

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06159

研究課題名(和文)核内小分子RNAの作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the molecular mechanisms of RNA-directed DNA methylation

研究代表者

岩川 弘宙(Iwakawa, Hiro-oki)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：60710415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRNAサイレンシング複合体(RISC)が配列特異的にDNAをメチル化するしくみに着目して研究を行った。その結果、細胞質ではたらく植物のRISCはRNAと強く相互作用するのに対し、核内ではたらくRISCはDNAと強く相互作用することを見出した。また、新規DNAメチル化に関わることが知られているRNA依存性RNAポリメラーゼ6(RDR6)の鋳型特異性や、核内RISC形成機構に関する新しい知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の核内RISCがRNAよりもDNAと強く結合することを世界で初めて生化学的に示したことで、「核内RISCは新生RNAとの結合を介して標的DNAに接近しメチル化を促進する」と信じられてきた従来のモデルを書き換える可能性がある。さらに核内RISC形成機構やRDR6の鋳型特異性の生化学的な理解は、未だ多くの謎に包まれている核内RNAサイレンシング機構を理解する上で重要な基盤的知見となる。

研究成果の概要(英文)：We conducted our research by focusing on how RNA-induced silencing complexes (RISCs) mediate sequence specific DNA methylation in nuclei. Through in vitro binding assays, we found that the plant cytoplasmic RISCs interact more tightly with RNAs than with DNAs, conversely, the plant nuclear RISCs bind to DNAs with much higher affinity than to RNAs. Moreover, we obtained novel insights into nuclear RISC assembly and template specificity of RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6), which is known to be involved in de novo DNA methylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNAサイレンシング siRNA DNA-RNAハイブリッド

1. 研究開始当初の背景

Argonaute タンパク質 (AGO) は原核生物から真核生物まで広く保存されている RNase H 様ドメインを持つヌクレアーゼである。原核生物がもつ AGO は小分子 RNA または小分子 RNA を取り込み、標的となる相補的な DNA または RNA に結合することで、外来 DNA の切断 (Swartz et al., 2014) や分解 (Olovnikov et al., 2013) を促すことが近年明らかにされてきた。一方で真核の AGO は小分子 RNA と RNA-Induced Silencing Complex (RISC) を形成して相補的な RNA の切断・分解・翻訳抑制などを促すことが長年の研究より明らかにされており、真核 RISC が RNA-DNA ハイブリッドを介して DNA を標的とする例は見つかっていない。植物の RISC は内在遺伝子の発現を調節するだけでなく、ウイルス免疫やトランスポソンの制御によるゲノムの安定化に寄与している。モデル植物であるシロイヌナズナは AGO1 から AGO10 までの 10 種類の AGO をコードしており、AGO4、AGO6、AGO9 は DNA メチルトランスフェラーゼ DRM2 を標的ゲノム DNA 領域にリクルートしメチル化を促進することが知られている。AGO4-RISC は植物特異的な RNA ポリメラーゼである Pol V の新生 RNA 鎖と RNA-RNA 相互作用を介して標的 DNA 領域に近づき機能を発揮していると推測されているが、詳細な解析はなされていなかった (Wierzbicki et al., 2009) (図 1 これまでの RNA-RNA 相互作用モデル)。

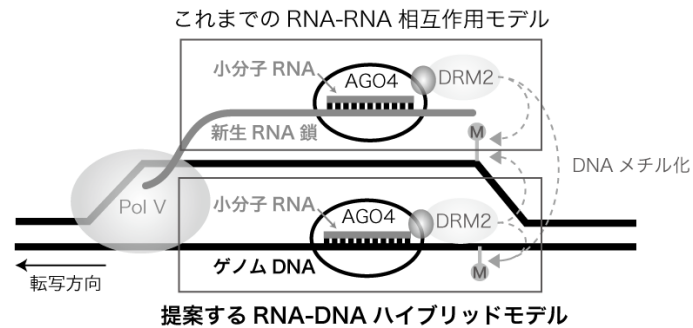


図 1. RNA-DNA ハイブリッドを介した核内サイレンシング機構

植物の RISC は内在遺伝子の発現を調節するだけでなく、ウイルス免疫やトランスポソンの制御によるゲノムの安定化に寄与している。モデル植物であるシロイヌナズナは AGO1 から AGO10 までの 10 種類の AGO をコードしており、AGO4、AGO6、AGO9 は DNA メチルトランスフェラーゼ DRM2 を標的ゲノム DNA 領域にリクルートしメチル化を促進することが知られている。AGO4-RISC は植物特異的な RNA ポリメラーゼである Pol V の新生 RNA 鎖と RNA-RNA 相互作用を介して標的 DNA 領域に近づき機能を発揮していると推測されているが、詳細な解析はなされていなかった (Wierzbicki et al., 2009) (図 1 これまでの RNA-RNA 相互作用モデル)。

