

研究終了報告書

「大規模ゲノム改変を可能にする RNA サイレンシング回避技術の確立」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：岩川 弘宙

1. 研究のねらい

近年、従来型の化学工業生産プロセスでは合成が不可能であった物質を、生物を介して作り出すバイオ産業プロセスに移行する動きが世界的に広がっている。特に、植物は極めて多様な代謝系を保持しており、高機能性ポリマーなどの高機能品生産が高く期待されている。今後、さらに高機能な物質の創出、高効率の物質生産を可能にするために、ゲノムスケールでの遺伝子改変が将来的に必要となっていくことは明白である。しかし、たとえ長鎖 DNA 導入技術が開発されたとしても、植物内で外来 DNA が安定的に発現する確率は低いと考えられる。その理由は、植物の RNA サイレンシング機構が外部より導入された遺伝子の発現を抑制するためである。

RNA サイレンシングは、20塩基程度の小分子 RNA を介して相補性を持つ遺伝子の発現を抑制する遺伝子発現制御機構である。植物はこの機構を複雑に発達させており、内在の遺伝子の制御のみならず、ウイルスやトランスポゾンなど非自己・利己的核酸に対する防御機構としての役割も果たす。そして、この機構は人為的に導入した外来 DNA に対しても作用し、その発現を「転写・転写後段階」で抑制してしまう。RNA サイレンシングが内在の遺伝子発現制御機構や、ゲノム安定化に重要であることを鑑みると、むやみに RNA サイレンシング主要酵素の変異体を用いて育種を進める方策も採用できない。つまり、長鎖 DNA を用いたゲノムレベルの改変により、高度に機能がデザインされた次世代細胞「スマートセル」を創出するためには、RNA サイレンシングを徹底的に理解し、「回避」する技術を確立することが必要不可欠である。

本計画では、「小分子 RNA 増幅機構」と「核内サイレンシング機構」という、これまで作用機序が未解明であった植物 RNA サイレンシング機構を、新規試験管内系の開発を通して深く理解する。また、生化学と生命情報科学を組み合わせることにより、サイレンシングを引き起こす隠れたルールを発見する。これらを基盤として、RNA サイレンシングの影響を受けにくい DNA をデザインする基盤技術の開発を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究では、RNA サイレンシング回避技術の基盤構築につながる、いくつかの重要な発見を成し遂げた。

小分子 RNA 増幅機構を試験管内で再現する世界初の解析系の開発に成功し、開始機構の一端と、小分子 RNA 増幅を促進/阻害する配列・要因を明らかにした(PNAS 2021, 最終責任著者)。また、植物の小分子 RNA がリボソームの進行を阻害する機構を解明するとともに、リボソームの停滞が小分子 RNA 増幅を促進することを明らかにした(Cell Reports 2021, 筆頭著者・責任著者)。さらに、国際共同研究を介して、環境ストレスにより生み出される特殊な小分子 RNA が標的の翻訳を抑制し、小分子 RNA の増幅に関わることを明らかにした(Nature 2020)。上記3本の論文は小分子 RNA 増幅機構の理解を飛躍的に深めるものであ

り、RNA サイレンシング回避技術の基盤構築にも大きく貢献すると考えられる。

24 塩基の小分子 RNA が引き起こす核内サイレンシング機構に関しては、小分子 RNA の生合成機構 (Nucleic Acids Research, 2022, 最終責任著者)、24 塩基の小分子 RNA の機能複合体形成機構 (投稿準備中, 最終責任著者) の一端を解明した。さらに、DNA メチル化活性を保持した核抽出液を2種類の培養細胞より作成した。これらの核抽出液は今後、小分子 RNA 依存的 DNA メチル化を再現する試験管内系の作成基盤となる。また、生化学と生命情報科学を組み合わせることにより、核内 RNA サイレンシング機能複合体を形成しやすい小分子 RNA の特徴を解明する技術の開発にも成功した (投稿準備中, 最終責任著者)。

現在、複数の共同研究を行っており、本領域さきがけ3期の越阪部博士とは植物のエピゲノムに関する共同研究を展開している。さらに、動植物の RNA サイレンシング機構の最新の知見を総説としてまとめた (Molecular Cell, 2022, 筆頭責任著者)。以上が本さきがけの研究成果である。

