

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892025

研究課題名(和文) In Vitro再構成系を用いた植物マイクロRNA生成機構の解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of plant microRNA precursor processing

研究代表者

岩田 雄二 (Iwata, Yuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：80704965

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)：マイクロRNAは配列依存的にmRNAに結合しmRNA分解や翻訳抑制を引き起こす、真核生物において重要な遺伝子発現調節因子であり、植物においては、正常な発達、様々なストレス応答など、多様な生命現象において重要である。本研究では、シロイヌナズナのマイクロRNA生成に関与するタンパク質群を異種タンパク質発現システムにより調製し生化学的解析を行った。試験管内でのマイクロRNA生成反応や分子間相互作用アッセイにより、植物におけるマイクロRNA生成の分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miRNA) is a small non-coding RNA molecule found in eukaryotes that functions in regulation of gene expression by binding to mRNA in a sequence-dependent manner and causing mRNA degradation and/or inhibition of translation. We analyzed molecular mechanism of miRNA precursor processing in the model plant *Arabidopsis thaliana* by using purified recombinant proteins expressed in insect cells. We gained insights into how efficient miRNA precursor processing is carried out by the RNaseIII family endoribonuclease Dicer-Like1 (DCL1) and its associated proteins.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：microRNA シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は真核生物における重要な遺伝子発現調節因子である。miRNA は塩基配列依存的に mRNA に結合し mRNA 分解または翻訳阻害を引き起こすことで遺伝子発現を抑制する。植物においては、正常な発達、様々なストレス応答など多様な生命現象を制御する重要な遺伝子発現制御因子であることが明らかになっている。

植物において、miRNA はゲノム DNA にコードされている miRNA 遺伝子から RNA ポリメラーゼ II により一本鎖の miRNA 前駆体として転写される。ミスマッチを含む不完全な二本鎖折りたたみ構造をとり、5' キャップ構造や Poly(A) tail が付加されるのが特徴である。miRNA 前駆体は核内で Dicer-Like 1 (DCL1) タンパク質により二段階切断を受け、miRNA/miRNA* 二本鎖が生成される。その後、片方の鎖 (miRNA) が Argonaute 1 (AGO1) タンパク質に取り込まれ RNA Induced Silencing Complex (RISC) を形成し、細胞質において mRNA に結合することで mRNA の分解や翻訳阻害を引き起こすことで機能を発揮する (図を参照)。

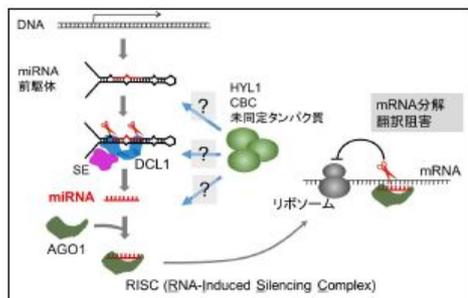


図 植物における miRNA 生成・機能のモデル図

シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析により、DCL1 による miRNA 前駆体のプロセシングには、二本鎖 RNA 結合タンパク質である HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)、ジンクフィンガータンパク質である SERRATE (SE)、Forkhead-associated (FHA) ドメインをもつタンパク質である DAWDLE (DDL) その他多くのタンパク質が必要であることが明らかになっている。一方、それらタンパク質がどのように協調して miRNA 生成に関与しているかに関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

申請者は、シロイヌナズナの miRNA 生成に関与するタンパク質について、精製タンパク質と miRNA 前駆体を調製し、*in vitro* 反応系を用いて miRNA 生成反応、タンパク質間相互作用、タンパク質 RNA 間相互作用を詳細に解析することで、植物における miRNA 生成の分子機構の詳細を明らかにすることを目的

とした。本研究においては、miRNA 前駆体を切断する RNaseIII ファミリーに属する RNA 分解酵素である DCL1 と、DCL1 と協調して働くことが示唆されているジンクフィンガードメインを持つタンパク質である SE に着目した。

また、SE と協調して機能することが示唆されている、RNA5' キャップ構造に結合するタンパク質複合体である Cap binding complex (CBC) にも着目した。CBC は、核内において、mRNA や miRNA 前駆体の 5' 末端に付加される 7-メチルグアノシンキャップ構造を認識して結合する、酵母、動物、植物など真核生物に広く保存されたタンパク質である。CBC は二つのタンパク質 Cap binding protein 80 (CBP80) と Cap binding protein 20 (CBP20) からなるヘテロ二量体である。先行研究により、これらの遺伝子を欠損するシロイヌナズナ変異体は、SE 遺伝子を欠損する変異体と非常に似た表現系を示すことが明らかになっていることから、SE と CBC は協調して miRNA 生成において機能することが推察された。そこで、シロイヌナズナの CBP80 と CBP20 の精製タンパク質を調製し、CBC の関与を *in vitro* 実験系により明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

