

領域融合レビュー, 1, e001 (2012)  
 DOI: 10.7875/leading.author.1.e001  
 2012年9月1日 公開

## Argonaute : RNAサイレンシングの構造基盤 Argonaute: the structural basis of RNA silencing

佐々木 浩・泊 幸秀  
 Hiroshi M. Sasaki & Yukihide Tomari

東京大学分子細胞生物学研究所 RNA 機能研究分野

### 要約

RNAサイレンシングの発見から10年以上を経た2012年, その中心的なタンパク質である真核生物型 Argonaute の立体構造が, わずか1カ月のあいだに3つの研究グループから報告された。ここでは, Argonaute に生じるダイナミックな立体構造の変化と標的に特異的なRNAサイレンシングとの密接なかかわりに焦点をあて, RNAサイレンシングの構造生物学における最新の知見を紹介する。

### はじめに

RNAサイレンシングとは, 20~30塩基長の小分子RNA (small RNA) を介して, それと相補的な配列領域をもつ遺伝子の発現が抑制される現象である。RNAサイレンシングは1998年, 線虫についてはじめて報告され, 2001年には, 真核生物に特異的な遺伝子発現の制御機構として広く保存されていることが知られるようになった<sup>2)</sup>。また, 応用的な観点からみると, RNAサイレンシングは特定の遺伝子産物の発現を人為的に抑制する方法として, 高い選

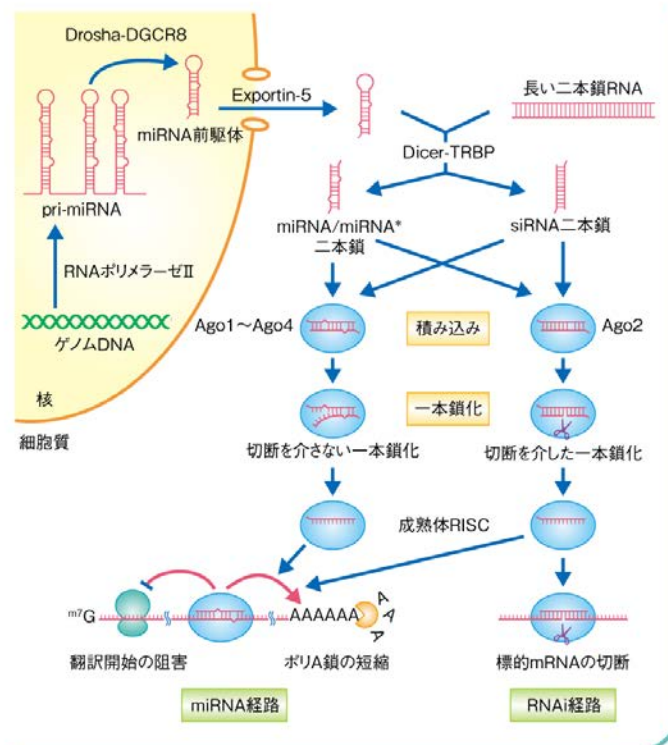


図1 ヒトにおけるRNAサイレンシングの分子機構

択性と汎用性とを兼ね備えたアプローチである。すでに、実験室レベルでは遺伝子の機能を解明するうえで欠かせないツールとして生命科学の実験に幅広く利用されている。

## 1. RNAi 経路と miRNA 経路

RNA サイレncingのなかでもとくにわしく調べられている経路として、おもにウイルスなど外因性の長い二本鎖 RNA に由来する small interfering RNA (siRNA) が原始的な防御システムとしてはたらく RNAi 経路, および、ヘアピン型をとる前駆体 RNA としてゲノムにコードされていてさまざまな生命現象の制御を行う microRNA (miRNA) のかかわる miRNA 経路の 2 つがある<sup>3-6)</sup> (図 1)。どちらの経路でも、生合成された 21~23 塩基長の RNA が RISC (RNA-induced silencing complex) とよばれる RNA-タンパク質複合体を形成し、相補的な配列領域をもつ mRNA の発現を抑制するという共通点がある。この RNA サイレncingの機能複合体である RISCにおいて、中心的な役割をはたしているのが Argonaute (Ago) とよばれる一群のタンパク質である<sup>7)</sup>。

