

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：26402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770169

研究課題名(和文) 緑藻クラミドモナスの翻訳抑制に寄与する新規マイクロRNAの探索とその役割の研究

研究課題名(英文) Search and investigation of novel Chlamydomonas miRNAs that mediate translational repression

研究代表者

山崎 朋人 (Yamasaki, Tomohito)

高知工科大学・工学部・助教

研究者番号：70512060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現を制御するシステムは多様である。遺伝子情報を持たない小さなRNA(miRNA)は、遺伝情報を持つRNA(メッセンジャーRNA)に特異的に結合し、その働きを抑えることが知られる。その抑え方には、メッセンジャーRNAを切断するやり方と、遺伝情報のタンパク質への変換(翻訳)を抑えるやり方がある。本研究では、単細胞緑藻クラミドモナスを使って、翻訳を抑えるタイプのmiRNAの探索と、その機能の解明を目指した。研究の結果、ある種のタンパク質リン酸化酵素遺伝子のメッセンジャーRNAが、miRNAによって翻訳が阻害されていることを初めて明らかにした。今後その機能の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：A gene exerts its function in a cell, and the gene expression is strictly controlled by diverse regulation systems. Small non-coding RNA, which is called miRNA, bind to specific mRNA with their complementarity and induce gene silencing. Gene silencing is mediated by cleavage of a target mRNA or translation inhibition of a target mRNA. Previously, we found that artificial miRNA regulates gene expression at translation levels in unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Therefore, some endogenous genes were suspected to be regulated by miRNAs at translation levels, but it has not been demonstrated. In this research, we tried to find miRNA that mediate translation repression, and we found that a miRNA inhibits translation of a protein kinase in *Chlamydomonas*.

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：マイクロRNA RNAサイレンシング クラミドモナス 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA(miRNA)は、自身と相補する mRNA に選択的に結合して発現を抑制するが、それには mRNA を切断するタイプと、mRNA を切断せず翻訳を阻害するタイプがあると考えられていた。本研究で研究材料とした単細胞緑藻であるクラミドモナスや陸上植物の属する緑色植物において、以前は mRNA を切断するタイプしか存在しないと考えられていたが、研究開始当初には翻訳を阻害するタイプの miRNA の存在を示唆する研究報告がいくつか出始めていた。しかしながら、そのようなタイプの miRNA が果たしてどれだけの機能や役割を持つのか、全く分かっていなかった。

翻訳抑制の経路に注目すると、動物と植物でメカニズムが異なり、動物は翻訳抑制した mRNA の不安定化を引き起こすが、陸上植物(シロイヌナズナ)では目に見える不安定化を起こさないことが明らかにされていた。一方で私は、クラミドモナスでもアラビドプシスと同じく標的 mRNA の顕著な不安定化は起こらないことなどを明らかにし、同じ緑色植物で進化的に近い関係にあるアラビドプシスとクラミドモナスが、ほぼ共通した翻訳抑制型 RNAi のメカニズムを持つことを明らかにしていた。

データベースに登録されている 50 の miRNA のうち、10 種のクラミドモナス miRNA と、それら miRNA それぞれに 100% 相補する標的配列を持つ 10 種の標的 mRNA について野生型株と Mut-20 株で比較解析をした。miRNA を生産できない Mut-20 変異株では 10 種全ての miRNA が検出されなかったが、Mut-20 で蓄積量が増加した標的 mRNA は 10 種のうち 1 種(12 倍程度増加)他の 9 種の蓄積量は変化がなかった。これは、クラミドモナス miRNA の多くが翻訳抑制型 RNAi の経路で作用している、または標的 mRNA の切断が検出できないほどごく僅かしか行われていないことを示唆していた。

2. 研究の目的

クラミドモナス miRNA の多くは翻訳抑制経路で作用すると予測された。よって、翻訳抑制に作用する miRNA を解析しなければ、miRNA による内在遺伝子発現制御の全ぼうを明らかにする事はできないと考えた。しかしデータベース上にあるクラミドモナス miRNA の種類は 50 種と少なく、またそれらの標的遺伝子に明確な機能が予測できるものはほとんど無い。そのため、これらの限られた情報を元に研究を進めても、miRNA が生命現象の調節に果たす役割を解明するに至るのは困難であった。

本研究では、Mut-20 株を利用し、特に翻訳抑制に作用する種類の miRNA を探索し、miRNA によって翻訳抑制される遺伝子を多数決定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いて新規 miRNA を探索し (small RNA-seq) 標的遺伝子の予測を試みた。

