様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：13101
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23770210
研究課題名（和文）　内在性小分子 siRNA 前駆体の成熟化プロセスの解明

研究課題名（英文）　Analysis of maturation process of endo-siRNA precursor

研究代表者
三好　智博　（MIYOSHI TOMOHIRO）
新潟大学　研究推進機構　超域学術院　助教
研究者番号：60534550

研究成果の概要（和文）：
細胞内では、タンパク質をコードしていない短鎖 RNA が機能的にはたらいている。この短鎖 RNA の一つに内在性 siRNA と呼ばれるものがあるが、この生合成過程は不明であった。本研究では、細胞内に存在する内在性 siRNA 前駆体の検出に成功した。また、内在性 siRNA 生合成には、新たに発見された細胞質構造体が機能的に重要であることを明らかにした。さらに、この RNA の生合成機構に関与している新規タンパク質を同定することが出来た。

研究成果の概要（英文）：
Non-coding small RNAs act as functional molecules in cells. Endogenous siRNA (endo-siRNA) is one of the small RNAs, but its biosynthesis process is unknown. In this study, we succeeded in detection of endo-siRNA precursor present in the cell. Further, we showed that novel cytoplasmic foci are functionally important in the endo-siRNA biosynthesis. Furthermore, we identified novel protein related to the biosynthesis mechanism of endo-siRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学
キーワード：RNA

１．研究開始当初の背景

近年、ヒトゲノム中の 98%がタンパク質をコードしない non-coding 領域であることが示された。また、生命の複雑さと non-coding RNA の種類には相関関係があり、多くの高等生物の生命現象は、non-coding RNA が担っていると考えられる。現在、この non-coding RNA 群が多種多様な機能を持つことが解明されつつある。小分子 non-coding RNA が関与する RNA サイレンシングは、塩基配列特異的な遺伝子発現制御機構である。この機構の一つに RNA 干渉（RNAi）がある。

RNA 干渉は、主にウイルス等からの生体自己防御機構であり、これまで siRNA は、外来性 RNA から作られていると考えられていた。しかし、2008 年に申請者所属の研究室を含めた複数のグループからショウジョウバエや哺乳動物における内在性 siRNA の存在が報告された。このことから、siRNA は、核酸を標的とした生体自己防衛機構に留まらず、生体にとって内在的に必須のサイレンシング機構であることが示された。

RNA 干渉において、長い 2 本鎖 RNA は RNaseIII ドメインをもつ Dicer2 複合体によりプロセシングされ約 21 塩基の 2 本鎖 RNA になる。その後、Argonaute（Ago）2 に結合することにより 1 本鎖化され成熟した siRNA となる。この siRNA は、RNA 単独では機能発現能力がなく RISC（RNA-induced silencing complex）と呼ばれる Ago2 を中心としたタンパク質機能複合体中に取り込まれることによって初めて塩基配列特異的に標的 RNA に結合することができる。その標的 RNA は、Ago2 が有する RNase H 様の endonuclease 活性により切断される。このようにして siRNA は、遺伝子発現を配列特異的に抑制するガイド分子として働き得る。endo-siRNA は、Dicer2 や Ago2 の欠損変異体で著しく減少することから、外来性 siRNA に良く似た経路で生合成が行われることが予想される。さらに、これらの欠損変異体では、endo-siRNA の減少により、TE の発現が上昇しており、endo-siRNA を介した遺伝子発現制御機構は、ゲノムの品質管理機構として機能することが示された。また、endo-siRNA は、TE 領域のみならず、繰り返し配列、離れた領域から転写された RNA が二本鎖を形成したもの、長いヘアピン構造を形成する領域などからも生合成される。さらに endo-siRNA の中には、タンパク質をコードする RNA の遺伝子発現を制御するという報告もあり、メッセンジャーRNA（mRNA）の転写後発現制御も行っていることが示唆されている。

