

学位論文

生殖巣ゲノムを保護する RNA サイレンシング因子の
構造機能解析

(Structural and functional analyses of RNA silencing
factors involved in genome defense in animal gonads)

平成 27 年 12 月 博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

松本 直樹

指導教員 濡木 理

目次

要旨	7
Abstract	9
略語一覧	11
アミノ酸略称一覧	12
序	13
序章の図表	17
第一章 Maelstrom の構造機能解析	19
1.1 Maelstrom	19
1.2 Mael の生化学的機能	19
1.3 piRNA 経路における Mael の機能	19
1.3.1 ショウジョウバエ	20
1.3.2 マウス	20
1.4 本研究の目的	21
1.5 材料および方法	21
1.5.1 FL-DmMael のコンストラクト設計	21
1.5.2 FL-DmMael の大量培養および精製	22
1.5.3 構造解析に向けた安定な領域の探索	22
1.5.4 DmMAEL のコンストラクト設計	23
1.5.5 DmMAEL の精製	23
1.5.6 DmMAEL の結晶化	24
1.5.7 DmMAEL 結晶の X 線回折データ収集	24
1.5.8 DmMAEL 結晶の X 線回折データ処理	25
1.5.9 DmMAEL Cys 変異体の発現系の構築および精製	25
1.5.10 DmMAEL Cys 変異体の結晶化	25
1.5.11 DmMAEL _{C228S} の X 線回折データ収集	26
1.5.12 DmMAEL _{C228S} の X 線回折データ処理および位相決定	26
1.5.13 DmMAEL _{C228S} 構造のモデル構築および精密化	26
1.5.14 DmMAEL の核酸切断実験に向けた精製系の改良	27

1.5.15 BmMAEL の発現系の構築および精製	27
1.5.16 MmMAEL の発現系の構築および精製	28
1.5.17 MAEL ドメインの核酸切断実験	29
1.5.18 OSC を用いたレスキューアッセイ	31
1.6 結果と考察	32
1.6.1 FL-DmMael の調製	32
1.6.2 構造解析に向けた安定な領域の探索	32
1.6.3 DmMAEL の調製	33
1.6.4 DmMAEL の結晶化および X 線回折実験	33
1.6.5 DmMAEL Cys 変異体の調製	33
1.6.6 DmMAEL Cys 変異体の結晶化	34
1.6.7 DmMAEL Cys 変異体の X 線回折実験	34
1.6.8 DmMAEL _{C228S} の位相決定および構造精密化	35
1.6.9 DmMAEL の全体構造	35
1.6.10 DmMAEL の構造学的洞察	35
1.6.11 DmMAEL の核酸切断実験	37
1.6.12 BmMAEL および MmMAEL の調製	39
1.6.13 BmMAEL および MmMAEL の核酸切断実験	39
1.6.14 DmMAEL 変異体を用いた核酸切断実験	40
1.6.15 OSC を用いたレスキューアッセイ	42
1.6.16 Mael の piRNA 経路における役割	43
1.6.17 Mael の RNA 切断メカニズム	45
1.7 まとめと展望	47
第一章の図表	48
第二章 PIWI サブファミリータンパク質の結晶構造解析	74
2.1 Argonaute タンパク質	74
2.2 Argonaute に結合する小分子 RNA	74
2.2.1 miRNA	74
2.2.2 siRNA	75
2.2.3 piRNA	75
2.3 RISC	75

2.3.1 miRISC および siRISC.....	76
2.3.2 piRISC.....	76
2.4 Argonaute の構造生物学的研究の流れ.....	76
2.4.1 原核生物由来 Argonaute ホモログの結晶構造解析.....	77
2.4.2 真核生物由来 AGO タンパク質の結晶構造解析	77
2.4.3 PIWI サブファミリータンパク質の構造生物学的研究の流れ	78
2.5 PIWI タンパク質の生化学的解析.....	79
2.6 高品質なモノクローナル抗体の作製.....	79
2.6.1 抗 MARWI 抗体.....	79
2.6.2 抗 Siwi 抗体	80
2.7 本研究の目的.....	80
2.8 材料および方法	80
2.8.1 抗 MARWI 抗体カラムの作製.....	80
2.8.2 抗体カラムを用いたマウス精巣由来 MIWI の精製系の構築 (1).....	81
2.8.3 抗体カラムを用いたマウス精巣由来 MIWI の精製系の構築 (2).....	82
2.8.4 MIWI のスライサー活性測定.....	83
2.8.5 MIWI の結晶化.....	83
2.8.6 MIWI 結晶を用いた X 線回折実験.....	85
2.8.7 精製 MIWI のリジンメチル化.....	85
2.8.8 MIWI _{LysMet} の結晶化	86
2.8.9 MIWI _{LysMet} 結晶を用いた X 線回折実験	86
2.8.10 抗 Siwi 抗体カラムの作製.....	87
2.8.11 抗体カラムを用いた BmN4 由来 Siwi の精製系の構築.....	87
2.8.12 Siwi の結晶化	88
2.8.13 Siwi 結晶を用いた X 線回折実験	88
2.8.14 Siwi の X 線回折データ処理およびモデル構築	88
2.9 結果と考察	89
2.9.1 抗体カラムを利用した, PIWI タンパク質精製系の構築に向けて	89
2.9.2 抗体カラムを利用した, マウス精巣由来 MIWI 精製系の構築 (1).....	90
2.9.3 抗体カラムを利用した, マウス精巣由来 MIWI 精製系の構築 (2).....	91
2.9.4 精製 MIWI のスライサー活性測定	92

2.9.5 MIWI の結晶化.....	92
2.9.6 MIWI 結晶の X 線回折実験	93
2.9.7 MIWI _{LysMet} の調製.....	94
2.9.8 MIWI _{LysMet} の結晶化	94
2.9.9 MIWI _{LysMet} の X 線回折実験.....	95
2.9.10 PIWI タンパク質の結晶構造決定に向けたストラテジーの改良.....	95
2.9.11 抗体カラムを利用した, BmN4 由来 Siwi 精製系の構築	96
2.9.12 Siwi の結晶化および X 線回折実験.....	96
2.9.13 Siwi の位相決定および構造精密化.....	96
2.9.14 Siwi の全体構造.....	97
2.9.15 Siwi と hAgo2 の全体構造比較.....	98
2.9.16 核酸結合チャネル	99
2.9.17 AGO subfamily タンパク質特異的な挿入配列が全体構造におよぼす影響	100
2.9.18 PAZ ドメインによるガイド鎖 RNA の 3' セグメント認識	101
2.9.19 MID/PIWI ドメインによるガイド鎖 RNA の 5' セグメント認識	102
2.9.20 ガイド鎖 RNA の 5' 末端塩基バイアス.....	103
2.9.21 触媒テトラッドの形成	105
2.9.22 ガイド鎖 RNA の軌道	106
2.9.23 piRNA-標的 RNA 結合モデル.....	107
2.9.24 t1A 結合ポケット.....	108
2.10 まとめと展望.....	109
第二章の図表.....	111
総括	146
参考文献	147
外部発表	158
発表論文.....	158
学会発表.....	158
謝辞	160

要旨

RNA サイレンシングは遺伝子発現制御機構のひとつとして重要な役割を担う。高等真核生物の生殖巣には利己的なトランスポゾンの転移によるゲノム損傷を防御する、いわば免疫システムとして RNA サイレンシング経路がはたらく。Argonaute タンパク質の PIWI サブファミリータンパク質と 23–30 塩基長の piRNA (PIWI-interacting RNA) がこのシステムの中核をなす。近年、遺伝学および細胞生物学的手法により複数の因子が piRNA 経路を介したトランスポゾン抑制に関与する因子として同定されてきたが、未だ個々の因子の生理機能解明には至っていない。本研究では以下に示す 2 つの piRNA 経路因子に着目し、X 線結晶構造解析および機能解析を通じて、それらがいかに piRNA を介したトランスポゾン抑制に関与するか、その分子基盤を明らかにすることを試みた。

Maelstrom の構造機能解析

Maelstrom (Mael) は進化的に保存されたタンパク質であり、ショウジョウバエやマウスなどにおいて piRNA を介したトランスポゾン抑制に関与する。Mael は N 末端の核酸結合モジュールの HMG ドメインと中央の MAEL ドメインからなる。MAEL ドメインはバイオインフォマティクス解析により RNase H 様フォールドをとると予想されていたものの、予測の域を出ず構造および生化学的機能に関する知見は得られていなかった。そのため Mael が piRNA 経路にかかわる分子機構について不明な点が多く残されていた。本研究ではショウジョウバエ由来 Mael の MAEL ドメイン (DmMAEL) の結晶構造を X 線結晶構造解析により分解能 1.6 Å で決定した。結晶構造から DmMAEL は RNase H 様フォールドをとっていたが、様々なエンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼを含む RNase H 様タンパク質群に高度に保存された触媒残基は DmMAEL には失われていた。しかしながら予想外に、生化学的解析により MAEL ドメインは一本鎖 RNA 切断酵素であること、そしてその切断活性は種を越えて保存されていることが明らかになった。さらにショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 (OSC) を用いた解析により、OSC における piRNA を介したトランスポゾン抑制には Mael の一本鎖 RNA 切断活性は関与しないことが示唆された。

PIWI タンパク質の構造解析

Argonaute は RNA サイレンシングの中核因子であり、小分子 RNA と結合して RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるエフェクター複合体を形成し、配列依存的に標的 RNA を制御する。Argonaute は発現部位や結合する小分子 RNA などにより AGO サブファミリーと PIWI サブファミリーに分類される。近年、高等真核生物由来 AGO タンパク質の全長構造が結晶構造解析により明らかになり、その作動機構などが明らかになってきた。一方で、PIWI タンパク質に関しては全長構造が未だ明らかとなっていない。その一因として PIWI タンパク質の高純度での精製が困難であることが挙げられる。本研究では、PIWI-piRNA 複合体の結晶構造を決定し、piRNA を介したトランスポゾン抑制の構造基盤を解明することを目的とした。そのために動物由来生殖細胞から PIWI タンパク質を精製する系を確立し、カイコ卵巣生殖細胞由来培養細胞 BmN4 から精製した Siwi の結晶構造を分解能 2.4 Å で決定した。Siwi は BmN4 内在発現性の piRNA と結合していた。Siwi と hAgo2 の構造比較によって、N ドメインの配向に差異があることがわかり、この違いが PIWI タンパク質と AGO タンパク質の生化学的機能の違いを生み出すことが示唆された。

Abstract

RNA silencing plays a key role in regulating gene expression. In animal gonads, a small RNA-based immune system acts to maintain the genome integrity against selfish transposable elements. The PIWI clade of Argonaute family proteins and their associated 23- to 30-nt PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are at the core of this defense system. Recently, genetic and cell-biological studies have identified several piRNA pathway factors. However, the physiological function of each factor remains elusive. In this study, I focused on two piRNA pathway factors as shown below. Using X-ray structural analysis and functional analysis, I tried to elucidate the molecular mechanism by which these factors participate in piRNA-mediated transposon silencing.

Structural and functional analyses of Maelstrom

Maelstrom (Mael), an evolutionarily conserved protein, participates in piRNA-mediated transposon silencing in animals such as flies and mice. Mael is composed of an N-terminal nucleic acid-binding module high-mobility-group (HMG) domain and a central MAEL domain. A bioinformatics analysis has predicted that the MAEL domain has an RNase H-like fold, but its structural and biochemical information remains unavailable. Accordingly, the mechanism by which Mael is involved in the piRNA pathway remains elusive.

In this study, I determined the crystal structure of the MAEL domain from *Drosophila melanogaster* Mael (DmMAEL) at 1.6 Å resolution. The structure revealed that DmMAEL adopts the RNase H-like fold but lacks canonical catalytic residues highly conserved among RNase H-like superfamily of endonucleases and exonucleases. Unexpectedly, a biochemical analysis showed that the MAEL domain exhibits a single-stranded RNA endonuclease activity beyond species. A cell-based analysis using cultured *Drosophila* ovarian somatic cells (OSCs) suggested that the endoribonuclease activity of Mael appears to be unrelated to piRNA-mediated

transposon silencing in *Drosophila* OSCs.

X-ray structural analysis of PIWI subfamily proteins

Argonaute, a central player in RNA silencing machinery, binds to small RNAs and forms an effector complex termed RNA-induced silencing complex (RISC), which controls their target RNAs in a sequence-specific manner. Argonaute family proteins are divided into AGO subfamily and PIWI subfamily based on their expression site, associated small RNAs, and so on. Recent X-ray structural analyses of several eukaryotic AGO proteins have revealed the molecular mechanism of AGO-mediated gene silencing. On the other hand, the overall structure of PIWI proteins has not been determined, partly due to the difficulty in obtaining PIWI proteins with high purity.

In this study, I tried to determine the crystal structure of PIWI protein and elucidate the molecular mechanism of PIWI-mediated transposon silencing. To this end, I developed a strategy for purification of PIWI-piRNA complex from animal germline using monoclonal antibody-based purification method. I purified Siwi, a silkworm homologue of PIWI, from BmN4, a *Bombyx* ovary-derived germ cell line, and determined the 2.4 Å resolution crystal structure of Siwi loaded with endogenous piRNAs. A structural comparison of Siwi with hAgo2 revealed a striking difference in the position of the N domain, which may contribute to the AGO subfamily- and PIWI subfamily-specific biochemical functions.

略語一覽

略語	正式名称
ATP	adenosine tri-phosphate
β -ME	beta-mercaptoethanol
ChIP	chromatin immunoprecipitation
c.p.m.	count per minute
DNA	deoxyribonucleic acid
ds	double-stranded
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
kDa	kilodalton
mRNA	messenger RNA
nt	nucleotide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RI	radioisotope
rmsd	root mean square deviation
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNA pol II	RNA polymerase II
SAD	single wavelength anomalous diffraction
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SeMet	selenomethionine
ss	single-stranded
TEV	tobacco etch virus
WT	wild type

アミノ酸略称一覧

一文字略称	三文字略称	正式名称
A	Ala	alanine
C	Cys	cysteine
D	Asp	aspartic acid
E	Glu	glutamic acid
F	Phe	phenylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	methionine
N	Asn	asparagine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	serine
T	Thr	threonine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophan
Y	Tyr	tyrosine

序

RNA サイレンシング

遺伝子発現は生体内で複雑に制御されており，制御システムの異常・破綻は生体に悪影響を及ぼす．ゲノムにコードされた 20–30 塩基程度の小分子 RNA がパートナータンパク質 Argonaute と協調して配列依存的に標的 RNA の発現を制御する機構は RNA サイレンシングとよばれる．RNA サイレンシングは細胞の発生・分化・細胞死・ウイルス感染防御など，複雑な遺伝子発現制御システムのひとつとして多岐にわたる生命現象にかかわる．Argonaute はサブタイプによってエンドリボヌクレアーゼ活性（スライサー活性）を示す．Argonaute と小分子 RNA は RISC (RNA-induced silencing complex) とよばれる複合体を形成し，RISC は配列依存的に標的 RNA の切断・標的 RNA の不安定化・ヘテロクロマチン化などを誘導することで標的 RNA の転写抑制あるいは転写後抑制を司る (図 0-1)¹⁻³．RISC の中核因子 Argonaute は AGO サブファミリーと PIWI サブファミリーに大別され，それぞれ発現部位・結合する小分子 RNA の塩基長・小分子 RNA の取り込み機構・標的 mRNA の抑制機構などが異なる．小分子 RNA として主に siRNA (small interfering RNA), miRNA (microRNA), piRNA (PIWI-interacting RNA) の 3 種類が知られており，siRNA および miRNA は AGO タンパク質に結合するのに対して，piRNA はその名の通り PIWI タンパク質に結合する．Argonaute および小分子 RNA に関して第二章にて詳細に取り扱う．

piRNA とトランスポゾン

ゲノムにはトランスポゾンと呼ばれる動く遺伝子が存在する．トランスポゾンがゲノム上を転移するとゲノム情報が書き換えられることとなり，ゲノム損傷につながりうる．動物の生殖細胞のゲノムにおいてトランスポゾンによるゲノム損傷が起こると，次世代にそうした異常な情報が受け継がれることになる．こうしたトランスポゾンの脅威からゲノムを保護するシステムとして小分子 RNA のひとつ，piRNA を介した RNA サイレンシング機構が生殖巣において機能することが近年明らかになってきた．

PIWI タンパク質とそれに結合する小分子 RNA である piRNA は主に生殖巣特異的に発現する。PIWI は P-element induced wimpy testis の略であり、元々はショウジョウバエを用いた遺伝学により *piwi* 遺伝子が生殖幹細胞の自己新生や分裂制御に必要であることから同定された⁴⁻⁶。その後、PIWI タンパク質欠損変異体ではトランスポゾンの発現が亢進することが示され、トランスポゾンの抑制にも関与することが明らかになった⁷⁻⁹。

2003 年にショウジョウバエの生殖巣に豊富に発現しトランスポゾンなどの反復配列に由来する小分子 RNA として rasiRNA (repeat-associated small interfering RNA) が同定され¹⁰、のちに PIWI タンパク質は rasiRNA に結合することが示された^{8,11-13}。さらに、2006 年になって哺乳類の PIWI タンパク質に結合する小分子 RNA として piRNA が同定された¹⁴⁻¹⁷。現在は rasiRNA は piRNA の一種であると認識されている。シーケンス解析からショウジョウバエやマウスそしてゼブラフィッシュにおいて多くの piRNA はトランスポゾンに相補的な配列、あるいはトランスポゾン配列に富んでいることが明らかになった^{11-13,18,19}。このように PIWI-piRNA 複合体がトランスポゾンを配列依存的に認識しそのはたらきを抑制するというモデルが定着するようになった²⁰⁻²⁴。

piRNA 経路

PIWI-piRNA 複合体はトランスポゾン抑制の中枢をなすが、それだけでは不十分である。これまでの主にショウジョウバエ・マウスをモデル生物とした遺伝学および細胞生物学的解析や近年の遺伝学的手法を用いた大規模スクリーニングにより piRNA を介したトランスポゾン抑制機構は PIWI タンパク質の他にも多くのタンパク質因子を必要とする非常に複雑なシステムであることが明らかになってきた。

piRNA 経路は大きく分けて piRNA を産生するステージと産生した piRNA を介してトランスポゾンを抑制するステージに分類され、それぞれのステージで様々な因子が協調してはたらく。生物種によって各経路は少し異なっており、以下では piRNA 経路の理解がもっとも進んでいる例としてショウジョウバエ卵巣における piRNA 経路のモデルを述べる (図 0-2)。

ショウジョウバエにおける piRNA 経路

ショウジョウバエの卵巢は哺育細胞や卵細胞などの生殖細胞と、それを取り囲む濾胞細胞という生殖系体細胞から構成される。この卵巢体細胞にも piRNA 経路が機能しているが生殖細胞とは発現する piRNA、標的とするトランスポゾン、はたらく piRNA 経路因子が異なる。ショウジョウバエのゲノムには 3 つの PIWI タンパク質 Piwi, Aubergine (Aub), Argonaute3 (AGO3) がコードされており、生殖細胞には 3 種類すべてが発現しているのに対して、体細胞には Piwi のみが発現しており Aub, AGO3 は発現していない。

piRNA 産生

piRNA 前駆体は piRNA クラスタとよばれる 100 kb にもおよぶゲノム上の特定領域から転写される^{12,25}。piRNA 前駆体は細胞質に輸送された後、何らかのヌクレアーゼにより切断され数百塩基の piRNA 中間体となる。さらに近年、この piRNA 中間体はミトコンドリア膜上に局在する Zucchini というエンドヌクレアーゼなどにより切断され、30 塩基長ほどの piRNA に成熟化することが明らかになった²⁶⁻²⁹。このようにして産生される piRNA を一次 piRNA とよぶ。

一次 piRNA 産生経路に加えて、PIWI タンパク質 Aub・AGO3 のスライサー活性依存的に piRNA が産生される機構が存在する。Aub はアンチセンス鎖由来 piRNA と結合し、センス鎖由来トランスポゾン転写産物を切断する^{8,11}。この切断産物は分解されず AGO3 に受け渡される。AGO3 と結合したセンス鎖由来 piRNA は成熟化の後、アンチセンス鎖由来転写産物を配列依存的に認識し標的として切断する^{12,13}。このアンチセンス鎖由来切断産物は Aub に受け渡され、やがて成熟化する。このようにして、Aub と AGO3 が piRNA を増幅するとともに、トランスポゾン由来 mRNA を切断することで転写後抑制している。PIWI タンパク質のスライサー活性依存的に産生される piRNA は二次 piRNA とよばれ、二次 piRNA 産生経路はその特徴を反映してピンポンサイクルとよばれる。ピンポンサイクルは細胞質の nuage とよばれる核周辺の顆粒構造で行われる。

二次 piRNA 産生経路には Aub, AGO3 が関与するが、Piwi は関与しない^{25,30}。したがって、卵巢生殖細胞では一次 piRNA および二次 piRNA がともに産生される一方、

卵巣体細胞では一次 piRNA のみが産生される。

トランスポゾン抑制

PIWI-piRNA 複合体はトランスポゾン抑制において転写後抑制および転写抑制の両方に関与する。前者では上で述べたように細胞質において Aub・AGO3 のスライサー活性により標的 mRNA を直接切断する。一方、後者では Piwi のみに関与する。

Piwi は細胞質において成熟型 piRNA を取り込んだ後、核内に移行する。核内において Piwi-piRNA 複合体はトランスポゾンのゲノム領域のヒストンメチル化修飾を誘導する³¹⁻³⁴。このように Piwi-piRNA 複合体はトランスポゾン領域のヘテロクロマチン形成を促進することでエピジェネティックにその転写を制御する。

本研究の目的

以上のように piRNA を介したトランスポゾン抑制機構は、中核因子である PIWI タンパク質に加えて多くの因子が協調してはたらく非常に複雑な機構となっており、その全貌解明には種々の piRNA 経路因子の生理機能を明らかにすることが必須である。

本研究では 2 つの piRNA 経路因子, Maelstrom, PIWI タンパク質に焦点を当て、結晶構造解析および機能解析を通してそれらの生理機能を解明することを目的とした。

序章の図表

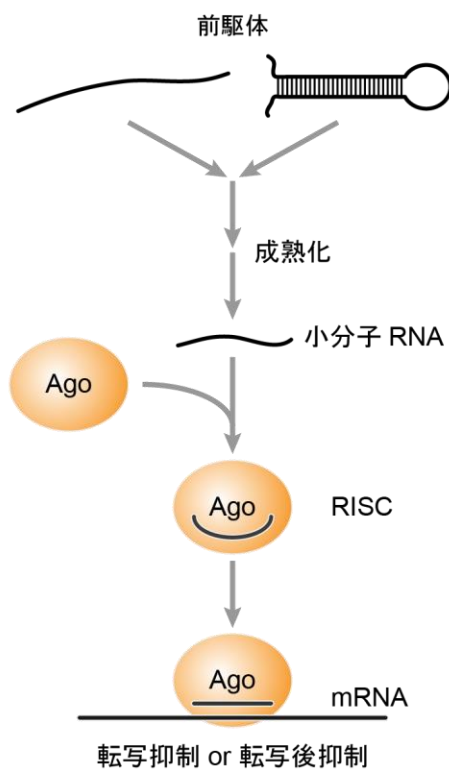


図 0-1 RNA サイレンシングの概略図

Argonaute は小分子 RNA と結合し RISC を形成する。RISC は配列依存的に標的 mRNA を認識し、その転写抑制あるいは転写後抑制を司る。

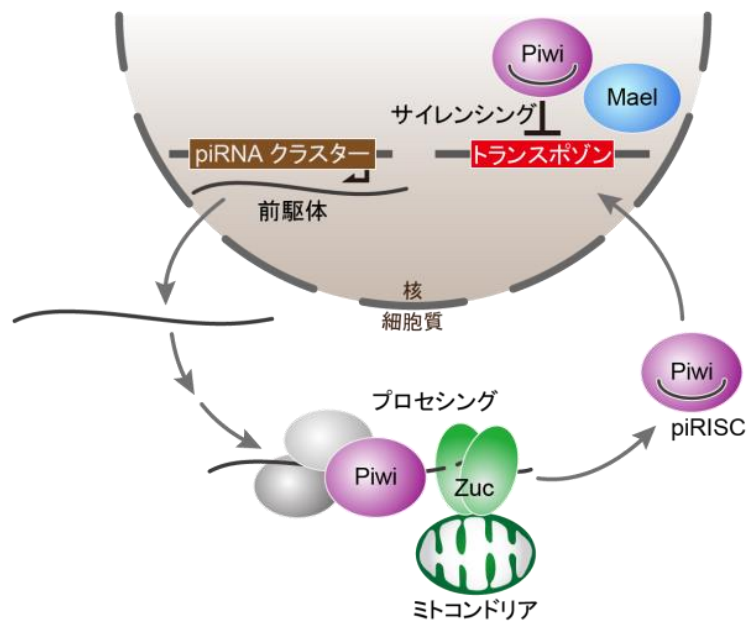


図 0-2 ショウジョウバエ卵巣体細胞における piRNA 経路

piRNA クラスターより転写された piRNA 前駆体は核外に移行した後、Zucchini などによりプロセッシングされ成熟型となる。成熟型 piRNA をとりこんだ Piwi は核内に移行し、トランスポゾン領域のヘテロクロマチン化を誘導することでトランスポゾンの転写を抑制する。

第一章 Maelstrom の構造機能解析

1.1 Maelstrom

Maelstrom (Mael) は元々 *mael* 欠損変異ショウジョウバエの卵形成初期において細胞極性・軸形成が異常を示しその個体は不妊となることから同定されたタンパク質である^{35,36}。その後、複数の研究グループによって Mael は piRNA 経路を介したトランスポゾン抑制に加えてさまざまな生命現象に関与する多機能タンパク質であることが報告された。たとえばショウジョウバエ卵巣の卵形成において複数の役割を果たす。Mael は後述の HMG ドメインを介して miRNA の一種, *miR-7* のプロモーター領域に結合し、その発現を抑制することで生殖幹細胞の正常な分化に関与すると報告されており³⁷、また卵巣において Mael は γ チューブリンなどの微小管形成中心の構成因子と相互作用し、微小管形成を制御する³⁸ という知見も得られている。別の研究ではリン酸化酵素 Polo により Mael はリン酸化され、減数分裂期のチェックポイントを不活性化することで卵母細胞の決定に関与する³⁹ との報告がある。

1.2 Mael の生化学的機能

Mael は動物に高度に保存されており、N 末端に位置する核酸結合モジュールの HMG (high-mobility group) ドメインと中央に位置する機能未知の MAEL ドメインから構成される (図 1-1)。一般的に HMG ドメインは転写因子などにみられ二本鎖 DNA に結合する⁴⁰ ことから、Mael の HMG ドメインも同様に核酸に結合すると考えられてきた。しかしながら、最近になってマウス由来 Mael の HMG ドメインは二次構造をとった一本鎖 RNA に結合することが生化学的解析により示された⁴¹。一方、MAEL ドメインはその名の通り Mael に特徴的なドメインであり、これまでバイオインフォマティクス解析によって特定のヌクレアーゼに共通して見られる RNase H 様フォールドをとることが予測されていた⁴²。しかしながら予測の域を出ず、実験的にヌクレアーゼ活性をもつのかを示した例はなく、MAEL ドメインの生化学的機能も不明であった。

1.3 piRNA 経路における Mael の機能

1997 年に Mael が同定されて以降³⁵、ショウジョウバエやマウスをモデル生物とした遺伝学や細胞生物学的研究により、Mael が piRNA 経路に関与することが明らかに

なってきた。近年、*Mael* の piRNA における機能に焦点をあてた研究によりその理解が徐々に深まってきた。以下それぞれのモデル生物ごとに先行研究により得られた *Mael* の機能的知見を述べる。

1.3.1 ショウジョウバエ

mael 欠損変異体の卵巣において、生殖細胞特異的に発現する *HeT-A*, *TAHRE*, *TART* などのテロメア由来トランスポゾンに対する piRNA の産生量の減少およびトランスポゾンの脱抑制がおこる^{31,43}。また *Mael* は卵巣生殖細胞において核と二次 piRNA 産生経路が機能する *nuage* の両方に局在し、それらを往復する^{38,43,44}。これらよりショウジョウバエの生殖細胞において *Mael* は piRNA 産生にかかわることが示唆された。

一方、卵巣生殖細胞（卵母細胞，哺育細胞）を取り囲む濾胞細胞などの生殖系列体細胞において、*Mael* は生殖細胞中とは異なる役割を果たす。ショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 OSC (ovarian somatic cell) を用いた近年の研究により、*Mael* はトランスポゾンの転写抑制には必須であるが、体細胞における piRNA 産生には関与しないことが示された³¹。OSC において Piwi-piRNA 複合体を介してトランスポゾン領域にヒストン H3K9me3 修飾が誘導され、トランスポゾンの転写が抑制される³¹。*piwi* をノックダウンした OSC ではヒストン H3K9me3 修飾が誘導されなくなりトランスポゾンの発現は亢進する³¹。その一方で、興味深いことに *mael* をノックダウンした OSC ではヒストン H3K9me3 修飾はあまり影響をうけず保たれていたにも関わらず、トランスポゾンの発現が亢進していた³¹。このことからヒストン H3K9me3 修飾だけでは OSC におけるトランスポゾン抑制には不十分であり、さらに下流であるいは並行して機能する経路が存在すること、そして *Mael* はそれらの経路にてはたらくことが示唆された (図 1-2a)³¹。さらに卵巣におけるトランスポゾン抑制には *Mael* のなかでも MAEL ドメインが主に重要な役割を果たすことが示された³¹。

1.3.2 マウス

マウスのゲノムには MILI, MIWI, MIWI2 の 3 つの PIWI タンパク質がコードされているが、マウス精巣においてこれらの PIWI タンパク質はそれぞれ精子形成過程でステージ特異的な発現パターンを示す^{21,24}。さらに piRNA の発現パターンも精子形成過程

で異なる。たとえば MIWI は第一減数分裂前期のパキテン期以降に発現し、pachytene piRNA に結合する。

Mael はマウス精巣の精母細胞や円形精子細胞において核と細胞質の nuage 様構造 (マウスでは pi-P body あるいは chromatoid body とよばれる) に局在する⁴⁵⁻⁴⁷。mael 欠損変異マウスの精巣において piRNA は正常に産生されなくなり L1 や IAP といったトランスポゾンが発現が脱抑制される⁴⁵⁻⁴⁷。これより Mael はマウス精巣において piRNA 産生に関与することが示唆されていた。近年、成体マウス精巣抽出液を用いた免疫沈降実験により Mael の相互作用因子が詳細に調べられ、PIWI タンパク質の MIWI や Tudor ドメインタンパク質の Tdrd6 などが Mael の相互作用因子として同定された⁴⁷。さらに RNA 免疫沈降実験および RNA 配列解析から、この Mael 複合体は MIWI に結合する piRNA である pachytene piRNA の前駆体を含むことが明らかになった⁴⁷。mael 欠損変異体精巣では pachytene piRNA 産生量が減少するというデータも併せて、Mael 複合体は pachytene piRNA 前駆体の断片化に関与することが示唆された (図 1-2b)⁴⁷。

1.4 本研究の目的

以上のように Mael は piRNA 経路に依って異なる機能を果たすことがわかってきた。しかしながら Mael の構造および機能的知見はまだ充分ではないため、Mael がどのように piRNA 経路に関与するかについて不明な点が多く残されていた。

本研究では X 線結晶構造解析により Mael の結晶構造を決定し、立体構造情報に基づいて機能解析を行うことにより、Mael が piRNA を介したトランスポゾン抑制に関与するメカニズムを解明することを目的とした。

1.5 材料および方法

1.5.1 FL-DmMael のコンストラクト設計

Drosophila melanogaster 由来 全長 Mael (1-459 残基, 以降 FL-DmMael と記す) をコードした DNA 領域を pBlueScript-FL-DmMael ベクターを鋳型として PCR 法により増幅し、pET28a (Novagen) 改変ベクターに挿入した。鋳型としたベクターは東京大学 塩見美喜子博士より譲与して頂いた。なお、pET28a 改変ベクターは thrombin 切断部位を Turbo3C Protease 切断部位に置換したものであり、目的遺伝子の N 末端に連続

した 6 つのヒスチジン (His タグ) が付加される設計となっている。

1.5.2 FL-DmMael の大量培養および精製

作製した改変 pET28a-FL-DmMael を用いて形質転換した大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株 (Novagen) を 50 µg/ml カナマイシンを含む LB 培地にて 37°C で培養した。培養液の OD₆₀₀ が 0.5 まで達した時点で終濃度 0.1% となるように IPTG を添加し、15°C で 18 時間培養した。培養液を遠心し (5,000 g, 10 分) 菌体を回収した後、ペレットを可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol) に懸濁した。超音波破碎を行った後、破碎液を遠心し (40,000 g, 30 分)、上清を回収した。可溶化バッファーで平衡化済みの Ni-NTA Superflow (QIAGEN) と上清を混合し、1 時間緩やかに転倒混和した。エコノカラム (Bio-Rad) に上清をロードし素通り画分を流した後、10 カラム容量の可溶化バッファーで洗浄を行った。その後、溶出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol) を 5 カラム容量流し、目的タンパク質を溶出した。溶出タンパク質に Turbo3C Protease (Nacalai Tesque) を添加し、透析バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 3 mM β-ME) で一晩透析しながら 4°C で His タグを切断した。切断処理後、Ni-NTA Superflow と混ぜ素通り画分を回収した。NaCl 濃度が 60 mM となるように素通り画分を希釈し、陰イオン交換カラム Resource Q (GE Healthcare) にロードし Resource Q バッファー A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 5% glycerol) と Resource Q バッファー B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol) を用いて 60–1000 mM NaCl の濃度直線勾配をかけてタンパク質を溶出した。さらにゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) で平衡化した Hiload 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) にかき、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。なお、各ステップで SDS-PAGE を行い、SimplyBlue Safestain (Invitrogen) によりゲルを染色することでサンプルの純度を確認した。精製した FL-DmMael は -80°C で凍結保存した。

1.5.3 構造解析に向けた安定な領域の探索

結晶化に適した高発現量の安定な領域をさがすため、トリプシンを用いた限定分解を

行った。精製した FL-DmMael とトリプシンを 1:1/5 ~ 1:1/20 (w/w) で混合し、室温で 20 分間反応させた。その後、SDS-PAGE により切断パターンを調べた。得られたバンドを PVDF 膜に転写し、N 末端解析を行った。なお、N 末端解析は理化学研究所 堂前直博士との共同研究として行った。N 末端解析の結果および FL-DmMael のディスオーダー予測 (DISOPRED2 : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) より安定なフラグメントを同定した。

1.5.4 DmMAEL のコンストラクト設計

D. melanogaster 由来 MAEL ドメイン (84-333 残基, 以降 DmMAEL と記す) をコードした DNA 領域を前項の pET28a 改変ベクターに挿入し、N 末端に His タグを付加したコンストラクトを設計した。

1.5.5 DmMAEL の精製

DmMAEL の調製は基本的に FL-DmMael と同様の手順で行った。作製した改変 pET28a-DmMAEL を用いて形質転換した大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株を 50 µg/ml カナマイシンを含む LB 培地にて 37°C で培養し、培養液の OD₆₀₀ が 0.8 まで上昇した時点で終濃度 0.1 mM になるように IPTG を添加し、15°C で 18 時間培養した。菌体を回収後、ペレットを可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol) に懸濁した。超音波破碎を行った後、破碎液を遠心し (40,000 g, 30 分)、上清を回収した。可溶化バッファーで平衡化した Ni-NTA Superflow と上清を混合し、1 時間緩やかに転倒混和した。エコノカラムに上清をロードし素通り画分を流した後、10 カラム容量の可溶化バッファーで洗浄を行った。その後、溶出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol) を 5 カラム容量流し、目的タンパク質を溶出した。溶出タンパク質に Turbo3C Protease を添加し、透析バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole, 3 mM β-ME) で一晩透析しながら 4°C で His タグを切断した。切断処理後、Ni-NTA Superflow につけ素通り画分を回収した。この操作により His タグおよび Turbo3C Protease を除去した。NaCl 濃度が 30 mM となるように素通り画分を希釈し、陰イオン交換カラム Resource Q にロードし Resource Q バッファー A

(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 5% glycerol) と Resource Q バッファー B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol) を用いて 30–600 mM NaCl の濃度直線勾配をかけてタンパク質を溶出した。SDS-PAGE で純度を確認したところ結晶化に十分なほど高純度であったため、透析によりゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) にバッファー置換した。さらに Amicon Ultra 10 K filter (Millipore) を用いて限外濾過法により 5 mg/ml まで濃縮した。精製した DmMAEL は -80°C で凍結保存した。

1.5.6 DmMAEL の結晶化

精製した DmMAEL について蒸気拡散法により以下のスクリーニングキットを用いて 20°C で結晶化初期スクリーニングを行った。

結晶化スクリーニングに用いたスクリーニングキット

PACT Suite, JCSG+ Suite (QIAGEN)

Crystal Screen 1 & 2, Natrix, PEG/Ion (Hampton Research)

JB Screen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience)

MemGold (Molecular Dimensions)

Wizard I & II (Emerald Biosystems)

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、沈殿剤の種類や濃度・緩衝液の pH などを変化させる、あるいは Additive Screen (Hampton Research) を用いて添加剤のスクリーニングを行うことで結晶化条件を最適化した。さらにタンパク質溶液とリザーバー溶液のドロップ体積を変化させてシットティングドロップ法・ハンギングドロップ法による結晶化も行った。なお、各溶液は基本的に結晶化ロボット Mosquito (TTP Labtech) を用いて分注した。

1.5.7 DmMAEL 結晶の X 線回折データ収集

X 線回折実験のため、結晶化条件に 25% ethylene glycol を含むクライオ溶液に DmMAEL 結晶を浸潤し、窒素ガスによるクライオストリームによって結晶を瞬間凍結

した。DmMAEL 結晶について、大型放射光施設 SPring-8 BL41XU および BL32XU にて回折データを収集した。すべてのデータ収集は X 線損傷による分解能低下を最小限に抑えるために窒素ガスクライオストリーム条件下 (100 K) で行った。

DmMAEL に含まれる ECHC モチーフは亜鉛原子と相互作用する可能性のあるグルタミン酸・システイン・ヒスチジン残基から構成される。まず DmMAEL 結晶が亜鉛原子を含むかを調べるために亜鉛原子の蛍光 X 線スペクトル測定を行った。

これにより DmMAEL 結晶中に亜鉛原子が含まれることがわかったため、結晶化条件を最適化して得られた DmMAEL 結晶に関して、波長 1.282 Å, 振動角 1.0°で 240°にわたって回折データを収集した。

1.5.8 DmMAEL 結晶の X 線回折データ処理

回折データはプログラム HKL2000⁴⁸ および XDS⁴⁹ を用いて処理した。結晶のブラベ格子と格子定数を決定後、回折データの各スポットについて指数付けと強度測定を行った。その後スケーリングを行い、空間群の決定・各指数に対する回折強度算出を行った。

1.5.9 DmMAEL Cys 変異体の発現系の構築および精製

DmMAEL SeMet 誘導体結晶および DmMAEL 水銀置換体結晶を用いた位相決定の試みはうまくいかなかった。また WT の結晶や SeMet 誘導体結晶において弾性があるものがみられた。分子間でシステイン残基がジスルフィド結合を形成し、結晶化パッキングに影響を与えている可能性を疑い、DmMAEL Cys 変異体の作製に移った。

複数生物種由来 MAEL ドメインに関して配列比較を行い、比較的保存性の低いシステイン残基を選定した。前項の改変 pET28a-DmMAEL ベクターを鋳型として QuikChange 法によりアミノ酸変異を導入した。最終的に C135V, C200S, C222S, C228S, C317A の計 5 種の DmMAEL Cys 変異体を作製した。それぞれの Cys 変異体に関して WT と同様の手順で大腸菌での発現およびその後の精製を行った。

