

令和元年6月6日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07246

研究課題名(和文)小分子RNAをガイド鎖とするDNAサイレンシング機構の解明

研究課題名(英文)Research for the mechanism of DNA silencing using small RNA as a guide strand

研究代表者

三好 智博(Miyoshi, Tomohiro)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60534550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodobacter sphaeroidesのArgonaute (RsAgo) は、小分子RNAをガイド鎖としてターゲットDNAに配列特異的に結合する機能を持つ。RsAgoは、新たな遺伝子解析技術の開発に關与する重要なタンパク質であり、本研究では、RsAgoの(1)ガイド鎖の選択メカニズム、(2)各ドメイン構造が核酸認識・機能に与える影響、(3)DNAサイレンシングの機能的役割、に關して新しい成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在治療が困難である難治性疾患に対して、その原因遺伝子の発現を抑制することで根治治療となり得るのではないかと期待されている。すなわち、RNA-guided DNA interferenceは、小分子RNAにより配列依存的に希望する分子の細胞内での遺伝子発現を特異的に抑制する方法であり、その効果を持つ小分子RNA自体は開発が容易なため究極のテーラーメイド医薬として期待できる。本研究で得られる結果は、RNA干渉では不可能である「塩基配列特異的なDNAサイレンシング機構」の応用によるテーラーメイド医薬の開発を進める上で特に重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Argonaute (RsAgo) of Rhodobacter sphaeroides binds in a sequence-specific manner to a target DNA using small RNA as a guide strand. RsAgo is an important protein involved in the development of new gene analysis technology. In this study, the new results were obtained regarding (1) guide strand selection mechanisms of RsAgo, (2) the influence of each domain structure on nucleic acid recognition and function, and (3) the functional role of DNA silencing.

研究分野：分子生物学

キーワード：Argonaute small RNA DNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

これまでタンパク質をコードしない 20 塩基程度の小分子 RNA は、細胞の中で生理的活性を持たないと考えられていたが、実は重要な機能を持っていることが、「RNA 干渉」という現象を通して明らかにされた。RNA 干渉は、まず長い 2 本鎖 RNA が Dicer 複合体によって約 20 塩基長にプロセッシングされ siRNA (small interference RNA) の生合成が行われる。その後、この siRNA は Argonaute に取り込まれ、siRNA の配列に相補的な塩基配列を持つ mRNA と特異的に対合・切断することによって遺伝子発現を制御する。この RNA 干渉マシナリーは、ウイルス感染等の自己防衛システムとしてだけでなく、レトロトランスポゾンの抑制によりゲノムの安定性にも寄与していることが明らかになった。また、ヘアピン構造を形成する内在性 RNA から生成される microRNA (miRNA) と呼ばれる小分子 RNA も、生体内で多数発現しており、多くの遺伝子の発現調節に関わっている。これまで申請者らは、上述した Dicer 及び Argonaute 複合体の機能解析により、siRNA と miRNA の生合成・作用機構の分子メカニズムの数々を明らかにしてきた。

このように、Argonaute に結合した小分子 RNA が真核生物特有の高次生命現象を複雑にコントロールする重要な役割を備えていることが明らかになってきた。そして、上記の siRNA や miRNA と呼ばれる小分子 RNA は、真核生物特有の小分子 RNA であり、原核生物には存在しないものだと考えられてきた。しかし近年、光合成細菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) の Argonaute (RsAgo) に DNA と RNA の両方の核酸が結合し、新規メカニズムで機能している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

RNA 干渉 (RNA interference) は、小分子 RNA をガイド鎖として、その塩基配列特異的にターゲット RNA を分解する生体内メカニズムである。この RNA 干渉は、真核細胞に特有の機構であり、Argonaute タンパク質がその作用機序の中核を担っている。一方、原核生物にも Argonaute は存在するが、その機能は未解明のままであった。これまでの申請者らの光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の Argonaute (RsAgo) 複合体の構造解析と生化学的解析により、小分子 RNA をガイド鎖として、その塩基配列依存的に標的 DNA と結合することを明らかにした。これらの結果から原核生物の Argonaute が小分子 RNA の配列依存的に DNA interference を誘導することが示唆された。本研究の目的は、RsAgo の DNA interference のメカニズムの詳細を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) RsAgo のガイド鎖の選択的結合の解析