上述したように、細胞内において endo-siRNA は多方面に機能することが明らかになってきたが、その生合成経路は未だ不明のままである。

２．研究の目的

ショウジョウバエの体細胞では、上記で述べた endo-siRNA の他に約 22 塩基長の miRNA が存在する。ショウジョウバエは、siRNA と miRNA の生合成経路が、独立して存在しており、これらの小分子 RNA の生合成経路を調べるに当たり最も適したモデル生物だと言える。一般的な miRNA 遺伝子は、核内で RNA ポリメラーゼ II により転写され、この primary miRNA（pri-miRNA）が形成するヘアピン構造を認識し、RNaseIII ドメインをもつ Drosha とその補因子である Pasha による複合体によって切断され 70 塩基程度の precursor miRNA（pre-miRNA）となる。その後、pre-miRNA は核外輸送タンパク質である Exportin-5（Exp-5）と RanGTP 依存的に核から細胞質に運ばれる。さらに、RNaseIII ドメインをもつ Dicer1 とその補因子である Loqs との複合体によって切断され、約 22 塩基の 2 本鎖 miRNA となる。この 2 本鎖 miRNA は、Argonaute（Ago）1 タンパク質に結合して 1 本鎖化され Ago1-miRNA 複合体を中心とした RISC 活性型構造体を形成し、標的 mRNA に塩基配列依存的に結合することによって特異的な遺伝子発現制御を行う。

さらに近年では癌の抑制因子である p53 を始めとして、ADARs（RNA エディティング因子）、SMADs（シグナル伝達因子）、ERα

（エストロゲン受容体）、KSRP（mRNA 分解促進因子）、ARS2（キャップ結合因子）、LIN28（細胞の多分化能促進因子）などの因子が、Drosha や Dicer の機能をコントロールしていることが明らかになってきた。このように miRNA の合成経路では、様々な複雑なステップを介して成熟化されることが示されているが、endo-siRNA の合成経路の詳細は、ほとんど明らかになっていないのが現状である。本研究の目的は、endo-siRNA 生合成経路の全貌解明を目指すことである。

３．研究の方法

endo-siRNA 生合成経路を解明するために、大きくわけて２つの視点に着目して解析を行った。その詳細を下記に示す。

（1）これまで申請者は、これら小分子 RNA 生合成の複雑な機構における siRNA と miRNA における分別に Loqs タンパク質のアイソフォームが特異的に関与していることを明らかにしてきた。Loqs アイソフォームは、Loqs-PA, PB, PC, PD の 4 種類が存在する。Loqs-PA, PB をノックダウンすると miRNA の合成量が減少し、Loqs-PD をノックダウンすると endo-siRNA の合成量が減少した。さらに、Loqs-PA, PB には、miRNA の生合成に関わる Dicer1 と特異的に複合体を形成し、Loqs-PD は、siRNA の生合成に関わる Dicer2 と特異的に複合体を形成することを示した。これらのことから、Loqs アイソフォームが特異的に２種類の Dicer を識別し、siRNA と miRNA の生合成経路に独立し特異的に関わっていることを明らかにした。

miRNA の生合成機構は、多くの複雑なステップにより成熟化され、同時に制御されていることが明らかにされてきたが、endo-siRNA 生合成機構は、ほとんどわかっていない。現在までに解明された siRNA の生合成に関わる反応は、全て細胞質で行われている。しかし、endo-siRNA の前駆体は、核内で転写される。つまり、核で転写されてから、細胞質に輸送され Dicer2/Loqs-PD に認識されるまでの過程がブラックボックスのままである。申請者は、endo-siRNA 生合成機構も miRNA 生合成機構と同様に複雑な制御が行われていると考え、上述したタンパク質に着目して、その機構を明らかにする。

（2）これまでに endo-siRNA 生合成経路で明らかになっていることは、以下の２つである。1 つ目は、長い 2 本鎖 RNA が Dicer2/Loqs-PD 複合体により 21 塩基長に切断されること。2 つ目は、この 21 塩基の 2 本鎖 RNA は Dicer2/R2D2 複合体依存的に Ago2 に結合し、1 本鎖化され成熟 endo-siRNA となることである。申請者は、この Dicer2/R2D2 複合体から、Ago2 への 2 本鎖 RNA の受け渡しの段階に Hsp90（Heat shock protein 90）が必要であることを証明した。Hsp90 は、標的タンパク質の構造変化を誘発する機能を持つ。この Hsp90 が Ago2 と結合し得ることから、Hsp90 が Ago2 に対して 2 本鎖 siRNA が結合出来るような構造変化を引き起こし、Ago2 を活性化することを明らかにした。ショウジョウバエにおいて、Ago2 は、2 本鎖 siRNA を持つとき（Pre-RISC）と 1 本鎖 siRNA を持っているとき（RISC）で、複合体の構成成分が異なることが知られている。Ago2 の RNaseH 変異体では、2 本鎖 siRNA が一本鎖化されず、2 本鎖のままであることから、Pre-RISC 特異的な複合体で反応が停止していると考えられる。そこで、共免疫沈降法を用いて、上記の複合体に関して解析を進めた。

