

研究課題別評価書

1. 研究課題名

線虫を用いた RNAi 反応機構の遺伝生化学的解析

2. 氏名

田原 浩昭

3. 研究のねらい

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る。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。又、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分かってきている。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。

本研究では、線虫 *C. elegans* をモデル生物として生化学と遺伝学を組み合わせた複合的な解析を行うことによって、RNAi のサイレンシング効率に密接に関連する反応について新たな理解を得ることを目指した。特に、以下の課題に重点を置いて研究を進めることにした。① 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と考えられる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) の生化学的性質を解明する。② 一般的な RNAi においては配列特異的な mRNA 切断活性が誘導されると考えられており、RdRP を持たない生物ではサイレンシング効率の鍵を担う中心的反応として研究がなされている。RdRP を持つ線虫においても mRNA 切断活性の性質を明らかにし、その活性を担う因子を同定する。

4. 研究成果

(1) 背景

RNAi および類似現象においては、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ことが知られている。

線虫や植物そして菌類における遺伝学的な研究は、RNAi および類似現象の機構に Argonaute 蛋白や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) 等が関与していることを明らかとしてきた。又、ショウジョウバエや哺乳類細胞における研究では、試験管内で RNAi を再現する無細胞反応系が構築されて活用され、以下の 2 つの活性が明らかとなっている。導入された dsRNA は、Dicer の RNase III 活性によって 5' 末端にモノリン酸を持ち 3' 末端が突出している 2 本鎖 siRNA (初期型) へと断片化される。siRNA はエンドヌクレアーゼ活性を持つ Argonaute 蛋白と一緒に 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)。

現在、標的遺伝子と相同な小分子 RNA が関与する多様な遺伝子発現抑制現象も、RNAi と広義に呼ばれるようになってきている。又、典型的な RNAi の経路は標的 mRNA の不安定化を生じるが、内在性の RNAi 反応の一種として染色体の標的領域のヘテロクロマチン化を誘導する経路も存在することが分裂酵母等の研究で分かっている。

(2) 線虫の RNAi 反応機構を解析するための無細胞反応系の開発

これまでに本研究者は線虫 *C. elegans* をモデル生物として用いて RNAi について遺伝学的な解析を行い、RNAi に必要な因子を複数同定してきた。研究の次の段階として、RNAi 反応機構における左記の RNAi 必要因子の上下関係および RNA の流れを明らかにしたいと考えた。そこで、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、これまで単離されてきた RNAi 欠損変異体と組み合わせた解析を行うことによって、RNAi 反応機構の概略を遺伝生化学的に記述することにした。

開発した無細胞反応系が適切に機能することを確認するために、まず RNAi 反応の初期に働く Dicer の活性を調べたところ、長い dsRNA を 23-24 nt の 2 本鎖 siRNA へ断片化する活性を確認できた。ちなみに線虫に一つだけ存在する Dicer 蛋白は DCR-1 と呼ばれ、DCR-1 と dsRNA 結合蛋白である RDE-4 の複合体が初期型 siRNA の産生を担っていることが知られている。

