

## 論文の内容の要旨

論文題目 Biochemical analysis of RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6 in post-transcriptional gene silencing (転写後遺伝子サイレンシングにおける RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 6 の生化学的解析)

氏名 白 昶玟

20 塩基程度の小分子 RNA を介して行われる転写後遺伝子サイレンシングは真核生物において広く保存されている。しかしながら、小分子 RNA は単独で働くわけではなく、Argonaute (AGO) と呼ばれる RNase H 様リボヌクレアーゼと RNA-induced silencing complex (RISC) を形成することにより、小分子 RNA と相補的な配列を持つ標的 RNA を切断または、翻訳を抑制する (Ameres and Zamore, 2013, *Nat Rev Mol Cell Biol*).

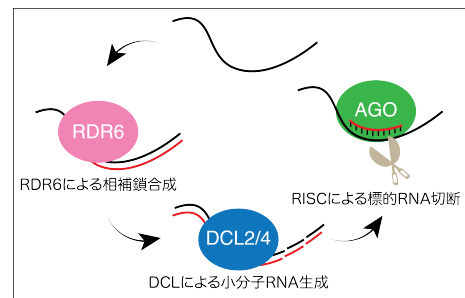


図 1. 転写後遺伝子サイレンシング機構

植物には小分子 RNA 増幅機構が存在する。外来遺伝子由来の異常な RNA や内在の一部の RNA (特殊な RISC によって切断された RNA) は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) により相補鎖が合成される。合成された二本鎖 RNA は RNase III 型リボヌクレアーゼである DICER 様タンパク質 (DCLs) によって 21 または 22 塩基の長さの小分子 RNA に裁断される (Allen *et al.*, 2005, *Cell*). 産生された二次的小分子 RNA は AGO と新たな RISC を形成することにより遺伝子サイレンシングを強める (図 1).

長年の遺伝学的研究より、植物における転写後遺伝子サイレンシングに関わる多くの因子が同定されてきた (Dalmay *et al.*, 2000, *Cell*) (Mourrain *et al.*, 2000, *Cell*). また近年の生化学的解析より、転写後遺伝子サイレンシング機構の詳細な分子機構が明らかになりつつある (Fukunaga and Doudna, 2009, *EMBO J*) (Iwakawa and Tomari, 2013, *Mol Cell*) (Nagano *et al.*, 2014, *NAR*). しかしながら、なぜ異常な外来 RNA が小分子 RNA 増幅機構の標的になる一方で多くの正常な RNA は標的にならないのかは長年の謎であった。

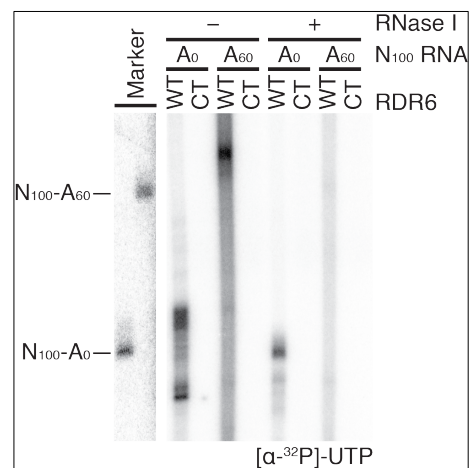


図 2. RDR6 の相補鎖合成実験 1

どのようなメカニズムで植物は正常な RNA と異常な RNA をみわけているのだろうか？ 近年の研究により、植物に外来遺伝子を導入すると真核生物の mRNA の重要な構造の一つである 3'末端



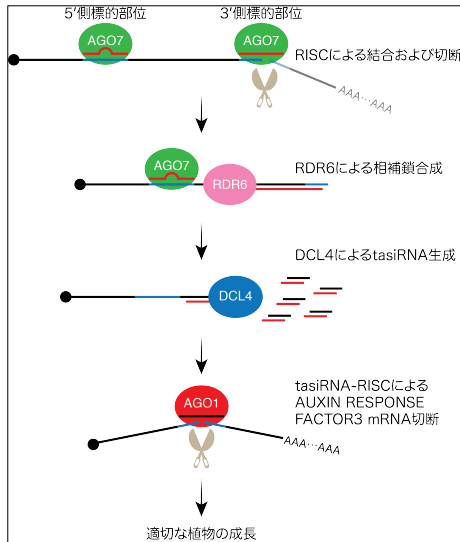


図 5. TAS3-tasiRNA 生合成経路

前述したように、非自己 RNA だけでなく、一部の内在の RNA (TAS RNA) も RDR6 の鋳型になり小分子 RNA を生み出すことが知られている。TAS RNA は AGO7-RISC や 22 塩基の microRNA と結合した AGO1-RISC という「特殊な RISC」によって切断されることで、小分子 RNA 増幅経路に入る。生成された TAS RNA 由来の小分子 RNA は TAS RNA 以外の標的を「trans」に抑制することから trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) とよばれている (Borges and Martienssen, 2015, *Nat Rev Mol Cell Biol*)。陸上植物に広く保存されている TAS3-tasiRNA 経路では、TAS3 RNA 上に AGO7-RISC の標的配列が二つ

存在しており (Axtell *et al.*, 2006, *Cell*)、モデル植物であるシロイヌナズナにおいては、5'側標的部位は AGO7-RISC が結合し、3'側標的部位は AGO7-RISC により切断されることが知られている。切断された RNA は RDR6 による二本鎖化を介して DCL4 によって 21 塩基の小分子 RNA にプロセッシングされる。生成した TAS3 tasiRNA は植物成長ホルモン調節関連因子をコードする mRNA を切断することにより、植物の適切な成長を促す (図 5)。この様に tasiRNA 経路は植物の成長に重要な役割を持つにも関わらず、詳細な分子機構は解明されていなかった。解析が進まない最大の理由として植物体を用いた研究では小分子 RNA の蓄積量という最終的な結果でしか活性評価が出来ず反応の素過程を解析することが不可能である点が挙げられる。試験管内アッセイ系は中間状態を切り分けて解析する極めて強力なツールとなるが、現在までこの複雑なシステムを試験管内で完全に再現出来た例は皆無であった。

