

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

RNAi 複合体形成の生化学的解析

### 2. 氏名

泊 幸秀

### 3. 研究のねらい

タンパク質の鋳型としては使われることのない、小さな RNA (small RNA) が、遺伝子発現の制御に大きな役割を演じており、生物の発生や形態形成、癌化など重要な生物学的機能を緻密にコントロールしていることが明らかになってきました。小さな RNA の中でも特に、small interfering RNA と micro RNA は、共に特異的なターゲット遺伝子の発現を抑制することで細胞機能の制御を行います。これらの小さな RNA は、単独で働くのではなく、複数のタンパク質と複合体を作って、初めてその機能を発揮できます。本研究は、このような複合体がどのようにして作られるのかに着目し、小さな RNA の働く仕組みを明らかにすることを目指します。

### 4. 研究成果

#### small RNAの振り分け機構

siRNA と miRNA は、その由来こそ違いますが、共に RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる、複数のタンパク質と一本鎖の small RNA から成るエフェクター複合体を通して、特異的な標的遺伝子の発現抑制を行います。RISC を通して、miRNA は通常不完全に相補的な結合部位を複数個持つターゲット mRNA の翻訳抑制を引き起こすのに対し、siRNA は相補性の高い結合部位を一つでも持つターゲット mRNA の切断・分解を引き起こします。RISC の中で中心的役割を果たすのは、Argonaute と呼ばれるタンパク質です。私たちが主な実験材料として用いているショウジョウバエには、Argonaute1 (Ago1)、Argonaute2 (Ago2) という二種類の Argonaute が存在しますが、一般に miRNA は Ago1 を含む RISC に、siRNA は Ago2 を含む RISC に取り込まれます。

ショウジョウバエでは、miRNA と siRNA は、それぞれ Dicer-1、Dicer-2 という別々の酵素によって生成されるため、それぞれの生合成経路と Argonaute へ取り込まれる経路は連動していると、もともと考えられてきました。しかし、私たちは、マサチューセッツ州立大学 Phillip Zamore 研究室との共同研究により、miRNA と siRNA は、それらの生合成経路とは独立して、能動的にそれぞれの Argonaute に振り分けられているということを明らかにしました。この時重要になるのが、miRNA と siRNA の生合成過程における small RNA 二本鎖中間体、すなわち Dicer による切断を受けた直後の miRNA/miRNA\*二本鎖と siRNA 二本鎖という中間体の構造です。私たちは、様々な生化学的実験を通して、small RNA 二本鎖の中心付近にミスマッチが存在する場合は Ago1 に、そうでない場合は Ago2 に振り分けられているということを見いだしました。この際、私たちが以前定義した RISC-loading complex (RLC, Ago2 を含む RISC に small RNA を「積み込む」働きをしている複合体で、RISC 形成の上流に位置する)が、結合強度の差を利用して、ミスマッチの位置を見分ける役割を果たします。統計的に見ると、天然に存在する miRNA/miRNA\*二本鎖には、中心部分にミスマッチが存在することが多く、RLC は siRNA 様のものを積極的に Ago2 に送り込み、miRNA 様のものを排除する「門番」の役割を果たしていると言えます。同時に、天然に存在する miRNA の中には、Ago1 だけでなく Ago2 にも取り込まれるものが存在するという予測が立てられましたが、実際、そのようなものが数多く報告されています。この研究成果は 2007 年 Cell 誌に 2 つの連報論文として発表しました。

## miRNAはどのようにしてエフェクター複合体を形成するのか?

miRNA は、ゲノムから長い前駆体として転写(DNA から RNA が作られること)されたあと、2 段階の切断を受け、最終的に 22 塩基程度の長さの成熟体 miRNA が作り出されます。この途中で miRNA/miRNA \* (スター)二本鎖と呼ばれる 22 塩基程度の長さの RNA がペアに成ったような中間体が作られます。miRNA/miRNA \* 二本鎖のうち、一方の鎖のみが選択的に RISC に取り込まれ(この鎖が成熟体 miRNA に相当します)、もう一方の鎖は RISC には取り込まれずに分解されてしまいます(この鎖が miRNA \* 鎖に相当します)。