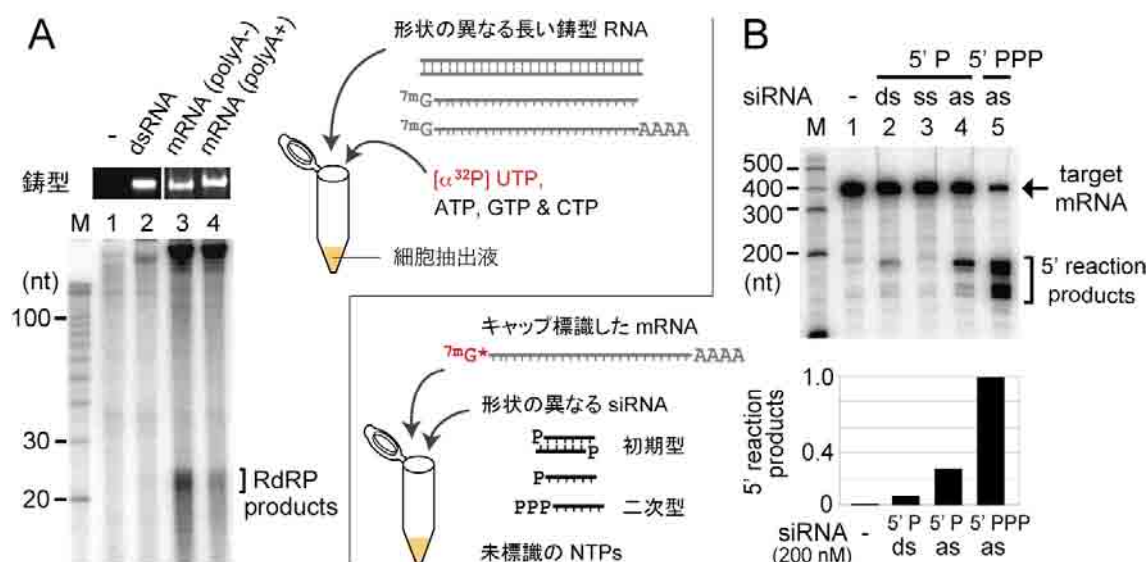


図 1 線虫の細胞抽出液を用いた無細胞系で検出した RdRP 活性および Slicer 活性

A) 長い 1 本鎖 RNA を鋳型として小分子 RNA を合成する RdRP 活性を検出した。細胞質の高分子量画分に対して内在性核酸を除去する処理を行い、その後各種の鋳型 RNA (dsRNA、正常な mRNA、poly-A を欠いた mRNA) を導入して RI 標識したヌクレオチド存在下で反応させた。B) 形状の異なる siRNA は mRNA を配列特異的に切断する Slicer 活性を異なる強度で誘導した。モノリン酸化された 2 本鎖 siRNA、モノリン酸化された 1 本鎖 siRNA、トリリン酸化された 1 本鎖 siRNA を細胞質画分へ導入して、標識した mRNA に対して反応させた。レーン 5 の 5' 反応産物が複数のバンドとなっているのは、mRNA が Slicer 活性で切断を受けた後にエキソヌクレアーゼ様活性の攻撃を受けていることを示唆している。ds (2 本鎖)、ss (センス 1 本鎖)、as (アンチセンス 1 本鎖)。

(3) 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 ポリメラーゼの生化学的性質の解明

植物や菌類等では、double-psi π -barrel (DPBB) 構造の活性ドメインを持つ RdRP が RNAi および類似現象におけるサイレンシングシグナルの増幅に関与している。DPBB 構造を持つ RdRP は線虫やナメクジウオにおいても存在しているが、脊椎動物や昆虫では見つかっていない。

線虫が持つ RdRP 活性の生化学的性質を明らかにすることを目的として細胞抽出液へ鋳型 RNA を導入する実験を行い、RdRP 活性を反映すると考えられる 21-23 nt の小分子 RNA の産生を検出した(図 1A)。その RdRP 活性の鋳型としては、dsRNA よりむしろ mRNA のような長い 1 本鎖 RNA が適しているという結果を得た。線虫においては、RdRP のコア蛋白をコードする遺伝子が 4 つ存在している。無細胞反応系を用いた解析によって、RdRP の変異体の一つであり RNAi に異常を示す *rif-1* では小分子 RNA を合成する RdRP 活性が 10% もしくはそれ以下に減少していることが分かった。幾つかの他グループの最近の研究は、線虫において *in vivo* で RNAi が生じる際に蓄積する siRNA の多くが 5' 末端にトリリン酸を持つことを明らかにしており、その知見は蓄積する siRNA の多くは mRNA を鋳型として RdRP 活性によってプライマー非依存的に合成された二次型 siRNA であることを意味している。つまり、二次型 siRNA の 5' 末端形成はモノリン酸化末端を持つ切断産物を生じる Dicer には依存していない。生じてくる新たな疑問は、二次型 siRNA の 3' 末端形成も Dicer (DCR-1) 非依存的な反応であるのかという問題である。本研究では、小分子 RNA を産生する RdRP 活性は *dcr-1* 変異体由来の抽出液においても存在するという実験結果を得た。