４．研究成果

申請者は、本研究において以下の 3 点につ

いて明らかにした。詳細を下記の（1）～（3）に示す。

（1） siRNA のプロセシングにおける Loqs-PD の役割

Dicer2 に特異的に結合する Loqs-PD は、siRNA 生合成経路で特異的に機能するタンパク質である。 siRNA の前駆体が、どのような配列・構造をもつ RNA なのかを同定するために、siRNA のプロセシングに特異的に関与しているタンパク質（Flag タグ付き Loqs-PD）をショウジョウバエ S2 培養細胞中で発現させ、そのライセートを用いて共免疫沈降法を行って、それに結合している RNA 成分を調べた。その結果、endo-siRNA-sl-1 と呼ばれる内在性 siRNA をプローブとしたノーザンブロット解析により、約 40bp と約 80bp 付近に前駆体 siRNA と考えられるバンドを検出することが出来た（図 1）。このことから、Loqs-PD 複合体によって、約 40bp と約 80bp の siRNA 前駆体が認識されプロセスされることを明確に示すことが出来た。

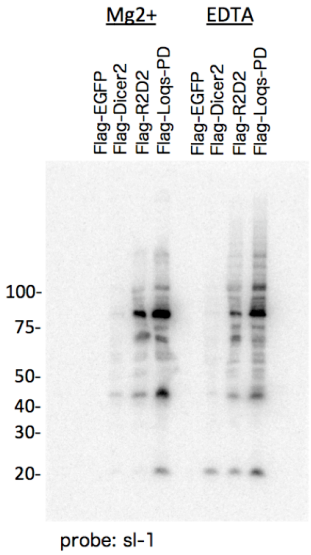

図1. 各種複合体に結合している内在性siRNA前駆体

（2）新規細胞質構造体 D2 body の機能解析

D2 body の形成には、Dicer-2 と R2D2 が必要である。Dicer-2 は、R2D2 に結合して R2D2 を安定化する。その結果、R2D2 は、Dicer2 によって集められ、D 2 body へ集結する。Dicer2 をノックダウンした細胞において、R2D2 を過剰発現させると、D2 body が復元される。このことから、D2 body において R2D2 は、必要不可欠な因子であることが示された。内在性の siRNA は、R2D2 ノックダウン細胞では、Ago1 にロードされた。外来性 siRNA は、Ago2 へ選択的にロードされることになっているが、この機能に R2D2 が必須であることが明らかになった。さらに、RNA 結合性を失った変異体を用いた R2D2 のレスキュー実験の結果から、これらの R2D2 の機能には、R2D2 の dsRBD が有する RNA 結合性が重要であることが示された。R2D2 は、D2 body で Dicer2 に結合することで、内在性 siRNA が本来結合するはずである Ago2 ではなく、間違って Ago1 に結合することを避ける重要な役割をもっていることが明らかとなった。

（3）Pre-RISC を構成する新規因子の発見とその機能解析

ショウジョウバエの Ago2 は、RNA 切断活性を持っている。Ago2 は 2 本鎖 siRNA の片方を切断することで、siRNA を合成している。この最終ステップである 2 本鎖 siRNA を切断する前と後で、Ago2 の複合体形成因子が異なると考えられている。そこで、pre-RISC を形成すると考えられるスライサー活性の無い変異体 Ago2 を用いて、WT-Ago2 との結合因子の違いを共免疫沈降とショットガン分析により解析を行なった。その結果、2 本鎖 siRNA をもつ Ago2 にのみ結合していると考えられる新たなタンパク質を同定した（Protein A）。ショウジョウバエ S2 細胞において、Protein A のノックダウンを行なっ

