

Rhodobacter sphaeroides Argonaute による
ガイド RNA/ターゲット DNA 認識の構造基盤
Structural basis for recognition of guide RNA/target DNA
heteroduplex by *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute

三好 智博^{1,*}、伊東 孝祐^{2,*}、村上 僚²、内海 利男²

¹新潟大学研究推進機構超域学術院、²新潟大学大学院自然科学研究科、

^{1,2}〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

Tomohiro Miyoshi^{1,*}, Kosuke Ito^{2,*}, Ryo Murakami², Toshio Uchiyumi²

¹Center for Transdisciplinary Research, Niigata University, ²Graduate School of Science and Technology, Niigata University, ^{1,2} 8050 Ikarashi 2-no-cho, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan

1 はじめに

Argonaute は、原核生物から真核生物まで、広く保存されており、ガイド鎖の塩基配列に依存したターゲット鎖への結合によって、多種多様なサイレンシング機構の中核を担うタンパク質である。真核生物の Argonaute は、小分子 RNA (siRNA, miRNA, piRNA) をガイド鎖として結合し、ターゲット RNA の分解や機能を抑制する「RNA-guided RNA silencing」を引き起こすことが知られている。一方、原核生物の Argonaute では、小分子 DNA をガイド鎖とし、ターゲット DNA を分解するシステム「DNA-guided DNA silencing」により、生体防御機構として機能することが近年明らかとなった。同じ原核生物の光合成細菌 *R. sphaeroides* のスライサー活性欠損型 Argonaute (*RsAgo*) は、DNA だけでなく RNA とも相互作用することは示されているが、ガイド/ターゲット鎖の核酸の種類やその構造学的知見は、不明なままであった。しかし我々は、*RsAgo* が RNA をガイド鎖として、DNA をターゲット鎖として認識し、新規の Argonaute 作用メカニズム「RNA-guided DNA silencing」で機能していることを明確にした^[1]。さらに我々は、*RsAgo* による guide RNA/target DNA 核酸結合メカニズムの構造基盤を解明するため X 線結晶構造解析を試みた。

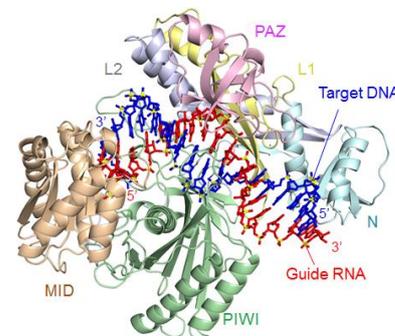
2 実験

RsAgo は大腸菌を用いて発現させ、各種クロマトグラフィーにより精製を行った。結晶化は、*RsAgo*、RNA および DNA を、1:1.2:1.2 のモル比で混合し、その溶液を 0.05 M sodium cacodylate trihydrolate pH 7.0、42% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol を含む溶液と 1:1 の割合で混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。測定は PF-AR NW12A にて行った。位相決定は、上記同様の方法で作製した Se-Met 同型置換体の結晶を使用して SAD 法により行った。

3 結果および考察

構造解析の結果、我々は、*RsAgo*•guide RNA•target DNA 3 者複合体の構造を分解能 2.0 Å で決定することに成功した (右図) (PDB ID: 5AWH)^[1]。その結

果、*RsAgo* による guide RNA•target DNA heteroduplex の認識機構が原子分解能レベルで明らかになった。なお、通常の Argonaute 中では、guide RNA の 3' 末端領域は N 末端ドメインにより Watson-Crick 塩基対が引き離されることが分かっているが、驚くべきことに今回決定した *RsAgo* 中では、この領域は N 末端ドメインと PIWI ドメインにより挟み込まれ、安定に target DNA と Watson-Crick 塩基対を形成していた。この塩基対安定化様式により、*RsAgo* は target DNA に強固に結合し、そして RNA ポリメラーゼの働きを効率的に阻害することで DNA サイレncing を行うと考える。その他、我々は生化学的解析と合わせて、MID ドメインと PIWI ドメインが共同的に働いて 5'リン酸化ウリジン guide RNA を選択していること、PAZ domain 中のループがターゲット遺伝子のサイレンシングに重要であること、L2 リンカーおよび PIWI ドメインがガイド鎖およびターゲット鎖の核酸種識別に重要な役割を果たしていること等を明らかにした。



4 まとめ

本研究で明らかにした“*RsAgo*•ガイドRNA”システムは標的とするDNAに直接作用するため、RNA干渉の弱点 (遺伝子 (DNA) に直接作用できない) を補う新規システムとして、基礎生命科学や先端医療研究への応用が期待される。

参考文献

[1] Miyoshi T., Ito K., Murakami R., Uchiyumi T. (2016) Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nature Commun.* 7, 11846.

^{1,*}miyoshit@po.mdu.ac.jp, ^{2,*}k-ito@bio.sc.niigata-u.ac.jp