

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21570178

研究課題名（和文）TGS 誘導における AGO-siRNA 複合体の標的 DNA 結合性の生化学的解析

研究課題名（英文）Biochemical analysis of the AGO-siRNA complex about DNA binding activity to induce the TGS (Transcriptional Gene Silencing).

研究代表者

石田 尚臣 (ISHIDA TAKAOMI)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：80293447

研究成果の概要（和文）： 研究代表者らの研究グループはこれまでに HIV プロモーター領域に設定した siRNA がウイルスの複製を抑制する事を明らかにし、またその抑制活性は転写抑制（TGS）にある事を証明してきた。siRNA による転写抑制は AGO1-siRNA 複合体形成にある事を証明し、その複合体は直接標的 DNA に結合しうる事を証明した。この配列結合性は、来はめて特異性が高い事を明らかにし、またその結合は、siRNA, HIV-1（標的配列）の共存在下で認められる事を証明した。

研究成果の概要（英文）： Our research group previously published data demonstrate that of siRNA targeting conserved regions of the untranscribed HIV-1 promoter region, a single dose of either Prom A siRNA induced prolonged and profound suppression of HIV re-production. Definitive evidence of transcriptional silencing (TGS) was provided to this repression of HIV reproduction by several assays. There is accumulating evidence the Argonaute family of siRNA binding proteins, play a pivotal role in siRNA induced TGS. In TGS Ago1 protein accumulates at the site of initiation of silencing. To explore the role of Ago1 in siRNA induced TGS of HIV-1, in vitro binding assay was established for detecting AGO1-siRNA complex can be bind to target DNA. This assay system clearly demonstrated that these complex can bind directly to target DNA sequence. AGO1 protein was co-localized with siRNA when the cells infected HIV-1 by immune-staining assay. We also demonstrated that these TGS effects are dependent upon close matching between the siRNA and the target sequence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写、TGS

1. 研究開始当初の背景

| 研究代表者は、ヒトレトロウイルスの潜伏感

染とエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が密に関係していることを明らかにしてきた。ヒト成人 T 細胞性白血病ウイルス (HTLV-1) は、長期の潜伏期を経てヒトに白血病を惹起するウイルスである。長期の潜伏化は臨床的潜伏期の他 (無症候)、ウイルス遺伝子の発現が全く検出されないウイルス学的潜伏感染でもある。すなわち、感染ウイルスは転写を強く抑制された状態で不活化されている。このプロウイルスの不活化がウイルス遺伝子の発現制御を行う LTR 領域の強固なメチル化による事を明らかにした。この強固な DNA メチル化は、プロウイルス両端に同一配列同一方向に存在する LTR の 5' 末端選択的であることも明らかにした。LTR の DNA メチル化の分子機構についての解析途中、HTLV-1 遺伝子産物である p40Tax が、転写抑制に関わるヒストン H3K9 メチル化酵素 Suv39H1 と物理的に相互作用する事を明らかにした。P40Tax はウイルス自身の転写を強力に促進する因子として機能するが、感染初期に一過性に発現が上昇した後、ヒストンめとるか酵素等転写抑制因子群と会合し、LTR 上に転写抑制複合体を形成するのではないかと考えられた。作業仮説として研究代表者は、H3K9 のメチル化はその後 DNA メチル化酵素の足場形成を誘導し、LTR の強固なメチル化を誘導するのではないかと考えている。一方、ヒトに感染するもう一つのレトロウイルスである HIV-1 もまた同様に、一部の感染細胞はプロウイルスを不活化することで潜伏感染細胞群を形成すると考えられる。HTLV-1 と同様の手法を用いて解析すると、明らかに 5'-LTR 選択的メチル化が認められた。しかし、ヒト感染者末梢血やサル感染個体の検体を用いた解析ではメチル化 LTR を検出することはできなかった。培養細胞系を用いた解析では抑制型ヒストンメチル化による転写活性の抑制が認められたことから、HIV-1 の場合、in vivo においてはヒストンの化学修飾が潜伏感染に重要な役割を阿多している事が示唆された。