Ago は、4 つのドメイン (N ドメイン, PAZ ドメイン, MID ドメイン, PIWI ドメイン) と 2 つのリンカー (L1 リンカーと L2 リンカー) から構成される, 分子量が約 100 kDa のタンパク質である。siRNA や miRNA などの small RNA は、通常、二本鎖 RNA として生合成され、二本鎖のまま Ago に積み込まれる (図 1)。つぎに、Ago のなかで二本鎖 RNA 鎖の片方の鎖 (パッセンジャー鎖) が引きはがされ捨てられることにより、もう片方の鎖 (ガイド鎖) のみが Ago に取り込まれた成熟体 RISC が形成される<sup>3-6)</sup>。こうして形成された RISC は、ガイド鎖の配列相補性を利用して特異的な標的 mRNA をみつけだし、翻訳の抑制やポリ A 鎖の短縮による不安定化をひき起こす (miRNA 経路)。また、Ago ファミリーに属するタンパク質のなかには“スライサー”とよばれるエンドヌクレアーゼ活性をもつものがあり、こうした Ago は標的 mRNA を切断することもできる (RNAi 経路)。

## 2. 3 つの研究グループから報告された真核生物型 Ago の立体構造

ガイド鎖 RNA との結合様式や標的 mRNA の認識およ

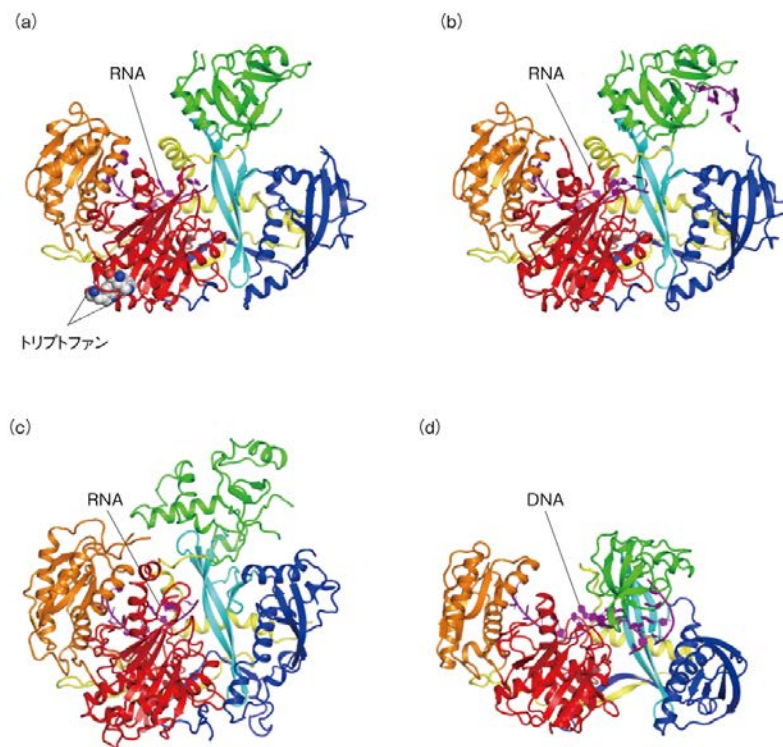


図 2 Ago の全体構造

- (a) ヒト Ago2<sup>31)</sup> (PDB ID : 4EI3).
- (b) ヒト Ago2<sup>30)</sup> (PDB ID : 4F3T).
- (c) *Kluyveromyces polysporus* Ago<sup>32)</sup> (PDB ID : 4F1N).
- (d) 高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* の Ago ホモログ<sup>27)</sup> (PDB ID : 3DLH).

