

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18822

研究課題名(和文) RNAキャップ構造を介した植物マイクロRNA生成の分子基盤

研究課題名(英文) Plant microRNA biogenesis through RNA 5' cap structure

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・助教

研究者番号：80704965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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制御因子であり、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、RNAの5'末端のキャップ構造を認識するタンパク質Cap Binding Complexと協調して機能するSERRATE (SE) 遺伝子の機能解析を行った。その結果、SEの持つジンクフィンガードメイン、N末端やC末端に存在するドメインのmiRNA生成における機能を明らかにした。

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. I analyzed the molecular function of SERRATE (SE) protein, which has been shown to play important roles in Arabidopsis miRNA biogenesis. I gained insights into how SE's zinc finger domain, N-terminal domain, and C-terminal domain coordinately function to assist miRNA precursor processing by the RNaseIII family endoribonuclease Dicer-Like 1 (DCL1).

研究分野：植物分子生物学

キーワード：マイクロRNA 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)。

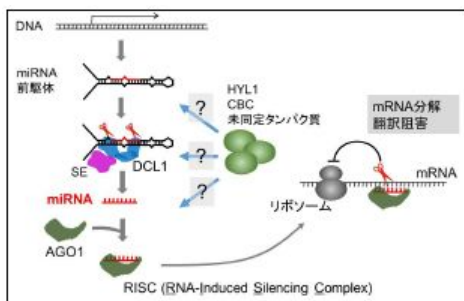


図 植物における miRNA 生成・機能のモデル図

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 前駆体のプロセッシングには、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 生成に関与する複数のタンパク質のうち、SERRATE (SE) に特に着目し、その機能解析を行うことにより miRNA 生成の分子メカニズムの解明を目指した。SE はジンクフィンガードメインを持つ核タンパク質であり、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 と協調して働くことが明らかにされている。SE はジンクフィンガードメインの他、SE の機能に重要であると予想される複数のドメインからなる。具体的には、N 末端側のプロリン残基やアルギニン残基に富んだ領域や、C 末端側のモチーフがあることがアミノ酸配列解析により明らかにされており、これらの特徴は植物の他の SE タンパク質にも保存されている。

シロイヌナズナを遺伝学的解析から、SE は RNA の 5' 末端のキャップ構造に結合するキャップ結合タンパク質複合体 (Cap-binding complex, CBC) と協調して機能することが示されているが、その詳細な分子メカニズムは明らかではない。本研究では、シロイヌナズナ植物体を用いて SE の機能解析を行い、RNA の 5' 末端キャップ構造が miRNA 生成に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、シロイヌナズナの SE 遺伝子の第 1 エキソンに T-DNA が挿入された変異体 se-3 を用いることとした。se-3 は形態異常、生育異常など様々な表現型を示す変異体であり、miRNA 生成に異常を示し、miRNA 蓄積が減少している。この se-3 変異体に、上記のドメインを欠失させた SE タンパク質を発現させ、形質転換体を作成し、表現型の回復度合いを調べることで、欠失させたドメインの機能を推定するというアプローチを取った。

(2) SE cDNA をクローニングし、5' 末端に FLAG タグをコードする DNA 配列を PCR により付加し、SE プロモーターの制御下で発現させるコンストラクトを作製した。次に、ジンクフィンガードメイン、N 末端ドメイン、C 末端ドメインを欠失させた同様のコンストラクトを作製した。得られたバイナリベクターをアグロバクテリウムに導入し、フローラルディップ法によりシロイヌナズナ se-3 変異体に導入した。得られた種子を除草剤耐性によりスクリーニングを行い、得られた個体を T1 個体とし、それぞれの T1 個体から T2 種子を得た。その後、得られた T3 ホモ個体を解析に用いた。それぞれのコンストラクトにつき複数のラインを以降の詳細な解析に用いた。

(3) miRNA 前駆体 RNA や miRNA の定量は、植物から全 RNA を抽出した後、リアルタイム PCR を用いた定量 RT-PCR により行った。なお、miRNA 前駆体 RNA の定量の際にはランダムプライマー、miRNA の定量の際には各 miRNA に特異的なステムループ RT プライマーを用いて逆転写反応を行った