た結果、miRNA の量には変化が見られなかったが、内在性の siRNA（sl-1, DM1731）の量は増加した（図 2）。このことから、この新規因子（Protein A）が内在性 siRNA の合成量を調節していることが明らかになった。

今後、細胞中でこのタンパク質が大量に発現させた条件下における siRNA 合成量の変化を調べる予定である。さらに、このタンパク質の siRNA 経路特異的に機能するメカニズムを解明していく予定である。

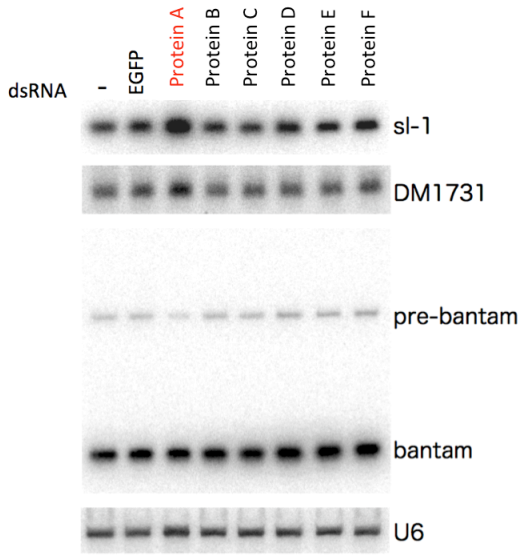

図2. 各タンパク質のノックダウンによる siRNAとmiRNAの生合成量の変化

以上のことから、本研究によってこれまで明確に示されていない内在性 siRNA の生合成過程において、非常に多くの分子機構の詳細を明らかにすることが出来た。

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 2 件）

（1）Nishida KM, Miyoshi K, Ogino A, Miyoshi T, Siomi H, Siomi MC.
Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*.
Molecular Cell, 2013 Feb 21; 49(4): 680-691.
doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.024.

（2）Mochizuki M, Kitamyo M, Miyoshi T, Ito K, Uchiumi T.
Analysis of chimeric ribosomal stalk complexes from eukaryotic and bacterial sources: structural features responsible for specificity of translation factors.
Genes to Cells, 2012 Apr; 17(4): 273-284.
doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01586.x.

〔学会発表〕（計 6 件）

口頭発表

（1）三好　智博
ショウジョウバエsmall RNA生合成機構の解明
新潟生化学懇話会
2011年6月25日
新潟薬科大学

ポスター発表

（1）遊佐 和之, 三好 智博, Ka-Ming Lee, 大野 萌, 伊東 孝祐, Kam-Bo Wong, 内海 利男
リボトキシンによるリボソーム不活性化作用への動物リボソームstalkタンパク質の関与
新潟生化学懇話会
2011年12月13-16日
新潟大学

（2）Yusa K, Miyoshi T, Lee KM, Maruyama R, Ohno M, Ito K, Wong KB, Uchiumi T.

The C-terminal region of the ribosomal stalk protein is required for depurination at the SRL region of rRNA
2012 Niigata Graduate Research Forum Research Camp
2012 年 1 月 7-8 日
朱鷺メッセ

（3）Onozuka M, Baba K, Miyoshi T, Ito K, Uchiumi T.
Evidence for Interaction of the C-terminal Region Shared by Human Ribosomal Stalk Proteins P0/P1/P2 with eEF-1A/eEF-2
日本分子生物学会
2012年12月11-14日
福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

（4）Yusa K, Ohno M, Miyoshi T, Ito K, Uchiumi T.
The Hinge Regions of Eukaryotic Ribosomal Stalk Proteins are Indispensable for Efficient Depurination of 28S rRNA by Ribotoxins
日本分子生物学会
2012年12月11-14日
福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

（5）Suzuki T, Honda T, Sato S, Miyoshi T, Ito K, Uchiumi T.
Construction of in vitro Translation Elongation System with Archaeal Elongation Factors and Hybrid Ribosomes: Control of Interaction aEF-1A and Stalk aP1 by aEF-1B
日本分子生物学会
2012年12月11-14日
福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

〔その他〕
ホームページ等
http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/uchiumi-ito/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者
三好　智博　（MIYOSHI TOMOHIRO）
新潟大学・研究推進機構・助教
研究者番号：６０５３４５５０