

論文の内容の要旨

論文題目

ショウジョウバエ Dicer-1 の基質認識

氏名 包明久

[背景]

microRNA (miRNA) は 22 塩基程度の短い非コード RNA である。ゲノムにコードされた内在性の因子であり、自身と不完全に相補的な配列を持つ messenger RNA (mRNA) の不安定化または翻訳抑制を誘起する。線虫から哺乳類に至るまで進化的に広く保存されており、ヒトでは 1200 種以上が報告されている。全遺伝子の 3 分の 1 以上が miRNA による制御を受けているとも言われ、いくつもの重要な生物学的機能を制御している。

miRNA とよく似た小さな RNA として small interfering RNA (siRNA) が知られている。siRNA は miRNA と同様に 22 塩基程度の RNA で、自身と完全に相補的な配列を持つ mRNA の切断を行う。

miRNA の生合成過程では、miRNA を含む転写産物(pri-miRNA)からヘアピン型の前駆体 pre-miRNA が切り出され、細胞質に輸送される。続いて RNaseIII ファミリータンパク質 Dicer によって切断(dicing)を受け、短い二本鎖 RNA となる。この二本鎖 RNA は Argonaute タンパク質などと共に RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成し、標的 mRNA に作用する。一方 siRNA は、ウイルス感染や遺伝子導入等に起因する、長い二本鎖 RNA を前駆体とする。この長い二本鎖 RNA も dicing により短い二本鎖 RNA が切り出され、RISC を形成する (図 1)。

ヒトやマウス等の哺乳類や線虫では、一つの Dicer がどちらの前駆体も認識し切断する。その一方、ショウジョウバエをはじめとする昆虫は、二つの Dicer パラログ、Dicer-1 と Dicer-2 を持ち、Dicer-1 が pre-miRNA を、Dicer-2 が長い二本鎖 RNA をそれぞれ特異的に切断する (図 1)。最近、Dicer-2 が無機リン酸やパートナータンパク質 R2D2 によって pre-miRNA の誤切断を回避していること、Dicer-2 はヘリケースドメインで ATP の加水分解により長い二本鎖 RNA のうえを移動し、連続的に切断することなどが報告された。一方で、Dicer-1 の基質特異性に関する分子基盤はほとんど明らかに

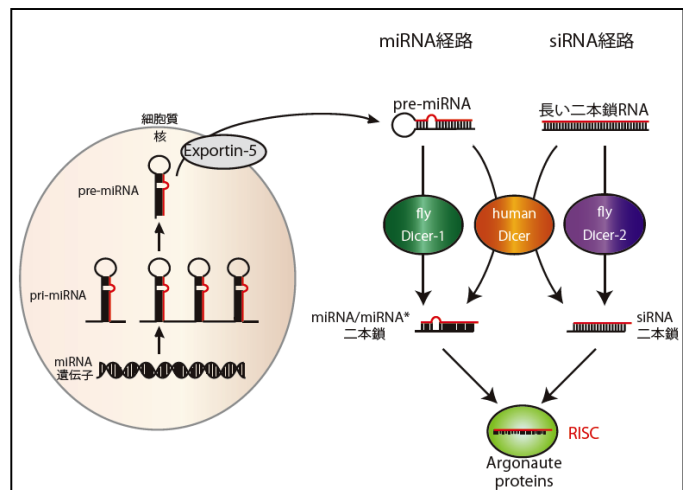


図 1 miRNA と siRNA の生合成経路

されていない。pre-miRNA は共通の配列を持たないが、構造的には二本鎖状のステム、2塩基の3'-overhang、一本鎖のループといった特徴を共有している(図2)。従って、Dicer-1 は pre-miRNA の塩基配列ではなく、構造を認識しているものと考えられる。

以上より本研究は、Dicer-1 に効率よく切断を受けるために必要な pre-miRNA の構造的特徴と、その特徴を認識する Dicer-1 のドメインを明らかにすることを目的とした。

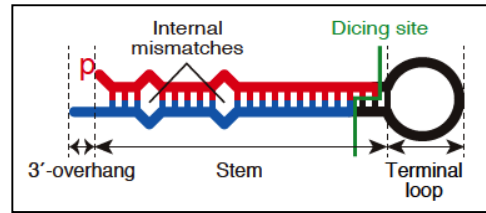


図2 pre-miRNA の構造

[手法]

Dicer-1 を用いた *in vitro* dicing アッセイ及びゲルシフトアッセイを行い、基質ごとの切断効率、Dicer-1 との結合能を定量的に評価した。Dicer-1 は、精製タグ付きの野生型、あるいはヘリケースドメイン欠損型組み替え体を、ショウジョウバエ S2 細胞株を用いて発現・精製した。基質 RNA は、代表的な miRNA である let-7 の前駆体 pre-let-7 を選択し、ステム長やループの大きさを段階的に変化させた変異体や、ステムのミスマッチを持たない変異体などを系統的にデザインした。基質は 5' 端を放射性同位体 ³²P により放射標識して使用した。