RsAgo に結合するガイド RNA 鎖は、RNA-guided DNA interference システムのトリガーとなる重要な核酸分子であるが、その生合成経路に関する知見は皆無である。しかし、構造解析の結果から、RsAgo には、ガイド鎖の 5' 末端のウラシル塩基を特異的に認識する機構が備わっていることを示唆する結果が得られている。5' 末端の塩基が U (ウラシル) である RNA が特異的にガイド鎖として RsAgo に結合することを実際に確認するために、5' 末端に U 以外の G (グアニン), A (アデニン), C (シトシン) の塩基を持つ RNA と RsAgo の結合力を比較検討する必要がある。当結合実験は、3' 末端に蛍光標識 (FITC) を行い、蛍光偏光度測定法により RsAgo への結合力を評価する。

(2) RsAgo の核酸認識に与える各ドメイン構造の重要性について

申請者は、これまでに RsAgo の機能発現状態における核酸との複合体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにした。本研究では、得られた立体構造から推察される RsAgo の機能の詳細を、生化学的実験で解明することにより、RNA-guided DNA interference マシナリーの全貌を明らかにする。Argonaute は、基本的に N, PAZ, MID, PIWI と呼ばれる4つの機能ドメインで構成されている。真核型 Argonaute の Nドメインは、ガイド鎖/ターゲット鎖間の塩基対合を解離させる機能を持つ (Kwak & Tomari, *Nat. struct. Mol. Biol.*, 2012, 19, 145-151)。しかし、RsAgo の Nドメインは、ガイド鎖/ターゲット鎖間の塩基対合を安定化させているように見える。その他の各ドメインの特徴と機能との関連性を調べるために、RsAgo の変異体を作製して機能への影響を解析する。さらに、各種 RNA と DNA のキメラ型核酸を用いて、RsAgo の核酸の種類を識別している領域に関して詳細を明らかにする。

(3)RsAgo の DNA サイレンシングの機能的役割

RNA-guided DNA interference マシナリーの詳細は、まだ明らかになっていない。RsAgo の機能を明らかにするために、RsAgo が発現していない細胞にタンパク質を発現させて、その効果を観察する。真核生物では、Argonaute はウイルス感染からの自己防衛システムとして機能することが示されていることから、原核生物の Argonaute も同じような機能を持つのではないかと考えられる。そこで、バクテリア特異的に感染するウイルスであるバクテリオファージを感染させることにより、RsAgo の効果を検証する。

4. 研究成果

(1)RsAgo のガイド鎖の選択的結合の解析

蛍光偏光度測定法を用いて RsAgo と核酸の結合を解析した結果、RsAgo と RNA との結合は、 $K_d=0.91(\text{nM})$ であった。一方、DNA との結合は、 $K_d=42.6$ で非常に弱いことから、RsAgo は、ガイド鎖として RNA を認識することが明らかとなった。また、5'末端がリン酸化されていない場合、 $K_d=1,144$ であり、RsAgo に全く結合しなかった。さらに、5'末端の塩基を U,A,C,G に置換して、RsAgo との相互作用を調べた結果、U に比べて他の塩基では、明確な結合力の減少が観察された。これらの実験結果から、ガイド鎖の 5'末端は、RsAgo との結合に非常に重要であることが示された。

(2)RsAgo の核酸認識に与える各ドメイン構造の重要性について

MID/PIWIドメインとの相互作用の重要性を解析するために、RNAとの相互作用部位にアミノ酸変異の導入を行った。RsAgo の変異体解析の結果、ガイド鎖の 1 塩基目と 2 塩基目のリン酸基の認識が特に重要であることがわかった。

RsAgo の Nドメインは、ターゲット DNA と相互作用している。この相互作用の重要性を探るために、Nドメイン変異体を作成して RsAgo の機能解析を行った。Nドメインの変異体では、優位に機能が低下していることが示された。また、Nドメイン変異体では、ターゲット DNA と RsAgo との結合力が低下していることが明らかとなった。この結果から、RsAgo とターゲット DNA の安定的な結合に Nドメインが関わっていることが明らかとなった。また、PAZドメインのガイド鎖 RNA の相互作用部位に変異を導入した解析では、RsAgo の機能に PAZドメインとガイド RNA との相互作用が必要であることが示された。

Argonaute タンパク質は、非常に広い範囲で核酸と相互作用することから、核酸の種類 (RNA もしくは DNA) をどうやって認識しているのか不明である。申請者は、DNA と RNA のキメラ型核酸を多数作成して、それぞれの核酸が RsAgo に認識されるかどうかを、ゲルシフト法で確認した。RsAgo との結合が見られたキメラ型核酸は、全てに共通してガイド鎖 5'側が RNA であり、ターゲット 3'側が DNA であること

