

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650047

研究課題名(和文)細胞内におけるRNAサイレンシング機構の分子ダイナミクス

研究課題名(英文)Molecular dynamics of RNA silencing mechanism in cell

## 研究代表者

佐々木 浩(Sasaki, Hiroshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30611454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉やマイクロRNAによる遺伝子抑制に代表されるRNAサイレンシングは、遺伝子発現を制御するシステムとして真核生物に広く保存されています。このシステムの中核を担うのが、Argonauteタンパク質と1本鎖RNAからなる複合体RNA-induced silencing complex (RISC) です。しかし、RISCの形成と作用の詳しい分子メカニズムについては、いまだ謎に包まれています。本研究では、全反射蛍光顕微鏡による1分子イメージングという手法を用いて、RISCの形成と標的認識のメカニズムを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：RNA silencing, such as RNA interference and gene silencing by microRNAs, is one of the fundamental gene regulation mechanisms and universally conserved in eukaryotes. The RNA-induced silencing complex, which is composed of an Argonaute protein and a single-stranded short RNA, plays a central role in this system. However, the detailed mechanisms of RISC assembly as well as target recognition and cleavage remained unclear. By single-molecule imaging approach using total-internal reflection microscopy, here I revealed the fundamental steps in the assembly and target cleavage of RISCs.

研究分野：1分子イメージング

キーワード：RNA 1分子イメージング RNAサイレンシング 核酸 RISC Argonaute

1. 研究開始当初の背景

(1) 18-30塩基長程度の小分子 RNA (small RNA) が、相補的な配列をもつ標的遺伝子の発現抑制を行う RNA サイレncing と呼ばれる機構は、真核生物に広く保存されており、発生、分化、細胞増殖、稔性、がん化など、多様な生命現象を緻密に制御していることが明らかとなりつつある。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) と呼ばれる複合体を形成して、初めて機能することができる。RISC を構成するタンパク質の中でも中心的な役割を担うのが、Argonaute (Ago) である。Ago は small RNA と直接結合し、標的 mRNA の切断や翻訳の抑制、poly(A) 鎖の短縮とそれに伴う標的 mRNA の分解など、多岐に渡る転写後翻訳制御を誘導することが明らかとなっている。

(2) 代表的な small RNA である small interfering RNA (siRNA) と microRNA (miRNA) は、それぞれ二本鎖中間体として生合成される。RNA 二本鎖中間体から最終的に RISC が形成される過程 (RISC 形成) は大きく 2 つの過程、すなわち Ago への small RNA 二本鎖の積み込み (duplex loading) と積み込まれた RNA 二本鎖の一本鎖化 (passenger ejection) から成り立っている。近年の研究から、RISC の構成因子あるいは形成に必要な因子として、Ago 以外にも Dicer や R2D2、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリータンパク質などが同定された。

(3) 形成された RISC は、Ago に取り込まれたガイド RNA 鎖と相補的な配列をもつ mRNA を標的として認識し結合する。この際、ガイド鎖の 5' 末端から 2-8 番目の塩基はシード配列と呼ばれ、標的の特異性の重要な決定因子

となること、これまでの研究から明らかとなっていた。さらに、ヒト Ago2 やショウジョウバエ Ago2 は、標的 RNA を切断する活性をもつ。

(4) RISC 形成や標的認識については、主に遺伝学と生化学を中心とする研究によって、その詳細が明らかにされてきた。しかしながら、RISC 形成や標的認識の中間状態は生化学的に単離することが難しく、それらの各素過程についてこれ以上解析することは不可能な状況にあった。また、構造生物学の進展により、複数の Ago タンパク質・RNA 複合体構造が決定されていたが、RNA を含まない Ago タンパク質については決定されておらず、複数の中間状態の立体構造を決定することで、RISC 形成を解明するというアプローチは実現性に乏しかった。そのため、これらの因子がどのように会合して機能的な複合体を形成するか、さらに標的 mRNA を認識し、どのように解離するかといった順序と構造変化の詳細については未知であった。さらに、in vivo での RISC 形成と標的認識に関する知見は皆無であった。