構造の比較から、真核生物型 Ago および原核生物 Ago ホモログの全体構造がもつ種間におたる類似性をみてとることができる。

結合している RNA あるいは DNA を紫色で、L-トリプトファンを空間充填モデルで示す。青色 : N ドメイン, 水色 : L1 リンカー, 緑色 : PAZ ドメイン, 黄色 : L2 リンカー, オレンジ色 : MID ドメイン, 赤色 : PIWI ドメイン。

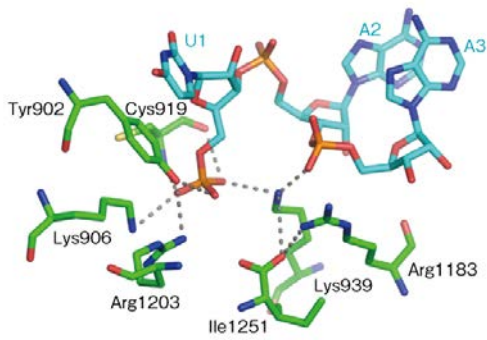


図3 ガイド鎖による5'-モノリン酸基の認識

ガイド鎖の1番目と3番目のリン酸基が5'末端結合ポケットにより認識されている。原核生物 Ago ホモログでは2つのリン酸基に  $Mg^{2+}$  が配位しているが、真核生物型 Ago では保存されたリジン残基 (Lys939) が同様の役割をはたしていた。残基番号は *K. polysporus* Ago に対応する。

び切断の分子機構をさぐるうえで、Ago に対する構造生物学的な理解は欠かすことができない。これまでに報告されていた Ago についての構造生物学的な知見は、個々のドメインを切り分けたレベルでの構造解析<sup>8-22)</sup>か、あるいは、生理的な機能のわかっていない原核生物の Ago ホモログ<sup>23-29)</sup>にかぎられていた。しかし、2012年4月から5月にかけて、ヒトに由来する Ago2<sup>30,31)</sup>、および、出芽酵母の一種である *Kluyveromyces polysporus* に由来する Ago<sup>32)</sup> (新着論文レビューでも掲載)の全長の結晶構造が報告され、真核生物における RNA サイレンシングの核心が明らかになった (図2)。

特筆すべきことに、今回、3つの研究グループから報告された真核生物型 Ago の立体構造は、どれも一本鎖 RNA と複合体を形成した状態において構造が決定されており (図2)、成熟体 RISC の構造を反映したものと考えられた。*K. polysporus* Ago およびヒト Ago2 の報告の一方では、タンパク質を発現させたときに非特異的に短い RNA が取り込まれていた<sup>31,32)</sup>。また、ヒト Ago2 のもうひとつ

の報告では、RNA を含まない空の Ago2 を精製することに成功し、そこに単一の RNA (ヒトの miRNA の一種である miR-20a) を取り込ませ結晶化を行った<sup>30)</sup>。

### 3. 真核生物型 Ago の立体構造の特徴

いずれの構造においても、ガイド鎖 RNA は、おもに5'末端から1~7番目のヌクレオチドにおいて Ago と結合していた<sup>30-32)</sup>。5'末端の塩基とモノリン酸基は、MID ドメインと PIWI ドメインとの境界部分にある5'末端結合ポケットにより認識されていた。原核生物の Ago ホモログと真核生物型 Ago の構造を比較すると、ガイド鎖の5'-モノリン酸が MID ドメインと PIWI ドメインとの境界部分にある結合ポケットに認識される様式に明らかな違いがみられた。興味深いことに、原核生物の Ago ホモログはリン酸基との相互作用に  $Mg^{2+}$  を用いていた<sup>14,15,27)</sup>、真核生物型 Ago ではこのような二価イオンの代わりに真核生物でのみ保存されているリジン残基の側鎖のもつアミノ基により同じ役割をはたされていた (図3)。

### 4. RNA 塩基のスタッキングとねじれ構造

Ago は、あらかじめガイド鎖の seed 領域を A 型ヘリックス様の構造に整列させることで、標的 RNA との塩基対の形成の際に生じる立体配置のエントロピーコストを低減させ、標的 RNA との塩基対の形成を開始するための“核”となる部位を提供していると考えられている<sup>16,27-29)</sup>。実際に、今回、決定された真核生物型 Ago の3つの構造すべてにおいて、ガイド鎖 RNA の2~6番目のリン酸-糖骨格は A 型らせん構造によく重ね合わさる配置をとって整列されており、塩基の部分は連続的にスタッキングしていた (図4)。その一方で、6番目と7番目の塩基のあいだ<sup>30-32)</sup>、および、9番目と10番目の塩基のあいだに<sup>30)</sup>、それぞれイソロイシン残基およびアルギニン残基が挿入されることによりねじれが生じており、RNA 塩基のスタッキングが途切れていることがわかった (図4)。ガイド

