

Dicer-2 タンパク質は長い二本鎖 RNA を連続的に切断する ～1分子イメージングでとらえた異常 RNA 切断のしくみ～

1. 発表者：

永沼 政広 (東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野 助教 [研究当時])
多田隈 尚史 (上海科技大学 生命科学技術学部 助理教授)
泊 幸秀 (東京大学定量生命科学研究所 RNA 機能研究分野 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆ Dicer タンパク質は、ウイルスなどに由来する異常な長い二本鎖 RNA (注 1) を切断することによって、小さな RNA を作り出し、標的となるタンパク質の合成を抑えます。この現象は RNA 干渉と呼ばれます。
- ◆ 今回、1 分子イメージング技術を駆使することによって、代表的なモデル動物であるショウジョウバエの Dicer-2 が長い二本鎖 RNA を切断する様子を直接とらえることに成功しました。
- ◆ その結果、Dicer-2 は、RNA の末端構造やパートナータンパク質の有無にかかわらず、二本鎖 RNA を連続的に切断することによって、効率の良い切断が達成されていることが明らかになりました。
- ◆ 本成果は RNA 干渉 (注 2) の分子メカニズムの理解を深め、生命科学研究や RNA 創薬 (注 3) を促進することが期待されます。

3. 発表概要：

ウイルスの一部は、自己の増殖のために二本鎖 RNA を作り出します。これに対抗して、感染した細胞側も RNA 干渉という機構を用いて、ウイルス由来の二本鎖 RNA を異常なものと認識し、それを壊そうとします。この RNA 干渉は、原始的な免疫機構としてはたらいっているだけでなく、人工的に応用することによって、ねらった特定の RNA を壊して遺伝子の発現を抑える手法として、生命科学研究や RNA 創薬に広く利用されています。今回、東京大学定量生命科学研究所の永沼政広助教 (研究当時)、泊幸秀教授、上海科技大学の多田隈尚史助理教授の研究チームは、1 分子イメージング技術 (注 4) を用いて、昆虫において二本鎖 RNA を切断する Dicer-2 がはたらく様子を直接観察することに世界で初めて成功しました (図 1)。その結果、Dicer-2 は、RNA の末端構造の違い (図 2) やパートナータンパク質である Loqs-PD の有無に関わらず、連続的に長い二本鎖 RNA を切断することで、効率的な切断が達成されていることが明らかになりました (図 3)。本成果は、細胞が RNA 干渉を介してウイルスなどに対抗するしくみの理解だけでなく、生命科学研究や RNA 創薬の発展を促進することが期待されます。

4. 発表内容：

多くのウイルスの増殖には、ゲノム RNA の複製が必要であり、その際には長い二本鎖 RNA が合成されます。細胞の中では、RNA は通常一本鎖の状態で存在しているため、二本鎖の RNA は異常なものと認識され、RNA 干渉というしくみによって排除されます。RNA 干渉において、Dicer

タンパク質はウイルスなどに由来する長い二本鎖 RNA を切断し、小さな RNA 断片を作り出します。さらに、小さな RNA はアルゴノートと呼ばれるタンパク質に組み込まれ、その配列をもとに一本鎖の標的 RNA（ウイルスの場合はゲノム RNA そのもの）を認識して切断し、タンパク質の発現を抑制します。このように、Dicer による長い二本鎖 RNA の認識と切断は、RNA 干渉の最初のステップとしてはたらくため、そのしくみを理解することは非常に重要です。

二本鎖の RNA は、その末端の形状によって、両鎖の長さが同じ「平滑末端」と、片方の鎖が飛び出ている「突出末端」の 2 種類に分けられます（図 2）。これまでの研究から、ショウジョウバエの Dicer の 1 つである Dicer-2 は、平滑末端の二本鎖 RNA を好んで切断し、突出末端をもつ二本鎖 RNA の切断は苦手であることが分かっていました。そして、この好みの差は、Dicer-2 の切断様式の違いによるものだと考えられてきました。すなわち Dicer-2 は、平滑末端の場合には二本鎖 RNA を連続的に切断するのに対し、突出末端の場合は、1 回切断したら二本鎖 RNA を手放し、再び結合して切断するというのを逐次的に繰り返す、というモデルが提唱されていました。また、Dicer-2 には、Loqs-PD と呼ばれるパートナータンパク質が存在し、Dicer-2 が苦手な突出末端を切断しやすくすることが知られており、その際には逐次的な切断様式から連続的な切断様式に切り替わっていると考えられてきましたが、直接的な証拠はありませんでした。そもそも従来の生化学的な方法では、切断様式の区別が困難であり、Dicer-2 の二本鎖 RNA 切断の具体的なしくみは、大きな謎に包まれていました。

