

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 19 年度採択研究代表者

塩見 美喜子

徳島大学ゲノム機能研究センター・准教授

RNA サイレンシングが司る遺伝子情報制御

1. 研究実施の概要

20 から 30 塩基長の小分子 RNA によって引き起こされる遺伝子発現抑制機構を RNA サイレンシングと呼ぶ。その代表例は RNA interference (RNAi) である。RNAi の発見以来、RNA サイレンシング研究は飛躍的に進み、この機構が発生や代謝、ウイルス感染防御といった、生命に欠かせない多くの現象を制御していることが明らかになってきた。ある種の癌の様に、RNAi 関連分子の機能異常が発症原因として疑われる疾患も次第に見つかってきている。これらの結果は、我々がこれまでに培ってきた、生命を司るための遺伝子情報発現の仕組みに関する理解を大きく変えようとしている。我々は、主にショウジョウバエをモデル生物として RNA サイレンシングの作用機序を分子レベルで解明する事を目指している。これまで、ショウジョウバエで発現する5種類の Argonaute (RNA サイレンシングの中核因子) それぞれを対象として研究を進める事によって、各 Argonaute が異なった小分子 RNA と結合し、独立した RNA サイレンシング機構で機能する事を明らかにしてきた。本研究においては、これまでに培った知見、技術、試料を十分に駆使し、発揮する事によって研究をさらに展開・発展させ、ショウジョウバエの RNA サイレンシング機構を包括的に理解する事を目指す。本研究を通して小さな RNA が制御する遺伝子情報発現の仕組みに関する理解をさらに深める。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

<AGO1 に関する研究>

ショウジョウバエ AGO1 は microRNA (miRNA) と特異的に結合する。結合した miRNA の塩基配列に従って標的 mRNA に作用し、その翻訳を負に制御する。しかし、その作用機序や分子作動特性に関する知見は乏しい。本年度は、以下の実験を行った。

- 1) 成熟した miRNA の AGO1 へ受け渡し(miRNA loading)機構は未だ解明されていない。最近、我々はこの機構がショウジョウバエにおいては ATP 依存的に起こる事を示した。この反応に関わる因子の同定を進めたところ、La 蛋白質が候補因子として得られた。現在、確認実験をすすめている。
- 2) AGO1 は標的 mRNA に作用する前後において結合因子を Dicer2 から GW182 へと変換する。しかし、この分子動態がどのような仕組みで行われるかは不明であった。Dicer2 と GW182 に対する抗体を用いる事によって、その解析をすすめた。現在、論文作成中である。
- 3) Bioinformatics によって各 miRNA の標的 mRNA の同定が進められているが、予測の域を脱しない。我々が作成した GW182 抗体を用いて AGO1/miRNA/標的 mRNA/GW182 複合体を細胞より単離し、この複合体に含まれる mRNA の library を作製することによって、各 miRNA の標的遺伝子の同定をすすめた。S2 細胞を由来とする library の作製は成功したため、現在、そのクローン解析を行っている。

<AGO2 に関する研究>

ショウジョウバエ AGO2 は外来性 siRNA と特異的に結合し、RNAi において機能する。しかし、AGO2 は、常に外来からの siRNA を待ち受けているのであろうか？それとも、細胞内在性 siRNA と結合する事によって、naïve な状態にある細胞でも RNAi にかかわっているのであろうか？この疑問に答えるために、AGO2 に対する抗体を利用し、naïve な状態にある S2 細胞より AGO2-small RNA 複合体を単離精製し、それら RNA の同定を試みた。High-throughput sequencing 及び bioinformatics をすすめる事によって8万程度のクローンの配列解析を行ったところ、多くのクローンは retrotransposon 由来である事が判明した。これまでの解析結果から、ショウジョウバエ及びマウスなど哺乳動物の生殖巣においては、PIWI 蛋白質群が retrotransposon 由来の small RNA と結合する事によって、そのサイレンシングに関わる事がわかっていた。しかし、somatic 細胞において retrotransposon のサイレンシングにどの AGO が関わるかは不明であったが、本研究を通して、AGO2 が関わる事が明らかとなった。本研究に関する論文は、現在 in press である (Nature) (2)。

