

## 論文の内容の要旨

### RNA 干渉を司る RISC 構成タンパク質 Dicer の生化学的解析

藏田 真也

#### 緒言

miRNA は、転写後の遺伝子発現調節を担う~21 塩基の 1 本鎖 RNA である。ヒトには 1000 種類程度の miRNA が存在することが知られ、ヒト遺伝子の 3 分の 1 以上が miRNA のターゲットであるとの見積もりが出されている。これは、miRNA による遺伝子発現調節が、あらゆる生命現象に関わる重要な制御機構であることを示唆している。実際、miRNA はその発現パターンを時期特異的・組織特異的に変化させることで、細胞増殖、アポトーシスの制御、発生・分化の調節などに寄与することが知られている。さらに、癌などの疾患にも関与しており、医療や診断法への応用研究も注目されている。

はじめに、miRNA は長いプレカーサーRNA として転写され、Drosha によって pre-miRNA にトリミングされる。その後、細胞質へと輸送され、そこで Dicer によって~21 塩基の 2 本鎖 miRNA になる (dicing)。その鎖の一方をガイド RNA として取り込んだ RISC がターゲット mRNA を認識する。ガイド RNA と完全に相補的なターゲット mRNA は RISC 内の Ago2 によって分解され、一部ミスマッチを含むターゲット mRNA は翻訳反応が阻害されることで遺伝子発現が抑制される。miRNA には鎖長の異なるバリエーションが存在するが、これは Dicer の基質特異性に由来すると考えられる。ガイド RNA の 5' 末端の鎖長が 1 塩基異なるだけでターゲット mRNA が変わる可能性があることや RNAi 活性の効率が変化することを考慮すると、生体内では pre-miRNA 切断パターンが正確に制御されていると推測される。

ヒト Dicer は PAZ ドメイン、dsRBD、2 つの RNase III ドメイン(RIIIa, RIIIb)等から成る~220 kDa のエンドヌクレアーゼである。これまで、PAZ ドメインは dsRNA の 3' 末端の 2 塩基 overhang に結合し、dsRBD は 2 本鎖 RNA を認識することが知られている。また、アンチセンス鎖の切断は RIIIa が、センス鎖の切断は RIIIb がそれぞれ行っていることが明らかにされている。

Dicer は dicing のみならず、RISC 形成においても重要な役割を果たしている。ヒトの場合、Dicer は TRBP と共に dicing された 2 本鎖 miRNA に結合し、これに Ago2 が加わり最終的に RISC へと成熟する。また通常は、2 本鎖 miRNA の片方の鎖が miRNA へと成熟することから、Dicer は miRNA の方向性を感知している可能性もあるが、これらの問題についてはほとんど分かっていない。本研究では、組換えヒト Dicer を用いて、基質認識と作用メカニズムについて生化学的な解析を行い、RNA 干渉の分子メカニズムに迫ることを目標とした。

## Stepwise dicing モデルの提唱

2本鎖RNAの dicing 部位を詳細に決定するために、基質としてshRNAを人工的にデザインした。Dicing後のサンプルを電気泳動したところ、経時的にshRNAが切断され、~22塩基のsiRNAが生成される様子が確認できた(図1(A))。鎖長を測定するために反応4時間後のレーン下側のバンドからsiRNAを回収し、脱塩した後に

MALDI-TOF MSで質量の測定を行った。様々な質量数のピーク

が検出されたが、全て分子量を基に塩基組成へと帰属することができ、dicingによる切断部位を決定できた(図1(B))。結果は、ピークの高さから検出されたRNA断片の割合を計算し、dicingパターンを図式化した。この解析により、DicerはshRNAを21~23塩基対のsiRNAにプロセッシングすることが確認できた。

次に、反応中間体を解析するために、反応4時間後のレーン上側のバンドのゲルからサンプルを回収し、MS解析を行った結果、アンチセンス鎖由来のRNA断片のみが検出された(図1(C))。これより、上側のバンドにはアンチセンス鎖のみにnickが入ったshRNAが含まれていることが予測された。

