

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670013

研究課題名(和文)核局在性非コードRNAの高効率ノックダウンに向けたAgo2の核移行メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of nuclear import mechanism of argonaute 2 for efficient knockdown of nuclear-localizing non-coding RNA

研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI, FUMINORI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70370939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNA干渉に必須の分子であるArgonaute (Ago)2の核移行メカニズムの解明を試みた。その結果、Ago2のある部位に変異を導入することで核移行が抑制されることが明らかとなった。さらに、その部位はあるタンパク質(タンパク質X)との結合に重要な領域であった。そこでタンパク質Xとの結合を免疫沈降法により検討したところ、タンパク質Xとの結合性を欠失した変異型Ago2は核への移行性を消失していた。またタンパク質Xをノックダウンすることで、Ago2の核移行が減弱した。従って、Ago2はタンパク質Xとともに核に移行していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to elucidate nuclear import mechanism of argonaute 2 (Ago2). Several Ago2 derivatives containing amino acid substitutions exhibited lower levels of nuclear accumulation, compared with wild-type Ago2. The Ago2 derivatives showing lower nuclear accumulation possessed the mutations which were important for association with protein X. We demonstrated by immunoprecipitation assay that the Ago2 derivatives showing lower nuclear accumulation exhibited low levels of association with protein X. In addition, siRNA-mediated knockdown of protein X resulted in reduction in nuclear accumulation of Ago2. These data indicate that Ago2 is imported to nucleus by being associated with protein X.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：Argonaute 2 RNA干渉 核移行 細胞内動態

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム・トランスクリプトーム解析により、ヒトゲノムからタンパク質をコードしない長さ 200 塩基以上の長鎖非コード RNA が数多く発現していることを明らかになってきた。長鎖非コード RNA は、クロマチン修飾因子など種々のタンパク質と複合体を形成し、転写制御など様々な機能を示すことから、タンパク質と同様、細胞機能の制御・維持において重要な因子であると言える。さらに一部の長鎖非コード RNA は、その発現が疾患と大きく関わっていることから、極めて重要な創薬ターゲットであり、その制御には標的 RNA を高効率に分解する siRNA に期待が寄せられている。しかし、長鎖非コード RNA の多くは核に局在するため、siRNA を用いて分解するには、siRNA のみならず RNA 切断活性を有する Ago2 も核に局在する必要がある。そこで申請者は、まず Ago2 の細胞内局在を検討したところ、Ago2 は細胞質のみならず核にも局在することを見出した。さらに siRNA を用いて、癌の浸潤・転移を関与することが知られている核局在性の長鎖非コード RNA である HOTAIR (Hox Transcript Antisense Intergenic RNA) をノックダウンすることに成功した。また最近、Ago2 が核内にてエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが報告されたことから、Ago2 が細胞質のみならず、核内にも存在していることは間違いないものと考えられる。しかし上記検討において核内 Ago2 量は細胞質内 Ago2 量の約 1/20 であること、HOTAIR のノックダウン効率が従来の mRNA に対するノックダウン効率と比較して低いことを考慮すると、高効率に核局在性の非コード RNA をノックダウンするには、より多くの Ago2 を核内に送達させる必要がある、そのためには Ago2 の核移行メカニズムを解明する必要がある。Ago2 は分子量 94 kDa であることから能動輸送により核移行していると予想されるが、Ago2 の核移行メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、Ago2 の核移行メカニズムを明らかにすることとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、Ago2 の核移行メカニズムを明らかにすることを目的とする。Ago2 の核移行メカニズムを明らかにすることで、核局在性の非コード RNA の高効率ノックダウン法の開発や、非コード RNA や Argonaute タンパク質によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型ならびに変異型 Ago2 の核局在性の検討

野生型 Ago2 の核局在性について検討するために、細胞を核画分と細胞質画分とに分離した。その後、Western blotting により各画

分における Ago2 量を評価した。また、細胞を固定後、抗 Ago2 抗体で処理したのち、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Ago2 の局在を観察した。

変異型 Ago2 の核局在性に関しては、N 末端に FLAG タグを付与した Ago2 発現プラスミドを作製するとともに、Ago2 の各ドメインにアミノ酸変異を導入した変異型 Ago2 発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドを HeLa 細胞に Transfection し、上記と同様に Western blotting ならびに免疫染色により Ago2 の細胞内局在を評価した。また核内から細胞質への移行に関与する CRM1 を阻害するレプトマイシン B (LMB) が Ago2 の細胞内局在に与える影響についても検討した。

(2) Ago2 の核移行に関与する Importin ファミリーの同定に関する検討

過去に Ago2 と相互作用することが報告されている Importin-8 を siRNA を用いてノックダウンした細胞における Ago2 の細胞内局在を、上記と同様に Western blotting ならびに免疫組織染色により検討した。

(3) 免疫沈降法による Protein X と変異型 Ago2 との結合に関する検討

FLAG タグを付与した野生型ならびに変異型 Ago2 発現プラスミドと、GFP タグを付与した Protein X 発現プラスミドを HeLa 細胞に Co-transfection した。その後、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降したのち、Protein X に結合している野生型および変異型 Ago2 量を Western blotting により評価した。

(4) Protein X ノックダウン時の Ago2 の核移行性に関する検討

Protein X を siRNA を用いてノックダウンした細胞において、上記と同様に Western blotting ならびに免疫染色により Ago2 の各局在性を評価した。

