

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870004

研究課題名（和文） 小分子 RNA 複合体形成過程の完全再構成の構築

研究課題名（英文） Reconstitution of small RNA-induced silencing complex assembly

研究代表者

岩崎 信太郎 (Shintaro Iwasaki)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80611441

研究成果の概要（和文）：小分子 RNA 二本鎖から最終的に RISC が形成される過程を RISC assembly と呼ぶ。これまでの研究では RISC assembly に必要な因子の同定行われてきた。その一方で RISC assembly が十分に起こる最小単位については全く解明されてこなかった。本研究においてショウジョウバエ Ago2 をコアとする RISC assembly の完全再構成系を確立した。小分子 RNA は疾患を含めた様々な生命現象を司ることが広く知られており、本研究の成果はそれらの根幹をなす重要な発見である。

研究成果の概要（英文）：Small RNA duplexes form the complex termed RISCs. So far, many studies have indentified the essential factors for this complex assembly pathway. However, the sufficient and minimal factors for RISC assembly have been remained unclear. Here, I established a reconstitution system for fly Ago2-RISC assembly. Results of this research project provide the fundamental and important framework for small RNAs, which are known to regulate diverse biological processes including diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：RNA サイレンシング、Argonaute, 小分子 RNA, シャペロン

### 1. 研究開始当初の背景

18-30 塩基長の小分子 RNA (small RNA) が標的遺伝子の発現調節を介し、発生、細胞周期、細胞増殖、稔性、がん化といった生物学的現象を緻密に制御していることが明らかになりつつある。small RNA は一般に自身と相補的な配列をもつ RNA を標的として働く。しかし、small RNA はそれ自身だけで標的 RNA を

調節できるわけではなく、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる RNA-タンパク質複合体を形成して初めて機能することができる。RISC の構成タンパク質の中でも中心的役割を担うのが Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質である。Ago は small RNA と直接結合し、標的 mRNA の切断活性を有することに加え、翻訳の抑制、poly(A) 鎖の

短縮、分解の誘導など多岐に渡って機能することが分かっている[1]。

代表的な small RNA として microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) がよく知られている。これらの small RNA は、それぞれ miRNA/miRNA\*二本鎖、siRNA 二本鎖と呼ばれる small RNA 二本鎖中間体として合成される。small RNA 二本鎖中間体から最終的に RISC が形成される過程を RISC assembly と呼ぶ。RISC assembly は複雑な過程を経るが、大きく分けると Ago への small RNA 二本鎖の積み込み (RISC loading) と small RNA 二本鎖の一本鎖化(unwinding)という2つの素過程から成り立っている(図1)。これまで最もよく研究されているショウジョウバエ Ago2 の RISC loading では、small RNA 二本鎖は Dicer-2/R2D2 に一度結合した後、ATP 依存的に Ago2 へと受け渡される。このとき一時的に形成される small RNA 二本鎖と Ago の複合体を pre-RISC と呼ぶ。その後、unwinding の過程では small RNA 二本鎖が Ago の中で巻き戻され、一方の RNA 鎖が Ago から解離する。最終的に形成される一本鎖 RNA と Ago の複合体を RISC と呼ぶ。以前の知見では RISC loading に Ago 以外の何らかの因子が必要であることは分かっていたが、それが一体どのような因子なのかについては不明であった。近年、私達のグループを含む3つのグループによってヒト、ショウジョウバエ、植物における RISC loading に Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが必要であることが示された[2-4]。Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーは ATP の加水分解を伴いながら、結合したタンパク質の構造を変化させることによって、そのタンパク質を成熟化させる機能をもつことが知られている。これらの結果により、RISC loading とは「Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが ATP を消費し Ago の構造を