(2) 詳細

研究テーマ A「小分子 RNA 増幅機構の試験管内再現」

小分子 RNA 増幅機構は、1. RISC による標的 RNA の切断、2. RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ6 (RDR6) による標的 RNA の二本鎖化、3. DCL による小分子 RNA の生産、4. 新たな機能複合体 (RISC) の形成という、4 つの反応が連続的に働くことにより RNA サイレンシングを増強する (図 1)。これまで遺伝学を中心にこの機構は調べられてきたが、1. どのように RDR6 が標的 RNA にリクルートされるのか、2. どのような配列や要因が小分子 RNA 増幅を促進するのかは明らかになっていなかった。そこで私は試験管内で小分子 RNA 増幅を再現

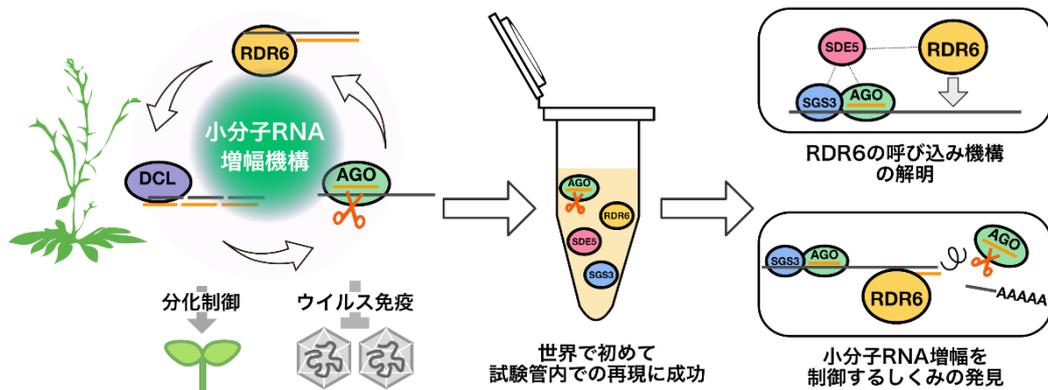


図 1. 小分子 RNA 増幅機構の試験管内再現

する新しい実験系を開発することにした。タバコ培養細胞から作成したセルフリー系で、小分子 RNA 増幅に関わることが遺伝学的に明らかになっている因子 (SDE5、SGS3、RDR6、AGO7/1) を発現し、標的 RNA に対応する小分子 RNA を加えたところ、二次的な小分子 RNA の生合成が観察された。その二次的小分子 RNA を次世代シーケンス解析したところ、生体内の生成パターンを模倣していた。すなわち、我々は世界で初めて小分子 RNA 増幅機構を試験管内で再現することに成功した (図 1) (PNAS 2021, 最終責任著者)。

研究テーマ B「小分子 RNA 増幅機構を制御する要因の解明」

開発した新しい試験管内系を用いることで、RDR6 は SGS3 と SDE5 の助けを借りて標的 mRNA にリクルートされることを明らかにした。また、RDR6 の相補鎖合成を真核 mRNA の 3' 末端に付加されるポリ A 配列が阻害すること、他の RISC が標的 mRNA の 3' 側を切断し、ポリ A 配列を除去することで相補鎖合成が促進することを見出した。さらに、3' 側の切断部位が小分子 RNA と強すぎる相互作用を持つ場合、逆に RDR6 の相補鎖合成を阻害することを解明した(図1)(PNAS 2021, 最終責任著者)。

小分子 RNA による翻訳抑制と小分子 RNA 増幅機構の関係を2つの独立した研究を介して明らかにした。1つ目の研究では、二本鎖 RNA 結合タンパク質である SGS3 が標的と結合している特殊な RISC(22-nt 小分子 RNA-AGO1-RISC、または miR390-AGO7-RISC)と直接相互作用することで強固な複合体を形成し、リボソームの進行を止めることを解明するとともに、リボソーム停滞が二次的な小分子 RNA の生合成を促進することを明らかにした(図2)(Cell Reports 2021, 筆頭著者・責任著者)。

