

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24248010

研究課題名(和文)植物におけるRNAサイレンシング増幅機構の解析

研究課題名(英文)Molecular analyses of RNA silencing amplification system in plants

研究代表者

飯 哲夫(Tesuo, Meshi)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・その他部局等・その他

研究者番号：40157813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物では、RISC複合体によって切断されたRNA断片を鋳型としたRNA合成を経て二次的siRNAの生成が起きる。この過程はRNAサイレンシングの増幅と呼ばれ、ウイルスに対する防御に重要である。我々は、miRNA173を含んだRISC切断RNA断片から生じるtrans-acting siRNA(tasiRNA)をモデルとして、二次的siRNA生成機構を解析した。まずin vitro解析により、SGS3がRISC切断RNAの安定化に機能していることを明らかにした。また、非コードRNAと考えられていたtasiRNA前駆体RNAにリボソームが結合することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plants have an RNA silencing amplification system, in which secondary small interfering RNAs (siRNAs) are produced from RISC-cleaved RNAs. This system plays a crucial role in virus resistance. To elucidate the molecular mechanisms of RNA silencing amplification, we analyzed Arabidopsis microRNA173-triggered trans-acting siRNA production using an in vitro RISC formation system. We discovered that SGS3 forms a complex that contains AGO1 and cleaved RNAs, and stabilizes RISC-cleaved RNAs. We also found that ribosomes associate with TAS2 RNA that had been thought to be non-coding. Further, we showed that a short open reading frame (ORF) that encompasses the microRNA173 target site on TAS2 RNA positively regulates production of tasiRNAs.

研究分野：植物保護学

キーワード：RISC複合体 trans-acting siRNA microRNA リボソーム ウイルス サプレッサー

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系をもたない植物にとって、RNAサイレンシングはウイルスに対する主要な防御機構の一つである。一方植物ウイルスはサプレッサーと呼ばれるRNAサイレンシング機構を阻害するタンパク質をゲノムにコードしている。植物ウイルスに対するRNAサイレンシングによる防御機構は、まず複製過程などで生じたウイルス由来の二本鎖RNAからDICER-LIKE (DCL) の働きにより small interfering RNA (siRNA) が生じることから始まる。次に、この siRNA が ARGONAUTE1 (AGO1) に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC 複合体) を形成する。そして RISC 複合体は、複合体に含まれる siRNA に相補的な配列をもつウイルス RNA を切断し、切断された RNA は速やかに分解される。しかし、RISC 複合体に含まれる siRNA が 22 塩基である場合、RISC 複合体によって切断された RNA は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼにより長鎖二本鎖に変換され、これを DCL がプロセスすることにより、ウイルス RNA に相補的な新規 siRNA (二次的 siRNA) を生じる。この RNA サイレncing の増幅と呼ばれる機構により、植物は増殖速度が著しく速いウイルスに対抗している。

RNA サイレncing の増幅過程には SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3)、RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) などが関与していることが知られている。しかし、これらのタンパク質により RNA サイレncing の増幅がどのような分子メカニズムで起こるか、またサプレッサーがどのような作用機作で RNA サイレncing の増幅を阻害するかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの 22 塩基 microRNA173 (miR173) を含む RISC 複合体によって切断された *TAS1* や *TAS2* RNA は、切断された RNA 断片が SGS3 や RDR6 によって二本鎖に変換され、これを DCL4 がプロセスして新規 siRNA を生じる。この経路により生じる二次的 siRNA は、*trans-acting* siRNA (tasiRNA) と呼ばれる。tasiRNA 生成は、RNA サイレncing 増幅のモデルとされている。そこで我々は、miR173 と *TAS2* RNA を使った試験管内実験等により、RNA サイレncing 増幅の分子機構の解明を目指して解析を行った。

本研究を始めるにあたり我々は、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液で AGO1 を合成し、二本鎖 siRNA を添加すると RISC が形成され、相補的な RNA を切断する試験管内 RISC 複合体形成系を確立していた。そこで、本研究では、(i) この試験管内 RISC 複合体形成系をもとに試験管内で RNA サイレncing の増幅過程を再構成し、(ii) 当該経路における SGS3 や RDR6 などの役割を明らかにし、さらに (iii) RNA サイレncing 増幅にかかわる新規因子を同定することを目指した。また、

