

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570044

研究課題名(和文)植物のダイサーの酵素活性と機能分化

研究課題名(英文)Enzymatic properties and functional divergence of plant Dicers

研究代表者

福原 敏行 (Fukuhara, Toshiyuki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90228924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：モデル植物シロイヌナズナの4種類の2本鎖RNA切断酵素ダイサー(DCL1～DCL4)の酵素活性および機能分化について解析した。DCL3は5'末端にアデニンもしくはウラシルを含み3'末端に1ないし2塩基の突出を有する短い2本鎖RNAを好んで切断すること、一方DCL4は長い平滑末端を有する2本鎖RNAを好んで切断することが判明した。また、DCL3とDCL4では、至適塩濃度、ATPの要求性などの酵素反応条件が異なることを明らかにした。この結果から、植物は酵素活性や基質特異性の異なるダイサーを用いることで、サイズと機能の異なるsiRNAを生合成し、異なる生体反応に対応・適応していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A model plant *Arabidopsis thaliana* has four distinct Dicer-like proteins (DCL1 - DCL4), which produce small RNAs of 21 to 24 nucleotides (nt) in length from long double-stranded RNA (dsRNA) precursors. DCL3 products, 24 nt siRNAs, function in RNA-directed DNA methylation, whereas DCL4 products, 21 nt siRNAs, function in RNA interference. To reveal how these four Dicers individually recognize long dsRNAs as substrates, in this study we biochemically characterized DCL3 and DCL4. DCL3 preferentially cleaves short dsRNAs with 5' phosphorylated adenosine or uridine and a 1 or 2 nt 3' overhang, whereas DCL4 cleaves long dsRNAs with blunt ends. Inorganic phosphate and NaCl enhance DCL3 activity but inhibit DCL4 activity. These results demonstrated that the substrate specificities of DCL3 and DCL4 differ distinctly, just as their *in vivo* functions differ.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：ダイサー シロイヌナズナ DCL3 DCL4 2本鎖RNA 小分子RNA 基質特異性

1. 研究開始当初の背景

植物には、4種類の2本鎖RNA切断酵素・ダイサーが存在し、遺伝子発現制御、トランスポゾンの転移抑制、ウイルス感染防御など多くの重要な生命現象に関わっている(表1)。これら4種類のダイサー(DCL1~DCL4)は、分子遺伝学的な解析から、それぞれが特異的な小分子RNA(マイクロRNA(miRNA)およびsmall interfering RNA (siRNA))を生成することが知られているが、それらの酵素活性や小分子RNAの生成機構については解明されていない(Bologna and Voinnet, 2014)。これらの小分子RNAは、それぞれ特異的なエフェクター複合体に取り込まれ特異的な生理機能を担うと考えられている(表1)。これまでの先行研究により、DCL1によるmiRNAの生成機構は、ある程度明らかにされているが、他の3種類のダイサー(DCL2~DCL4)によるサイズの異なる3種類(22, 24, 21塩基)のsiRNAの生成機構については全く解明されていなかった。これら3種類のダイサーにより生成される3種類のsiRNAは、異なるエフェクター複合体に取り込まれ、明確な機能分担がある(表1)。例えば、DCL3により生成する24塩基のsiRNAは、AGO4を含むエフェクター複合体に取り込まれ、DNAのメチル化(転写ジーンサイレンシング)に関与し、一方DCL4により生成する21塩基のsiRNAは、AGO1を含むエフェクター複合体に取り込まれ、mRNAの切断・不活性化(転写後ジーンサイレンシング)にはたらく(表1)。

表1 4種のダイサーの生成物とその機能

ダイサー	基質	生成物	機能
DCL1	ステムループを含む1本鎖RNA (Pol II)	21塩基 miRNA	遺伝子発現調節、発生制御
DCL2	完全な2本鎖RNA (Pol II)	22塩基 siRNA	ウイルス感染防御、環境ストレス応答
DCL3	完全な2本鎖RNA (Pol IV, RDR2)	24塩基 siRNA	トランスポゾンの転移抑制、DNAのメチル化、TGS
DCL4	完全な2本鎖RNA (Pol II, RDR6)	21塩基 siRNA	ウイルス感染防御、RNA干渉 (PTGS)、遺伝子発現制御