遺伝子のコードされていない RNA、いわゆる non-coding RNA が遺伝子発現の時間的・空間的制御を行う事が明らかにされてきた。小分子二重鎖 RNA を用いることにより、人為的に遺伝子の不活化を行う事が可能である。この小分子 RNA (siRNA) の機能には不明な点が多い。要約すると以下ようになる。

(1) 遺伝子の不活化には転写そのものと mRNA 分解や翻訳阻害を介して制御するものと大きく 2 通りに制御方式があるとされる。mRNA 分解や、翻訳阻害は転写後に機能する干渉なので、post-transcriptional gene silencing (PTGS) と呼ぶ。(2) siRNA の

相補的配列が、分解される mRNA や翻訳阻害する標的特異性を発揮している。(3) mRNA の分解には Argonaute (AGO) と呼ばれる分子が重要な機能を果たしている。siRNA を保持し標的 mRNA の切断する (slicer) 活性を有する。ヒトでは 1-4 までのファミリーを形成し、slicer 活性を有するのは AGO2 のみである。(4) 転写阻害活性を誘導することを、Transcriptional gene silencing (TGS) と呼び、TGS に関する分子機構は PTGS ほど明らかにされていない。標的遺伝子プロモーター領域に siRNA の配列を設定し、標的配列近傍にヒストンの化学修飾 (特に H3K9 や K27 メチル化) や DNA メチル化を誘導する事が明らかになって居る一方で、siRNA を保持した AGO 複合体 (RNA-induced transcriptional gene silencing (RITS) complex) が直接標的配列に結合している可能性やその複合体中にヒストン化学修飾荷か変る因子が会合している事等は未だに明らかにされていない。対 HIV 戦略として mRNA の分解や翻訳阻害を誘導する RNAi が試みられ、いくつか報告が成されているが、予想される通り、HIV-1 の性質としての易変異性から、いずれの RNAi に対しても耐性ウイルスが出現し長期の複製抑制には成功していない。従って PTGS の誘導では HIV の複製抑制は困難であると考えられている。そこで、TGS を人為的に誘導し、潜伏化を誘導する事が可能であれば、ウイルス複製を抑制する事が可能ではないかとの仮説を基に、プロモーター標的 siRNA の応用をシドニーセントヴィンセント病院の鈴木博士らと共同研究を開始した。これらの実験からプロモーター標的 siRNA は HIV-1 ウイルスの複製を抑制し、これらは点差 y 抑制を介した抑制である事が明らかとなった。さらに転写抑制は DNA のメチル化、ヒストンのメチル化等のエピジェネティクス制御による事もあきらかにした。

2. 研究の目的

上述した研究背景を基に、研究代表者は、siRNA を介した TGS 誘導時における HIV の長期抑制を TGS の分子機構解明の有効な実験系とし、(1) 生命科学現象の根幹をなす転写制の調節機構として、siRNA-AGO 複合体による制御がどのような分子機構によってもたらされるのか。(2) その応用としての HIV-1 複製の長期抑制の分子機構について。(3) siRNA-AGO 複合体とエピジェネティクス制御因子群との関わり (クロマチン構造制御)。以上 3 点を研究の柱とし等が医研究では主に (1) の「生命科学現象の根幹をなす転写制の調節機構として、siRNA-AGO 複合体による制御がどのような分子機構によってもたらされるのか」について、HIV-1

複製の長期抑制系を実験系として明らかにする事を目的とする。
 当該研究は、以下5点を青木等かにする事を目標とした。

- (1) Argonaute 蛋白質は、保持した siRNA の相補鎖を利用して標的 DNA に結合する事。
- (2) 標的 DNA に結合した argonaute 蛋白質複合体は、近傍のヒストン化学修飾に関わる酵素群を含む事。
- (3) 4種あるヒト argonaute 蛋白質の TGS に対する役割について。
- (4) 標的配列に対する siRNA の相補性について、その特異性を決める領域の同定。
- (5) 応用研究として臨床検体を用いた HIV-1 ウイルス再活性化の抑制の可否について。