以上の実験により、ヒトDicerはアンチセンス鎖を切断した後、遅れてセンス鎖を切断することが示唆された。ここで、最初の切断を1st

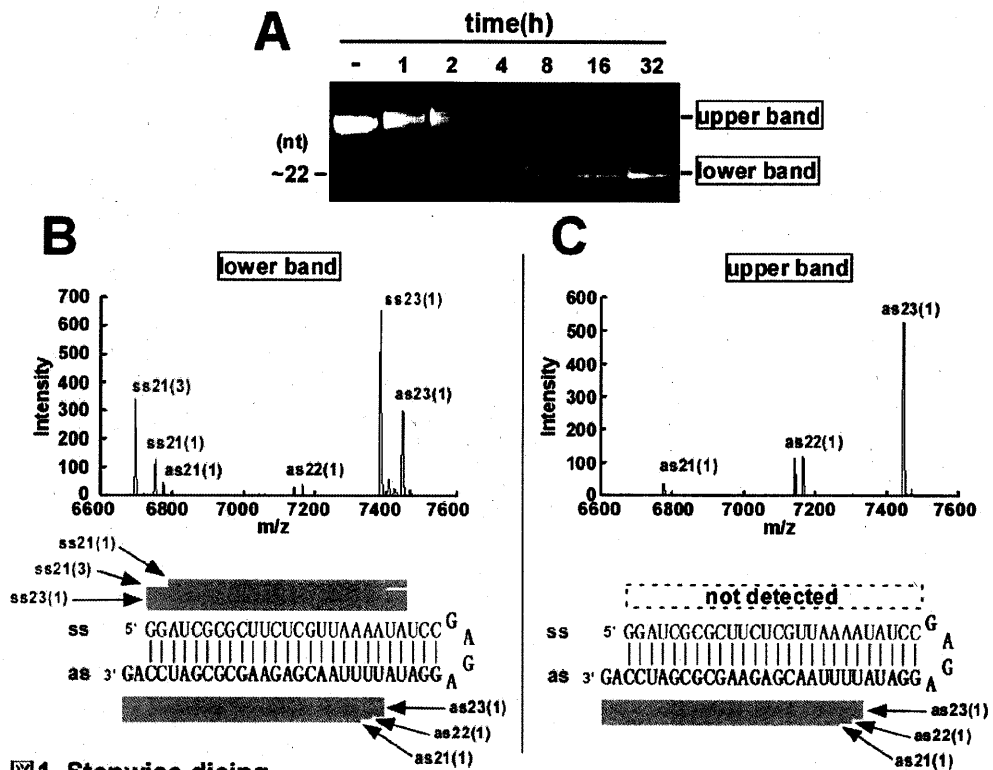


図1. Stepwise dicing

(A) dicing後shRNAの15%未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (B, C)ゲルから回収したRNA断片のMALDI-TOFマスペクトルとdicingパターンの長さは検出されたRNA断片の長さを、太さはその割合を示している

(B)ゲルの下側のバンドの解析

(C)ゲルの上側のバンドの解析

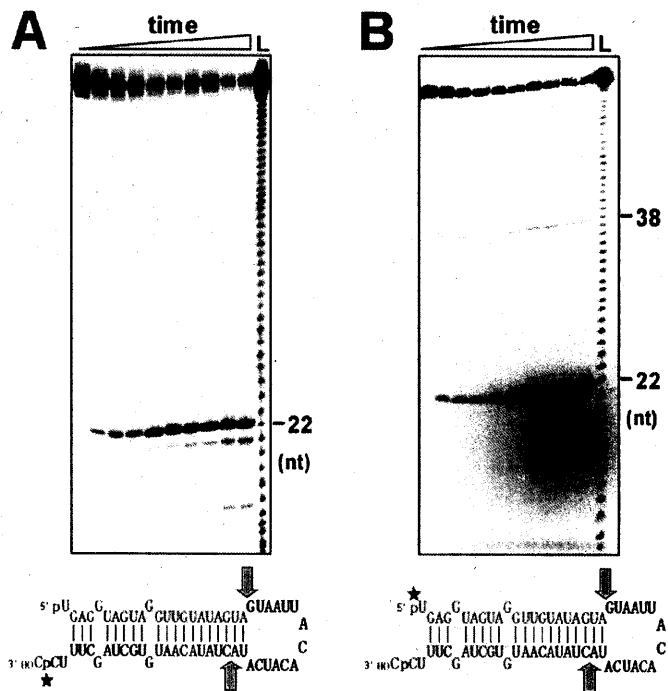


図2. pre-let-7のdicingパターン

10%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

L: アルカリラダー

(A) 3'末端標識 (B) 5'末端標識

cut、次の切断を 2nd cut と定義し、このような切断様式を stepwise dicing と名付けた。

これを天然の miRNA 前駆体で検証するため、pre-let-7 の dicing パターン解析を行った。3'末端を標識した pre-let-7 を dicing 後に電気泳動することで、経時的に pre-let-7 が切断される様子を確認した(図 2(A))。次に、5'末端を標識した pre-let-7 で同様の解析を行うと、22 塩基

の RNA 断片に加えて 38 塩基の RNA 断片が観測された(図 2(B))。以上の結果から、内在性の pre-miRNA でも同様な切断様式であることが判明した。

この様式が Dicer 特有かどうかを調べるため、大腸菌 RNaseIII による基質 R1.1[WC] (図 3(A))の切断様式を解析した。反応 30 分後に消化物を電気泳動で分離し(図 3(B))、それぞれ RNA 断片を回収し MS 解析を行った。その結果、一番上のバンドからは両鎖に由来する RNA 断片が、ほぼ同程度のピーク強度で検出された。これは、両鎖の切断タイミングがほぼ同時であることを示しており、stepwise な切断様式は Dicer 特有であることが示唆された。

## 2本鎖 RNA の 3'末端構造と Dicer による認識

3'末端構造による dicing パターンの違いや、アンチセンス鎖上の 1st cut 部位を特定するため、3'-overhang がマイナス 5 塩基からプラス 5 塩基までの計 11 種類の shRNA を調製した。これらは全て dicing され、~22 塩基対の siRNA が生成された(図 4)。そして、一番上のバンドの MS 解析により、Dicer は 3'末端から~22 塩基を測ってアンチセンス鎖上に 1st cut を入れることが判明した。

次に、両鎖の 3'末端のみをリン酸基または OH 基にした計 4

種類の 27 塩基対 dsRNA を dicing した結果、両鎖の 3'末端がリン酸基の dsRNA は dicing されなかった(図 5(A))。また、MS 解析を行った結果、両鎖の 3'末端が OH 基の dsRNA の場合、アンチセンス鎖

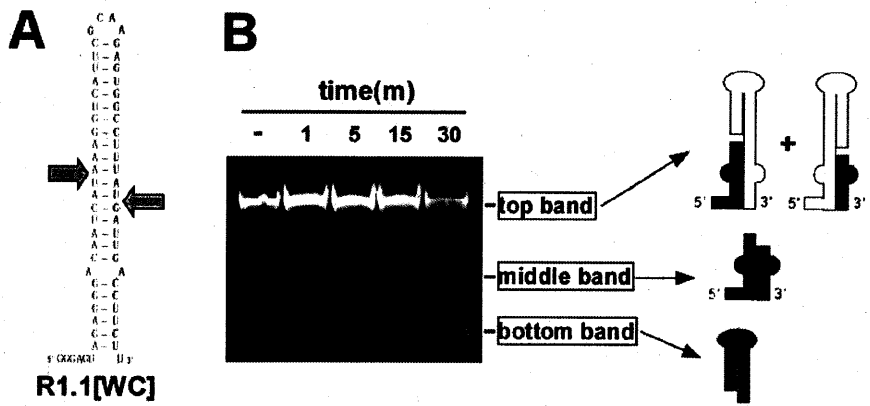


図3. 大腸菌RNaseIIIの切断様式

(A) 大腸菌RNaseIIIの基質R1.1[WC]の2次構造

(B) 反応後に15%未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、それぞれのゲルから回収したRNA断片をMALDI-TOF解析した。模式図において検出されたRNA断片は濃い色で示している。

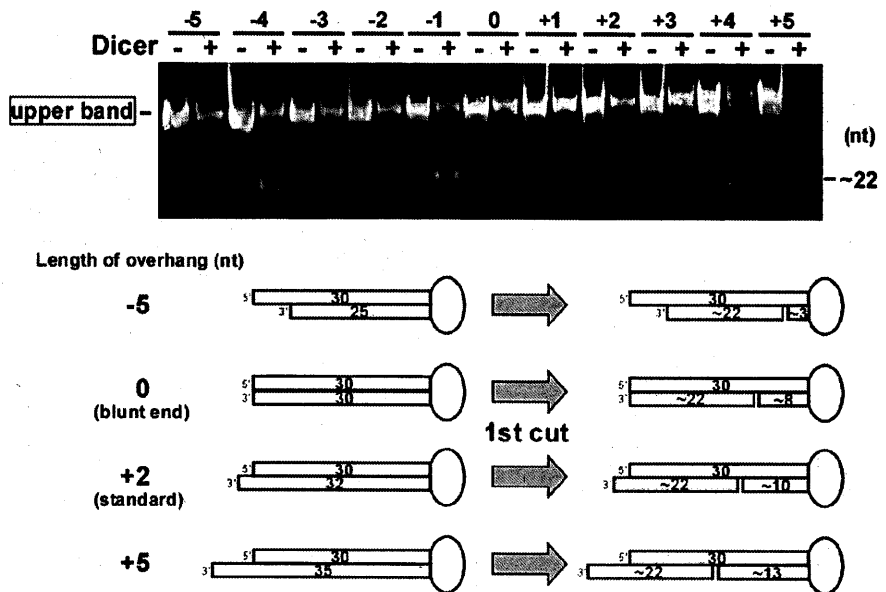


図4. 2本鎖RNAの3'末端構造に関係なく、Dicerは3'末端から~22塩基を測ってアンチセンス鎖上に1st cutを入れる

に 1st cut、センス鎖に 2nd cut が入った siRNA(R タイプ)と、センス鎖側に 1st cut、アンチセンス鎖側に 2nd cut が入った siRNA(L タイプ)の 2 パターンが検出された(図 5(B))。そして、アンチセンス鎖の 3'末端のみが OH 基の dsRNA の場合は R タイプだけが検出され、逆にセンス鎖の 3'末端のみが OH 基の場合は L タイプだけが検出された。以上の結果は、PAZ による 3'末端の認識が dicing に必須であることを示唆している。

これまでの結果を総合して、図 6 のような stepwise dicing モデルを構築した。まず PAZ が 2 本鎖 RNA の 3'-overhang と相互作用し、RIIIa が PAZ と結合している RNA 鎖の 3'末端から~22 塩基の位置に 1st cut を入れ、その後 RIIIb がもう片方の RNA 鎖に 2nd cut を入れる。RIIIb による切断部位は RIIIa の結合部位に依存していることが推測される。最近、*Giardia* Dicer の結晶構造が報告されたが、この 2 本鎖 RNA 結合モデルにおいて、PAZ と 3'-overhang の強い相互作用につられて RIIIa が配置され 1st cut を入れる。次に、軟らかい構造を持つ bridging ドメインを介した RIIIb が遅れて配置され、2nd cut を入れることで dicing が完了するのだろうと考察している。

両鎖の 3'末端が OH 基の 27 塩基対 dsRNA を dicing し MS 解析をすると、通常は前述のように R タイプと L タイプの 2 種類の siRNA が検出されるが、両鎖の 3'-overhang を AG にした dsRNA で dicing を行くと、両鎖の 3'末端に 7 塩基の overhang を持つ異常な siRNA が主生成物として検出された。これは、2 分子の Dicer の PAZ が 1 分子の dsRNA 両鎖の 3'末端 OH

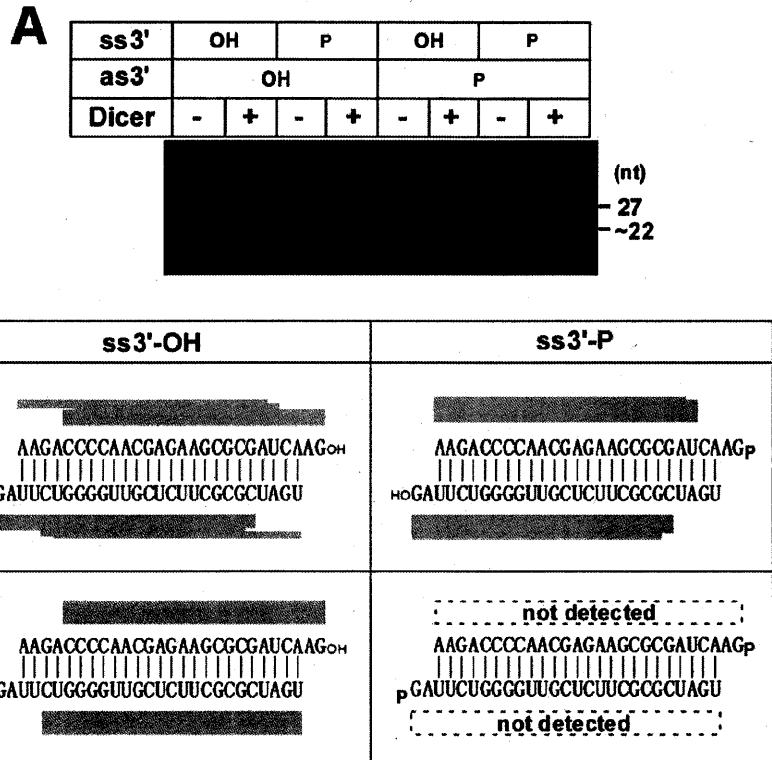


図5. 3'末端OH基とPAZの相互作用がdicingパターンを決める  
(A) 3'末端をリン酸基またはOH基にした4種類のdsRNAをdicing後、15%未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った  
(B) それぞれのdsRNAのdicingパターン

と結合している RNA 鎖の 3'末端から~22 塩基の位置に 1st cut を入れ、その後 RIIIb がもう片方の RNA 鎖に 2nd cut を入れる。RIIIb による切断部位は RIIIa の結合部位に依存していることが推測される。最近、*Giardia* Dicer の結晶構造が報告されたが、この 2 本鎖 RNA 結合モデルにおいて、PAZ と 3'-overhang の強い相互作用につられて RIIIa が配置され 1st cut を入れる。次に、軟らかい構造を持つ bridging ドメインを介した RIIIb が遅れて配置され、2nd cut を入れることで dicing が完了するのだろうと考察している。

PAZが3'-overhangに結合

RIIIaが3'末端から~22塩基の位置を切断する (1st cut)

RIIIbが他方の鎖を切断する (2nd cut)

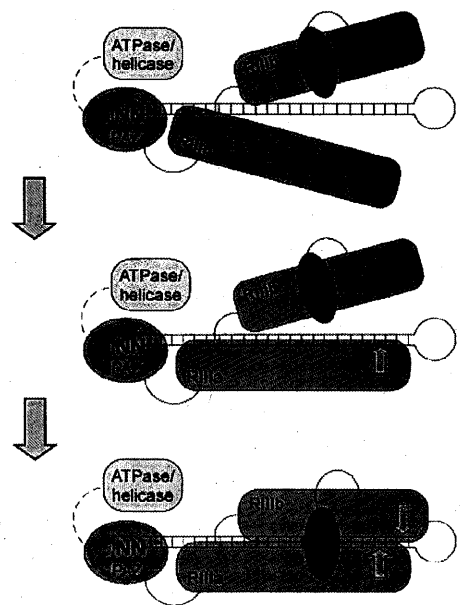


図6. Stepwise dicingモデル

基に競合的に結合し、それぞれの RIIIa がほぼ同時に 1st cut を入れる。そして RIIIb による 2nd cut は、互いの RIIIa によって立体的に阻害された結果、異常な siRNA が生じたと考えられる。

#### 細胞内 RISC 複合体中の Dicer の解析

細胞内から調製した RISC 複合体による pre-let-7 の切断様式を解析した。N 末端側に FLAG タグを持つ Ago2 および TRBP を恒常的に発現する HeLa 細胞から、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。この免疫沈降物には内在の Dicer が共沈していると考えられる。免疫沈降物に 5' 末端を標識した pre-let-7 を混合し電気泳動したところ、22 塩基の let-7 が観測されたが 38 塩基の RNA 断片は検出されなかった。この結果は、RISC 中の Dicer には両鎖を同時に切断する性質があることを意味している。恐らく、RISC の構成成分の中に dicing に関わる別の因子が存在し、この因子の作用で Dicer の性質が変化していると考えられる。切断キネティクスをほぼ同時にする因子は Ago2 なのか、TRBP なのか、それとも未知の因子なのか、更なる解析が必要であり、そこから RNAi の分子メカニズムの一部が見えてくるかもしれない。