今回、研究チームは、Dicer-2 や長い二本鎖 RNA に蛍光分子（注 5）を導入することによって、Dicer-2 が長い二本鎖 RNA を切断する様子を、分子一つ一つのレベルでリアルタイム観察することに初めて成功しました（図 1）。その結果、平滑末端の場合には、これまでに提唱されていたように Dicer-2 が二本鎖 RNA を連続的に切断している様子をとらえることができました。一方、予想に反して、突出末端においても、二本鎖 RNA が連続的に切断されている様子が観察されました。しかし、突出末端は平滑末端と比べて Dicer-2 が二本鎖 RNA をつかまえる頻度が低く、この単純な結合頻度の差が平滑末端と突出末端での切断されやすさの違いを生んでいることが分かりました。また、パートナータンパク質である Loqs-PD は、これまで言われていたように突出末端に対する切断様式を逐次的なものから連続的なものに切り替えているという訳ではなく、Dicer-2 が突出末端の二本鎖 RNA をつかまえる頻度を単純に向上させることで、Dicer-2 が苦手とする部分を克服していることがわかりました（図 3）。

このように Dicer-2 は、RNA の末端構造の違いやパートナータンパク質である Loqs-PD の有無にかかわらず、長い二本鎖 RNA を連続的に切断することにより、効率の良い切断が達成されていることが明らかとなりました。これらの結果は、Dicer-2 が長い二本鎖 RNA を切断し小さな RNA を作り出すという、RNA 干渉の重要な第一段階の分子メカニズムの理解を大きく深めるものであり、生命科学研究や RNA 創薬を促進することが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名： *Nature Communications*

論文タイトル： Single-molecule analysis of processive double-stranded RNA cleavage by *Drosophila* Dicer-2

著者： Masahiro Naganuma, *Hisashi Tadakuma, and *Yukihide Tomari (*責任著者)

DOI 番号： 10.1038/s41467-021-24555-1

URL： <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24555-1>

6. 問い合わせ先：

東京大学定量生命科学研究所 RNA機能研究分野

教授 泊 幸秀 (とまり ゆきひで)

電話: 03-5841-7839

E-mail: tomari@iqb.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) RNA：

Ribonucleic acid の略で、リボ核酸とも表記されます。一般的に良く知られているメッセンジャー RNA は、DNA がもつ遺伝情報を写し取った一本鎖 RNA であり、タンパク質を作るための設計図として働きます。一方、ウイルスの中には DNA の代わりに RNA を遺伝情報として持つものがあります。そのようなウイルスの増殖の際には、遺伝情報である RNA の複製が行われることで二本鎖 RNA が作られます。

(注2) RNA 干渉：

長い二本鎖 RNA が小さな RNA を生み出し、その配列に対応する特定の遺伝子からのタンパク質合成を抑える現象で、RNA interference (RNAi) とも呼ばれます。1998 年に線虫で発見されて以来、現在までにヒトを含む様々な真核生物で RNA 干渉が起きることがわかっています。

(注3) RNA 創薬：

RNA を医薬品として使おうとする試み。最近、RNA 干渉を利用することによって、これまで難しかった病気を治療するための医薬品が開発され、日本でも承認されています。しくみは異なりますが、COVID-19 の mRNA ワクチンも RNA 創薬の 1 つです。

(注4) 1分子イメージング技術：

一つ一つの分子を選択的に可視化し、観察する技術のこと。今回の実験では、全反射蛍光顕微鏡を用い、Dicer-2 による二本鎖 RNA 切断の様子を観察しました。

(注5) 蛍光分子：

ある特定の波長の光 (励起光) を吸収し、その光よりも長い波長の光 (蛍光) を放出する分子を

蛍光分子と呼びます。蛍光分子を使って目印をつけることで、タンパク質や DNA、RNA など細胞を作る部品の位置や動きについて、顕微鏡を用いて調べることができるようになります。今回の実験では、Dicer-2 と、切断される二本鎖 RNA それぞれに、2 種類の異なる色の蛍光分子を化学的に結合させることで、Dicer-2 による二本鎖 RNA 切断の様子を観察しました。

