胞および卵巣細胞において、*Dcr-2* の細胞内局在性を観察した。予想に反し、核膜周辺への局在があまり観察されず、細胞質に顆粒状構造体として観察された(図1)。また *Dcr-2* と *R2D2* は本顆粒状構造体に共局在することが明らかになった。既知の細胞質顆粒状構造体マーカー (*P-body*、*Stress Granule*、*ゴルジ体* 及び *U-body*) とは共局在しなかったことから、新規顆粒体であると判断し、*D2-body* と名付けた。*D2-body* は *R2D2* ノックダウン細胞で消失したことから、*R2D2* 依存的に形成されると考えられる。つぎに、*Dcr-2* 及び *R2D2* の欠失変異体を作製し、それらの細胞内局在性を観察した。その結果、

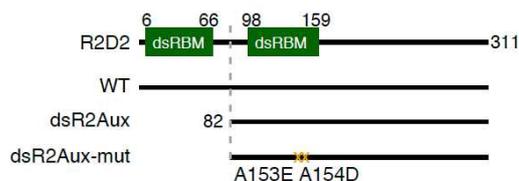


図2. R2D2野生型および変異型

Dcr-2 (全長 1722 アミノ酸) の N 末端 572 アミノ酸領域が顆粒状構造体を形成し、N 末端 207 アミノ酸領域は顆粒状構造体を形成しなかった。この結果は、R2D2 との相互作用と相関性が観察されたことから、Dcr-2 の D2 body 局在は R2D2 との結合に依存することが明らかとなった。一方、R2D2 においては、野生型 (R2D2-WT) および N 末端欠損変異体 (R2D2-dsR2Aux: 82-311 アミノ酸) によって D2 body が形成されることが明らかとなった。また、Dcr-2 ノックダウン細胞においても、R2D2-dsR2Aux は顆粒状構造体を形成した。R2D2 は二つの二本鎖 RNA 結合ドメインを持つ。二本鎖 RNA 結合ドメインに保存されたアミノ酸の置換変異体 (A153E A154D: R2D2-dsR2Aux-mut) は D2 body を形成しなかった。これらの結果から、二本鎖 esiRNA 依存的に D2 body が形成されることが考えられる。

ショウジョウバエにおいて、恒常的に機能している内在性小分子 RNA は二種類存在し、それらは esiRNA とマイクロ RNA (miRNA) である。miRNA 前駆体は Dcr-1 により約 23 塩基長の二本鎖 RNA に切断され、一本鎖化された成熟型 miRNA は Argonaute 蛋白質の一つ AGO1 と相互作用し、miRISC を形成し、主に転写後レベルにおける遺伝子発現制御に機能する。最近、*r2d2* 欠損変異体では、AGO2 特異的に結合する esiRNA が AGO1 に結合することが報告された。本研究においても、S2 細胞において内在性 R2D2 を RNAi 法によりノックダウンすると、AGO1 に相互作用する esiRNA (esiR-si-1) の量が増加することが示された。言い換えれば、D2 body 形成されない状況下において、esiRNA と AGO2 の特異的な相互作用が失われた。R2D2-WT もしくは R2D2-dsR2Aux (図 2) を内在性 R2D2 ノックダウン細胞で過剰発現させると D2 body 形成は回復するが、R2D2-dsR2Aux-mut では回復しないことが明らかとなった。現在、R2D2 ノックダウン細胞における esiRNA の間違っ た AGO1 への結合が、D2 body 形成可能な R2D2-dsR2Aux によって抑制できるか検討している。R2D2 ノックダウン細胞の esiRNA の受け渡し異常を R2D2-dsR2Aux が抑制し、R2D2-dsR2Aux-mut が抑制しなければ、我々の仮説を一層強く支持すると考え、さらに解析を進めている。

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)

Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., Sardo, F.L., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., Siomi, M.C., Carninci, P., Gilmour D.S., Corona D.F.V., and Orlando, V. Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature*, 480: 391-395 (2011)、査読有

Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., Siomi, M.C. Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and micro RNA biogenesis pathways in *Drosophila*. *RNA*, 16: 506-515 (2010)、査読有

Miyoshi, K., Miyoshi, T., Siomi, H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular Genetics and Genomics*, 284: 95-103 (2010)、査読有

[学会発表](計 8 件)

荻野あきよ、三好啓太、塩見美喜子、塩見春彦、R2D2 plays a role in endogenous siRNA loading onto Argonaute2 in novel cytoplasmic Dicer-2 bodies in *Drosophila*. 第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜パシフィコ、12.15. 2011

Miyoshi, K., Ogino, A., Siomi, M.C., Siomi, H. A role of novel cytoplasmic R2D2 body in esiRNA biogenesis in *Drosophila*. 第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜パシフィコ、12.14. 2011

Miyoshi, K., Ogino, A., Siomi, H., Siomi,

M.C. Role of Loqs PD in the esiRNA precursor processing in *Drosophila*. Cell Symposia: Regulatory RNAs, Wyndham Hotel, Chicago, USA, Oct. 10-12. 2011
Miyoshi, K., Ogino, A., Siomi, M.C., Siomi, H. Roles of Dicer2 partners, R2D2 and Loqs PD, in the esiRNA biogenesis pathway in *Drosophila*. Sixteenth annual meeting of the RNA society, Kyoto international conference hall, JAPAN, Jun. 17. 2011

Miyoshi, K., Ogino, A., Siomi, H., Siomi, M.C. Specific requirement for Dicer2 and Loquacious PD isoform in endogenous small -interfering RNA biogenesis in *Drosophila*. Keystone symposia, Mechanism and Biology of Silencing, Portola Hotel & Spa, Monterey, California, USA, March 20-25, 2011
Miyoshi, K., Ogino, A., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., Siomi, M.C. The recognition of different Dicer-Loqs complexes to small RNA precursors in *Drosophila*. Exciting Biologies: Biology of Recognition, Sentosa Resort & Spa, SINGAPORE, Oct.8. 2010

三好啓太、三好智博、荻野あきよ、塩見春彦、塩見美喜子、ショウジョウバエ内在性 siRNA 生合成機構の解析、第 12 回 RNA ミーティング、一橋記念講堂、7. 27.2010
Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., Siomi, M.C. Specific requirement for Dicer2 and Loquacious PD isoform in endogenous small -interfering RNA biogenesis in *Drosophila*. Keystone symposia, RNA Silencing: Mechanism, Biology and Application, Keystone Resort, USA, Jan.14~19. 2010

[図書](計5件)

Miyoshi, K., Ogino A., Siomi, M.C.,

Siomi, H. Purification of the dFMR1-containing complexes using the Tandem Affinity Purification Method. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, in press (2012)

Miyoshi, K., Okada T.N., Siomi, H., Siomi, M.C. Biochemical analyses of endogenous Argonaute proteins immunopurified from living cells with anti-Argonaute monoclonal antibodies. *Methods in Molecular Biology*, 725, 29-43, Humana Press (2011)

Saito, K., Miyoshi, K., Siomi, M.C., Siomi, H.

The key features of RNA silencing. *RNA technologies and their applications*, 1-28, Springer (2010)

三好啓太

内在性 small interfering RNA の生合成経路と機能、実験医学 増刊「拡大・進展を続ける RNA 研究の最先端」vol. 28(10)、p. 84-89、羊土社、2010

三好啓太、塩見美喜子

RNA interference (RNAi) と micro RNA (miRNA): 概論、RNA 工学の基礎と応用、2010、p. 30-40、シーエムシー出版、2010

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/dmb/sindex.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 啓太 (MIYOSHI KEITA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20423395