

令和元年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06616

研究課題名(和文)オートファジーを介したmicroRNA非結合型Argonauteの分解機構の解明

研究課題名(英文)Dissecting the mechanism for autophagic degradation of empty Argonaute

研究代表者

小林 穂高(Kobayashi, Hotaka)

東京大学・定量生命科学研究所・博士研究員

研究者番号：80802975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、microRNA非結合状態にあるArgonauteタンパク質(以下、空のAGO)がユビキチン化を受けた後、どのようにして分解されるのかについて解析を行った。本研究の開始時点で、ユビキチン化された空のAGOがオートファジーによって分解されることを支持する結果が得られていた。そこで、2017年度にユビキチン化された空のAGOに結合するオートファジー関連因子の同定を行い、2018年度にこれらの因子について機能解析を行った。その結果、ユビキチン化された空のAGOはUfd1-Npl4ヘテロダイマーを介して、選択的オートファジーに寄与するVCPによって認識され分解されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microRNAは多様な遺伝子の発現調節に寄与しており、その機能の破綻は様々な疾患にも繋がる。従って、microRNAが正常に機能するための細胞内の仕組みを理解することは、基礎研究・応用研究双方の観点から重要である。「空のAGOの分解」という現象は、microRNAによる遺伝子発現抑制が正常に起こる上で必須の現象であることが近年報告されている。しかしながら、その分解機構の実体については不明な点が数多く残されていた。本研究では、空のAGOの分解に必須の新規因子を複数同定することに成功し、それらの因子によるAGO分解機構を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how the empty state of Argonaute (AGO) proteins is degraded after ubiquitination. Our unpublished data had suggested that ubiquitinated empty AGO is degraded by autophagy, but not by the proteasome. Thus, first, we identified autophagy-related molecules that interact with ubiquitinated empty AGO. Next, we conducted functional analyses of these molecules to reveal the mechanism of empty AGO degradation. We found that VCP, a mediator of selective autophagy, recognizes ubiquitinated empty AGO via the Ufd1-Npl4 heterodimer to direct its degradation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：microRNA Argonaute ユビキチン オートファジー VCP

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) とは 22 塩基ほどの小さな RNA であり、Argonaute (AGO) と呼ばれるタンパク質と相互作用することで、相補的配列を持つ mRNA の発現を抑制する (図 1)。この現象は RNA サイレンシングと呼ばれている。miRNA はヒトゲノムに 2,000 種類以上コードされており、miRNA によって制御される遺伝子はタンパク質をコードする全遺伝子の 70% にも及ぶものと考えられている。そのため、miRNA は数多くの一般的な生命現象に深く関与しており、その機能の破綻は多様な疾患にも繋がる。従って、miRNA が正常に機能するための細胞内の仕組みを理解することは、生命科学において基礎・応用双方の観点から重要である。

AGO は miRNA 結合時には安定である一方、miRNA 非結合時、すなわち「空」の状態では積極的に分解されることが知られている (Derrien et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; Martinez and Gregory, *RNA*, 2013; Smibert et al., *Nat Struct Mol Biol*, 2013) (図 1)。「空の AGO を分解する」というこの不思議な現象は進化的に良く保存されていることから、RNA サイレンシングにおける重要性が示唆されてきた。しかしながら、空の AGO の分解機構の実体、および空の AGO を分解する意義については依然として明らかでなかった。

