

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840019

研究課題名(和文) 真核生物における小分子RNA作用機序の構造基盤の解明

研究課題名(英文) Structural basis for small RNA functional mechanism in eukaryotes

研究代表者

三好 智博 (Miyoshi, Tomohiro)

新潟大学・研究推進機構超域学術院・助教

研究者番号：60534550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Argonauteは、バクテリアから真核生物にまで全ての生物界に存在し、核酸の配列依存的なサイレンシング機構において必要不可欠なタンパク質である。これまでに多くの研究により、Argonaute-核酸複合体の構造的知見が得られてきた。しかしながら、Argonauteによるガイド鎖とターゲット鎖の認識メカニズムの詳細は、未だ不明のままである。本研究では、ガイド鎖をRNAとし、ターゲット鎖をDNAとするArgonauteタンパク質複合体をX線結晶構造解析により、明確に示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Argonaute proteins are widespread in all domains of life from bacteria to eukaryotes, and are an essential component of the nucleic acid-based silencing systems. Although many aspects of the structure of Argonaute-nucleic acid complexes have been described in previous crystal structure studies, the recognition mechanism of the guide and target strands by Argonaute proteins is still not fully understood. In the present study, we have solved the structure of Argonaute in complex with guide RNA and target DNA by X-ray crystallography.

研究分野：構造生物学、分子生物学

キーワード：Argonaute small RNA

1. 研究開始当初の背景

網羅的トランスクリプトーム解析により、ヒトではタンパク質をコードしている領域は、2%しかなく、残りの98%は、ノンコーディング領域であることが明らかになった。さらに、これまで特別な生理的活性を持たないと考えられていたノンコーディング領域から転写される RNA (非コード RNA) が、細胞増殖・細胞死・細胞運命系譜決定・幹細胞維持・発生段階の時間的制御といった高次生命現象を複雑にコントロールする重要な機能を備えていることが明らかになってきた。現在、非コード RNA の中で、特に脚光を浴び研究が進んでいるのが、約 20 塩基長の siRNA (small interfering RNA)、miRNA (microRNA)、piRNA (PIWI-interacting RNA) と呼ばれる小分子 RNA 集団である。

真核生物に特異的な RNA サイレンシングは、上記に述べた約 20 塩基長の小分子 RNA がトリガーとなって機能する塩基配列特異的な遺伝子発現制御機構であり、種々の高次生命現象に関わる必要不可欠な生体メカニズムである。本機構は、多くのバイオテクノロジー分野において、ターゲット遺伝子の発現をノックダウンするツールとして幅広く利用されている。さらに、新たな核酸創薬を担うシステムとして、がん治療や再生医療の分野での応用利用が待ち望まれている。これらの応用研究を進めるためには、RNA サイレンシング機構の完全な理解が必要不可欠である。

この RNA サイレンシング機構で特に重要な役割を持つ因子が、Argonaute タンパク質である。Argonaute タンパク質は、RNA サイレンシングのトリガーとなる小分子 RNA を取り込み、その塩基配列依存的にターゲット RNA を認識・結合して、ターゲット RNA の分解や翻訳抑制の中心的な役割を担っている。

Argonaute タンパク質は、4 つの機能ドメイン (N, PAZ, MID, PIWI) と 2 つのリンカー配列により、構成されているが、それぞれの機能部位のメカニズムに関しては、不明な部分が多く残されて

いた。また、真核生物の Argonaute は、ガイド鎖とターゲット鎖を共に RNA 分子を認識するが、DNA ではなく RNA 分子を特異的に識別する分子メカニズムは、不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、多彩な機能をもつ非コード RNA の分子メカニズムを原子分解能レベルで理解することを目的とし、Argonaute タンパク質複合体の X 線結晶構造解析を行い、小分子 RNA マシナリーの学術的知見を得ることである。

