

研 究 報 告 書(公開)

「植物における RNA サイレンシング経路への導入機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：吉川 学

1. 研究のねらい

植物は、ウイルスなどの外来因子やトランスポゾン、高発現している遺伝子などの RNA を“異常”と認識し、それらの発現を抑制するための機構として、RNA サイレンシングを持つ。この機構によって抑制される RNA は mRNA と同様に、CAP 構造やポリ A 鎖を持つものや両方を持たないものに加え、それぞれの塩基配列も様々である。すなわち植物は、mRNA などの生命活動に必要な RNA と、RNA サイレンシングによって排除すべき“異常”RNA を区別していると考えられる。本研究では、植物の転写後調節に機能する RNA サイレンシング及び転写調節に機能する RNA サイレンシングそれぞれの small interfering RNA (siRNA) 生成過程を解析することによって異常な RNA の認識機構を解明し、人為的な遺伝子発現制御や弱毒ウイルスのデザインに向けての基盤の構築を目指す。

2. 研究成果

転写後調節に関わる siRNA の生成

trans-acting siRNA (tasiRNA) の生成に関わる Arogonaute1 (AGO1) や Suppressor of gene silencing3 (SGS3)、RNA-dependent RNA polymerase6 (RDR6)、Dicer-like4 (DCL4) などが RNA サイレンシングを介した転写後調節や植物ウイルスの抵抗性に非常に重要であることが示されている。このことから、tasiRNA の生成機構の解明は、本研究の目的とする植物の異常な RNA の認識機構の解明につながると考え研究を進めた。さきがけ研究以前に得た研究結果から、tasiRNA は、タンパク質をコードしない CAP 構造と polyA 鎖を持つ前駆体 RNA (TAS) が、miR173 など特定の miRNA によって切断されることが引き金となって生じることがわかっている。特に、 *rdr6* 変異体では、miR173 によって切断された TAS RNA の 5'側断片と 3'側断片が蓄積していることから、この状態を CAP 構造と polyA 鎖を持つ mRNA と同様の RNA が、miR173 によって切断され、異常な RNA になったため、RNA サイレンシング経路に導入されると考えた。さらにこの蓄積状態が、 *sgs3* 、 *rdr6* 二重変異体では見られず、 *sgs3* 変異体と同様のパターンを示すことから、SGS3 が異常 RNA の安定化に機能し、RNA サイレンシング経路へ引き込むという仮説を立て、研究を行った。

まず、TAS RNA の 5'側断片と 3'側断片の状態を解析するために、tasiRNA 生成に働く遺伝子の変異体から細胞粗抽出液を調製し、密度勾配超遠心を行い、分画した画分から RNA を抽出し、TAS RNA に対するノーザン解析を行った。その結果、TAS 及び 5'断片、3'断片が、高分子量のリボヌクレオ複合体(RNP)を形成し、この複合体が tasiRNA 生成中間体をヌクレアーゼによる分解を受けにくい状態に保っていることがわかった。次に、 *rdr6* で安定化されている TAS RNA の安定化に SGS3 が関わっているという仮説をたて、SGS3 に FLAG タグを付加した形質転換体を作製、植物粗抽出液を調製し、密度勾配超遠心した後分画したサンプルを用いて SGS3 のアフィニティー精製を行い、共精製される RNA の解析を行った。その結果、SGS3 に TAS RNA が結合していることが明らかになった。

DNA メチル化を誘導する RNA サイレンシング経路に関する解析

RDR6 が転写後調節に働くのに対して、RDR2 は植物特異的な RNA ポリメラーゼである PolIV などと共にトランスポゾンや繰り返し配列などから 24 塩基長の siRNA 生成し、ゲノムの該当領域にメチル化を誘導する機能を持つ。そこで DNA メチル化と RDR2 による RNA サイレンシング経路の共通性を調べるマーカー遺伝子を見つけるために、この経路に関わる変異体を使った他の研究グループによって行われたアレイ解析を参考にして、それらの変異体につ