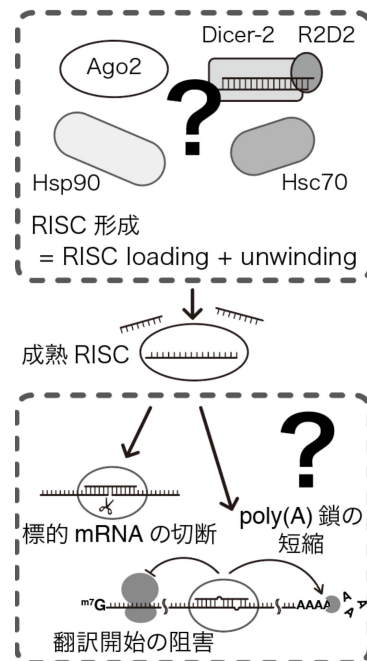


図 1. ショウジョウバエ Ago2-RISC の形成と作用

## 2. 研究の目的

(1) RISC の *in vitro* 完全再構成系を用いた生化学と全反射顕微鏡を用いた1分子イメージングを組み合わせ、これまでの方法では捉えることができなかった RISC 形成と標的認識の分子ダイナミクスを試験管内そして最終的に細胞内で可視化し、統合的に理解することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 生化学的に最も解析が進んでいるシヨウジョウバエ Ago2 をモデル Ago として用いた。まず RISC が形成される過程を全反射顕微鏡下で解析できる1分子イメージング系を構築した。まず、RISC 形成に必要なタンパク質群をすべて組み換えタンパク質として調製した。次に、リガンドと共有結合する Halo タンパク質を融合タグとして用いて、S2 細胞で発現させた Ago2 タンパク質を基板上に固定化し、組換えタンパク質として調製した Dicer-2/R2D2, Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリー、さらにそれぞれの3'末端に異なる蛍光標識を導入した RNA2 本鎖を加えることで、石英ガラス基板上で RISC 形成反応を行った。この様子を、全反射顕微鏡にてリアルタイム観察した。そして、複数の実験条件において RNA2 本鎖が Ago2 上に滞在する時間を解析し、RISC 形成に必要な各因子の寄与と作用点を調べた。

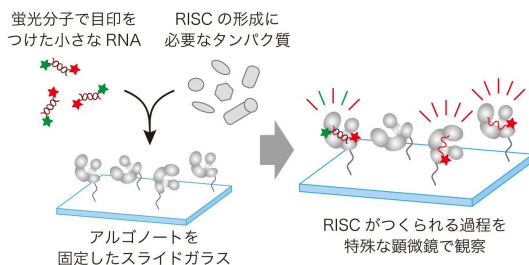


図2. RISC 形成の1分子観察実験の概要

(2) 次に、RISC による標的認識・切断過程を全反射顕微鏡下で解析できる1分子イメ

ージング系を構築した。まず内在性の Ago2 を含む S2 細胞抽出液を調製し、ATP 再生系、ガイド鎖となる RNA 鎖の3'末端に蛍光標識を導入した RNA2 本鎖を加えることで、蛍光標識 RISC を調製した。次に、RISC とは異なる蛍光標識を導入した標的 RNA を石英ガラス基板上に固定し、RISC を加えて、標的認識・切断過程を全反射顕微鏡にてリアルタイム観察した。そして、RISC が標的を認識し、切断後に標的から解離するまでの様子を複数の実験条件において解析した。

## 4. 研究成果

(1) Dicer-2/R2D2/siRNA2 本鎖の複合体が、シャペロンマシナリー非依存的に Ago2 に結合解離を繰り返すこと、そしてシャペロンマシナリーの存在により、Dicer-2/R2D2/siRNA2 本鎖複合体の Ago2 への結合が安定化され、滞在時間が延びることを明らかにした。さらに、Ago2 によるガイド鎖5'-末端に位置するリン酸基の認識は、繰り返される結合解離のステップ以降に起きることが分かった。

(2) RISC は標的切断後に、ガイド鎖3'末端側と相補的なフラグメントから切断産物を解離し、その後でシード領域と相補的なフラグメントを解離することを明らかにした。また、ガイド鎖3'末端と標的の熱力学的安定性を極端に高めた場合は、この順序が逆になることも同時に示した。

(3) これらの事実を統合することで、従来の生化学的解析では捉えることができなかった、シヨウジョウバエ Ago2-RISC の形成と標的認識・切断における複数の基本過程を解明した。

## 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) Chunyan Yao, Hiroshi M. Sasaki, Takuya Ueda, Yukihide Tomari, Hisashi Tadakuma. Single-molecule analysis of the target cleavage reaction by the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Molecular Cell*. 査読有. Vol. 59, No. 1, pp. 125-32. 2015年7月2日. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.015.

(2) Shintaro Iwasaki, Hiroshi M. Sasaki, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki, Hisashi Tadakuma, Yukihide Tomari. Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature*. 査読有. Vol. 521, No. 7553, pp. 533-6. 2015年5月28日(オンライン掲載2015年3月31日). doi: 10.1038/nature14254.

〔学会発表〕(計1件)

(1) Hiroshi M. Sasaki. Defining fundamental steps in the assembly of *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Cell Symposia: Regulatory RNA*. ポスター発表. 査読有. 10/20/2014. Berkeley, CA, USA.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 浩 (SASAKI, Hiroshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号: 30611454

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: