

# 論文の内容の要旨

論文題目 ヒトにおける小分子RNA複合体形成の生化学的解析

氏 名 依田 真由子

## 【背景・研究目的】

タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の生物学的意義は、近年ますます高まっている。様々な生物種を対象にした生体分子情報の網羅的解析、いわゆるオミックス解析の急速な進歩は、遺伝情報である DNA から数多くの ncRNA が転写されていることを明らかにした。現在では、様々な方法で遺伝子発現の制御を行う新たな因子として、生体内における ncRNA の重要性が注目されている。

ncRNA による遺伝子発現制御機構の一つに、21–30塩基長の小分子 RNA によって引き起こされる RNA サイレncing がある。RNA サイレncing は小分子 RNA の配列依存的に標的遺伝子の発現を負に制御する。この機構で中心的な役割を果たす小分子 RNA として知られているのが、microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) である。miRNA はゲノム中にコードされた内在性の小分子 RNA で、発生や分化、形態形成、アポトーシスなど様々な生命現象を緻密に制御している。近年では、癌や生活習慣病、感染症などヒトの疾患と miRNA との関連性が指摘されており、医療応用の面でも関心が高まっている。一方 siRNA は、元来、ウイルスなど外来遺伝子に対する防御応答として働く外因性の小分子 RNA である。近年では、それを応用することで標的遺伝子をノックダウンする手法が確立され、今や日常の研究に不可欠なツールとなっている。さらに、siRNA を用いて特定のタンパク質の発現を抑制する分子標的治療法としての応用も期待されている。

miRNA や siRNA などの小分子 RNA は単独で機能するわけではなく、複数のタンパク質と RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成して、はじめて配列依存的に標的遺伝子の発現を制御することができる。したがって、RISC の形成は小分子 RNA が働く上で最も重要な過程であり、この過程を明らかにすることは、小分子 RNA の作用メカニズムを理解する上で非常に大きな意義をもつ。

これまでの RISC 形成の研究は、ショウジョウバエをモデル生物として用いた研究が中心に行われており、ヒトにおける解析はほとんど進んでいなかった。

そこで私は、ヒトの RISC 形成の詳細を解明することを目的とし、生化学的手法を用いてヒトの RISC 形成過程を検出する実験系を確立した。そしてその実験系を用いて、典型的な小分子 RNA の RISC 形成過程と Dicer 非依存的に生合成される miRNA の RISC 形成過程の諸性質について解析を行った。

## 【研究報告】

### 1. 典型的な小分子 RNA の RISC 形成過程

まず初めに、私は当研究室で確立されたショウジョウバエの RISC を検出するためのアガロースネイティブゲルシステムを用いて、ヒトの RISC およびその中間体を直接検出するシステムの確立を行った。

RISC の中核をなす Argonaute タンパク質 (Ago) はヒトでは 4 種類 (Ago1-4) 存在する。その中でヒトでは Ago2 のみが切断活性を有する。

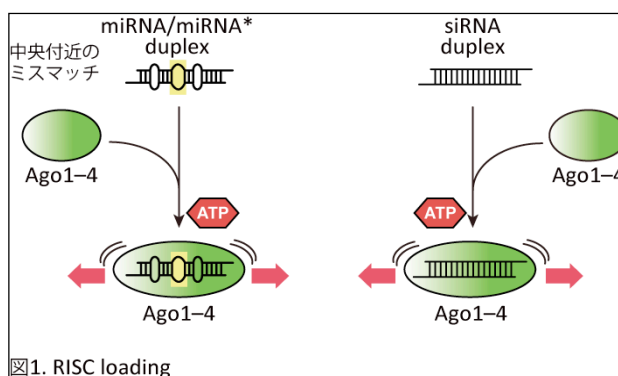
HEK293T 細胞で Ago1-4 をそれぞれ過剰発現させたタンパク質粗抽出液と、ガイド鎖の 5'末端に放射性ラベルをした小分子 RNA 二本鎖、ガイド鎖と相補的な配列をもつ標的 mRNA を混合し、アガロースネイティブゲル電気泳動を行った。その結果、二本鎖の小分子 RNA を取り込んだ状態の「pre-RISC」と、二本鎖 RNA が一本鎖化し、標的 mRNA と組んだ状態の「Mature RISC」を直接検出することに成功した。

