

平成 31 年 4 月 23 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018 年度

受付番号 201860706

氏 名 解 沼 正 行
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ミシガン大学 （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
核内における小分子 RNA インタラクトームの同定
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 30 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入**

も可）

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

〈研究実施状況〉

1. AGO4 および AGO1 の免疫沈降法と小分子 RNA の検出法の確立

まず小分子インタクトームを明らかにするため、小分子 RNA と RNP 複合体を作る AGO4 および AGO1 の免疫沈降法、小分子 RNA の検出法の条件検討を行なった。クロマチン画分を用いた免疫沈降により AGO4 の精製に成功した (図 1)。続いて、AGO4 および AGO1 に結合した小分子 RNA の検出のための条件検討を行なった。免疫沈降後の小分子 RNA は極めて微量であるため、5' 端、3' 端へのアダプター付加後に PCR により増幅することで、検出を可能にした (図 2)。

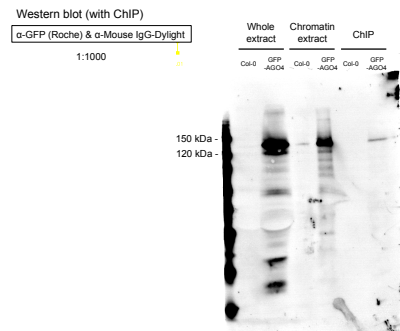


図1 GFP-AGO4の免疫沈降

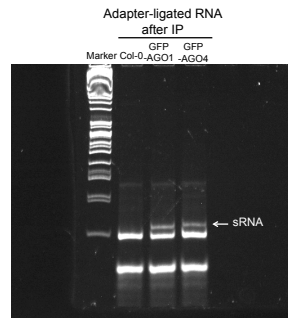


図2 GFP-AGO4、GFP-AGO1に結合した小分子RNAの検出

2. AGO4 および AGO1 に結合した小分子 RNA と標的 RNA のライゲーションおよびキメラ RNA の検出

次に、AGO4 および AGO1 を免疫沈降した後、標的 RNA の部分的な切断を行い、リンカーRNA を用いて、両者をライゲーションすることにした。ライゲーションした RNA を 1) の方法でアダプターを付加した後に増幅し、目的の長さのサンプルをサイズセレクションして TOP0 ベクターへとクローニングした。その後サンガー法により、ライゲーションが上手くいっているか確認した。しかしながら、それらの配列はどれも、短いジャンク RNA などにアダプターが付加されたものであり、目的としたようなキメラ RNA ではなかった (図 3、図 4)。

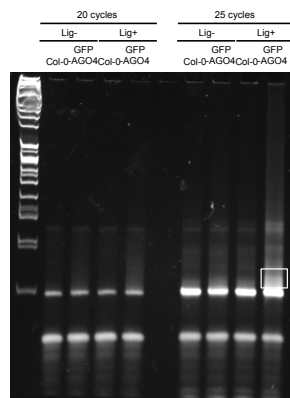


図3 小分子RNAと標的RNAのライゲーション産物の作出

```
#1 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATGTTGAGGTTGAGGTTCTGTAGGACCATCAATCT
#2 GGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#3 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCAGGACCTGTAGGACCATCAATCTGTAGGACCATCAAT
#4 CTGATGCGGTTCTTCTGCTTG
#5 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCAGGACCTGTAGGACCATCAATCTGTAGGACCATCAAT
#6 CCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#7 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTAGGACCATCAATG
#8 GTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#9 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCAAGAGAGTCAAGAGTCTTGAATTGTCGGAG
#10 GCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#11 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#12 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#13 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#14 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#15 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#16 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#17 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#18 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#19 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
#20 AATGATAGCGGACACCGAGATCTACACGACAGGTTGAGGTTCTACAGTCCGACGATCCTGTAGGACCATCAATCTGTATGCGGTTCTTCTGCTTG
```