Pol II: RNAポリメラーゼII、PolIV: RNAポリメラーゼIV、TGS: 転写ジーンサイレンシング、PTGS: 転写後ジーンサイレンシング

本研究室は、モデル植物シロイヌナズナの芽生えの粗抽出液を用いてsiRNAを生成するダイサーの活性を簡便に検出する実験系を確立した。特にDNAのメチル化に関与する24塩基のsiRNAを生成するDCL3の活性、およびRNA干渉やウイルス感染防御に関与する21塩基のsiRNAを生成するDCL4の活性を簡便に効率よく検出することに成功した(Fukudome et al, 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、4種類のダイサー(特にDCL3とDCL4)の酵素活性・基質特異性を解析し、小分子RNAの生成機構を解明することで、ダイサーの機能分化を明らかにすることを目的とする。本研究により、ダイサーが生成する小分子RNAが関与する遺伝子発現制御、生殖細胞形成、トランスポゾンの転移抑制、ウイルス感染防御など重要な生命現象の一端を解明できることが期待される。

3. 研究の方法

2本鎖RNA切断(ダイサー)活性の検出(ダイサーアッセイ)

寒天培地で栽培した2週齢のシロイヌナズナ(野生型・コロンビアエコタイプ、*dcl3*変異体、*dcl4*変異体)を材料に、Fukudomeら(2011)の方法を用いて粗抽出液を調製し酵素画分とした。<sup>32</sup>Pで末端標識した30~50塩基対の2本鎖RNA(基質)1μl、5x反応バッファー4μlを、15μlの粗抽出液と混合し、22°Cで2時間反応後、フェノール・クロロフォルム処理、エタノール沈殿で反応産物(切断産物)のRNAを回収した。反応産物RNAは、尿素を含む15%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、ゲルを乾燥後、Typhoon FLA 7000イメージアナライザー(GE Healthcare)で解析した。

4. 研究成果

(1) DCL3は短い2本鎖RNAをDCL4は長い

## 2本鎖 RNA を好んで切断する

シロイヌナズナの粗抽出液を酵素画分、種々の末端構造を含む 37 塩基の 2本鎖 RNA および 500 塩基の 2本鎖 RNA を基質としてダイサーの活性を検出したところ、37 塩基の 2本鎖 RNA は DCL3 により切断され、500 塩基の 2本鎖 RNA は DCL4 により切断されることが分かった。さらに、30, 37, 50 塩基の 2本鎖 RNA を基質に用い、*dcl3* 変異体および *dcl4* 変異体由来の粗抽出液を酵素画分として用いた実験から、DCL3 は短い 2本鎖 RNA を好んで切断し 24 塩基の RNA を生成し、DCL4 は長い 2本鎖 RNA を好んで切断し 21 塩基の RNA を生成することが分かった (図 1)。

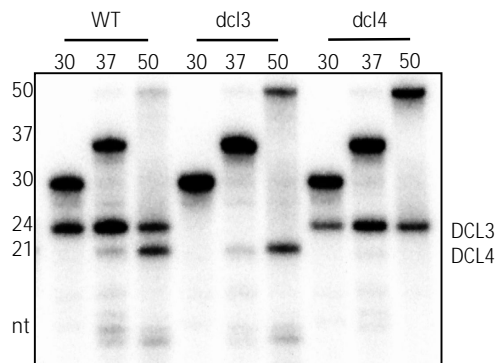


図 1 DCL3は短い 2本鎖RNAを好んで切断し、DCL4は長い 2本鎖RNAを好んで切断する  
シロイヌナズナの野生型(WT)、*dcl3*変異体、*dcl4*変異体由来の粗抽出液を用い、30, 37, 50塩基対の 2本鎖RNAを基質として 2本鎖RNA切断反応を行い、産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

## (2) DCL3 は 5' 末端にアデニンもしくはウラシルを含む 2本鎖 RNA を好んで切断する

次にリン酸化した 5' 末端ヌクレオチドを変えた 4 種類の 37 塩基対基質 2本鎖 RNA を用意し、DCL3 が 5' 末端ヌクレオチドを認識して切断するか検討した (図 2)。その結果、DCL3 は、5' 末端にアデニンおよびウラシルを含む 2本鎖 RNA を効率よく切断することが分かった。しかしながら、リン酸化した 5' 末端の塩基対にミスマッチを導入すると 5' 末端にグアニン、シトシンを有する 2本鎖 RNA も効率良く切断することから、末端の塩基対が不安定な 2本鎖 RNA を効率よく切断す

