

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26113007

研究課題名(和文) ncRNA作動装置構築の分子動態解析基盤の開発

研究課題名(英文) Monitoring the molecular dynamics in the assembly of ncRNA machinery

研究代表者

泊 幸秀 (Tomari, Yukihide)

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：90447368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 135,500,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉を引き起こす本体であるRISCと呼ばれる複合体をモデルとして、ncRNA作動装置の形成と作用における分子ダイナミクスを、リアルタイムかつ定量的に一分子レベルで解析する技術の開発に成功した。これにより、RISCを構成するアルゴノートと呼ばれるタンパク質の形が、補助因子の助けを借りて大きく開かれた状態に変化し、小分子RNAを取り込んでやや開いた形で落ち着くまでのダイナミックな構造変化の過程や、RISCが標的RNAを素早く正確に見つけて切断するしくみなど、これまでの生化学的解析では調べることができなかった詳細な分子メカニズムが、一分子イメージングによって明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA干渉は、任意の遺伝子の発現を簡単にシャットダウンできるため、基礎生物学だけではなく、医薬への応用も進められているが、その分子レベルでの詳細なメカニズムはまだ完全に理解されているとは言えない。本研究によって、RISC形成や標的切断における律速段階を高い精度で同定し、それを突破するような配列デザインや化学修飾を行うことができれば、より高い効率で作用する小分子RNAの合理的設計が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Using the effector complex of RNA interference, called "RISC," as a model system, we developed new techniques that can monitor the molecular dynamics of ncRNA machinery in a real-time and quantitative manner at the single-molecule level. We used these techniques to study the dynamic structural changes of Argonaute proteins, the core of RISC. We found that the structure of Argonaute, which is closed in the empty state, is first opened by helper factors. After incorporating the small RNAs, Argonaute takes a fixed, semi-open structure. Moreover, our data provided molecular insights into how RISC can recognize and cleave their targets so quickly and accurately. In conclusion, single-molecule imaging allowed us to uncover these detailed molecular mechanisms, which were not readily approachable by conventional biochemistry.

研究分野：RNA生物学

キーワード：一分子イメージング RNA干渉 Argonaute RISC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 新学術領域「ノンコーディング RNA ネオタクソノミ」においては、個々のノンコーディング RNA (ncRNA) が有する機能を規定する配列・構造、修飾などの様々な特徴を「作動エレメント」として同定し、それらがタンパク質と共に形成する「作動装置」の作用機構を解明することを目指した。さらに、それぞれの作動エレメントによって獲得される ncRNA の生理機能を解明することによって、機能に根ざした作動エレメントによる ncRNA の新しい分類体系「ncRNA ネオタクソノミ」を確立し、体系的な機能解析を加速的に進めることを目的とした。
- (2) 本計画研究においては、ncRNA 作動装置の分子動態を解析できる技術を開発し、その詳細な動作原理を解明することを目的とした。そのモデルシステムとして、特に RNA 干渉に関わる ncRNA タクソン、小分子 RNA に注目した解析をすすめた。RNA 干渉は、Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質と小分子 RNA から成る作動装置(RNA-induced silencing complex; RISC) が、配列依存的に標的 mRNA を切断し抑制する重要な生命現象であり、創薬への応用も精力的に進められている。RISC の形成は、小分子 RNA が Ago に自発的に取り込まれて起こるのではなく、Hsc70/Hsp90 を中心とするシャペロンマシナリーの働きによる Ago のダイナミックな構造変化が必須であると考えられる。近年、一本鎖 RNA を含んだヒトや酵母の Ago の結晶構造から、形成された成熟体 RISC の安定なスナップショットが明らかにされたが、そこに至るまでの過程とその後の過程、すなわち、小分子 RNA がシャペロンマシナリーの力を借りながら Ago と機能的な作動装置を形成し、さらに mRNA の標的部位を認識して切断するまでの、中間状態の順序や構造変化の詳細は不明であった。
- (3) 研究開始当初の時点において、我々は、ショウジョウバエ Ago2 の RISC 形成経路において、「RISC 積み込み複合体」の既知構成因子である Dicer-2 と R2D2、および Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーを構成する 5 種類のシャペロン因子と ATP を用い、ショウジョウバエ Ago2 の RISC 形成過程を試験管内で再構成することに初めて成功し、その生化学的解析を進めていた。しかしながら、生化学的手法では、Ago に取り込まれた RNA の量や二本鎖・一本鎖の状態を定量的に評価することは可能であるものの、中間状態を単離することができないため、RISC 形成の各素過程の詳細を明らかにするには、生化学的手法だけではなく、新たな実験系、特に一分子イメージングを使った生物物理学的手法の開発が不可欠であるという結論に達していた。
- (4) 細胞内は非常に混み合った環境にもかかわらず、ncRNA 作動装置・作動反応場は、非常に効率的に動作している。その理由として、複合体や集積場の形成が鍵となっている事は分かってきていたが、なぜ複合体や集積場では、反応が効率的に動作しうるのかの理解は進んでいなかった。