(2) miRNA の標的となる mRNA の定量解析 (Real-time RT-PCR) を行い、野生型株と変異株の miRNA 標的遺伝子 mRNA 量を比較し、各 miRNA が機能する抑制経路を予測した。

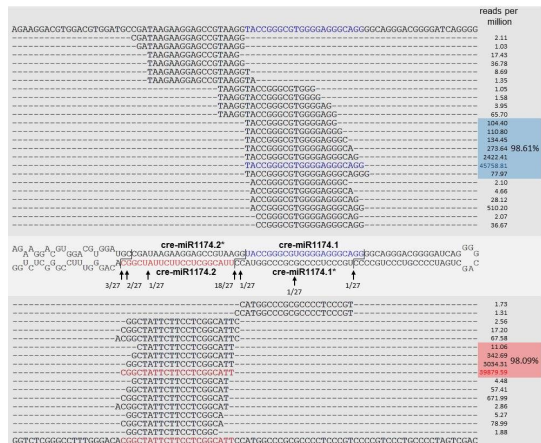
(3) の結果から翻訳が抑制されていると見られる遺伝子産物に対する抗体を作製し、野生型株と Mut-20 株でタンパク量を比較、翻訳抑制されていることを明らかにしようと試みた。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによる small RNA-seq 解析から、新規 miRNA を 2 つ同定し、そのプロセッシングパターンを解明した。

野生型株の全 RNA を鋳型に small RNA ライブラリーを作製し、Small RNA-seq 解析を行った。解析の結果、18-24 塩基の、データベースに登録されていない多数の miRNA 候補配列が見いだされた。中でも miR1174.1 と miR1174.2 の 2 つの miRNA を、前駆体 RNA がヘアピン RNA として存在し、ガイド miRNA と相補するパッセンジャー miRNA が検出され、かつ発現抑制を誘導することが確認された (図 1)。

さらに、miR1174.2 の前駆体 RNA を 5' RACE 解析した結果、前駆体 RNA をプロセッシングする Dicer タンパクによる切断が、ヘアピン型前駆体 RNA のループ側から起こることが明らかになった (図 1)。これらの結果は miR1174.2 が真の新規 miRNA であることを明確に示唆する物であった。また miRNA 前駆体のプロセッシングパターンは、近縁の陸上植物のそれよりも、動物のそれに似ており、ク



ラミドモナスは進化の過程上そうであるように、動物と植物、両方の特徴を持つことが示唆された。

図 1 small RNA-seq と 5' RACE の結果 中央に前駆体 RNA、上下に small RNA のリードをアライメントしている。前駆体に対する

矢印は 5' RACE によってクローニングされた配列の末端位置と、その頻度。

(2)野生型株と Mut-20 株の real-time RT-PCR による比較解析から、miR912、miR1174.2 との相関性が高いにもかかわらず、その mRNA レベルに変化がない遺伝子を、miRNA によって翻訳が阻害されている可能性の高いとして 2 つ選んだ。次にそれぞれの遺伝子産物であるタンパク質に対するペプチド抗体を 2 種類ずつ作製した。標的遺伝子の cDNA 配列をクローニングし、その一部を大腸菌 PET 系で発現させた。次いでその大腸菌を用いてウエスタンブロットを行い、作製した抗体が確かに標的候補遺伝子のタンパクを認識していることを確認した。次に当該タンパク質に野生型株と Mut-20 株で変化がないかを調べた。しかしながら、タンパク質量に明確な違いがみられなかった。つまり、クラミドモナス miRNA は相関性の高い配列を持った mRNA を切断もせず、翻訳阻害もしない場合があることが示唆された。

(3)解析に用いた miR912、miR1174.2 は果たして miRNA としての活性があるのかを確かめるため、また miRNA の種類毎に mRNA 切断タイプと翻訳阻害タイプに分かれるのではなく、miRNA と標的 mRNA の相関性の違いによって mRNA を切断したり、翻訳を阻害したりするのではないかと予測を立て、以下の実験を行った。まずルシフェラーゼレポーター遺伝子に miRNA の標的配列を接続し、形質転換体プールを作ってその発現抑制効果を簡便に解析できるアッセイ系を構築した。この系を用いて miR912 と miR1174.2 の発現抑制効果を解析したところ、完全相補する配列を持ったルシフェラーゼは強力にその発現が抑えられることが分かった。この結果は、miR912、miR1174.2 とともに発現抑制を起こす能力があるが、内在遺伝子の種類によっては検出できるレベルの発現抑制効果を生み出さないと示唆した。この理由の解明が今後の課題であるが、もしかすると mRNA の局在に問題解決の糸口があるのかもしれない。