真核生物の Argonaute は、ガイド鎖として RNA を、ターゲット鎖も同様に RNA を認識している。一方で、光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 由来の Argonaute (RsAgo) は、ガイド鎖が RNA であり、ターゲット鎖が DNA であることを、我々の生化学的解析により明らかにした。本研究では、ガイド RNA/ターゲット DNA 型 Argonaute の立体構造を決定し、真核(ガイド RNA/ターゲット RNA)型との構造的な違いを示すことで、Argonaute の核酸タイプ識別分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質の発現と精製

N 末端に His タグを付加した RsAgo を大腸菌を用いて大量に発現させた。その大腸菌は、破碎後、Ni-NTA カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製を行った。タンパク質の精製度は、SDS-PAGE により、単一になった事を確認した。この精製タンパク質を用いて、以下の X 線結晶構造解析及び生化学的な解析を行った。

タンパク質の結晶化、回折データ取得、構造計算

精製タンパク質と核酸を混合し、シッテイングドロップ法により結晶化スクリーニングを行

い、タンパク質複合体の結晶を得た。さらに、結晶化の最適化条件の検討を行い、X線回折データが取得可能な大きさの結晶を得た。得られた結晶は、放射光施設(Photon Factory)でX線回折データを取得した。当タンパク質複合体の構造計算は、分子置換法で行うことが出来なかったため、セレンメチオン置換体を用いたSAD法により、位相を決定し、構造決定を行った。なお、セレンメチオン置換体の精製方法は、Nativeタンパク質と同様の方法で行った。

ゲルシフト法

プローブである18塩基長のRNA及びDNAは、5'末端を[γ - ^{32}P]ATPとT4PNKによりリン酸化することで、放射性標識を行った。標識された各種核酸プローブは、様々な濃度のRsAgoと混合した後に、非変性ゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを乾燥し、X線フィルムに露光し、現像する事によりシグナルのバンドを検出した。

プラスミドDNAサイレンシング解析

タンパク質発現用大腸菌BL21(DE3)にプラスミドを形質転換し、RsAgo(野生型もしくは変異型)を発現させる。発現誘導後、30°Cで5時間培養した後に大腸菌を回収して、大腸菌からプラスミドの抽出及び精製を行った。プラスミド量は、OD260 nmを測定することにより定量した。

4. 研究成果

RsAgoに結合する核酸の種類(RNA, DNA)を同定するために、ゲルシフト法により解析をした。RsAgoは、一本鎖の場合、DNAよりRNAの方より強く結合することが明らかとなった(図1 a, b)。この結果は、RsAgoがガイド鎖としてRNA分子を識別可能であることを示している。さらに、RsAgoに結合するターゲット鎖(ガイド鎖配列の相補的な配列)の核酸の種類を決定するために、2本鎖の核酸の結合性もゲルシフト法により解析した(図1 c-f)。4通りの核酸の組み合わせ(ガイド

鎖/ターゲット鎖: RNA/RNA, RNA/DNA, DNA/DNA, DNA/RNA)によるRsAgoへの結合性を解析したところ、RNA/DNAの組み合わせの時のみに複合体のバンドを検出することが出来た。これらの結果から、RsAgoは、ガイド鎖をRNA、ターゲット鎖をDNAとしているユニークな核酸結合性Argonauteタンパク質であり、RNA-guided DNA silencingで機能することが明らかになった