RNA サイレncing 増幅を試験管内で再構成できれば、様々なウイルスに由来するサプレッサーを反応液に加え、それらの阻害機構を解析できると考えた。

以上を総合して最終的には、RNA サイレncing 増幅過程の分子機構を解明し、植物のウイルス抵抗性の全貌を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験管内 RISC 複合体形成系について

我々は、タバコ BY-2 培養細胞プロトプラストからパーコール密度勾配遠心により、液胞を除去して得られる脱液胞化プロトプラストの破碎液 (BYL) が、ヌクレアーゼやプロテアーゼをほとんど含まず、翻訳等の反応を高効率で行えることを見いだしていた。そこで、BYL を用いた試験管内翻訳反応により AGO1 タンパク質を調製し、そこに二本鎖 siRNA を添加して RISC 複合体を形成させると、相補的な RNA を切断する活性が検出できた。

本研究では、この試験管内 RISC 複合体形成系を用いた生化学的実験を中心として研究を進めた。

(2) 試験管内翻訳系を用いたタンパク質間相互作用の解析

AGO1 や SGS3、RDR6 など相互作用が予測されるタンパク質に FLAG や myc などのタグを付加した mRNA を作製し、これを BYL に添加してそれぞれのタンパク質を調製した後、混合した。次にそれぞれのタグに対する抗体を結合したアフィニティー精製ゲルを加え、相互作用することが考えられるタンパク質が共精製されるかどうかをウエスタン解析で調べた。この際、RISC 複合体との相互作用では、加える小分子 RNA の種類や標的 RNA の相補性などを変化させた様々な条件下で目的タンパク質の共精製を解析した。

(3) シロイヌナズナ RNA サイレncing 増幅機構欠損変異体を用いた解析

シロイヌナズナでは、遺伝学的に tasiRNA 生成において機能する遺伝子が同定されてきた。そこで、それらの変異体から細胞粗抽出液調製し、生化学的解析を行った。また、これらの多重変異体を使った遺伝学解析を行った。

(4) アグロインフィルトレーションによる tasiRNA 生成解析

TAS2 RNA の変異体を作製し、tasiRNA 生成に重要な領域を明らかにするために、35S RNA プロモーター下流に miR173 前駆体遺伝子と *TAS2* 遺伝子の両方を持つプラスミドを構築した。このプラスミドを使い、アグロインフィルトレーションにより *Nicotiana benthamiana* で一過的に tasiRNA を発現させ、ノーザン解析により野性型と変異型 *TAS2* RNA からの tasiRNA 蓄積を比較した。同様に、ウ

ウイルスサプレッサーを共発現させることにより、この実験系における RNA サイレンシング増幅阻害効果を調べた。

4. 研究成果

(1) tasiRNA 生成の *in vitro* 解析

5' 突出二本鎖 RNA 結合活性を持つ SGS3 に着目して研究を行った。シロイヌナズナの遺伝学解析から、SGS3 は RISC 切断 RNA 断片の安定化に機能していることが示唆されていた。そこで、BYL を用いて miR173 と AGO1 を含む RISC 複合体と SGS3、RISC 切断 RNA それぞれとの相互作用を、試験管内 RISC 複合体形成系を使って調べた。その結果、22 塩基 miR173 と TAS2 RNA の両方が存在する場合、RISC-SGS3-切断 RNA の複合体が形成されるが、21 塩基に変えた miR173 または miR173 標的配列に変異を導入した TAS2 RNA の場合では、この複合体が形成されないことがわかった。これらのことから miR173 の 22 塩基目が RISC 複合体から突出し、この部分の 5' 突出二本鎖 RNA に SGS3 が結合することにより RISC-SGS3-切断 RNA 複合体が形成されると考えられた。

RNA サイレンシングの増幅過程で働く SDE5 の解析を行うために、大腸菌で組換えタンパク質の発現を試みた。しかし、全長での発現が困難であることがわかった。そこで、部分的に欠失させた SDE5 を発現させたところ、組換えタンパク質が得られたが、RNA 結合活性は見られなかった。