1.5.10 DmMAEL Cys 変異体の結晶化

DmMAEL Cys 変異体について WT と同様に蒸気拡散法により以下のスクリーニングキットを用いて 20°C で結晶化初期スクリーニングを行った。

結晶化スクリーニングに用いたスクリーニングキット

PACT Suite, JCSG+ Suite, Natrix, PEG/Ion

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、沈殿剤の濃度を変化させることで結晶化条件を最適化した。シッティングドロップ法・ハンギングドロップ法による結晶化のほか、得られた結晶を種結晶としてストリークシーディングによる結晶化を行った。なお、各溶液は基本的に結晶化ロボット **Mosquito** を用いて分注した。

1.5.11 DmMAEL_{C228S} の X 線回折データ収集

X 線回折実験のため、結晶化条件に 25% ethylene glycol を含むクライオ溶液に DmMAEL_{C228S} 結晶を浸潤し、窒素ガスによるクライオストリームによって結晶を瞬間凍結した。DmMAEL_{C228S} 結晶について、大型放射光施設 SPring-8 BL32XU にて回折データを収集した。すべてのデータ収集は X 線損傷による分解能低下を最小限に抑えるために窒素ガスクライオストリーム条件下 (100 K) で行った。

結晶化初期スクリーニングにより得られた DmMAEL_{C228S} 結晶 (結晶 I) に関して、波長 1.282 Å, 振動角 1.0°で 180°にわたって回折データを収集した。さらに結晶化条件を最適化して得られた DmMAEL_{C228S} 結晶 (結晶 II) に関して、波長 1.000 Å, 振動角 1.0°で 180°にわたって回折データを収集した。

1.5.12 DmMAEL_{C228S} の X 線回折データ処理および位相決定

回折データはプログラム HKL2000⁴⁸ および XDS⁴⁹ を用いて処理した。結晶のブラベ格子と格子定数を決定後、回折データの各スポットについて指数付けと強度測定を行った。その後スケーリングを行い、空間群の決定・各指数に対する回折強度算出を行った。結晶 I の X 線回折データを用いて非対称単位中に存在する亜鉛原子の位置をプログラム SHELXC/D⁵⁰ を用いて特定した。得られた亜鉛原子の位置をもとにプログラム SHARP⁵¹ を用いて SAD 法により位相決定を行った。

1.5.13 DmMAEL_{C228S} 構造のモデル構築および精密化

プログラム RESOLVE⁵² による自動ビルドにより初期原子モデルを構築した。その後プログラム COOT⁵³ を用いた手動モデル構築とプログラム PHENIX⁵⁴ による構造精密

化のサイクルを数回繰り返した。さらに分解能の向上した結晶 II について結晶 I の構造情報をサーチモデルとしてプログラム MOLREP⁵⁵を用いて分子置換法により位相を決定した。その後、結晶 I の構造精密化と同様に、プログラム COOT⁵³を用いた手動モデル構築とプログラム PHENIX⁵⁴による構造精密化のサイクルを数回繰り返した。

1.5.14 DmMAEL の核酸切断実験に向けた精製系の改良

タンパク質の発現宿主である大腸菌から持ち込みの夾雑物が核酸を切断してしまうのを避けるために、核酸切断実験に用いる DmMAEL は結晶化に使用したものよりも精製ステップを増やしてより高純度に精製を行った。前項の結晶化に用いたサンプル調製法に従って Resource Q による精製まで行った後、さらに Resource PHE (GE Healthcare) にかける疎水性相互作用クロマトグラフィーを行った。この際、バッファー A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 M ammonium sulfate, 1 mM DTT) によりサンプルの硫酸濃度を 1 M とした後、バッファー A とバッファー B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT) を適宜混合し 1–0 M 硫酸の濃度直線勾配をかけて溶出した。さらにゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) で平衡化した Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) にかける、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い最終精製とした。

DmMAEL 点変異体の核酸切断実験のために、前項の改変 pET28a-DmMAEL ベクターを鋳型として Quik Change 法によりアミノ酸変異を導入したベクターを用いて WT と同様の手順で発現・精製を行った。

1.5.15 BmMAEL の発現系の構築および精製

Bombyx mori 由来 全長 Mael (1–354 残基) をコードした DNA 領域を、カイコ卵巣由来培養細胞 BmN4 から抽出したトータル RNA から逆転写 PCR 法により増幅し pGEX-5X-1 ベクター (GE Healthcare) にクローニングした。本ベクターは東京大学塩見美喜子博士より譲与して頂いた。このプラスミドベクターを鋳型として、*B. mori* 由来 MAEL ドメイン (92–335 残基, 以降 BmMAEL と記す) をコードする領域を PCR 法により増幅し前項で述べた pET28a 改変ベクターに挿入し、N 末端に His タグを付加したコンストラクトを設計した。BmMAEL の発現および精製は DmMAEL と同様の

手順で行った．最終的に目的タンパク質溶液はゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) に置換した．

1.5.16 MmMAEL の発現系の構築および精製

Mus musculus 由来 全長 Mael (1–434 残基) をコードした DNA 領域を, C57BL/6J マウス精巢 (日本エスエルシー) から抽出したトータル RNA から逆転写 PCR 法により増幅し pGEX-5X-1 ベクター (GE Healthcare) にクローニングした．本ベクターは東京大学 塩見美喜子博士より譲与して頂いた．このプラスミドベクターを鋳型として, *M. musculus* 由来 MAEL ドメイン (83–327 残基, 以降 MmMAEL と記す) をコードする領域を PCR 法により増幅し, 前項で述べた pET28a 改変ベクターに挿入して N 末端に His タグを付加したコンストラクトを設計した．さらに pE-SUMO ベクター (LifeSensors) に挿入して His-SUMO タグを N 末端に付加したコンストラクトを設計した．

大腸菌では MmMAEL が発現しなかったため, 次に昆虫細胞での MmMAEL の発現系構築を試みた．MmMAEL コード領域を pFastBac HTa (Invitrogen) 改変ベクターに挿入した．なお, pFastBac HTa 改変ベクターは His タグと TEV プロテアーゼ切断部位の間に SUMOstar タグ (LifeSensors) を組み込んだものとなっている．これにより完成した改変 pFastBac HTa-MmMAEL は N 末端に His-SUMOstar タグが付加される設計となっている．このプラスミドベクターを用いて形質転換した大腸菌 DH10Bac 株 (Invitrogen) を 50 µg/ml カナマイシン, 10 µg/ml ゲンタマイシン, 10 µg/ml テトラサイクリンを含む LB 培地中で 37°C で 12 時間培養後, バクミドを精製した．精製したバクミド 4 µg を FuGENE (Promega) を用いて 1.0×10^5 cells/ml Sf9 接着細胞 2 ml に遺伝子導入し, 細胞を 27°C に保温したインキュベータ内で静置した．120 時間程度経過後, 遠心 (400 g, 10 分) し, その上清を P1 ウイルスとした．このとき回収したペレットを用いて発現チェックを行った．破碎バッファー (20 mM phosphate buffer pH 7.3, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol, 1 mM PMSF) をペレットに加え超音波破碎処理した後, MagneHis Protein Purification System (Promega) により簡易精製した．溶出には溶出バッファー (20 mM phosphate buffer pH 7.3, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol, 1 mM PMSF)

を使用した。目的タンパク質の発現が確認できたため、以降ウイルス増幅および大量培養へと進んだ。1.0×10⁶ cells/ml Sf9 細胞に対し 1/100 量 (v/v) P1 ウイルスを添加し、72–96 時間をめどに回収・遠心 (400 g, 10 分) し、その上清を P2 ウイルスとした。同様に P2 ウイルスを Sf9 細胞に感染させて得た上清を P3 ウイルスとし、以降大量培養にこれを用いた。はじめにウイルス感染後の Sf9 細胞回収時間 (48, 60, 72 時間) によるタンパク質発現量を比較検討した。検討の結果、2.0×10⁶ cells/ml の Sf9 細胞 600 ml に対し 1/100 (v/v) P3 ウイルスを添加した後、60 時間後に遠心 (5,000 g, 10 分) により細胞を回収した。なお、Sf9 細胞は Sf900II (Invitrogen) 培地で培養した。

回収した Sf9 細胞を可溶化バッファー (20 mM phosphate buffer pH 7.3, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol, 1 mM PMSF) に懸濁した。超音波破碎を行った後、破碎液を遠心 (40,000 g, 30 分) し、さらに超遠心 (45,000 rpm, 70 Ti, 30 分) を行い上清を回収した。可溶化バッファーで平衡化した Ni-NTA Superflow と上清を混合し、1 時間緩やかに転倒混和した。エコノカラムに上清をロードし素通り画分を回収した後、10 カラム容量の可溶化バッファーで洗浄を行った。その後、溶出バッファー (20 mM phosphate buffer pH 7.3, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, 3 mM β-ME, 5% glycerol, 1 mM PMSF) を 5 カラム容量流し、目的タンパク質を溶出した。溶出画分に TEV protease (当研究室で調製したもの) を目的タンパク質の 1/2 量 (w/w) 添加し、透析バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 30 mM NaCl, 10 mM imidazole, 3 mM β-ME) で一晩透析しながら 4°C で His-SUMOstar タグを切断した。再度 Ni-NTA Superflow に通し、His-SUMOstar タグおよび TEV protease と目的タンパク質を分離した。以降は DmMAEL・BmMAEL の精製手順と同様に Resource Q, Resource PHE, Superdex 200 Increase 10/300 により精製した。最終的に目的タンパク質溶液はゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) に置換されている。

1.5.17 MAEL ドメインの核酸切断実験

基質として用いた核酸の塩基配列を表 1-1 に示した。一本鎖 RNA, 一本鎖 DNA は GeneDesign, Eurofins Genomics からそれぞれ購入した。100 pmol の一本鎖 RNA および一本鎖 DNA に対し 5 units T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs),

ATP- γ - ^{32}P (室町薬品) を添加し, 37°C , 1 時間, 反応させた. その後フェノール・クロロホルム抽出, エタノール沈殿により核酸基質を精製した. 核酸試料を 15%変性 PAGE (6 M urea) により分離した. Typhoon FLA 9500 image analyzer (GE Healthcare) を用いて RI シグナルを読み取り, 5'末端が RI 標識された核酸をゲルから切り出した. ゲル切片を 0.4 M NaCl に浸し, ペッスルで破砕した. 一晚低速で攪拌したものについてエタノール沈殿により精製した.

二本鎖 RNA および二本鎖 DNA は 5'末端 RI 標識した一本鎖核酸 (アンチセンス鎖) と非 RI 標識相補鎖 (センス鎖) をモル比 1:2 でアニーリングバッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 内で混合し 95°C , 15 分, 熱処理した後, 緩やかに 1 時間強かけて 30°C まで温度を下げることで調製した.

環状一本鎖 RNA は 5'末端 RI 標識した ~ 50 pmol の一本鎖 RNA に対し 20 units T4 RNA ligase 1 (New England Biolabs), 1 mM ATP を添加し, 37°C , 15 分, 反応させた後, 10%変性 PAGE (6 M urea) により分離した. Typhoon FLA 9500 image analyzer により RI シグナルを読み取りゲル切り出しを行った後, 前項と同様の手順でゲルから RNA を精製した.

精製した DmMAEL ($2.2\ \mu\text{M}$) と核酸基質 (10^4 c.p.m.) を $20\ \mu\text{l}$ の反応バッファー (25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 5 mM DTT) 中で混合し, 26°C , 3 時間, 反応させた. 反応溶液を等量のローディングバッファー (98% (w/v) deionized formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.025% (w/v) xylene cyanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) と混合した. 核酸が二次構造をとらないよう 95°C , 2 分, 熱処理を行った後, 急速冷却し, 15% 変性 PAGE (6 M urea) で展開した. Typhoon FLA 9500 image analyzer により RI シグナルを読み取った.

Mg^{2+} や Ca^{2+} 存在下での DmMAEL の切断活性測定のために, 反応バッファー (25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 5 mM DTT, 3 mM MgCl_2 or 3 mM CaCl_2) を用いた.

NaCl 濃度による DmMAEL の切断活性への影響を調べるために, 反応バッファー (25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 5 mM DTT, 0–100 mM NaCl) を用いた.

環状一本鎖 RNA を基質として用いた切断実験に関して, コントロールとして 7.5 units Exonuclease T (New England Biolabs) を環状一本鎖 RNA と反応バッファー

(50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate pH 7.9, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT) 中で反応させた.

基質の二次構造が DmMAEL の切断活性へ影響を及ぼすかを調べるために, 0, 1 or 3 つのグアニン残基を含む 15-nt poly (A) を用いた.

DmMAEL と RNase T1 の酵素活性および RNA 切断パターンを比較するために DmMAEL (0.14–2.2 μ M) と RNase T1 (0.5–10 units) (Ambion) をそれぞれ用いた.

MAEL ドメインのヌクレアーゼ活性が DmMAEL に特有なものかを調べるために DmMAEL, BmMAEL, MmMAEL のヌクレアーゼ活性測定を行った. DmMAEL (1 μ M) および BmMAEL (1 μ M) の活性測定は 26°C, 3 時間で反応させたのに対して, MmMAEL (1, 10, 20 μ M) の活性測定は 37°C, 3 時間で反応させて行った.

DmMAEL の変異体を用いた RNA 切断実験は WT および変異体それぞれ 1 μ M を用い, 26°C, 1 時間, 反応させて行った.

1.5.18 OSC を用いたレスキューアッセイ

以下のレスキューアッセイは東京大学 塩見美喜子博士との共同研究にて行った.

OSC とは先に述べたようにショウジョウバエ卵巣の濾胞細胞から単離された生殖巣体細胞由来培養細胞である^{56,57}. OSC において Piwi を介したトランスポゾン抑制機構が機能しているため, 一次 piRNA 産生機構やトランスポゾンの転写抑制機構の研究に適したツールとして利用されており, 近年 OSC を用いた解析により多くの知見が得られている. 本研究では DmMAEL のヌクレアーゼ活性が Piwi を介したトランスポゾン抑制に関与するかを調べるために OSC を用いたレスキューアッセイを行った.

D. melanogaster 由来 全長 Mael (FL-DmMael) をコードする DNA 領域をショウジョウバエ卵巣から抽出したトータル RNA から逆転写 PCR により増幅し pAcM ベクター⁵⁸に挿入した. この pAcM-FL-DmMael ベクターを鋳型として, Quik Change 法により RNAi 抵抗性を示すアミノ酸変異を導入したレスキュープラスミドベクター (FL-DmMael, WT および変異体) を作製した. さらにこれらのベクターを鋳型として PCR 法によりレスキュープラスミドベクター (DmMAEL, WT および変異体) を作製した. ネガティブコントロールとして pAcM-EGFP を用いた.

OSC へのベクターのトランスフェクションは以下の手順で行った. トリプシン処理

した OSC (3.0×10^6 cells) に対し内在性の Mael をノックダウンするよう設計した二本鎖 siRNA (300 pmol) およびレスキュープラスミド (5 μ g) を Nucleofector (Lonza) により遺伝子導入した後、新しい OSC 培地に移した。26°C, 2 日間インキュベートした後、ISOGEN reagent (Nippon Gene) あるいは RNazol RT reagent (Cosmo Bio) を用いてトータル RNA を精製した。1 μ g のトータル RNA から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) およびオリゴ (dT) プライマーを用いて cDNA を合成した。qRT-PCR は SYBR Premix ExTaq (Takara) あるいは THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO), LightCycler Real-Time PCR system (Roche Diagnostics) あるいは StepOnePlus system (Applied Biosystems) を用いて行った。*ribosomal protein 49 (rp49)* をコントロールとして、*mdg1* などのトランスポゾンの発現量を測定した。Mael, Piwi, Tubulin の発現量はそれぞれ抗 Mael 抗体産生ハイブリドーマ細胞, 抗 Piwi 抗体産生ハイブリドーマ細胞, 抗 Tubulin 抗体産生ハイブリドーマ細胞の培養上清を用いてウェスタンブロッティングにより定量した。二本鎖 siRNA および qRT-PCR に用いたプライマーをまとめたものを表 1-2 に示す。

1.6 結果と考察

1.6.1 FL-DmMael の調製

FL-DmMael を His タグ融合タンパク質として発現させ、Ni カラム, 陰イオン交換カラム, ゲル濾過カラムに通すことにより精製した (図 1-3a, b)。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピークは単分散性を示したが夾雑物由来のピークと一部重なっていた (図 1-3a)。最終的な収量は大腸菌培養液 1 L から 30 μ g と非常に少なく、結晶化には至らなかった。全長のコンストラクトでは収量が低く結晶化に適さないと判断し、結晶化に向けて新たなコンストラクト作製を検討した。

1.6.2 構造解析に向けた安定な領域の探索

構造解析に向けてより安定かつ発現量の多い領域を探索するために、精製した FL-DmMael に対してトリプシン処理による限定分解を行った。トリプシン限定分解処理後 SDS-PAGE により 30 kDa 付近に比較的安定と思われるバンドが確認された (図 1-4a)。N 末端解析および分子量から、このバンドは MAEL ドメインに対応することが推測された (図 1-4a)。さらに FL-DmMael のディスオーダー予測により MAEL ドメ

ンはディスオーダー領域をほとんど含まない安定な構造をとりうることがわかった (図 1-4b). なお, N 末端解析は理化学研究所の堂前直博士との共同研究にて行った.

1.6.3 DmMAEL の調製

DmMAEL を His タグ融合タンパク質として発現させ, Ni カラム, 陰イオン交換カラムに通すことにより精製した (図 1-5a, b, c). 陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出ピークは単分散性を示した (図 1-5b). さらに単分散性を示したピーク画分を SDS-PAGE で展開した結果, DmMAEL が高純度に精製されたことが明らかとなった (図 1-5c). 最終的に大腸菌培養液 1 L から 1.6 mg の DmMAEL が得られた. HMG ドメインおよび C 末端のディスオーダー領域を削ることにより収量が 50 倍に上がったこととなる.

1.6.4 DmMAEL の結晶化および X 線回折実験

精製 DmMAEL を用いて結晶化初期スクリーニングを行ったところ, 複数条件で結晶を得た. 中でも結晶化条件のひとつ JCSG+ No.79 (0.1 M succinic acid pH 7.0, 15% PEG3,350) (図 1-6a) に関して最適化の末, 結晶化条件 (0.1 M succinic acid pH 7.5, 15% PEG3,350) で長辺 400–500 μm のロッド状の結晶が得られた (図 1-6b).

DmMAEL 結晶中に亜鉛原子が含まれるかを調べるために亜鉛原子の蛍光 X 線スペクトル測定を行った結果, 図 1-6c のようなスペクトルが得られた. これより DmMAEL 結晶中に亜鉛原子が含まれることが明らかになった. 蛍光 X 線スペクトルから亜鉛原子の異常散乱を利用した SAD 法による位相決定に向けて測定波長として波長 1.282 Å を選択し回折実験を行ったところ, 分解能 3.3 Å の X 線回折データセットが得られた (図 1-6d). 結晶の空間群は $P4_32_12$ に属し, 格子定数は $a = b = 72.9$, $c = 109.0$ Å であった. しかしながら亜鉛原子の異常散乱を利用した SAD 法による位相決定には至らなかった.

1.6.5 DmMAEL Cys 変異体の調製

DmMAEL WT の結晶から分解能 3.3 Å のデータセットが得られていたが, 結晶間による差があり, 安定して分解能が伸びなかった. 位相決定のために DmMAEL 水銀導入体結晶, あるいは SeMet 置換体結晶を作製し X 線回折実験を行ったものの, 水銀導

入は結晶にとってダメージが甚大で X 線回折はおこななかった, SeMet 置換体結晶も分解能 7 Å までの X 線回折データしか得られなかった. また複数の結晶化条件において得られた結晶において多結晶化の問題もあった. さらに DmMAEL 結晶に関してゴムのよう弾性を示すものが多くみられた. これらより DmMAEL 結晶ではシステイン残基が分子間ジスルフィド結合を形成し結晶のパッキング・並び方に影響を与えている可能性が考えられた. そこで複数生物種由来 MAEL ドメインに関して配列比較を行い, 比較的保存性の低いシステイン残基を選び, Cys 変異体 (C135V, C200S, C222A, C228S, C317A) を作製した.

5 種類の Cys 変異体のうち C222A のみタンパク質が発現しなかった. 他の 4 種類に関しては WT 同様に発現・高純度での精製ができ, 陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出ピークは単分散性を示した.

1.6.6 DmMAEL Cys 変異体の結晶化

精製した Cys 変異体 (C135V, C200S, C228S, C317A) に関して結晶化初期スクリーニングを行ったところいずれのコンストラクトでも複数条件で結晶が得られたがほとんどの結晶が WT と同じく柱状あるいは針状の結晶であった. しかしながらその中でも C228S 変異体に関して PEG/ION No.30 (0.2 M ammonium acetate, 20% PEG3,350) 条件下で形の異なる一辺の長さ 30–40 μm のピラミッド状の四角錐の結晶 (結晶 I) が得られた (図 1-7a). さらに結晶化条件の最適化の末, 結晶化条件 (0.2 M ammonium acetate, 19% PEG3,350) にて一辺の長さ約 50 μm の同様の形状の結晶 (結晶 II) が得られた (図 1-7b).

1.6.7 DmMAEL Cys 変異体の X 線回折実験

Cys 変異体の結晶のうち WT と同じような柱状あるいは針状結晶に関して X 線回折実験を行ったところ, 最大分解能 4.0 Å までの回折スナップショットしか得られなかった. しかし C228S 変異体のピラミッド状結晶 I に関して X 線回折実験を行ったところ, 分解能 2.2 Å で回折スナップショットが得られた (図 1-7c). 亜鉛原子の異常散乱を利用した SAD 法による位相決定のため波長 1.282 Å にて, 180 枚の回折データを収集することに成功した. 結晶 I の空間群は $P4_32_12$ に属し, 格子定数は $a = b = 71.9$, $c = 86.8$

Åであった。さらに結晶化条件を最適化し得られた結晶 II に関しても同様に X 線回折実験を行い、分解能 1.6 Å の X 線回折データセットが得られた (図 1-7d)。結晶 II の空間群は $P4_32_12$ に属し、格子定数は $a = b = 71.9$, $c = 88.4$ Å であった。

1.6.8 DmMAEL_{C228S} の位相決定および構造精密化

結晶 I のデータセットについてプログラム SHELXC/D により亜鉛原子位置を計算し、非対称単位あたり 1 個の亜鉛原子を同定した。この亜鉛原子の情報を用いてプログラム SHARP により位相計算を行い、溶媒平滑化を行った。原子モデルの構築はプログラム RESOLVE にて行い、プログラム COOT を用いてモデルを修正した。さらに結晶 II の回折データに関して、結晶 I により得られた原子モデルをサーチモデルとして分子置換を行うことでさらなるモデル修正および精密化を行った。DmMAEL_{C228S} の原子モデルは分解能 1.6 Å で、最終的に $R_{\text{work}} = 19.4\%$, $R_{\text{free}} = 21.6\%$ まで精密化した (図 1-8a)。最終的なモデルのラマチャンドランプロットを図 1-8b、解析結果の統計値を表 1-3 にそれぞれ示した。

1.6.9 DmMAEL の全体構造

得られた電子密度からモデル構築を行った結果、一部のアミノ酸残基 (156–162, 228–229, 236–237) を除いてすべてモデルを置くことができた (図 1-9a)。

結晶構造から、DmMAEL は中心部位に 5 本のβストランドが配置し、13 本のαヘリックスがそれを取り囲むように配置することがわかった (図 1-9a)。RNase H フォールドはβ1と平行な3本のβストランド (β3, β4, β5) と、β1と逆平行な1本のβストランド (β2) の計5本のβストランドを中心に配置し、αヘリックスがそれを取り囲むという特徴をもつ⁵⁹。DmMAELに見られる5本のβストランドも同様の向きのパターンを示しており、DmMAEL は RNase H 様フォールドをとることが明らかになった。

高等真核生物 Mael オーソログ間で高度に保存された ECHC モチーフ (Glu131, Cys288, His291, Cys300) は亜鉛イオンと 4 配位で配位結合していた (図 1-9b)。

1.6.10 DmMAEL の構造学的洞察

RNase H-like superfamily (別名 retroviral integrase superfamily) は進化的に関連性のある巨大なタンパク質群であり、複製・相同組み換えなど多岐にわたる核酸代謝に

かかわる数多くの酵素を含む⁵⁹。具体的には retroviral integrase, DNA transposase, Holliday junction resolvase, Argonaute, Prp8 などに加えてある種のエキソヌクレアーゼも含まれる。DmMAEL が RNase H 様フォールドをとっていたことから、次に RNase H フォールドをとる RNase H-like superfamily タンパク質の中でどのタンパク質と高い構造類似性を示すかを調べた。

プログラム Dali⁶⁰を用い、構造が既に決定され Protein Data Bank (PDB) に登録されているタンパク質の中でもっとも DmMAEL と構造類似性を示すタンパク質を探索した。その結果、DmMAEL は RNase H-like superfamily に属するタンパク質のうち特に DEDDh family exonuclease と高い構造類似性を示し、中でも Lassa virus 由来 nucleoprotein (LASV NP) (PDB ID: 4GV9) が最も高いスコアを示した⁶¹。LASV NP はウイルス感染の副産物である二本鎖 RNA を切断する 3'-5' エキソヌクレアーゼであり、ウイルス感染により誘導されるインターフェロン産生を抑制するはたらきをもつ⁶¹⁻⁶⁴。DmMAEL と LASV NP の配列相同性は 13%しかないにもかかわらず両者の全体構造は高い構造類似性を示した (rmsd = 2.9 Å) (図 1-10a, b, c)。前述のように、LASV NP の属する DEDDh family exonuclease は 5 つの活性残基 (Asp, Glu, Asp, Asp, His : DEDDh モチーフ) からなる負電荷の溝を共通してもち、two-metal-ion mechanism により二本鎖 RNA を切断する (図 1-11)⁶⁵。LASV NP において、活性部位は DEDDh モチーフを構成する Asp389, Glu391, Asp466, Asp533, His528 および周辺に位置し高度に保存された Ser430, Gln462, Arg492 により形成される (図 1-10b)^{61,66}。LASV NP の Asp389, Glu391, Asp466, Asp533, His528 は DmMAEL ではそれぞれ Ala114, Asn116, Met218, Met304, Tyr299 に対応しておりどのアミノ酸残基も両者間で保存されていなかった (図 1-10b)。また DmMAEL において、LASV NP の活性部位に相当する溝 (central groove とよぶ) を構成するアミノ酸残基は Mael オーソログ間でも保存されていなかった (図 1-10a, 12, 13)。これらのことからこの central groove は Mael の機能には重要でないことが示唆された。

予想外なことに、DmMAEL で見られたように LASV NP においても Glu399, Cys506, His509, Cys529 により構成される ECHC モチーフが亜鉛イオンを配位していた (図 1-10c)⁶¹。さらに両者の構造を重ね合わせたところ ECHC モチーフは空間的にもよく重なった。LASV NP において亜鉛イオンを配位した ECHC モチーフは構造安定化ある

いは基質結合に関与することが示唆されていた^{63,64}。DmMAELにおいて、ECHCモチーフの点変異体はいずれも可溶性が顕著に低下したことから、DmMAELにおいてECHCモチーフは構造安定化に寄与することが示唆された。

以上のLASV NPとの構造比較によって、DmMAELはRNase H様フォールドをとるものの、DEDDh family exonucleaseに高度に保存された活性部位はもたないことが明らかになった。

1.6.11 DmMAELの核酸切断実験

DmMAELがDEDDhモチーフをもたないことが明らかになったため、次にDmMAELが核酸切断活性を有するのかを生化学的解析により調べた。構造決定に用いた試料は結晶化できるほど高純度であったが、非常に少量ではあるが夾雑物が含まれていた。生化学的解析を行うにあたり、夾雑物による核酸切断活性がみえてしまう可能性を排除するためにDmMAELの精製ステップを増やした。疎水性カラム、ゲル濾過カラムのステップを増やすことで結晶化に使用したものよりさらに高純度でDmMAELを精製することができ、この試料を用いて核酸切断実験を行うこととした(図1-14a, b)。

DmMAELがヌクレアーゼであるかを検証するために、精製したDmMAELと5'末端をRI標識した40-nt ssRNA(40AS ssRNA)を基質として混合し切断されるかを調べた。その結果、予想に反してDmMAELは40AS ssRNAを切断した(図1-14b)。さらに最終精製ステップであるゲル濾過クロマトグラフィーの各溶出フラクションのヌクレアーゼ活性を測定したところ、溶出ピークと切断活性のピークが相関していた(図1-14b)。またDmMAELは量および時間依存的にヌクレアーゼ活性を示した(図1-15a, b)。これらの結果からDmMAELは一本鎖RNAを切断するヌクレアーゼであることが明らかとなった。

Two-metal-ion mechanismにより二本鎖RNAを切断するDEDDh family exonucleaseの活性部位⁶⁵がDmMAELに保存されていないことと一致して、DmMAELはMg²⁺やCa²⁺といった二価金属イオンをRNA切断には必要とせず、むしろこれらの二価金属イオン存在下では切断活性が阻害された(図1-15c)。

次に5'末端をRI標識した様々な核酸基質を用いてDmMAELの基質特異性を調べた。その結果、DmMAELは一本鎖RNAを切断する一方で二本鎖RNAは切断しなかった

(図 1-16a). 一本鎖 DNA に対しては僅かながら切断活性を示したが、それは一本鎖 RNA と比較して非常に弱かった (図 1-16a). DmMAEL は環状一本鎖 RNA を切断したことから DmMAEL はエンドヌクレアーゼであることも明らかになった (図 1-16b). 40AS ssRNA を用いた切断活性測定に関して、切断産物に他に比べて強いシグナルを示すバンドがみられた (図 1-16a). 40AS ssRNA の塩基配列は図 1-17a の通りであり、中央に連続したグアニン残基を含む。40AS ssRNA の切断パターンから DmMAEL はグアニン残基のなかでも、とりわけ連続したグアニン残基を特異的に切断することが示唆された (図 1-16a). 40AS ssRNA が図 1-17b, c に示すような二次構造をとりそれが DmMAEL の RNA 切断活性に影響を与えている可能性を検証するために、二次構造をとらないよう設計したグアニン残基を含むあるいは含まない 15-nt poly(A) RNA を用いて切断活性測定を行った (図 1-17a). その結果 DmMAEL はグアニン残基を含む基質を切断した一方で、グアニン残基を含まない 15-nt poly(A) RNA は切断しなかった (図 1-17d). これより DmMAEL が RNA の二次構造非依存的にグアニン残基の箇所で一本鎖 RNA を切断することが明らかになった。

RNase T1 はグアニン残基の 3'側を特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼであり⁶⁷、生化学的解析などにも広く使用されている。DmMAEL がグアニン残基に切断嗜好性を示したことから、次に DmMAEL と RNase T1 の 40AS ssRNA に対する切断活性を比較した。基質として用いた 40AS ssRNA は中央の連続したグアニン残基以外にも散在したグアニン残基を 5 つ含む (図 1-18a). RNase T1 はグアニン残基の箇所に関係なく均一に切断活性を示した (図 1-18a). 一方で DmMAEL は散在したグアニン残基よりも中央に位置する連続したグアニン残基に対して強い切断嗜好性を示した (図 1-18a). また NaCl 濃度に関係なく RNase T1 は ssRNase 活性を示し 100 mM NaCl 存在下でも切断活性を保持していたのに対して、DmMAEL の一本鎖 RNA 切断活性は NaCl 濃度依存的に阻害され 25 mM NaCl 存在下でも顕著な切断活性の減弱がみられた (図 1-18b). DmMAEL と RNase T1 の切断パターンを詳細に比較したところ、DmMAEL では 40AS ssRNA の中央の連続したグアニン残基の箇所で切断したと思われるバンドが 4 本みられたのに対して、RNase T1 では 3 本しかみられなかった (図 1-18a). RNase T1 はグアニン残基の 3'末端を均一に切断していると考えられる。一方で、DmMAEL では中央のグアニン残基に関しては 5'末端も切断している可能性が考え

られた．あるいは DmMAEL の切断産物の末端構造が泳動度に影響を与えている可能性が考えられた．RNase T1 による切断は 2',3'-環状モノリン酸中間体を経て，3'-リン酸末端を生じる⁶⁷．現状では DmMAEL の切断産物の末端構造は不明であるが，仮に切断産物にこのような中間体が混合していると泳動度が変わりバンドが 1 本多くみえることになるのかもしれない．この点を明らかにするには今後例えば DmMAEL の切断産物の末端構造を決定することが重要となるだろう．

以上の比較から DmMAEL は RNase T1 とは異なる切断機構により一本鎖 RNA を切断することが示唆された．

1.6.12 BmMAEL および MmMAEL の調製

MAEL ドメインの一本鎖 RNA 切断活性がショウジョウバエ由来 Mael にのみ特異的にみられるものかを調べるために，他生物種由来 Mael の MAEL ドメインを調製しその一本鎖 RNA 切断活性測定を行った．ショウジョウバエに加えて piRNA 経路の研究のモデル生物として利用され研究が発展しているカイコおよびマウス由来 Mael の MAEL ドメインを解析対象とし調製した．

BmMAEL を His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ，Ni カラム，陰イオン交換カラム，疎水性カラム，ゲル濾過カラムに通すことにより高純度に精製した（図 1-19a）．最終的に大腸菌培養液 1 L から 1 mg の BmMAEL が得られた．

MmMAEL を His タグ融合タンパク質あるいは可溶性を上げるために SUMO タグを導入した His-SUMO タグ融合タンパク質として大腸菌を宿主として発現を試みた．イミダゾール濃度，培養条件などを検討したが可溶化できなかった．そこで次に昆虫細胞 Sf9 を宿主として MmMAEL の発現を試みた．MmMAEL を His-SUMOstar タグ融合タンパク質として Sf9 浮遊細胞で発現させたところ発現・可溶化に成功した．BmMAEL 同様に Ni カラム，陰イオン交換カラム，疎水性カラム，ゲル濾過カラムに通すことにより高純度に精製した（図 1-19a）．最終的に Sf9 浮遊細胞培養液 1 L から 0.6 mg の MmMAEL が得られた．

1.6.13 BmMAEL および MmMAEL の核酸切断実験

高純度に精製した BmMAEL および MmMAEL を用いて DmMAEL と同様の手順で

40AS ssRNA に対する切断活性測定を行った。その結果 BmMAEL・MmMAEL ともに 40AS ssRNA を切断した (図 1-19b)。さらに BmMAEL・MmMAEL は DmMAEL とよく似た RNA 切断パターンを示し、グアニン残基に切断嗜好性を示した (図 1-19b)。BmMAEL は DmMAEL と同等のヌクレアーゼ活性を示したのに対し、MmMAEL の切断活性は DmMAEL のそれと比較して弱かった (図 1-19b)。また発現宿主として DmMAEL および BmMAEL は大腸菌を使用したのに対して、MmMAEL は昆虫細胞を使用していることから、ヌクレアーゼの本体がそれぞれの発現宿主に由来するものではないことが示された。

以上の結果より MAEL ドメインは進化的に保存された一本鎖 RNA 切断酵素であることが明らかになった。

1.6.14 DmMAEL 変異体を用いた核酸切断実験

前述のとおり、MAEL ドメインは LASV NP の活性部位 DEDDh モチーフを欠いていた。そこで次に Mael オーソログ間での配列保存性をもとに DmMAEL の触媒残基の同定を試みた。高等真核生物 (ヒト、マウス、カエル、カイコ、ショウジョウバエ) 由来 Mael の一次配列を比較したところ Mael オーソログ間で厳格に保存されておりかつ親水性であるのは ECHC モチーフを除いてほとんどなかった (図 1-12)。そこで DmMAEL の結晶構造を参考に分子表面に露出しており親水性のアミノ酸残基という基準でアミノ酸を選定し、それぞれをアラニンに置換した点変異体を 12 種類作製・精製した (図 1-20a)。これらの変異体について全てゲル濾過クロマトグラフィーの結果 WT と同様に単分散性の溶出ピークを示すことを確認し、これよりいずれの変異体も立体構造が保持されていると判断した。40AS ssRNA を基質として、精製した DmMAEL 変異体の RNA 切断活性測定を行った。その結果、K109A, K188A, N192A, E292A 変異体は WT と同等の切断活性を示し、K277A 変異体のそれは WT に比べてやや減弱した切断活性を示した (図 1-20b)。その一方で、K140A, K199A, Q289A, D293A, D295A, D314A, K328A 変異体は WT に比べて顕著に減弱した切断活性を示した (図 1-20b)。これより Lys140, Lys199, Gln289, Asp293, Asp295, Asp314, Lys328 は一本鎖 RNA の切断に関与することが示唆された。前述のとおり DmMAEL, BmMAEL, MmMAEL は同様の RNA 切断活性を示したが、これらのアミノ酸残基は Asp295 を除いてどれも

Mael オーソログ間で保存されていなかった (図 1-12). またいずれの変異体も完全に切断活性を失ったわけではなく、微弱ながらも保持していたことから、これらのアミノ酸残基は触媒活性ではなく核酸結合に関与している可能性が考えられた. 正電荷を帯びたアミノ酸残基 Lys140, Lys199, Lys328 は負電荷を帯びた一本鎖 RNA のリン酸基との相互作用に寄与するかもしれない. 興味深いことにこれらのアミノ酸残基は LASV NP の活性部位の溝に相当する DmMAEL の溝 (central groove) とは反対側の分子表面上に位置していた (図 1-21a, b, c). 次にこの DmMAEL の central groove が一本鎖 RNA 切断に関与するかを調べた. そのために LASV NP の DEDDh モチーフに相当する DmMAEL のアミノ酸残基の点変異体 (N116A, M218A, Y299A, M304A) の調製を WT と同様の手順で試みた. しかしながら、いずれの変異体も可溶化することができなかった. これより DmMAEL において central groove は構造安定化に寄与していることが示唆された. また構造決定のために導入した C228S 変異体も一本鎖 RNA 切断活性を保持していたことからこの変異により DmMAEL の構造および機能に与えた影響は少ないことを確認した (図 1-20b).

次に DmMAEL と RNase T1 が一本鎖 RNA をグアニン残基嗜好的に切断するという共通の性質をもっていたことから両者の立体構造を比較することで DmMAEL の活性部位の同定を試みた. RNase T1 は金属イオン非依存的に切断する一本鎖 RNA 切断酵素であり、保存されたヒスチジン残基が触媒残基としてはたらく⁶⁷. DmMAEL にはヒスチジン残基が His103, His167, His291, His329 の 4 つ含まれているが、ECHC モチーフを構成する His291 を除くと DmMAEL, BmMAEL, MmMAEL 間で保存されているのは His329 に限られる (図 1-12). そこで H329A 変異体の一本鎖 RNA 切断活性を調べたところ、WT と同等の活性を示した (図 1-20a, b). これより His329 は DmMAEL による一本鎖 RNA 切断には関与しないことが示された.

以上の結果をまとめると、DmMAEL の触媒残基そして RNA 切断メカニズムは未だ不明ではあるが、変異体解析や立体構造比較により Mael は RNase T1 あるいは DEDDh family exonuclease とは異なる新規の活性部位そして触媒メカニズムにより一本鎖 RNA を切断することが示唆された.

1.6.15 OSC を用いたレスキューアッセイ

次に Mael の一本鎖 RNA 切断活性が Piwi を介したトランスポゾン抑制に関与するかを調べるためにショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 OSC を用いたレスキューアッセイを行った (図 1-22).