私たちは miRNA 経路のモデルと位置づけられるショウジョウバエの Ago1 というタンパク質に着目し、RISC の形成過程を、アガロースネイティブゲルと呼ばれる生化学的な手法によって直接検出できるシステムを初めて確立しました。そして、miRNA が Ago1 に取り込まれ RISC が作られるまでの道筋を詳しく調べました。その結果、miRNA/miRNA \* は、まず二本鎖のままの状態 Ago1 へと取り込まれることが分かりました。その際、エネルギーである ATP が必要であること、また、miRNA/miRNA \* 鎖のミスマッチ(塩基対が形成されないこと)が中心部分(9-11 番目)に存在すると、Ago1 により効率よく取り込まれることが明らかとなりました。私たちは以前、RNA 干渉を引き起こす small interfering RNA (siRNA)が Ago2 を核とする RISC に取り込まれる際には、中心部分のミスマッチが嫌われるということを見いだしていましたが、Ago1 と Ago2 は全く逆の(相補する)「好み」を持っているということになります。

次に、miRNA/miRNA \* 鎖から miRNA 鎖のみが選択され miRNA \* 鎖が分解される過程(この過程のことを unwinding [巻き戻し]と呼びます)を調べました。これまで、unwinding には ATP を利用して、二本鎖 RNA をほどこ様な巻き戻し酵素(helicase)が関わっていると考えられてきましたが、驚くべきことに、実際には ATP は全く必要なく、miRNA/miRNA \* 二本鎖の 2-8 番目(seed 領域)あるいは 12-15 番目(3'-mid 領域)の塩基にミスマッチが存在すること、成熟型 Ago1-RISC の形成に必要であることが分かりました。興味深いことに、unwinding の際に「ミスマッチが必要」な領域は、miRNA が標的 mRNA を認識する際に「塩基対形成が必要」な領域と、全く同じものでした。これは、miRNA/miRNA \* から miRNA が選択される過程と、miRNA が標的 mRNA を認識する過程が、鏡写しの関係にあることを表しています。つまり、これは、これまでは全く別物であると考えられてきた 2 つの過程が、共に Argonaute というタンパク質の中で RNA が取り得る特殊な構造により説明できるということであり、従来の考え方を大きく変えることになります。

さらに私たちは、ショウジョウバエ Ago1 についての知見をもとに、ヒトに 4 種類存在する Argonaute についても、二本鎖の取り込みと巻き戻しという 2 つのステップに着目し、解析を行いました。その結果、ショウジョウバエ Ago1 と同様、miRNA が複合体を形成するためには、特定の領域(seed 領域および 3'-mid 領域)にミスマッチが必要であることが分かりました。この性質はヒト Argonaute の 4 種類すべてに共通のものでした。また、ミスマッチを持たない siRNA の場合には、ヒトの 4 種類の Argonaute のうち RNA を切断する活性をもつもの(Argonaute2)のみでしか効率よく複合体が形成されないことが明らかになりました。

今回の発見により、miRNA が RISC を形成する複雑な過程が初めて明らかになったと同時に、miRNA 遺伝子が特定の領域に持つミスマッチが重要な役割を果たしていることを見いだしました。実際、天然に存在する miRNA 遺伝子の構造を調べたところ、ほとんどのものが、今回我々が見いだした RISC 形成に必要な要件(特定の領域にミスマッチが存在すること)を満たしており、それは様々な生物種で保存されていることが分かりました。すなわち、なぜ miRNA 遺伝子が進化の過程において特定の領域に多くのミスマッチを維持しているのかということ、生化学的に説明することが可能になったわけです。さらに、これを応用することで人工的

な miRNA 遺伝子を設計することも可能になると考えられます。これらの研究成果は、2009 年と 2010 年、Nature Structural and Molecular Biology 誌に 2 報の論文として発表しました。