8. 添付資料：

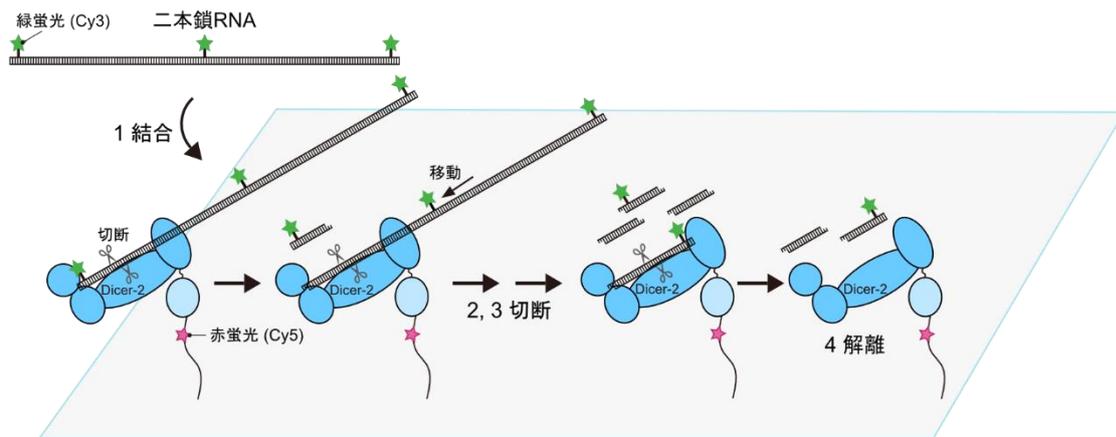


図1 二本鎖 RNA を切断する Dicer-2 の 1 分子観察

Dicer-2 に赤色蛍光 (Cy5) を、二本鎖 RNA の 3 箇所緑色蛍光 (Cy3) を導入しました。Dicer-2 による二本鎖 RNA の切断の過程は以下の 1~4 のように観察されます。

1. 結合によって、Dicer-2 の赤と二本鎖 RNA の緑が重なって観察される。
- 2, 3. 切断が進むに従って緑の蛍光強度が減少する。
4. 解離によって緑と赤が消失する。

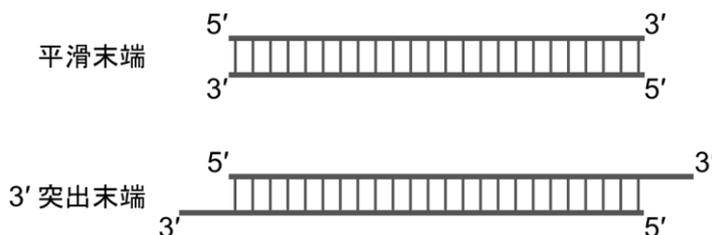


図2 平滑末端と突出末端の二本鎖 RNA の模式図

「平滑末端」は二本の RNA の端が揃っているが、「3' 突出末端」は二本鎖 RNA の端に一本鎖領域が突出しています。5'、3' は RNA 鎖の方向性を表します。

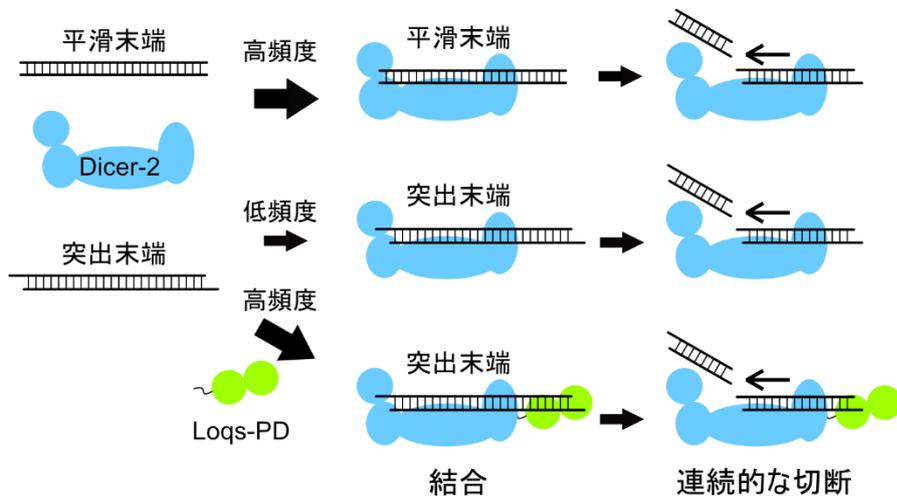


図3 Dicer-2 と Loqs-PD による二本鎖 RNA 結合切断モデル

「平滑末端」の二本鎖 RNA は「突出末端」の二本鎖 RNA より高頻度に Dicer-2 に捕まえられ (結合)、連続的に切断されます。Loqs-PD は二本鎖 RNA の Dicer-2 への結合頻度を高めます。