2つ目は、南方科技大学の Hongwei Guo 博士の研究室と私の国際共同研究により遂行された研究である。植物は様々な長さの小分子 RNA を生み出すが 22 塩基の short interfering RNA (siRNA)の役割は不明な点が多かった。本研究では環境ストレスによって発現した 22 塩基の siRNA が翻訳レベルで標的の遺伝子発現を制御すること、そして二次的な小分子 RNA の生合成を引き起こすことを明らかにした。私は 22 塩基の小分子 RNA が 21 塩基の小分子 RNA に比べて翻訳抑制する能力が高いことを独自の試験管内系を用いて明らかにした(Nature, 2020)。

リボソーム停滞あり

リボソーム停滞なし

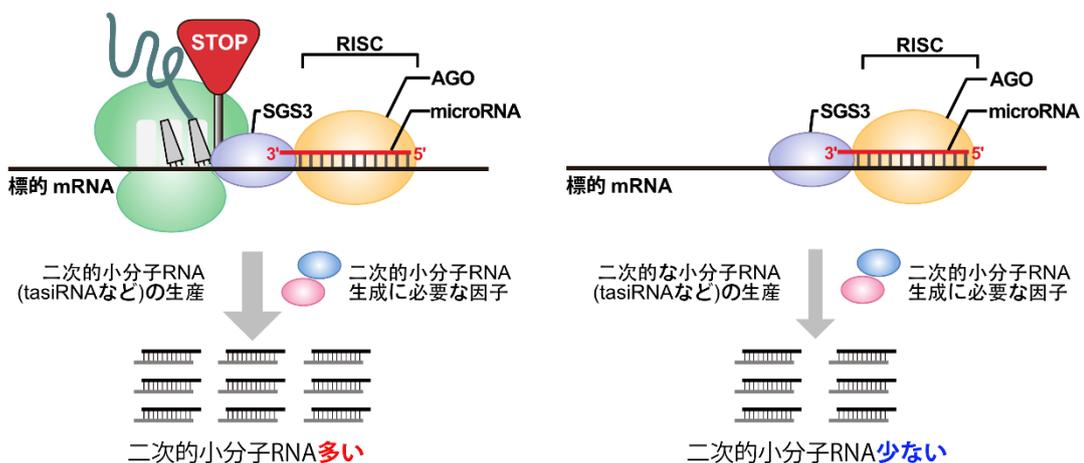


図2. 小分子RNAによるリボソーム停滞は、小分子RNA増幅を促進

上記3本の論文は小分子 RNA 増幅機構の理解を飛躍的に深めるものであり、RNA サイレンシング回避技術の基盤構築にも大きく貢献すると考えられる。

研究テーマ C「核内 RNA サイレncing機構を理解する試験管内系の開発」

植物は 24 塩基の siRNA を介して標的 DNA 配列のメチル化を行う。この機構は RNA-directed DNA methylation (RdDM)と呼ばれ、転写抑制を介したゲノムの安定化に寄与する。RdDM には多種類のタンパク質が関わり、おおよそ次のような機構であることがわかっている。1. 植物特異的 RNA ポリメラーゼである Pol IV が約 38 塩基の RNA を転写する。2. RDR2 がその RNA を二本鎖 RNA に変換する。3. DICER-LIKE3 (DCL3)がその前駆体 (P4R2 RNA) を 24 塩基の siRNA 二本鎖に切り出す。4. シャペロンの助けをうけ siRNA は AGO4/6 と RISC を形成する。5. AGO4/6-RISC は植物特異的 RNA ポリメラーゼである Pol V の転写産物と相互作用し、de novo DNA メチルトランスフェラーゼである DRM2 をリクルートすることで DNA メチル化を行う。しかしながら、生化学的アプローチが未発達であるため、DNA メチル化ステップの詳細は明らかになっていなかった。

そこで、生化学的アプローチが可能な核内 RNA サイレncingを再現する新規試験管内系の開発に取り組んだ。タバコ培養細胞、及びシロイヌナズナ培養細胞から液胞を密度勾配遠心法により取り除いた後、多段階の精製を行い、核抽出液を作成した。これらの抽出液の DNA メチル化活性を ^3H の取り込み実験により確認したところ高い DNA メチル化活性を保持していた。またこのセルフリー系は転写も可能であることを確認した。これらの核抽出液は今後、RdDM を再現する試験管内系の作成基盤となる。また、本研究によって作成したセルフリー系はさきがけ3期の越阪部博士のヒストン修飾研究にも用いられている。

