

# 研究報告書

## 「Agoタンパク質による遺伝子発現制御機構の構造生物学的基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中西 孝太郎

### 1. 研究のねらい

Argonaute は、ガイド鎖と呼ばれる一本鎖 RNA と結合して RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する。RISC はガイド鎖と塩基相補的な配列を含むメッセンジャー(mRNA) と結合し、その mRNA を切断もしくは mRNA を分解する因子をリクルートすることにより、遺伝子の発現を制御する。研究者は本プロジェクトを始める前に、ガイド RNA と結合した出芽酵母 *Kluyveromyces polysporus* 由来の AGO の結晶構造を決定した(Nakanishi *et al.*, Nature 2012)。その結果、ガイド鎖の取り込みによる構造変化によって触媒テトラッドが形成され、AGO が RNA 切断活性型になることを明らかにした。また、ガイド鎖と結合したヒトの Argonaute1 (AGO1) の結晶構造の決定にも成功し、標的 mRNA が結合する核酸結合チャネルの形がヒトの Argonaute2 (AGO2) と異なることを明らかにした(AGO2)。本研究では、ヒトがもつ 4 種類の Argonaute タンパク質 (AGO1, AGO2, AGO3, AGO4) が二本鎖 RNA を 1) 取り込み、2) ほどき、そして 3) 標的 mRNA と結合する分子機構を原子分解能レベルで理解するために、それら複合体の結晶構造を決定する。近年、製薬業界やベンチャー企業が人工的な二本鎖 RNA もしくは一本鎖 RNA を AGO に取り込ませ、疾患に関わる蛋白質の発現を制御する技術を開発している。本研究では、RNA 干渉を用いた医薬品の技術開発や臨床開発の発展には欠かせない構造学的基盤を与えることを最終目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ヒトは4種類の Argonaute タンパク質、AGO1, AGO2, AGO3, そして AGO4 をもつ。これらのうち RNA 切断活性をもつのは AGO2 のみである。ほぼすべての細胞において AGO2 の発現レベルが高いことから、他の AGO タンパク質は AGO2 のバックアップ的な働きをされると考えられてきた。さらに、AGO2 の切断活性に依存した生理反応が多く見られることから、これまでの Argonaute やそれに結合する microRNAs(miRNAs)や small interfering RNAs(siRNAs)の研究は主に AGO2 を中心に行われてきた。しかし最近になり、各 AGO が特定の細胞で特有の働きを担うことが報告されてきた。例えば、シカゴ大学の Gomez グループらによって、脊髄小脳変性症の原因となっているメッセンジャーRNA(mRNA)の転写を抑制する際、デザインした miRNA は4つの AGO のうちの AGO2 と AGO4 のみに取り込まれ、実際に標的 mRNA に結合するのは AGO4 に取り込まれた時のみであることが報告されている(Miyazaki *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 2016)。この結果は、miRNA を研究してきた者としては非常に驚きだった。というのは、miRNA はヒトがもつ 4 種類の AGO にランダム取り込まれると考えられてきたからだ。さらに驚くことに、AGO2 と AGO4 は同じ miRNA を取り込んだにも関わらず、AGO4 のみが標的 mRNA に結合することを同著者らは報告している。これらの結果は、AGO が取り込んだ miRNA の塩基配列に従って標的 RNA に結合するという従来のモデル