まず RNAi によって内在性発現 *mael* をノックダウンした OSC に対して EGFP, FL-DmMael, DmMAEL を過剰発現させ, qRT-PCR によってトランスポゾン *mdg1* の発現量を測定した. その結果, EGFP はトランスポゾン脱抑制をレスキューできなかったのに対して, FL-DmMael および DmMAEL は共にトランスポゾン脱抑制をレスキューできた (図 1-23a, 24a). さらに *mdg1* に加えて他の体細胞発現性のトランスポゾン (*297*, *blood*, *Tabor*, *gypsy*, *ZAM*) の脱抑制も同様にレスキューできた (図 1-23b, 24a). これは *mael* 欠損変異体の卵巣に HMG ドメインを欠損させた Mael Δ HMG を過剰発現させると体細胞発現性のトランスポゾン脱抑制をレスキューできたという先行研究³¹と一致しており, MAEL ドメインのみでもショウジョウバエ OSC におけるトランスポゾン抑制に中心的な役割を果たすことが確認できた. 次に ECHC モチーフの重要性を検証するために, 各種 ECHC 変異体の過剰発現によりトランスポゾン脱抑制をレスキューできるかを調べた. FL-DmMael の各 ECHC モチーフ変異体 (一重変異体: E131A, C288A, H291A, C300A, 四重変異体: E131A/C288A/H291A/C300A) および DmMAEL の ECHC モチーフ四重変異体 (E131A/C288A/H291A/C300A) はいずれも *mdg1* の脱抑制をレスキューできなかった (図 1-23a, 24b). これより Piwi-piRNA 複合体を介したトランスポゾン抑制における ECHC モチーフの重要性が示された. ECHC モチーフ変異体の多くは, 過剰発現させた場合に *mdg1* の発現量が EGFP を過剰発現させた場合に比べて亢進していた (図 1-23a). この結果はドミナントネガティブ変異を想起させ, Mael が二量体など多量体を形成する可能性が考えられた. 実際, FL-DmMael のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピーク位置から FL-DmMael が二量体を形成する可能性が排除しきれなかった (図 1-3a). MAEL ドメインの溶出ピーク位置からは単量体であると推測されるので, もしかすると全長だと二量体を形成しうるのかもしれない. この点については今後さらなる検証が必要であろう.

続いて, 前項で一本鎖 RNA 切断活性が減弱した DmMAEL 変異体 (K140A, K199A, Q289A, D293A, D295A, D314A, K328A) に関してトランスポゾン脱抑制をレスキュー

一できるかを同様に調べた。その結果、7 種類いずれの DmMAEL 変異体も WT と同程度 *mdg1* の脱抑制をレスキューできた (図 1-23a, 24c)。これらの結果より、Mael の一本鎖 RNA 切断活性はショウジョウバエ OSC における Piwi を介したトランスポゾン抑制には必要ないと示唆された。

1.6.16 Mael の piRNA 経路における役割

本研究により Mael は一本鎖 RNA 切断酵素であることが明らかになり、ショウジョウバエの卵巣体細胞におけるトランスポゾン抑制にはその酵素活性は必要ないことが示唆された。では Mael は piRNA 経路においてどのような機能を果たしているのだろうか？以下、ショウジョウバエおよびマウスの piRNA 経路において Mael がどのようなに関わるか、その生理機能について考察する。

ショウジョウバエの卵巣体細胞において Mael は piRNA 産生には必要なく、核内における Piwi を介したトランスポゾン抑制にのみ関与し、かつトランスポゾン抑制には MAEL ドメインのみで充分である³¹。近年のゲノムワイドなバイオインフォマティクス解析によって、OSC において *mael* をノックダウンしても標的トランスポゾン領域へ Piwi-piRNA によって誘導される H3K9me3 修飾はあまり影響をうけないが、標的トランスポゾンの発現は脱抑制され亢進することが示された³¹。また RNA pol II ChIP-seq 解析によりトランスポゾン領域の RNA pol II 占有率は上昇することも示された³¹。これらのデータから Mael は OSC において H3K9me3 修飾の下流ではたらし、かつ RNA pol II によるトランスポゾンの転写を阻害することが示唆された³¹。Mael の機能を知るうえで他にどのような因子が核内におけるトランスポゾン抑制に関与するかを知ることが重要であろう。複数の研究グループにより、遺伝学的手法を用いた大規模スクリーニングが行われ、Piwi・Mael の他にトランスポゾン抑制に必要な因子が多数同定された^{68,69}。これによりジンクフィンガードメインを含む Gtsf1^{70,71}に加えて、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 やヒストンシャペロン Asf1 などのクロマチン関連因子^{68,69}などが OSC におけるトランスポゾン抑制に必要な因子であることが明らかになった。ヘテロクロマチン形成機構はこれまで主に分裂酵母をモデル生物とした研究により理解が進んでいる。酵母では H3K9 メチル化のみではヘテロクロマチン形成に不十分で

あること、さらにヒストン脱アセチル化複合体やヒストンシャペロン複合体が遺伝子の転写抑制に必要であり、それらがヒストン脱アセチル化やヌクレオソーム占有率の上昇を促進することにより標的領域への RNA pol II のアクセスを妨げるというモデルが提唱されている⁷²⁻⁷⁴。ショウジョウバエにおいても HDAC3 や Asf1 などのクロマチン関連因子がトランスポゾン抑制に必要であること^{68,69}を考慮すると、OSC におけるトランスポゾン領域の転写抑制にはヒストン脱アセチル化やヒストンシャペロンなど酵母に類似の機構が関与しており、Mael はこれらに関与している可能性が考えられる。一本鎖 RNA 結合能をもつ HMG ドメインを必要としない、さらに MAEL ドメインの一本鎖 RNA 切断活性も必要としないという本研究の結果を考慮すると、Mael は MAEL ドメインを介したヒストン関連因子とのタンパク質-タンパク質間相互作用により RNA pol II のアクセスの妨げに寄与しているのかもしれない (図 1-25a)。しかしながら、OSC において Mael がヒストン関連因子を含めどの因子と直接的あるいは間接的に相互作用するかは明らかになっていないため、相互作用因子を同定するなど今後の研究展開が待たれる。

ショウジョウバエ卵巣生殖細胞およびマウス精巣において Mael は piRNA 産生に関与する^{31,43,46,47}。最近になって成体マウス精巣で Mael がいかに piRNA 産生に関与するかについて重要な知見が報告された。それによると成体マウス精巣で Mael が PIWI ホモログ MIWI, Tudor ドメインタンパク質 Tdrd6 と複合体を形成すること、複合体は RNA との相互作用非依存的に形成され、Mael-MIWI および Mael-Tdrd6 間相互作用はタンパク質-タンパク質間相互作用による直接的なものであることが示唆された⁴⁷。さらに Mael 複合体に含まれる RNA の配列解析から、Mael 複合体は哺乳類特異的な pachytene piRNA の前駆体を含むことが明らかになった⁴⁷。複合体には成熟型 pachytene piRNA が含まれていなかったことから、この複合体は pachytene piRNA の断片化・プロセッシングに関与していることが示唆された⁴⁷。現在までに Mael 複合体に含まれる因子として MIWI や Tdrd6 に加えて複数同定されているが、その中にヌクレアーゼは含まれておらず、MIWI のスライサー活性も pachytene piRNA の成熟化には必要ないことがわかっている⁷⁵。本研究で MmMAEL が一本鎖 RNA 切断活性を示したことから、成体マウス精巣における pachytene piRNA 産生の成熟化に Mael の一本鎖

RNA 切断活性が関与している可能性が考えられる (図 1-25b).

1.6.17 Mael の RNA 切断メカニズム

本研究において MAEL ドメインが種を越えて保存された一本鎖 RNA 切断酵素であることを示した. DmMAEL は DEDDh family exonuclease と高い構造類似性を示したが, このファミリー間で高度に保存された触媒モチーフ, DEDDh モチーフを失っていた. ではどのように MAEL ドメインは一本鎖 RNA を切断するのだろうか?

本研究から明らかになったように DmMAEL, BmMAEL, MmMAEL が同様のヌクレアーゼ活性を示したことから, 少なくともこれら 3 生物種由来 MAEL ドメインは共通の保存された活性部位をもつことが示唆された. タンパク質一次構造比較からショウジョウバエ, カイコ, マウスを含めた高等真核生物由来 MAEL ドメイン間で厳密に保存されている親水性残基は Ser138, Gly292, Asp295, His329 と ECHC モチーフを構成する Glu131, Cys288, His291, Cys300 のみである (図 1-12). この中で, 近傍に位置し活性モチーフをつくるという条件をみたす点で ECHC モチーフが高度に保存された唯一のモチーフであると考えられる (図 1-26).

本研究の成果の発表とほぼ同時期に別の研究グループからカイコ由来 Mael の MAEL ドメイン (78–338 残基) の分解能 2.4 Å の結晶構造が報告された (図 1-27a)⁷⁶. BmMAEL は 5 本のβストランドが中心に配置し, αヘリックスがそれを取り囲むという RNase H 様フォールドをとっており, DmMAEL と BmMAEL の全体構造はよく重なった (rmsd = 1.5 Å) (図 1-27b). BmMAEL の central groove において, LASV NP の DEDDh モチーフ構成残基は Asp122, Asn124, Ala224, Arg306, Val301 に置換されていた (図 1-27c). また BmMAEL においても ECHC モチーフ (Glu137, Cys290, His293, Cys302) は亜鉛イオンと 4 配位で配位結合しており, DmMAEL の ECHC モチーフとよく重なる空間配置をしていた (図 1-27d). このように BmMAEL は DmMAEL と非常に類似した特徴をもつ立体構造をとっていた.

配列保存性に加えて立体構造的な保存性を考慮すると ECHC モチーフが構造安定化だけでなく RNA 切断にも関与する可能性が考えられる. これは ECHC モチーフの近傍に位置し, 動物由来 MAEL ドメイン間で高度に保存された Asp295 が RNA 切断に関与するという生化学的解析のデータからも支持される.

先行研究のバイオインフォマティクス解析により原生生物由来 MAEL ドメインは DEDDh モチーフと ECHC モチーフを共に有することが示されており、さらに原生生物・高等真核生物由来 MAEL ドメインの立体構造予測がなされていた⁴²。その結果をもとに同研究グループにより、MAEL ドメインは DEDDh exonuclease から進化の過程で DEDDh モチーフから ECHC モチーフへと活性部位を変換したという "active site switch model" が提唱された⁴²。実際、近年別の研究グループより生化学的解析により原生生物 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* 由来 MAEL ドメインはエキソヌクレアーゼ活性をもつことが報告された⁷⁶。本研究の結果とあわせて、これらは ECHC モチーフが RNA 切断に関与するという active site switch model を支持するものであった。

このように MAEL ドメインの ECHC モチーフが活性部位としての役割もあわせもつと仮定すると、OSC を用いたレスキューアッセイの結果の解釈は困難となる。すなわち、各種 ECHC 変異体はいずれを過剰発現させても OSC におけるトランスポゾン脱抑制をレスキューできなかったことから、Mael のヌクレアーゼ活性が piRNA を介したトランスポゾン転写抑制に関与する可能性が考えられる。レスキューアッセイで使用した一本鎖 RNA 切断活性が減弱した DmMAEL 変異体はいずれも微弱ながら切断活性を保っており、その微弱な切断活性でもタンパク質を過剰発現させることによって、トランスポゾンの抑制には十分な影響を与えた可能性は捨てきれない。実際、一次 piRNA 産生に必要なエンドリボヌクレアーゼ Zucchini に関して、OSC に触媒残基変異体を過剰発現させた場合はトランスポゾンは脱抑制されたままであったのに対して、わずかに切断活性を保持する RNA 結合能低下変異体を過剰発現させた場合はトランスポゾン脱抑制はレスキューされたことが先行研究により報告されている²⁶。大腸菌で ECHC 変異体を発現させるとタンパク質の大部分が不溶性画分に存在し、精製できなかったため、ヌクレアーゼ活性を有するか否かは不明である。それに対して、OSC 内に過剰発現させた ECHC 変異体はいずれもウェスタンブロッティングにより可溶性画分に検出されたことから、OSC では完全に構造が不安定化されて立体構造が保てなくなったわけではないことが示唆された。このように現段階では実験系の限界により、Mael の一本鎖 RNA 切断活性が OSC におけるトランスポゾン抑制に関与する可能性を完全に排除す

ることはできない。今後さらなる検証が必要となるだろう。

1.7 まとめと展望

本研究ではショウジョウバエ由来 *Mael* の MAEL ドメインの結晶構造を決定し、MAEL ドメインは RNase H 様フォールドをとるが DEDDh family exonuclease に高度に保存された活性モチーフ、DEDDh モチーフを失っていることを示した。また高純度に精製したタンパク質を用いて生化学的解析を行い、MAEL ドメインは一本鎖 RNA を特異的に切断するエンドヌクレアーゼであること、グアニン残基の箇所を好んで切断すること、RNA 切断活性が種を越えて保存されていることを示し、MAEL ドメインが新規のヌクレアーゼであることが明らかとなった。構造情報などをもとに変異体解析を行い、ヌクレアーゼ活性に影響を与えるアミノ酸残基を複数同定した。さらにショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 OSC を用いたレスキューアッセイを行い、OSC の核内におけるトランスポゾン抑制は *Mael* のヌクレアーゼ活性を必要としないことが示唆された。

一方で *Mael* に関して未解明な謎は依然として多く残されている。

- (1) RNA 基質をどのように認識し、切断するのか。
- (2) 生体内でどのような RNA と結合しているか。
- (3) *Mael* のヌクレアーゼ活性は piRNA 経路に必要なか、
必要でないとしたらその機能は何か。
- (4) *Mael* のヌクレアーゼ活性は piRNA 経路以外の生理機能に必要なか。

これらの問題を解決するために、結晶構造解析による RNA 基質と *Mael* の複合体の構造決定が待たれる。それにより RNA の認識・切断メカニズムの解明が期待される。またグアニン残基、特にグアニン残基が複数並んだ箇所、を好んで切断するというユニークな酵素特性も明らかにできると考えられる。また *Mael* と結合する RNA を同定することにより、生体内における *Mael* の生理機能解明につながると期待される。

第一章の図表

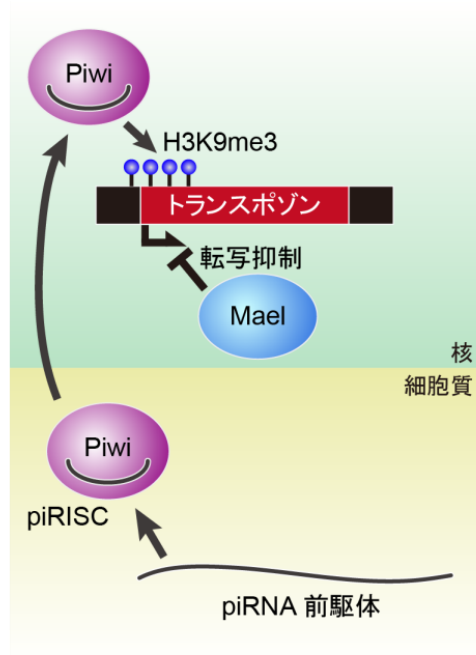
Drosophila melanogaster Mael



図 1-1 ショウジョウバエ由来 Mael のドメイン構成

Mael は核酸結合モジュールの HMG ドメインと機能未知の MAEL ドメインからなる。C 末端領域は二次構造をとらないディスオーダー領域であると予測される。

(a) ショウジョウバエ卵巣体細胞



(b) マウス精巢生殖細胞

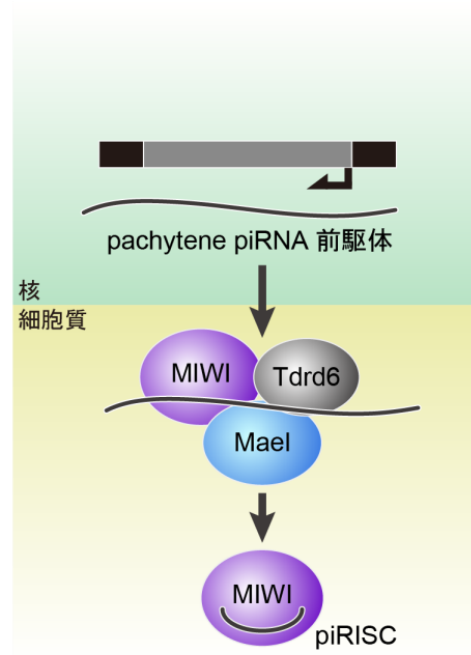


図 1-2 Mael の piRNA 経路における機能

(a) ショウジョウバエ卵巣体細胞において、Mael は piRNA 産生ではなくトランスポゾンの転写抑制にかかわる。Mael はヒストン H3K9me3 修飾の下流経路ではたらくと考えられている。

(b) マウス精巢生殖細胞において、Mael は pachytene piRNA 産生にかかわる。Mael は MIWI, Tdrd6 などと複合体を形成する。

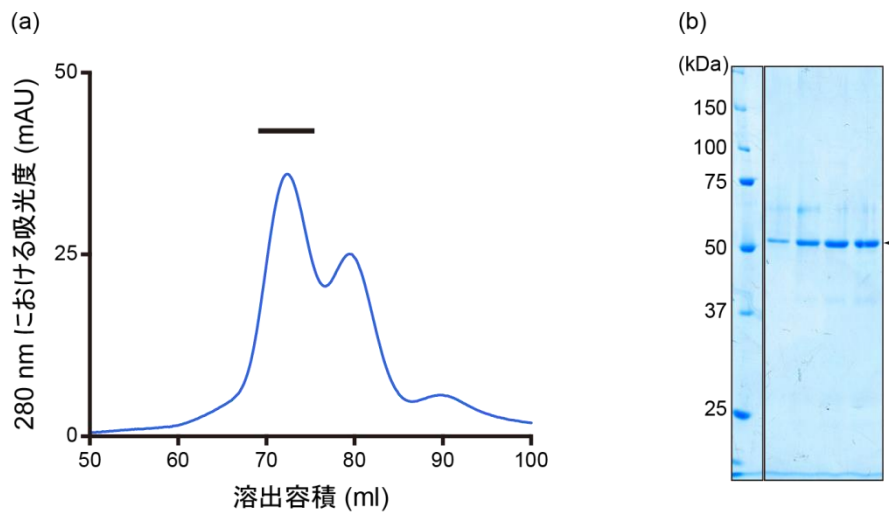


図 1-3 FL-DmMael の調製

(a) 最終精製産物のゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出ピーク.

(b) (a) の SDS-PAGE 検出結果.

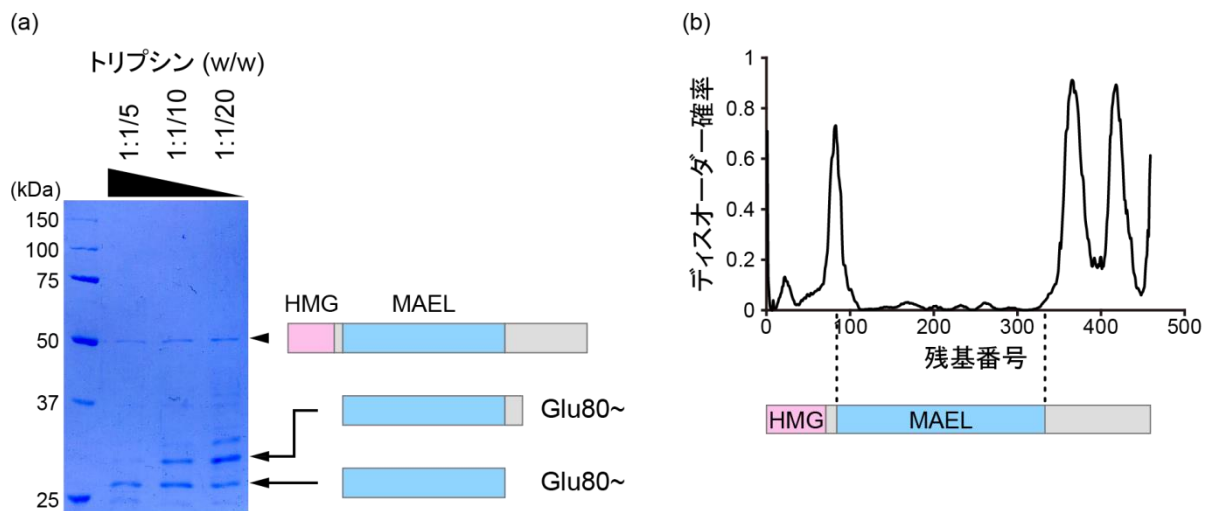


図 1-4 構造解析に向けた安定な領域の探索

(a) FL-DmMael のトリプシンによる限定分解.

(b) FL-DmMael のディスオーダー確率プロット. ディスオーダー予測は DISOPRED2 を用いて行った.

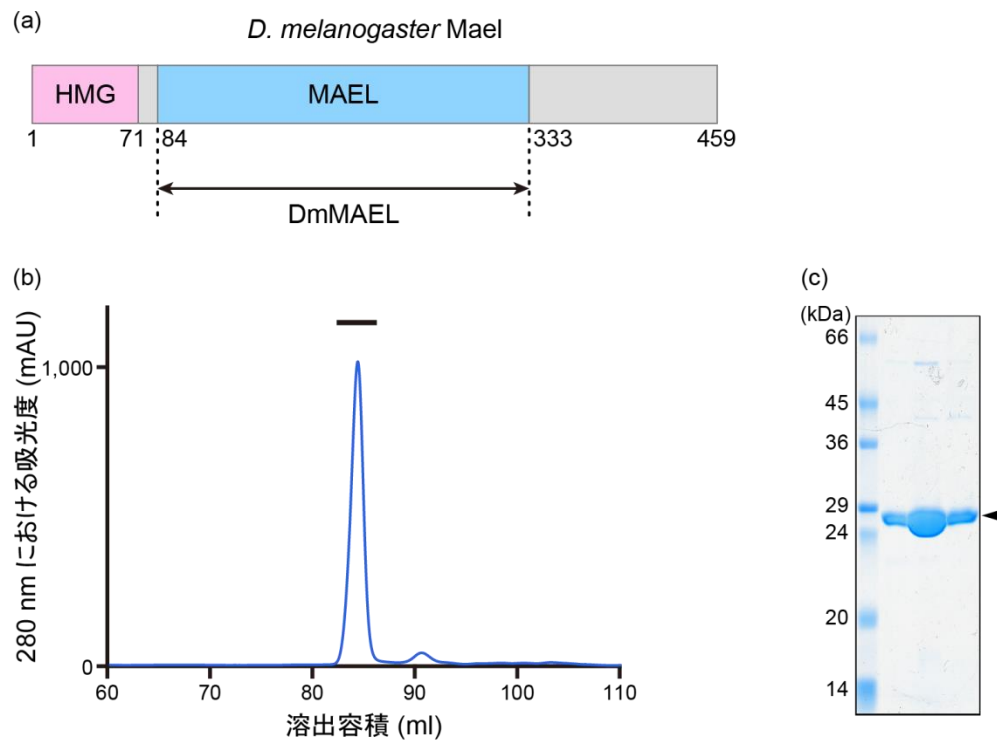


図 1-5 DmMAEL の調製

- (a) 結晶化に使用したコンストラクト.
- (b) 最終精製産物の陰イオン交換クロマトグラフィーにおける溶出ピーク.
- (c) (b) の SDS-PAGE 検出結果.

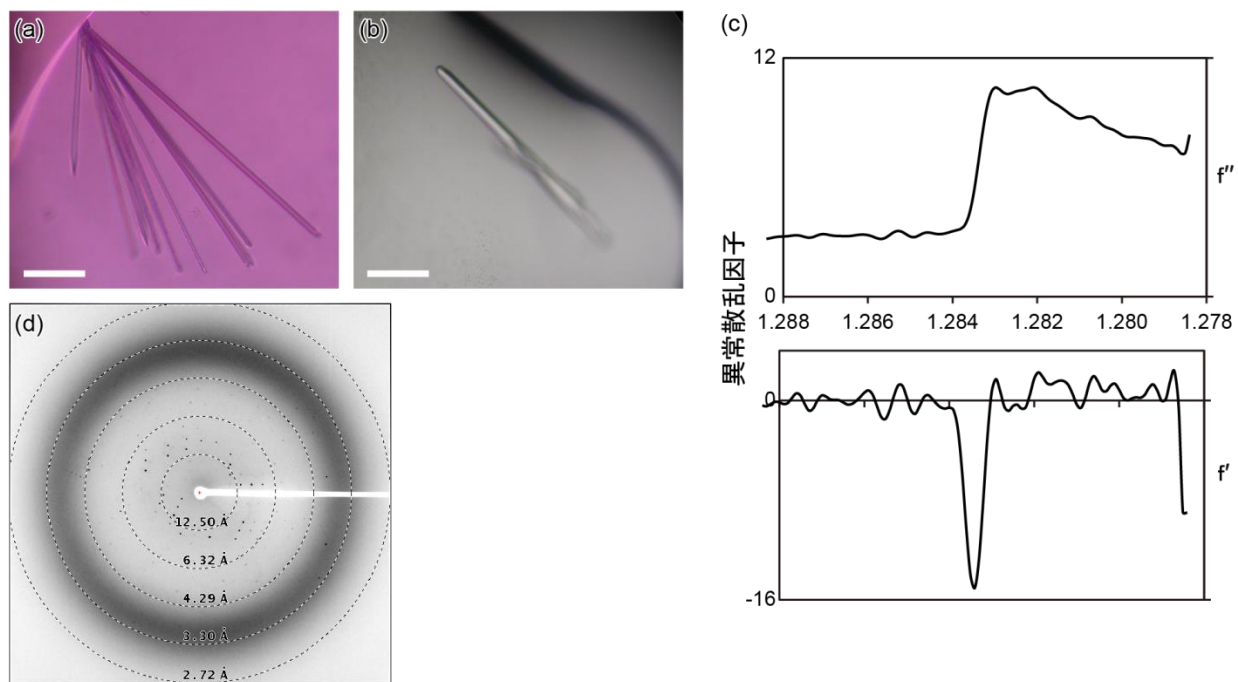


図 1-6 DmMAEL の結晶化， および X 線回折実験

(a) 結晶化初期スクリーニングにより得られた DmMAEL の結晶． スケールバーは 100 μm を表す．

(b) 結晶化条件の最適化により得られた DmMAEL の結晶． スケールバーは 100 μm を表す．

(c) DmMAEL の亜鉛原子の蛍光 X 線スペクトル．

(d) (b) の結晶から得られた回折像．

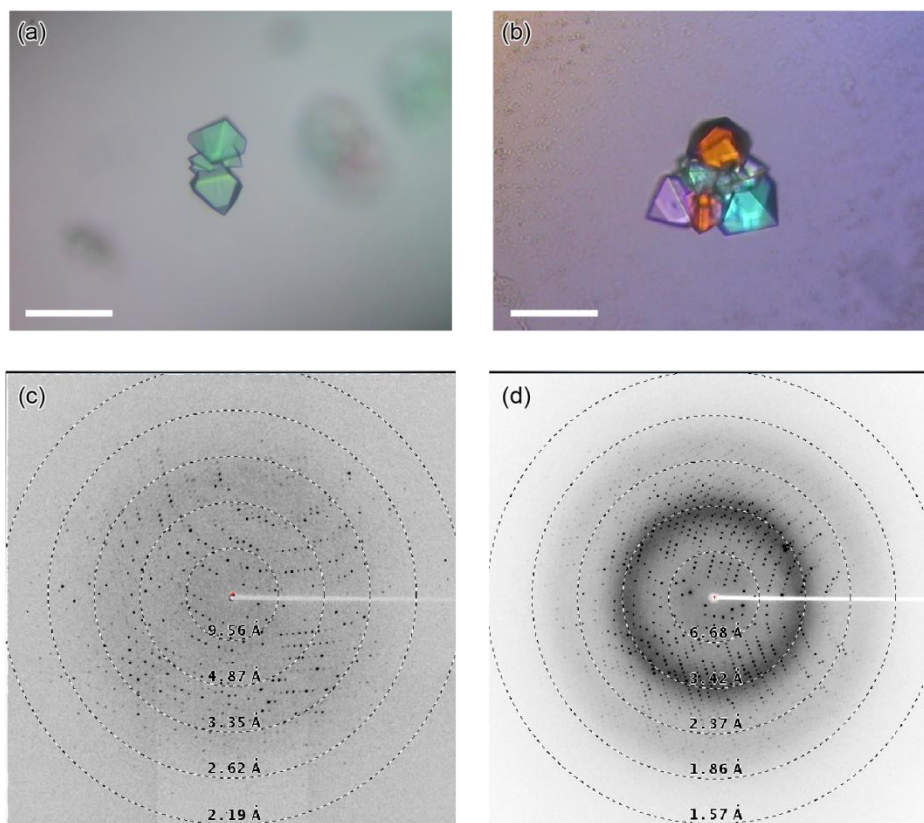


図 1-7 DmMAEL_{C228S} の結晶化， および X 線回折実験

- (a) 結晶化初期スクリーニングにより得られた DmMAEL_{C228S} の結晶。スケールバーは 100 μm を表す。
- (b) 結晶化条件の最適化により得られた DmMAEL_{C228S} の結晶。スケールバーは 100 μm を表す。
- (c) (a) の結晶から得られた回折像。
- (d) (b) の結晶から得られた回折像。

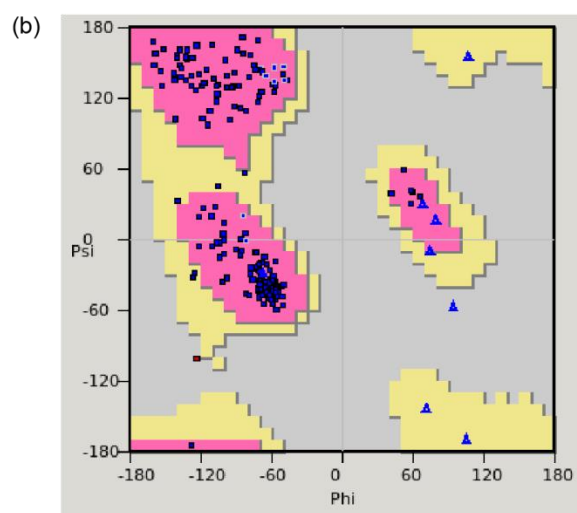
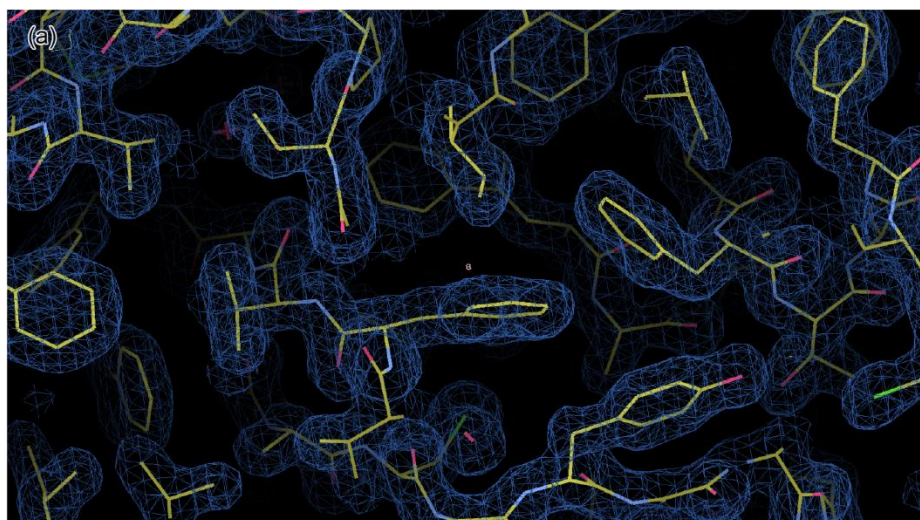


図 1-8 DmMAEL_{C228S} の構造決定

- (a) 構造精密化後の最終的な $2F_o - F_c$ 電子密度マップ。 Contour level = 1.0σ で示した。
 (b) 最終的な DmMAEL のラマチャンドラプロット。

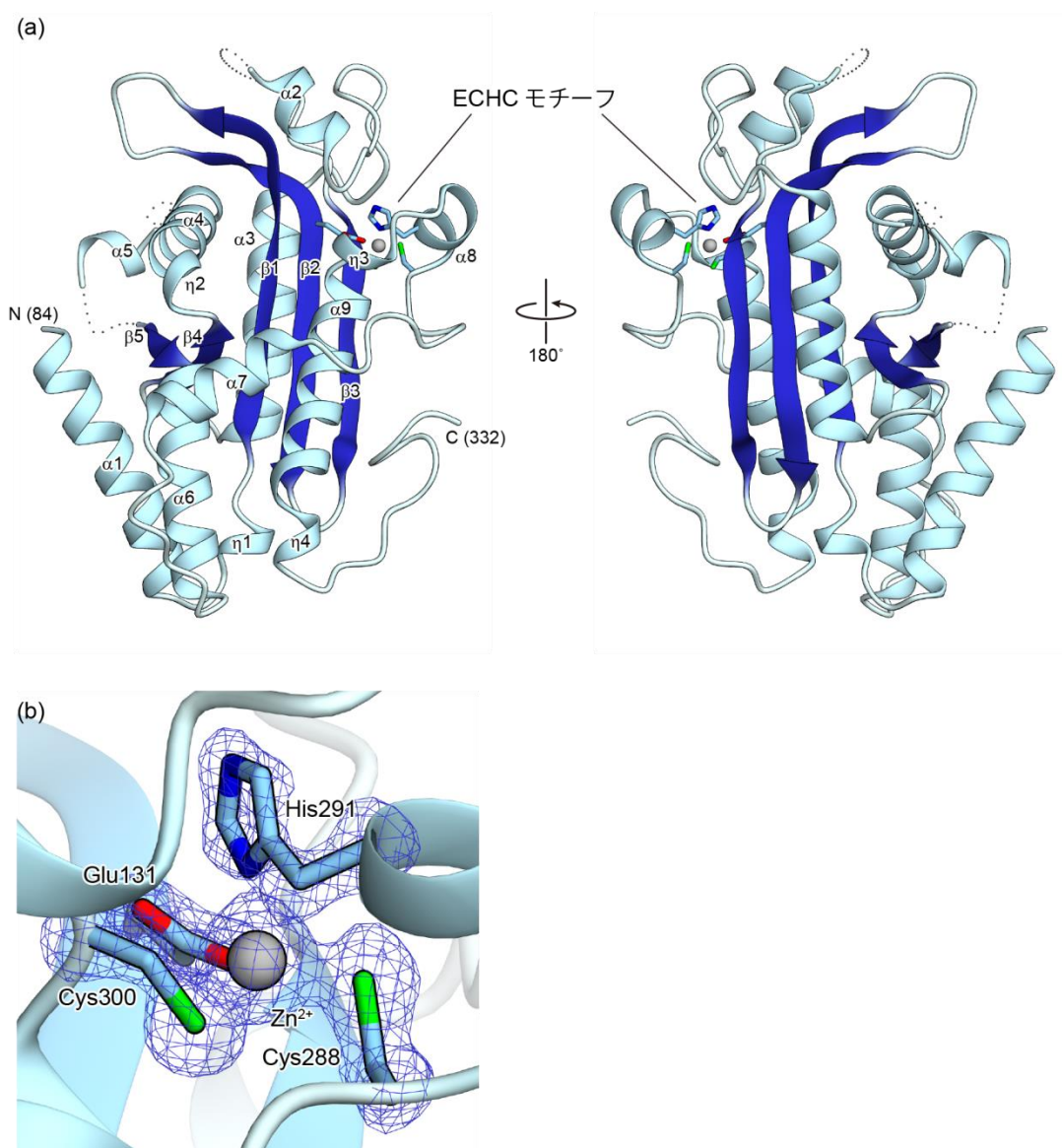


図 1-9 DmMAEL の全体構造

(a) DmMAEL の結晶構造. 電子密度が不明瞭であったディスオーダー領域 (156–162, 228–229, 236–237 残基) を点線で示した.

(b) ECHC モチーフの拡大図. $F_o - F_c$ simulated annealing omit map を青のメッシュで示した (Contour level = 3.5 σ).

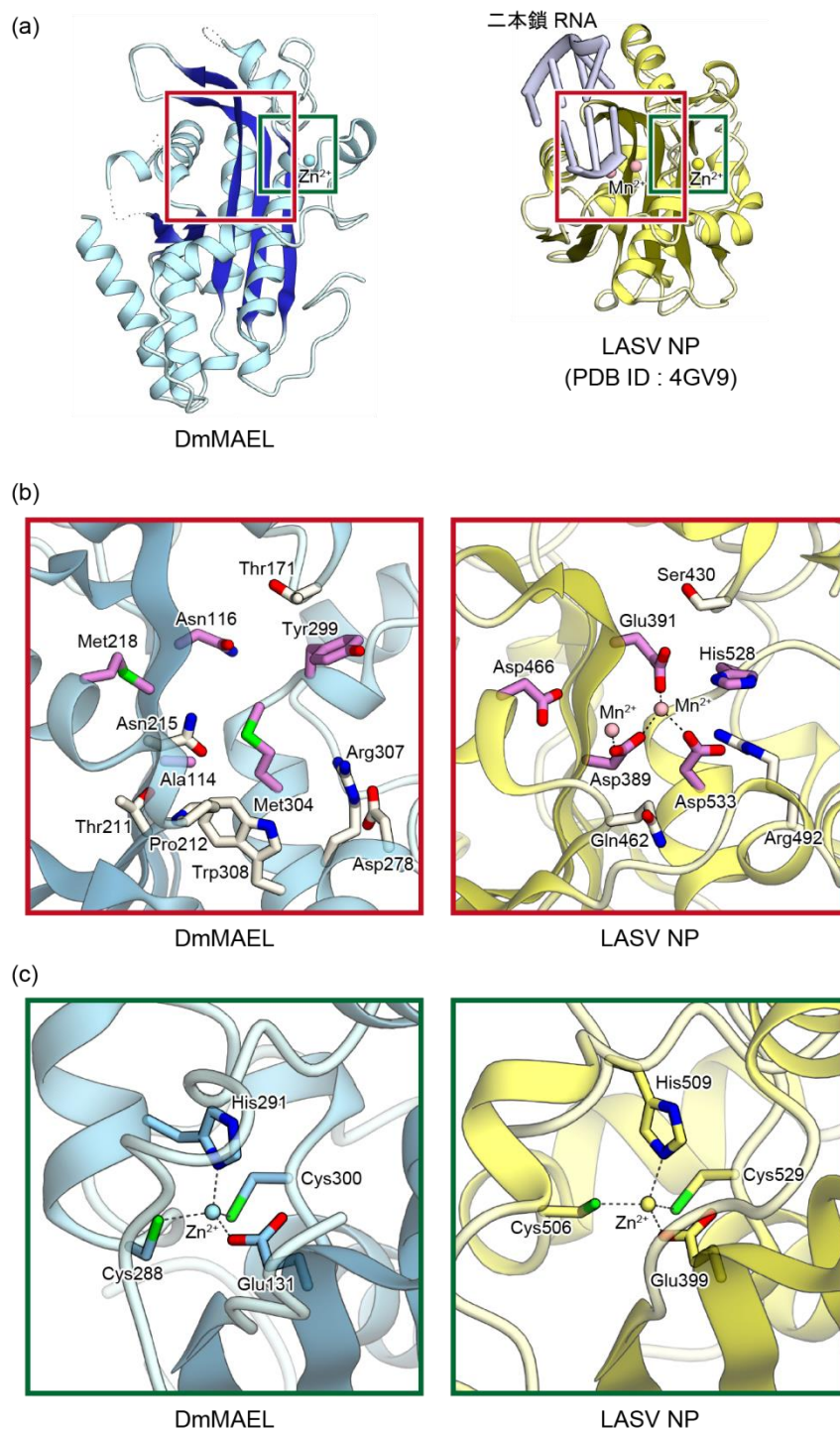


図 1-10 DmMAEL と LASV NP の立体構造比較

(a) DmMAEL の結晶構造 (左), LASV NP- 二本鎖 RNA 複合体の結晶構造 (PDB ID : 4GV9) (右). 亜鉛イオンをそれぞれ水色 (左), 黄色 (右) の球, マンガンイオンをピンク (右) の球で示した. central groove および ECHC モチーフをそれぞれ赤枠, 緑枠で示した.