ることが分かった (図 2)。

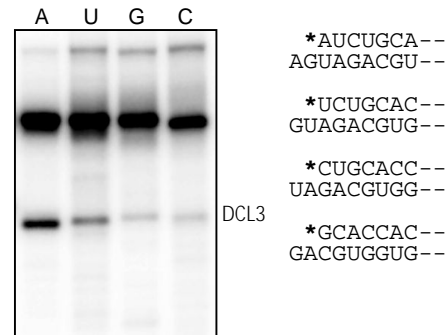


図 2 DCL3は5' 末端にアデニンもしくはウラシルを有する 2本鎖RNAを好んで切断する  
野生型の粗抽出液を用い、5' 末端のヌクレオチドを変えた 4 種類の 37塩基対 2本鎖 RNA (右) を基質として 2本鎖RNA切断反応を行い、産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (左) で解析した。

## (3) DCL3 は 1 ないし 2 塩基の 3' 末端突出を含む 2本鎖 RNA を DCL4 は平滑末端を含む 2本鎖 RNA を好んで切断する

細胞内で生成する 2本鎖 siRNA は、通常 3' 末端に 2 塩基の突出 (オーバーハング) 構造を有していることから、3' 末端の突出の長さを変化させた基質を用意してダイサーの活性を解析した。DCL3 は 1 ないし 2 塩基の 3' 末端突出を含む 2本鎖 RNA を、DCL4 は平滑末端を含む 2本鎖 RNA を好んで切断することが分かった (図 3)。

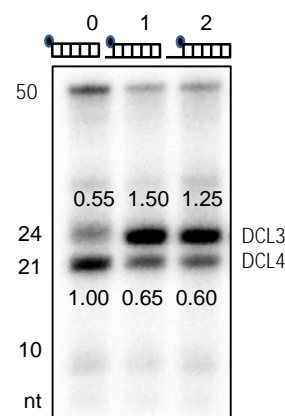


図 3 DCL3は3' 末端に 1 もしくは 2 塩基のオーバーハングを有する 2本鎖RNAを好んで切断し、DCL4は平滑末端を有する 2本鎖RNAを好んで切断する  
平滑、1 および 2 塩基 3' 末端突出の 50 塩基対 2本鎖RNAを基質、野生型シロイヌナズナ由来の粗抽出液を酵素画分に用いてダイサーの活性を解析した。数字は、2本鎖RNA切断産物 (バンド) の相対値を表す。

(4) DCL3 と DCL4 では至適塩濃度などの至適反応条件が異なる

これまでの研究で、DCL3, DCL4 は、基質 2 本鎖 RNA に対する特異性が異なることがわかった。そこで、反応条件を検討し、それぞれのダイサーの至適反応条件を検討した。DCL4 は反応にアデノシン 3 リン酸(ATP)を要求するが DCL3 は要求しないこと、DCL3 は至適塩濃度が 150 mM に対し、DCL4 は 0 mM であること(図 4)、反応溶液に無機リン酸(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)を添加すると、DCL3 の活性は上昇するが DCL4 の活性は阻害されることなど、DCL3 と DCL4 は、基質特異性以外にも酵素の性質が異なることが判明した。これまでの研究で明らかになった DCL3, DCL4 の基質特異性の違いを模式図で表した(図 5)。