[結果]

1. Dicer-1 は基質の両端の距離を測る

精製された SBP-Dicer-1 は野生型の基質を効率よく切断した(図3a)。また、二本鎖状ステム中のミスマッチをなくした基質(図3b)や、ミスマッチを一つだけ導入しなおした基質は野生型の基質と同等の切断効率を示し、ミスマッチの位置や個数は Dicer-1 による切断反応には影響を与えないものと考えられた。

一方、3'-overhang を持たない基質(図3c)やループが小さい基質(図3d)では Dicer-1 による切断活性が大幅に減少したことから、Dicer-1 は 3'-overhang とループを認識していることが明らかになった。さらに、このループ構造を中央で切断した“二本鎖+一本鎖”型の Y 字型の基質もヘアピン型の基質と同じ程度に切断された(図3e)。この Y 字型の基質もヘアピン型同様、一本鎖部分が短くなると切断されにくくなった。

ステム部分の構造変異体を使用した実験では、ヘアピン型と Y 字型のどちらの基質でもステムが長くなると Dicer-1 に切断されにくくなった(図3f, g)。さらに、Y 字型の基質と同じ長さの“二本鎖+一本鎖+二本鎖”型の基質を作製したところ、3'-overhang と一本鎖 RNA 領域との距離がより近い“二本鎖+一本鎖+二本鎖”型の基質のほうが Dicer-1 に切断されやすかった(図3g, h)。この事実は、Dicer-1 が基質 RNA

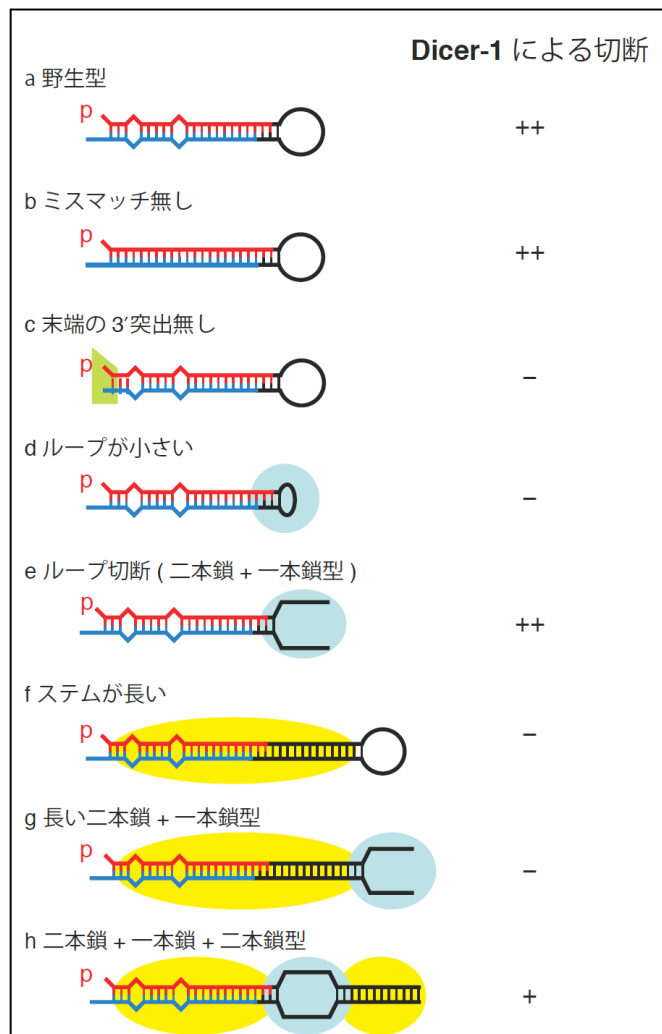


図3 本研究で使用した基質

の 3'-overhang から一本鎖 RNA 領域までの長さを測っていることを示唆していた。

以上の切断されにくい基質 RNA は、いずれもゲルシフトアッセイによって Dicer-1 との結合能が著しく低下していることが確認された。

これらの結果から、Dicer-1 は基質の 3'-overhang と「一本鎖の」ループを認識しており、これらの距離が適切な場合にのみ基質と結合し切断する、というモデルが考えられた。

