

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891006

研究課題名(和文)植物microRNAによる翻訳抑制機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of miRNA-mediated translational repression in plants

研究代表者

岩川 弘宙(Iwakawa, Hiro-oki)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：60710415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物のマイクロRNA(miRNA)は標的mRNAを切断するだけでなく標的の翻訳を抑制することが知られている。しかしながらmiRNA依存的な翻訳抑制の分子機構はこれまで明らかになっていなかった。本研究では、植物の培養細胞由来の試験管内系を用いることにより、miRNA依存的な遺伝子発現制御機構を生化学的に切り分けることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Plant microRNAs(miRNAs) can mediate the cleavage of their target mRNAs as well as the repression of their translation. However, the molecular mechanism underlying miRNA-mediated translational repression remains unknown. Here, by using an in vitro system prepared from plant culture cells, we biochemically dissected the mechanisms of miRNA-mediated gene silencing.

研究分野：生化学

キーワード：RNAサイレンシング 核酸 蛋白質 発現制御

1. 研究開始当初の背景

約 20-24 塩基の長さを持つ microRNA (miRNA) は RNase H 様エンドリボヌクレアーゼである Argonaute (AGO) と RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成し、相補的な配列を持つ標的 mRNA の遺伝子発現を抑制する。RISC 内の miRNA が標的と完全に相補的である場合 AGO の持つヌクレアーゼ活性によって標的 RNA は切断される。動物の RISC に取り込まれた miRNA は一部の配列のみを使って標的と結合するため、標的切断は通常引き起こさない。しかし、動物 RISC のコアタンパク質である GW182 を介して標的の翻訳開始段階を抑制し、PolyA 鎖短縮を介した mRNA の分解を促進することが知られている (図 1)。一方、植物には GW182 のホモログが存在せず、miRNA は標的 RNA とほぼ完全に塩基対を形成するため「切断」機構のみを用いて遺伝子発現制御が行われていると考えられてきた (図 1)。しかし近年、遺伝学的解析から標的 RNA の全ての分子が切断されるわけではなく、残りの標的 RNA は翻訳抑制を受けていることが明らかとなった (Brodersen *et al.*, 2008) (図 1)。しかしながら現在まで植物 RISC による翻訳抑制メカニズムは解明されていない。大きな理由の一つとして植物 RISC は翻訳抑制と標的切断の 2 つのサイレンシング経路を持つため翻訳抑制活性のみを評価することが困難な点が挙げられる。さらに 10 種類以上存在する AGO ホモログの存在が解析をより難しくしている。これらの問題を解決するには一種類の切断活性欠損変異 AGO にもみ任意の miRNA をプログラムして機能解析しなければならないが、植物体や培養細胞を用いた実験では前述のとおり現実性に乏しい。

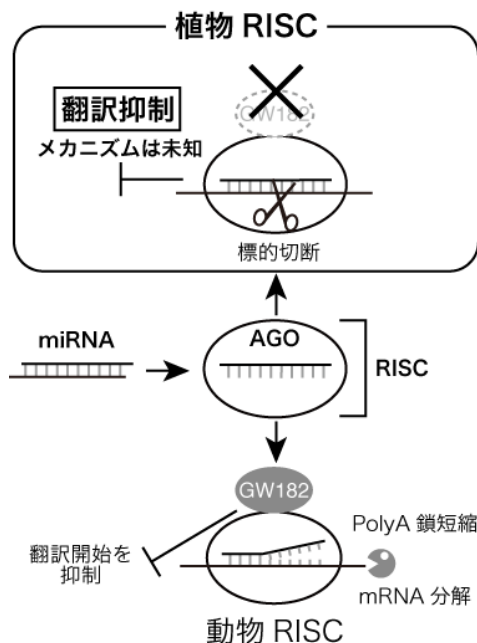


図 1. 植物・動物 RISC の機能

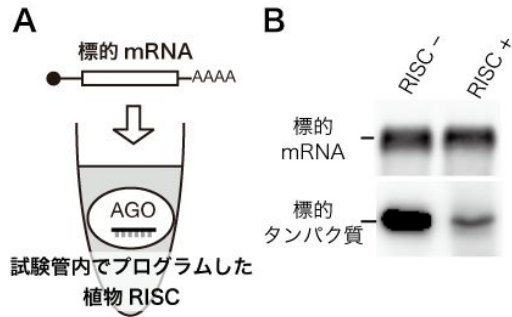


図 2. 試験管内翻訳抑制系 (A) 系の模式図 (B) 切断活性失活変異体 AGO を用いることで翻訳抑制のみを解析できる。標的 mRNA のノーザン解析 (上図) 標的タンパク質のウエスタン解析 (下図)。

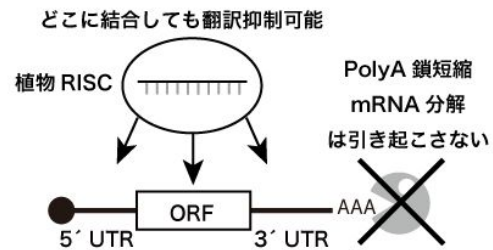


図 3. これまでの研究結果

申請者はこれまで、生体内の翻訳機構を忠実に再現できるタバコ培養細胞 BY-2 由来の試験管内系 (Komoda *et al.*, 2004, Iki *et al.*, 2010) およびモデル植物であるシロイヌナズナ培養細胞 MM2d 細胞由来の試験管内系 (Iwakawa *et al.*, 2012) を応用し、植物 RISC による翻訳抑制を生化学的に解析する基盤を作ることに成功している (図 2)。具体的には、試験管内で発現した活性欠損変異を有する植物 AGO に合成 miRNA をプログラムし切断活性を欠いた RISC を形成した後、標的配列を持つレポーター mRNA を加える事により翻訳抑制活性を評価する。これらの系では内在性 AGO には合成 miRNA は取り込まれないため試験管内で発現した RISC の機能のみを解析することができる。

