田原研究者：論文紹介

RNAi におけるサイレンシングシグナルの増幅装置および増幅産物の生化学的活性を解明

In vitro* analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans

Kazuma Aoki, Hiromi Moriguchi, Tomoko Yoshioka, Katsuya Okawa and Hiroaki Tabara

The EMBO Journal 26, *5007–5019*, 2007:

科学技術振興機構（JST）のさきがけ研究領域「RNA と生体機能」に所属する田原研究者ら（京都大学）は、遺伝子発現の抑制手段として有用な RNAi におけるサイレンシングシグナルの増幅装置および増幅産物の生化学的活性を解析し、幾つかの新規な知見を発表した。

研究の背景

RNA interference（RNAi）とは細胞に 2 本鎖 RNA（dsRNA）を導入した場合に相同配列を持つ遺伝子の発現抑制が生じる現象であり、線虫 *C. elegans* を用いた研究において最初に発見された。様々な真核生物において遺伝子発現を制御する新しい手段として、基礎研究において既に盛んに利用されているのみならず将来の医療や植物育種等への RNAi の応用が期待されている。また、RNAi は転移因子やウイルスに対する防御反応と類似した現象であることがわかってきている。このように、RNAi は基礎および応用の両面で興味深い現象であり、RNAi の反応機構を詳しく解析して理解することが求められている。

RNAi の反応機構においては、標的遺伝子と相同な 20–25 塩基長（nt）の small interfering RNA（siRNA）が中間産物として重要な役割を果たしている。RNAi 反応の初期段階においては、Dicer と呼ばれるマルチドメイン蛋白の RNA 断片化（RNase III）活性によってトリガーである長い 2 本鎖 RNA から 5' 末端にモノ燐酸を持つ初期型 siRNA が産生される。加えて線虫や植物を含む複数の生物種においては、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRP）が関与する反応過程によって標的 mRNA を鋳型として二次型 siRNA が産生されることによって、サイレンシングシグナルの増幅が生じると考えられている。少なくとも線虫では、二次型 siRNA の 5' 末端がトリ燐酸化されていることが知られている。昆虫や哺乳類では、Argonaute ファミリーに属し RNA 切断活性を持つ蛋白が初期型 siRNA と一緒に RNA-induced silencing complex（RISC）と呼ばれる複合体を形成し、RISC は標的 mRNA を配列特異的に認識して切断する（Slicer）活性を示す。

研究の成果

これまで、田原研究者は RNAi の反応機構について線虫をモデル生物として遺伝学的な研究を行ってきた。その遺伝学的研究の蓄積を基盤とし、さらに線虫の細胞抽出液を用いて RNAi に関連する酵素活性を試験管内で解析するための無細胞反応系を独自に開発して活用することによって、RNAi の反応機構を複合的に解析した。

この無細胞反応系を用いることによって、まず初期型 siRNA を産生する Dicer 活性を解析することが可能である。そして、細胞抽出液中の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を探索して解析した結果、下記の新たな知見を得た。

1. mRNA やその派生物を鋳型として 21-23 塩基長の小分子 RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を検出した。
2. RRF-1 ポリメラーゼの複合体が主としてその RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性に対応し、二次型 siRNA に特有の 5' 末端構造を持つ小分子 RNA をプライマー非依存的かつ Dicer 非依存的に合成することを明らかにした。
3. そのサイレンシングシグナルの増幅装置である RRF-1 複合体が、哺乳類におけるウイルスセンサー蛋白と類似した DExH 型ヘリカーゼである DRH-3 を含んでいることを発見した。

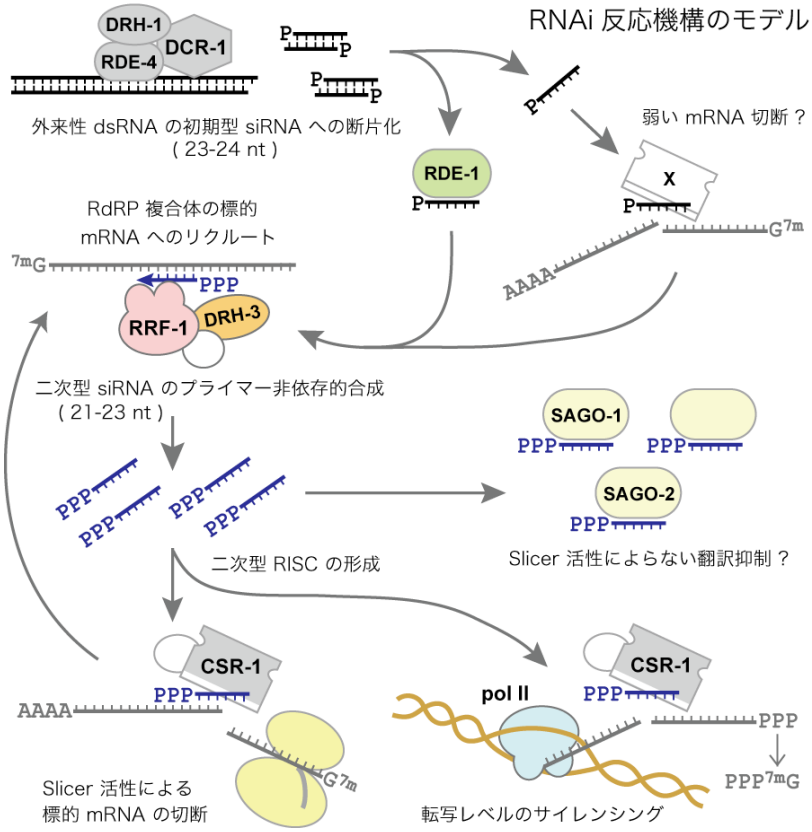
次に、幾つかの形状の siRNA が示す活性について無細胞反応系を用いて解析した結果、下記の知見も得た。

4. 二次型 siRNA が初期型 siRNA よりも遥かに強力に標的 mRNA を切断する Slicer 活性を誘導することを見いだした。その Slicer 活性は Argonaute 蛋白の一つである CSR-1 に対応していることも明らかとした。

以上の研究結果に基づき、線虫の RNAi における標的転写産物の不安定化においては、初期型よりもむしろ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによる増幅産物である二次型 siRNA が主要な役割を果たしているというモデルを提唱した。

この研究成果は、線虫という生物種における RNAi の機構について、外来の RNA によって誘導される反応の概略を提示するものである（図 1）。

図 1. 線虫における外来性の RNAi 反応機構のモデル



今後の展開

本研究は、RNAi におけるサイレンシングシグナルの増幅装置に相当する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体の生化学的活性を明らかとしたものであり、加えて増幅産物に相当する二次型 siRNA の活性についても新たな知見を提供した。RNAi による遺伝子発現抑制を増強するための手段の一つとして、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによってサイレンシングシグナルを高効率で増幅する条件を見いだして活用することが有効である可能性が考えられる。そのような将来の応用研究に向けての基盤情報の一つとして、本研究の成果は重要であると思われる。

また、遺伝学的な解析が進んでいる線虫でも標的転写産物の切断に関与する siRNA−蛋白複合体（RISC）を同定できたことから、RNAi における鍵の一つである標的転写産物の分解装置について遺伝学的な解析がさらに進展する契機になるのではないかと考えられる。