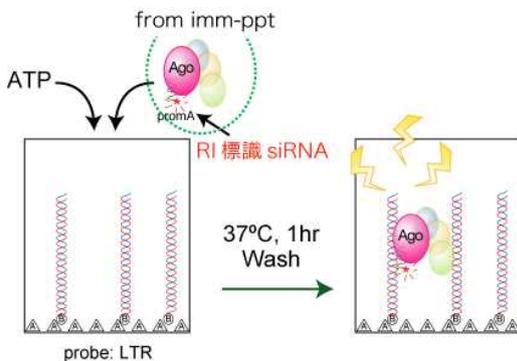
3. 研究の方法

上記5点を明らかにするため、当初研究代表者は、以下のような研究計画を立案した。

(1) Argonaute を強制発現させ、そこに RI 標識した siRNA を導入し、核抽出液から Argonaute 蛋白質を免疫沈降する。抗原ペプチドにて抗体から、Argonaute 複合体を溶出し、放射活性を測定して in vitro において、標的 DNA に結合する実験系を構築し (in vitro binding assay)、標的 DNA に対する結合能について評価する。

(2) (1)で完成させた in vitro binding assay 系を用いて AGO1 から AGO4 の siRNA の核における結合性、標的 DNA に対する結合性について検討を加え、4種ある Argonaute 蛋白質の TGS における機能について考察する。

(3) (1)で完成させた in vitro binding assay 系を用いて、配列変異を加えた siRNA を複数準備し、assay 系に加え、AGO 蛋白質が siRNA を保持する配列特異性について考察する。さらに、in vitro binding assay 時に用いる標的 DNA 配列にも変異を加え、標的 DNA に対する配列特異性についても考察を加える。



In vitro binding assay

- (1) AGO 強制発現細胞に RI 標識した siRNA を導入し、核抽出液を得る。
- (2) 核抽出液から AGO 複合体を免疫沈降し、抗原ペプチドを用いて AGO 複合体をビーズよ

り溶出する。

- (3) 溶出された AGO 複合体をあらかじめ標的 DNA を固相化した 96 穴プレートに加える。ATP を加え反応を開始し、37°C で 1 時間加温する。
- (4) 3 階の洗浄の後、残存する放射活性を定量する。

(4) AGO 複合体中のヒストンメチル化活性についての評価は、in vitro Methyltransferase assay 系を樹立して検討を加える。

4. 研究成果

HIV-1LTR 標的 siRNA が 1 年以上の長期間、ウイルスの複製を抑制し、その抑制がエピジェネティクス制御を介した転写抑制に起因する事を証明した (図 1. Yamagishi M, Ishida T. et al., 2009 Microb Inf.)

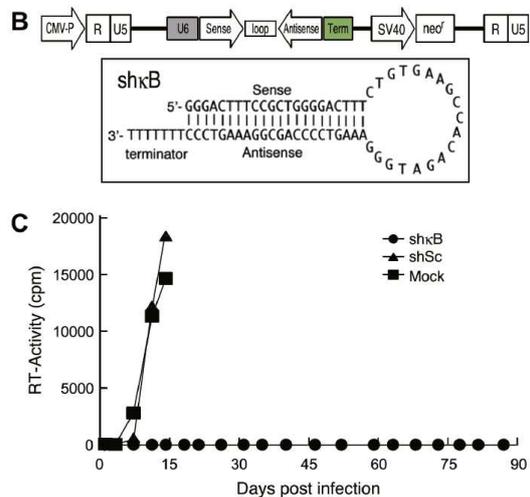


図 1. 細胞内発現させたヘアピン型 siRNA の構造と HIV-1 の複製抑制

siRNA が作用している HIV-1 LTR 上に siRNA を作用させた時にのみ AGO1 が LTR 上に集積していることを証明し (図 2)、in vitro binding assay 系を樹立するため、RI 標識した siRNA の AGO 結合性を確認し、に siRNA と AGO1 は共局在する事を明らかにした。また、AGO1 に結合する siRNA は主に antisense 鎖である事を確認した (図 3) (Ishida T. unpublished)

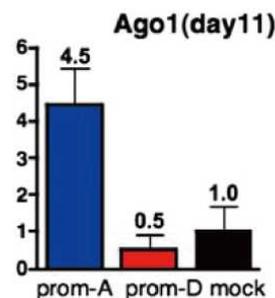


図2. siRNA 導入後 1 1 日目における HIV LTR 上の AGO1 蛋白質をクロマチン免疫沈降し、promA (複製抑制可能なプロモーター標的 siRNA) を作用させたときのみ、LTR 配列が確認できた。