が示された。この生化学的な解析結果と立体構造解析の結果を統合することにより、RsAgo の L2 リンカー領域に核酸認識に重要な部位が見出された。以上の結果から、Argonaute のタンパク質成分と結合する核酸成分の両方向からの機能解析に成功し、複雑な RsAgo の分子メカニズムを明らかにすることができた。

(3) RsAgo の DNA サイレンシングの機能的役割

バクテリア特異的に感染するウイルスであるバクテリオファージを感染実験により、RsAgo の生理的な機能を検証した。Argonaute が発現していない大腸菌に RsAgo を発現させて、原核生物のウイルスであるバクテリオファージの感染実験を行った。T4 ファージの感染実験では、RsAgo の発現によりファージ感染の拡大が見られた。一方、T7 ファージを感染させた時には、RsAgo の発現による大きな影響は見られなかった。さらに、RsAgo の発現により、感染が抑制されるファージも見つかっている。以上のことから、RsAgo の機能は、ファージの種類により異なることが示された。これらのことから、RsAgo は、バクテリオファージの感染機構に大きく関与していることが示された。

以上の結果から、RsAgo の構造的知見が生化学的解析により証明され、新たな Argonaute の機能部位や、メカニズムが明らかとなった。今後、RsAgo の細胞内の生理的なメカニズムに着目した実験を行っていく上で必要不可欠で非常に重要な研究成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Miyoshi T. (2018) Nucleic Acid-Binding Assay of Argonaute Protein Using Fluorescence Polarization. *Methods Mol Biol.* 1680:123-129. 査読有
- ② Murakami R, Singh CR, Morris J, Tang L, Harmon I, Takasu A, Miyoshi T, Ito K, Asano K, Uchiumi T. (2018) The Interaction between the Ribosomal Stalk Proteins and Translation Initiation Factor 5B Promotes Translation Initiation. *Mol Cell Biol.* 38(16). pii: e00067-18. 査読有
- ③ Imai H, Abe T, Miyoshi T, Nishikawa SI, Ito K, Uchiumi T. (2018) The ribosomal stalk protein is crucial for the action of the conserved ATPase ABCE1. *Nucleic Acids Res.* 46(15):7820-7830. 査読有
- ④ Honda T, Imai H, Suzuki T, Miyoshi T, Ito K, Uchiumi T. (2017) Binding of translation elongation factors to individual copies of the archaeal ribosomal stalk protein aP1 assembled onto aP0. *Biochem Biophys Res Commun.* 483:153-158. 査読有
- ⑤ Murakami R, Miyoshi T, Uchiumi T, Ito K. (2016) Crystal structure of translation initiation factor 5B from the crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. *Proteins.* 84(5): 712-717. 査読有
- ⑥ Miyoshi T, Ito K, Murakami R, Uchiumi T. (2016) Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat. Commun.* 7: 11846. 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 三好智博、中田智是、大毛将吾、植野裕司、浮田英彦、高坂怜子、吉成伸夫、吉田明弘：“唾液中の溶血性細菌の解析” 第 2 回オーラルサイエンス研究会，2018 年 11 月

- ② 三好智博、中田智是、大毛将吾、植野裕司、浮田英彦、高坂怜子、吉成伸夫、吉田明弘：“歯周疾患と *Gemella* の関連性” 第 101 回日本細菌学会関東支部総会， 2018 年 11 月
- ③ 三好智博：“Argonaute タンパク質の新規構造基盤の解明” 第 1 回オーラルサイエンス研究会 2017 年 10 月
- ④ 三好智博：“微生物における Argonaute の新機能” 第 5 回五大学微生物研究会， 2017 年 9 月
- ⑤ 三好智博：“細菌 Argonaute の RNA-guided DNA interference” 第 11 回細菌学若手コロッセウム， 2017 年 8 月
- ⑥ 三好智博：“光合成細菌で明らかとなった DNA サイレンシング機構” 第 2 回光合成細菌ワークショップ， 2017 年 3 月
- ⑦ Miyoshi T., Ito K., Murakami R., Uchiumi T. “A possible mechanism for small RNA processing by *R. sphaeroides* Argonaute” The 21st Annual Meeting of the RNA Society 2016 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊東 孝祐

ローマ字氏名：Ito Kosuke

所属研究機関名：新潟大学

部局名：自然科学研究科

職名：助教

研究者番号（8 桁）：20502397

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。