

# Dicerによる基質RNA認識選別機構の解明

名古屋大学大学院工学研究科生命工学専攻

神谷 由紀子

## 1. 目的

RNAi機構において基質RNAの長さを調製するDicerは、pre-miRNAや外来性の長鎖dsRNAを切断し、20~23mer程度の短いdsRNA(miRNA、siRNA)を生産する重要な役割を担っている。このことから、DicerによるRNA認識・切断機構の解明はRNAiを理解するうえでも、RNAiを基盤とする核酸医薬を開発する上でも非常に重要である。

ヒトDicerはHelicase、Platform/PAZ、RNase、RBDなどからなるマルチドメインタンパク質(図1)であり、ドメイン間の相対配置を変化させることで基質RNAの認識・切断・受け渡しのステップを調節していると考えられている。Dicerの作用機構を明らかにするためには、DicerのRNA認識の詳細を明らかにすることが求められており、これまでに一部のドメインの結晶構造解析、またクライオ電子顕微鏡解析により、各種Dicerの全長あるいは、基質RNAとの複合体の三次元構造が報告されている。一方で、クライオ電子顕微鏡像でdsRNAは触媒ドメインから離れた位置に存在するなど、立体構造解析では捉えられていない相互作用状態が存在する可能性が示唆されている。このことから、DicerとRNAの相互作用の詳細を明らかにするためには、従来の手法とは異なる方法を用いて溶液状態の相互作用を調査する必要があると考えた。申請者はDicerのPAZドメインが、基質RNAの3'オーバーハング末端に結合することに着目し、また、報告されているクライオ電子顕微鏡による立体構造解析により、DicerのPAZはPlatformドメインと共に、DicerのL型構造のCapとして存在すると示されていることから、Platform/PAZドメイン(Dicer-PP)による基質RNA認識の解明を試みた(図1b)。

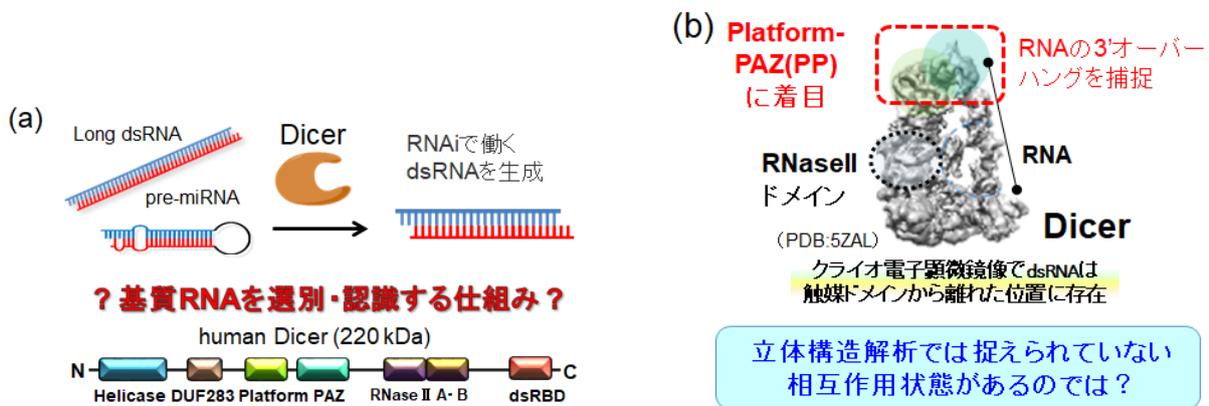
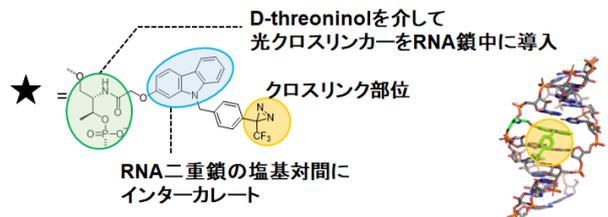