(b) DmMAEL (左) および LASV NP (右) の central groove の拡大図. LASV NP においては触媒活性部位の溝を示す. LASV NP において, DEDDh モチーフおよび RNA 結合残基をそれぞれマゼンタ, 白色のスティックモデルで示し, マンガンイオンをピンクの球で示した. DmMAEL において, DEDDh モチーフに相当する残基をマゼンタ, その周辺の溝を形成する残基を白色のスティックモデルで示した.

(c) DmMAEL (左) および LASV NP (右) の ECHC モチーフの拡大図. 亜鉛イオンを水色 (左), 黄色 (右) の球で, ECHC モチーフを水色 (左), 黄色 (右) のスティックモデルで示した.

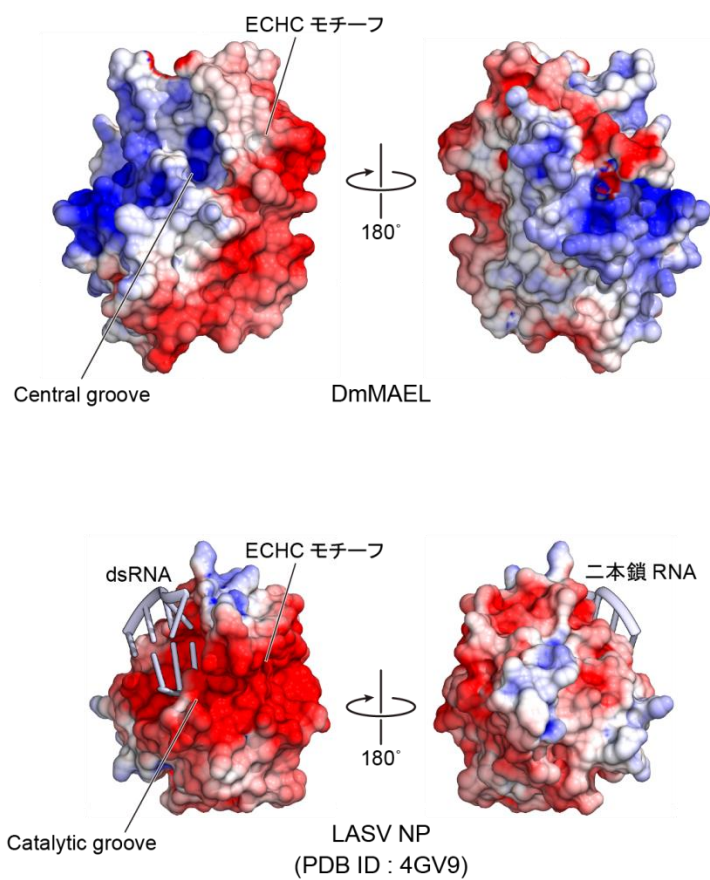
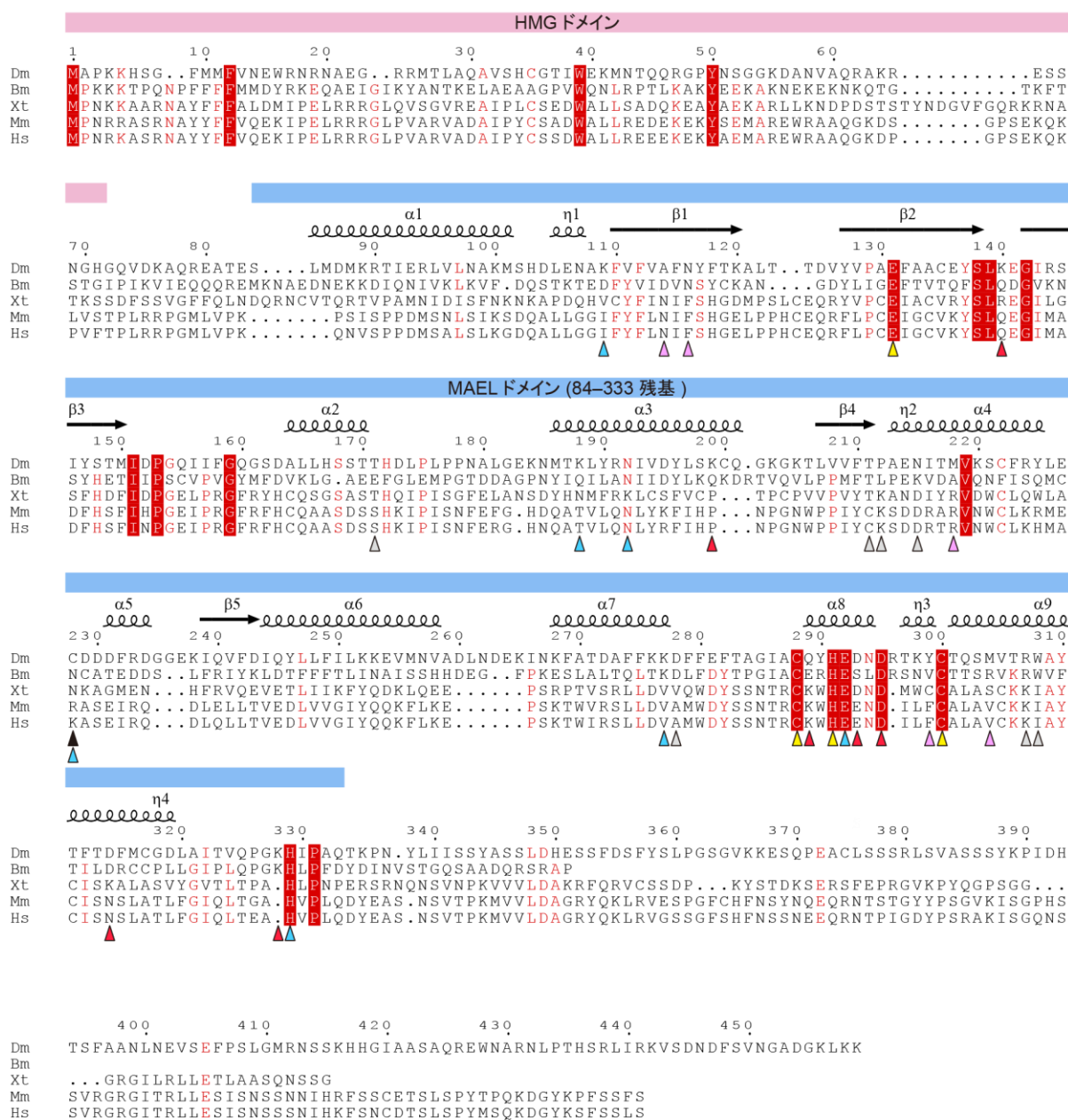


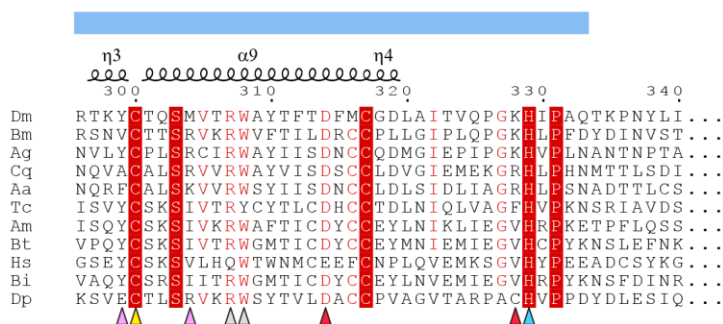
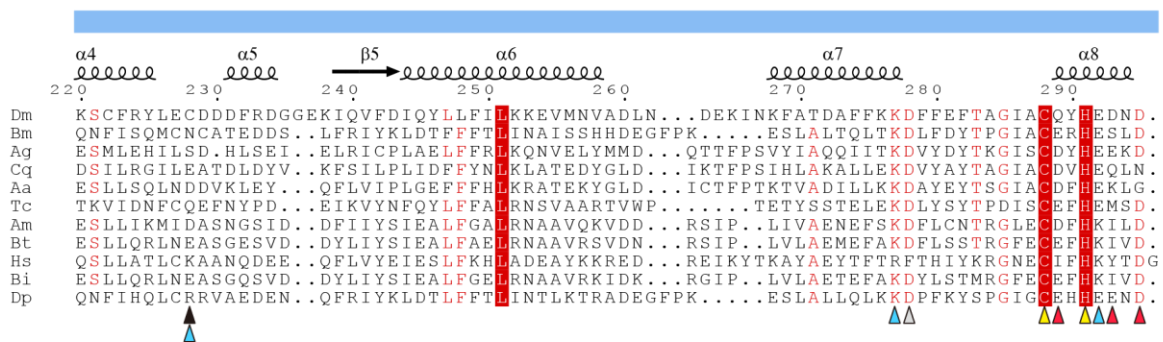
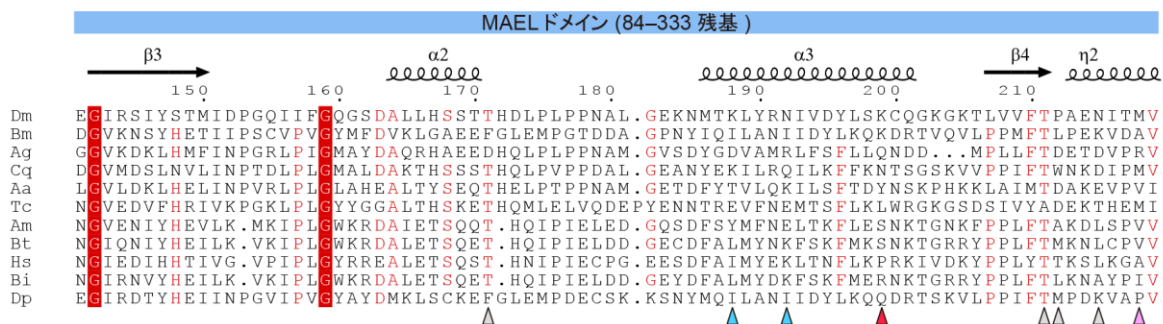
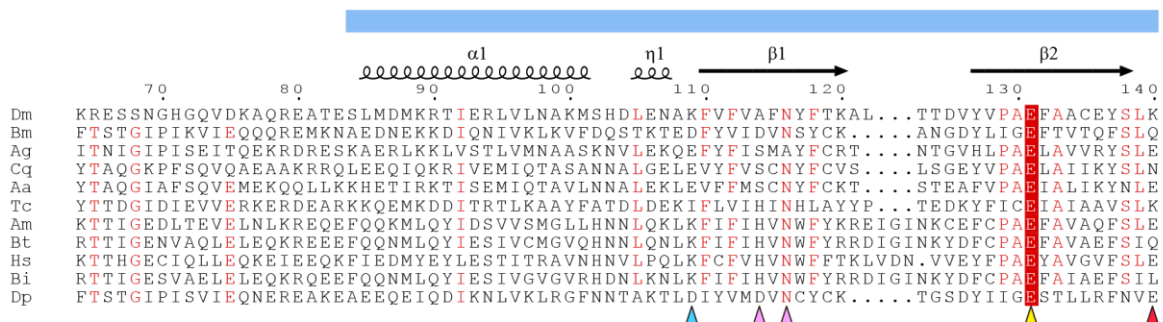
図 1-11 DmMAEL と LASV NP の表面電荷比較
DmMAEL の表面電荷 (上), および LASV NP の表面電荷 (下).
-5 kT/e (赤) ~ 5 kT/e (青) のグラデーションにて着色した.



- ▲ ECHC モチーフ
- ▲ DEDDh モチーフに相当するアミノ酸残基
- ▲ central groove に位置するアミノ酸残基
- ▲ 一本鎖 RNA 切断活性にかかわるアミノ酸残基
- ▲ 一本鎖 RNA 切断活性に関与しないアミノ酸残基
- ▲ 結晶化のためにセリンに置換したシステイン

図 1-12 高等真核生物由来 Mael オースログのアミノ酸一次配列アラインメント

Drosophila melanogaster (Dm), *Bombyx mori* (Bm), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Mus musculus* (Mm), *Homo sapiens* (Hs) 由来 Mael オースログの一次配列アラインメント。DmMAEL の二次構造を配列上部に示した。



- ▲ ECHC モチーフ
- ▲ DEDDh モチーフに相当するアミノ酸残基
- ▲ central groove に位置するアミノ酸残基
- ▲ 一本鎖 RNA 切断活性にかかわるアミノ酸残基
- ▲ 一本鎖 RNA 切断活性に関与しないアミノ酸残基
- ▲ 結晶化のためにセリンに置換したシステイン

図 1-13 昆虫由来 MAEL ドメインのアミノ酸一次配列アラインメント

Drosophila melanogaster (Dm), *Bombyx mori* (Bm), *Anopheles gambiae* (Ag), *Culex quinquefasciatus* (Cq), *Aedes aegypti* (Aa), *Tribolium castaneum* (Tc), *Apis mellifera* (Am), *Bombus terrestris* (Bt), *Harpegnathos saltator* (Hs), *Bombus impatiens* (Bi), *Danaus plexippus* (Dp) 由来MAELドメインの一次配列アラインメント。

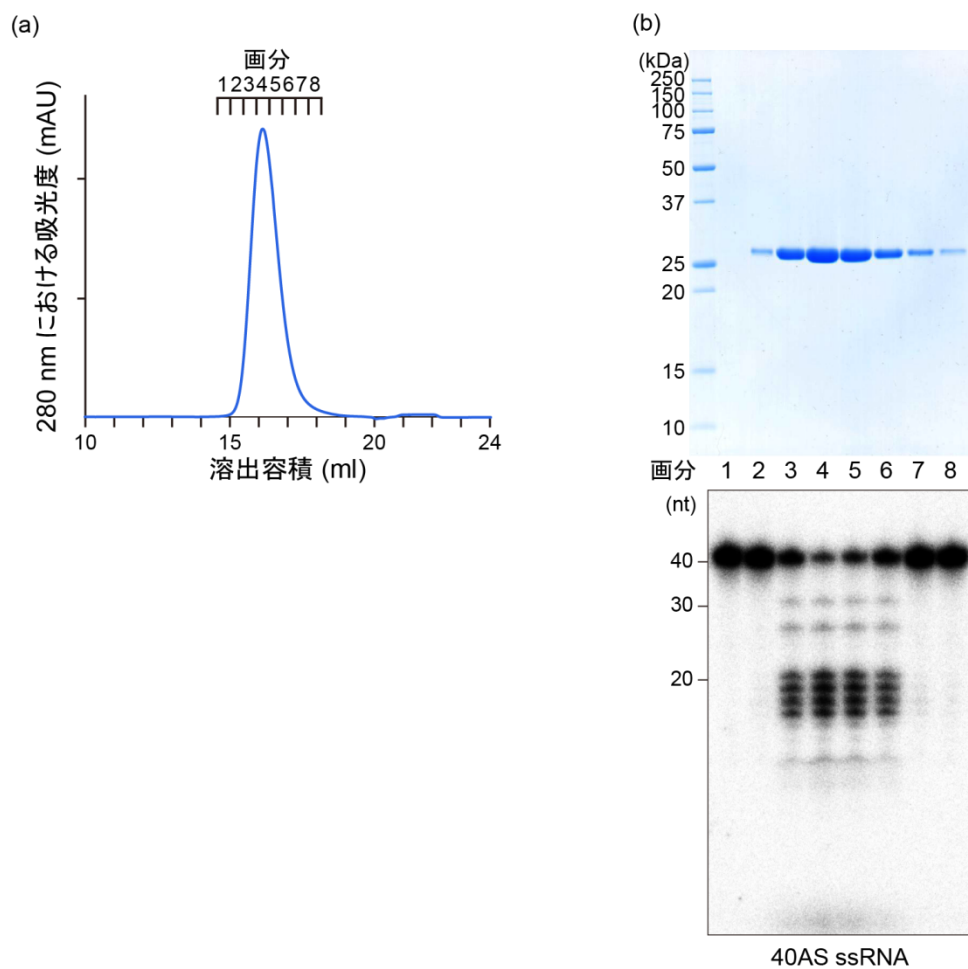


図 1-14 DmMAEL の一本鎖 RNA 切断実験

(a) DmMAEL のゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出ピーク。画分 1~8 を RNA 切断活性測定に使用した。

(b) 画分 1~8 の SDS-PAGE 検出結果 (上)。画分 1~8 の一本鎖 RNA 切断活性測定 (下)。各画分 1 μ l を 40AS ssRNA と混合し、切断反応産物を変性 PAGE で検出した。

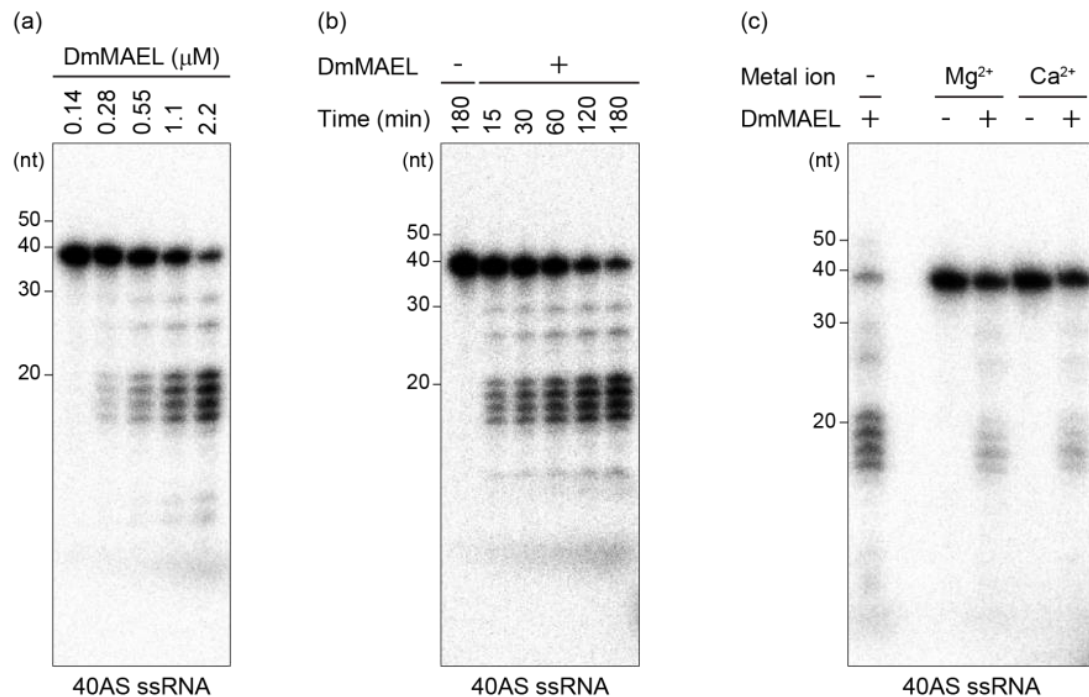


図 1-15 DmMAEL の一本鎖 RNA 切断実験

(a) DmMAEL の一本鎖 RNA 切断活性の量依存性. DmMAEL (0.14–2.2 μm) を 40AS ssRNA と 26°C, 3 時間反応させた.
 (b) DmMAEL の一本鎖 RNA 切断活性の時間依存性. DmMAEL (2.2 μm) を 40AS ssRNA と 26°C, 15–180 分反応させた.
 (c) DmMAEL の一本鎖 RNA 切断活性に二価金属イオンの及ぼす影響. 基質として 40AS ssRNA を用いた.

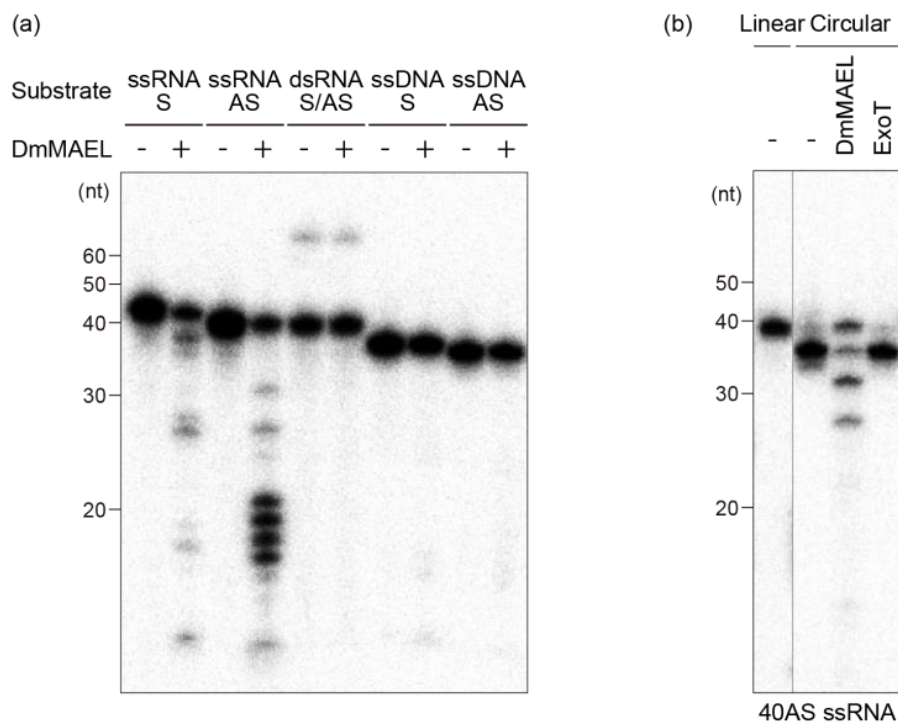


図 1-16 DmMAEL の一本鎖 RNA 切断実験

(a) DmMAEL の基質特異性. S および AS はそれぞれセンス鎖, アンチセンス鎖を示す.
 (b) DmMAEL の線状および環状一本鎖 RNA (40AS ssRNA) に対する切断活性. 環状 RNA が形成されていることを確認するために Exonuclease T (ExoT) をコントロールとして用いた.

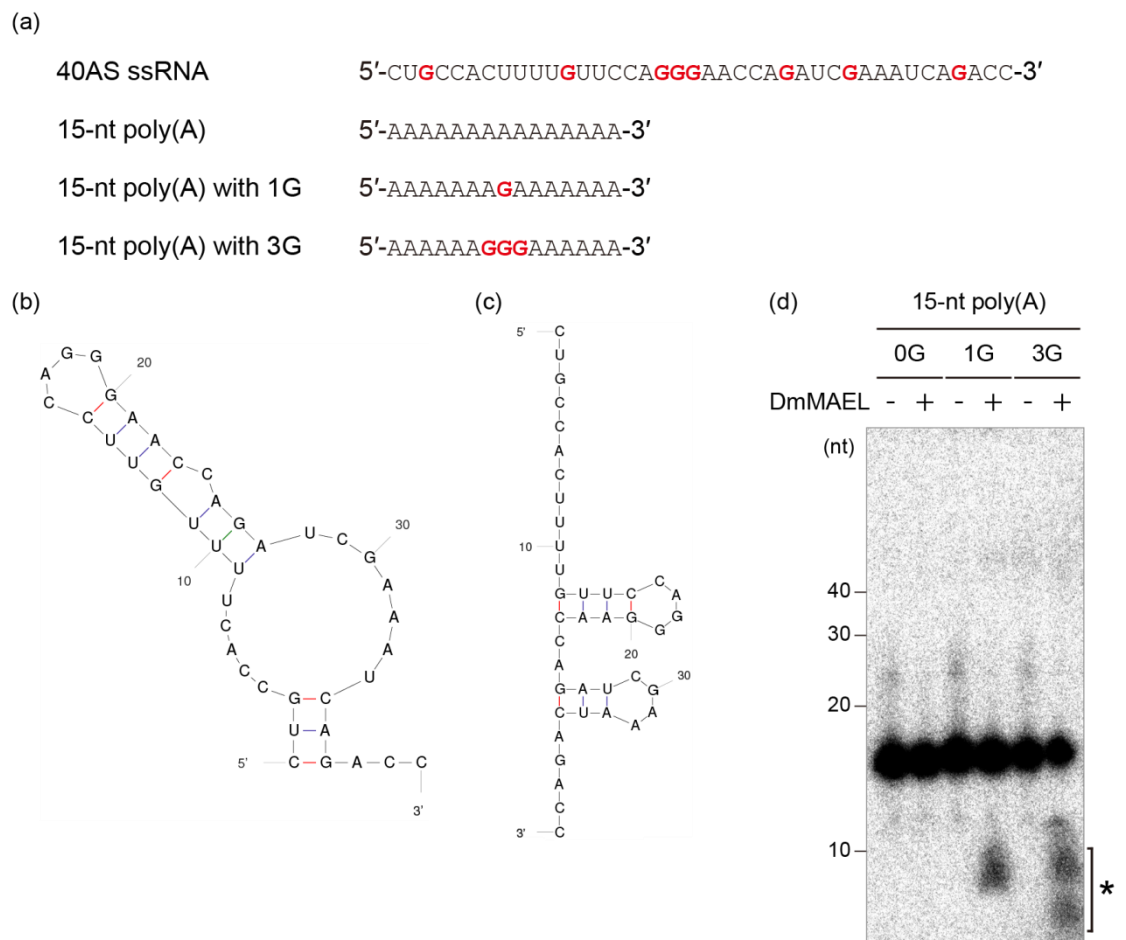


図 1-17 DmMAEL の一本鎖 RNA 切断実験

(a) RNA 切断活性測定に用いた一本鎖 RNA の塩基配列。 グアニン残基を太字， 赤色で示した。

(b, c) Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>) による 40AS ssRNA の二次構造予測。 2 例の結果を示した。

(d) DmMAEL のグアニン残基 (0, 1, 3 残基) を含む 15-nt poly(A) に対する切断活性。 切断反応産物をアスタリ スクで示した。

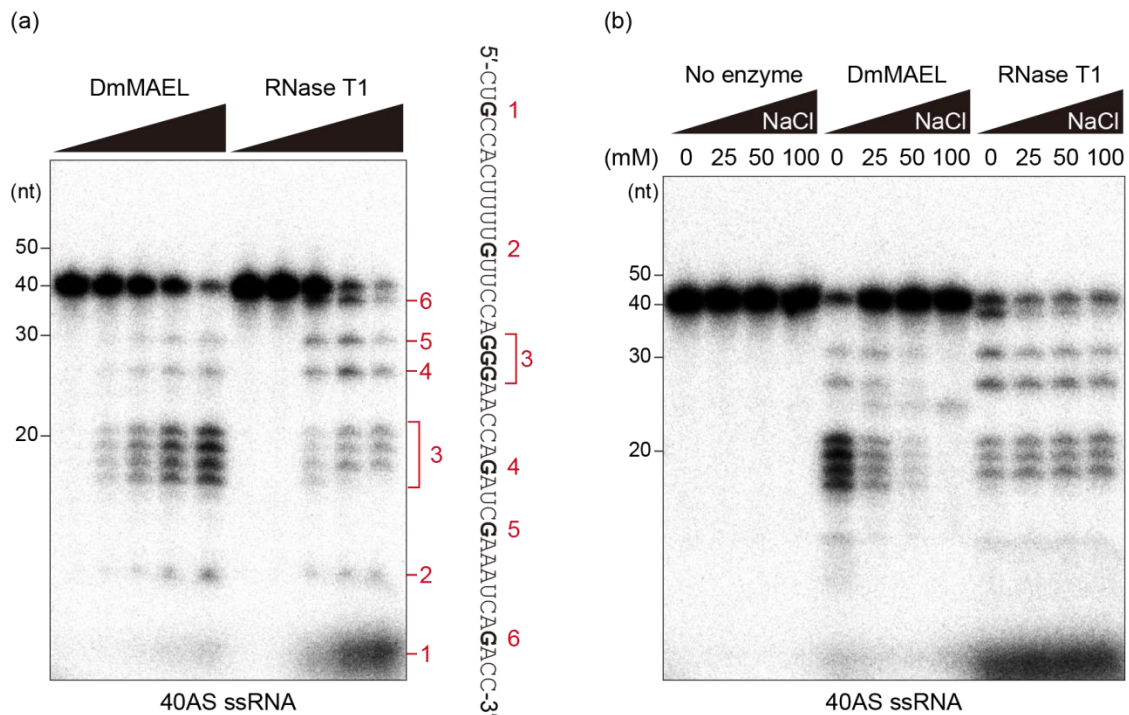


図 1-18 DmMAEL と RNase T1 の一本鎖 RNA 切断実験

(a) DmMAEL と RNase T1 の RNA 切断活性比較. DmMAEL (0.14–2.2 μ M), RNase T1 (0.5–10 units) を 40AS ssRNA と 26°C, 3 時間反応させた. 40AS ssRNA の塩基配列を右に示し, グアニン塩基を太字で示した. 切断部位と予想される箇所を赤文字で示した.

(b) NaCl 存在下での DmMAEL と RNase T1 の RNA 切断活性比較. 基質として 40AS ssRNA を用いた.

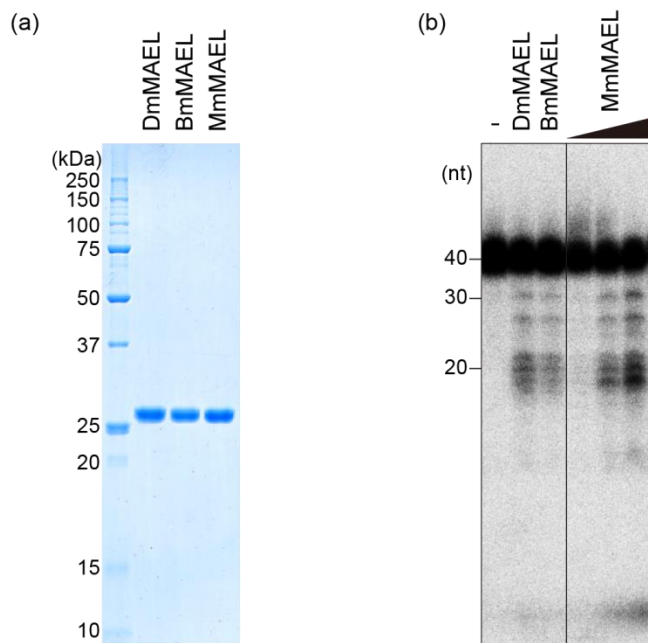


図 1-19 複数動物由来 MAEL ドメインの一本鎖 RNA 切断実験

(a) DmMAEL, BmMAEL, MmMAEL の SDS-PAGE 検出結果.

(b) DmMAEL, BmMAEL, MmMAEL の 40AS ssRNA 切断活性測定. 基質として 40AS ssRNA を用いた.

DmMAEL (1 μ M), BmMAEL (1 μ M), MmMAEL (1, 10, 20 μ M) を RNA と反応させた.

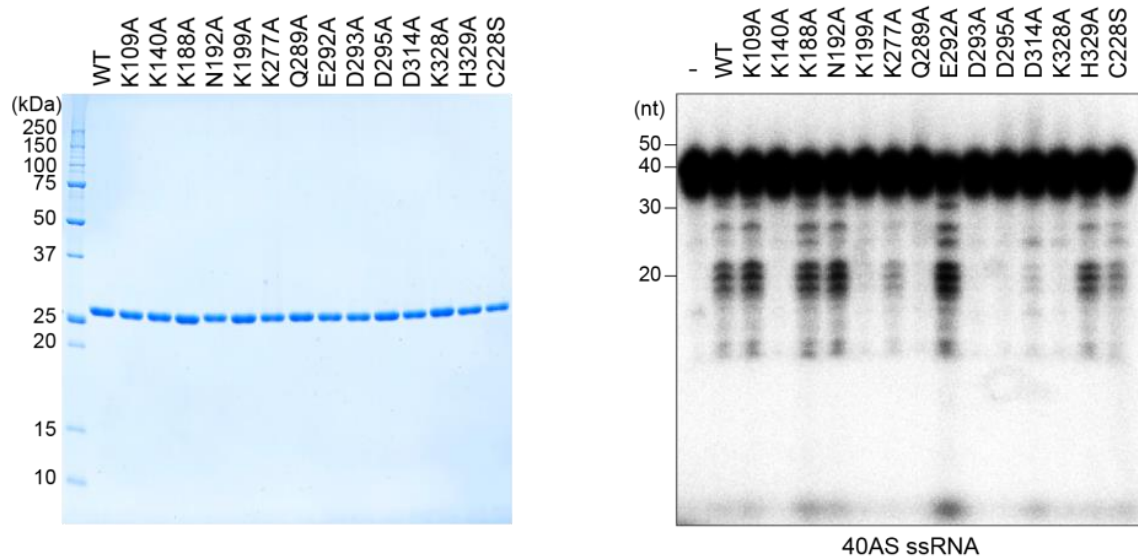


図 1-20 DmMAEL 変異体の一本鎖 RNA 切断実験

(a) DmMAEL 変異体の SDS-PAGE 検出結果.

(b) DmMAEL 変異体の RNA 切断活性測定. 基質として 40AS ssRNA を用いた.

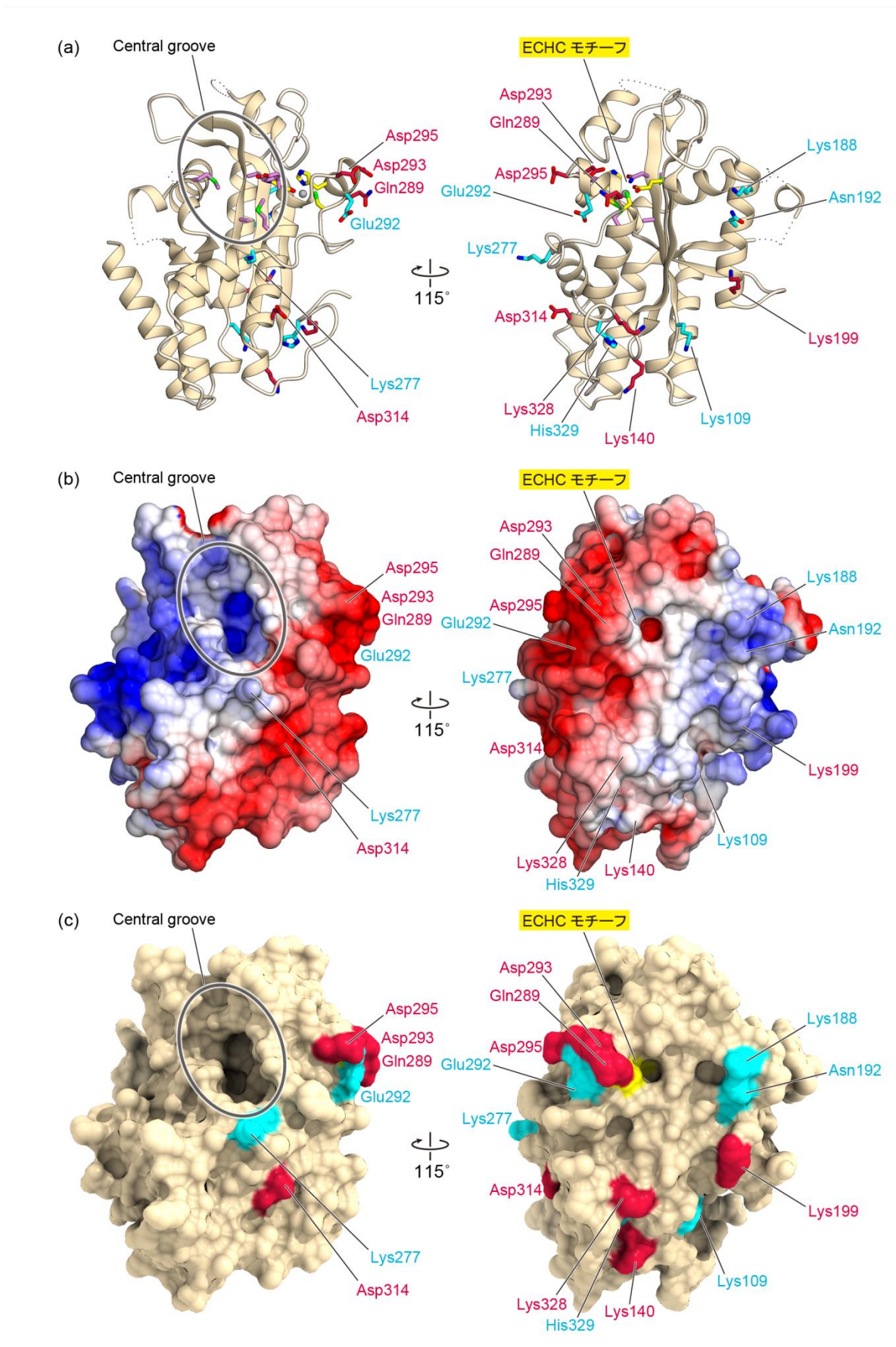


図 1-21 DmMAEL 変異体の一本鎖 RNA 切断実験

生化学的解析に用いた変異箇所の構造マッピング。リボンモデル (a), 表面電荷 (b), 分子表面 (c) にそれぞれ同じ角度からマッピングした。一本鎖RNA切断活性に関与する残基を赤、関与しない残基をシアンで色付けした。ECHCモチーフを黄色で示した。central grooveを灰色の円で示した。

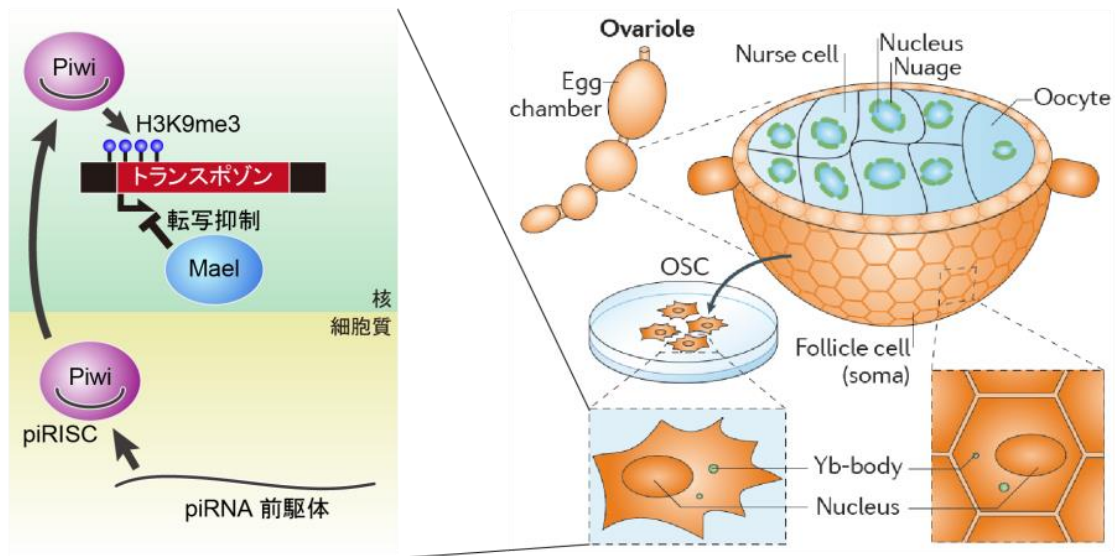


図 1-22 ショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 OSC

OSCとはショウジョウバエ卵巣濾胞細胞から単離された生殖系列体細胞培養細胞である。OSCにはPIWIタンパク質のうちPiwiのみが発現しており、一次piRNA産生経路およびPiwiを介したトランスポゾン抑制経路が機能する。

(Siomi *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011より転載)

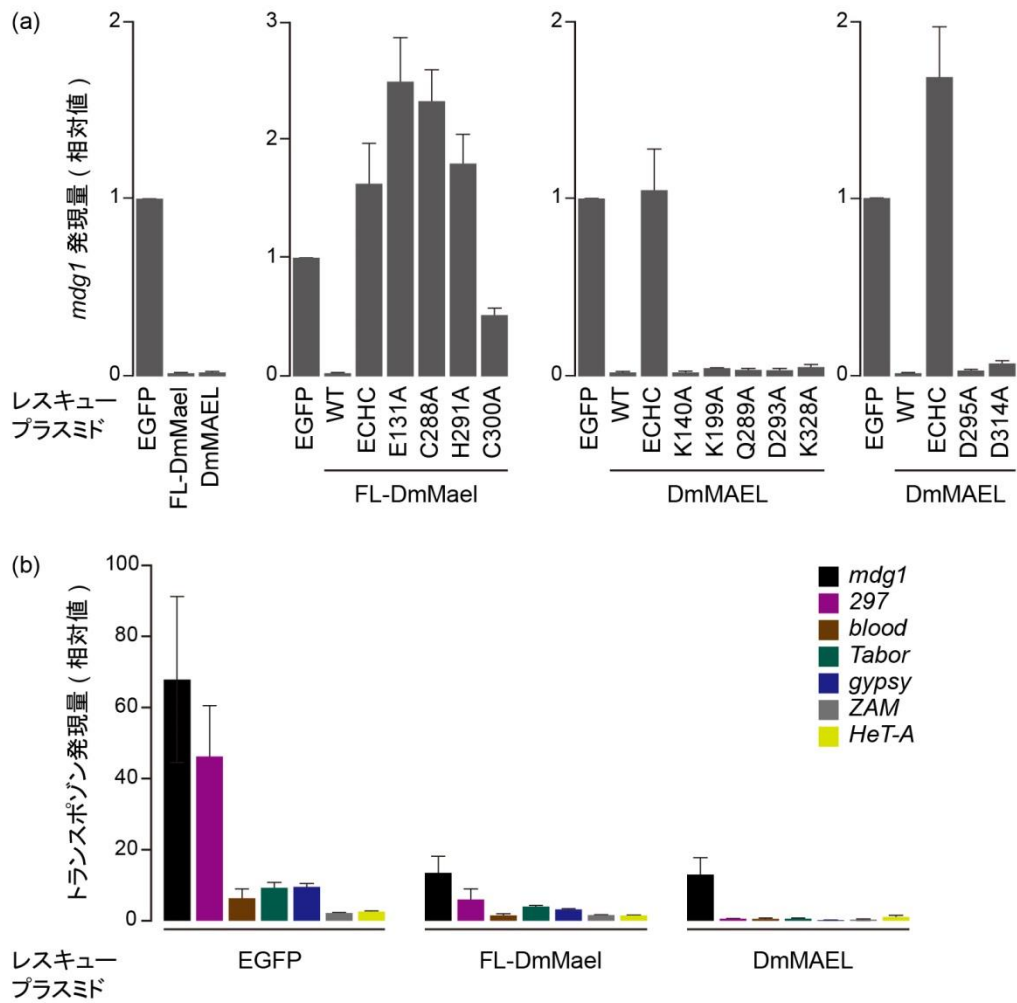


図 1-23 OSC を用いたレスキューアッセイ

(a) FL-DmMael, DmMAEL, FL-DmMael ECHCモチーフ変異体, DmMAEL ECHCモチーフ変異体, DmMAEL活性変異体のトランスポゾン*mdg1*の抑制活性. EGFPをコントロールとして使用した. ECHCはE131A/C288A/H291A/C300A四重変異体を示す. (n = 3, エラーバーは標準誤差を示した.)

