

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14444

研究課題名(和文)二次的小分子RNA生成における反応モジュール間連動機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the inter-modular communication in the secondary siRNA biogenesis 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二次的小分子RNAを生み出す鍵因子であるRNA依存性RNAポリメラーゼ6(RDR6)の基質特異性を調べたところ、ポリA配列を持たない異常なRNAを特異的に相補鎖合成することを見出した。さらなる解析により、RDR6のRdRPドメインに非ポリA配列を好む性質が存在すること、ポリA配列はRDR6の相補鎖合成開始段階を阻害することを見出した。また、我々は二次的小分子RNA生成機構をタバコ細胞抽出液内で再現することに成功した。RDR6による効率の良い相補鎖合成には、AGO7-RISCの標的への結合と、SILENCING DEFECTIVE 5の試験管内翻訳が必須であった。

研究成果の概要(英文)：RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) is one of the key components for the secondary short interfering RNA (siRNA) biogenesis in plants. Here, we showed that RDR6 specifically converts aberrant non-polyadenylated (non-poly(A)) mRNAs into double-stranded RNAs, which are the precursors of siRNAs. We also demonstrated that the C-terminal RdRP domain of RDR6 possesses a preference for non-poly(A) sequences. Biochemical and biophysical experiments suggest that the poly(A) sequence inhibits the initiation step rather than the elongation step of complementary strand synthesis by RDR6. We have also successfully recapitulated the secondary siRNA biogenesis pathway in the tobacco cell extract. In this system, both the binding of AGO7-RISC to the target mRNA and in vitro translation of SILENCING DEFECTIVE 5 were required for the efficient complementary strand synthesis by RDR6.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNAサイレンシング siRNA microRNA 植物 自己・非自己認識

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) や short interfering RNA (siRNA) に代表される、21 塩基程度の長さを持つ小分子 RNA は、Argonaute (AGO) タンパク質と、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成し、標的 mRNA を切断または翻訳抑制することで様々な生命現象を緻密に制御している。植物は内在遺伝子発現制御機構、およびウイルス抑制機構として、RISC が切断した一部の標的 RNA から小分子 RNA を作り出す、二次的小分子 RNA 生成機構を持っている。これまでの遺伝学的研究および分子生物学研究より、この機構は RISC による「標的認識・切断モジュール」、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) による「相補鎖合成モジュール」、Dicer 様タンパク質 DCL4 による「二本鎖 RNA 切断モジュール」から形成されることが明らかになっている (図 1)。しかしながら、反応モジュール間の連動機構には多くの謎が

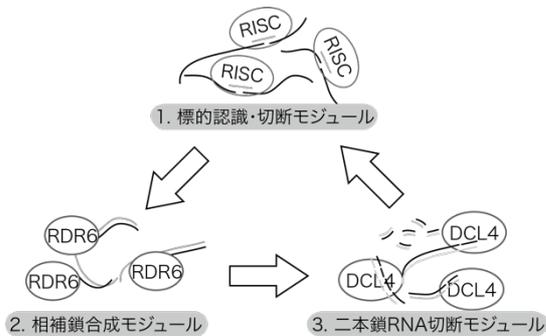


図1: 3つの反応モジュールが連動することで働く二次的小分子RNA生成機構

残されている。特に、なぜ RDR6 が特殊な RISC の標的 RNA のみを特異的に鋳型にし、その他の転写産物を鋳型にしないのかは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は多因子・多段階反応である二次的小分子 RNA 生成機構を試験管内で再構成し、反応モジュール間の連動機構を生化学的、生物物理学的に解析することで、二次的小分子 RNA 生成機構の最重要反応である RDR6 の鋳型選択機構を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 「相補鎖合成モジュール」のコアタンパク質である RDR6 のリコンビナントタンパク質を、大腸菌、昆虫培養細胞、または植物のセルフリー系を用いて作成を試み、活性を評価する。作成したリコンビナント RDR6 を用いて試験管内で相補鎖合成反応を行う。新規に合成された相補鎖をラベルするため、反応系に [ $\gamma$ - $^{32}$ P] UTP または [ $\gamma$ - $^{32}$ P] CTP を加え、

反応産物は変性ゲルで展開する。

(2) RDR6 には、アミノ末端に RNA 結合ドメインとして知られている RRM ドメインが、カルボキシ末端に RdRP ドメインが存在する。RRM ドメインが鋳型特異性に必要かを調べるため、RRM ドメイン欠失変異体を作製し、試験管内での相補鎖合成実験を行う。

(3) RDR6 と鋳型 RNA とのゲルシフトアッセイは RRM ドメインを欠失したリコンビナント RDR6 と 5' キャップラベルした RNA とを用いる。一分子蛍光顕微鏡観察では、5' ビオチン化した RNA と、Halo タグを介して蛍光標識したリコンビナント RDR6 を用意し、全反射照明蛍光顕微鏡の下、ガラス基板上で結合頻度・時間を観察する (図 2)。