そこで、私はタバコ培養細胞由来細胞抽出液 (BYL) を用いて、TAS3-tasiRNA 生合成経路を試験管内で再現することで、RDR6 を介した小分子 RNA 増幅系を生化学的に理解しようと考えた。まず、TAS3-tasiRNA 生合成に関わる因子である AGO7, SGS3, SDE5, RDR6 の N 端に FLAG タグをつけた mRNA 作製し、BYL を用いて試験管内翻訳した。それぞれのタンパク質の発現はウエスタンブロッティングによって確認した (図 6)。BYL で形成した AGO7-RISC と試験管内翻訳した SGS3, SDE5, RDR6 を混和し、TAS3 RNA を加えインキュベートした。反応後、トータル RNA を抽出し、TAS3 RNA および TAS3 RNA に由来する tasiRNA をノーザンブロッティングにより検出した。TAS3 RNA と小分子 RNA 増幅に必要な因子を加えた場合、切断された TAS3 RNA 断片に加え、大量の tasiRNA が検出された (図 7)。

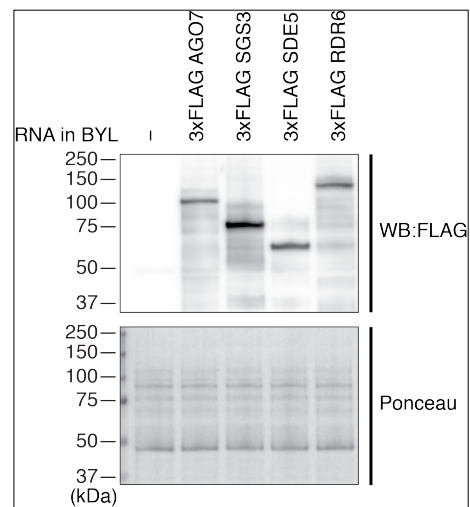


図 6. tasiRNA 生成に関わるタンパク質の発現

TAS3-tasiRNA 生合成経路を試験管内で再現できるアッセイ系を構築出来たため、この系を用いて、私は RISC が TAS3 RNA の二ヶ所をターゲティングする"two-hit"と呼ばれる機構の意義を調べることにした。two-hit は RDR6 による効率的な相補鎖合成に必要ではないかと仮定し、二ヶ所の RISC 標的部位それぞれ (5'標的部位変異体 (5'mut)および 3'標的部位変異 (3'mut))、または両方 (5'3'標的部位変異 (5'3'mut)) に変異を持つ TAS3 変異体、そして 3'標的部位

がすでに切断されている TAS3 を想定した TAS3 RNA (Cleaved)を作製した。また、二本鎖 RNA に結合することで DCLs による小分子 RNA 生成を阻害する役割をもつ昆虫ウイルス由来のサイレンシングサプレッサーである、FHVB2 を加えることで、TAS3 RNS のアンチセンス鎖を検出することにした。FHVB2 の有無にかかわらず、RISC による切断は WT と 5'mut で確認された (図 8)。FHVB2 が

ない場合、WT と Cleaved では 3'mut, 5'3'mut と比較してより強い siRNA シグナルが検出された (図 8)。FHVB2 存在下では予想通り siRNA 生成は阻害され、WT と Cleaved で大量のアンチセンス鎖が検出された (図 8)。この結果により、5'標的部位に RISC

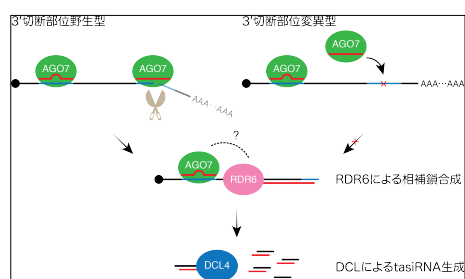


図 9. tasiRNA 生成において two-hit の意味

直接的もしくは SGS3 や SDE5 を介して間接的に RDR6 を標的 RNA 上にリクルートする役割を持つことが示唆される (図 9)。すなわち、二ヶ所の RISC 標的部位はそれぞれ異なる役割を持ち、協調的に働くことによって効率的に tasiRNA を生成することが明らかとなった。

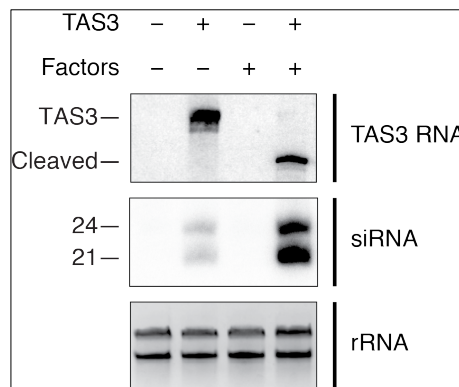


図 7. TAS3-tasiRNA 生合成実験 1

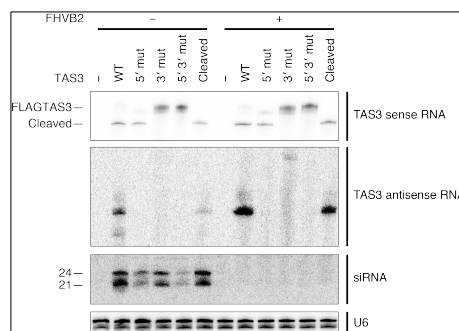


図 8. TAS3-tasiRNA 生合成実験 2