いて、いくつかのトランスポゾンの発現解析を行った。その結果、シロイヌナズナのデータベース上でDNA型トランスポゾンとアノテーションされたゲノム領域がいずれの変異体でも上昇していることが、わかった。

3. 今後の展開

これまでの植物に関するRNA研究は、遺伝学的アプローチまたは、精製した組換えタンパク質を使った *in vitro* の生化学解析が主流で、植物以外では広く行われている細胞粗抽出液を使った解析はあまり行われていない。これは、植物細胞中のヌクレアーゼやプロテアーゼを含む液胞により、細胞粗抽出液の利用が困難であることが主な理由である。そのため、遺伝学的にRNAプロセシング変異体が単離されてもそれらの利用があまり進んでいない。しかし、本研究で密度勾配超遠心によるRNP解析方法を確立できたので、今後は、RNAサイレンシング以外のRNAプロセシング変異体解析にも利用して、多様な機能を持つ植物RNAの研究に広がっていきたい。

4. 自己評価

本研究においても、研究開始当初は、解析対象とするタンパク質やRNAの扱いが難しく、研究の進捗状況は良くなかった。しかし、領域会議などで有用な多くのアドバイスを得たこともあって進展し、ここまで研究を発展させることができたものと思う。さきがけ申請時に目標としていた植物の異常RNAの認識機構の解明まで至らなかったのは残念であるが、本研究で解析対象を絞り込むことができたので、今後さらに解析を進め、植物の異常RNA認識機構の解明につなげたいと思う。

一方、研究範囲を広げるためにDNAメチル化に機能するRNAサイレンシング経路に関する研究を計画したが、さきがけ研究に採択されて以降、海外のグループによって、その研究領域が大幅に進められてしまい、ほとんど手をつけることができなかった。しかし、本研究で見出したDNA型トランスポゾンのマーカー遺伝子は、非常に興味深いパターンを示すことから、今後も解析を進めていきたい。

5. 研究総括の見解

植物の、転写後調節に機能するRNAサイレンシング及び転写調節に機能するRNAサイレンシングそれぞれの経路のsiRNA生成過程を解析することによって、異常なRNAの認識機構を解明することを目指した研究である。異常なRNAの認識機構解明には至らなかったが、異常なRNAの蓄積・安定化に働くと考えられる分子を絞り込むことができた。これは、植物以外では広く行われている細胞粗抽出液を使った解析に取り組んだ成果であり、今後の研究進展の基盤を築いた成果である。DNAメチル化に機能するRNAサイレンシング経路に関する研究も今後の進展に期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.	Numa H, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Mochizuki Y, Kimura H, Shinozaki K, Toyoda T, Seki M, <u>Yoshikawa M</u> , Habu Y Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in <i>Arabidopsis thaliana</i> . EMBO J 29:352-62 (2010)
2.	Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhashi I, Meshi T, Ishikawa M <i>In Vitro</i> Assembly of Plant RNA-induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. Molecular Cell 39:282-91 (2010)

(2)特許出願
なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

① 国内招待講演

1.吉川学

trans-acting siRNA 前駆体 TAS のプロセッシング

日本植物学会第 74 回大会(2010.9.10、名古屋)

② 学会発表

1.井木太一郎, 吉川学, 石川雅之

植物 RISC 形成における HSP90 の役割

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010.2、神戸)

2.Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Mitsuhara I, Meshi T, Ishikawa M

In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complex

EMBO Workshop 2010: Genomic approaches to interactions between plant viruses, their hosts and their vectors

3.井木太一郎,吉川学,ジャウダル モーレン,横山英子,錦織雅樹,光原一朗,飯哲夫,石川雅之

植物における RNA-induced silencing complex の無細胞形成系の確立

第 51 回日本植物生理学会年会(2010.3.19、熊本)

4.土生芳樹, 沼寿隆, 金鍾明, 栗原志夫, 松井章裕, 篠崎一雄, 関原明, 吉川学

シロイヌナズナのサイレンシング因子 Morpheus'Molecule 1(MOM1)による内在性領域不活性化機構の解析

日本遺伝学会第 81 回大会(2009.9.16、松本)