(b) FL-DmMael, DmMAELの様々なトランスポゾン (*mdg1*, 297, *blood*, *Tabor*, *gypsy*, ZAMは体細胞発現性, *HeT-A*は生殖細胞発現性) の抑制活性. EGFPをコントロールとして用いた. (n = 3, エラーバーは標準誤差を示した.)

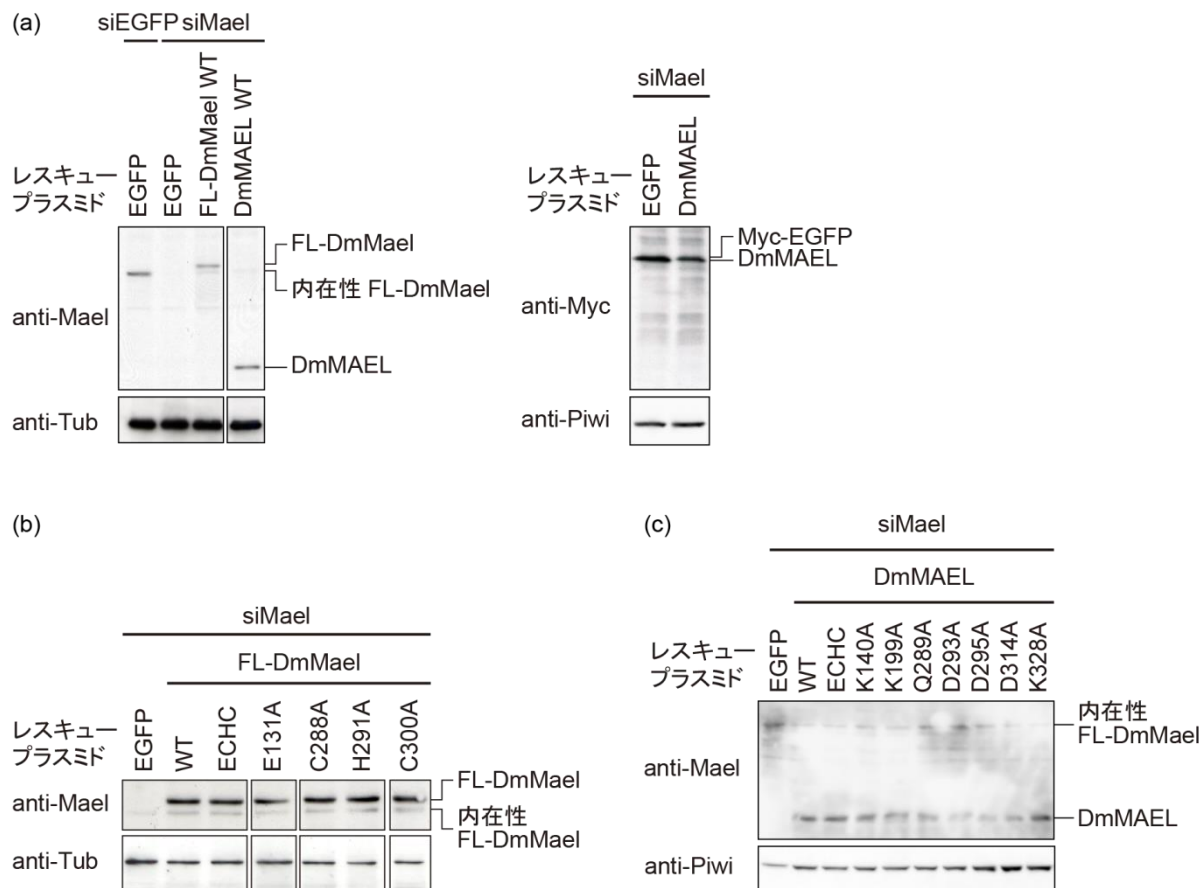
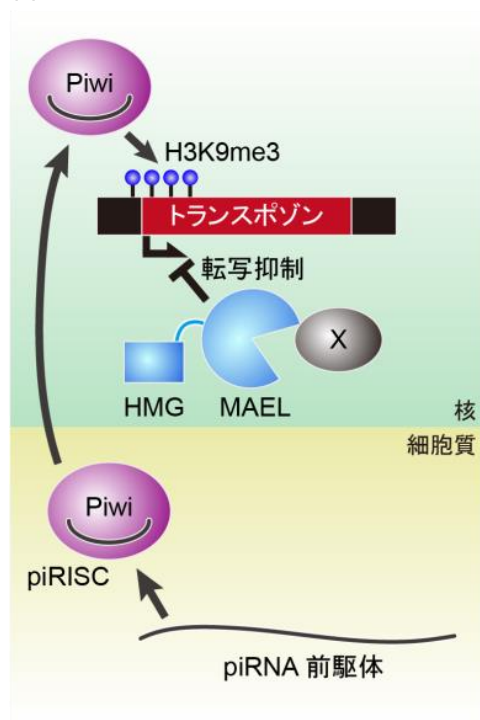


図 1-24 OSC における Mael の発現量

WT FL-DmMaelおよびWT DmMAEL (a), FL-DmMael ECHCモチーフ変異体 (b), DmMAEL ECHCモチーフ変異体および活性変異体 (c) をそれぞれ抗Mael抗体あるいは抗Myc抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。TubulinあるいはPiwiをコントロールとして用いた。

(a) ショウジョウバエ卵巣体細胞



(b) マウス精巣生殖細胞

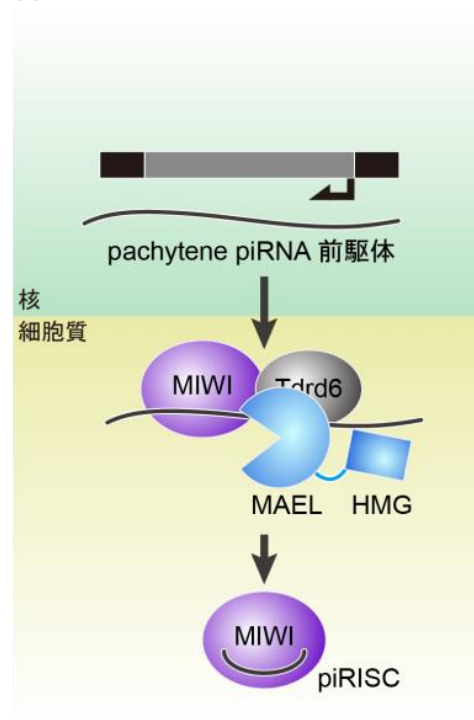


図 1-25 piRNA 経路における Mael の機能（モデル）

- (a) ショウジョウバエ卵巣体細胞においてMaelは核内におけるトランスポゾンの転写抑制にかかわる。MaelはMAELドメインを介して未知の因子Xと相互作用することによってトランスポゾン抑制にかかわる。
- (b) マウス精巣生殖細胞においてMaelはpachytene piRNA産生にかかわる。Mael複合体のうち、MAELドメインの一本鎖RNA切断活性によりpachytene piRNA前駆体を切断することでpiRNA成熟化に関与する。

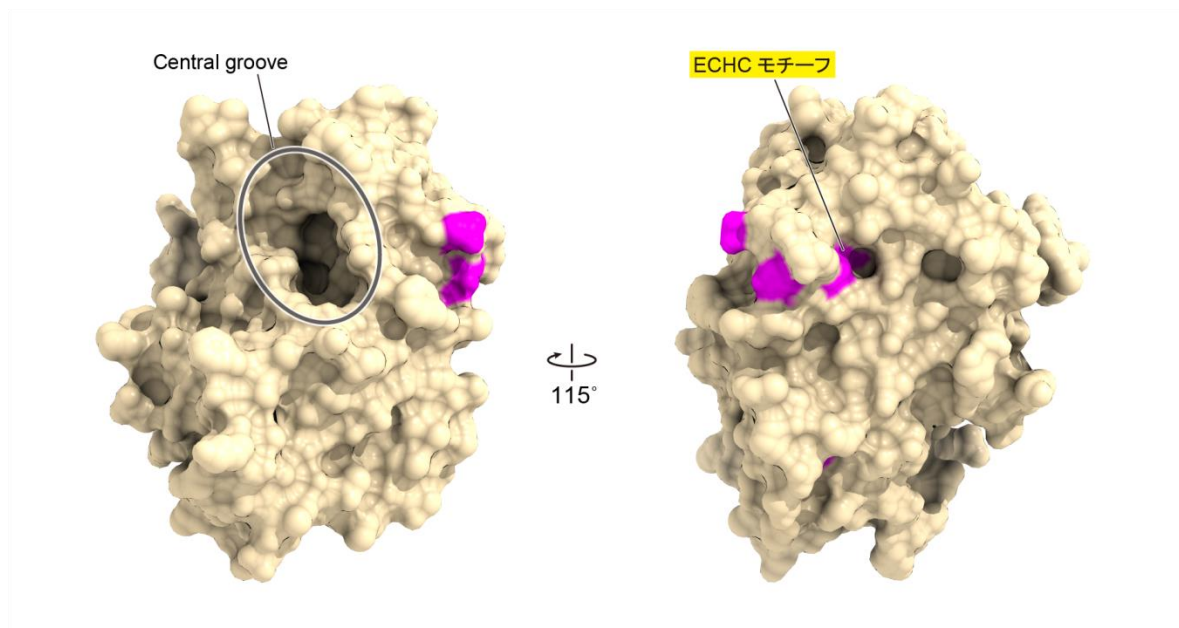


図 1-26 高等真核生物由来 MAEL ドメイン間で高度に保存されたアミノ酸残基のマッピング
 高等真核生物由来MAELドメインにおいて高度に保存され、表面に露出し、かつ親水性の残基をマゼンタでマッピングした。

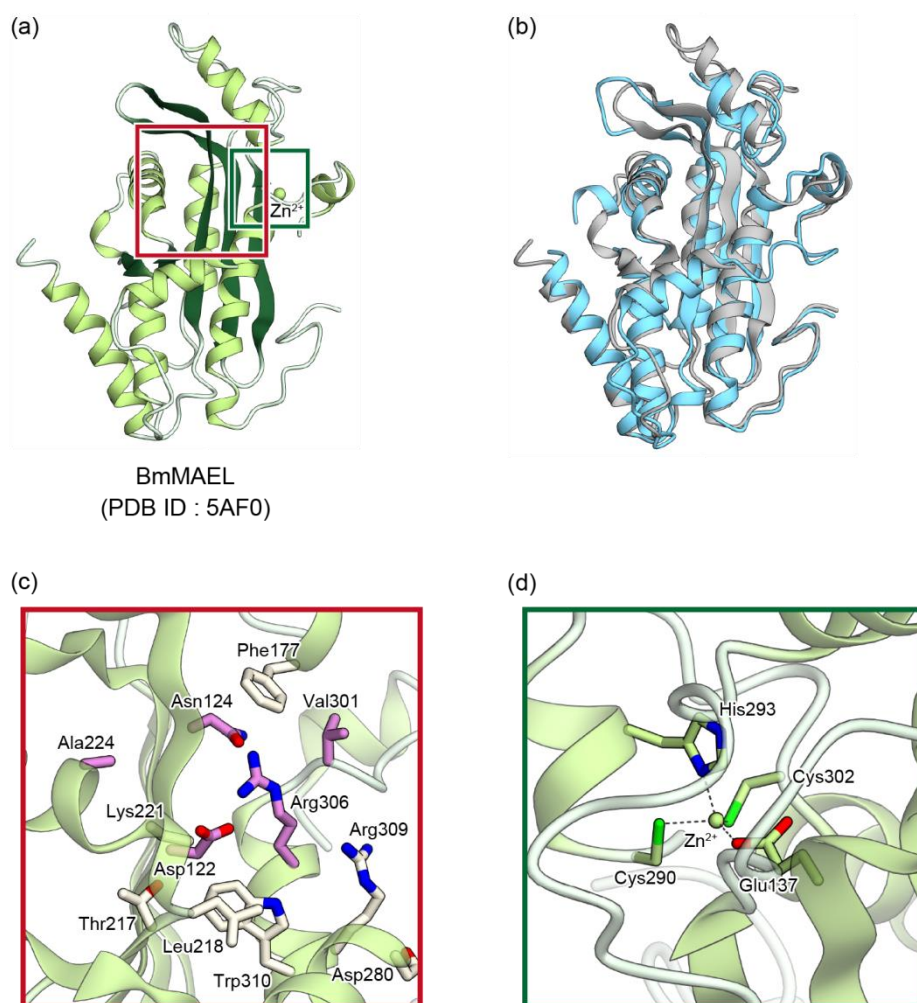


図 1-27 DmMAEL と BmMAEL の立体構造比較

(a) BmMAEL の結晶構造 (PDB ID : 5AF0). 亜鉛イオンを黄緑色の球で示した. central groove および ECHC モチーフをそれぞれ赤枠, 緑枠で示した.

(b) DmMAEL と BmMAEL の重ね合わせ. DmMAEL を水色, BmMAEL を灰色のリボンモデルで示した.

(c) BmMAEL の central groove の拡大図. DEDDh モチーフに相当する残基をマゼンタ, その周辺の溝を形成する残基を白色のスティックモデルで示した.

(d) BmMAEL の ECHC モチーフの拡大図. 亜鉛イオンを黄緑色の球で, ECHC モチーフを黄緑色のスティックモデルで示した.

表 1-1 RNA 切断実験に用いた核酸の塩基配列

40-nt sense RNA	GGUCUGAUUUUCGAUCUGGUUCCCUGGAACAAAAGUGGCAG
40-nt antisense RNA	CUGCCACUUUUGUUCCAGGGAACCAGAUCGAAAUCAGACC
40-nt sense DNA	GGTCTGATTTTCGATCTGGTTCCCTGGAACAAAAGTGGCAG
40-nt antisense DNA	CTGCCACTTTTGTTCAGGGAACCAGATCGAAATCAGACC
15-nt poly(A)	AAAAAAAAAAAAAAAA
15-nt poly(A) with 1G	AAAAAAAGAAAAAA
15-nt poly(A) with 3G	AAAAAAGGGAAAAAA

表 1-2 レスキューアッセイに用いた核酸の塩基配列

レスキューアッセイに用いた siRNA	
siMael sense	CGCCAAGAUGUCCCAUGAUTT
siMael antisense	AUCAUGGGACAUCUUGGCGTT
siEGFP sense	GGCAAGCUGACCCUGAAGUTT
siEGFP antisense	ACUUCAGGGUCAGCUUGCCTT
qRT-PCR に用いたプライマー	
<i>mdg1</i> _forward	AACAGAAACGCCAGCAACAGC
<i>mdg1</i> _reverse	CGTTCCCATGTCCGTTGTGAT
<i>297</i> _forward	CTGGCAAAGGGATTTTCATCA
<i>297</i> _reverse	TGCATTCCTAAGGCCAAATG
<i>blood</i> _forward	TATCGCATGGCAGATAGCCAAA
<i>blood</i> _reverse	CGTGGAATTCGGAAGTGGTTTC
<i>Tabor</i> _forward	ACGTTGTTACGACATTAGCCG
<i>Tabor</i> _reverse	GGGTTGGTTCGGATCTGACG
<i>gypsy</i> _forward	ACTAGACTGCACGTACTCGGACA
<i>gypsy</i> _reverse	GTTAGCTTCTTTTCAACTTCATCGT
<i>ZAM</i> _forward	ACTTGACCTGGATACACTCACAAC
<i>ZAM</i> _reverse	GAGTATTACGGCGACTAGGGATAC
<i>HeT-A</i> _forward	CGCGCGGAACCCATCTTCAGA
<i>HeT-A</i> _reverse	CGCCGCAGTCGTTTGGTGAGT
<i>rp49</i> _forward	CCGCTTCAAGGGACAGTATCTG
<i>rp49</i> _reverse	ATCTCGCCGCAGTAAACGC

表 1-3 DmMAEL の回折データ, および構造精密化後の統計値

	DmMAEL (結晶 I)	DmMAEL (結晶 II)
Data collection		
Beamline	SPring-8 BL32XU	SPring-8 BL32XU
Wavelength (Å)	1.282	1.000
Space group	$P4_32_12$	$P4_32_12$
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	71.9, 71.9, 86.8	71.9, 71.9, 88.4
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50.0–2.40 (2.55–2.40)	50.0–1.60 (1.70–1.60)
R_{sym}	0.157 (0.897)	0.088 (1.17)
$\ \sigma I$	8.13 (2.01)	18.7 (2.40)
Completeness (%)	92.8 (95.3)	99.8 (99.6)
Redundancy	4.08 (3.86)	14.3 (14.3)
CC(1/2)	0.992 (0.715)	0.999 (0.797)
Refinement		
Resolution (Å)		33.4–1.60
No. reflections		31,075
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$		0.194 / 0.216
No. atoms		
Protein		1,902
Ligand		8
Zinc ion		1
Solvent		82
B -factors (Å ²)		
Protein		31.0
Ligand		43.8
Zinc ion		17.9
Solvent		34.4
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)		0.011
Bond angles (°)		1.289
Ramachandran plot		
Favored (%)		98.3
Allowed (%)		1.7
Outlier (%)		0.0

*Highest resolution shell is shown in parentheses.

第二章 PIWI サブファミリータンパク質の結晶構造解析

2.1 Argonaute タンパク質

argonaute は元々、シロイヌナズナ変異体の形態がカイダコ *Argonauta argo* に似ていることにちなんで名づけられた⁷⁷。後になって RNAi が発見され⁷⁸、生化学的解析などにより標的 RNA の切断を司る中核複合体が得られた^{79,80}。この中核複合体は短い一本鎖 RNA (ガイド鎖 RNA) を含むことから RISC (RNA-induced silencing complex) と命名され⁸¹、その性質が詳細に調べられた⁸¹⁻⁸⁷。やがて RISC に含まれる複数のタンパク質因子のなかでも Argonaute タンパク質が RISC の活性中心であることが示された⁸⁸。なお、Argonaute と小分子 RNA の複合体を RISC として扱う場合も多く、以下でもこれに従うものとする。

Argonaute は AGO サブファミリータンパク質と PIWI サブファミリータンパク質に分類され、前者は miRNA や siRNA と結合しそれぞれ miRISC, siRISC を形成するのに対して、後者は piRNA に結合し piRISC を形成する。以下、小分子 RNA の相違点および両サブファミリータンパク質が形成する RISC の相違点について順を追って述べる (表 2-1 にこれらを簡潔にまとめた)。

2.2 Argonaute に結合する小分子 RNA

2.2.1 miRNA

22 塩基長程度の miRNA は発生・分化・ストレス応答など多くの生命現象にかかわる⁸⁹⁻⁹¹。ヒトには約 2000 種類の miRNA が発現しており、大部分の遺伝子が miRNA による制御をうけるとされている⁹²。

miRNA 前駆体はゲノムにコードされており転写された miRNA 前駆体 (pri-miRNA) は特徴的なヘアピン構造をとる。pri-miRNA のヘアピン構造は Microprocessor と呼ばれるタンパク質複合体により認識・切断され、ヘアピンループ構造をもつ pre-miRNA となる⁹³⁻⁹⁵。pre-miRNA は Dicer などによりさらに切断され、~22 塩基長の二本鎖 RNA が生成される^{96,97}。二本鎖 RNA は AGO タンパク質に取り込まれた後、一方の RNA 鎖が選択的にとどまり、成熟型となる^{98,99}。

2.2.2 siRNA

21 塩基長程度の siRNA は多くの真核生物においてウイルスやトランスポゾンからゲノムをまもる役割を担う^{89,100}。二本鎖 RNA の導入によって標的 mRNA の切断が誘導されるという RNAi の発見⁷⁸でも知られるように、siRNA は現在では標的遺伝子をノックダウンするためのツールとして生命科学研究に汎用されている。

siRNA はウイルスなどに由来する長い二本鎖 RNA を前駆体とする。前駆体は段階的に Dicer によって~21 塩基長の二本鎖 RNA に切断された後、AGO タンパク質に取り込まれ、一方の RNA 鎖のみが残り成熟型となる^{98,99}。

2.2.3 piRNA

23–30 塩基長の piRNA は miRNA や siRNA より長いという点で特徴的である。piRNA は動物の生殖巣にほぼ特異的に発現し、トランスポゾンによる DNA 損傷の脅威から生殖巣ゲノムを保護する役割を担う^{20–24}。第一章で述べたように piRNA クラスターとよばれる特定のゲノム領域から転写される、場合によっては 100 kb にも及ぶ非常に長い一本鎖 RNA を前駆体として piRNA は生成される^{12,25,101}。ショウジョウバエやマウスにおける piRNA 成熟化機構に関して近年報告された知見によると、piRNA 前駆体が PIWI タンパク質に取り込まれた後、ミトコンドリア膜上に局在するエンドリボヌクレアーゼ Zucchini による切断をうけ成熟型となる^{26–29}。Zucchini に加えて未だ正体は不明なエキソヌクレアーゼ Trimmer による 3'末端のトリミングも piRNA の成熟化に関与するという報告もある¹⁰²。さらに piRNA は成熟化に共役して 3'末端の 2'-OH 基がメチル基転移酵素 Hen1/Pimet によりメチル化修飾をうける^{103–105}。

2.3 RISC

Argonaute は 4 つの機能ドメイン (N ドメイン, PAZ ドメイン, MID ドメイン, PIWI ドメイン) と 2 つのリンカードメイン (L1, L2) から構成される分子量 約 100 kDa のタンパク質である (図 2-1a)。PAZ ドメイン, MID ドメインはガイド鎖 RNA の 3'末端, 5'末端をそれぞれ繋ぎとめる (図 2-1b)。サブタイプに依るが PIWI ドメインはエンドリボヌクレアーゼ活性 (スライサー活性) を示し、標的 RNA を切断する (図 2-1b)。

2.3.1 miRISC および siRISC

miRISC, siRISC は共に上述のとおり, まず二本鎖 RNA を前駆体として取り込み pre-RISC を形成する. 続いて一方の RNA 鎖 (パッセンジャー鎖) が引きはがされ, もう片方の RNA 鎖 (ガイド鎖) がとどまり成熟型 RISC を形成する. このパッセンジャー鎖の引きはがしには N ドメインが関与することが報告されている^{106,107}.

ガイド鎖の 5'末端から数えて 2-8 塩基はシード領域とよばれる¹⁰⁸. この領域は標的 mRNA の認識にとりわけ重要であり, シード領域と標的 mRNA の相補性が標的とするか否かを規定している. miRISC および siRISC は共に標的遺伝子転写後の段階において 2 つの機構により制御する. ひとつは標的 mRNA を PIWI ドメインのスライサー活性により切断する機構である. 他方, 標的 mRNA を認識した AGO タンパク質が他に複数のタンパク質群をリクルートし, 結果として翻訳阻害や mRNA のポリアデニン鎖の短縮による mRNA の不安定化を誘導する機構も存在する¹⁰⁹.

2.3.2 piRISC

第一章で述べたように piRISC の標的 mRNA 抑制機構はサブタイプによって異なる. あるサブタイプでは PIWI ドメインのスライサー活性により標的 mRNA を直接切断する転写後抑制機構をもってはたらき, 別のサブタイプでは標的領域に対してヒストンメチル化や DNA メチル化を誘導する転写抑制機構をもってはたらく.

PIWI タンパク質は数十アミノ酸残基以上からなる長いループを N 末端に有する. この N 末端ループにはグリシン残基とアルギニン残基が豊富に並んだ領域が複数存在し, ショウジョウバエ・マウス・アフリカツメガエル¹¹⁰の PIWI タンパク質に関してアルギニン残基が多くの場合対称的ジメチル化修飾 (sDMA: symmetrical dimethyl arginine) をうけることが報告されている¹¹⁰⁻¹¹². sDMA は Tudor ドメインタンパク質により特異的に認識される¹¹⁰⁻¹¹². このように PIWI タンパク質は長い N 末端ループを介して Tudor ドメインタンパク質をリクルートする.

2.4 Argonaute の構造生物学的研究の流れ

上述のように Argonaute は標的 RNA の切断や翻訳の抑制などの中核を司る. ではいかにして Argonaute が小分子 RNA 前駆体を取り込み pre-RISC を形成するか, 成熟型 RISC を形成するか, 成熟型 RISC が標的 mRNA を認識し切断するのか, Argonaute

の各ドメインはいかに協調してはたらくのか、などといった様々な疑問が生じる。こういった問いに対して明確な解を得るべく、これまで主に X 線結晶構造解析を用いた構造解析により原核生物あるいは真核生物に属するさまざまな生物種由来 Argonaute 単体あるいは核酸との複合体の結晶構造が原子分解能レベルで解き明かされてきた³。以下に Argonaute の構造解析についてこれまでの歩みを述べる。

2.4.1 原核生物由来 Argonaute ホモログの結晶構造解析

初めに全長構造が決定されたのは真核生物由来のものではなく超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来 Argonaute ホモログ (PfAgo) の単体構造¹¹³であった。この立体構造から Argonaute の 4 つの機能ドメインがどのような配置をとるかが明らかになった。さらに PIWI ドメインのスライサー活性部位の空間配置からガイド鎖 RNA と結合した Argonaute がどのように標的 mRNA を切断するかのモデルが予想され、RISC の触媒本体が Argonaute であることが強く支持された。その後も原核生物由来 Argonaute ホモログ単体の結晶構造¹¹⁴⁻¹¹⁶は複数報告された。続いて報告されたのは好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* 由来 Argonaute ホモログ (TtAgo) -ガイド鎖 DNA の二者複合体構造¹¹⁷であった。さらに TtAgo-ガイド鎖 DNA および様々な塩基長の標的 RNA の三者複合体構造¹¹⁸⁻¹²⁰が相次いで決定された。この他にも核酸との複合体構造¹²¹⁻¹²³は報告され、この一連の結晶構造解析によって、Argonaute が核酸結合チャネルを形成しガイド鎖 DNA と結合する様子やガイド鎖 DNA を取り込む際の構造変化、標的 RNA を認識し切断するメカニズムなど Argonaute による RNA サイレンシングの構造基盤モデルが提唱された¹²⁴。

2.4.2 真核生物由来 AGO タンパク質の結晶構造解析

真核生物由来 AGO タンパク質の結晶構造解析については、N ドメインを除く各機能ドメインの単体あるいは RNA 鎖などとの複合体構造が決定されることから始まった¹²⁵⁻¹³³。その後 2012 年になって 3 つの研究グループからほぼ同時期に真核生物由来 AGO タンパク質-ガイド鎖 RNA の二者複合体の結晶構造が報告された (1 つの研究グループは出芽酵母 *Kluyveromyces polysporus* 由来 Ago (KpAgo) (図 2-2a)¹³⁴, 2 つの研究グループはヒト由来 Ago2 (hAgo2) (図 2-2b)^{135,136} について報告した)。これらと

TtAgo などとの立体構造比較から両者の類似点・相違点が明らかになった。たとえば真核生物由来 AGO タンパク質においても原核生物由来 Argonaute ホモログ同様、標的 RNA をとりこむ核酸結合チャネルがみられたが、真核生物では挿入配列により原核生物由来 Argonaute ホモログのそれよりも長く広げられていた。また TtAgo では標的 RNA をガイド鎖 RNA が認識する過程で構造変化がおこり触媒活性部位が形成されるのに対して、真核生物由来 AGO タンパク質においてはガイド鎖 RNA との二者複合体の状態で既に触媒残基同士が近接した位置に存在し既に活性部位が形成された状態をとっていることが示された¹³⁴。さらにスライサー活性をもたないヒト由来 Ago1 (hAgo1)・ガイド鎖 RNA 二者複合体の結晶構造^{137,138}も相次いで報告され(図 2-2c)、スライサー活性をもつ hAgo2 に比べて hAgo1 はわずかに空間配置が異なるループ構造をもつことによってスライサー活性を失うことが原子分解能レベルで説明された。

さらに最近になって hAgo2・ガイド鎖 RNA と短い標的 RNA の三者複合体の結晶構造^{139,140}が報告された(図 2-2d)。hAgo2・ガイド鎖 RNA 二者複合体ではガイド鎖 RNA のシード領域のうち 2-6 位のヌクレオチドは標的 RNA と相互作用する際のエン트로ピーコストを最小化すべく A 型構造をとっていたのに対して、ガイド鎖 RNA の 3'側は互いにスタッキングしておらず向きもさまざまであった¹³⁹。一方、hAgo2・ガイド鎖 RNA・標的 RNA 三者複合体においてはタンパク質のコンフォメーション変化によりガイド鎖 RNA の捻れが解消され、3'側のヌクレオチドも A 型構造をとっていた¹³⁹。このように、成熟型 RISC の形成過程や成熟型 RISC が標的 RNA を認識するメカニズムの一端が明らかになり、構造生物学の進展により AGO タンパク質の作動機構に対する理解が深まってきている。

2.4.3 PIWI サブファミリータンパク質の構造生物学的研究の流れ

AGO サブファミリータンパク質の構造生物学に比べて PIWI サブファミリータンパク質のそれは大幅に遅れている。これまで構造が報告されているのはヒト由来 PIWI ホモログ HILI および HIWI の PAZ ドメインの結晶構造(図 2-3a, b)¹⁴¹、マウス PIWI ホモログ MIWI の PAZ ドメインの NMR 構造(図 2-3c)¹⁴²、同じく MIWI の MID ドメインの結晶構造(図 2-3d)¹⁴³のみである。HIWI および MIWI の PAZ ドメインは piRNA を模して 3'末端に 2'-OCH₃基をもつ RNA 鎖との複合体の構造(図 2-3b, c)となってお

り、AGO タンパク質由来 PAZ ドメイン-RNA 複合体構造と比較することで、PIWI タンパク質由来 PAZ ドメインが 3'末端の 2'-OCH₃基を好む構造基盤が説明された^{141,142}. このように PIWI タンパク質の構造解析は機能ドメインが決定されている状況にとどまっており、全長の構造情報は未だ報告されていない.

2.5 PIWI タンパク質の生化学的解析

AGO タンパク質に比べて PIWI タンパク質の構造解析が遅れている一因として、試料調製の困難さが挙げられる. 結晶構造解析には一般的にミリグラムオーダーの大量の高純度精製タンパク質が必要となる. そのための試料調製には主に大腸菌や昆虫細胞などの培養細胞が利用される. しかしながら、これまで PIWI タンパク質をこれらの培養細胞に組み換え体として発現させ高純度まで精製したという例は知る限り報告されていない. その代わりに、PIWI タンパク質の生化学的解析にはマウス精巣など生体組織に発現する内在性 PIWI タンパク質を特異的な抗体により精製する、あるいはショウジョウバエ卵巢体細胞由来培養細胞 OSC^{56,57} やカイコ卵巢生殖細胞由来培養細胞 BmN4¹⁴⁴ などの生殖巣由来培養細胞にタグ融合型として発現させてタグ認識抗体で精製する、といった手法で得られた試料が用いられてきた.

2.6 高品質なモノクローナル抗体の作製

2.6.1 抗 MARWI 抗体

こうした状況の中で近年、霊長類コモンマーマセット由来 PIWI like1 (PIWIL1) に対するモノクローナル抗体、抗 MARWI (marmoset PIWIL1) 抗体が慶應大学 塩見研究室にて作製された¹⁴⁵. 本研究においてはより高品質の抗体を使用した (Hirano *et al.*, 未発表). 前述のとおりマウス精巣には 3 つの PIWI タンパク質 (MIWI, MILI, MIWI2) が発現しているが、C57BL/6J 近交系マウス精巣 (日本エスエルシー) の抽出液を用いた免疫沈降実験により抗 MARWI 抗体は MIWI に交差することが明らかになった (図 2-4a). また MARWI が 3 つのマウス由来 PIWI タンパク質のうち MIWI (mouse PIWIL1) のオーソログであることと一致して、抗 MARWI 抗体は他の PIWI タンパク質 MILI および MIWI2 には交差しなかった (図 2-4b). さらに交差した MIWI には 30 塩基長にピークをもつ精巣内在性 piRNA が結合していた (図 2-4c).

2.6.2 抗 Siwi 抗体

これに加えて近年、カイコ由来 PIWI タンパク質 Siwi に対する良質なモノクローナル抗体が東京大学 塩見研究室にて作製された¹⁴⁶。カイコ卵巢生殖細胞由来培養細胞 BmN4 には2つのカイコ由来 PIWI タンパク質 Siwi, BmAgo3 が発現しており, piRNA 経路が機能している¹⁴⁴。BmN4 は現在では OSC に加えて piRNA 経路の研究に適したツールとして利用されている。BmN4 抽出液を用いた免疫沈降実験により抗 Siwi 抗体により分離・精製した Siwi には 28 塩基長にピークをもつ BmN4 内在性 piRNA が結合していたと報告されている (図 2-5a, b)¹⁴⁶。

2.7 本研究の目的

こうした背景をもとに、本研究では PIWI-piRNA 複合体を動物由来生殖細胞から精製する系の確立を試みた。とくに、(1) 良質な抗 MARWI 抗体が成体マウス精巣に発現するマウス PIWI ホモログ MIWI と特異的に交差する点に着目し、抗 MARWI 抗体を用いたモノクローナル抗体カラムを作製することで、成体マウス精巣抽出液から MIWI を精製する系を確立する、(2) 良質な抗 Siwi 抗体を用いたモノクローナル抗体カラムを作製することで、BmN4 抽出液から Siwi を精製する系を確立する、といった戦略を立てた。そして精製 PIWI-piRNA 複合体の結晶構造を決定することにより、piRNA を介したトランスポゾン抑制機構および AGO タンパク質との作動機構の違いの構造基盤を原子分解能レベルで解明することを目指した。

2.8 材料および方法

2.8.1 抗 MARWI 抗体カラムの作製

高品質の抗 MARWI モノクローナル抗体を慶應大学 塩見春彦博士より譲与して頂いた。この抗体を産生するハイブリドーマを用いたマウス腹水作製およびプロテイン A 精製による抗体精製をミクリ免疫研究所に委託し、高純度の抗 MARWI 抗体を得た。抗体は使用まで PBS バッファー (+ 0.09% NaN₃) 中で 4°C で保存した。

抗体カラム作製にあたり、まず抗 MARWI 抗体を透析バッファー (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl) を用いて一晩透析しバッファー置換した。抗体カラムの担体としては CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いた。抗体 1 mg あたり担体 0.1 mg を用いた。担体 1 mg あたり 5–10 ml の 1 mM HCl を加え、4°C で 30

分、懸濁した。この操作により担体 1 mg あたり約 4 ml まで膨潤した。10 カラム容量の 1 mM HCl で洗浄した後、さらに 10 カラム容量の透析バッファー (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl) を流し平衡化した。平衡化した担体を精製済みの抗体と混合し、4°C で一晩かけて吸着させた。エコノカラムに担体を流し、素通り画分に抗体が含まれないことを確認した後、3 カラム容量の 1 mM Tris-HCl pH 8.0 と室温で 3 時間混合しブロッキングした。さらに 4°C にて 5 カラム容量のバッファー A (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl), MilliQ, バッファー B (0.1 M NaOAc pH 5.2, 0.5 M NaCl) で洗浄した後、10 カラム容量のバッファー C (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) で洗浄した。最後にバッファー D (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% NaN₃) に平衡化し、使用直前まで 4°C にて保存した。

2.8.2 抗体カラムを用いたマウス精巣由来 MIWI の精製系の構築 (1)

成体マウス精巣は摘出済みのものを日本エスエルシーから購入した。先行研究において使用された近交系マウス C57BL/6J ではなくクローズドコロニーマウス Slc:ICR (8 週齢, オス) の精巣を購入した。

はじめに少量スケールでの精製条件検討を行った。精巣 20 個に対して 20 ml の破碎バッファー (30 mM Tris-HCl pH 7.3, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 5.2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 1.4 µg/ml Pepstatin A) を加え、ホモジナイザーにより破碎した。さらにソニケーターによる超音波破碎の有無で破碎効率が変わるかを検討した。破碎液を遠心 (20,000 g, 15 分) した後、上清に 1 ml 担体を混合し、4°C, 1 時間バッチさせた。素通り画分を流した後、10 カラム容量の洗浄バッファー (30 mM Tris-HCl pH 7.3, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 5.2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 1.4 µg/ml Pepstatin A) で洗浄し、さらに高塩濃度バッファー (30 mM Tris-HCl pH 7.3, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, PI) で洗浄した。最後に 10 カラム容量の TL (Thermolysin) バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 0.1% NP-40, 1 mM DTT) を流した後、3 カラム容量の TL バッファーで担体を回収した。回収した担体を SDS-PAGE により展開し、MIWI の収量を見積もった。MIWI をトラップした担体に対して、TL バッファーに懸濁した Thermolysin (Promega) を

MIWI の 5–0.001 倍量 (w/w) 添加し, 4°C, 一晚反応させた. 反応後, SDS-PAGE により MIWI の溶出効率を比較検討した.