試験管内系を用いる事により、これまで、植物 RISC は動物 RISC と異なり PolyA 鎖短縮活性がなく mRNA の分解も促進しないこと、miRNA と標的配列が高い相補性をもつ場合、5' 非翻訳領域 (UTR)、Open reading frame (ORF)、3' UTR のどの領域に RISC が結合しても強い翻訳抑制を引き起こすことを見出した (図 3)。

2. 研究の目的

動物 RISC とは異なり、すべての位置から翻訳抑制が可能である点 (動物 RISC は 3' UTR からのみ翻訳抑制可能)、動物の持つ翻訳抑制因子を欠く点より、植物 RISC は、動物 RISC と異なるメカニズムで翻訳を抑制していると考えられる。しかしながらそのメカ

ニズムは全くの解明されていない。本研究では、植物 RISC による翻訳抑制の作用点とその詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

標的 mRNA の各領域に結合した RISC が、翻訳のどのステップを抑制するかという情報を得るため、リボソーム-標的 mRNA 複合体のショ糖密度勾配遠心を行った。この方法で示唆されたステップを RISC が実際どのような機構で阻害しているかを調べるために、UV クロスリンク法といった古典的生化学を駆使し詳細な翻訳抑制メカニズムの解析を行った。実験は全て開発した植物由来の試験管内翻訳抑制系を用いた。

4. 研究成果

ショ糖密度勾配遠心法を用いることにより、植物 RISC が翻訳のどの段階を阻害しているかを解析したところ、植物 RISC は標的 mRNA のどの領域に結合しても翻訳の開始段階を阻害することが明らかとなった。

次に、RISC が ORF に結合した場合、翻訳伸長を阻害しているかを調べるために、N 末端に FLAG タグを持ち ORF の異なる位置に標的配列を持つ mRNA を設計した。もし RISC が ORF 上でリボソームの進行を止めることができるのであれば、FLAG タグに対するウエスタン解析によって、N 末端から標的配列までのアミノ酸からなる不完全な長さを持つタンパク質断片が蓄積するはずである。この仮説を支持するように、標的配列に完全に相補的な miRNA をプログラムした RISC を加えた場合、完全長のタンパク質蓄積が減少した一方で、おおよそ標的配列までの長さのタンパク質断片の蓄積が認められた。この結果はリボソームが標的配列の直前で止まっていることを示唆する。

以上より植物 RISC は翻訳開始を抑制するとともに、ORF に結合した場合、翻訳の伸長も阻害することが示唆された (図 4)。以上の結果は論文として発表した (Iwakawa and Tomari, 2013)

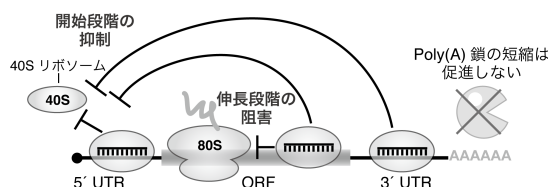


図 4. 植物 miRNA による翻訳抑制機構

RISC が実際どのような機構で翻訳の開始段階を阻害しているかをより詳細に調べるために、標的 mRNA 上の翻訳開始因子複合体の形成状態を観察可能な UV クロスリンク法を開発した。植物 RISC による抑制機構を調べ

る前に、翻訳機構が詳しく分かっている動物の系で開発した UV crosslink 法が使用可能であることを確かめた。その結果、標的 RNA 上の翻訳開始因子 eIF4E および eIF4A を特異的に観察できることが明らかになった。microRNA を加えると eIF4E のシグナルに変化はなかったが eIF4A のシグナルが減少することが示された。これらの研究は東京大学分子細胞生物学研究所 泊 幸秀教授、深谷 雄志博士とともに共同で行い、論文として発表した (Fukaya, Iwakawa and Tomari, 2014)。UV クロスリンク法を植物の系で用いたところ、動物 RISC 同様、植物の RISC も mRNA 上から eIF4E および iso4E を解離せずに標的の翻訳を抑制することが明らかとなった。

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)

1. Yayoi Endo, *Hiro-oki Iwakawa, *Yukihide Tomari, (*共責任著者)
Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly
EMBO Reports, 14(7), 2013, 652-658
査読あり
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.033.
2. Hiro-oki Iwakawa, *Yukihide Tomari
Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants
Molecular Cell, 52(4), 2013, 591-601
査読あり
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.033.
3. #Takashi Fukaya, #Hiro-oki Iwakawa, *Yukihide Tomari, (#同等貢献)
MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in Drosophila
Molecular Cell, 56, 2014, 67-78
査読あり
DOI: 10.1016/j.molcel.2014.09.004.

[学会発表](計 3 件)

1. 岩川 弘宙, 泊 幸秀
The mechanistic bases for microRNA-mediated translational repression in plants
第 86 回 日本生化学会大会
2013 年 9 月 11 日 ~ 2013 年 9 月 13 日
横浜
2. 岩川 弘宙, 泊 幸秀

植物 microRNA による翻訳抑制機構
第 16 回 RNA 学会年会
2014 年 7 月 23 日～2014 年 7 月 25 日
名古屋

3. 岩川 弘宙, 泊 幸秀
植物における microRNA を介した翻訳抑制機構
RNA フロンティアミーティング 2014
2014 年 9 月 16 日～2014 年 9 月 18 日
和歌山

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/tomari/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩川 弘宙 (IWAKAWA HIRO-OKI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：60710415