2. 研究の目的

本研究では核で働く植物 RISC がゲノム DNA と RNA-DNA ハイブリッドを形成することでゲノム DNA をメチル化する新規サイレンシング機構を解明する (図 1)。さらに対象を核で働く動物や酵母の RISC にも広げることで RNA-DNA ハイブリッドを介した標的認識機構の普遍性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 植物 RISC と標的 RNA/DNA との親和性に関しては、試験管内で作製し、精製・定量した RISC と放射性標識した標的 RNA/DNA を混ぜ合わせ、フィルターバインディングアッセイを行う。

(2) 生体内で植物の核内 AGO が結合する DNA 領域を高感度で解析する実験系「改変 iCLIP」法に関しては以下の通り研究を進める。まず AGO4-RISC とゲノム DNA を UV を用いて架橋した後、超音波で DNA を裁断または DNase I で限定分解し、AGO4-RISC を免疫沈降する。RNase 処理した後、[γ -³²P] ATP で DNA 断片の 5' 末端をラベルし、AGO4-RISC と共有結合した DNA 断片を SDS-PAGE で展開する。メンブレンに転写された AGO4 より少し大きいサイズの放射性シグナルを切り出し、プロテアーゼ処理により DNA を回収する。3' 末端にアダプターを付加した後、逆転写酵素を用いて相補鎖合成を行う (逆転写酵素は一本鎖 DNA も相補鎖合成できる)。AGO4 が UV クロスリンクで共有結合していた部位はプロテアーゼ処理後も数アミノ酸残るため相補鎖合成はその場所で止まる (Konig et al., 2010)。その後、環状化、開環のステップを経てサンプリングを次世代シーケンサーを用いて解読しゲノムにマップする。AGO4 と結合している小分子 RNA と相補的な配列と、改変 iCLIP 配列の末端が近傍にマップされることを確認する。

(3) 新規 DNA メチル化に関わる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) の基質特異性は、昆虫培養細胞で発現した RDR6 と様々な特徴をもった鋳型 RNA とを NTP 存在下で混ぜ合わせることで解析する。

(4) 小分子 RNA 依存的 DNA メチル化を生化学的に解析する基盤技術の開発に関しては、昆虫培養細胞、植物セルフリー、大腸菌などで本機構に関わるリコンビナントタンパク質を発現し、精製した後、試験管内で標的 DNA、メチル基供与体と混ぜ合わせ、DNA が特異的にメチル化されるのかを確認する。

(5) 核内 AGO の小分子 RNA 選択性の解析に関しては、植物セルフリー内でエピトープタグのついた核内 AGO (AGO4、AGO6) と、放射性標識した様々な長さ、異なる 5' 末端の塩基をもつ小分子 RNA 二本鎖を混ぜ合わせ、免疫沈降後に AGO と相互作用した小分子 RNA を非変性ゲルを用いて展開後検出する。

4. 研究成果

(1) 5 種類の植物 RISC と標的 RNA/DNA との結合親和性の解析

モデル植物であるシロイヌナズナが持つ複数の AGO タンパク質からなる RISC と、標的 RNA または標的 DNA との相互作用を

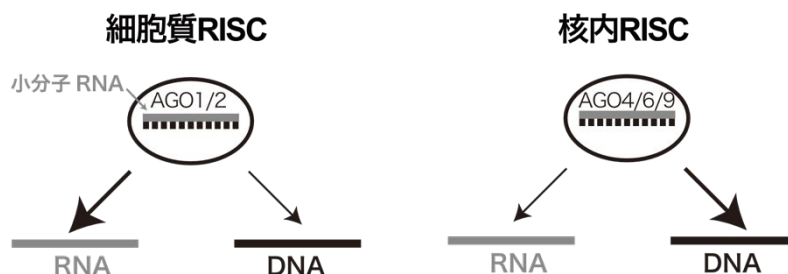


図 2. 細胞質RISC (AGO1/2-RISC)はRNA に強く結合する。一方、核内RISC (AGO4/6/9-RISC)はDNA により強く結合する。

解析した。細胞質で機能する AGO1 および AGO2 から作り出される RISC は、標的 DNA よりも標的 RNA と強く相互作用し、核内で DNA メチル化促進に関わる AGO4-、AGO6-、AGO9-RISC は標的 RNA よりも標的 DNA と強く相互作用した (図 2)。これらのデータは核内 RISC が RNA-DNA ハイブリッドを介して機能している可能性を支持する。