2.8.3 抗体カラムを用いたマウス精巣由来 MIWI の精製系の構築 (2)

少量スケールでの検討の結果をふまえ, さらに大量スケールでのマウス精巣破碎液からの MIWI 精製系の構築を目指した. マウス精巣 400 個を 160 ml の破碎バッファー (30 mM Tris-HCl pH 7.3, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 10% glycerol, 5.2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 1.4 µg/ml Pepstatin A) と混合し, ホモジナイザーにより破碎した. 破碎液を遠心 (13,500 rpm, 30 分) し, 得られた上清に破碎バッファーで平衡化した 14.4 ml の抗 MARWI 抗体カラム (36 mg の抗体を含む) を混合し, 4°C, 3.5 時間, 攪拌した. エコノカラムに通し素通り画分を流した後, 3 カラム容量の TL バッファー (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 10% glycerol) で洗浄した. 1 カラム容量の TL バッファーで担体を回収し, TL バッファーに懸濁した Thermolysin, 2 mg を添加し, 4°C, 一晚攪拌した. エコノカラムに再度通し, 素通り画分を回収した. さらに精製ステップを検討し, 素通り画分の NaCl 濃度を 100–150 mM まで下げた後, HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) にロードしバッファー A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10% glycerol), バッファー B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol) を用いて 2 M NaCl まで濃度直線勾配をかけてタンパク質を溶出した. さらにゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol) で平衡化した Hiload 16/600 Superdex 200 pg にかき, ゲル濾過クロマトグラフィーを行った. さらに Amicon Ultra 30 K filter (Millipore) を用いて限外濾過法により濃縮した. 波長 260 nm と 280 nm に対する吸光度比から得られたタンパク質は核酸を含んでいると考えられたため, タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific) により測定した. 最終的に 2–9 mg/ml まで濃縮した. MIWI に結合した核酸を調べるために, まず MIWI, 1.5–6 µg に対して Proteinase K, 20 µg (New England Biolabs) を添加し, ゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol) にて 37°C, 30 分反応させた. 反応溶液を等量のローディングバッファー (98% (w/v) deionized

formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.025% (w/v) xylene cyanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) と混合した. 95°C, 2 分, 熱処理を行った後, 急速冷却し, 20%変性 PAGE (6 M urea) で展開した. 電気泳動後, SYBR GOLD (Thermo Fisher Scientific) により染色し Typhoon FLA 9500 image analyzer にてシグナルを検出した.

2.8.4 MIWI のスライサー活性測定

以下のスライサー活性測定は慶應大学 塩見春彦博士との共同研究にて行った.

精製した MIWI がスライサー活性を有するかを調べるために RNA 切断実験を行った. 標的 RNA としては内在 MIWI に結合することが配列解析からわかっていた piRNA の一種 piR-1 に相補的な配列を含む一本鎖 RNA を用いた. マウス精巣抽出液から Dynabeads protein G にカップリングさせた抗 MARWI 抗体により MIWI を粗精製した後, 磁気ビーズ上に移しビーズの洗浄後, 反応バッファー (25 mM HEPES-KOH pH 7.5, 50 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 5 mM DTT, 0.4 units RNasin plus) に置換したものを全長 MIWI として使用した. 全長 MIWI あるいは精製 MIWI, 0.5 µg を 5'末端を RI 標識した piR-1 target RNA と反応バッファー中で 35°C, 4 時間, 反応させた. 反応産物の RNA を Isogen-LS (ニッポンジーン) を用いて精製し, 12%変性 PAGE (6M urea) で展開した. RI シグナルは BAS2500 (GE Healthcare) で検出した. piR-1 および標的 RNA として用いた RNA の塩基配列は以下の通りである.

piR-1

5'-UUUGAAAUCAGGACUGUUCUGGAAAUUC-3'

標的 RNA

5'-AUCAAUGGAAUUUCCAGAACAGUCCUGAUUUCAAACAGCCA-3'

2.8.5 MIWI の結晶化

精製した MIWI について蒸気拡散法により以下のスクリーニングキットを用いて 20°C で結晶化初期スクリーニングを行った.

結晶化スクリーニングに用いたスクリーニングキット

PACT Suite, JCSG+ Suite (QIAGEN)

Index, Natrix, PEG/Ion (Hampton Research)

JB Screen Classic 1, 2, 4, 5 (Jena Bioscience)

MemGold, MemGold2, MemStart&MemSys (Molecular Dimensions)

Wizard I & II (Emerald Biosystems)

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について、沈殿剤の種類や濃度・緩衝液の pH などを変化させる、あるいは Additive Screen (Hampton Research) を用いて添加剤のスクリーニングなどを行うことで結晶化条件を最適化した。さらにタンパク質溶液とリザーバー溶液のドロップ体積を変化させる、あるいはシッティングドロップ法・ハンギングドロップ法による結晶化も行った。結晶化初期スクリーニングによって結晶が得られたリザーバーが 0.1 M MgCl_2 を含んでいたため、タンパク質溶液に 0.1 M MgCl_2 を加えて以下のスクリーニングキットを用いて再度蒸気拡散法により 20°C で結晶化初期スクリーニングを行った。

MgCl₂ 添加試料の結晶化に用いたスクリーニングキット

PACT Suite, JCSG+ Suite, Index, PEG/Ion, JB Screen Classic 1, 2, 4, 5, MemGold, Wizard I & II

MgCl_2 をタンパク質溶液に添加して行った初期スクリーニングで結晶が得られた条件についても、沈殿剤の種類や濃度・緩衝液の pH などを変化させる、あるいは Additive Screen を用いて添加剤のスクリーニングなどを行うことで結晶化条件を最適化した。さらにハンギングドロップ法による結晶化も行った。

さらに精製した MIWI について蒸気拡散法により 4°C での結晶化初期スクリーニングも行った。

4°C での結晶化に用いたスクリーニングキット

PACT Suite, JCSG+ Suite, Index, JB Screen Classic 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (Jena

Bioscience), Crystal Screen 1 & 2 (Hampton Research), Crystal Screen Lite (Hampton Research), MemGold, MemGold2, MemStart&MemSys, Wizard I & II

なお、各溶液は基本的に結晶化ロボット Mosquito (BioLab) を用いて分注した。

2.8.6 MIWI 結晶を用いた X 線回折実験

結晶が得られたリザーバー溶液に 22% PEG400 が含まれていたため、基本的にリザーバー溶液をクライオ溶液とした。クライオ溶液に MIWI 結晶を浸潤し、窒素ガスによるクライオストリームによって結晶を瞬間凍結した。MIWI 結晶について、大型放射光施設 SPring-8 BL41XU にて回折データを収集した。すべてのデータ収集は X 線損傷による分解能低下を最小限に抑えるために窒素ガスクライオストリーム条件下 (100 K) で行った。結晶化初期スクリーニングにより得られた MIWI 結晶に関して、波長 1.000 Å, 振動角 1.0°で回折スナップショット収集を試みた。

2.8.7 精製 MIWI のリジンメチル化

MIWI の結晶に関して X 線回折スポットは得られなかった。通常、タンパク質の結晶構造解析に向けて結晶の質を向上させるには結晶化条件の検討・最適化も有効ではあるが、それよりもタンパク質のコンストラクトの最適化に立ち返る方が有効なケースも多い。しかしながら培養細胞などの発現ホストに組み換え体としてタンパク質を発現させる一般的な手法と異なり、本研究では生体由来組織からタンパク質を得るという手法をとったためコンストラクトを変更する手立てはほとんどなく限られていた。

結晶構造解析に使用されるコンストラクト改良の手法のひとつとして、リジン残基のメチル化修飾がある。これは精製したタンパク質に適切な試薬を混ぜることによりタンパク質表面に露出したリジン残基を修飾する手法であり¹⁴⁷、今回適用可能なコンストラクト変更手法のひとつであった。そこで精製 MIWI のリジン残基のメチル化を試みた。

基本的なプロトコルは先行研究¹⁴⁷に従った。前項の手順で最終的にゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した MIWI をバッファー (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol) に透析してバッファー置換した。MIWI タンパク質 5 ml に 1 M

dimethyl amine-borane complex (DMAB) (Sigma-Aldrich) 100 μ l, および 1 M formaldehyde (和光純薬) 200 μ l を加え, 4°C, 2 時間, 反応させた. この操作をもう一度繰り返し行った. 1 M DMAB 50 μ l を加え, 4°C, 一晚反応させた. 白色沈殿を遠心・フィルターにより取り除き, ゲル濾過バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) で平衡化した Hiload 16/600 Superdex 200 pg でゲル濾過クロマトグラフィーを行い最終精製とした.

2.8.8 MIWI_{LysMet} の結晶化

精製した MIWI_{LysMet} について蒸気拡散法により 20°C で以下のスクリーニングキットを用いて結晶化初期スクリーニングを行った.

リジンメチル化試料の結晶化に用いたスクリーニングキット

PACT Suite, JCSG+ Suite, Index, JB Screen Classic 1, 2, 4, 5, MemGold, MemGold2, Wizard I & II, Crystal Screen 1 & 2

初期スクリーニングで結晶が得られた条件について, 沈殿剤の種類や濃度・緩衝液の pH などを変化させる, あるいは Additive Screen を用いて添加剤のスクリーニングなどを行うことで結晶化条件を最適化した. さらにタンパク質溶液とリザーバー溶液のドロップ体積を変化させる, あるいはハンギングドロップ法による結晶化も行った.

2.8.9 MIWI_{LysMet} 結晶を用いた X 線回折実験

タンパク質溶液に 10% glycerol が含まれていたため, リザーバー溶液に 20% glycerol を添加することでクライオ溶液とした. クライオ溶液に MIWI 結晶を浸潤し, 窒素ガスによるクライオストリームによって結晶を瞬間凍結した. MIWI 結晶について, 大型放射光施設 SPring-8 BL32XU にて回折データを収集した. すべてのデータ収集は X 線損傷による分解能低下を最小限に抑えるために窒素ガスクライオストリーム条件下 (100 K) で行った. 結晶化初期スクリーニングにより得られた MIWI 結晶に関して, 波長 1.000 Å, 振動角 1.0° で回折スナップショット収集を試みた.

2.8.10 抗 Siwi 抗体カラムの作製

高品質の抗 Siwi モノクローナル抗体を東京大学 塩見美喜子博士より譲与して頂いた。この抗体を産生するハイブリドーマを用いたマウス腹水作製およびプロテイン A 精製による抗体精製をミクリ免疫研究所に委託し、高純度の抗 Siwi 抗体を得た。抗体は使用まで PBS バッファー (+ 0.09% NaN₃) 中で 4°C で保存した。

抗体カラム作製は 2.8.1 に記したのと同様の手順によって行った。最終的に抗体カラムはバッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% NaN₃) に平衡化し、使用直前まで 4°C にて保存した。

2.8.11 抗体カラムを用いた BmN4 由来 Siwi の精製系の構築

BmN4 は 175 cm² Corning cell culture flask (Sigma-Aldrich) にて EX-CELL 420 (Sigma-Aldrich) に 10% FBS (Equitech-Bio), 1×Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Thermo Fisher) を添加した培地を用いて培養した。

はじめに少量スケールでの精製条件検討を行った。BmN4 接着細胞 ~3.0×10⁷ 個に対して 20 ml の破碎バッファー (30 mM Tris-HCl pH 7.3, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 10% glycerol, 5.2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 1.4 µg/ml Pepstatin A) を加え、ホモジナイザーにより破碎した。破碎液を遠心 (40,000 g, 30 分) した後、上清に 0.8 ml 担体 (1 mg 抗体を含む) を混合し、4°C, 3.5 時間バッチさせた。素通り画分を流した後、5 カラム容量の TL バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 10% glycerol) で洗浄した。その後、3 カラム容量の TL バッファーで担体を回収した。回収した担体を SDS-PAGE により展開し、Siwi の収量を見積もった。Siwi をトラップした担体に対して、TL バッファーに懸濁した Thermolysin (Promega) を Siwi の 2–0.01 倍量 (w/w) 添加し、4°C, 一晩反応させた。反応後、SDS-PAGE により Siwi の溶出効率を比較検討した。

少量スケールでの検討の結果をふまえ、さらに大量スケールでの BmN4 からの Siwi 精製系の構築を目指した。BmN4 接着細胞 ~9.0×10⁸ 個を ~200 ml の破碎バッファー (30 mM Tris-HCl pH 7.3, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 10% glycerol, 5.2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin, 1.4 µg/ml Pepstatin A) と混合

し、ホモジナイザーにより破碎した。破碎液を遠心 (13,500 rpm, 30 分) し、得られた上清に破碎バッファーで平衡化した 12 ml の抗 Siwi 抗体カラム (30 mg の抗体を含む) を混合し、4°C, 3.5 時間、攪拌した。以下 2.8.3 と同様の手順、すなわち Thermolysin による溶出後、Heparin カラム、ゲル濾過カラムに通すことで Siwi を精製した。Amicon Ultra 30 K filter (Millipore) を用いて限外濾過法により濃縮し、最終的に 2–3 mg/ml まで濃縮した。

2.8.12 Siwi の結晶化

精製した Siwi について蒸気拡散法により以下のスクリーニングキットを用いて 20°C で結晶化初期スクリーニングを行った。

結晶化スクリーニングに用いたスクリーニングキット

JCSG+ Suite, MemGold, Wizard I & II, Crystal Screen 1 & 2

2.8.13 Siwi 結晶を用いた X 線回折実験

X 線回折実験のため、結晶化条件に 20% glycerol を含むクライオ溶液に Siwi 結晶を浸潤し、窒素ガスによるクライオストリームによって結晶を瞬間凍結した。Siwi 結晶について、大型放射光施設 SPring-8 BL41XU にて回折データを収集した。すべてのデータ収集は X 線損傷による分解能低下を最小限に抑えるために窒素ガスクライオストリーム条件下 (100 K) で行った。

結晶化初期スクリーニングにより得られた Siwi 結晶に関して、波長 1.000 Å, 振動角 0.1°で 180°にわたって回折データを収集した。

2.8.14 Siwi の X 線回折データ処理およびモデル構築

回折データはプログラム DIALS および AIMLESS¹⁴⁸ を用いて処理した。結晶のブラベ格子と格子定数を決定後、回折データの各スポットについて指数付けと強度測定を行った。その後スケールリングを行い、空間群の決定・各指数に対する回折強度算出を行った。

このデータをもとに、hAgo2-ガイド鎖 RNA 二者複合体の構造情報 (PDB ID: 4OLB) をサーチモデルとしてプログラム MOLREP⁵⁵ による分子置換法により初期位相を決定

した。電子密度が明瞭であった領域についてプログラム REFMAC による構造精密化、プログラム COOT⁵³ を用いた手動モデル構築を繰り返した。その後、ヒト由来 PIWI ホモログ HIWI の PAZ ドメインと RNA の二者複合体の構造情報 (PDB ID: 3O7V) をサーチモデルとしてプログラム MOLREP⁵⁵ による分子置換を行った。さらにプログラム RESOLVE¹⁴⁹ により溶媒平滑化を行った後、プログラム PHENIX⁵⁴ による構造精密化・プログラム COOT⁵³ を用いた手動モデル修正、のサイクルを繰り返し行った。

2.9 結果と考察

2.9.1 抗体カラムを利用した、PIWI タンパク質精製系の構築に向けて

抗体カラムから目的タンパク質を溶出する場合、たとえば目的タンパク質と相互作用する因子を同定したいといった共免疫沈降実験などでは、担体樹脂ごと熱処理する、あるいは強酸性バッファーなどによって担体樹脂からタンパク質を引きはがすといったことがしばしばなされる。しかし、このような方法を用いるとタンパク質にとってダメージが大きく変性してしまい結晶構造解析には適さないという懸念があった。そこで抗体カラムからタンパク質をよりマイルドな条件下で溶出させる方法を考案する必要があった。まず抗体が認識するエピトープに相当するペプチドにより競合的にタンパク質を溶出させるという方法が考えられた。本研究で使用した抗 MARWI 抗体、抗 Siwi 抗体はそれぞれの N 末端ループに GST を融合したものを抗原として作製されたものである。これらのうち正確にどこがエピトープとして抗体に認識されているかは不明であったことに加え、ペプチドによる競合溶出が効率よく行われるかという懸念もあったため、別の溶出法を模索した。

先行研究によりヒト由来 Argonaute2 (hAgo2) に関してガイド鎖 RNA の結合状態によってプロテアーゼ Thermolysin に対する抵抗性が変化することが示されていた (図 2-6a, b)¹³⁶。すなわち、ガイド鎖 RNA 非結合型 hAgo2 は Thermolysin による限定分解処理により機能ドメインまで分解・断片化されるのに対し、ガイド鎖 RNA 結合型 hAgo2 は Thermolysin による限定分解処理を施しても抵抗性を示し分解・断片化を受けない¹³⁶。これよりガイド鎖 RNA が結合することで Argonaute は頑健に安定化されることが示唆されていた。この知見に加えて先に述べたように PIWI タンパク質には N 末端に長いディスオーダーループが存在し、ループ上に存在する sDMA を介して Tudor ド

メインタンパク質と相互作用する¹¹²。このような Argonaute の性質および PIWI タンパク質の特徴を考慮して図 2-7 に示すような溶出法を考えた。この手法において PIWI タンパク質をトラップした抗体カラムに Thermolysin などのプロテアーゼ溶液を添加することで PIWI タンパク質を溶出する。動物由来生殖細胞において PIWI タンパク質は内在性 piRNA と結合しているものもあれば、空の状態のものも存在すると考えられる。プロテアーゼ処理により溶出することにより、piRNA 非結合型 PIWI タンパク質は各機能ドメインあるいはそれ以上まで分解される (図 2-7a) が、piRNA 結合型 PIWI タンパク質はそのような分解はうけず高品質な PIWI-piRNA 複合体のみが得られることが期待された (図 2-7b)。

2.9.2 抗体カラムを利用した、マウス精巣由来 MIWI 精製系の構築 (1)

抗 MARWI 抗体を担体 CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow にカップリングさせて抗体カラムを作製した。カップリングの各ステップで抗体のロスがないことを SDS-PAGE で確認し、最終的に担体 1ml に対して 2.5 mg の抗体がカップリングした状態で抗体カラムを作製した。

少量スケールでの精製においてまずマウス精巣の破碎条件を検討した。ホモジナイザーによる破碎の後、ソニケーションの有無 (0, 1, 3 分) で抗体カラムに結合する目的タンパク質の量を比較した。その結果ソニケーションを行わない方が抗体カラムに結合する MIWI の量が多いこと、ソニケーションを長く行うほど抗体カラムに結合する夾雑物が増えていくことがわかった (図 2-8a)。この結果をうけて、以降ソニケーションは行わず、ホモジナイザーのみによってマウス精巣を破碎することとした。

続いて抗体カラムから MIWI の溶出に用いるプロテアーゼ Thermolysin の量の検討を行った。その結果、MIWI の 10 分の 1 倍量 (w/w) 以上の Thermolysin を加えると高効率で MIWI を溶出できることがわかった (図 2-8b)。また MIWI の 5 倍量 (w/w) の Thermolysin を添加しても溶出タンパク質は確認されたことから、得られた MIWI はプロテアーゼに抵抗性を示し非常に安定であることが示唆された (図 2-8b)。溶出タンパク質に関して N 末端解析を行った結果、MIWI の Leu98 の N 末端側で Thermolysin により切断され溶出されたことが明らかになった (図 2-9a)。これまで構造が報告されている真核生物由来 AGO タンパク質のコンストラクト設計は全て β 1 ストランドの N 末

端側に 30 残基程度のループが存在する形となっている。このループのうち、いずれの結晶構造中でも前半の 10–22 残基は電子密度が見えておらず、非常にフレキシブルであると予想される一方で、後半の 15 残基程度は電子密度が確認でき、実際に PIWI ドメインと相互作用しているという点で共通していた (図 2-9b)。MIWI に関して PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) により二次構造予測を行った結果、Leu98 は β 1ストランドより 14 残基 N 末端側に位置していた (図 2-9a, b)。これらの結果から、溶出された MIWI は N 末端のフレキシブルな領域をできるかぎり削られており、結晶化に適したコンストラクトであると期待された。

2.9.3 抗体カラムを利用した、マウス精巢由来 MIWI 精製系の構築 (2)

少量スケールで成体マウス精巢から MIWI を粗精製することに成功したため、続いて結晶化に向けて大量スケールでの精製系の構築にとりくんだ。マウス精巢に対する抗体カラム樹脂の容量や抗体カラムに結合した MIWI を溶出するまでの洗浄条件などを検討した。その結果、マウス精巢 400 個に対して抗体 36 mg を含む抗体カラムにより精製することとした。Thermolysin による溶出後のサンプルは抗体カラムに結合した夾雑物などが Thermolysin に分解されたせいも MIWI のほかにも多数のタンパク質が含まれており、結晶化にはさらに高純度に MIWI を精製する必要があった。複数のカラムによる精製法を検討した結果、Heparin カラムを通した後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製する手順が最適であることが明らかとなった。Heparin カラムに通した際のクロマトグラムより、高い溶出ピークが素通り画分にみられた (図 2-10a)。SDS-PAGE の結果、素通り画分に含まれるタンパク質はほとんど検出されなかったことから、素通り画分のピークは大量の核酸あるいは Thermolysin による分解産物に由来するものであると判断した (図 2-10b)。Heparin カラムにより核酸などを除去した後、ゲル濾過クロマトグラフィーに通した結果、溶出ピークは単分散性を示した (図 2-10c)。SDS-PAGE により MIWI は高純度に精製されたことを確認した (図 2-10d)。精製した MIWI の波長 260 nm と 280 nm に対する吸光度比 $OD_{260/280}$ は約 1.40 であったことから MIWI は核酸と結合した状態であることが明らかとなった。実際変性 PAGE により精製 MIWI は核酸を含むことを確認した (図 2-10e)。

2.9.4 精製 MIWI のスライサー活性測定

高純度に精製した MIWI は piRNA のひとつ piR-1 を含むことがノザンブロットティングにより確認された (図 2-11a, b). piR-1 と相補的な配列を含む標的 RNA を用いてスライサー活性測定を行った結果, 精製 MIWI は標的 RNA を切断した (図 2-11c). また Thermolysin 添加前の抗体カラム樹脂に結合した状態の全長 MIWI と同じ箇所では標的 RNA を切断し, スライサー活性も全長 MIWI と同等であった (図 2-11a, c). これらの結果から, 精製した MIWI は全長 MIWI と同様のスライサー活性を保持しており, N 末端ループ (1-97 残基) は MIWI による標的 RNA の切断には関与しないことが明らかになった.

2.9.5 MIWI の結晶化

精製 MIWI に関して結晶化初期スクリーニングを行ったところ, MemGold No.26 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 22% PEG400) の条件で針状結晶が得られた (図 2-12a). 結晶が得られた条件に関して, 緩衝液の pH, PEG の種類・濃度, タンパク質濃度, MgCl₂ 濃度などをふって結晶化条件を最適化したところ結晶は再現よく得られ下記の条件下で初期条件で得られた結晶よりは比較的厚みのある針状結晶が得られた (図 2-12b, c). また, タンパク質溶液とリザーバー溶液のドロップ体積を変化させる, ハンギングドロップ法による結晶化, Additive Screen を用いた添加剤のスクリーニング, 得られた結晶を種結晶としたストリークシーディング法による結晶化なども試したものの, 結晶の形・大きさなどに顕著な変化はみられなかった.

最適化した結晶化条件

条件 A: MIWI-piRNA, 9 mg/ml

100 mM Tris pH 7.5, 21.3% PEG400, 250 mM MgCl₂

条件 B: MIWI-piRNA, 5 mg/ml

100 mM Tris pH7.5, 21.6% PEG400, 200 mM MgCl₂

結晶化初期スクリーニングによって結晶が得られたリザーバーに 0.1 M MgCl₂ が含まれていたため, タンパク質溶液に 0.1 M MgCl₂ を加えて再度蒸気拡散法により 20°C

で結晶化初期スクリーニングを行った。その結果、下記に示す複数の条件で結晶が得られた (図 2-13a, b, c)。

結晶化条件 (タンパク溶液 + 0.1 M MgCl_2)

MemGold No.7 : 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM HEPES pH 7.5, 12% PEG4,000, 22% glycerol (図 2-13a)

MemGold No.65 : 100 mM NaCl, 325 mM CH_3COONa , 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 21% PEG400 (図 2-13b)

Wizard I & II No.2 : 100 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% 2-propanol (図 2-13c)

上記の結晶が得られた条件に関して、緩衝液の pH, PEG の種類・濃度, MgCl_2 濃度などをふって結晶化条件を最適化したところ、結晶は再現よく得られたが結晶の厚みや長さなど顕著な変化はみられなかった。また、ハンギングドロップ法による結晶化, Additive Screen を用いた添加剤のスクリーニングなども試したものの、結晶の形が変化する、あるいは結晶の厚み・長さなど見た目が格段に変化するといった目に見えた効果はなかった。

精製した MIWI について 4°C での結晶化初期スクリーニングを蒸気拡散法により行ったものに関しては結晶は得られなかった。

2.9.6 MIWI 結晶の X 線回折実験

結晶をクライオ溶液に浸潤した際、いずれの結晶化条件で得られた結晶に関しても時間経過とともに結晶が溶けていくのか小さくなり次第に消えてなくなってしまうことがあった。たとえば MemGold No.26 条件下で得られた結晶に関してはリザーバー溶液に 22% PEG400 が含まれていたため、結晶化条件をそのままクライオ溶液として使用したが結晶が次第に溶けていった。このことから得られた MIWI 結晶に関して、結晶としては品質が悪いことが示唆された。完全に溶けてしまう前に結晶をクライオ溶液から拾って X 線回折実験を行ったが、上記の結晶化条件で得られた結晶に関していずれ

についても X 線回折スポットは全くみられなかった。

2.9.7 MIWI_{LysMet} の調製

精製 MIWI に DMAB や formaldehyde を反応させてリジン残基のメチル化処理を行い、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、溶出ピークは単分散性を示した（図 2-14a）。タンパク質収量は試薬に一晩反応させた際白色沈殿が生じたために、WT のサンプルの半量ほどとなった。MIWI_{WT} と MIWI_{LysMet} のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出ピーク位置を比較した結果、リジンメチル化サンプルは WT に比べて高分子量側に溶出された（図 2-14b）。さらに SDS-PAGE により MIWI_{LysMet} は MIWI_{WT} に比べて高分子量であることが確認された（図 2-14c）。質量分析によりさらなる解析が必要ではあるが、溶出ピークの単分散性などから MIWI のリジン残基のメチル化は均一に行われていることが示唆された。

2.9.8 MIWI_{LysMet} の結晶化

精製 MIWI_{LysMet} に関して結晶化初期スクリーニングを行ったところ、複数の条件下で結晶が得られたもののそのほとんどが厚みが全くなく長辺数十 μm にも満たない微小針状結晶であった。そのなかでも Wizard I & II No.91 (0.2 M MgCl_2 , 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 10% PEG8,000) の条件下で厚みはほとんどないものの長辺 400 μm におよぶ針状結晶が得られた（図 2-15a）。結晶が得られた条件に関して、緩衝液の pH、沈殿剤の種類・濃度をふって結晶化条件を最適化したところ結晶は再現よく得られ、下記の条件下でやや厚みが増した長辺 400–500 μm におよぶ針状結晶が得られた（図 2-15b）。

最適化した結晶化条件

0.2 M MgCl_2 , 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 11% PEG3,350

また、ハンギングドロップ法による結晶化、Additive Screen を用いた添加剤のスクリーニングなども試したものの、ハンギングドロップ法では結晶が得られず、Additive Screen によっても目に見えた効果は小さかった。

2.9.9 MIWI_{LysMet} の X 線回折実験

結晶をクライオ溶液に浸潤した際、いずれの結晶化条件で得られた結晶に関しても MIWI_{WT} 結晶においてもみられたように時間経過とともに次第に消えてなくなってしまった。得られた結晶に関してはタンパク質溶液に 10% glycerol が含まれていたことから、結晶化条件に 20% glycerol を含む溶液をクライオ溶液として使用したが結晶が次第に溶けていった。このように MIWI_{LysMet} 結晶に関しても、MIWI_{WT} 結晶と同様に結晶としての品質は悪いと考えられる。完全に溶ける前に結晶をクライオ溶液から拾って X 線回折実験を行ったが、X 線回折スポットは全くみられなかった。結晶の形が WT のものとほとんど変わらなかったことも考慮すると、MIWI のリジン残基のメチル化は結晶化に関してはそれほど大きな影響をおよぼさないと示唆された。

2.9.10 PIWI タンパク質の結晶構造決定に向けたストラテジーの改良

本研究において、WT およびリジン残基をメチル化した MIWI の結晶が得られたものの、それらは全てせいぜい厚みが 10 μm 程度の針状結晶であった。またクライオ溶液中で結晶が溶けていくことから、結晶としての品質は悪いものと思われた。この要因として精製タンパク質の性質が悪いことが考えられる。たとえば第一章の DmMAEL のようにシステイン残基が分子間でジスルフィド結合を形成するなどして分子の並び方に影響をおよぼす場合や、分子内にフレキシブルな領域（一般的にループなど）が存在し分子のパッキングに影響をおよぼす場合、などがありうる。フレキシブルな領域が結晶化に悪影響をおよぼす場合、in situ proteolysis とよばれる手法¹⁵⁰が有効な場合がある。これは結晶化の際に Trypsin, Chymotrypsin などのプロテアーゼを添加することでフレキシブルなループ構造などを切断しつつ結晶化する手法であり、MIWI の結晶化においても少なからず影響をおよぼすかもしれない。

こうした手法の他に、PIWI タンパク質の結晶構造決定に向けてよりドラスティックに試料調製法を変更する必要もあると考えられる。たとえば生物種を変更することが有効であるかもしれないと考えた。そこで内在性 piRNA 経路が機能しているカイコ卵巣生殖細胞由来培養細胞 BmN4 から、高品質なモノクローナル抗体を利用する精製法により、カイコ由来 PIWI ホモログ Siwi の精製および結晶化を試みた。

2.9.11 抗体カラムを利用した, BmN4 由来 Siwi 精製系の構築

まず抗体カラムから Siwi を溶出する際に用いる Thermolysin の量の検討を行った。その結果, Siwi の 2 分の 1 倍量 (w/w) 以上の Thermolysin を加えると高効率で Siwi を溶出できることがわかった (図 2-16a)。また Siwi の 2 倍量 (w/w) の Thermolysin を添加しても溶出タンパク質は分解されず確認されたことから, 得られた Siwi はプロテアーゼに抵抗性を示す非常に安定な状態であることが示唆された (図 2-16a)。

続いて結晶化に向けて大量スケールでの Siwi 精製系の構築にとりくんだ。基本的にはマウス精巣からの MIWI 精製に用いた手順と同様に行った。その結果, Siwi に関しても Heparin カラムに通した際, 非常に高いピークが素通り画分に見られた (図 2-16b)。大量の核酸や Thermolysin による分解産物などを Heparin カラムにより除去した後 (図 2-16b, c), ゲル濾過クロマトグラフィーに通した結果, 溶出ピークは単分散性を示した (図 2-16d)。SDS-PAGE により Siwi は高純度に精製されたことを確認した (図 2-16e)。精製した Siwi の波長 260 nm と 280 nm に対する吸光度比 $OD_{260/280}$ は約 1.37 であったことから Siwi は核酸と結合した状態であることが明らかとなった。

2.9.12 Siwi の結晶化および X 線回折実験

精製した Siwi に関して結晶化初期スクリーニングを行ったところ, 複数の条件にて結晶が得られた。中でも Crystal Screen 1 & 2 No.42 (0.05 M Potassium phosphate monobasic, 20% PEG8,000) の条件下にて長辺 200–300 μm ほどの盤状結晶が得られた (図 2-17a)。

この盤状結晶に関して X 線回折実験を行ったところ, 最大分解能 2.4 Å までの回折スナップショットが得られた (図 2-17b)。波長 1.000 Å にて, 1800 枚の回折データセットを収集することに成功した。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ に属し, 格子定数は $a = 61.9$, $b = 114.6$, $c = 136.7$ Å であった。

2.9.13 Siwi の位相決定および構造精密化

得られたデータセットについて, hAgo2-ガイド鎖 RNA 二者複合体の構造情報 (PDB ID: 4OLB) をサーチモデルとして分子置換法により初期位相を決定した。MID ドメイン, PIWI ドメインに関しては電子密度が明瞭であったが, その他のドメインについては電子密度が不明瞭でありモデル構築を行うことはできなかった (図 2-18a)。そこで,

MID ドメイン・PIWI ドメインに関して COOT によるモデル構築・REFMAC による構造精密化を繰り返し行った後、hAgo2 よりも配列相同性の高い HIWI の PAZ ドメイン-RNA 複合体の構造情報 (PDB ID : 3O7V) をサーチモデルとして分子置換を行った。その結果、依然として N ドメインについては電子密度が不明瞭であったが PAZ ドメイン、L1 ドメイン、L2 ドメインに関しては明瞭な電子密度が観察された(図 2-18b)。電子密度が明瞭であった領域に関して COOT によるモデル構築・REFMAC による構造精密化を繰り返し行った後、RESOLVE により溶媒平滑化を行った。さらに手動モデル構築を行ったところ、N ドメインについても電子密度が解釈可能となり、COOT によるモデル構築・PHENIX による構造精密化を繰り返し行った。モデル構築の際、核酸結合部位と予想される空間に BmN4 内在発現の piRNA 由来と思われる核酸様の電子密度が観察されたため、一本鎖 RNA を電子密度にアサインし、構造精密化を行った。Siwi の原子モデルは分解能 2.4 Å で、最終的に $R_{\text{work}} = 20.9\%$, $R_{\text{free}} = 24.6\%$ まで精密化した(図 2-18c, d)。最終的なモデルのラムチャンドラプロットを図 2-18e、解析結果の統計値を表 2-2 にそれぞれ示した。

2.9.14 Siwi の全体構造

得られた電子密度からモデル構築を行った結果、アミノ酸残基 130–899 までモデルを置くことができた(図 2-19)。精製した Siwi について N 末端解析を行っていないため、どの残基で Thermolysin により切断されているかは現時点では不明である。しかしながら、MIWI が Leu98 の N 末端側で切断されたことをふまえると Siwi でも対応する Arg136 の付近で切断をうける可能性が高いと考えられ、Ile130 まで電子密度が見えたという結果とも一致していた。

Siwi はこれまで結晶構造が報告されている Argonaute のように N/L1/PAZ ドメインがひとつのローブを、MID/PIWI ドメインがもうひとつのローブを形成したバイローブ構造をとっており、各ドメインの空間的な配置も似ていた(図 2-19)。各機能ドメインも真核生物由来 AGO subfamily と同様の構造をしていた。N ドメインのコア領域は逆平行の 5 本のβストランドと 2 本のαヘリックスから構成されていた。PAZ ドメインは中心に 6 本のβストランドからなるβバレル様構造が配置し、一方向から 2 本のαヘリックスが、もう一方向から 1 本のαヘリックスとβターンが挟み込むような構造をとって

いた。MID ドメインは 4 本の α ヘリックスと 4 本の β ストランドが交互に並んだ Rossman フォールドをとっていた。PIWI ドメインは RNase H 様フォールドをとっていた。

タンパク質内部に MID/PIWI/L1/L2 ドメインの表面が形成する間隙がみられた。モデル構築に際し、MID/PIWI ドメインが形成する間隙領域および PAZ ドメインに核酸様の電子密度が観察された。Siwi の精製最終ステップであるゲル濾過クロマトグラフィーの結果より、Siwi は核酸と結合した状態であると示唆されたことから、観察された核酸様の電子密度は BmN4 内在発現の piRNA であると予想された。最終的に MID/PIWI ドメインの境界面の核酸結合ポケットに 5'末端がアンカーされた状態の 7 ヌクレオチドの RNA 鎖（以下、5'セグメントとよぶ。7 位はリン酸基のみ）と PAZ ドメインの核酸結合ポケットに 3'末端がアンカーされた状態の 3 ヌクレオチド（以下、3'セグメントとよぶ）の RNA 鎖を電子密度マップにアサインした（図 2-20）。これまで BmN4 に発現する Siwi に結合した piRNA の解析から、Siwi には 28 塩基長にピークをもつ piRNA が結合すること¹⁴⁶、ガイド鎖 RNA の 5'末端の塩基のほとんどがウラシルであること（g1U バイアス、後ほど詳述する）^{102,144,146}、が報告されていた。これと一致して 5'末端の塩基の電子密度マップにはウラシルがフィットした。それ以外の塩基は偏向がなく配列が多様であることが報告されていた^{144,146}ため、電子密度の形からプリン塩基・ピリミジン塩基を適宜アサインした。また piRNA の特徴として成熟化の過程で 3'末端-2'OH 基がメチル化されることが報告されている¹¹⁰⁻¹¹²ように、3'末端-2'OH 基の電子密度マップにはメチル化されたものがフィットした。最終的に 5'セグメントは UAUUAUUU、3'セグメントは AUUm とした（Um は 3'末端-2'OCH₃基をもつウラシルを示す）。ガイド鎖 RNA の中間セグメントに関しては電子密度が観察されなかった。これは先行研究の hAgo2, hAgo1, KpAgo と多様な配列のガイド鎖 RNA の複合体構造にも共通して見られる特徴であり^{134,135,137}、配列が多様であることやある程度構造がフレキシブルであることが原因であると推察された。

2.9.15 Siwi と hAgo2 の全体構造比較

PIWI subfamily に属する Siwi と AGO subfamily に属する hAgo2¹³⁹の構造的な類似点・相違点を明らかにするためにまず両者の各ドメインの重ね合わせを行った（図

2-21). その結果, いずれのドメインも比較的良好に重なった ($\text{rmsd} = 1.6\text{--}2.2 \text{ \AA}$) (図 2-22). 次に全体構造を重ね合わせたところ, L1/L2/MID/PIWI ドメインはよく重なったのに対し, N ドメインおよび PAZ ドメインは異なる空間配置をとることが明らかになった (図 2-23a). Siwi において N ドメインは L1/L2/MID/PIWI ドメインが構成するコア領域に対して 35° 分子外側に開いた配置をとっており, PAZ ドメインはコア領域に対して 40° 分子内方向に傾いた配置をとっていた. また N ドメインおよび PAZ ドメインのみを対象として重ね合わせを行ったものの両者は重ならなかったことから (図 2-23b, c), N-PAZ ロープが剛体として異なる配置をとるのではなく N ドメインと PAZ ドメインはそれぞれ独立して異なる配置をとることが明らかになった.

2.9.16 核酸結合チャネル

これまでに構造が報告されている Argonaute と同様に, MID/PIWI/L2/L1 ドメインの表面がチャネル構造を形成していた. このチャネルは正電荷を帯びており, ガイド鎖 RNA および標的 RNA と結合する核酸結合チャネルであると示唆された (図 2-24). PIWI subfamily タンパク質に結合する piRNA は AGO subfamily タンパク質に結合する siRNA/miRNA に比べて塩基長が 7 塩基分ほど長いことから, 小分子 RNA を収容する核酸結合チャネルも PIWI subfamily タンパク質のチャネルの方が長い必要があると考えられていた.

hAgo2-ガイド鎖 RNA 二者複合体¹³⁹において, ガイド鎖 RNA の 1-13 位のヌクレオチドは MID/PIWI/L2 ドメインが形成するチャネルを走っていたが, その先は N ドメインと L1 ドメインの境界部位により通路が閉ざされており, ガイド鎖 RNA 後半の 14-18 位のヌクレオチドは N/PAZ ドメインの形成する狭いチャネルを走っていた. タンパク質の断面図を作成し, ガイド鎖の 5'末端から N ドメインの表面が形成するチャネルの末端まで直線距離を計算したところ, hAgo2 では $\sim 45 \text{ \AA}$ であったのに対し, Siwi では $\sim 60 \text{ \AA}$ であり 15 \AA 程度伸長していた (図 2-25). Siwi-ガイド鎖 RNA 二者複合体においては, N ドメインが分子外側に位置することで hAgo2 のように N ドメインと L1 ドメインの境界により核酸結合通路が閉ざされることなく核酸結合チャネルが伸長していた. さらに N ドメインが外側に位置したことにより開いた領域に PIWI subfamily タンパク質間で保存された正電荷の Arg/Lys 残基が集中してみられ, ガイド

鎖 RNA や標的 RNA との結合に関与する可能性が考えられた (図 2-26). これらのことから Siwi では N ドメインが外側に配置されることにより hAgo2 と比較して核酸結合チャネルが伸長し, siRNA/miRNA よりも塩基長の長い piRNA の収容が可能となると推察された.