次に、RRF-1 の蛋白複合体について解析を行った。RRF-1 複合体中にヘリカーゼの一つで

ある DRH-3 が存在することを見つけたが、DCR-1 の存在は検出できなかった。ちなみに DRH-3 は DExH 型ヘリカーゼであり、その構造は Dicer のヘリカーゼ領域や哺乳類においてウイルスセンサーとして働く RIG-I と類似している(図 2A)。又、免疫沈降した RRF-1 複合体は、鋳型 mRNA に対して相補的なトリリン酸化 siRNA をプライマー非依存的に合成する RdRP 活性を実際に示すことを確認した(プライマー伸長活性は検出できなかった)。RRF-1 複合体が合成した小分子 RdRP 産物をクローニング解析したところ、93% の RdRP 産物の 5' 末端が G でスタートしており、96% の RdRP 産物は鋳型 RNA の末端ではなく内部配列に合致していた。以上の解析結果は、Dicer 活性とは独立した様式で、RRF-1 が DRH-3 の協力を得て mRNA 派生物を鋳型として二次型 siRNA を合成することを意味している。

(4) 線虫の RNAi において配列特異的な mRNA 切断活性を担う主要因子の同定

ハエや哺乳類では、Dicer 産物であるモノリン酸化 siRNA によって標的 mRNA を切断する Slicer 活性が誘導されることが示されている。線虫をモデル生物とした遺伝学的な研究は RNAi 関連因子を他生物にさががけて数多く同定してきたが、Slicer 活性についての生化学的な情報は全く存在しない状況であった。

本研究者は、数種類の異なる形状の合成 siRNA を細胞抽出液へ導入して、標的 mRNA を配列特異的に切断する Slicer 活性を誘導することを試みた。Slicer 活性はモノリン酸化された 2 本鎖 siRNA (初期型) によって弱く、モノリン酸化された 1 本鎖 siRNA によって中程度に誘導された。興味深いことに、RdRP 産物を模したトリリン酸化された 1 本鎖 siRNA (二次型) が最も強力に Slicer 活性を誘導することが判明した(図 1B)。又、モノそしてトリリン酸化 siRNA によって誘導される Slicer 活性はそれぞれ異なる蛋白に対応していることが、ゲル濾過解析によって示唆された。