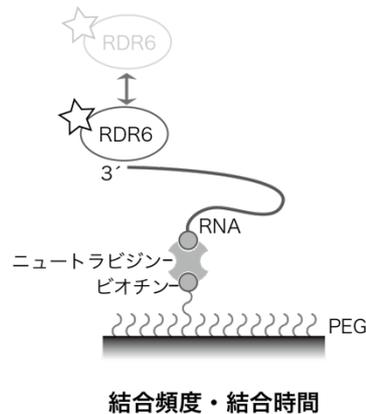
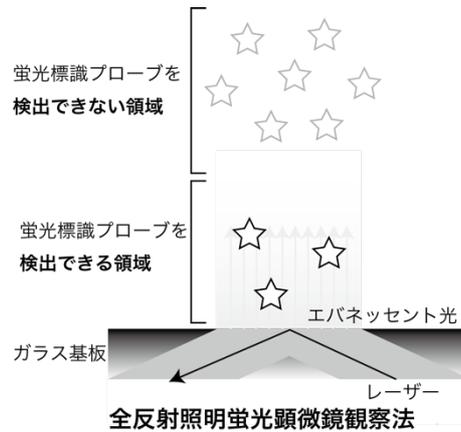


図2: RDR6 と標的 RNA との結合頻度・時間を調べるための一分子観察法

(4) これまで私はタバコ培養細胞 BY-2 から作成した試験管内アッセイ系を用いて、「標的認識・切断モジュール」を再現することに成功している。「相補鎖合成モジュール」を再現するために、これまでの遺伝学によって二次的小分子 RNA 生成機構に必要であることが明らかになっている因子 (RDR6, SGS3 および SDE5) を試験管内翻訳する。同じ試験管内で AGO7 と miR390 から作られる RISC を形成し、RISC が結合した標的 RNA が特異的に相補鎖合



messages in a unique way. *Nature Plants* 3(10) 769-770, 査読あり, 2017年, DOI <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0028-2>

- ③ Watanabe M, Iwakawa HO, Tadakuma H, Tomari Y. Biochemical and single-molecule analyses of the RNA silencing suppressing activity of CrPV-1A. *Nucleic acids research* 45(18) 10873-10844, 査読あり, 2017年, DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gkx748>
- ④ 岩川 弘宙. 植物のRNAサイレンシング機構が自己の mRNA を攻撃しないメカニズム. *植物科学最前線* 8 58-70, 査読あり, 2017年, DOI: 10.24480/bsj-review.8b4.00114. 1.
- ⑤ Baeg K, \*Iwakawa HO, \*Tomari Y. The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing. *Nature Plants* 3 Article number: 17036, 査読あり, 2017年, DOI: 10.1038/nplants.2017.36.

[学会発表] (計 8 件)

1. 岩川 弘宙. 非自己核酸と防御. 分生研シンポジウム「生命科学の若手フロンティア」(招待講演), 2017年
2. Baeg K, Iwakawa HO, Tomari Y. The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into the substrates for gene silencing. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society, 2017年
3. Baeg K, Iwakawa HO, Tomari Y. The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into the substrates for gene silencing. 12<sup>th</sup> Microsymposium on small RNA biology, 2017年
4. 岩川 弘宙. 植物のRNAサイレンシング機構. 第39回日本分子生物学会(招待講演), 2016年11月30日
5. 岩川 弘宙. 生化学で迫る植物のRNAサイレンシング. 日本植物学会第80回大会(招待講演), 2016年
6. Baeg K, 岩川 弘宙, 泊幸秀. RNA依存性RNAポリメラーゼ6の鋳型特異性. 平成28年度日本植物病理学会大会, 2016年
7. Baeg K, Iwakawa HO, Tomari Y. The substrate specificity of RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 6. Keystone Symposia Small RNA Silencing Meeting, 2016年
8. Baeg K, Iwakawa HO, Tomari Y. The substrate specificity of RNA

DEPENDENT RNA POLYMERASE 6. 第5回植物RNA研究ネットワークシンポジウム, 2016年

[図書] (計 1 件)

1. Tomari Y, \*Iwakawa HO. Springer, Plant Argonaute Proteins: Methods and Protocols: In Vitro Analysis of ARGONAUTE-Mediated Target Cleavage and Translational Repression in Plants. *Methods in Molecular Biology* 1640 55-71 2017年, DOI: 10.1007/978-1-4939-7165-7\_4.

[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:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

[https://researchmap.jp/Hiro\\_Iwa/?lang=ja&panese](https://researchmap.jp/Hiro_Iwa/?lang=ja&panese)

[https://scholar.google.co.jp/citations?user=ZvpQg\\_gAAAAJ&hl=ja](https://scholar.google.co.jp/citations?user=ZvpQg_gAAAAJ&hl=ja)

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

多田 限 尚史 (Tadakuma Hisashi)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号： 10339707

(4)研究協力者  
Baeg Kyungmin

坪山 幸太郎 (Tsuboyama Kotaro)