2.9.17 AGO subfamily タンパク質特異的な挿入配列が全体構造におよぼす影響

hAgo2 と Siwi の全体構造の違いが何に起因するかを明らかにするために, AGO subfamily タンパク質と PIWI subfamily タンパク質のアミノ酸一次配列比較を行ったところ, AGO subfamily タンパク質特異的にみられる複数の挿入配列が明らかになった (図 2-27).

この中で L1 ドメインの挿入配列 (AGO-Ins) に着目した (図 2-27). hAgo2 において AGO-Ins は α ヘリックスを形成しており, ヘリックス上の Leu143, Leu147 の側鎖が同じく L1 ドメインの Pro155, Thr158, Ile159, Met213 の側鎖と疎水性相互作用を形成していた (図 2-28a). また AGO-Ins 上の Leu147 の主鎖のカルボニル基と L1 ドメインの Trp211 の主鎖のアミノ基間で水素結合を形成していた (図 2-28a). さらに N ドメインと L1 ドメイン間の相互作用を調べたところ, 疎水性相互作用ネットワークが形成されていた (図 2-28b). このように hAgo2 では AGO-Ins を介した L1 ドメイン内での疎水性相互作用と N ドメイン-L1 ドメイン間の疎水性相互作用により構造が安定化されていた.

一方, AGO-Ins を欠く Siwi においては, やはり L1 ドメイン内での対応する疎水性相互作用は失われていた (図 2-28c). しかし分子外側に配置した N ドメインと L1 ドメイン間の相互作用を見ると, N ドメインの配向が hAgo2 のそれとは変化したことで, hAgo2 で疎水性相互作用を形成していた疎水性残基が一残基ずつずれて相互作用ペアを変えて新たに疎水性相互作用ネットワークが形成されていた (図 2-28d). この新たな相互作用様式をとることで N ドメインの分子外側への配向が安定化されていた.

siRISC/miRISC は二本鎖 RNA 前駆体を取り込んだのちパッセンジャー鎖をはがすこと (unwinding) により成熟型となる. それに対して, piRISC は長い一本鎖 RNA 前駆体を取り込んだのち 3'末端側がプロセッシングされて成熟型となる. これまで hAgo の生化学的解析から二本鎖 RNA の unwinding には N ドメインが重要な役割を果たすこ

とが示されており, N ドメインが "くさび" のように二本鎖 RNA に打ちこまれることで **unwinding** を促進するというモデルが提唱されている^{106,107}. この研究により **hAgo2** における **unwinding** には N ドメイン-L1 ドメイン間で疎水性相互作用ネットワークを形成していた残基や AGO subfamily タンパク質特有の AGO-Ins が関与することが示されている^{106,107}. **piRISC** を形成する **Siwi** には AGO-Ins が欠失しており N ドメイン-L1 ドメイン間の疎水性相互作用も **hAgo2** のそれとは異なるという観察結果も考慮すると, **Siwi** において N ドメインが分子外側に配置され安定化されていることは **piRISC** 成熟化過程で **unwinding** 活性を必要としないという性質を反映しているのかもしれない.

このように AGO subfamily タンパク質特有の挿入配列 AGO-Ins を欠くことにより N ドメインが外側に位置した状態で安定化され, 結果として伸びた核酸結合チャネルを形成するのは **PIWI subfamily** タンパク質間で共通した特徴であると推察された. 同時に **hAgo2** との N ドメインの配向の差異は結晶化パッキングによるものではないことが示唆された.

2.9.18 PAZ ドメインによるガイド鎖 RNA の 3'セグメント認識

PAZ ドメインには 3'末端側の 3 つのヌクレオチドが結合していた (**BmN4** から抽出した **Siwi** に結合する **piRNA** の多くは 28 塩基であることが報告されていた¹⁴⁶ため, ここではこの 3 ヌクレオチドを 26–28 位と表記する). これまでにヒト由来 **PIWI** ホモログ **HIWI** と 3'末端-2'-OCH₃ RNA の複合体¹⁴¹やマウス由来 **PIWI** ホモログ **MIWI** と 3'末端-2'-OCH₃ RNA の複合体構造¹⁴²が報告されており, **PIWI subfamily** の PAZ ドメインの核酸結合ポケットにどのように核酸が結合するかが示されていた. **Siwi** の PAZ ドメインと核酸の結合様式は **HIWI** や **MIWI** と同様であった (図 2-29a). ガイド鎖 RNA の 28 位のリン酸基は **Tyr350**, **Tyr382**, **Tyr387** の側鎖と水素結合を形成し, 27 位のリン酸基は **Lys386**, **Tyr355** の側鎖と水素結合を形成していた. 28 位の 3'-OH 基は **Tyr417** の主鎖のカルボニル基と水素結合を形成していた. また 3'末端-2'-OCH₃ 基に関しても, **HIWI** や **MIWI** と同様に **Phe370**, **Phe379**, **Leu415**, **Ile416** などの疎水性残基が形成するポケットに格納された構造をとっており, 主にファンデルワールス相互作用により認識されていた (図 2-29b).

前項で述べたように, Siwi と hAgo2 において PAZ ドメインの配向にも大きな差異が見られた. しかしながら, PAZ ドメインに関しては N ドメインのように挿入配列が配向の違いを生み出す要因となるというような明確な違いは見受けられなかった. Siwi に結合する piRNA は長い一本鎖 RNA を前駆体として取り込まれた後, 3'末端がプロセシングをうけることにより成熟化する¹⁰². さらにプロセシングに共役して 3'末端-2'OH 基はメチル化修飾をうけ, 安定化される¹⁰². これまで報告されている Argonaute の構造比較などから PAZ ドメインは状態に応じてコンフォメーション変化することが知られており, Siwi においても PAZ ドメインの異方性温度因子が相対的に高かったことから動きうることが示唆された (図 2-30). これらを踏まえると, Siwi では (1) 取り込んだ長い一本鎖 RNA 前駆体が Siwi と立体障害をおこすまでプロセシングをうけ, その後 3'末端がメチル化される, (2) PAZ ドメインはある程度動きをもって揺らいだ状態となっているが, 3'末端-2'OCH₃ 基が近傍に位置すると疎水性ポケットにより認識し, その構造が固定される, というプロセスを経ると考えられた. このように piRNA の成熟過程が PAZ ドメインの配向を規定するのではないかと推察された.

2.9.19 MID/PIWI ドメインによるガイド鎖 RNA の 5'セグメント認識

これまで構造が報告されている Argonaute と同様に, Siwi においてガイド鎖 RNA の 5'セグメントは主に MID/PIWI ドメインにより認識されていた. また 1 位のヌクレオチドのみフリップアウトし MID/PIWI ドメインの境界面が形成する核酸結合ポケットに収容されていた (図 2-31a). ガイド鎖 RNA とタンパク質間の相互作用のほとんどはリン酸基との水素結合やソルトブリッジであった (図 2-31a, b). 1 位のリン酸基は真核生物由来 Argonaute で高度に保存された Phe607, Lys611, Gln623, Lys649 の側鎖, および Val624 の主鎖と水素結合を形成していた. 2 位のリン酸基は Asn629 の側鎖, および Cys626 の主鎖と, 3 位のリン酸基は Gln645 の側鎖と水素結合により相互作用していた. 4 位, 5 位, 7 位のリン酸基はそれぞれ Phe857 および Asn859, Gln871, Arg433 の側鎖と水素結合を形成していた. 6 位のリン酸基とタンパク質間の相互作用はみられなかった. ガイド鎖 RNA の 2'-OH 基については 1 位のものが Asn602 の側鎖と, 3 位のものが Asn859 の主鎖のカルボニル基とそれぞれ水素結合を形成していた. また他の Argonaute と同様に 1 位のウラシル塩基と Tyr607 の側鎖との間にスタック

ング相互作用がみられた。

興味深いことにモデル構築の際、ガイド鎖 RNA の 1 位と 3 位のリン酸基の間に強い電子密度が観察された (図 2-32)。TtAgo において、同じ箇所にてマグネシウムイオンが配位し、正電荷の環境を提供することでガイド鎖と結合することが知られていた¹¹⁷ ため (図 2-32)、Siwi においてもマグネシウムイオンが配位しているものと考えた。精製バッファーや結晶化試薬等にマグネシウムイオンは一切含まれていないことから Siwi は持ち込みのマグネシウムイオンを介してガイド鎖 RNA と結合していることが示唆された。マグネシウムイオンにはガイド鎖 RNA の 1 位と 3 位のリン酸基の他に、C 末端の Leu899 のカルボキシル基、Gln645 の側鎖カルボニル基、そして水分子が配位していた。マグネシウムイオンと唯一側鎖を介して配位していた Gln645 は PIWI subfamily タンパク質において高度に保存されていたことから (図 2-27)、Siwi で見られたマグネシウムイオンを介したガイド鎖 RNA との結合は PIWI subfamily タンパク質に共通の特徴であることが示唆された。また hAgo2 などの AGO subfamily タンパク質においては Siwi の Gln645 に対応する残基は Lys 残基となっており、その側鎖を介して正電荷の環境を作り出し直接的にガイド鎖 RNA と相互作用していた¹³⁹ (図 2-32)。このように、マグネシウムイオンを介してガイド鎖と結合するという点において Siwi は真核生物由来 AGO subfamily タンパク質よりも原核生物由来 Argonaute ホモログに似ていた。

2.9.20 ガイド鎖 RNA の 5'末端塩基バイアス

先に述べたように miRISC や siRISC 形成において、まず二本鎖前駆体が AGO subfamily タンパク質に取り込まれた後に一方の RNA 鎖が選択的にとどまる。二本鎖前駆体のうちどちらの RNA 鎖を選択するかは 5'末端塩基や両末端の熱力学的安定性により規定される¹⁵¹。またシロイヌナズナにおいては 10 種類の AGO subfamily が発現するが、Ago のサブタイプによって結合するガイド鎖の 5'末端塩基に偏向を示すことが知られている¹⁵²。このように Argonaute によるガイド鎖の 5'末端塩基の認識は正しい RNA 鎖の選択のみならず正しいパートナー Argonaute への振り分けという点で重要となる。

ヒトの miRNA の 5'末端塩基はウラシル (g1U) あるいはアデニン (g1A) がほとんど

であることが知られている¹³⁰。これまで hAgo2 の MID ドメインとヌクレオシド-リン酸の複合体構造解析によって、MID ドメインのなかでもプロリン残基に富んだ "nucleotide specificity loop" とよばれるループが g1U や g1A の特異的な認識に関与することが示された¹³⁰。

PIWI subfamily タンパク質においても、ガイド鎖 RNA の 5'末端塩基偏向が知られており、Siwi に結合する piRNA の 5'末端塩基はほとんどがウラシルである (g1U バイアス)^{102,144,146}。Siwi の他に、ショウジョウバエに発現する Piwi やマウスに発現する MIWI, MILI, MIWI2 など g1U バイアスを示す^{12,75,153,154}。一方、カイコに発現するもうひとつの PIWI タンパク質である BmAgo3 やショウジョウバエに発現する DmAgo3 は 5'末端塩基バイアスを示さない^{13,102,144,146}。PIWI subfamily タンパク質においても hAgo2 のように nucleotide specificity loop が 5'末端塩基バイアスを規定すると考えられていたが、PIWI subfamily タンパク質の MID ドメインの nucleotide specificity loop は多様なアミノ酸配列をもつため、Siwi などにおいて g1U バイアスはどうのように獲得されるのかは不明であった (図 2-27)。

今回の Siwi の構造を見ると、g1U は Argonaute に高度に保存された Tyr607 とのスタッキング相互作用を除いて、nucleotide specificity loop 内の Phe603 の主鎖カルボニル基とただ一つの水素結合を介して認識されていた (図 2-33)。重ね合わせの結果、ガイド鎖 RNA の 1 位の塩基をグアニンやアデニンなどのプリン塩基に置換するとループとの間に立体障害が起こり、シトシンに置換すると電気的反発により認識されにくくなることが予想された。しかしながら、nucleotide specificity loop がフレキシブルであればコンフォメーションを変えることによりこれらが解消されるため、g1U バイアスが規定されるには nucleotide specificity loop のフレキシビリティが低く固定されている必要があると考えられた。hAgo2 においては specificity loop に保存されたプロリン残基が存在するためにループがリジッドに固定されているが、Siwi のループにはそのようなプロリン残基がなかったことから、他の残基がループのフレキシビリティに関与すると考えられた。そこで Siwi の構造を詳しく調べたところ、nucleotide specificity loop 上の Leu599 が Phe579 と疎水性相互作用を形成していることがわかった (図 2-33)。この疎水性相互作用がループのフレキシビリティ低下に寄与する可能性を考え、これらの残基が他の PIWI subfamily で保存されているかを調べた。Phe579 は Phe か Tyr な

ど芳香族アミノ酸残基で保存されていた、一方で Leu599 は g1U バイアスを示すものは Leu or Val or Met or Ile 残基であったのに対して 5'末端塩基バイアスを示さないものでは Cys 残基に置換されていた (図 2-27). このことから, Siwi での Leu599 が Cys 残基である場合, Phe との疎水性相互作用が相対的に弱くなり結果としてフレキシブルとなった nucleotide specificity loop が様々なコンフォメーションをとり 5'末端塩基バイアスが失われるが, Leu599 が Cys 残基よりも嵩高い Leu or Val or Met or Ile 残基である場合, Phe579 に対応する残基との疎水性相互作用により specificity loop が固定され g1U バイアスを獲得するという仮説をたてた. 現在, この仮説を変異体解析により検証中である.

2.9.21 触媒テトラッドの形成

Argonaute の PIWI ドメインは RNase H 様フォールドをとり, そのスライサー活性部位は 4 つの触媒残基 (DEDX: X = D or H) から構成される¹³⁴. ガイド鎖との二者複合体と標的 RNA も含めた三者複合体の構造比較から, TtAgo はガイド鎖と結合した状態では 3 つの触媒残基 (DEDX の DDX に相当) は互いに近傍に位置するものの 4 番目の触媒残基 (DEDX の E に相当) が遠くに位置し触媒部位を形成しないが, 標的 RNA の結合に呼応して 4 番目の触媒残基が活性部位近傍に突き出され触媒テトラッドが完成することが示された^{117,119,120,155}. これは主に 2 つのループ PL1, PL2 が標的 RNA 結合に伴いコンフォメーション変化を起こすことから説明された (図 2-34a, b). TtAgo-ガイド鎖二者複合体では 4 番目の触媒残基 Glu512 が存在する PL2 が PL1 により塞がれていた (unplugged) が, 標的 RNA も含めた三者複合体では標的 RNA が PL1 を押しのけるように結合することで PL1 ゲートが開き PL2 が活性部位近傍に "plugged in" した状態へと構造変化する (図 2-34a, b). 一方で, hAgo2 などを含めた真核生物由来 AGO subfamily タンパク質-ガイド鎖 RNA 二者複合体¹³⁴⁻¹³⁹ はいずれも標的 RNA の非存在下であるにも関わらず, PL2 上に存在する Glu 残基は plugged in した状態となっており, 複数の水素結合を介してその状態が安定化されていた (図 2-34c).

今回決定した Siwi の構造において触媒テトラッドの形成を調べたところ, 3 つの触媒残基 (DEDX の DDX に相当) は互いに近傍に位置していたのに対して, 4 番目の触媒残基 Glu708 (DEDX の E に相当) は遠くに位置していた (図 2-34d). Siwi において

PL1 ゲートは開いた構造をとっていたが、Glu 残基の存在する PL2 は依然として活性部位よりも遠い位置にあり "unplugged" 状態となっていた (図 2-34d). このことから、Siwi においては触媒テトラッドの形成過程の中間体状態をとらえているものと考えられた. 同時に Siwi は AGO subfamily タンパク質とは異なる触媒テトラッド形成機構をもつ可能性が示唆された. Siwi では TtAgo のように標的 RNA の結合に呼応して PL2 のコンフォメーション変化がおり触媒テトラッドが完成するのかもしれないと考えられた.

2.9.22 ガイド鎖 RNA の軌道

hAgo2 などの真核生物 AGO subfamily タンパク質-ガイド鎖 RNA 二者複合体においてガイド鎖 RNA は 2-6 位までは A 型に近い構造 (near-A フォーム) をとっていた¹³⁴⁻¹³⁹. 今回 Siwi に結合していたガイド鎖 RNA の 5'セグメントは 2-5 位の塩基がスタッキングし near-A フォームをとっていた (図 2-35a). なかでも特に 2-4 位の塩基は溶媒側を向いていた (図 2-35b). これは他の Argonaute にもみられる構造であり、Siwi においても同様にガイド鎖 RNA のシード領域をあらかじめ整列させることで標的 RNA と二本鎖 RNA を形成する際のエン트로ピーコストを低下させていると考えられた. また溶媒側に向いたシード領域が標的認識の起点となることが示唆された. 電子密度マップよりガイド鎖のうち塩基をアサインできたのは 6 位までであったが、5 位と 6 位の間にねじれが観察された (図 2-35a). hAgo2, KpAgo などとガイド鎖の二者複合体においても同様のねじれがみられ、L2 ドメインの α ヘリックス上の Ile 残基 (hAgo2 における Ile365) が 6 位と 7 位のヌクレオチド間に突き出されることでねじれが生じていた¹³⁴⁻¹³⁶. 一方、Siwi では同様の α ヘリックス上の Phe436 が突き出されており、5 位と 6 位のヌクレオチド間でねじれが生じていた.

これまで構造が報告されたものに関して原核生物由来であれ真核生物由来であれ Argonaute に結合したガイド鎖はほとんど同様の軌道を描いていた. しかしながら Siwi に結合したガイド鎖とそれらを比較するとその軌道に大きな差異がみられた (図 2-35c). hAgo2 と Siwi においてガイド鎖 RNA の軌道を比較すると hAgo2 に結合したガイド鎖 RNA は L2 ドメインの表面に沿うように走っていたが、Siwi に結合したガイド鎖 RNA は PIWI ドメインの表面側に走っていた (図 2-35c). 両者を重ね合わせると

4位のリン酸基は 2.9 Å, 5位のリン酸基は 5.9 Å, 6位のリン酸基は 7.0 Å, それぞれ離れていた。

タンパク質-ガイド鎖間相互作用の違いがこのような軌道の差異が生じる要因となっていると考え、次に hAgo2-ガイド鎖の 5'セグメント間の相互作用を調べた。hAgo2 とガイド鎖 RNA 間の相互作用のほとんどはリン酸基との水素結合やソルトブリッジであった¹³⁹ (図 2-35d)。3-8 位のリン酸基は Lys709, Arg714, His753, Arg761, Tyr790, Arg792, Ser798, Tyr804 の側鎖のいずれかと相互作用していた。2'-OH 基を介した相互作用は少なく、5 位と Ile756, Gln757 の主鎖アミノ基間、6 位と Gln757 の側鎖カルボニル基間の相互作用のみがみられた。hAgo2 と Siwi を比較すると hAgo2 の Lys709, Arg714, Tyr790 は Siwi でも保存されていたが、Arg792, Tyr804, His753, Arg761 は Siwi ではそれぞれ Asn859, Gln871, Gln820, Ala828 にかわっていた。この違いによりガイド鎖の軌道の差異が生じていると示唆された。

hAgo2 および TtAgo の標的 RNA も含めた三者複合体とガイド鎖のみの二者複合体構造比較の結果^{117,119,135,139}, いずれにおいても標的 RNA が結合してもガイド鎖の 5'セグメントにはほとんど構造変化はみられなかった。そのため Siwi においても標的 RNA が結合してもガイド鎖 RNA の 5'セグメントに構造変化が起きない可能性を考え、A 型二本鎖 RNA 結合モデルを作成した。その結果、二本鎖 RNA は PIWI ドメインと立体障害を起こすことがわかった (図 2-35e)。しかしながら、これまで標的 RNA の結合に伴って PIWI ドメインが大きく構造変化する例は知られていない。加えて hAgo2, Siwi においてガイド鎖-標的 RNA を収容する核酸結合チャネルの向きは同様であったこと (図 2-25), hAgo2-ガイド鎖 RNA 相互作用に関与していた残基のうち複数 Siwi でも保存されていたこと (hAgo2 における Lys709, Arg714, Tyr790 : Siwi ではそれぞれ Lys780, Arg785, Tyr857 に対応), も考慮すると今回 Siwi に結合していたガイド鎖の構造は完成型ではなく標的 RNA の結合に伴って、hAgo2 結合型ガイド鎖 RNA 様構造へとコンフォメーション変化が起こると推察された。

2.9.23 piRNA-標的 RNA 結合モデル

Siwi 結合型ガイド鎖が標的 RNA の結合に呼応して hAgo2 結合型様構造へとコンフォメーション変化が起こるという仮説のもと、Siwi のガイド鎖 RNA-標的 RNA 結合モ

デルを作成した。なお TtAgo と hAgo2 では核酸の軌道が同様であったこと、TtAgo は hAgo2 よりも二本鎖 RNA の塩基対が長い状態で構造決定されていること、などから TtAgo-ガイド鎖-標的 RNA 構造¹¹⁹を参考に 28 塩基対の二本鎖 RNA 結合モデルを作成した。複合体モデルより hAgo2 と同様に核酸結合チャネルの中間領域において二本鎖 RNA は L2/PAZ ドメインと立体障害をおこすことがわかり、L2/PAZ ドメインがより開いた状態へと構造変化する必要があると示唆された (図 2-36a)。TtAgo に結合した二本鎖 RNA の 16 位以降は N ドメインが二本鎖 RNA の塩基対合を阻害するよう塞ぐ位置をとっていた¹¹⁹。一方 Siwi のモデル構造では N ドメインが分子外側に配置することで N ドメインによる塩基対合阻害はみられず、28 塩基対の二本鎖 RNA を収容するのに適した核酸結合チャネルが形成されると示唆された (図 2-36a)。

近年興味深いことに、ショウジョウバエ由来 Ago2 では標的 RNA の切断ののち切断産物が剥がれるが、対照的に Siwi では標的 RNA を切断した後も切断産物が Siwi から剥がれず留まることが生化学的解析により報告された¹⁴⁶。Siwi は二次産生経路に働くタンパク質であり、切断産物をパートナーである BmAgo3 へと受け渡す。受け渡しは Siwi 単独では行われず、ヘリカーゼ BmVasa の ATP 加水分解による RNA 巻き戻し活性を必要とする^{146,156}。このような Argonaute の性質の違いは切断産物が piRNA として利用されるか、あるいは単に分解されるべき標的かということを反映していると考えられている。Siwi-ガイド鎖 RNA-標的 RNA 三者複合体モデルから標的 RNA の 5'末端側が分子外側に位置する N ドメインの分子表面と相互作用しうることが示唆された (図 2-36a)。これより Siwi では標的 RNA を切断した後も、二本鎖 RNA-N ドメイン間の相互作用により二本鎖 RNA が安定化されているのかもしれないと考えられた。一方で、同じく hAgo2-ガイド鎖 RNA-標的 RNA (21 塩基対) 三者複合体モデルを作成したところ、塩基長が短いために、標的 RNA の 5'末端側において Siwi で予想されたようなタンパク質-RNA 間相互作用はみられなかった (図 2-36b)。このように N ドメインの配向の差異が Siwi に特異的な性質をあたえることが示唆された。

2.9.24 t1A 結合ポケット

ヒトを含めた脊椎動物において、miRNA の 1 位 (g1) に対する標的 RNA の塩基 (t1) はアデニンであること (t1A) や、t1A は miRNA による標的の抑制を促進することな

どが報告されていた¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. さらに g1 の塩基に依らず miRNA は t1A をもつ RNA を標的とすることも示された^{158,159}. これらのことからガイド鎖との相補性ではなく Argonaute 自身が t1A を好む性質をもつのではないかという仮説が立てられた. この発想のもと, 近年 hAgo2-ガイド鎖 RNA-標的 RNA 三者複合体の構造解析から t1 のヌクレオチドはフリップアウトし L2/MID ドメインの境界面が形成するポケットに塩基が収容されるように認識されること, さらにこの結合ポケットは水分子を介して t1A を特異的に認識することなどが明らかになった¹⁴⁰ (図 2-37).

近年, ショウジョウバエ由来 Aub を含めた複数の PIWI subfamily タンパク質も g1 の塩基に依らず t1A をもつ RNA を標的とすることが示された¹⁵³. Siwi に関して生化学的解析により t1A をもつ標的 RNA を切断しやすいことが示され¹⁵³, これらにも hAgo2 と同様の t1A 結合ポケットが保存されているのではないかと予想されていた.

そこで Siwi, hAgo2 の t1A 結合ポケットについて構造比較を行った. hAgo2 では t1A は主にタンパク質主鎖と水分子を介した水素結合ネットワークにより認識されていた (図 2-37). 唯一, Ser561 の側鎖が t1A の N6 原子と水素結合を形成していた (図 2-37). 今回決定した Siwi-ガイド鎖 RNA 複合体の構造中でも同様の領域にポケット様構造がみられた (図 2-37). hAgo2 の Ser561 に対応する位置に Siwi では Thr640 が位置していた. hAgo2 において水素結合ネットワークに関与していたタンパク質主鎖についても同様の構造がみられた. また hAgo2 の t1A 結合ポケットの構造は標的 RNA の非存在下においても保たれていたことも考慮すると, Siwi においてもポケットの Thr640 の側鎖を介して同様の水素結合ネットワークが形成され t1A が嗜好的に収容されると推察された.

2.10 まとめと展望

本研究では抗 MARWI 抗体を利用した抗体カラムからプロテアーゼ Thermolysin を用いることで MIWI を成体マウス精巣抽出液から溶出することに成功し, さらに高純度で MIWI を精製する系を確立した. 精製した MIWI は 30 塩基長にピークをもつ piRNA と結合していた. また精製した MIWI を用いて生化学的解析を行い, N 末端に存在する 100 残基程度のループは MIWI のスライサー活性に必要ではないことを示した. さらに WT MIWI およびリジン残基をメチル化した MIWI の結晶を得ることに成

功したが、それらに関して X 線回折像を得ることはできなかった。

加えて抗 Siwi 抗体を利用した抗体カラムから Thermolysin を用いることで Siwi を BmN4 接着細胞から溶出し、高純度に Siwi を精製する系を確立した。精製 Siwi の結晶を得ることに成功し、最大分解能 2.4 Å の回折データセットを得た。hAgo2 などの構造情報を用いて分子置換法により Siwi の結晶構造を決定した。Siwi はガイド鎖 RNA を含んでおり、ガイド鎖 RNA の一部と Siwi の相互作用を示した。そして Siwi と hAgo2 の構造を比較することで、Siwi では AGO subfamily タンパク質特有の挿入配列がないために N ドメインが分子外側に位置することが明らかになった。また N ドメインの配向の差異が核酸結合チャネルの伸長、くさびとしての役割などに関与することが示唆された。さらに Siwi-ガイド鎖 RNA-標的 RNA 三者複合体モデルを作成し、N ドメインが二本鎖 RNA との相互作用に関与していることが示唆された。これまで Argonaute の N ドメインに関しては他の機能ドメインと比べてその知見が不足していた。本研究により N ドメインが AGO subfamily タンパク質と PIWI subfamily タンパク質間の違いを生み出し様々な機能を発揮するのに関与することが示唆されたという点においても大きな意義をもつと考えられる。今後は培養細胞 BmN4 を用いた変異体解析により本研究で得られた知見 (piRNA ローディング, スライサー活性, g1U バイアス等) を検証する。

本研究では 2 つの PIWI タンパク質、MIWI, Siwi を同様の手法にて精製することに成功した。このことから他の PIWI タンパク質の精製にも本手法が適用可能であると期待される。たとえば成体マウス精巣からの MILI の精製、ショウジョウバエ卵巣体細胞由来培養細胞 OSC からの Piwi の精製、カイコ卵巣生殖細胞由来培養細胞 BmN4 からの BmAgo3 の精製などに適用できる可能性は高いと考えられる。そうして高純度に精製した PIWI タンパク質は構造解析や生化学的解析などへ展開すると期待される。また本研究により Siwi-ガイド鎖 RNA 二者複合体の構造が明らかになったが、PIWI タンパク質の作動機構の全貌解明には一枚のスナップショットのみでは不十分であり、他の状態の結晶構造が必要となる。Siwi に関してはたとえば Siwi-ガイド鎖 RNA-標的 RNA 三者複合体に加えて Siwi-BmVasa 複合体など相互作用因子との複合体構造解析などを行うことが重要となるだろう。

第二章の図表

	miRNA	siRNA	piRNA
Argonaute	AGO	AGO	PIWI
塩基長	~22 nt	~21 nt	23~30 nt
発現部位	ユビキタス	ユビキタス	生殖巣
前駆体	ヘアピン RNA	二本鎖 RNA	一本鎖 RNA
抑制機構	転写後抑制	転写後抑制	転写抑制 / 転写後抑制

表 2-1 Argonaute に結合する小分子 RNA

主な小分子 RNA の特徴を示した。piRNA は他の小分子 RNA に比べて塩基長が長く、一本鎖 RNA を前駆体として産生されるなどの特徴をもつ。

表 2-2 Siwi の回折データ, および構造精密化後の統計値

Siwi	
Data collection	
Beamline	SPring-8 BL41XU
Wavelength (Å)	1.000
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	61.9, 114.6, 136.7
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	114.6–2.40 (2.49–2.40)
R_{meas}	0.136 (1.115)
$\ \sigma I$	8.0 (1.8)
Completeness (%)	99.7 (99.4)
Redundancy	5.0 (4.5)
CC(1/2)	0.998 (0.523)
Refinement	
Resolution (Å)	87.8–2.40
No. reflections	38,663
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.209 / 0.246
No. atoms	
Protein	5,981
RNA	192
Magnesium ion	1
Solvent	66
B -factors (Å ²)	
Protein	72.9
RNA	105.8
Magnesium ion	36.4
Solvent	50.7
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (°)	0.990
Ramachandran plot	
Favored (%)	95.3
Allowed (%)	4.4
Outlier (%)	0.3

*Highest resolution shell is shown in parentheses.

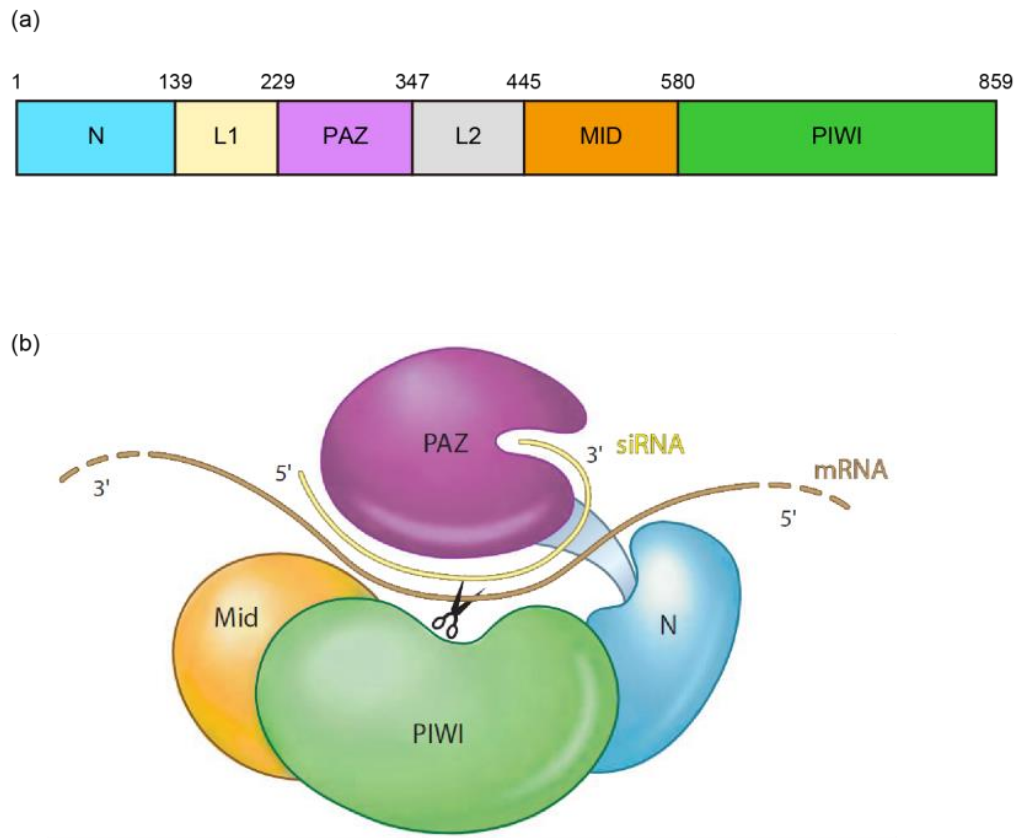


図 2-1 Argonaute

(a) Argonaute のドメイン構成. Argonaute は 4 つの機能ドメインと 2 つのリンカードメインからなる. 代表的な例としてヒト由来 Argonaute2 (hAgo2) の残基番号を示した.

(b) 各ドメインの機能. PAZドメインがガイド鎖 RNA の 3'末端を, MIDドメインがガイド鎖 RNA の 5'末端をそれぞれつなぎとめる. Argonaute のサブタイプによっては, PIWIドメインがエンドリボヌクレアーゼ活性 (スライサー活性) を示すものもある. (Liu and Paroo, *Annu. Rev. Biochem.*, 2010 より転載)

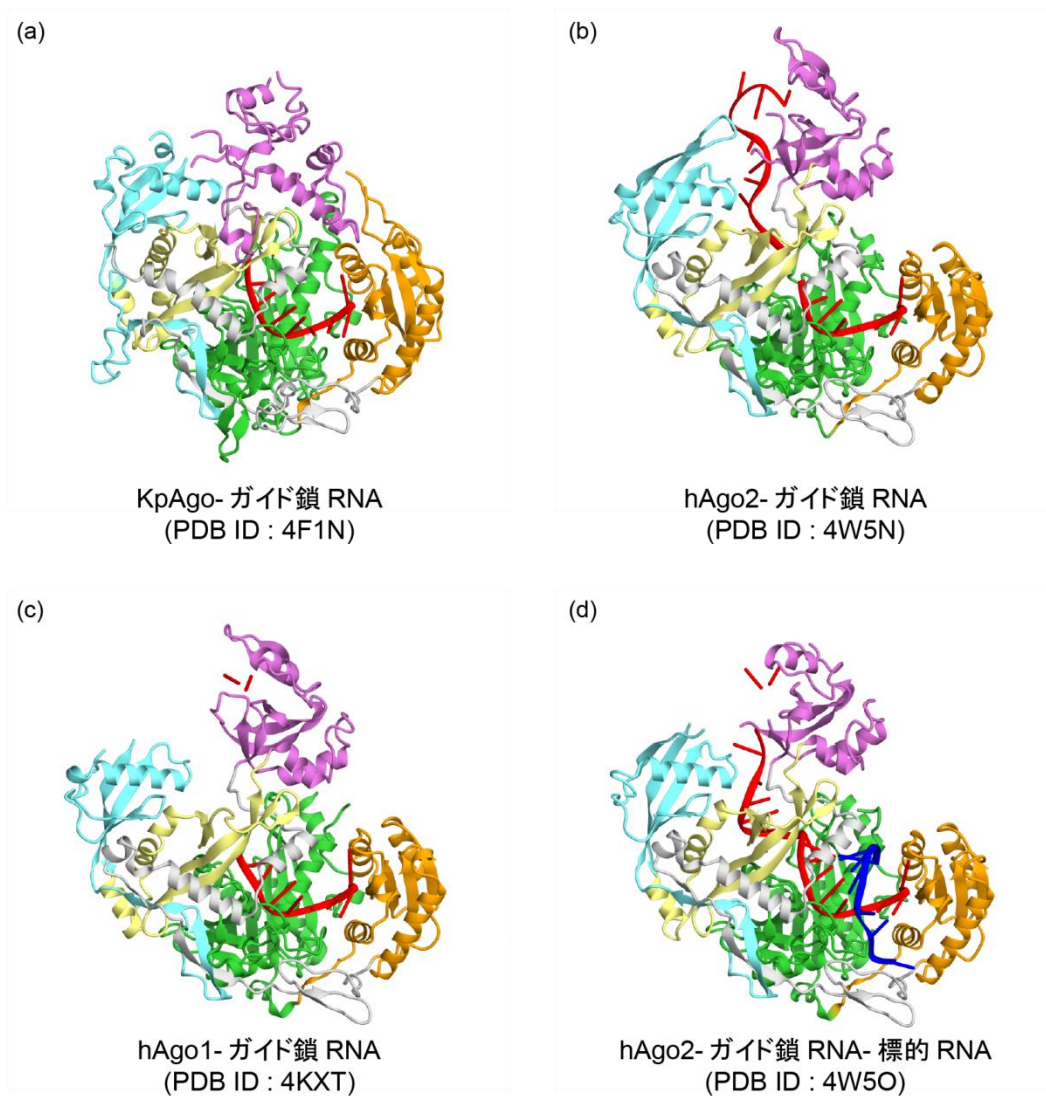


図 2-2 真核生物由来 AGO タンパク質の結晶構造

(a) 出芽酵母 *Kluyveromyces polysporus* 由来 Ago (KpAgo)- ガイド鎖 RNA 二者複合体の結晶構造.

(b) hAgo2- ガイド鎖 RNA 二者複合体の結晶構造.

(c) ヒト由来 Argonaute1 (hAgo1)- ガイド鎖 RNA 二者複合体の結晶構造.

(d) hAgo2- ガイド鎖 RNA- 標的 RNA 三者複合体の結晶構造.

図 2-1 (a) にならってドメインを着色した. ガイド鎖 RNA を赤色, 標的 RNA を青色のモデルで示した.

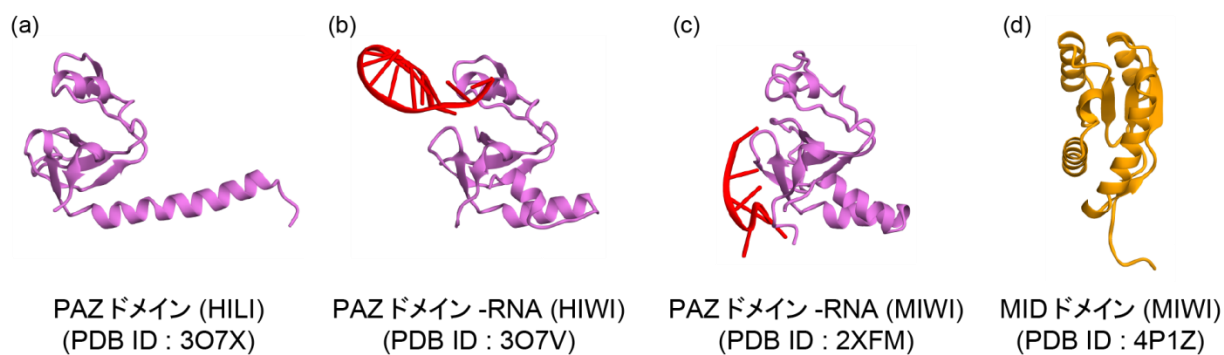


図 2-3 PIWI タンパク質の各機能ドメインの構造解析

(a) ヒト由来 PIWI ホモログ HILI の PAZドメイン単体の結晶構造.

(b) ヒト由来 PIWI ホモログ HIWI の PAZドメイン -RNA 二者複合体の結晶構造.

(c) マウス由来 PIWI ホモログ MIWI の PAZドメイン -RNA 二者複合体の NMR 構造.