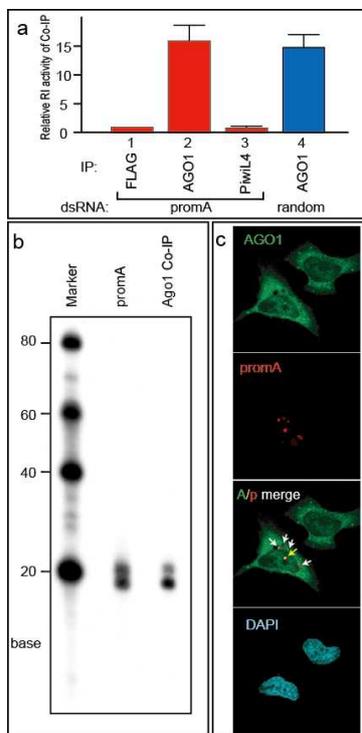


図3. 免疫沈降法を用い RI 標識した siRNA と AGO1 の結合を確認した (A)。AGO1 に結合する siRNA は主に antisense 鎖であり (B)、siRNA と AGO1 は核内で共局在する事を明らかにした。

in vitro binding assay 系の樹立を試み、AGO1-siRNA 複合体が LTR DNA に直接結合しうる事を証明した (図4. Ishida T. unpublished)

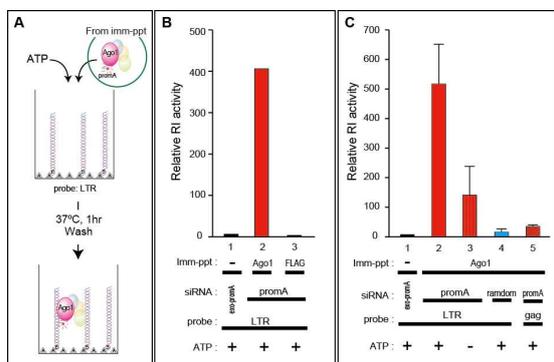


図4. AGO1-siRNA 複合体は LTR 配列に直接結合する。(A). 実験の模式図。(B). AGO1-promA siRNA の結合複合体のみが LTR 標的配列に結合できる、(C). DNA に結合する活性は ATP に

依存し、また標的配列特異性を有する。

In vitro binding assay 系の不利な点として大量の RI を必要とする事や核抽出液からの免疫沈降が主な実験操作であるため、多くのパラメータ (siRNA の様々な配列や標的 DNA 配列等) を同時に評価することが困難であった。このため、siRNA の配列特異性は、従来の HIV-1 複製抑制活性によって評価した (図5, Suzuki K. Ihida T et al., 2011. RNA boil.)

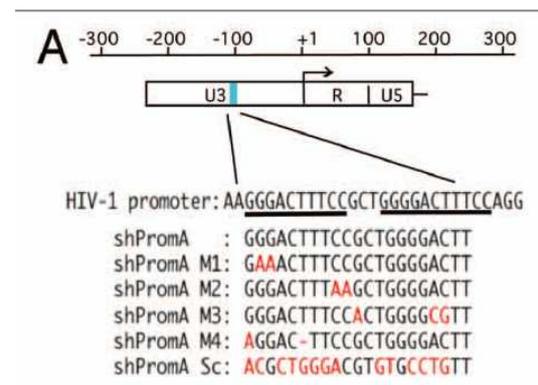


図5A. 配列特異性を考察する為に作製した、siRNA 配列変異 siRNA
下線部は NF-kB 認識配列部位を示し、配列中の赤字で示した塩基が変異塩基である。

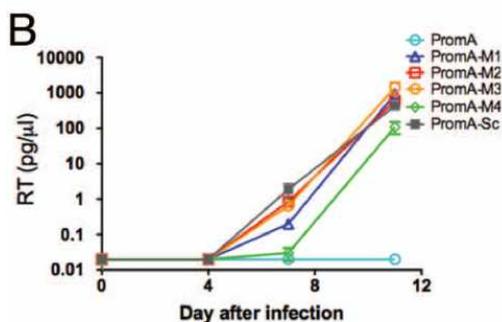


図5B. 変異 siRNA を用いて HIV-1 複製抑制活性を評価した。その結果用いた全ての変異 siRNA は HIV-1 の複製を抑制することができなかった。変異塩基のパターンから、TGS 誘導活性を有する siRNA は配列特異性が非常に高い事が示唆された。