さらに、miR1174.2 と標的配列の相関性が発現抑制のタイプ分けに与える影響を調べたところ、相関性が 100%に近い場合は切断タイプ、相関性が低く、特に配列中央部分にミスマッチがある場合は翻訳阻害タイプになることが明らかになった。また動物細胞同様に seed 配列(miRNA の 5' か 2-8 塩基分)の相関性の高さが発現抑制効果の発揮に重要であることが明らかにされた。

(4)これらの研究結果を踏まえ、新たに翻訳抑制の標的と目される遺伝子を洗い直した。研究協力者の Heriberto Cerutti 教授との共同研究において、miRNA を内包する Argonaute3 タンパクの RNA-IP、RNA-seq 解析を行い、細胞内で miRNA と確かに結合してい

る mRNA を見いだした。この mRNA がコードするタンパク質のペプチド抗体を作製し、再び野生型株と Mut-20 株で比較解析した結果、あるタンパク質リン酸化酵素が Mut-20 において 30%程度増加していることが分かり、ついに miRNA によって翻訳阻害がされている遺伝子を明らかにすることができた。本研究により、これまで緑色植物で存在が明らかでなかった miRNA による内在遺伝子の翻訳阻害による発現制御メカニズムが確かに存在することが明らかになり、翻訳レベルで制御される内在遺伝子を発見することができた。

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 3 件)

1. Kong Fantao, Yamasaki Tomohito, Ohama Takeshi.

Expression levels of domestic cDNA cassettes integrated in the nuclear genomes of various *Chlamydomonas reinhardtii* strains.
Journal of Bioscience and Bioengineering. Volume 117, 613-616, 2013 (査読あり)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.025>

2. Tomohito Yamasaki, Adam Voshall, Eun-Jeong Kim, Etsuko Moriyama, Heriberto Cerutti, and Takeshi Ohama.

Complementarity to a miRNA Seed Region Is Sufficient to Induce Moderate Repression of a Target Transcript in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*
The Plant Journal, Volume 76, 1045-1056, 2013 (査読あり)
DOI: 10.1111/tpj.12354

3. Hidenobu Uchida, Eri Ikeuchi, Tomohito Yamasaki, and Takeshi Ohama

The role of zinc finger protein in RNAi in a unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)
Journal of Phycology, volume 48, 1299-1303, 2012 (査読あり)
DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01214.x

[学会発表](計 6 件)

1, Tomohito Yamasaki, Heriberto Cerutti, Takeshi Ohama.

The development of a luciferase reporter system to test gene silencing mediated by individual miRNAs

15th international Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*
2012年6月7日 ドイツ ポツダム

2, Tomohito Yamasaki, Heriberto Cerutti, Takeshi Ohama.

The development of a luciferase reporter system to test gene silencing mediated by individual miRNAs

Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference

2012年7月14日 高知市 高知市文化プラザカルポート

3, 山崎朋人, Heriberto Cerutti, 大濱武
小分子 RNA を介した翻訳抑制と Raptor の役割

第14回日本RNA学会

2012年7月19日 宮城県 東北大学

4, 山崎朋人, Heriberto Cerutti, 大濱武
単細胞緑藻クラミドモナスを用いた RNA サイレンシング機構の解析

第15回日本RNA学会

2013年7月25日 愛媛県 媛銀ホール

5, 山崎朋人, Heriberto Cerutti, 大濱武
クラミドモナス miRNA を介した遺伝子発現抑制は seed 配列の相同性のみで誘導される

第77回日本植物学会

2013年9月13日 北海道 北海道大学

6, 山崎朋人, 大濱武

クラミドモナス miRNA の生合成メカニズムと標的配列認識ルールの解析

第10回クラミドモナス研究会

2013年11月30日 愛知県 基礎生物学研究所

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://www.env.kochi-tech.ac.jp/ohama/ohama-home/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 朋人 (YAMASAKI, tomohito)

高知工科大学・環境理工学群・助教

研究者番号: 70512060

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大濱 武 (OHAMA, Takeshi)

高知工科大学・環境理工学群・教授

研究者番号: 00194267

Heriberto Cerutti (CERUTTI, Heriberto)

ネブラスカ大学リンカーン校・プラントサイエンスイニシアチブ・教授

研究者番号: なし