この実験系の確立によって、多段階反応である RISC 形成過程をひとつひとつの素過程に分けて評価し、これまで手つかずであったヒトの RISC 形成過程の詳細を解析することが可能になった。そこで私はこの実験系を用いて、RISC 形成に必要な小分子 RNA 二本鎖の構造的特徴について調べた。

#### 1) RISC loading

完全に相補的な 21 塩基長の RNA 二本鎖に対し、5'末端から順番にミスマッチを一つずつ入れた合計 17 種類の小分子 RNA シリーズを作製し、小分子 RNA 二本鎖が AGO に取り込まれ、pre-RISC を形成する量を調べた。

その結果、Ago1-4 全てが、ミスマッチをもつ miRNA 様の小分子 RNA 二本鎖とミスマッチをもたない siRNA 様の小分子 RNA 二本鎖の両方を取り込むことが出来た。ただし、中心付近にミスマッチを持たない小分子 RNA 二本鎖は、



どの AGO タンパク質にも取り込まれにくい (図 1)。

#### 2) Unwinding

pre-RISC の形成を促進する為に小分子 RNA 二本鎖の中央にミスマッチを入れ、さらに 5'末端から順番にミスマッチを入れた二本鎖 RNA (すなわち二つのミスマッチをもつ)16 種類を用いて、Mature RISC の形成量を調べた。

その結果、小分子 RNA 二本鎖のガイド鎖の seed 領域 (2-7 番目) または 3' 側領域 (12-15 番目) に存在するミスマッチによって unwinding が大きく促進されることが分かった。一方、siRNA のように相補的な二本鎖 RNA の場合は、Ago1-4 に取り込まれるものの、切断活性をもつ Ago2 のみがパッセンジャー鎖の切断を介して効率よく Mature RISC を形成できることが分かった(図 2)。

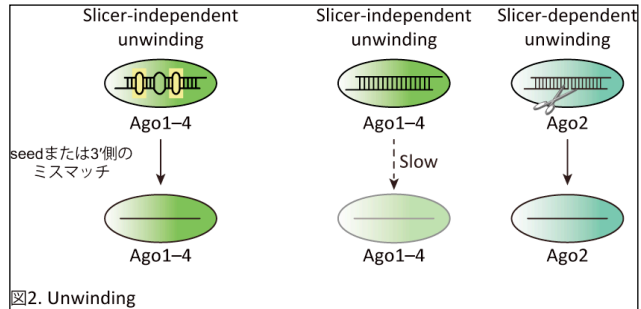


図2. Unwinding

天然に存在する miRNA/miRNA\*二本鎖も、今回明らかにした RISC loading および unwinding を促進するような二本鎖 RNA の構造的特徴、すなわち中心部分に加え 5' 側または 3' 側にミスマッチを持つものが多く存在する。本研究では、miRNA/miRNA\*二本鎖内の特定の場所に存在するミスマッチが、RISC 形成過程の各ステップにおいて重要な役割を果たしていることを見出した。

## 2. Dicer 非依存的に生合成される miR-451 の RISC 形成過程

miR-451 は miR-144 とクラスターを形成しており、miR-144/451 の発現は赤血球分化において重要な役割を果たしている。miR-451 は魚類からヒトまで、脊椎動物すべてにわたって高い保存性をもつが、典型的な miRNA とは異なり、Dicer に依存しない生合成過程を経るユニークな miRNA である。

典型的な miRNA は核内で転写された後、RNase III 型の酵素である Drosha/DGCR8 複合体による切断を受けてヘアピン型の pre-miRNA となる。その後、細胞質で RNase III 型の酵素である Dicer によって切断され、21-22 塩基の miRNA/miRNA\*二本鎖となり、前述の過程を経て RISC が形成される。一方 miR-451 は、核内で転写され Drosha/DGCR8 複合体の切断を受けた後 (pre-miR451)、細胞質で Dicer のプロセッシングを受けずにヘアピン構造のまま Ago タンパク質に取り込まれる。その後、切断活性をもつ Ago2 ではパッセンジャー鎖の切断と同様の切断が起こり pre-miR-451 が切断され、その先の反応へと続く。この経路の詳細は未だ分かっていないが、切断された