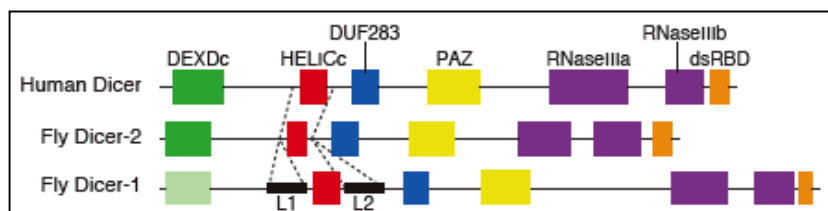
また、ステムが長い基質の場合でも、切断産物の長さに変化はなかった。鞭毛虫 *Giardia intestinalis* の Dicer の結晶構造から、切断産物の長さは 3'-overhang を認識する PAZ ドメインと、切断活性をもつ二つの RNaseIII ドメインとの距離によって決定されること報告されている。従って、これらのドメインは基質の構造によってその位置を変化させず、これら以外のドメインが基質の構造、すなわちループの位置を認識するものと考えられた。

図4 Dicer ファミリータンパク質のドメイン構造

図5 Dicer-1 による基質認識モデル

2. Dicer-1 は、そのヘリケースドメインで基質のループを認識している

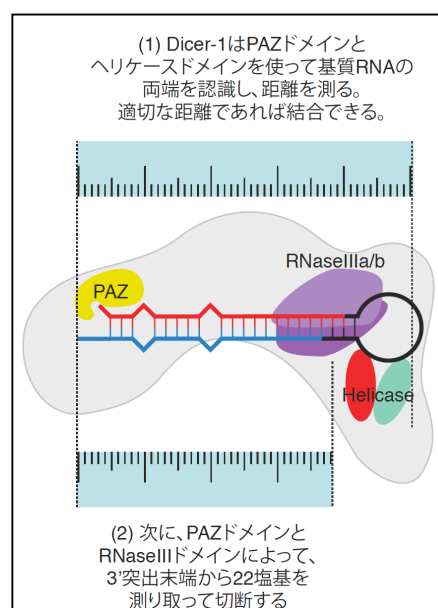
Dicer ファミリータンパク質は巨大なマルチドメインタンパク質であり、その N 末端側に DEXDc ドメイン及び HELICc ドメインと呼ばれる、二つのヘリケースドメインを有する。これらは協調的に一つの RNA ヘリケースとして機能することが知られている。ショウジョウバエ Dicer-1 のヘリケースドメインは、ショウジョウバエ Dicer-2、ヒト DICER1 のヘリケースドメインに比べアミノ酸配列の保存性が非常に低い、という特徴を持つ (図 4)。したがって、pre-miRNA に特化した Dicer-1 の特徴的な基質認識は、特徴的なヘリケースドメインによってもたらされると仮定した。そこで、これらのドメインを欠損した Dicer-1 を作製し、野生型と同様のアッセイを行い結果を比較した。



その結果、Dicer-1 が二つのヘリケースドメインのどちらか一方、あるいは両方を欠損した場合、野生型 pre-let-7 に対する切断効率が、ステムが長い基質、ループが小さい基質とほぼ同等にまで低下することが明らかとなった。これら全ての基質との結合能も低下しており、野生型 Dicer-1 に比べて基質間の結合能の差が小さかった。

これらの結果は、Dicer-1 の基質認識にはヘリケースドメインと基質の一本鎖 RNA 領域の結合が必要であることを示唆している。Dicer-1 の二つのヘリケースドメインのどちらか一方でも欠損するとこの機能が失われる事実も、これらのドメインが協調的に一つの機能単位としてはたらくこととよく合致している。

以上をまとめると、Dicer-1 が基質を認識する仕組みとして、次のようなモデルが考えられる。Dicer-1 は基質の 3'-overhang 構造を PAZ ドメインで、一本鎖ループ領域を二つのヘリケースドメインでそれぞれ認識している。これらのドメインの距離を分子定規として pre-miRNA の長さを測り取り、Dicer-1 の構造にフィットする典型的な構造の pre-miRNA のみと効率的に結合し、切断する。また、このとき pre-miRNA を切断する二つの RNaseIII ドメインと PAZ ドメインの位置も固定されているため、常に「正しい」構造の pre-miRNA から「正しい」長さの miRNA が切り出されるのである (図 5)。



[まとめ]

本研究により、ショウジョウバエ Dicer-1 の基質認識機構を初めて明らかにした。Dicer-1 は、基質 pre-miRNA の 3'-overhang と一本鎖ループを認識し、それらの距離が適切な場合に効率的に結合し切断する。また、一本鎖ループの認識は、機能未知であったヘリケースドメインがおこなっていることが示唆された。

ヘリケースドメインがどのようにして一本鎖 RNA の認識に特化したのか、また一般的に Dicer ファミリーはその切断反応とヘリケースドメインの機能をどのようなメカニズムで協調させているのか、といった分子基盤は今後明らかにされるべき課題である。

[発表論文]

Tsutsumi A, Kawamata T, Izumi N, Seitz H, Tomari Y
Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1
Nature Structural & Molecular Biology 18, 1153-8 (2011)