変化させることで small RNA 二本鎖が Ago の中に取り込まれる」という反応である、と説明することができる。

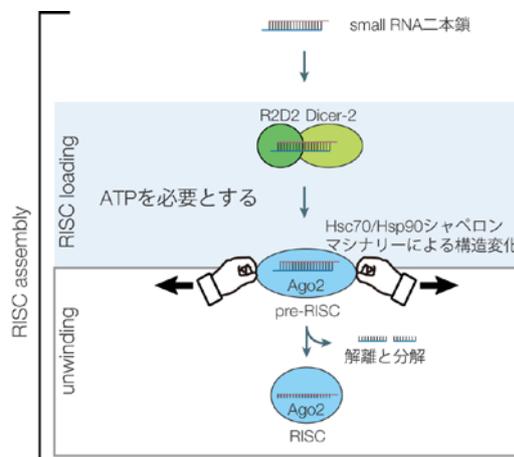


図1 ショウジョウバエ Ago2 における RISC assembly の模式図

## 2. 研究の目的

これらの研究によって RISC loading に Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが必要であることが示された一方、どのような因子によって十分に RISC loading が起こるのか、という点は明らかになっていない。そこで本研究では RISC assembly の完全再構成を目的とし、RISC assembly が十分に起こる最小単位を明らかにする。RISC assembly 再構成系が確立されれば、新規中間状態の発見など、これまでの生化学的解析では解明することが出来なかった詳細な分子メカニズムを解析することが可能になると考えられる。

RISC assembly のメカニズムは上記の通りヒト、ショウジョウバエ、植物において共通しており保存性が非常に高い。本研究は主にショウジョウバエの RISC assembly に着目するが、本研究で得られた知見はヒトを含めたその他の生物にそのまま当てはまる可能性が非常に高く、生物学的にも非常に意義深い。また、近年 small RNA による医薬応用が盛ん

に研究されており、本研究の成果によって、正確なメカニズムの理解に立脚した医薬応用研究が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究ではこれまで研究が最も進んでいるショウジョウバエ Ago2 をモデル Ago として用いる。Ago2 は標的 RNA の切断活性を有しており、これを指標に RISC assembly をモニターできる。ショウジョウバエ S2 細胞において過剰発現し免疫沈降精製した FLAG-Ago2 と small RNA 二本鎖だけでは標的 RNA の切断は起こらないが、この反応系に S2 細胞抽出液を加えると免疫沈降精製 FLAG-Ago2 による標的 RNA の切断が起きる (図 2A)。また、small RNA 二本鎖を RI 標識し、同様の実験を行うと免疫沈降精製 FLAG-Ago2 と pre-RISC として small RNA 二本鎖が、RISC として small RNA 一本鎖が共沈される (図 2B)。これら二種類の実験系を私はこれまでの研究において確立しており、RISC assembly を評価することが可能である。

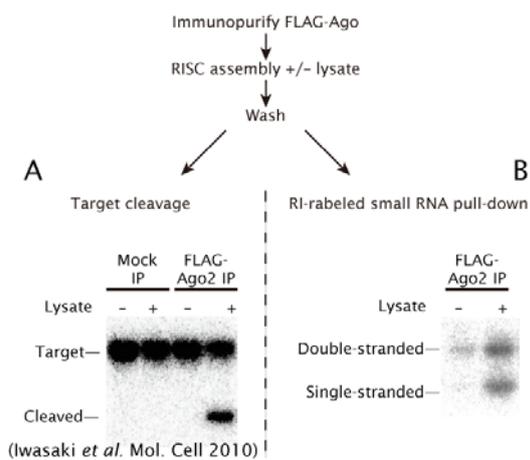
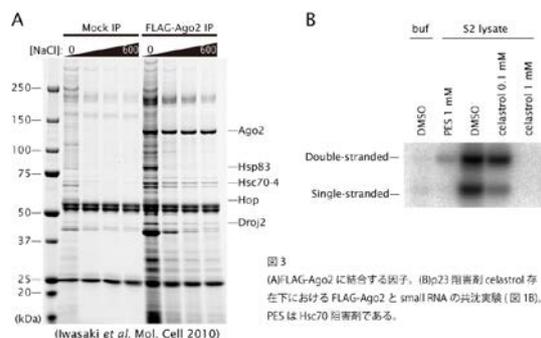