## 4. 研究成果

1) 野生型ならびに変異型 Ago2 の核局在性の検討

まず野生型 Ago2 の細胞内局在について Western blotting により検討したところ、細胞質画分のみならず、核画分においても Ago2 が検出された。回収されたタンパク質量からおおまかに計算すると、核には細胞質中の Ago2 量の 1/10 ~ 1/50 量の Ago2 が局在しているものと見積もられた。また免疫染色によっても Ago2 の核局在について検討したところ、主に細胞質において Ago2 が検出されたものの、核においても弱いながら Ago2 の局在が検出された。さらには、LMB を用いて核から細胞質への移行を阻害したところ、LMB 非作用時と比較して核に局在する Ago2 量が大きく増加した。本結果より、Ago2 は主には細胞質に存在するものの、核にも局在

すること、さらには核に移行した Ago2 は CRM1 によって再び細胞質に移行することが示された。

Ago2 はおもに N 末端部位、PAZ ドメイン、MID ドメイン、PIWI ドメインとに分けられる。またこれまでに、各ドメインにおいて RNA 切断活性や他のタンパク質との相互作用に重要なアミノ酸が明らかとなっている。そこでこれまでに Ago2 の機能に重要であることが報告されているアミノ酸に変異を加えた変異型 Ago2 発現プラスミドを作製した。さらには、in silico 解析によって Ago2 内において核移行シグナル(Nuclear localization signal; NLS) 活性を有することが予測される部位を探索し、その部位に変異を導入することで、核移行が抑制されるか検討した。まず、RNA 切断活性に重要な部位に変異を導入した Ago2 においては核移行性に変化は見られなかった。それに対し、microRNA を含む small RNA との結合に重要な部位に変異を導入した Ago2 においては、核移行が劇的に抑制されていた。Small RNA との結合に重要な部位に変異を導入した Ago2 は、計 3 種類作製したが、どれにおいても核移行が減少していた。また Ago2 は、Ago hook と呼ばれるモチーフを含むタンパク質と結合することが報告されている。そこで Ago hook との結合に重要な部位に変異を導入した変異型 Ago2 を作製し核移行性を検討したところ、この変異型 Ago2 においても核移行性が大きく抑制されていた。なお、NLS と予想された領域に変異を導入した Ago2 においては、核移行性に変化は見られなかった。従って Ago2 の核移行には、Small RNA との結合部位ならびに Ago hook との結合部位が重要であることが示された。

#### 2) Ago2 の核移行に関与する Importin ファミリーの同定に関する検討

これまでに Ago2 は Importin-8 と結合するとともに、Ago2 の P-body ならびに核への集積に重要であることが報告されている (Weinmann *et al.*, Cell, 2009)。そこで実際に Ago2 の核移行に Importin-8 が関与するか、Importin-8 をノックダウンして検討した。その結果、Importin-8 をノックダウンしても、Ago2 の細胞内局在については全く影響しなかった。従って少なくとも本研究条件下においては、Importin-8 は Ago2 の核移行に関与しないことが示された。

#### 3) 免疫沈降法による Protein X と変異型 Ago2 との結合に関する検討

上記 1) において、Ago2 の Ago hook との結合部位に変異を入れることで核への移行性が消失したことから、Ago2 は Ago hook を有するタンパク質とともに核に移行していることが示唆された。そこで、Ago hook だけでなく、核移行シグナルを有するタンパク質である Protein X に着目した。GFP タグを

付与した Protein X を過剰発現させ、免疫沈降法によって回収することにより Protein X と各種変異型 Ago2 の結合について検討した。その結果、Ago hook との結合に重要な領域に変異を加えた Ago2 については Protein X との結合が減弱していた。さらには、核への移行性が減弱していた Small RNA との結合性を消失させた変異型 Ago2 についても Protein X との結合性が減弱していた。すなわち、核への移行性が減弱していた変異型 Ago2 全てにおいて Protein X との結合性が減弱していた。またプロテオーム解析により Protein X 以外に Ago2 に結合するタンパク質でかつ核移行シグナルを有するものを探索したが、こちらについては現在のところ有力な候補タンパク質が検出されていない。

#### 4) Protein X ノックダウン時の Ago2 の核移行性に関する検討

次に Protein X をノックダウンした細胞において Ago2 の核移行性が減弱するか否か検討した。siRNA を用いて Protein X をノックダウンしたところ、Ago2 の核移行性は有意に減弱していた。以上の結果より、Protein X が Ago2 の核移行に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

- 1) 櫻井文教、谷野文仁、林晃平、Ong Tyng Tyng、立花雅史、水口裕之。核局在性非コード RNA の高効率な制御に向けた Argonaute 2 の核移行メカニズムの解明。第 29 回日本 DDS 学会 2013.7.4-5。(京都)
- 2) Fuminori Sakurai, Masahi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. Elucidating the mechanism of nuclear transport of argonaute 2 toward efficient knockdown of nuclear non-coding RNA. 2013 日本癌学会学術総会。2013.10.3-5。(横浜)
- 3) Fuminori Sakurai, Fumihito Tanino, Tyng Tyng Ong, Kohei Hayashi, Masahi Tachibana, Hiroyuki Mizuguchi. Elucidating the mechanism of nuclear transport of argonaute 2. 2013 Oligonucleotide Therapeutic Society Annual Meeting. 2013.10.6-8。(イタリア・ナポリ)
- 4) 櫻井文教、谷野文仁、Ong Tyng Tyng、林晃平、立花雅史、水口裕之。Argonaute 2 の核移行メカニズムの解明。第 23 回アンチセンスシンポジウム。2013.11.28-29。(徳島)

[図書](計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

大阪大学大学院薬学研究科

分子生物学分野・准教授

研究者番号：70370939

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

鎌田 春彦 (KAMADA HARUHIKO)

(独) 医薬基盤・健康・栄養研究所

バイオ創薬プロジェクト・サブプロジェクト  
リーダー

研究者番号：00324509