赤:5'アダプター 黒:検出されたRNA 青:リンカーRNA オレンジ:3'アダプター

図4 サンガーシーケンスによるキメラRNAの検出

その後様々な RNase、アダプター、ライゲーション法、タンパク質変性等を試したが、キメラ DNA の作出は上手く行かなかった。これまでに小分子 RNA と標的 RNA のライゲーションに成功した報告は、動物の microRNA に限られる。動物の microRNA は、シード配列と呼ばれる小分子 RNA の 5' 端から 2-8 塩基目における相補性が比較的重要であり、標的 RNA との相補性はそこまで高くない。一方植物の AGO4、AGO1 はほぼ相補的な結合をしていると考えられている。この相補度合いの高さが、RNA リガーゼのアクセスを妨げた可能性がある。また、ARGONAUTE タンパク質によって小分子 RNA の 3' 端側が抱え込まれている可能性がある。この場合、RNA リガーゼが小分子 RNA にアクセスできなくなっている可能性も考えられる。

以上の考察から、当初予定していた方策からアプローチを変えることで、小分子 RNA の作用メカニズムを探ることにした。

3. AGO4 の足場としてはたらく植物特異的 RNA ポリメラーゼ Pol V の免疫沈降による間接的な小分子 RNA の検出-ライブラリー作成法の改変-

前述の問題点を解決するため、受け入れ先である Wierzbicki 研究室において過去事例がある Pol V の免疫沈降により、実際に標的 RNA に結合していると考えられる小分子 RNA を間接的に検出することで実際にはたらく小分子 RNA の動態を探ることにした。

これまでに Pol V の RIP-seq を行なった報告は、Wierzbicki 研究室によるもの 1 報と、他の研究室によるものが 1 報に限られている (Böhmendorfer et al. (2016) eLife 5: e19092. ; Liu et al. (2018) Nature Plants 4: 181-188.)。しかしながら、どちらも検出感度が低く、間接的に結合する小分子

RNAを検出するまでには至っていない。そこでまず検出感度の高いRIP-seq法を開発することにした。主に、ライブラリー作成法の改変を行なった。

従来の方法では、RNA-IP後、ランダムプライマーを用いた逆転写を行なった後、illumina TruSeq mRNA kitを用いてcDNAライブラリーが作成されていたが、Pol Vの転写物RNAが比較的短いことから、ランダムプライマーとの相性が悪く、TruSeq kit内のアダプターライゲーションの効率が悪いことなどから、最終的なシーケンシングの検出感度が低かった。そのため、新しいライブラリー作成法では、IP後のRNAにpolyAを付加することでdTプライマーによる逆転写を可能にした。またMMLV RTの特徴を利用したTemplate switching法を用いることで、逆転写とアダプター配列付加を高効率で行うことにより、検出感度、特異性共に上昇した(図5、図6)。これにより、改良前のRIP-seqと比較して、Pol V転写物と考えられるシーケンシングリードの大幅な増加が見られた。また、変異体と比較して4倍、8リード以上の差を満たすPol V転写領域の数は、従来の方法によって同定された4502箇所から20322箇所へと増加した(図7)。シロイヌナズナの遺伝子数が現在約27000箇所であることを考えると、Pol Vによる転写はゲノム上に起こっていることがわかった。以上の結果から、ライブラリー作成法の改良によって、これまでに検出できなかったPol V転写物RNAの検出に成功した。

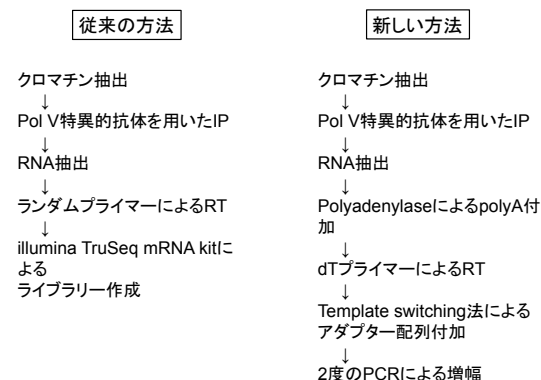


図5 Pol V RIP-seqのライブラリー作成法の改良

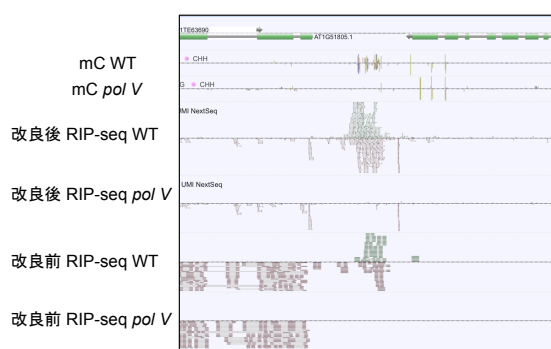


図6 ライブラリー作成法の改良後のRIP-seqの結果

アノテーションしたPol V転写領域(>8リード、200bp以内)