#### miRNAによる翻訳抑制のしくみ

miRNA が標的 mRNA の翻訳を抑制するしくみに関しては、数多くの報告がなされてきましたが、1. cap 構造認識段階での阻害 2. cap 構造認識後の後期翻訳開始段階での阻害 3. 翻訳伸長段階での阻害 4. poly(A)の短縮と mRNA の不安定化 5. P-body (mRNA の分解と貯蔵を司る細胞質顆粒)への移行 等、様々な仮説が提唱されており、混乱を極めています。前述の通り、ショウジョウバエでは、miRNA はその中間体の構造に従って、Ago1 と Ago2 の間に分配されます。私たちは、miRNA が取り込まれる Argonaute の種類によって、その翻訳抑制作用が異なるのではないかと、という仮説を立てました。ショウジョウバエの「small RNA 振り分け機構」を利用すれば、その生合成を考慮しなくとも、ミスマッチの位置をデザインすることで、Ago1-RISC と Ago2-RISC を、ほぼ排他的に形成させることが可能となります。私たちは、独自に開発した in vitro 系を使うことで、Ago1 と Ago2 による作用を個別に評価し、それらの翻訳抑制の様式を丹念に調べました。その結果、1. Ago1 は標的 mRNA の poly(A)を分解するが、Ago2 はしない 2. Ago1 は(poly(A)分解と独立して)cap 認識後の段階を阻害するが、Ago2 は cap を認識する eIF4E と eIF4G との相互作用を特異的に阻害する 3. Ago1 の働きには P-body 構成要素である GW182 が必要であるが、Ago2 には必要ではない という様に、Ago1 と Ago2 の働きには大きな違いがあるということが明らかになりました。よって、これまでの矛盾した結果の少なくとも一部は、別々の Argonaute の活性を混同して評価していたためであると考えられます。この研究成果は 2009 年 Molecular Cell 誌に発表しました。

#### 5. 自己評価

小さな RNA がエフェクター複合体を形成する過程に着目し、小さな RNA が働く仕組みを解明するという当初の目的に対しては、この 4 年間でかなりの進展を達成できたと考えています。ただし、これですべてが明らかになったわけでは決して無く、例えば「二本鎖 RNA として生まれた小さな RNA が、どのようにして複合体の中核である Argonaute タンパク質に取り込まれるのか」という根本的疑問に対する答えはまだ得られていません。よって、今後もこの経路に注目しながら、小さな RNA が働く仕組みの全体像に迫って行きたいと考えています。

#### 6. 研究総括の見解

重要な生物の機能の多くが、small RNA (siRNA や miRNA)によって制御を受けていることが明らかとなっている。このような制御は RNA 単独ではなく、複数のタンパク質と複合体を作って行われる。本研究では、このような複合体がどのようにしてつくられるかを主にショウジョウバエの系を使用して、明らかにすることを目的とした。その結果、二本鎖 RNA にミスマッチが存在するか否かで取り込むタンパク質が異なることを明らかにした。この取り込みの機構は完全には明らかとなっていませんが、取り込みに ATP が必要であること、二本鎖が一本鎖になるとき(unwinding)には ATP は必要ないことなどを明らかにし、人工的な miRNA 遺伝子を設計することも可能にした。さらに、混乱を極めていた miRNA による翻訳抑制の仕組みを見事に整理し、Ago1 と Ago2 の働きに大きな違いが存在することを解明した。本研究は、世界的にとくに競争の激しい当該分野において、世界をリードする日本発の研究成果として、特に高い評価を与えたい。

#### 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.Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, \*Tomari Y.  
ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol*. 2010

Jan;17(1):17-23.

2.Kawamata T, Seitz H, \*Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Sep;16(9):953-60.

3.Iwasaki S, Kawamata T, \*Tomari Y. *Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell.* 2009 Apr 10;34(1):58-67.

4.\*Tomari Y, Du T, \*Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNA. *Cell.* 2007 Jul 27;130(2):299-308.

②特許

研究期間累積件数:1 件

発 明 者:川俣朋子、依田真由子、泊幸秀

発明の名称:small RNA 二本鎖およびヘアピン型 RNA の設計方法

出 願 人:東京大学

出 願 日:2009 年 6 月 29 日

出願番号: 特願 2009-146466

③受賞

1. 国際ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム キャリアディベロップメントアワード (H20.6)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

Forstemann K, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct Argonaute protein complexes after their production by Dicer-1. *Cell.* 2007 Jul 27;130(2):287-297.