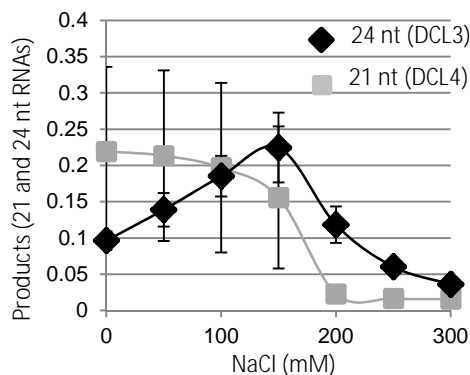


図 4 DCL3とDCL4は異なった至適塩濃度を有する

50塩基対 2本鎖RNAを基質、野生型シロイヌナズナ由来の粗抽出液を酵素画分に用いて隋 1 ~ 3 と同様にダイサー活性を解析した。グラフは、3回の反応の平均値

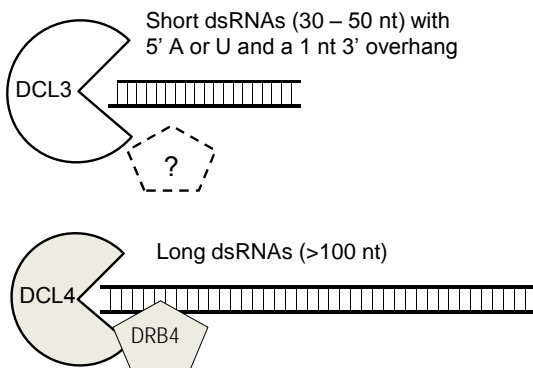


図 5 DCL3とDCL4の基質特異性の模式図

<考察>

植物には、4種類のダイサーが存在し、それぞれが生成する特異的な小分子 RNA(miRNA および 21, 22, 24 塩基の siRNA)は、それぞれ特異的なエフェクター(RISC)複合体に取り込まれ特異的な生理機能を担うと考えられている(表 1)。DCL3 により生成する 24 塩基の siRNA は、DNA のメチル化に関与し、DCL4 により生成する 21 塩基の siRNA は mRNA の切断にはたらくが、前駆体 2 本鎖 RNA が、どのように個々のダイサーに認識されているかは解明されていなかった。本研究により DCL3, DCL4 は、基質である 2 本鎖 RNA のサイズを認識し、短い 2 本鎖 RNA からは DCL3 により 24 塩基の siRNA が生成され DNA のメチル化にはたらく、長い 2 本鎖 RNA からは DCL4 により 21 塩基の siRNA が生成され mRNA (RNA)の切断にはたらくことが判明した。これは、(1) RNA ポリメラーゼ IV (Pol IV) が転写する RNA (DCL3 が生成する 24 塩基の siRNA の前駆体 2 本鎖 RNA の鋳型)は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II)が転写する RNA (DCL4 が生成する 21 塩基の siRNA の前駆体 2 本鎖 RNA の鋳型)より短いことや、(2) DCL4 が好んで切断するウイルス複製中間体 2 本鎖 RNA が、通常 1000 塩基対を超える長さであること等と良く一致する。

植物は酵素活性や基質特異性の異なる複数のダイサーを用いることで、サイズと機能の異なる siRNA を生合成し、異なる RNA サイレンシング経路の反応に対応・適応したことが示唆された。

<引用文献>

Bologna, N.G., and Voinnet, O. (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 473-503.  
 Fukudome, A., Kanaya, A., Egami, M., Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H. and Fukuhara, T. (2011)

Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the in vitro dsRNA-cleaving activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4. *RNA*, **17**, 750-760.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Nagano H., Fukudome A., Hiraguri A., Moriyama H. and **Fukuhara T.** Distinct substrate specificities of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4. **Nucleic Acid**

**Research** 42: 1845-1856 (2014) 査読有

Okada R, Yong CK, Valverde RA, Sabanadzovic S, Aoki N, Hotate S, Kiyota E, Moriyama H, and **Fukuhara T.** Molecular characterization of two evolutionally distinct endornaviruses co-infecting common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of**

**General Virology** **94** (1): 2191-2199 (2013) 査読有

Jeong IS, Aksoy E, Fukudome A, Akhter S, Hiraguri A, **Fukuhara T.**, Bahk JD, and Koiwa H. *Arabidopsis* C-terminal domain phosphatase-like 1 functions in miRNA accumulation and DNA methylation. **PLoS**

**One** **8**(9): e74739 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

Seta A., Nagano H., Fukudome A., Ohkama-Ohtsu N., Yokoyama T., Moriyama H. and **Fukuhara T.** Nutritional deficiency stresses affect DCL3 and DCL4 activities in *Arabidopsis thaliana*. 25th International Conference on *Arabidopsis* Research. Vancouver, CANADA (2014, 07, 30)

Nagano H., Fukudome A., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H. and **Fukuhara T.** Characterization of enzymatic properties of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4. 10th International Plant Molecular Biology Congress. Jeju, Korea (2012, 10, 21-26)

〔その他〕

ホームページ等

東京農工大学農学部細胞分子生物学研究室

ホームページ

<http://www.tuat.ac.jp/~mcb/>

東京農工大学研究要素集 RNA 干渉を担う 2 種類のダイサー(DCL3, DCL4)活性の簡便な検出

[http://www.rd.tuat.ac.jp/activities/factors/search/20140325\\_02.html](http://www.rd.tuat.ac.jp/activities/factors/search/20140325_02.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

福原 敏行 (FUKUHARA, Toshiyuki)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：90228924

(2)連携研究者

土生 芳樹 (HABU, Yoshiki)

独立行政法人農業生物資源研究所・農業先端ゲノム研究センター・主任研究員  
研究者番号：80266915

吉川 学 (YOSHIKAWA, Manabu)

独立行政法人農業生物資源研究所・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

石井 一夫 (ISHII, Kazuo)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：60449238

石川 英明 (ISHIKAWA, Hideaki)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：80625715

泉川 桂一 (IZUMIKAWA, Keiichi)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：60625713

古崎 利紀 (KOZAKI, Toshinori)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：60442828

(3)研究協力者

長野 秀昭 (NAGANO, Hideaki)

瀬田 淳 (SETA, Atsushi)