(2) In vivo で核内 RISC の DNA 結合部位を高精度で検出する実験手法の開発

生体内で植物の核内 AGO が結合する DNA 領域を高感度で解析する実験系「改変 iCLIP」法を確立するための条件検討を行った。使用した抗体の効率が十分でなかったため、AGO4 に対する 4 種類の新規抗体を作製し、再度条件検討を行ったが良好な結果は得られなかった。しかしながら他のグループが行った植物体を用いた UV レーザー-ChIP 法 (Lahmy et al., 2016) は我々の RNA-DNA ハイブリッド説を支持していることから、in vivo での核内 RISC と DNA 間の直接相互作用を検証する実験はひとまず終了することにした。

(3) 新規 DNA メチル化に関わる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) の基質特異性の解明

外来転移因子の DNA メチル化をトリガーするには Pol IV と RDR2 から作り出される siRNA ではなく、Pol II と RDR6 から作り出される siRNA が必要であることが示唆されている (Fultza and Slotkin, 2017)。RDR6 はこの他にもウイルス RNA や、細胞内に蓄積した異常な mRNA を二本鎖化することにより siRNA を作り出し、異常 RNA を排除する役割をもつ。一方で、通常、細胞内に存在する正常な mRNA は RDR6 の鋳型にはなりにくい。RDR6 が正常な RNA と外来転移因子由来の RNA など異常な RNA を見分ける機構を明らかにするために、ショウジョウバエ S2 細胞で発現し精製したリコンビナント RDR6 を用いて鋳型特異性を解析した。その結果「RDR6 はポリ A 鎖を 3 端にもつ RNA を相補鎖合成の鋳型にできない」という驚くべき結果を得た。この結果はなぜポリ A 鎖をもつ細胞内の内在 mRNA が RDR6 によって二本鎖化されず、RISC によって切断された mRNA やウイルス RNA、そして転移因子由来の RNA などの異常な RNA のみが二本鎖化されサイレンシングされるのかという長年の謎を解き明かす可能性がある。これらの成果は Nature plants 誌に論文として発表した (Nature Plants 2017)。また RDR6 による試験管内アッセイの詳しい手法を Bio-protocol 誌で発表した (Bio-protocol 2018)。

(4) 小分子 RNA 依存的 DNA メチル化を生化学的に解析する基盤技術の開発

試験管内で小分子 RNA 依存的に DNA メチル化を促進する新規実験系を作成するため、DNA メチルトランスフェラーゼ (DRM2) および、メチル化補助因子の発現及び精製を行った。当初シロイヌナズナの AtDRM2 を作成したが活性がなかったため、タバコ由来の DRM2 (NtDRM2) の発現・精製を試みた。メチル化補助因子に関しては AtDRM2 と相互作用が認められている AtDRM1 と AtDRM2 のホモログである AtDRM3 の発現・精製を行った。精製した核内 RISC (AGO4-RISC、AGO6-RISC) と基質となる内部ループ構造をもった二本鎖 DNA が高い親和性をもって相互作用することも確認した。今後これらの因子を用いることで、小分子 RNA 依存的 DNA メチル化を試験管内で観察する。

(5) 核内 AGO の小分子 RNA 選択性の解析

核内 AGO がどのような特徴を持つ小分子 RNA と好んで機能複合体 (RISC) を形成するのかを明らかにするとともに、異なる核内 AGO 間でドメインスワッピングを行い、小分子 RNA の認識に関わるドメインを明らかにした。具体的には以下の通りである。

これまで核内 DNA メチル化に関わる AGO4 と AGO6 は 24 塩基かつ 5' 末端の塩基がアデニン (A) の小分子 RNA (24A) と好んで RISC を形成することが知られていた。しかしながら、24A は細胞内で最も多い小分子 RNA 種であるため、AGO4 と AGO6 自体がどの程度 24A を選択しているのかという定量的なデータは存在しなかった。試験管内系を用いて AGO4・AGO6 の小分子 RNA 選択性を詳細に解析した結果、AGO4 と AGO6 は共に 24A を積極的に選択するが、AGO6 は AGO4 に比べて遥かに厳密に 5' 末端にアデニンをもつ小分子 RNA を見分けていることが明らかになった。一方、小分子 RNA の長さに関しては逆の傾向が観察された。すなわち、AGO4 は 24 塩基の小分子 RNA のみを特異的に選択するのに対し、AGO6 は 21 塩基の小分子 RNA とも効率よく RISC を形成することができた。このように本研究によって AGO4 と AGO6 は異なる小分子 RNA の選択性を持つことを明らかにした (投稿準備中)。