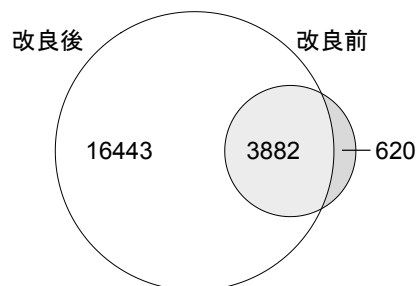


図7 RIP-seqによって同定されたゲノム上のPol V転写領域の数

4. AGO4の足場としてはたらく植物特異的RNAポリメラーゼPol Vの免疫沈降による間接的な小分子RNAの検出-Pol Vに結合した24塩基RNAの特徴-

続いて、実際にPol V RIP-seqによってAGO4に結合した小分子RNAが検出できたか解析を行なった。AGO4に結合した小分子RNAの第1塩基はA(アデニン)の割合が高いことが知られている。そこで、小分子RNAのサイズである21から24塩基長までのRNA配列をRIP-seqデータから抽出し、塩基の割合を調べた。その結果、21から24塩基長のリードは全てAを一番高い割合で持っていることがわかった(図8、図9)。24塩基長の第1塩基におけるAの割合は52.3%であり、nrpe1変異体において31.5%であることを考えると、AGO4に結合した小分子RNAを間接的に検出することができた可能性が高いといえる。

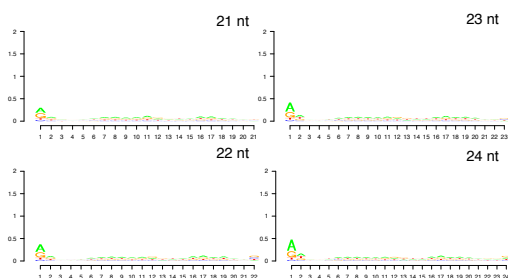


図8 21-24塩基長RNAの塩基配列

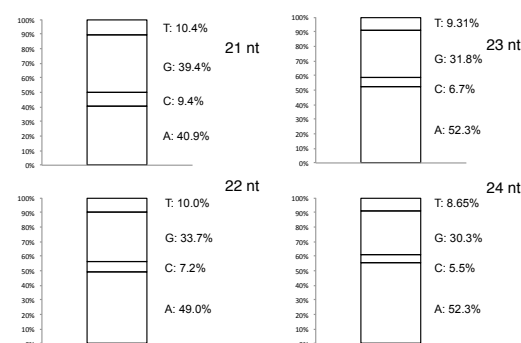


図9 21-24塩基長RNAの1st塩基

5. Pol V に結合した AGO4-siRNA の特徴

続いて、これまでに報告のある、AGO4 RIP-seq のデータを用いて、今回得たデータがどれだけ AGO4 に結合した sRNA と同様な点、異なる点を持っているかを調べた。まず、結果 4) と同様に第 1 塩基の割合を調べた。すると Pol V RIP-seq によって得た sRNA 画分と同様の傾向を持っていることがわかる (図 10)。これは Pol V RIP-seq のデータが AGO4 に結合した sRNA である可能性を高める結果である。

続いて、Pol V 転写領域におけるそれぞれの発現傾向を調べた。AGO4 RIP によって得た sRNA の蓄積量と、Pol V RIP-seq との相関は取れなかった (図 11A)。このことは、AGO4 RIP によって検出できる sRNA の情報は、あくまで AGO4 に結合している sRNA の特徴であるからであると説明できる。次に当たり前ではあるが、Pol V RIP-seq と 24 nt のみ抽出した画分との間では、一定の相関が取れた (図 11b)。また、Pol V RIP-seq の 24 nt 画分と sRNA シーケンシングのデータとの間でも低いながら相関が取れた (図 11c)。以上のことから、Pol V に結合した小分子 RNA は、全体的に発現する小分子 RNA とある程度発現量が近いが、どのような独自の特徴を持つかに関しては、さらなる解析が必要である。現状は、Pol V RIP-seq を利用した間接的な sRNA の検出は、実際にはたらく sRNA を検出することができるため、有用であることが示唆された。