図2 ショウジョウバエ Ago2 における RISC assembly 評価系 (A)FLAG-Ago2 による標的 RNA 切断、(B)RI 標識した small RNA と FLAG-Ago2 との共沈を指標にしている。

Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーによる成熟化が最も研究されているものとして、ヒト

のステロイドレセプターが挙げられる。ステロイドレセプターはそれ自身だけではリガンドであるステロイドと結合できず、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーによって構造変化が誘導され、初めてステロイドと結合できるようになる。small RNA 二本鎖を Ago に対するリガンドと見なすとステロイドレセプターの例と RISC loading は非常に類似性が高い。ステロイドレセプターの成熟化は再構成系が確立されており、Hsp70、Hsp90、Hsp40、Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein)、p23 の 5 種類のタンパク質が必要十分であることが示されている [5]。私のこれまでの研究により、ショウジョウバエ Ago2 に結合するタンパク質として Hsc70-4 (Hsp70 ホモログ)、Hsp83 (Hsp90 ホモログ)、Droj2 (Hsp40 ホモログ)、Hop を同定している (図 3A) [4]。以上の結果から、Ago2 の RISC loading においても Hsp70、Hsp90、Hsp40、Hop、p23 の 5 種類のタンパク質ホモログによって再構成される可能性が高いと考えた。



### 4. 研究成果

本研究において、ショウジョウバエ Ago2 をコアとする RISC assembly を再構成することが可能になった。

まず、ステロイドレセプターの成熟化に必要なとされているが、ショウジョウバエ Ago2 と

の結合が確認されていない p23 が RISC assembly に必要かを検証する実験を行った。p23 阻害剤である Celastrol を反応系に加えると顕著に RISC loading が阻害された (図 3B)。このことから、p23 が RISC loading に必須であることが示唆された。

そこで、Hsp83、Hsc70-4、Hop、Droj2、p23 に加え、これまでの研究により Ago2 の RISC loading に必須であることが知られている Dcr-2/R2D2 を含めた 7 種を、それぞれのリコンビナントタンパク質として発現させ、精製し、反応に用いた。すべてタンパク質が揃った場合、pre-RISC、RISC がそれぞれ形成された。これまでの報告の通り、Dcr-2/R2D2 は Ago2 の RISC loading に必須であった (図 4A)。それに対し、シャペロンマシナリー構成因子を反応系からそれぞれ除くと 50%から 80%程度反応の効率が低下した (図 4A)。このことはシャペロンマシナリー構成因子が協調的に働いていることを示唆している。また本再構成系を用いて標的 RNA の切断実験を行ったところ、図 4A の結果に対応し、すべての因子がそろった場合、最も高い切断活性が検出された (図 4B)。この結果は本再構成系においても機能的な RISC が形成されていることを示している。

siRNA 二本鎖には非対称性があり、一方の RNA 鎖が他方に対し、より頻度高く RISC を形成することが知られている。主に 5' 端がより熱力学的に不安定な塩基対をもつ RNA 鎖がガイド鎖 (最終的に RISC に残る RNA 鎖) として選ばれ、もう一方の RNA 鎖 (パッセンジャー鎖) は unwinding の過程で複合体から解離する。シヨウジョウバエ Ago2 の RISC assembly 過程では Dcr-2/R2D2 がこの非対称性の認識を担い、方向性をもって siRNA 二本鎖に結合することが知られている。