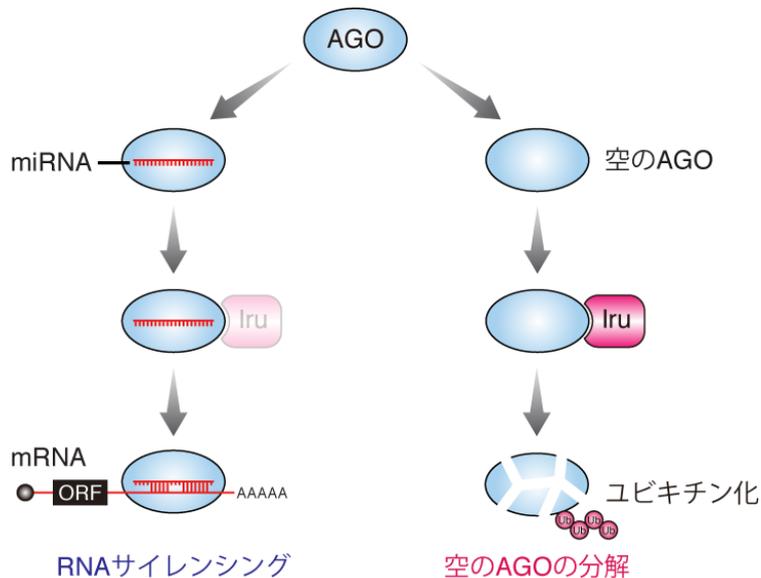


図 1 空の AGO は選択的に分解される

### 2. 研究の目的

本研究開始当初、我々は空の AGO の分解が空の AGO のユビキチン化に起因することを見出しており、このユビキチン化を担う因子 Iruka (Iru) の同定に成功していた。また、Iru ノックダウン実験の結果は、空の AGO の分解が正常な RNA サイレンシングに必須の現象であることを示唆していた (当時未発表データ ; Kobayashi et al., *Mol Cell*, 2019)。興味深いことに、我々はその一方で、ユビキチン化された空の AGO はプロテアソームではなくオートファジーによって分解されることを支持する結果を得ていた。しかしながら、肝心のユビキチン化された空の AGO をオートファジーによって分解する仕組みの実体は不明であった。そこで本研究では、「ユビキチン化された空の AGO は、その後どのようにしてオートファジーによって分解されるのか」という疑問の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 空の AGO とオートファジーを繋ぐ分子基盤の同定

本研究では第一に、空の AGO とオートファジーを繋ぐ分子基盤の同定を試みた。miRNA と結合する AGO はヒトでは 4 種類存在するのに対して、ハエでは Ago1 のみであり解析が簡便である。そこで、本研究はハエ S2 細胞を用いて行った。我々はまず、野生型 Ago1 と miRNA 結合能を欠損させた Ago1-Y619E 変異体のインタラクトームを比較し、空の Ago1 に選択的に結合するオートファジー関連因子が存在するか検証した。しかしながら、この手法では空の Ago1 に選択的に結合する候補因子を見出すことが出来なかった。これはおそらく、空の Ago1 のうち実際にオートファジーによる分解を担う因子と結合したものは積極的に分解されてしまうためと考えられた。我々は手法を変更し、「空の Ago1 のユビキチン化レベルを増減させた時に、連動して結合強度が増減する因子」の同定を試みた。具体的には、正常な S2 細胞と Iru をノックダウンした S2 細胞に Ago1-Y619E 変異体を発現させ、それぞれの条件における Ago1 インタラクト

ームを比較解析した。同様に、正常な S2 細胞と Iru を過剰発現させた S2 細胞についても Ago1 インタラクトームの比較を行った。

## (2) 空の AGO とオートファジーを繋ぐ分子基盤の機能解析

本研究では第二に、(1)で同定された候補因子群について機能解析を行った。具体的には、まず同定された候補因子について一つ一つノックダウンを行い、それぞれの候補因子が実際に空の Ago1 の分解に寄与するのか検証した。なお、空の Ago1 の分解活性は、正常な S2 細胞と miRNA 産生に必須の Drosha タンパク質をノックダウンした S2 細胞の Ago1 発現量を比較することで評価した。続いて、実際に空の Ago1 の分解に寄与した因子について、どういった機構で分解に寄与するのか検証を進めた。具体的には、それぞれの因子について、有する機能ドメインや先行研究で報告されている機能などを足掛かりに、空の Ago1 の分解に寄与する機構について仮説を立て、その真偽の検証を行った。