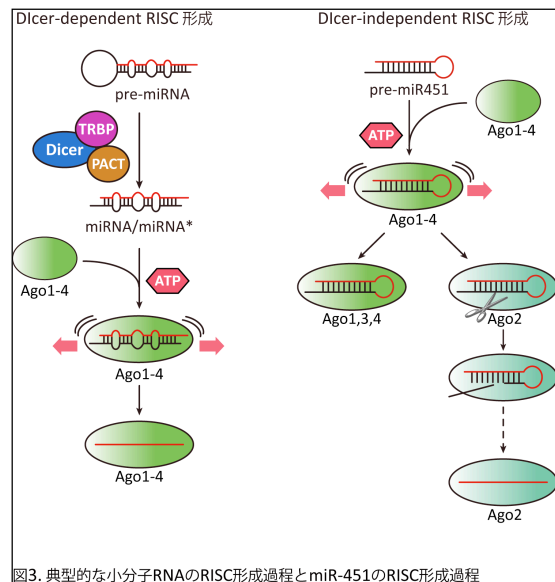


図3. 典型的な小分子RNAのRISC形成過程とmiR-451のRISC形成過程

30 塩基長の pre-miR-451 の 3' 末端側が、細胞質中に存在するタンパク質のプロセッシングを受けて 23 塩基長の一本鎖 RNA となり、Mature RISC が形成されると考えられている (図 3)。

miR-451 の生合成経路のユニークな点は、Dicer によるプロセッシングを受けないことである。その理由として、pre-miR451 は全長が 42 塩基長/ステム部分が 17 塩基と通常の pre-miRNA よりも短い構造をしているため、Dicer の基質として認識されにくいことが考えられる。そのため、pre-miR451 は Dicer のプロセッシングを受けずに、そのまま AGO へと直接取り込まれる。また取り込まれた後、Ago2 の切断

活性を必要とする点においてもこれまでの生合成過程とは異なり、Ago2 の切断活性に依存する経路として非常に興味深い。

これまでの miR-451 の研究は in vivo での解析がほとんどで、その生合成過程を生化学的に解析するための実験系が存在しなかった。そこで私は、K562 細胞や Ago2 を過剰発現させた HEK293T 細胞を用いて、in vitro で miR-451 の生合成を生化学的に検出する実験系の確立を行った。

具体的には、免疫沈降した FLGA-Ago2 に 5'末端を放射性ラ

ベルした 41 塩基長の pre-miR-451 を取り込ませ、その後洗浄して取り込まれなかった pre-miR-451 を除去した。そこに K562 細胞のタンパク質粗抽出液を加えたところ、Ago2 の切断産物である 30 塩基長の pre-miR-451、トリミングを受けて 23 塩基長になった miR-451、そしてその中間産物を検出することに成功した (図 4)。

この実験系を用いて、miR-451 の RISC 形成過程の諸性質について調べた結果、いくつかの特徴を見出すことが出来た。

- 1). pre-miR-451 の Ago への取り込みは Hsp70 の阻害剤によって阻害されることから、miR-451 は典型的な miRNA や siRNA と同様に、Ago に取り込まれるには ATP と Hsc70/Hsp90 シヤペロンマシンナリーが必要である。
- 2). Ago2 の切断後に起こるトリミング反応は  $Mg^{2+}$  要求性、ATP 非依存性、かつ 3'末端から 5'末端への加水分解によって起こる。
- 3). トリミング反応の速度は、プリン塩基に比べてピリミジン塩基では遅くなる。

#### 【総括】

本研究において、ヒトの RISC を検出する実験系を確立し、ヒトの RISC 形成過程を詳細に解析することに初めて成功した。その結果、RISC 形成に必要な小分子 RNA 二本鎖の構造的特徴を見いだすことができ、天然の miRNA/miRNA\*二本鎖が内部にミスマッチを有する意味を生化学的に説明することができるようになった。今後は典型的な miRNA とは異なる、特殊な生合成過程を経る miR-451 の RISC 形成過程の詳細が明らかになることを期待する。

#### 【発表論文】

Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y.

ATP-dependent human RISC assembly pathways., *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 17-23 (2010).

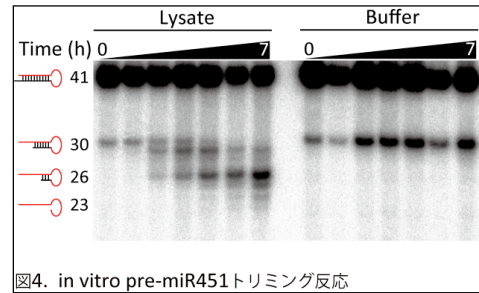


図4. in vitro pre-miR451トリミング反応