次に、AGO1-siRNA 複合体の解析を行った。図4で明らかにした通り、AGO1-siRNA は核に局在する。一方で、従来の報告では AGO ファミリー蛋白質の核局在についての詳細な報告は無い。そこで、HIV 感染、非感染下での AGO1 蛋白質の局在性について実験を試みた。結果を図6に示す。

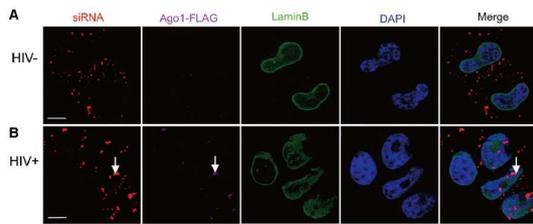


図 6. HIV-1 感染下 siRNA と AGO1 は核に共局在する。

HIV 感染下、siRNA (promA) と AGO1 蛋白質は核に共局在する事が明らかとなった。なお図には示さないが、AGO2 は核に共局在しない事が示されている。

次に、siRNA-AGO1 複合体を核から免疫沈降法によって精製し、その複合体中にヒストン化学修飾活性が含まれるかどうか *in vitro* Methyltransferase assay 系の樹立を試みたが、ヒストンメチル化活性の評価を行う事ができなかった。これは、*in vitro* でのメチル化活性を高感度で検出する事ができなかった為である。

また、研究期間内に計画を変更し、精製した AGO1-siRNA 複合体のプロテオーム解析を用いることによって、ヒストン化学修飾因子が含まれるか同定を試みたが、核抽出液からの複合体精製が、プロテオーム解析に必要な蛋白質量を確保できず、また収量をあげる工夫をすると、非得意的結合物が増加する事がわかり、現在まで、精製系を樹立することができていない。

生物活性を指標にしたアッセイ系を用いることによって、生物学的意義を保持した結果を評価する事が可能であるが、一方で、複雑な実験系の為に複数のパラメータ評価や、また精製等には大量の細胞培養が必要な事等困難な事柄が明らかとなった。今後、解析を進めるにあたり、さらに簡便な AGO-siRNA-DNA 結合活性を検討することが可能なアッセイ系の樹立するが望ましい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty DW, Watanabe T. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications

for retroviral replication.

Microbes Infect. 2013 Mar 27. doi:pii: S1286-4579(13)00064-6.

② Kobayashi-Ishihara M, Yamagishi M, Hara T, Matsuda Y, Takahashi R, Miyake A, Nakano K, Yamochi T, Ishida T, Watanabe T.

HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. Retrovirology. 2012 May 8;9:38.

③ Ahlenstiel CL, Lim HG, Cooper DA, Ishida T, Kelleher AD, Suzuki K.

Direct evidence of nuclear Argonaute distribution during transcriptional silencing links the actin cytoskeleton to nuclear RNAi machinery in human cells. Nucleic Acids Res. 2012 Feb;40(4):1579-95.

④ Suzuki K, Ishida T, Yamagishi M, Ahlenstiel C, Swaminathan S, Marks K, Murray D, McCartney EM, Beard MR, Alexander M, Purcell DF, Cooper DA, Watanabe T, Kelleher AD.

Transcriptional gene silencing of HIV-1 through promoter targeted RNA is highly specific. RNA Biol. 2011 Nov-Dec;8(6):1035-46.

⑤ Yamamoto K, Ishida T, Nakano K, Yamagishi M, Yamochi T, Tanaka Y, Furukawa Y, Nakamura Y, Watanabe T. SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. Cancer Sci. 2011 Jan;102(1):260-6.

⑥ Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, Ishida T, Semba K, Watanabe S, Yamaguchi N, Inoue J.