2. 研究の目的

- (1) 上記のような背景を受け、本研究では、我々が独自に開発した RISC 形成の試験管内再構成系を最大限に活用し、基板上で RISC 形成の再構成を行い、一分子イメージングを行うことで、Ago に二本鎖 RNA が取り込まれ一方の鎖が捨てられるまでの一連のプロセスをリアルタイムかつ定量的に観察し、これまで不明確であった RISC 形成過程の分子ダイナミクスを明らかにすることを目的とした。
- (2) また、ガラス基板上に標的 RNA を固定化し、別途調製した RISC によって基板上で標的切断反応を行い、一分子イメージングを行うことで、RISC がどのようにして標的 RNA を正確に認識、切断、解離するのかということを一分子レベルで明らかにすることを目的とした。
- (3) RNA 干渉は、植物や昆虫などがウイルス等に抵抗するための重要な手段であるが、ウイルス側もホストの RNA 干渉に抵抗するため、サイレンシングサブレッサーと呼ばれるタンパク質を作ることが知られている。上記標的切断の一分子イメージング系を用い、ウイルスのサイレンシングサブレッサーの効果を一分子レベルで解析することにより、ウイルスがホストの RNA 干渉に対抗する分子基盤を明らかにすることを目的とした。
- (4) 人工的に ncRNA 作動装置・作動反応場を構築することで、動作原理の解明と合理設計の基盤技術開発を目的とした。特に、分子がナノメートル程度に非常に近接した際に、生化学反応にどのような影響を与えるかの解明を目指した。

3. 研究の方法

- (1) まず任意のタンパク質および小分子 RNA に、蛍光色素を導入する方法の開発を行った。タンパク質を 1 種類の蛍光色素で標識するためには、Halo タグや SNAP タグと呼ばれる、リガンドと特異的な共有結合を形成するタンパク質タグを、目的のタンパク質の末端に融合させ、蛍光標識されたりリガンドと混ぜることによって、高効率で蛍光標識できることを確認した。特に、Ago については、N 末端に Halo タグを融合させたコンストラクトが有効であることが明らかと

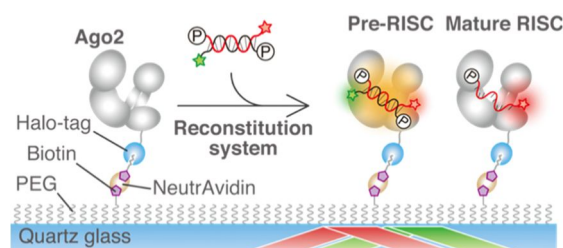
なった。このとき、代わりにビオチン化リガンドを用いることによって、ガラス基板上へのタンパク質の固定を行う方法も確立した。小分子 RNA については、蛍光色素修飾の位置をいくつか検討したところ、少なくともショウジョウバエの Ago2 については、ガイド鎖 3'末端に蛍光色素を付加しても RISC の形成や機能を阻害しないことが判明したため、その方法を用いることとした。また、蛍光色素標識した RNA を、ビオチンを介してガラス基板に固定する方法や、タンパク質や RNA のガラス基板への非特異的な吸着を抑制するための基盤表面処理方法やバッファー条件の最適化も行った。

(2) 一分子 FRET を利用してタンパク質のダイナミックな構造変化をとらえるためには、タンパク質内部の任意のアミノ酸 2 カ所に、別々の蛍光色素を部位特異的に導入することが必須である。これは技術的な難易度が非常に高い課題であるが、様々な試行錯誤を行った結果、以下の様な方法によって、ショウジョウバエ Ago2 の中の特異的なアミノ酸 2 カ所に 2 色の蛍光色素を高効率で導入する事に成功した。まず、蛍光色素を導入したい箇所に対応するコドン 2 カ所をアンバー終止コドンに置換したコンストラクトを準備する。これを、アンバーコドンと対合することによって終止コドンを読み飛ばすことができるサプレッサー-tRNA、サプレッサー-tRNA に EndoBCN-K と呼ばれる非天然アミノ酸を導入できるようなアミノアシル tRNA 合成酵素、さらには、サプレッサー効率を増強するためのドミナントネガティブ型翻訳終結因子が発現されるようなプラスミドと共にヒト HEK293 細胞にトランスフェクションし、EndoBCN-K 存在下で培養することにより、EndoBCN-K が 2 カ所導入された Ago2 タンパク質を精製する。精製後、蛍光色素標識されたテトラジンと EndoBCN-K とをクリックケミストリーによって結合させ、さらに精製を行う。この方法により、ショウジョウバエ Ago2 だけではなく他のタンパク質にも部位特異的に蛍光色素が導入できることを確認した。