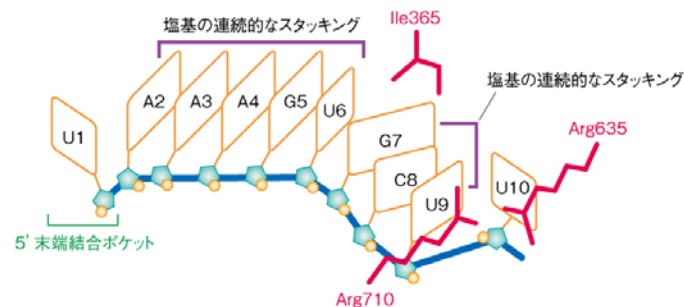


図4 ガイド鎖にみられる2つのねじれ構造

ヒト Ago2 と miR-20a との複合体の構造において、ガイド鎖の6番目と7番目の塩基のあいだにみられたねじれは、PAZ ドメインと MID ドメインとを結ぶ L2 リンカーに含まれるヘリックスにある Ile365 の側鎖が挿入されることでひき起こされていた。9番目と10番目の塩基のあいだにみられたもう1つのねじれは、2つのアルギニン残基 (Arg635 と Arg710) のスタッキング相互作用により生じていた。

鎖と標的 RNA とのあいだで整列したらせん構造をとりながら塩基対の形成が伸長する際には、これらのねじれが解消される必要がある。seed 領域における塩基対の形成がねじれを解消しながら段階的に進むとすれば、このような段階的な対合は標的 RNA の認識における校正機能をはたすと考えられる。実際に、真核生物型 Ago と同じようなねじれ構造は、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* の Ago ホモログのガイド鎖を含む構造の 7 番目と 8 番目の塩基のあいだにも弱いながらみられる<sup>27)</sup>。さらには、9 番目と 10 番目の塩基のあいだのアルギニン残基の挿入は、Ago が活性型の構造をとるためのスイッチとしての役割をはたしている可能性も考えられる。

## 5. 4 番目の活性残基の発見

Ago の PIWI ドメインは Asp-Asp-His (DDH) または Asp-Asp-Asp (DDD) という 3 残基の触媒中心を使って標的 RNA を切断すると長らく信じられてきた<sup>12,14,15,19,23,24,27-29)</sup>。しかしながら、*K. polysporus* Ago の構造において、PIWI ドメインのループに存在するグルタミン酸残基が活性中心に挿入されており、RNase H に似た Asp-Glu-Asp-Asp (DEDD) という 4 残基触媒中心の形成されていることが見出された<sup>32)</sup> (図 5)。この観点から再度、これまでに構造決定された原核生物の Ago ホモログや Ago の部分構造を検証してみると、新たにみつかった活性残基を含むループが活性中心に挿入された“plug-in”構造をとっているものがみられる一方で<sup>28,29)</sup>、活性中心に別のループが挿入され 4 残基触媒中心の形成がブロックされている“unplugged”構造がいくつかの Ago の結晶構造においてみられることが判明した<sup>19,27)</sup> (図 5)。ヒト Ago2 においても、*K. polysporus* Ago と同様に、新たにみつかった活性残基を含むループが活性中心に挿入された“plug-in”構造がみられた<sup>30,31)</sup>。現時点では、活性部位の構造がどのように plug-in と unplugged とのあ

いだで切り替わっているのかはわかっていないが、RNA との結合状態に対応して全体的なドメインの配置が変化することにより、活性型の 4 残基触媒中心がダイナミックに形成されている可能性がある。このように、4 番目の活性残基の発見は Ago の構造変化と生物学的な機能との密接な結びつきを示している。