研究テーマ D「RNA サイレncing主要酵素の基質特異性の解析」

生化学と生命情報科学を組み合わせることにより、RNA サイレncingの主要酵素の基質特異性を解明することを目的とした。本プロジェクトでは、核内 RNA サイレncingに関わる DCL3/5 および AGO4/6 の基質特異性を解明することに成功した。

単子葉類、および双子葉類の DCL3 と、単子葉類の DCL3 ホモログ DCL5 の基質特異性を調べることにより、それぞれの DCL が独自の基質特異性を持つこと、そしてそれらの違いが PAZ ドメインに蓄積した変異に起因することを明らかにした (Nucleic Acids Research, 2022, 最終責任著者)。

また、AGO4 と AGO6 がどのような配列的特徴を持つ 24 塩基の小分子 RNA と相互作用するのかを試験管内系を用いて調べた結果、どちらの AGO も 5' 末端がアデニンの小分子 RNA を選んで相互作用するが、選択メカニズムが異なることを見出した。AGO4 は弱い 5' A/G (プリン塩基) 選択性と、熱力学的に不安定な末端を好むことで 5' A を選択し、AGO6 は非常に強い 5' A 選択性を持っていた。また、AGO6 がもつ強い 5' A 選択には、これまで 5' 塩基の選択に必要であると信じられていた MID ドメインに存在するヌクレオチド選択性ループではなく、PIWI ドメインが重要な役割を果たすことがわかった (投稿準備中, 最終責任著者)。

その他、共同研究など

さきがけ期間中は、複数の共同研究を行っており、本領域のさきがけ3期の越阪部博士とは植物のエピゲノムに関する共同研究を展開している。さらに、動植物の RNA サイレンシング機構の最新の知見を総説としてまとめた(Molecular Cell, 2022, 筆頭責任著者)。

以上が本さきがけの研究成果の詳細である。

3. 今後の展開

RNA サイレンシングを回避する技術を完成させるためには、徹底的な RNA サイレンシングの基礎研究が必須となる。来年以降は、JST 創発的研究支援事業を通して、RNA サイレンシング増幅機構の解析、核内サイレンシング機構の解析、そしてサイレンシング主要酵素の基質特異性の解析をさらに進める予定である。特に DNA メチル化を促す核内サイレンシングは未解明な点が多く、今後も試験管内アッセイ系の開発などに力を入れていく。RNA サイレンシングを回避する技術の社会実装は、各主要酵素の基質特異性がさらに明らかとなり、サイレンシングを引き起こす要因が解明された時点で実現すると考えられる。期間としては 7 年以内を予想している(創発的研究の完了時)。一方で、現時点でも、本計画で明らかにしたいいくつかのルールを組み合わせることで RNA サイレンシングを低減することが可能であると思われる。例えば、導入遺伝子に長鎖のポリ A 配列を高効率で付けることができる高効率のターミネーター配列を採用することで二次的小分子 RNA の生成を抑制できる。また、導入遺伝子の塩基を GC リッチの配列に置き換えることで、その領域から作られる小分子 RNA を AGO が取り込みにくくなり、サイレンシングの大幅な低減が期待できる。今後さらにサイレンシングを引き起こしやすい、または引き起こしにくい配列・要因を明らかにすることで、より完成されたサイレンシング回避デザイン法を創出できると考えられる。

4. 自己評価

本さきがけ研究は、新規試験管内系の開発を通して植物 RNA サイレンシング機構を深く理解し、RNA サイレンシングを引き起こす要因や配列を見つけることで RNA サイレンシング回避技術の確立を目指すという課題である。この 3 年半で、小分子 RNA 増幅機構を再現する新規試験管内系を開発し、小分子 RNA 増幅機構の開始機構、促進機構、阻害機構を解明した(PNAS 2021, Cell Reports 2021, Nature 2020)。さらに核内 RNA サイレンシングを試験管内で再現する実験系の開発を進め、さきがけ 3 期の越阪部博士と植物のエピゲノムを試験管内で解明する領域内共同研究を進めることができた。また、RNA サイレンシング主要酵素である DCL と AGO の基質特異性を、生化学と生命情報科学を組み合わせるアプローチを通して解明することに成功した(DCL: Nucleic Acids Research, 2022, 最終責任著者, AGO: 投稿準備中, 最終責任著者)。