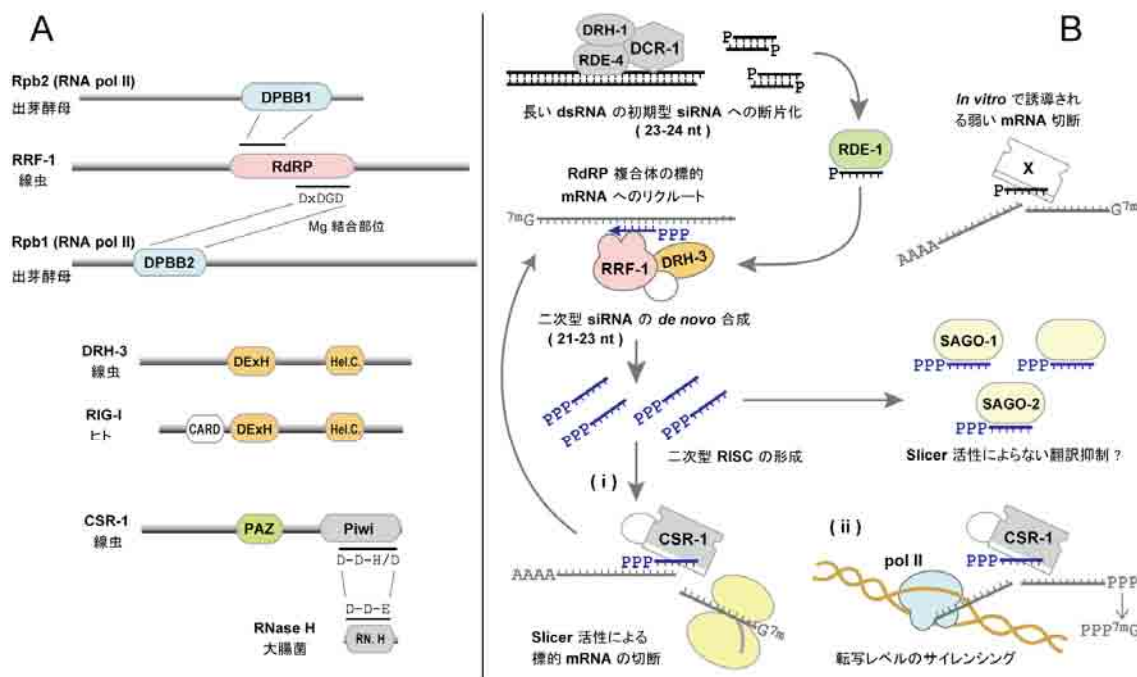


図 2 線虫における二次型 siRNA の産生と活性に関連する因子、そして RNAi 機構のモデル

A) RRF-1、DRH-3、CSR-1 のドメイン構造。RRF-1 は細胞型 RdRP ドメインを持つ。アカバシカバの細胞型 RdRP である QDE-1 の立体構造が解明されており、その活性ドメインの構造は転写を担う DNA 依存性 RNA ホリメラーゼのコア酵素が持つ DPBB 構造と類似性を示す。DRH-3 は DExH 型ヘリカーゼのドメインを持つ。CSR-1 は、PAZ そして Piwi ドメインを持つ Argonaute 蛋白の一つである。Piwi ドメインの構造は RNase H 等と類似していることが知られている。B) 線虫の RNAi 反応機構のモデル。モノリン酸化 siRNA は *in vitro* において Slicer 活性を弱く誘導するが、その活性は初期型 siRNA と相互作用することが知られている Argonaute である RDE-1 とは対応しない。我々の *in vitro* 実験は、CSR-1 が二次型 siRNA と一緒に標的 mRNA の切断に働くことを示唆する (i)。csr-1 変異体は RNAi のみならず染色体の分配にも異常を示すことから、CSR-1 が内因性小分子 RNA と一緒に転写レベルのサイレンシングにも関与している可能性も考えられる (ii)。二次型 siRNA の一部は、Slicer 活性に必要な D-D-H/D モチーフを持たない Argonaute (SAGO) と相互作用していることも知られている。

次に、様々な RNAi 欠損変異体から細胞抽出液を調製して Slicer 活性を調べる実験を行った。

その結果、本研究者らが作製した Argonaute 変異体の一つである *csr-1(f54)* においては二次型 siRNA による Slicer 活性がひどく損なわれていることが分かった。大腸菌で作製した CSR-1 リコンビナント蛋白はモノリン酸化された 1 本鎖 siRNA と一緒に弱く、そして二次型に相当するトリリン酸化された 1 本鎖 siRNA と一緒に強く Slicer 活性を示した。つまり、CSR-1 が二次型 siRNA によって誘導される Slicer 活性を担っていると考えられる。

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 RdRP 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(図 2B)”。

5. 自己評価

遺伝学と生化学を組み合わせた複合的な解析によって、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研究ができたと考えている。しかしながら、初期型の siRNA が RdRP を標的 mRNA へ選択的にリクルートする仕組みが未だ不明である等、未解明の問題も存在している。又、線虫と他生物における RNAi 反応機構は類似した蛋白因子を用いているが、RNA の流れについてはかなりの違いが見受けられることも、本研究および関連する他グループの研究によって分かってきた。他生物と保存性の非常に高い機構が浮かび上がってくることを期待していたことから、少し残念に思っている。

今後は、生化学的な研究から生理学的な研究へ立ち戻って、広い意味で RNA が関与する他生物でも共通性の高い生命現象の解明に再び挑戦したいと考えている。

6. 研究総括の見解

線虫を研究材料とし、生化学的および遺伝学的手法を組み合わせた解析により RNAi のサイレンシング効率に関連する反応についての理解を深めることを目標とした。そのために、サイレンシングシグナルの増幅に重要な役割を果たす RNA 依存 RNA ポリメラーゼの生化学的性質を解明すること、および配列特異的 mRNA 切断活性の性質を明らかにし、その活性を担う因子を同定することを目指した。その結果、RNAi の機能発現機構について、外来の RNA によって誘導される反応機構のモデルの提唱に至った。RNAi に関連する酵素活性を見るための無細胞反応系の開発などを含む優れた技術により、当初の目的をほぼ達成したことは、大変立派である。さらに、内因性の反応についての興味ある研究を展開中であり、今後も大変楽しみである。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., & **Tabara, H.*** *In vitro* analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J.* 26, 5007–5019 (2007).