## 6. 2 つのトリプトファン結合ポケット

Ago は標的 RNA の切断を触媒するだけではなく、下流で RNA サイレンシングに機能するタンパク質を動員するプラットフォームとしても機能する。これらのタンパク質の多くはグリシン残基とトリプトファン残基に富んだ領域 (GW リッチ領域) をもつという特徴がある。このような RNA サイレンシングに機能するタンパク質としてもっとも研究の進んでいる GW182 (TNRC6 としても知られている) は、GW リッチ領域を介して Ago に結合し、miRNA 経路における翻訳の抑制やポリ A 鎖の短縮に重要な役割をはたしている<sup>33)</sup>。では、GW182 はどのようにして Ago と結合するのだろうか？ ヒト Ago2 の報告の一方では、L-トリプトファンとの共結晶構造解析により PIWI ドメインに 2 つ並んで存在するトリプトファン結合ポケットが同定された<sup>31)</sup> (図 6)。この 2 つのポケットのあいだの距離は柔軟なアミノ酸リンカーの長さおよそ 8 残基分に相当しており、複数のトリプトファン残基が点在している GW リッチ領域に対する結合ポケットという性質に合致していた。過去の変異体解析の結果によると、今回、同定されたトリプトファン結合ポケットを破壊するような変異の導入は、Ago の RNA 結合能には影響をあたえず GW182 との結合を阻害する一方で<sup>19,34)</sup>、PAZ ドメインや MID ドメインへの変異の導入では、small RNA の結合を阻害するものの GW182 への結合に影響はみられない<sup>34-37)</sup>。これらの結果は、Ago において small RNA の取り込みと GW182 との結合とは独立して起こることを示し

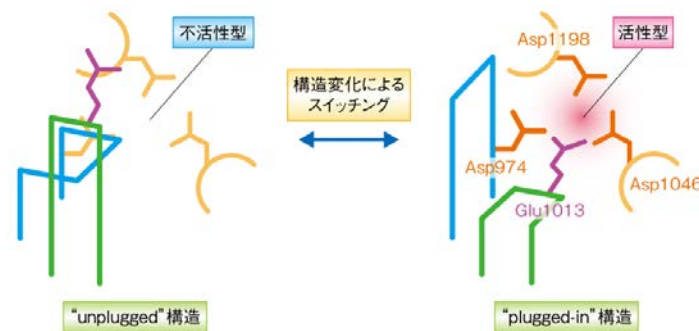


図 5 PIWI ドメインにあるスライサー活性部位は構造変化により活性型に切り替わる

左側は、青色で示すループが挿入されることにより活性部位がブロックされている“unplugged”構造。右側は、緑色で示すループが挿入されることにより保存されたグルタミン酸残基 (紫色) が RNase H 型の Asp-Glu-Asp-Asp (DEDD) モチーフを完成させている“plugged-in”構造。

残基番号は *K. polysporus* Ago に対応する。

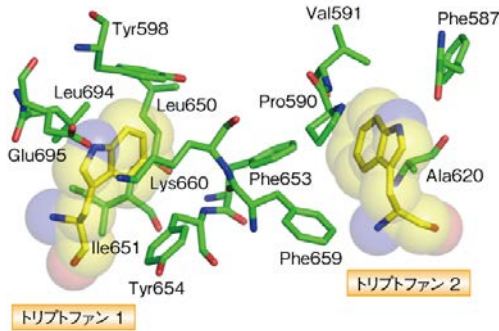


図6 L-トリプトファンの認識様式

ヒト Ago2 の PIWI ドメインに位置する 2 つのトリプトファン結合ポケットは、おもに疎水性相互作用によりトリプトファンと結合する。トリプトファン 1 は Glu695 と水素結合も形成している。

ている。

## おわりに

今回、報告された真核生物型 Ago の構造に関する 3 つの論文により、標的 RNA を正確に認識し遺伝子の発現を負に制御するという RISC の作用機序について、Ago の立体構造とその構造変化との密接なかかわりに新たな光があてられた。しかし、RISC そのものの形成過程についてはまだ多くの謎が残されている。RNA サイレンシングにおけるつぎの大きな課題は、RNA の取り込み、パッセンジャー鎖の放出、機能複合体の形成、標的 RNA のサイレンシング、そして、ターンオーバーの過程を解明することにほかならない。構造生物学のさらなる進歩が“RISC の一生”における Ago と RNA との動的な相互作用をより精密な視点から解き明かすことに期待したい。