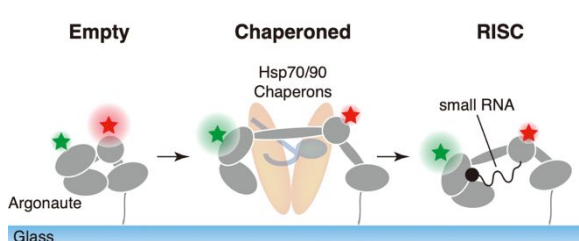
(3) 分子をナノメートル精度で配置可能な、DNA ナノ技術を用いる事で、人工的に ncRNA 作動装置・作動反応場を構築することを目指した。第一歩として、ncRNA を産生する転写系を人工的に集積化した転写ナノチップを構築した。この転写ナノチップ上において、標的遺伝子と、標的遺伝子から RNA を作る RNA ポリメラーゼの分子間距離をナノメートル精度で変化させ、転写活性の変化を調べた。

4. 研究成果

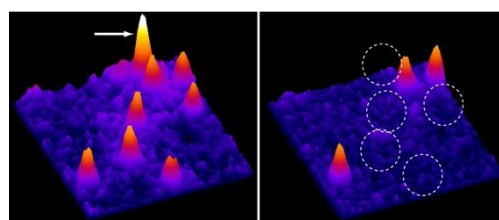
(1) Hsc70/Hsp90 を中心とするシャペロンマシナリーを含め、ショウジョウバエ Ago2-RISC の形成に必要な因子をすべて同定し、試験管内で RISC を完全再構成することに成功した。また、RNA 干渉の分子メカニズム解析に初めて一分子イメージングの手法を取り入れ、siRNA 二本鎖のそれぞれを蛍光色素で標識したものが、基板上に固定した Ago2 に結合解離する様子を一分子レベルで観察することによって、シャペロンは、siRNA:Dicer-2:R2D2 複合体と Ago2 との間の結合時間を大きく延長させることによって、RISC 形成を促進していることが明らかになった。(Nature. 2015)



(2) ショウジョウバエの Ago2 タンパク質に 2 色の蛍光色素を導入し、一分子 FRET 技術を用いることによって、RISC 形成過程においてアルゴノートがダイナミックに構造変化する様子を観察することに成功した。これにより、空の状態の Ago2 は閉じた形をとっているが、Hsp70/Hsp90 シャペロンマシナリーのはたらきにより、大きく開いた形に変化すること、また siRNA が取り込まれて RISC が作られた後はやや閉じた形で安定することが明らかとなった。また、Ago2 の構造を大きく開く際に、Hsp70 システムと Hsp90 システムの間で明確な役割分担があることも判明した。これは、Hsp70/Hsp90 シャペロンシステムが協調して作用することによって、クライアントタンパク質の形を変え、その機能を活性化するしくみを一分子レベルでとらえた初めての例であり、他の様々なクライアントタンパク質に対しても共通の原理を示唆するものであると考えられる。(Mol Cell. 2018)



(3) 蛍光標識した標的 RNA を基板上に固定し、別の蛍光色素で標識した RISC を作用させて一分子イメージングを行うことにより、RNA 干渉の機能複合体である RISC が標的となる RNA1 本 1 本を切断する様子をリアルタイムに観察することに成功した。これにより、RISC が標的 RNA を素早く



正確に見つけ出して切断し、さらに切断した標的 RNA を放出するしくみが明らかになった。
(*Mol Cell*. 2015)

(4) 上記標的切断の一分子イメージング系に、Cricket Paralysis Virus の CrPV-1A と呼ばれるサイレンシングサブレッサーを作用させて観察することにより、RISC が seed と呼ばれる領域の相補性を用いて、標的 RNA を認識する最初の段階が、CrPV-1A によって阻害されていることを見だし、ウイルスがホストの RNA 干渉に対抗する分子基盤を明らかにした。(*Nucleic Acids Res.* 2017)

(5) カイコにおいて、生殖細胞のゲノムを守る piRNA の 3'末端成熟化を司るエキソヌクレアーゼ「Trimmer」を同定した。(*Cell* 2016) のちに、マウスにおいても Trimmer のホモログである PNLDC1 が piRNA の 3'末端の削り込みに必須であることが明らかにされ(*EMBO Rep.* 2018、ほか 2 報)、piRNA の 3'末端成熟化のしくみは種を超えて広く保存されていることが示された。