また、試行錯誤の末、ある条件下で RNA サイレンシング増幅活性を有する抽出液を得た。これにより、RNA サイレンシング増幅の生化学的解析が可能となった。

(2) RNA サイレンシングの増幅に機能するタンパク質とウイルスサプレッサーとの相互作用の解析

植物体を使った研究から、イネ縞葉枯ウイルスの p2 及びトマト黄化葉巻ウイルスの V2 が、SGS3 と相互作用することにより RNA サイレンシングの増幅を抑制することが提唱されている。そこで、これらの相互作用を確認するために、それぞれの宿主植物から SGS3 をクローニングし、それらの mRNA を BYL で翻訳してタンパク質を調製し、免疫沈降を行ったが相互作用は確認できなかった。次に、これらのタンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製し、tasiRNA の蓄積を調べたが、野生型と同様であった。また、*N. benthamiana* を使ったアグロインフィルトレーションにより miR173 と TAS2 RNA の一過的発現実験系においても、tasiRNA 蓄積の阻害は見られなかった。そこで、他のウイルスのサプレッサーを追加して調べたところ、イネ黄葉ウイルス P6 が RNA サイレンシング増幅において機能するタンパク質 RDR6 と相互作用すること、アグロインフィルトレーションによる一過的発現系において tasiRNA 蓄積を

阻害することがわかった。

(3) 植物体を用いた tasiRNA 生成の解析
tasiRNA の鋳型となる TAS2 RNA の様態を調べるために、tasiRNA 生成に異常をきたしたシロイヌナズナ変異体から細胞抽出液を調製し、密度勾配超遠心法により、TAS2 RNA の分布を調べた。その結果、ノンコーディング RNA と考えられていた TAS2 RNA は、miR173 を含む RISC 複合体による切断前に翻訳されており、また切断後の TAS2 RNA にはリボソームが結合したままであることがわかった。さらに、TAS2 RNA 上の開始コドンと終止コドンを調べたところ、miR173 標的配列を含む短いオープンリーディングフレーム(ORF)が存在することがわかった。そこで、この ORF の翻訳が tasiRNA の生成に重要であるかを調べるため、この ORF に終止コドンを導入した TAS2 RNA 変異体を作製し、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* で発現させ、tasiRNA の蓄積を定量した。その結果、miR173 標的配列から 15 塩基上流に終止コドンを導入した変異体で tasiRNA の蓄積が減少したことから、この ORF の翻訳が tasiRNA に重要であることが明らかになった。

また、シロイヌナズナの *sde5* 変異体を用いた遺伝学解析から、SDE5 が miR173 切断 RNA に作用するステップは、SGS3 の後、RDR6 の前であることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Yoshikawa M, Iki T, Numa H, Miyashita K, Meshi T, Ishikawa M. A Short Open Reading Frame Encompassing the MicroRNA173 Target Site Plays a Role in trans-Acting Small Interfering RNA Biogenesis. *Plant Physiol*. 171: 359-368 (2016). 査読有

Yoshikawa M, Iki T, Tsutsui Y, Miyashita K, Poethig R.S, Habu Y, Ishikawa M, 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3, *Proc Natl Acad Sci USA* 110:4117-4122, 2013, 査読有

Yoshikawa M, Biogenesis of trans-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants, *Genes Genet Syst* 88:77-84, 2013, 査読有

Ye R, Wang W, Iki T, Liu C, Wu Y, Ishikawa M, Zhou X, Qi Y, Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Arabidopsis Argonaute4/siRNA complexes, *Mol Cell*, 46:859-870, 2012, 査読有

[学会発表](計4件)

吉川 学, 飯 哲夫, 石川 雅之、trans-acting siRNA 前駆体 TAS2 の翻訳と trans-acting siRNA の生成経路の共役、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月、札幌

市

吉川 学、シロイヌナズナにおける tasiRNA 生成の分子機構、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月、富山市

Masayuki Ishikawa、Toward controlling tobamovirus multiplication、2012 FFTC-TUA International Seminar on Emerging Infectious Diseases of Food Crops in Asia、2012 年 10 月、東京都世田谷区

吉川学、井木太一郎、土生芳樹、石川雅之 SGS3 による切断 RNA-RISC 複合体の安定化、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012 年 7 月、仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯 哲夫 (MESHI, Testuo)

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)

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

吉川 学 (YOSHIKAWA, Manabu)

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・主任研究員

研究者番号：80391564

石橋 和大 (ISHIBASHI, Kazuhiro)

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・主任研究員

研究者番号：20611742