## 文献

- 1) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K. et al.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811 (1998)
- 2) Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W. et al.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-498 (2001)
- 3) Tomari, Y. & Zamore, P. D.: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.*, 19, 517-529 (2005)
- 4) Hutvagner, G. & Simard, M. J.: Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 22-32 (2008)
- 5) Ghildiyal, M. & Zamore, P. D.: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.*, 10,

94-108 (2009)

- 6) Kawamata, T. & Tomari, Y.: Making RISC. *Trends Biochem. Sci.*, 35, 368-376 (2010)
- 7) Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A. et al.: Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293, 1146-1150 (2001)
- 8) Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. et al.: Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426, 465-469 (2003)
- 9) Yan, K. S., Yan, S., Farooq, A. et al.: Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 426, 468-474 (2003)
- 10) Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H. et al.: The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.*, 10, 1026-1032 (2003)
- 11) Ma, J. B., Ye, K. & Patel, D. J.: Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429, 318-322 (2004)
- 12) Parker, J. S., Roe, S. M. & Barford, D.: Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.*, 23, 4727-4737 (2004)
- 13) Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. et al.: Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 576-577 (2004)
- 14) Parker, J. S., Roe, S. M. & Barford, D.: Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, 434, 663-666 (2005)
- 15) Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G. et al.: Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434, 666-670 (2005)
- 16) Parker, J. S., Parizotto, E. A., Wang, M. et al.: Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein. *Mol. Cell*, 33, 204-214 (2009)
- 17) Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B.: Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465, 818-822 (2010)
- 18) Boland, A., Tritschler, F., Heimstadt, S. et al.: Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep.*, 11, 522-527 (2010)
- 19) Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S. et al.: Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 10466-10471 (2011)
- 20) Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J. B. et al.:

Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 903-910 (2011)

21) Zeng, L., Zhang, Q., Yan, K. et al.: Structural insights into piRNA recognition by the human PIWI-like 1 PAZ domain. *Proteins*, 79, 2004-2009 (2011)

22) Simon, B., Kirkpatrick, J. P., Eckhardt, S. et al.: Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure*, 19, 172-180 (2011)

23) Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. et al.: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305, 1434-1437 (2004)

24) Yuan, Y. R., Pei, Y., Ma, J. B. et al.: Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell*, 19, 405-419 (2005)

25) Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J. et al.: Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 340-349 (2005)

26) Rashid, U. J., Paterok, D., Koglin, A. et al.: Structure of *Aquifex aeolicus* argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. *J. Biol. Chem.*, 282, 13824-13832 (2007)

27) Wang, Y., Sheng, G., Juraneck, S. et al.: Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456, 209-213 (2008)

28) Wang, Y., Juraneck, S., Li, H. et al.: Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 456, 921-926 (2008)

29) Wang, Y., Juraneck, S., Li, H. et al.: Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 461, 754-761 (2009)

30) Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Haase, A. D. et al.: The structure of human Argonaute-2 in complex with

miR-20a. *Cell*, 150, 100-110 (2012)

31) Schirle, N. T. & MacRae, I. J.: The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, 336, 1037-1040 (2012)

32) Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P. et al.: Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 486, 368-374 (2012)

33) Huntzinger, E. & Izaurralde, E.: Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.*, 12, 99-110 (2011)

34) Eulalio, A., Helms, S., Fritzsche, C. et al.: A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA*, 15, 1067-1077 (2009)

35) Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J. et al.: A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.*, 7, 1261-1266 (2005)

36) Miyoshi, K., Okada, T. N., Siomi, H. et al.: Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *RNA*, 15, 1282-1291 (2009)

37) Rudel, S., Wang, Y., Lenobel, R. et al.: Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Res.*, 39, 2330-2343 (2011)

## 著者プロフィール

佐々木 浩 (Hiroshi M. Sasaki)

略歴: 2011年 東京大学大学院理学系研究科博士課程 修了, 同年より東京大学分子細胞生物学研究所 助教.

研究テーマ: 1分子イメージングによる RISC 形成の解析.

関心事: 何を研究するかというテーマ以上に, どうやって研究するかというアプローチのことをいつも考えてしまいがちです.

泊 幸秀 (Yukihide Tomari)

東京大学分子細胞生物学研究所 准教授.

研究室 URL: <http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/tomari/>