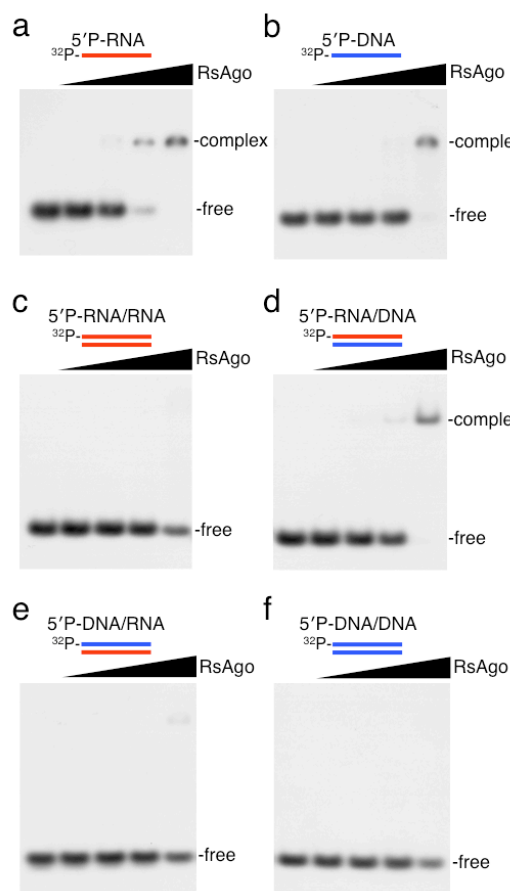


図1. ゲルシフト法によるRsAgoの核酸識別解析

この生化学的解析の結果をもとに、RsAgo/ガイドRNA(18bp)/ターゲットDNA(18bp)複合体の結晶構造を決定した。RsAgoは、4つのドメイン(N, PAZ, MID, PIWI)と2つのリンカー(L1, L2)により構成されていた(図2上図)。さらに、RsAgoの中心には、正に帯電した溝が存在し(図2下図)、その領域にガイド鎖及びターゲット鎖が結合していた。ガイド鎖RNAの5'末端は、MID/PIWIドメインの間に形成さ

れた溝に結合していた。このため、ガイド鎖の 1 塩基目は、ターゲット DNA との塩基対合が唯一崩壊していた。さらに、このガイド鎖 RNA の 5' 末端では、塩基の種類が MID ドメインとの水素結合によって、認識されていた。これは、RsAgo 自体が、単独でガイド鎖の核酸を塩基の違いによって選別する能力がある事を示している。その一方で、ガイド鎖の 3' 末端は、ターゲット DNA と塩基対合を形成した状態で、Nドメインと PIWI ドメインに挟まれる様に相互作用していた。この塩基対合は、RsAgo の機能には DNA との強い相互作用が重要である事を示唆している。この RsAgo 複合体構造は、ガイド鎖 RNA とターゲット鎖 DNA を認識する Argonaute の初めての構造解析であり、我々は、Argonaute タンパク質による新しい核酸相互作用様式を示すことに成功した。

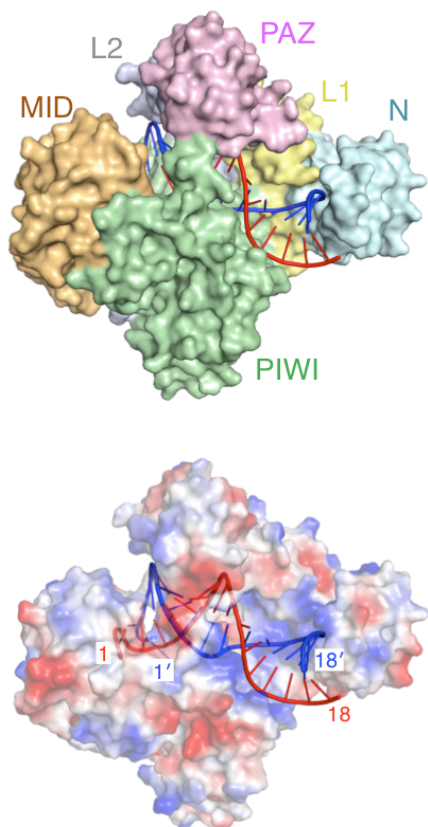


図 2. RsAgo 複合体の構造 (上図)RsAgo の各ドメインを色分けで示す。ガイド鎖 RNA とターゲット鎖 DNA は、それぞれ赤色と青色で示す。(下図)RsAgo のタンパク質表面の電荷の分布を示す。青色と赤色は、それぞれ正と負に帯電している領域を示す。