では説明できない。

ヒトの4種類の Argonaute タンパク質のアミノ酸配列が 82%の相同性を持つことから、それらの全体構造も非常に似ていることが予想されてきた。実際、これまで AGO1 と AGO2 の結晶構造が決定されており、両者の全体構造は非常に似ていることが報告されている(Elkayam *et al.*, *Cell* 2012; Faehnle *et al.*, *Cell Rep.*; Nakanishi *et al.*, *Cell Rep.* 2013; Schirle and MacRae *Science* 2012)。しかしながら、AGO1 と AGO2 の立体構造は局所的に異なり、その違いが両者の機能の違いを生み出していることが明らかになった。Argonaute は4つのドメインで構成され、N 末端ドメインと PAZ ドメインが N 末端 lobe を形成し、MID ドメインと PIWI ドメインが C 末端 lobe を形成している。この2つの lobes の間を核酸結合チャネルが走っており、ガイド鎖(miRNA)とターゲット鎖(mRNA)は共にそのチャネルに結合する。上述した AGO1 と AGO2 の構造の相違点のうちの幾つかは核酸結合チャネルに沿って局在する。これらの事実から、本研究は、「small RNA が Argonaute に取り込まれることで初めて完成するチャネルの形状こそが標的 RNA を規定している」という作業仮説を立てて Argonaute の研究を行った。

## (2)詳細

### 研究テーマ「ヒトの Argonaute4」

真核生物の遺伝子発現は階層的に制御されており、その制御機構の1つが microRNA (miRNA)を介した遺伝子サイレンシングである。miRNAs はそれら単体では生理的活性をもたないが、Argonaute と呼ばれるタンパク質に取り込まれ RNA-induced silencing complex (RISC) を形成することで、相補的な塩基配列を含むメッセンジャーRNAに結合することができる。ヒトがもつ4種類の Argonaute タンパク質のうち、RNA 切断活性をもつのは AGO2 のみであるが、すべての Argonaute が RISCを形成して切断非依存的に翻訳抑制や脱アデニル化することができる。最近の研究から、Argonaute4 が精子形成で重要な役割を担うことや脊髄小脳変性症の原因となっている mRNA の翻訳を阻害する役割があることが明らかになり注目され

始めている (Modzelewski *et al.*, *Dev. Cell* 2012; Miyazaki *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 2016)。このような機能を AGO4 がどのようにしてもつのかを理解するためには、生化学的手法による機能解析のみならず、構造学的基盤が不可欠である。これまで AGO1 と AGO2 については、それらがガイド鎖と結合した RISC の結晶構造が決定されているが、AGO4 の構造は未だ決定されていない。

今回私たちのグループは、AGO4 とガイド RNA の複合体の結晶構造を分解能 1.9 Å で決定した。回折実験は NE-CAT, Advanced Photon Source (Argonne, Chicago)で行った。2014年にドイツのグループが AGO4 のアミノ酸配列と AGO2 の既知構造から AGO4 の立体構造モデルを報告している。しかし、私たちが決定した結晶構造から、AGO4 に特異的な挿入部位の立体構造が報告されたモデルと異なることが明らかになった。Argonaute タンパク質はガイド鎖の取り込みに伴って構造を変化させ、保存されたグルタミン酸残基(glutamate finger)が移動して触媒テトラッドを完成させることが知られている。今回の構造は、以前モデルを基に予想された残基とは異なるグ

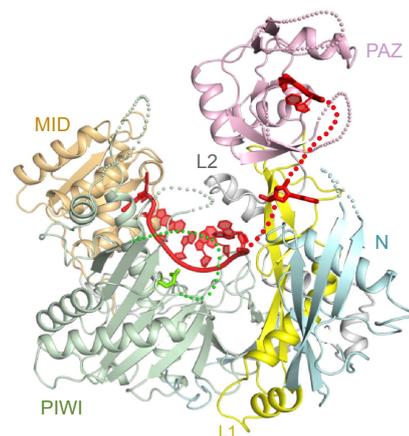


図 1: ヒトの Argonaute4 とガイド RNA(赤)の複合体の結晶構造

ルタミン酸残基が glutamate finger として触媒テトラッドを完成させていることを示した。RNA 切断活性に関係なく Argonaute タンパク質は触媒テトラッドを完成させることから、Argonaute が生理活性をもつ RISC となるためには触媒テトラッドの完成が不可欠であることが強く示唆された。