(6) ショウジョウバエにおいて、microRNA が結合していない「空の」アルゴノートタンパク質を選択的にユビキチン化して分解に導く新規 E3 ユビキチンリガーゼを同定し、「イルカ」と名付けた。細胞内からイルカを無くすと、microRNA と結合できない品質の悪いアルゴノートが蓄積し、RNA サイレncing の効率が低下する。したがってイルカは、アルゴノートの品質管理に重要な役割を担っていると考えられる。(*Mol Cell*. 2019)

(7) ナノチップ上での解析から、転写活性は、標的遺伝子と RNA ポリメラーゼの間の距離に依存し、分子が近接した状況では実効濃度が向上し、反応効率が向上している事がわかった。また、この距離依存性を利用し、シグナルの有無で実効距離を変化させる事で、検出・演算・出力を自律的に行う、分子デバイス作製に成功した。そして、人工細胞内の microRNA 入力プロファイルに応じて、多様な出力 RNA を産生する遺伝子発現システムを実現した。(*Nat Nanotechnol.* 2018)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1. Iruka eliminates dysfunctional Argonaute by selective ubiquitination of its empty state.
*Kobayashi H, Shoji K, Kiyokawa K, Negishi L, *Tomari Y.
Mol Cell. 2019 Jan 3;73(1):119-129.e5. 査読有
2. Construction of integrated gene logic-chip.
Masubuchi T, *Endo M, Iizuka R, Iguchi A, Yoon DH, Sekiguchi T, Qi H, Inuma R, Miyazono Y, Shoji S, Funatsu T, *Sugiyama H, Harada Y, *Ueda T, *Tadakuma H.
Nat Nanotechnol. 2018 Oct;13(10):933-940. 査読有
3. Conformational activation of Argonaute by distinct yet coordinated actions of the Hsp70 and Hsp90 chaperone systems.
Tsuboyama K, *Tadakuma H, *Tomari Y.
Mol Cell. 2018 May 17;70(4):722-729.e4. 査読有
4. Biochemical and single-molecule analyses of the RNA silencing suppressing activity of CrPV-1A.
Watanabe M, Iwakawa HO, Tadakuma H, *Tomari Y.
Nucleic Acids Res. 2017 Oct 13;45(18):10837-10844. 査読有
5. Identification and functional analysis of the pre-piRNA 3' Trimmer in silkworms.
Izumi N, Shoji K, Sakaguchi Y, Honda S, Kirino Y, Suzuki T, Katsuma S, *Tomari Y.
Cell. 2016 Feb 25;164(5):962-73. 査読有
6. Single-molecule analysis of the target cleavage reaction by *Drosophila* RNAi enzyme complex.
Yao C, Sasaki HM, Ueda T, *Tomari Y, *Tadakuma H.
Mol Cell. 2015 Jul 2;59(1):125-32. 査読有
7. Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex.
Iwasaki S, Sasaki HM, Sakaguchi Y, Suzuki T, *Tadakuma H, *Tomari Y.
Nature. 2015 May 28;521(7553):533-6. 査読有

[学会発表] (計 29 件)

1. 泊 幸秀 “A conserved step-wise maturation mechanism of piRNAs”
EMBO Workshop: piRNAs and PIWI proteins (Montpellier, France) 2018 年 9 月
2. 泊 幸秀 “Iruka mediates selective degradation of unloaded Argonaute”

The 26th KOGO Annual Conference (Seoul, South Korea) 2017 年 9 月

3. 多田隈 尚史 “Construction of protein integrated nano-chip using DNA origami.”
Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies (Shanghai, China) 2017 年 8 月
4. 泊 幸秀 “Biochemical and genetic approaches to understanding the microRNA pathway”
Keystone Symposium (Colorado, USA) 2016 年 1 月
5. 泊 幸秀 “Dissection of RISC assembly and function by single-molecule imaging”
ComBio2014 (Malborne, Australia) 2015 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: プログラム可能な遺伝子発現システム

発明者: 多田隈尚史、増淵岳也、原田慶恵

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/044292

出願年: 平成 30 年

国内外の別: 国外

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 多田隈 尚史

ローマ字氏名: TADAKUMA, Hisashi

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 蛋白質研究所

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 10339707

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 佐々木 浩

ローマ字氏名: SASAKI, Hiroshi

研究協力者氏名: YAO, Chunyan

ローマ字氏名: YAO, Chunyan

研究協力者氏名: 坪山 幸太郎

ローマ字氏名: TSUBOYAMA, Kotaro

研究協力者氏名: 増淵 岳也

ローマ字氏名: MASUBUCHI, Takeya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。