以上より、本さきがけ研究は、当初の計画を大きく上回る成果を上げることができたと評価する。研究実施体制も適切であり、研究費も毎年必要なものを購入し、適切に執行した。

本研究成果は RNA サイレンシング回避技術の創出の基盤になるだけでなく、植物 RNA サイレンシング研究分野に大きなインパクトを与えた。実際、小分子 RNA によるリボソーム停滞が小分子 RNA 増幅を促進するという論文(Cell Reports 2021)、そして小分子 RNA 増幅機構を試験管内再構成した論文(PNAS 2021)が公開された際は、海外のトップ研究室から複数の共同研究の申

込みがあった。このように、本さがけ研究により大きな飛躍ができた3年半であった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:4件

1. Yuriki Sakurai, Kyungmin Baeg, Andy Y.W. Lam, Keisuke Shoji, *Yukihide Tomari, ***Hiro-oki Iwakawa**. Cell-free reconstitution reveals the molecular mechanisms for the initiation of secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021 年, 118 巻, 31 号, e2102889118

小分子 RNA 増幅機構を試験管内で再現する実験系の開発に、世界で初めて成功した。この系を用いることで RDR6 が SDE5 や SGS3 と呼ばれる植物因子の助けを借りて標的 RNA 上に呼び込まれることを明らかにした。また、小分子 RNA 増幅を制御する配列やルールを発見した。本研究は、植物の分化やウイルス制御に必要な二次的小分子 RNA が生み出されるしくみを解明した大きな発見と言える。また、これらの知見は、将来有用な作物を創出する際の基盤となることが期待される。

2. ***Hiro-oki Iwakawa**, Andy Y.W. Lam, Akira Mine, Tomoya Fujita, Kaori Kiyokawa, Manabu Yoshikawa, Atsushi Takeda, Shintaro Iwasaki, Yukihide Tomari. Ribosome stalling caused by the Argonaute-microRNA-SGS3 complex regulates the production of secondary siRNAs in plants. *Cell Reports*, 2021 年, 35 巻, 13 号, 109300

これまでの研究で、植物の microRNA はリボソームの進行を止めることが示されていたが、microRNA を介したリボソーム停滞の「しくみ」や、タンパク質合成抑制以外の「役割」は不明であった。我々は SGS3 と呼ばれる二本鎖 RNA 結合タンパク質が microRNA に依存するリボソーム停滞の決定因子であることを見出した。さらに、リボソーム停滞が植物の発生やストレス応答に重要な二次的小分子 RNA の生成を促進することも明らかにした。本研究は、小分子 RNA を介した遺伝子発現制御機構に新しい知見をもたらすだけでなく、タンパク質合成を越えたリボソームの新機能を明らかにした大きな発見と言える。

3. Shirui Chen, Wei Liu, Masahiro Naganuma, *Yukihide Tomari, ***Hiro-oki Iwakawa**. Functional specialization of monocot DCL3 and DCL5 proteins through the evolution of the PAZ domain. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50 巻, 8 号, 4669-4684 頁

単子葉類、および双子葉類の DCL3 と、単子葉類の DCL3 ホモログ DCL5 の基質特異性を比較することにより、それぞれの DCL が独自の基質特異性を持つこと、そしてそれらの違いが PAZ ドメインに蓄積した変異に起因することを明らかにした。本研究は、なぜ DCL が固定された一方の端からのみ dsRNA を切断するのかを説明するだけでなく、植物が進化の過程でどのように RNA サイレncing 機構を多様化し、最適化したかに対して示唆を与える。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. プレスリリース. 小分子 RNA の増幅機構を試験管内で再現！

～植物の分化やウイルス制御に必要な小さな RNA を生み出すしくみを解明～

2. プレスリリース. 植物の小さな RNA が巨大なタンパク質合成装置の動きを止める

～そのしくみと意外な役割を解明～

3. 総説: 自然免疫における環状 RNA の役割.

実験医学, , 2020 年, 38 巻 3 号, 436-437 頁

4. 総説: *Hiro-oki Iwakawa and *Yukihide Tomari, Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex, DOI: 10.1016/j.molcel.2021.11.026, *Molecular Cell* 82(1) 30-43 2022 年 1 月