ドイツのグループは、AGO2 の結晶構造を基に AGO4 の構造モデルを報告している(Hauptmann *et al.*, RNA 2014)。同モデルでは、AGO4 に特有の挿入領域が  $\beta$ -ストランドを形成し、触媒ドメイン上に位置している。しかし、本研究で決定した結晶構造から、AGO4 に特有の挿入領域は触媒ドメイン上には存在せず、核酸結合チャンネルに突き出していることが明らかになった。このことから、AGO4 はこのループの存在によって、他の Argonaute とは異なるターゲット鎖認識機構を持つことが考えられた。この仮説が変異体機能解析の結果と合致したことから、当初掲げた「ガイド鎖が Argonaute のチャンネルに結合することで完成するターゲット鎖結合チャンネルの形状が標的 RNA を規定する」という作業仮説が成り立つことが強く示唆された。現在同内容についてまとめた論文を準備している。

### 3. 今後の展開

これまでの遺伝子サイレンシング研究は、主に AGO2 の役割を解明することに焦点が当てられてきた。ヒトは 4 種類の Argonaute タンパク質をもつが、それらは余剰的に働いていると考えられている。しかし、最近報告された研究結果は、4つの Argonaute がそれぞれに特化した役割も担うことを示唆している。今後は生化学的手法を用いて、AGO4 の機能解析を進めていく予定である。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究を提案した際には、本研究者は preliminary データを持ち合わせてなかったのに、アイデアで採択して頂いたと考えています。”さきがけ”という言葉通り、自分が面白いと信じる研究テーマについて申請書を書き、その目的に向かって3年半研究できるだけの予算(機会)を頂いたことに感謝しております。自分がポスドクであったならば、もっとできたであろうという思いは正直あります。それでも、空っぽのスペースに実験機材を置くことから始め、学生を指導していく中で彼らが実働部隊として成長し、その結果が発表できるようになったことを振り返ると、研究テーマの推進を最終目的とするものの、その過程で科学者としてラボを経営する資質を学ぶことができたと考えております。

ヒトがもつ4種類の Argonaute 分子がどのように振る舞うのかについて、その構造情報を提供することは、miRNA や siRNA の医療応用に非常に重要になってくると考えています。これまで、small RNAs がどのような mRNA を標的とするかについては、両者(つまり、ガイド鎖とターゲット鎖)の塩基対相補性のみが着目され研究の対象とされてきました。しかしながら、本研究の結果から、small RNA が Argonaute に取り込まれることで初めて完成する「チャンネルの形状」が標的 RNA を規定していて、ガイド鎖とターゲット鎖の塩基相補性のみから正確な標的 RNA を予測するのは困難であることが分かり、今後 RNAi の医療応用の実現に向け必要な研究対象を明確化できたと考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

遺伝子発現を制御する4種類の Argonaute (AGO)タンパク質の一つである AGO4 と RNA の複合体の結晶構造を 1.9 オングストロームの分解能で明らかにし、AGO2 や変異体との構造・機能の比較から、guide RNA の AGO 結合特異性を説明した。AGO の種類、構造がターゲットの特異性を決定しているという結論は明確である。ほぼ目標通りの成果を達成した。

今後は、構造生物学の専門性を生かし、堅実な努力を続けられることで、より大きな系の中での AGO の働きを理解する方向に進んでいって欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Nakanishi, K. (2016) Anatomy of RISC: How do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 7, 637-60.
2. Jannot G, Michaud P, Quévillon Huberdeau M, Morel-Berryman L, Brackbill JA, Piquet S, McJunkin K, Nakanishi K, Simard MJ. (2016) GW182-Free microRNA Silencing Complex Controls Post-transcriptional Gene Expression during *Caenorhabditis elegans* Embryogenesis. *PLoS Genet*. 2016 Dec 9;12(12):e1006484
3. Swarts, D.C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R.F., Koonin, E.V., Patel, D.J., van der Oost, J. (2014) The evolutionary journey of Argonaute proteins from a structure-function perspective. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 743-53

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

なし