次に AG06 の厳密な 5' A 選択がどのドメイン・モチーフによって行われているのかを AG04 と AG06 間のドメインスワッピングを行うことで調べることにした。現在まで複数種の活性のあるキメラ AG04/6 を作成することに成功しており、予備的ながら予想外のドメインが 5' 塩基選択に関わるという興味深い結果を得ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Baeg K, Tomari Y, Iwakawa HO. In vitro RNA-dependent RNA Polymerase Assay Using Arabidopsis RDR6. *Bio-protocol* (査読あり), 8 巻, 1 号, 2018 年 doi: 10.21769/BioProtoc.2673

Iwakawa HO and Tomari Y. Silencing messages in a unique way. *Nature Plants* (査読あり), 3 巻, 10 号, 769-770 頁, 2017 年, doi: 10.1038/s41477-017-0028-2.

Tomari Y and Iwakawa HO. In Vitro Analysis of ARGONAUTE-Mediated Target Cleavage and Translational Repression in Plants. *Methods in Molecular Biology* (査読あり), 1640 巻 55-71 頁, 2017 年, doi: 10.1007/978-1-4939-7165-7_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. *BSJ-Review* (査読あり), 8 巻, 58-70 頁, 2017 年, doi: 10.24480/bsj-review.8b4.00114.1.

Baeg K, Iwakawa HO, Tomari Y, The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing, *Nature Plants* (査読あり), Article number: 17036 2017 年, doi: 10.1038/nplants.2017.36.

〔学会発表〕(計 13 件)

Baeg K, Sakurai Y, Lam A, Shoji K, Yoshikawa M, Tomari Y, Iwakawa HO, In vitro recapitulation of the secondary siRNA biogenesis in plants, PGRP2019, 奈良, 2019 年.

Liu W, Tomari Y, Iwakawa HO, The PIWI domain of RdDM Argonautes in plants plays a critical role for sensing the identity of the 5' -base of small RNAs, PGRP2019, 奈良, 2019 年.

Iwakawa HO, Baeg K, Sakurai Y, Yoshikawa M, Tomari Y, In vitro recapitulation of the secondary siRNA biogenesis in plants, 第 20 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム RNA ネオバイオロジー, 大阪, 2019 年.

岩川 弘宙, 植物の RNA サイレンシング機構, 第 53 回 植物感染生理談話会, 第 53 回 植物感染生理談話会, 高知, 2018 年.

Baeg Kyungmin, 櫻井 友理希, 吉川 学, 泊 幸秀, 岩川 弘宙. 植物における二次的小分子 RNA 生成の試験管内再現, 第 20 回日本 RNA 学会年会, 大阪, 2018 年.

Liu W, Tomari Y, Iwakawa HO, In vitro analysis of small RNA preference of ARGONAUTE 4 in Arabidopsis thaliana, 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌, 2018 年.

Iwakawa HO, Tomari Y. Plant ARGONAUTE4 family proteins prefer to bind to DNA targets in vitro. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society, Prague, Czech Republic, 2017 年.

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, Prague, Czech Republic, 2017 年.

Iwakawa HO, Tomari Y. Plant ARGONAUTE4 family proteins prefer to bind to DNA targets in vitro. 12th Microsymposium on small RNA biology, Vienna, Austria, 2017 年.

Baeg K, Iwakawa HO, Tomari Y. The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into the substrates for gene silencing. 12th Microsymposium on small RNA biology, Vienna, Austria, 2017 年.

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, 横浜, 2016 年.

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, 沖縄, 2016 年.

Iwakawa HO, Tomari Y, Plant ARGONAUTE4 family proteins prefer to bind to DNA targets in vitro, The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, 2016 年.

〔図書〕(計 1 件)

岩川 弘宙, 植物の RNA サイレンシング機構, 植物感染生理談話会論文集 (53) 46-56, 2018 年.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://researchmap.jp/Hiro_Iwa/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。