- (1) シロイヌナズナの DCL1、SE タンパク質を、バキュロウイルス / 昆虫細胞による異種タンパク質発現系を用いて発現させた。具体的には、ヒスタグ、Strep-tag II、SUMOstar タグを N 末端側に付加した DCL1、SE タンパク質を昆虫細胞株 Sf9 でそれぞれ発現させた。粗タンパク質抽出液を調製し、ニッケルカラムとストレプトタクチンカラムを用いて精製した後 SUMOstar プロテアーゼ (Lifesensor 社) で切断した。再度ニッケルカラムにかけ、SUMOstar タグを除去すると共に SUMOstar タグを持たない DCL1、SE タンパク質を素通り画分に回収した。さらにゲル濾過カラムにかけ目的タンパク質を精製し、透析によりバッファー交換を行った。
- (2) シロイヌナズナの CBP80 と CBP20 を発現するコンストラクトを作製し、大腸菌異種タンパク質発現システムを用いてそれぞれ単独で発現、もしくは共発現させた。CBP80 は N 末端側にヒスタグ、C 末端側に Strep-tag II を付加したものを発現させた。また、CBP20 に関しては、N 末端側にヒスタグを付加したものを発現させた。タンパク質発現誘導後、粗タンパク質抽出を調製し、ニッケルカラム、ストレプトタクチンカラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムなどを用いて精製した。その後、透析によりバッファー交換を行っ

た。

- (3) Pri-miR167b を始めとする miRNA 前駆体をコードする遺伝子をシロイヌナズナ Col-0 のゲノム DNA を鋳型に PCR 法により増幅した。T7 プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによる in vitro 転写反応により RNA を調製した。その後、変性 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) により全長の miRNA 前駆体を含むゲル片を切り出し RNA を抽出し精製した。
- (4) In vitro での miRNA 前駆体切断反応は、基本的には以下の条件で行った。10 μ l の反応系 (20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 150 nM miRNA 前駆体, 50 nM DCL1, 240 nM SE) で 37 °C で 20 分間反応させた後、エタノール沈殿により RNA を回収した。変性 12%PAGE に供し、SYBR Gold (Life Technologies 社) 染色により RNA を検出した。
- (5) Surface Plasmon Resonance (SPR) による分子間相互作用の際には、まず、タンパク質は CM-5 チップ、RNA はビオチンでラベルしたものをストレプトアビジン (SA) チップに固定した。その後、DCL1 や SE タンパク質をインジェクトし、相互作用を検出した。

4. 研究成果

本研究の成果を箇条書きで記す。

- (1) 精製 DCL1 タンパク質は miRNA 前駆体を切断し miRNA/miRNA*二本鎖を生成する活性を有するがその活性は低く、精製 SE タンパク質の添加によりその活性は上昇すること、この上昇度合いは反応系の塩濃度により異なることが分かった。
- (2) 精製 DCL1 タンパク質は ATP 非存在下でも miRNA 前駆体を切断する活性を有していた。また、ATP 添加により切断活性の上昇が見られたが、その上昇度合いはわずかであった。
- (3) Surface Plasmon Resonance (SPR) 解析により、精製した DCL1 タンパク質と SE タンパク質は直接相互作用することを明らかにした。また、DCL1 と SE はそれぞれ RNA に直接結合することを示した。DCL1 と RNA の相互作用は比較的強いが、その一方、SE と RNA の相互作用は弱く、塩濃度に非常に感受性であることを示した。

- (4) SE はプロリン残基とアルギニン残基に富む N 末端ドメイン、ジンクフィンガードメイン、C 末端ドメインを持つ。精製 DCL1、SE タンパク質、miRNA 前駆体からなる in vitro 反応系において、ジンクフィンガードメインが、DCL1 の miRNA 前駆体切断活性に重要であることを示した。一方、N 末端ドメインと C 末端ドメインはこの反応系においては重要ではないことを示した。
- (5) DCL1 と SE の相互作用には、SE のジンクフィンガードメインが重要であることを明らかにした。一方、SE が RNA と相互作用するには N 末端ドメインが重要であることを明らかにした。
- (6) シロイヌナズナ CBP80 と CBP20 タンパク質をそれぞれ単独で大腸菌異種発現システムにより精製を試みた結果、CBP80 は精製に成功したが、CBP20 は可溶化画分にタンパク質は得られずほとんどが不溶化していた。一方、CBP80 と CBP20 を共発現させたところ、CBP80 だけでなく CBP20 も可溶化タンパク質として精製することが出来た。このことから、CBP20 は相互作用パートナーである CBP80 の存在下でのみ正しくフォールディングできることが示唆された。

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1件)

1. Yuji Iwata, Masateru Takahashi, Nina V. Fedoroff and Samir M. Hamdan (2013) Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and Dicer-Like 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Research* 41(19), 9129-9140. doi: 10.1093/nar/gkt667

[学会発表](計3件)

国際学会(計1件)

1. Yuji Iwata, Masateru Takahashi, Nina V. Fedoroff and Samir M. Hamdan, "Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing." Keystone Symposia - RNA Silencing - (Seattle, Washington, USA) 2014年2月2日.

国内学会 (計 2 件)

1. 岩田雄二、Nina V. Fedoroff、Samir M. Hamdan「シロイヌナズナの microRNA 生成因子 DCL1 と SE の生化学的解析」第 31 回日本植物細胞分子生物学会 (北海道大学札幌キャンパス・北海道) 2013 年 9 月 11 日.
2. Yuji Iwata、Nina V. Fedoroff、Samir M. Hamdan「Dissecting the interactions of SE with DCL1 and RNA in Arabidopsis microRNA biogenesis」第 55 回日本植物生理学会 (富山大学五福キャンパス・富山県) 2014 年 3 月 19 日.

〔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

<https://sites.google.com/site/pmbopu/people/yuji-iwata>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 雄二 (IWATA, Yuji)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80704965

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：