後、得られた cDNA を用いて定量 PCR を行った。FLAG-SE (野性型もしくは欠失型) の検出にはウエスタンブロットを用い、定法に従ってタンパク質抽出、SDS-PAGE を行い、抗 DDDDK 抗体 (MBL 社) を用いて検出した。

- (4) 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ラ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交換を行った。
- (5) miRNA 前駆体である Pri-miR167a 遺伝子はシロイヌナズナ 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。
- (6) *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  $\mu$ l の反応系 (20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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。

#### 4. 研究成果

- (1) まず se-3 変異体に、FLAG-SE を SE プロモーターの制御下で発現するコンストラクトを導入し、複数の形質転換体を得た。se-3 でみられた形態異常や生育異常は、得られた形質転換体において野性型と同様まで回復していた。このことから、FLAG-SE は内在性の SE と同様に機能し、FLAG タグを N 末端側に付加することによる SE タンパク質への機能阻害は無いことが確認できた。

- (2) 次に、ジンクフィンガードメイン、N 末端ドメイン、C 末端ドメインをそれぞれ欠失させた SE を発現するコンストラクトをそれぞれ se-3 変異体に導入し、各コンストラクトにつき複数の形質転換体を得た。表現型を観察したところ、いずれのコンストラクトを持つ形質転換体も、野生型と同様のレベルにまでは回復しなかった。なかでも、ジンクフィンガードメインを欠失する SE を発現する形質転換体は、あまり表現型の回復はみられず、よりシビアな表現型を示したことから、ジンクフィンガードメインが SE の機能において非常に重要であることが示唆された。N 末端ドメインや C 末端ドメインを欠失させた形質転換体は、ジンクフィンガードメインを欠失させた形質転換体よりは表現型は回復していたものの、野性型レベルにまでは回復していなかった。このことから、N 末端ドメインや C 末端ドメインも SE の機能において一定の役割を果たしていることが示唆された。

- (3) 作製した形質転換体における miRNA 蓄積レベルの定量を、定量 RT-PCR により評価した。具体的には miR159、miR166、miR167 について調べた。se-3 変異体は野性型に比べて少ない miRNA レベルを示したが、FLAG-SE (野性型) を発現させることにより miRNA レベルは野生型のレベルにまで回復した。次に各ドメインを欠失する SE を発現する形質転換体について調べたところ、いずれの形質転換体においても miRNA レベルは野生型と比べて低かった。中でも、ジンクフィンガードメインを欠失させる植物において miRNA レベルが低かった。さらに、miRNA 前駆体 RNA の蓄積レベルについても定量 RT-PCR により評価した。具体的には、pri-miR159a、pri-miR166b、pri-miR167a について調べた。se-3 変異体は野生型に比べて多くの miRNA 前駆体 RNA を蓄積していたが、FLAG-SE (野性型) を発現させることにより miRNA 前駆体 RNA レベルは野生型のレベルにまで減少した。次に角度メインを欠失する SE を発現する形質転換体についても調べたところ、いずれの形質転換体においても miRNA 前駆体 RNA レベルは野生型と比べると減少していたが se-3 変異体のレベルにまでは減少していなかった。このことから、それぞれの変異型 SE タンパク質は miRNA 前駆体のプロセッシングにおいて正の作用があるが野性型 SE ほどの効果はないと言える。特にジンクフィンガードメインを欠失する SE を発現する形質転換体における miRNA 前駆体蓄積量は se-3 変異体のものよりわずかに減少していたのみであったことから、ジンクフィンガードメインのもつ機

能の重要性が確かめられた。

- (4) in vitro での miRNA 前駆体切断反応を行った。精製 DCL1 タンパク質と miRNA 前駆体の一つである pri-miR167a を反応させ、変性 PAGE により電気泳動した結果、DCL1 単独で miRNA 前駆体 RNA を切断し miRNA を生成したが、精製 SE タンパク質を加えることにより切断量は増大し、より多くのみ RNA が検出された。一方、各ドメインを欠失する精製 SE タンパク質を調製し、同様に in vitro 反応に供したところ、ジンクフィンガードメインを欠失させることにより SE の切断活性上昇への効果が無くなることが分かった。このことから、ジンクフィンガードメインが SE の機能に非常に重要であることが in vitro 実験系においても確かめられた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/pmb/member/iwata\\_articles/](http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/pmb/member/iwata_articles/)

#### 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：

##### (4) 研究協力者

( )