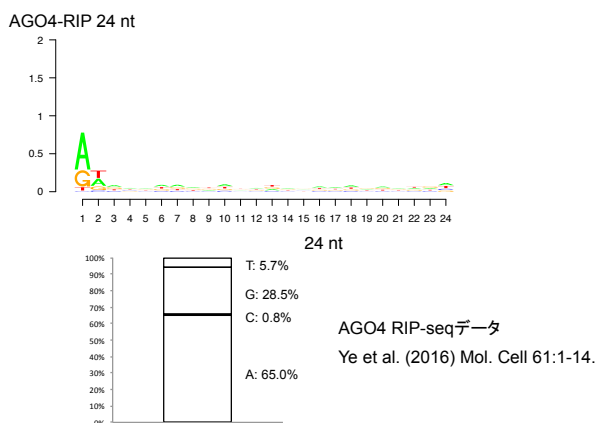


図10 AGO4 RIP-seqの1st塩基

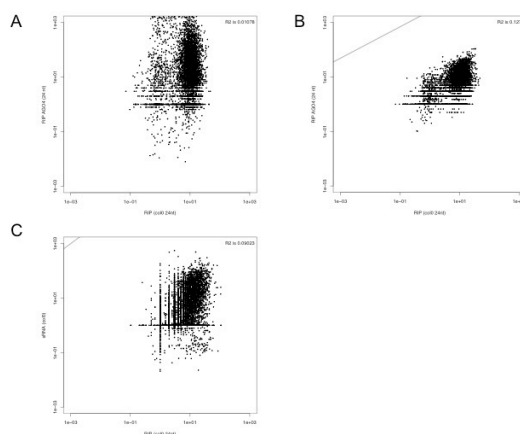


図11 Pol Vに結合したsRNAの特徴

6. 小分子 RNA の足場としてはたらく Pol V 転写物の新たな特徴

Pol V の RIP-seq の大幅な改善により、*nrpe1* 変異体では検出されないような微量の RNA が検出されていることも、ゲノムブラウザーのマッピングデータから発見した (図 12)。このことから Pol V の転写領域は大きく 2 種類に分けられることが示唆されてきた。1 つは従来の DNA メチル化経路の標的であり、Pol V の転写量が強く DNA メチル化や小分子 RNA の発現を伴い、トランスポゾンや遺伝子間領域に存在している。もう 1 つは Pol V の転写量が低く、小分子 RNA の発現が見られず、遺伝子領域を含みゲノムワイドに存在している RNA 依存性 DNA メチル化経路において解明されていない疑問の 1 つは、どのようなメカニズムで経路が開始されるかということである。この点において、Pol V によるゲノムワイドな微量な転写から標的領域での RdDM 経路の転写への状態の変化が、小分子 RNA によって変化することが示唆される。標的ではなかった領域が標的になるためには、Pol V が常にゲノムワイドに存在することで DNA メチル化経路への移行開始因子としてはたらくと考えるのは妥当である。今後さらに小分子 RNA による RdDM のモードの変化に着目して、研究を進めていく。

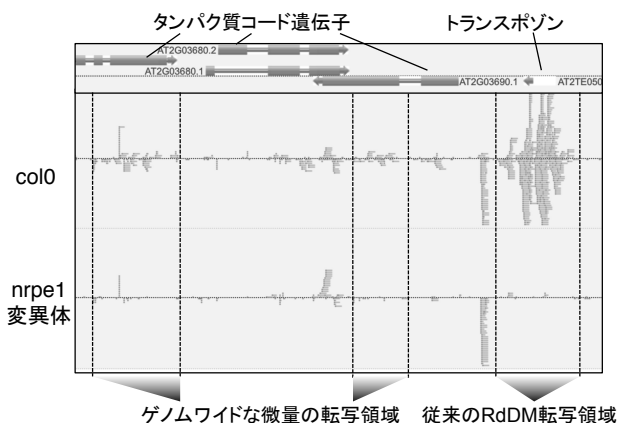


図12 ゲノムワイドなPol Vの微量な転写