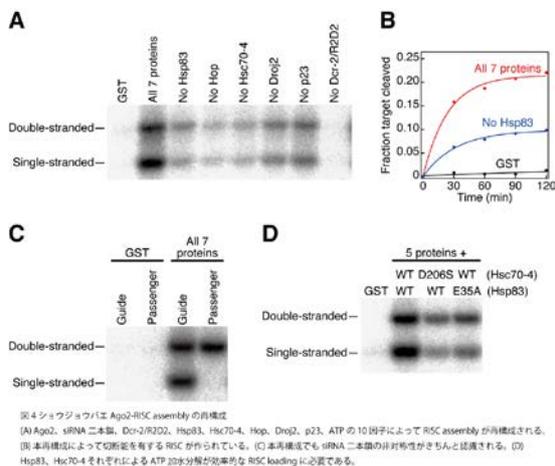
本再構成系においても上記の siRNA 二本鎖の

非対称性が認識されているかを検証するために、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖をそれぞれ RI 標識し、実験を行った。ガイド鎖を標識した場合、pre-RISC に該当する二本鎖と RISC に該当する一本鎖の両方が検出されるのに対し、パッセンジャー鎖を標識した場合、pre-RISC のみが検出された (図 4C)。以上の結果は本再構成系においても siRNA 二本鎖の非対称性がきちんと認識されていることを示す。

これまでの研究により、RISC loading には ATP 加水分解が必要であることが示されてきた。Hsp83 と Hsc70-4 はそれぞれ ATPase であり、ATP 加水分解を伴いながら結合したタンパク質の構造を変化させることが知られている。Hsp83、Hsc70-4 による ATP 加水分解が RISC loading に必要であるかを検証するためにそれぞれの ATPase 変異体リコンビナントタンパク質を作成し、反応に用いた。両方の変異体によって RISC loading の効率が低下したことから、Hsp83、Hsc70-4 それぞれによる ATP 加水分解が効率的な RISC loading に必要であることが明らかとなった (図 4B)。

本研究の結果により、これまでの研究で用いられてきた細胞粗抽出液を用いずとも精製した因子のみによって RISC assembly という反応を引き起こすことができるようになった。本再構成系はこれまで知られている RISC assembly の性質をきちんと反映している。現在、本再構成系と一分子実験と組み合わせることでこれまで明らかにされていなかった RISC assembly 反応の中間的素過程を検出することを試みている。本研究の結果は、RISC assembly とステロイドレセプターという一見全くことなる反応が全く同様のシャペロンマシナリーの構成要素によって行われて

いることを示している。これらは「シャペロンマシナリーによって結合したタンパク質の構造が変化し、初めてリガンドに結合できる」というコンセプトを共有しており、シャペロンマシナリーによるタンパク質の成熟化という反応の普遍性を示す例となっている。本再構成系は RISC assembly のみならず、シャペロンマシナリーによるタンパク質の成熟化を今後さらに詳細に研究することを可能とする実験系であり、今後のさらなる応用が期待される。



[1] R. W. Carthew & E. J. Sontheimer, *Cell* **11**, 1150 (2009)  
 [2] S. Iwasaki *et al.*, *Mol. Cell* **39**, 292 (2010)  
 [3] T. Iki *et al.*, *Mol. Cell* **39**, 282 (2010)  
 [4] T. Miyoshi *et al.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1024 (2010)  
 [5] K. C. Kanelakis & W. B. Pratt, *Methods Enzymol.* **364**, 159 (2003)

## 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)

[学会発表] (計2件)

(1)

発表者：Shintaro Iwasaki

発表表題：In vitro Reconstitution of RISC Assembly Mediated by Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery

学会等名：The 22nd CDB Meeting RNA Sciences in Cell and

Developmental Biology II

発表年月日：2012年06月11日～2012

年06月13日

発表場所：RIKEN CDB, Kobe

(2)

発表者：Shintaro Iwasaki

発表表題：Reconstitution of RISC Assembly Mediated by Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery

学会等名：第14回日本RNA学会年会

発表年月日：2012年07月18日～2012年7月20日

発表場所：東北大学百周年記念会館 川内萩ホール、仙台市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 信太郎 (Shintaro Iwasaki)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80611441