<PIWI 蛋白質群(Piwi, Aub, AGO3)に関する研究>

Aub は、生殖巣特異的に発現する Argonaute (PIWI 蛋白質群と呼ぶ)である。これまで、遺伝学的な解析はなされていたが、生化学的な解析は手つかずであった。Aub に対する抗体を作成し、卵巣、及び精巣より、Aub-small RNA 複合体を単離精製し、Aub に結合する small RNA を同定したところ、いろいろな種類の retrotransposon を由来とする RNA である事が判明した。Aub には、Slicer 活性がある事も本解析によって明らかとなった。Aub 欠損体においては、retrotransposon の発現が上昇することが知られており、これらを総合すると、Aub は、retrotransposon を由来とする small RNA との結合を介して、retrotransposon を RNAi 様の反応によって制御する因子である事が明らかになった。本研究に関する論文を、RNA に発表した。

PIWI 蛋白質群に含まれる3種の蛋白質はいずれも生殖細胞特異的に発現する。これまでの解

析を通して、我々はこれら 3 種ともが卵巣において rasiRNA (piRNA) と特異的に結合する事を明らかにした。また、この解析を通して「rasiRNA 生合成モデル」を提唱するまでに至った。しかし、rasiRNA 生合成に関しては、未だ不明な点が多く含まれる。生殖巣そのものを用いた生化学実験は、困難である。よって、まず簡易な assay 系を立ち上げる事が重要であると考え、それを試みたが、これまで成功に至っていない。最近、ある特徴を有した生殖細胞由来の cell line を入手するまでに至った。これをうまく利用すれば、rasiRNA 生合成に関する研究を進める事ができると期待する。

<ヒト Argonaute に関する研究>

これまで human Ago1 (hAgo1) から hAgo4 全てに対するモノクローナル抗体に成功した。これら抗体を用いて Jurkat 細胞の hAgo2 及び hAgo3 に結合する small RNA の同定を pyrosequencing 法によって行った。その結果、hAgo2 も hAgo3 も miRNA が大半を占める事が明らかになった。本解析を通して 5 種類の新規 miRNA が同定出来た。Jurkat 細胞より免疫沈降した hAgo2 と hAgo3 を用いて標的 RNA 切断反応を行ったところ、hAgo2 にはその活性があるものの、hAgo3 には標的を切断する能力がない事が示された。hAgo2、hAgo3 抗体を用いて HeLa 細胞の免疫染色を行ったところ、P-body (processing body) への両者の局在を観察することが出来た。興味深い事に、Jurkat 細胞で hAgo2、hAgo3 に結合する miRNA には、種々の variant がある事が判明した。つまり、現在登録されている miRNA に比べ、5' 末端において 1、2 塩基長いものや少ないものが発現している事が判明した。miRNA の 5' 末端側には、seed 配列と呼ばれる部分があり、この配列が、標的の recognition に重要な役割を担う事が判っている。5' 末端においてみられた 1、2 塩基の違いは、つまり、seed 配列をかえるものであり、1 種類の precursor から異なる seed 配列を持つ、異なる標的を認識する miRNA が複数生じている事を強く示唆する。本研究に関する論文は現在 in press である (PNAS) (1)。

3. 研究実施体制

(1) 「塩見」グループ

① 研究分担グループ長: 塩見 美喜子 (徳島大学、准教授)

② 研究項目

- AGO1 に関する研究
- AGO2 に関する研究
- PIWI 蛋白質群 (Piwi, Aub, AGO3) に関する研究
- ヒト Argonaute に関する研究

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1)A.M. Azuma, H. Oguri, T. Kin, Z.R. Qian, K. Asai, H. Siomi and M.C. Siomi. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. PNAS (in press)

2)Y. Kawamura, K. Saito, T. Kin, Y. Ono, K. Asai, T. Sunohara, T.N. Okada, M.C. Siomi and H. Siomi. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. Nature (in press)