RsAgo の各ドメインの機能の詳細を調べるために、結晶構造から明らかとなった核酸認識に重要なアミノ酸に変異を導入する実験を行った。この解析では、大腸菌に様々な変異を導入した RsAgo を発現するプラスミドを導入し、発現させる事により、各 RsAgo の発現によるプラスミド量の変化を調べた。その結果、各ドメインのアミノ酸による重要な相互作用部位が明らかになり、MIDドメインと PIWIドメインによるガイド鎖の 5' 部位の相互作用と、Nドメインや L1リンカーによるターゲット鎖との相互作用が、特に重要であることが示された(図 3)。

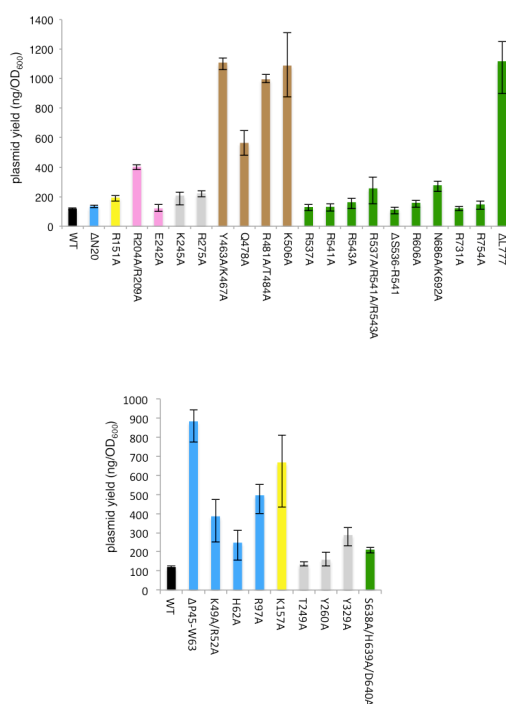


図 3. RsAgo の機能解析
ガイド RNA 鎖(上図)とターゲット DNA 鎖(下図)と相互作用が見られたアミノ酸への変異導入実験。

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 3 件)

(1) Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute.

Miyoshi T., Ito K., Murakami R. and Uchiumi T. (2016) Nature Communications, in press.

(2) Crystal structure of translation initiation factor 5B from the crenarchaeon *Aeropyrum pernix*.

Murakami R., Miyoshi T., Ito K. and Uchiumi T. (2016) *Proteins*, 84: 712-717.

doi: 10.1002/prot.25009.

(3) Functional role of the C-terminal tail of the archaeal ribosomal stalk in recruitment of two elongation factors to the sarcin/ricin loop of 23S rRNA.

Imai H., Miyoshi, T., Murakami, R., Ito, K., Ishino, Y., and Uchiumi, T. (2015) *Genes to Cells*, 20(7): 613-24.

doi: 10.1111/gtc.12256.

[発表] (計 4 件)

(1) RNA-guided DNA interference を担う Argonaute タンパク質

三好智博、伊東孝祐、村上僚、内海利男

平成 27 年度日本生化学会関東支部例会 2015/6/20、新潟日報メディアシップ 6 階 (新潟)

(2) *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute によるガイド RNA/ターゲット DNA 認識機構の構造基盤

三好智博、伊東孝祐、村上僚、内海利男

第 17 回日本 RNA 学会年会、2015/7/15-17、ホテルライフオーブ札幌 (北海道)

(3) Recognition mechanism of guide RNA-target DNA heteroduplex by Argonaute

Tomohiro Miyoshi, Kosuke Ito, Ryo Murakami, Toshio Uchiumi

EMBL Symposium, 2015/10/18-21, EMBL Advanced Training Centre (Heidelberg Germany)

(4) アルゴノート蛋白質によるガイド/ターゲット二本鎖の新結合様式

三好智博、伊東孝介、村上僚、内海利男

第 38 回日本分子生物学学会 2015/12/1-4、神戸ポートアイランド (兵庫)

[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

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biology/index/uchiumi-ito/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 智博 (MIYOSHI TOMOHIRO)

新潟大学・研究推進機構・助教

研究者番号 : 60534550