Epigenetic alteration of the NF- κ B-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. **Cancer Sci.** 2010. 101:2391-7.

⑦ Miyake A, Ishida T, Yamagishi M, Hara T, Umezawa K, Watanabe T, Horie R.

Inhibition of active HIV-1 replication by NF-kappaB inhibitor DHMEQ. Microbes Infect. 2010 May;12(5):400-8.

⑧ Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Cooper DA, Kelleher AD, Suzuki K, Watanabe T.

Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of

HIV-1 transcription.
Microbes Infect. 2009 Apr;11(4):500-8.

[学会発表] (計 10 件)

① Kazuo Suzuki, S Hattori, K Marks, C Ahlenstiel, M Millington, M Boyd, G Symonds, Takaomi Ishida, D Cooper, Seiji Okada, A Kelleher.

Promoter targeting small RNA suppresses HIV-1 infection in vivo.

20th Conference on retroviruses and opportunistic infections 2013.
March 3-6, 2013. Atlanta, USA.

② Takaomi Ishida, Kazuo Suzuki, Makoto Yamagishi, Ariko Miyake, David A Cooper, Anthony D. Kelleher and Toshiki Watanabe. The epigenetic regulation of HIV-1 virus gene expression

Cold Spring Harbor retrovirus meeting.
May 21-26, 2012. New York, USA.

③ Takaomi Ishida, Kazuo Suzuki, Makoto Yamagishi, Ariko Miyake, David A Cooper, Anthony D. Kelleher and Toshiki Watanabe The Epigenetic Regulation of HIV-1 Virus Gene Expression.

Keystone Symposia, Frontiers HIV Pathogenesis, Therapy and Eradication, March 26-31, 2012.

④ Takaomi Ishida, Kazuo Suzuki, Makoto Yamagishi, David A Cooper, Anthony D. Kelleher, Kentaro Semba, Tadashi Yamamoto, Aikichi Iwamoto and Toshiki Watanabe. *The Epigenetic Regulation of HIV-1 virus Gene Expression.*

The 7th Japan-China joint laboratory workshop pathogenesis, gene regulation, and signal transduction.
October 25, 2010. Beijing, China.

⑤ 鈴木一雄、服部真一郎、前田洋助、石田尚臣、David Cooper、岡田誠治、Anthony Kelleher.

プロモーター領域を標的とした siRNA は HIV-1 の増殖抑制を誘導する (in vivo の実験系による評価)

日本エイズ学会学術集会

2012 年 11 月 24-26 日 (横浜)

⑥ 松田 有加、山岸 誠、小林 美栄、原 拓馬、石田 尚臣、渡邊 俊樹

HIV-1 潜伏化の成立と維持における Polycomb group の機能解析

日本ウイルス学会学術集会

2012 年 11 月 13 -15 日 (大阪)

⑦ 小林(石原)美栄、山岸 誠、松田 有加、中野 和民、矢持 忠徳、石田 尚臣、渡邊 俊樹

HIV-1 由来 antisense RNA によるウイルス複製抑制メカニズムの解析

日本ウイルス学会学術集会

2012 年 11 月 13 -15 日 (大阪)

⑧ 小林美栄、山岸誠、原拓馬、松田有加、三宅在子、中野和民、石田尚臣、渡邊俊樹

HIV-1 由来新規 antisense RNA, ALe はウイルス増殖を抑制する

日本エイズ学会学術集会

2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)

⑨ 小林 美栄、山岸 誠、原 拓馬、松田 有加、三宅 在子、中野 和民、石田 尚臣、渡邊 俊樹

HIV-1 由来新規 antisense RNA, ALe の同定と機能解析

日本ウイルス学会学術集会

2010 年 11 月 7-9 日 (徳島)

⑩ 小林美栄、山岸 誠、原 拓馬、松田有加、三宅在子、中野和民、石田尚臣、渡邊俊樹 HIV-1 由来新規 antisense RNA, ALe はウイルス増殖を抑制する

日本エイズ学会学術集会

2010 年 11 月 24-26 日 (東京)

[図書] (計 1 件)

山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司編集
シグナル伝達キーワード
羊土社、2012 年 (335-343)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 尚臣 (ISHIDA TAKAOMI)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号 : 80293447

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者