図1 DicerはRNAiで働くdsRNAを生成する役割を担うマルチドメインタンパク質である。

## 2. 本研究の戦略

Dicer-PPが基質RNAを認識する際には、RNAの長さや内部構造に依存して構造変化する可能性があることから、従来の立体構造解析とは異なる手法で、溶液中におけるDicer-PPと基質RNAの相互作用状態を明らかにすることをねらった。そこで、クロスリンク解析により、複合体上のコンタクト部位を探索することとした。そのために、pre-siRNA上の様々な位置に光クロスリンク剤であるジアジリン分子を導入したものを設計した(図2)。具体的には、二重鎖RNA内の塩基対間にインターカレートすることを期待し、また、dsRNA内のクロスリンクを避けるようにクロスリンク部位がdsRNAのグループに出ることを期待し、ジアジリン誘導体を設計した。このジアジリン誘導体を、D-threoinolを足場としてdsRNAに導入することで、RNA鎖内の望みの位置にクロスリンカーが

### ① RNAインターカレート型光クロスリンカーの開発



### ② 光クロスリンク法を用いたDicer-PPとdsRNAの相互作用界面の特定

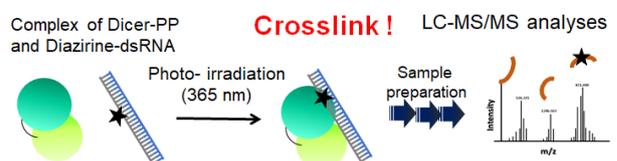


図2 本研究で用いる光クロスリンカーの設計と戦略

導入できる設計とした。本クロスリンカーを導入したpre-siRNAを用いて、Dicer-PPとの間のクロスリンク産物を調製し、Dicer-PP上のRNA-クロスリンク部位を、LC-MS/MS解析により同定することを試みた。

### 3. 結果

#### pre-siRNAとDicer-PPの部位特異的な光クロスリンク

センス鎖の5'あるいは3'末端、および内部に光クロスリンクを導入したpre-siRNAを調製し、Dicer-PPとの光クロスリンクを評価した。なお電気泳動解析によるクロスリンク産物の検出のため、pre-siRNAには蛍光基も導入した。その結果Dicer-PPは、結合が想定されている3'オーバーハング領域近傍にくわえて、pre-siRNAの内部領域ともクロスリンクした。一方、結合が想定されている3'オーバーハング末端とは逆の末端とはクロスリンクしなかった。このことから、Dicer-PPはpre-siRNAの末端のみならず内部領域とも隣接して存在しており、pre-siRNAの3'オーバーハング末端から中央領域にかけて相互作用することが考えられた。

#### LC-MS/MSによるクロスリンク部位の決定

上記の解析により得られたクロスリンク産物において、Dicer-PP上のどの部位クロスリンクしたかを明らかにするために、LC-MS/MS解析を実施した。Pre-siRNAの3'オーバーハング領域近傍に導入したクロスリンカーのコンタクト部位は、報告されているDicer-PPとdsRNAの複合体の結晶構造から予想されるように、3'オーバーハング領域結合部位の近傍に位置する、ループ領域であることが明らかとなった。その他の部位にクロスリンカーを導入したpre-siRNAにおいても、同様にコンタクト部位を決定することができた。このように本手法を用いて、狙い通りにクロスリンク産物を得ることができた。

報告されているDicer-PPとdsRNAの結晶構造における結合配向と、クロスリンク解析によって見出された相互作用界面に基づくDicer-PPとpre-siRNAの複合体の結合配向が異なることから、溶液中でDicer-PPの構造変化により揺らぐことによって複合体の結合配向が変化すると予想されたため、FRETを用いたDicer-PPとdsRNAの複合体状態の検出を試みた。Dicer-PPおよびRNAへの蛍光色素の導入法の確立に成功し、実際にFRET計測を可能とした。しかし、導入した色素の意図しない揺らぎやDicer-PPあるいはdsRNAとの相互作用が影響し、定量的な結果を得るためには、色素導入法の改善が必要であるということが分かった。

### 4. まとめと展望

光クロスリンカーの開発によって、pre-siRNAとDicer-PPの複合体の相互作用界面を明らかにすることに成功した。この相互作用においては、pre-siRNAの3'オーバーハングだけでなく内部領域も相互作用界面に含まれていた。今後は、本研究を全長のヒトDicerに展開し、Dicer-PPの構造変化と相互作用を捉え、本相互作用が担う役割を明らかにする必要があると考えている。