## 4. 研究成果

まず、正常な S2 細胞と Iru ノックダウン S2 細胞において、空の Ago1 のインタラクトームを比較解析した。空の Ago1 のユビキチン化レベルに結合強度が連動する因子を同定する上で、我々は以下の 3 つの基準を採用した。①独立した 3 回の実験の結果、3 実験全てで結合因子として同定されたもの（高い再現性を示すもの）、②一定以上の結合強度を示したもの、③Iru ノックダウンによって結合強度が 50%以下になったもの。その結果、空の Ago1 のユビキチン化レベルを低下させた時に結合強度が低下する因子として、選択的オートファジーに寄与する VCP と呼ばれる因子を同定することに成功した。Iru ノックダウン実験の結果とは逆に、Iru を過剰発現させると、今度は空の Ago1 と VCP の結合が増強された。さらに、VCP をノックダウンすると、空の Ago1 の分解が起こらなくなることが確認された。VCP は、ユビキチン結合能を有するアダプター因子を介して基質を認識することが報告されている。VCP とアダプターの結合は、VCP の N ドメインと呼ばれる領域を介して行われることが報告されており、実際に N ドメインを欠損させた VCP 変異体は空の Ago1 と結合しなかった。従って、空の Ago1 についても VCP は何らかのアダプター因子を介して認識しているものと予想された。そこで、上述した空の Ago1 のインタラクトームを再解析したところ、VCP のアダプターとして報告されている因子群が Ago1 のインタラクトームに複数含まれていることが明らかになった。これらのアダプター候補因子はいずれも、Iru ノックダウン時に空の Ago1 との結合が減弱し、Iru 過剰発現時には結合が増強していた。そこで、これらの因子についてノックダウン実験を行ったところ、Ufd1-Npl4 ヘテロダイマーと呼ばれるアダプターをノックダウンすると、空の Ago1 と VCP の結合が抑制されることが判明した。さらに、Ufd1-Npl4 ノックダウン時には空の Ago1 の分解も阻害された。また Iru 同様に、VCP や Ufd1-Npl4 ヘテロダイマーをノックダウンすると、正常な RNA サイレンシングが起こらなくなることが確認された。以上の結果から、空の Ago1 は Ufd1-Npl4 ヘテロダイマーを介して VCP によって認識されることでオートファジーによる分解へと導かれること、そしてこの経路が正常な RNA サイレンシングに重要であることが示された (図 2; Kobayashi et al., in Revision)。

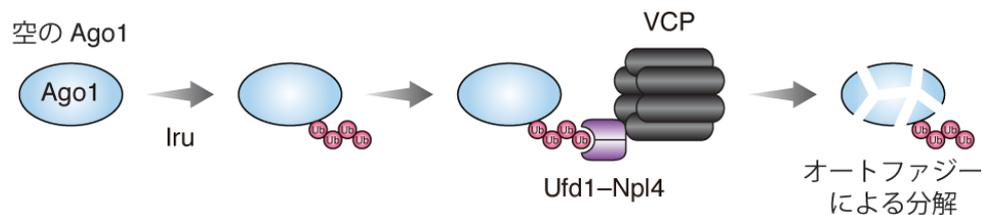


図 2 VCP-Ufd1-Npl4 による空の AGO の分解機構

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① †[Kobayashi H](#), Shoji K, Kiyokawa K, Negishi L, †Tomari Y. (†, Corresponding authors)  
Iruka eliminates dysfunctional Argonaute by selective ubiquitination of its empty state.  
*Mol Cell*. 2019 Jan 3;73(1):119-129.  
doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.033.  
査読有り

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① [Kobayashi H](#).  
Iruka ensures the quality of Argonaute by selective ubiquitination of its empty state.  
13th Microsymposium on Small RNA Biology (Invited Talk). June 20, 2018
- ② [Kobayashi H](#), Shoji K, Negishi L, Tomari Y.  
Iruka ensures the quality of Argonaute by selective ubiquitination of its empty state.  
13th Microsymposium on Small RNA Biology (Poster). June 18, 2018
- ③ [小林 穂高](#)、[庄司 佳祐](#)、[根岸 瑠美](#)、[泊 幸秀](#)  
Iruka directs selective ubiquitination of empty Argonaute for successful miRNA-mediated silencing.  
第 18 回 東京大学生命科学シンポジウム（ポスター） 2018 年 6 月 9 日
- ④ [小林 穂高](#)、[根岸 瑠美](#)、[泊 幸秀](#)  
Iruka は microRNA 非結合型 Argonaute を選択的にユビキチン化する  
第 19 回 日本 RNA 学会年会（口頭） 2017 年 7 月 21 日
- ⑤ [Kobayashi H](#), Negishi L, Tomari Y.  
Takotsubo (Iruka) mediates selective degradation of miRNA-unloaded Argonaute.  
The 43rd Naito Conference (Poster). June 28, 2017

〔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

<https://researchmap.jp/hota-koba/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究分担者：該当無し  
(2) 研究協力者：該当無し

※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。