(d) MIWI の MIDドメイン単体の結晶構造.

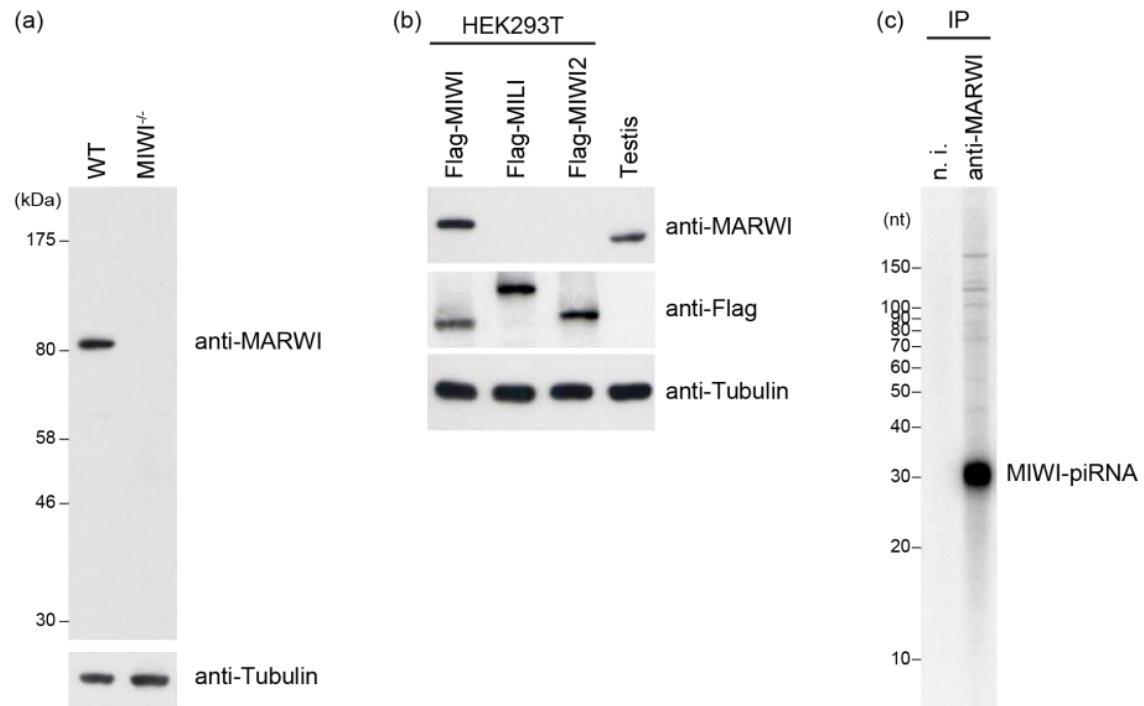


図 2-4 抗 MARWI 抗体の調製 (Hirano *et al.*, 未発表)

(a) マウス精巣抽出液を用いたウェスタンブロッティングによる MIWI の検出.

(b) 抗 MARWI 抗体のマウス由来 PIWI ホモログの交差. HEK293T 細胞に Flag タグ融合型として 3 つのマウス PIWI ホモログ (MIWI, MILI, MIWI2) を発現させ, ウェスタンブロッティングにより検出した.

(c) MIWI に結合する核酸の変性 PAGE による検出. n. i. は非免疫性 IgG を示す.

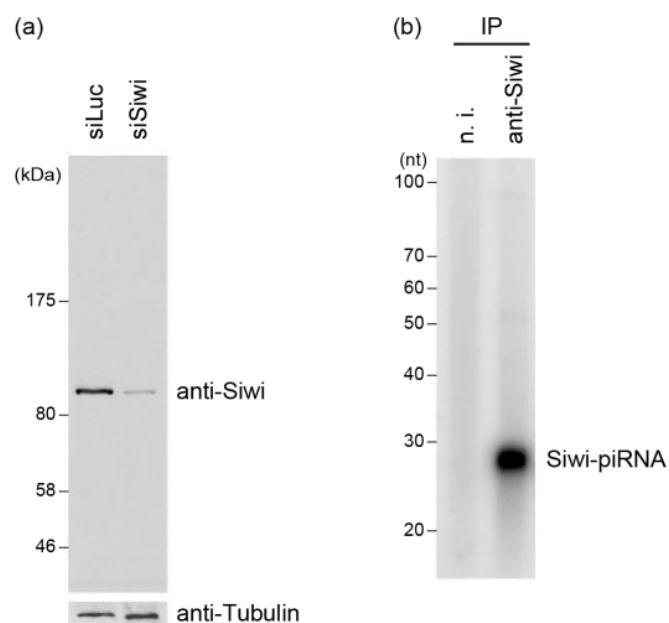


図 2-5 抗 Siwi 抗体の調製 (Nishida *et al.*, *Cell Rep.*, 2014 より一部改変して転載)

(a) BmN4 抽出液を用いたウェスタンブロッティングによる Siwi の検出.

(b) Siwi に結合する核酸の変性 PAGE による検出. n. i. は非免疫性 IgG を示す.

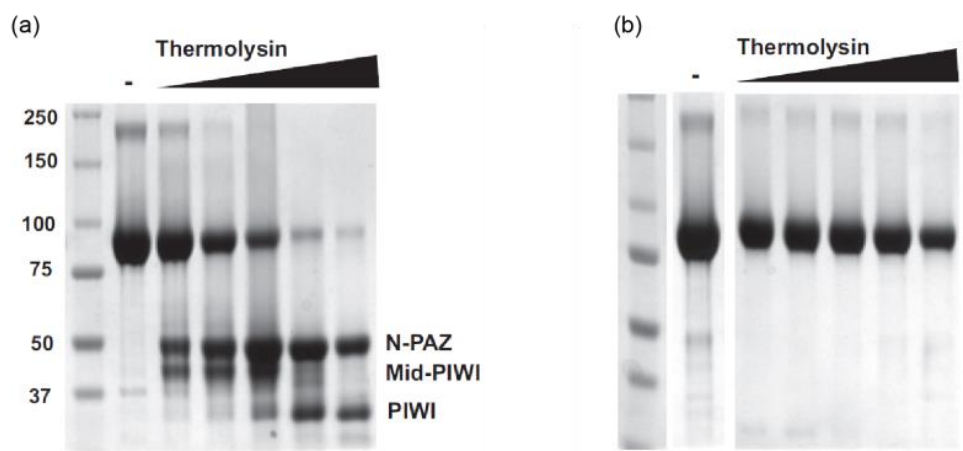


図 2-6 hAgo2 の Thermolysin に対する抵抗性 (Elkayam *et al.*, *Cell*, 2012 より転載)
 (a) ガイド鎖 RNA 非結合型 hAgo2 に Thermolysin を添加すると各機能ドメインに分解される。
 (b) ガイド鎖 RNA 結合型 hAgo2 に Thermolysin を添加しても分解されず抵抗性を示す。

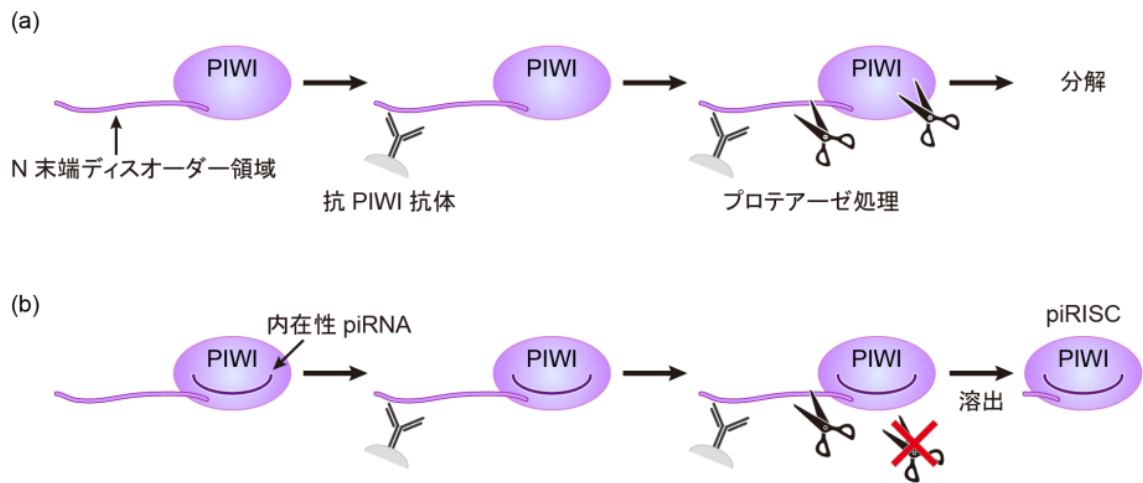


図 2-7 抗体カラムを用いた、動物由来生殖細胞からの PIWI タンパク質精製の戦略

PIWI タンパク質には N 末端に 100 残基程度のディスオーダー領域が存在する。この N 末端上に存在するエピトープがモノクローナル抗体によって認識され、抗体カラムによりトラップされる。Thermolysin などのプロテアーゼ処理を施すことにより PIWI タンパク質を抗体カラムから溶出する。

(a) 内在性 piRNA 非結合型 PIWI タンパク質の場合、不安定なためタンパク質は各機能ドメインなどにまで分解される。

(b) 内在性 piRNA 結合型 PIWI タンパク質の場合、PIWI タンパク質は安定化されプロテアーゼに抵抗性を示すため、N 末端のディスオーダー領域のみが切断され、piRNA を結合した PIWI タンパク質が溶出される。

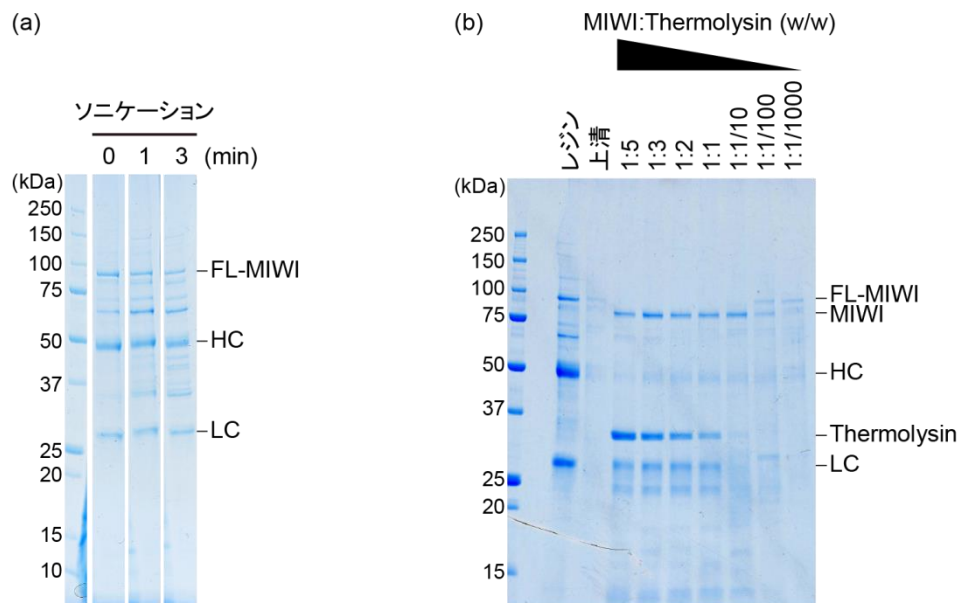


図 2-8 少量スケールでの MIWI 精製条件の検討

(a) ソニケーションの時間による精製破碎効率の検討. HC は重鎖, LC は軽鎖をそれぞれ示す.

(b) 抗体カラムから MIWI を溶出する際の Thermolysin の量の検討.

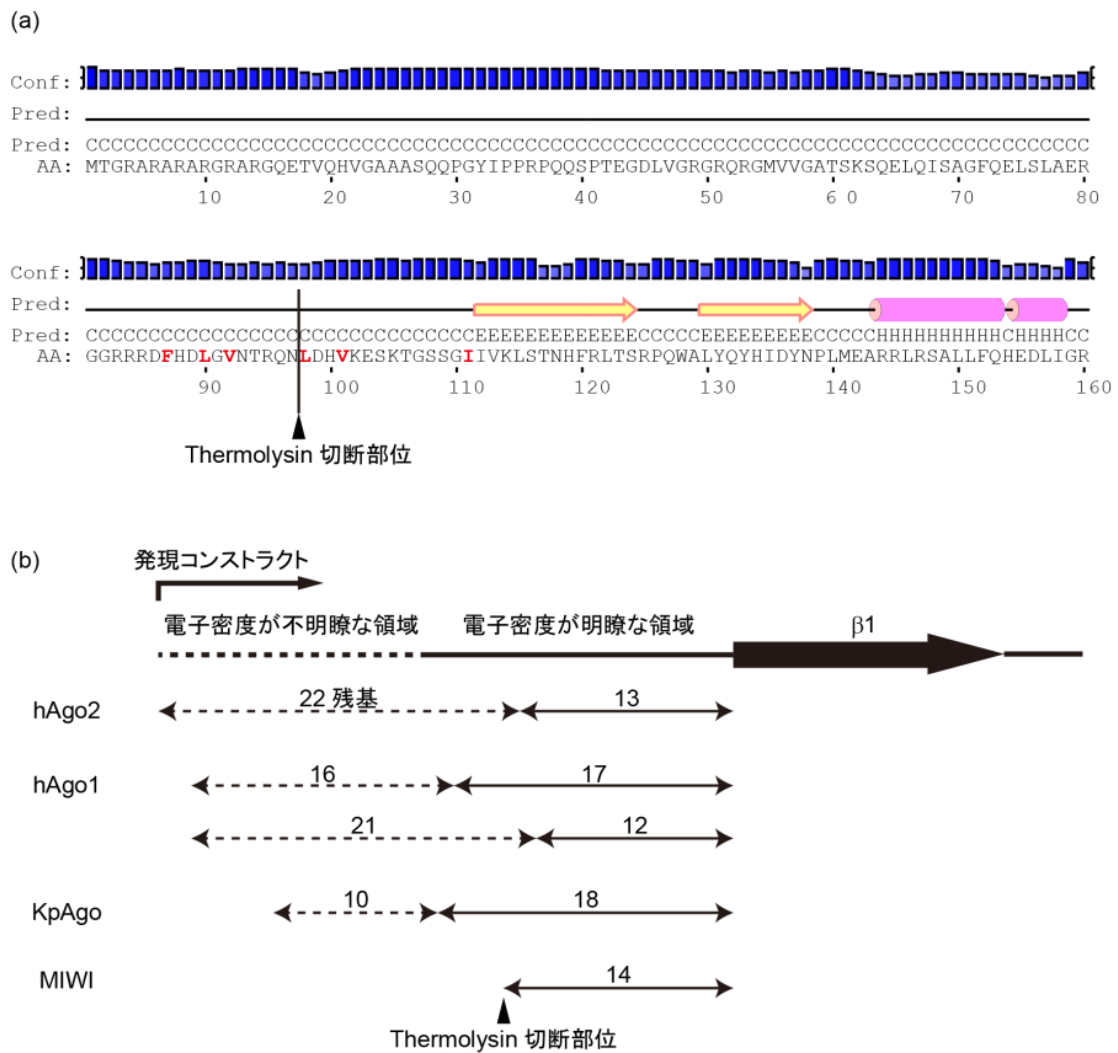


図 2-9 抗体カラムから溶出した MIWI の N 末端

(a) PSIPRED による MIWI の二次構造予測。N 末端側の 160 残基のみを示した。N 末端に 100 残基程度のディスオーダー領域が存在することがわかる。Thermolysin による予想切断部位を赤字で示し、実際に Thermolysin で切断された箇所を黒三角で示した。

(b) 結晶構造が報告されている真核生物由来 AGO タンパク質の N 末端。hAgo2, hAgo1, KpAgo はどれも $\beta 1$ から 30 残基程度のディスオーダー領域をもつが、N 末端側の 15 残基程度は電子密度が不明瞭であり後半の 15 残基程度は電子密度が明瞭であるという点で共通していた。Thermolysin により溶出された MIWI は $\beta 1$ の 14 残基 N 末端側で切断をうけていた。

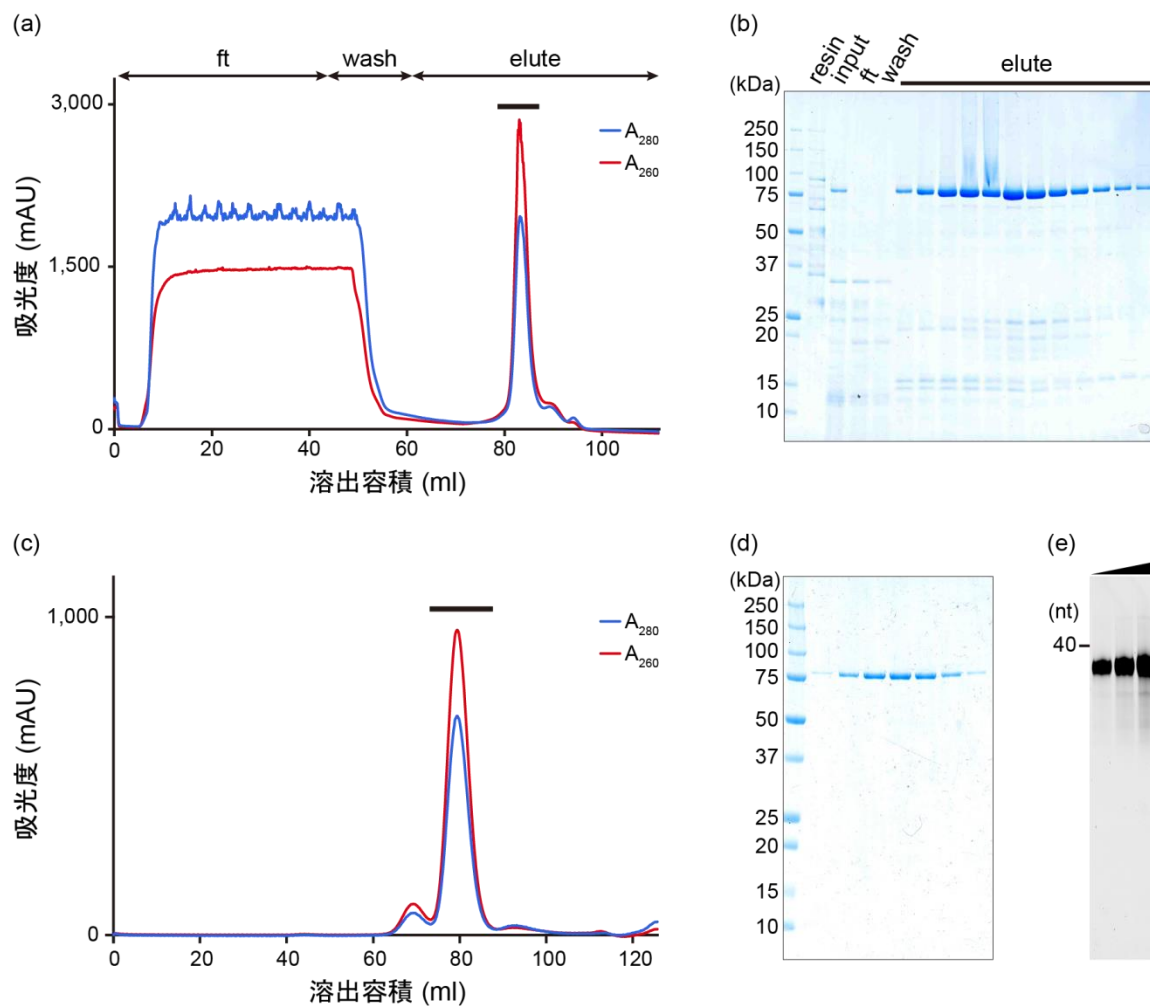


図 2-10 MIWI の調製

(a) MIWI の Heparin カラムにおける溶出ピーク。ft は素通り画分，wash は洗浄画分，elute は溶出画分を示す。ft に大きなピークがみられる。

(b) (a) の SDS-PAGE 検出結果。素通り画分および洗浄画分にはほとんどタンパク質は検出されなかった。Thermolysin により N 末端ループを切断された MIWI は溶出画分に検出された。

(c) MIWI のゲル濾過カラムにおける溶出ピーク。溶出ピークは単分散性を示した。260 nm に対する吸光度が 280 nm に対する吸光度よりも高いことから MIWI には核酸が結合していることがわかる。

(d) (c) の SDS-PAGE 検出結果。

(e) 精製 MIWI に結合する核酸の変性 PAGE による検出結果。

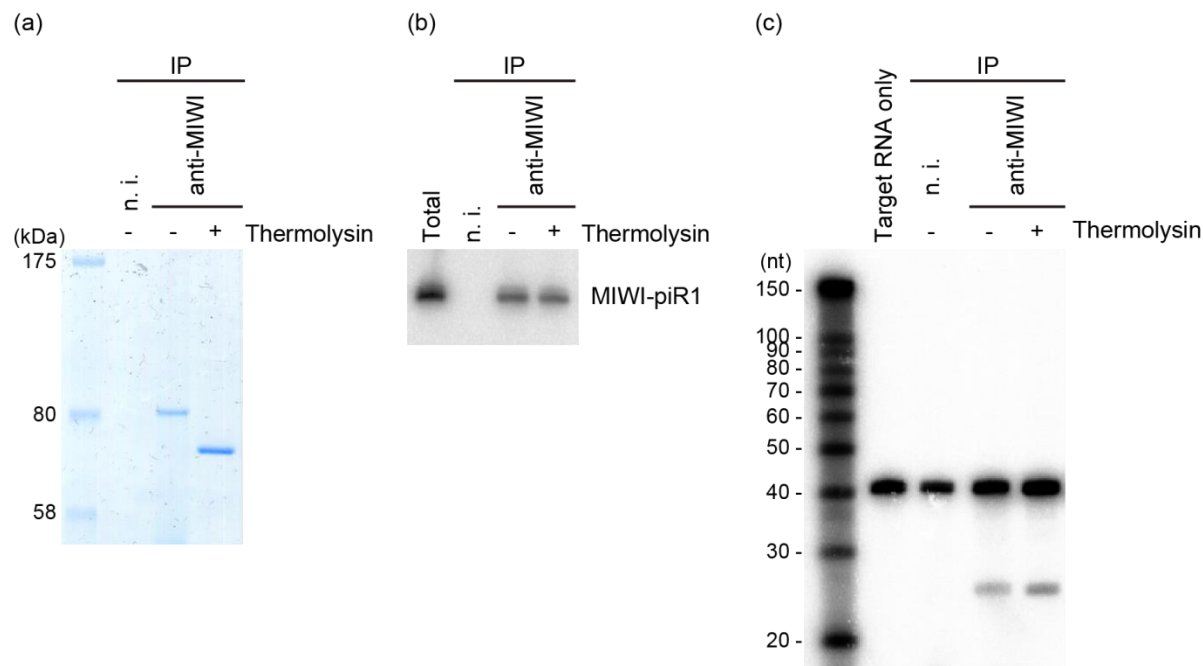


図 2-11 精製 MIWI のスライサー活性測定

(a) Thermolysin 未処理および処理後の MIWI の SDS-PAGE 検出結果. Thermolysin 未処理のサンプルは抗体に結合した状態であり, 全長 MIWI を示す. Thermolysin 処理済みのサンプルは精製した MIWI を示す.

(b) Thermolysin 未処理および処理後の MIWI に結合する piRNA のノザンブロット解析.

(c) Thermolysin 未処理および処理後の MIWI のスライサー活性測定. N 末端のディスオーダーループが削られた精製 MIWI は全長 MIWI と同等のスライサー活性を示した.



図 2-12 MIWI の結晶化

(a) 結晶化初期スクリーニングにより得られた MIWI の結晶.

(b, c) 結晶化条件の最適化により得られた MIWI の結晶.

スケールバーは 100 μm を表す.

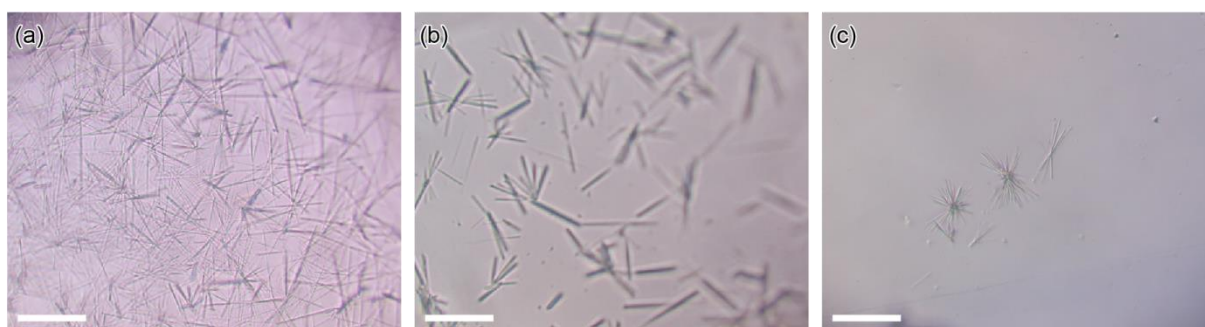


図 2-13 MIWI タンパク溶液にマグネシウムを添加した状態での結晶化

(a-c) 結晶化初期スクリーニングにより得られた MIWI の結晶. スケールバーは 100 μm を表す.

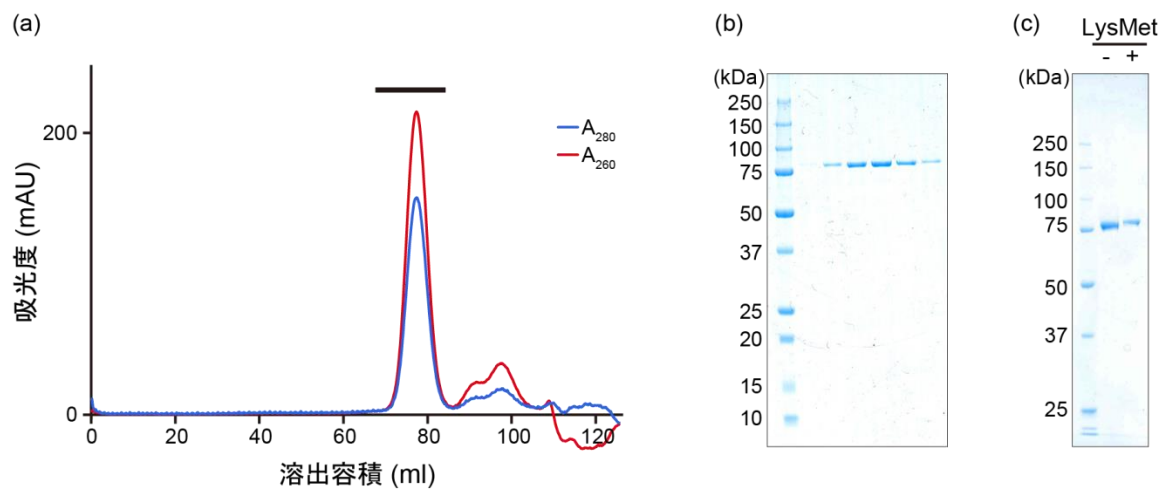


図 2-14 MIWI_{LysMet} の調製

(a) MIWI_{LysMet} のゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出ピーク.

(b) (a) の SDS-PAGE 検出結果.

(c) 精製した MIWI, MIWI_{LysMet} の SDS-PAGE 検出結果. リジン残基をメチル化したことで分子量が大きくなったことがわかる.

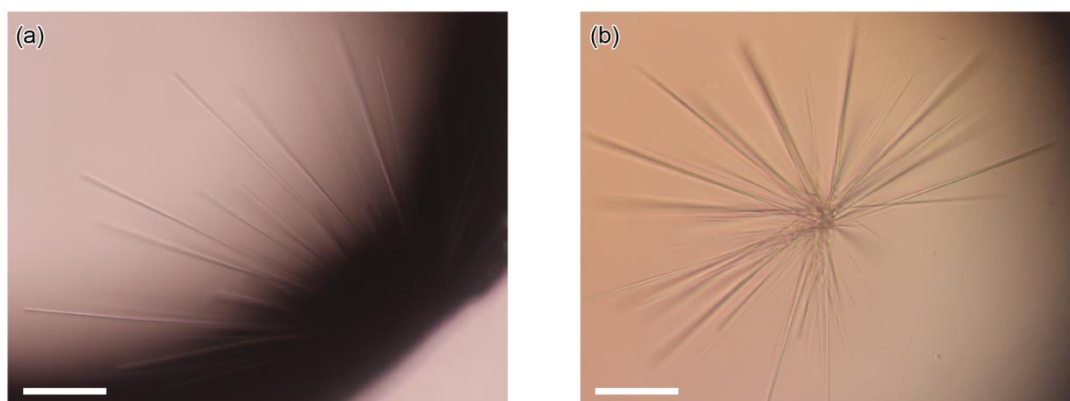


図 2-15 MIWI_{LysMet} の結晶化

(a) 結晶化初期スクリーニングにより得られた MIWI_{LysMet} の結晶.

(b) 結晶化条件最適化により得られた MIWI_{LysMet} の結晶.

スケールバーは 100 μm を表す.

(a) Siwi:Thermolysin (w/w)

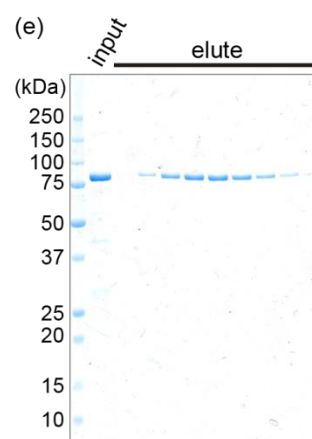
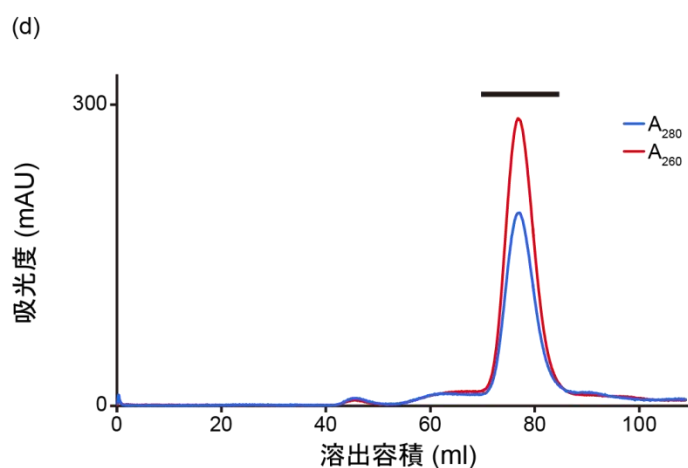
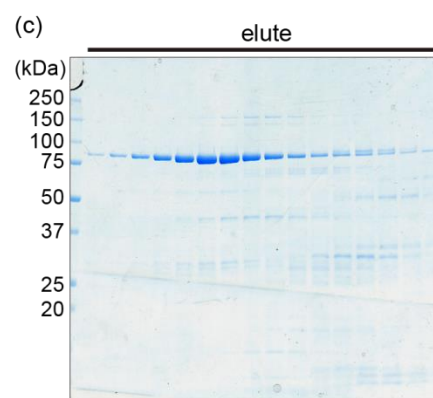
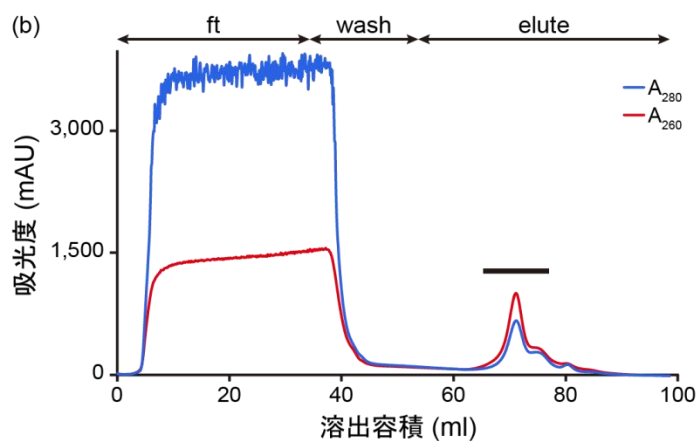
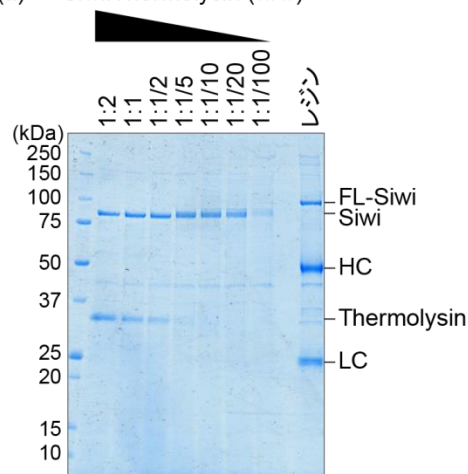


図 2-16 Siwi の調製

- (a) 抗体カラムから Siwi を溶出する際の Thermolysin の量の検討。HC は重鎖, LC は軽鎖を示す。
- (b) Siwi の Heparin カラムにおける溶出ピーク。ft は素通り画分, wash は洗浄画分, elute は溶出画分を示す。ft に大きなピークがみられる。
- (c) (b) の SDS-PAGE 検出結果。Thermolysin により N 末端ループを切断された Siwi は溶出画分に検出された。
- (d) Siwi のゲル濾過カラムにおける溶出ピーク。溶出ピークは単分散性を示した。260 nm に対する吸光度が 280 nm に対する吸光度よりも高いことから Siwi には核酸が結合していることがわかる。
- (e) (d) の SDS-PAGE 検出結果。

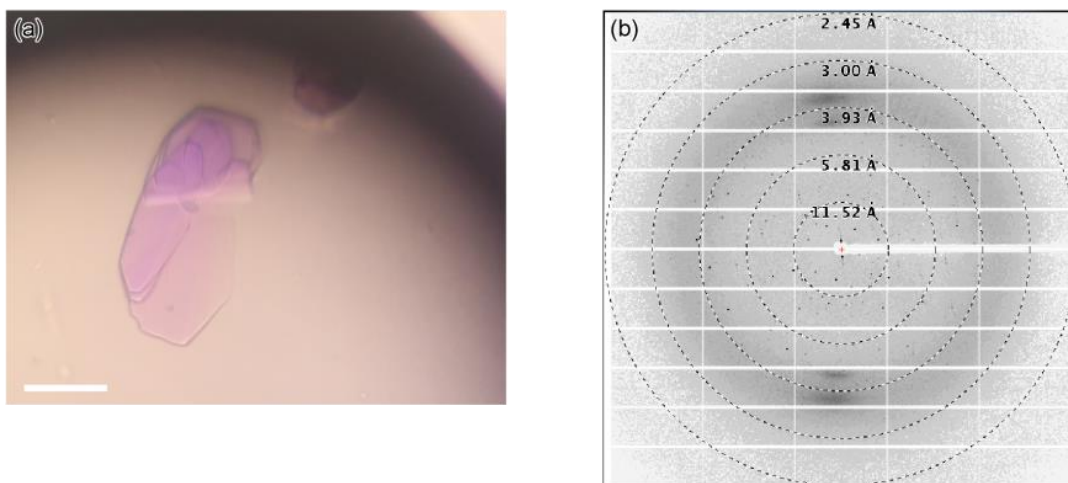


図 2-17 Siwi の結晶化， および X 線回折実験

(a) 結晶化初期スクリーニングにより得られた Siwi の結晶． スケールバーは 100 μm を表す．

(b) (a) の結晶から得られた回折像．

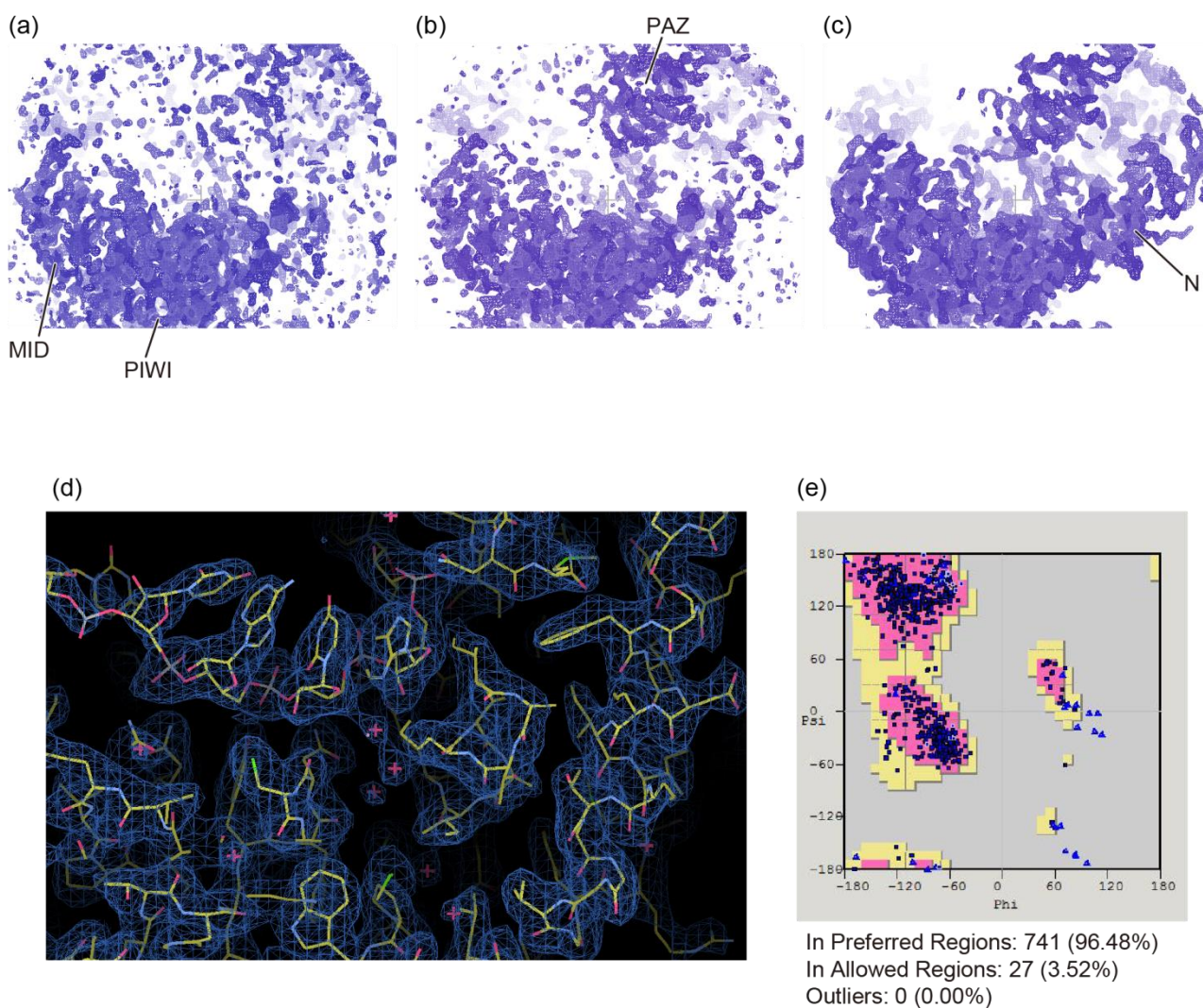


図 2-18 Siwi の構造決定

- (a) hAgo2 をサーチモデルとして分子置換を行い，手動モデル構築を行った後の $2F_o - F_c$ 電子密度マップ (1.5 σ).
 (b) HIWI-PAZ ドメインをサーチモデルとして分子置換を行い，手動モデル構築を行った後の $2F_o - F_c$ 電子密度マップ (1.5 σ).
 (c, d) 構造精密化後の最終的な $2F_o - F_c$ 電子密度マップ (1.5 σ (c), 1.0 σ (d)).
 (e) 構造精密化後のラマチャンドランプロット.

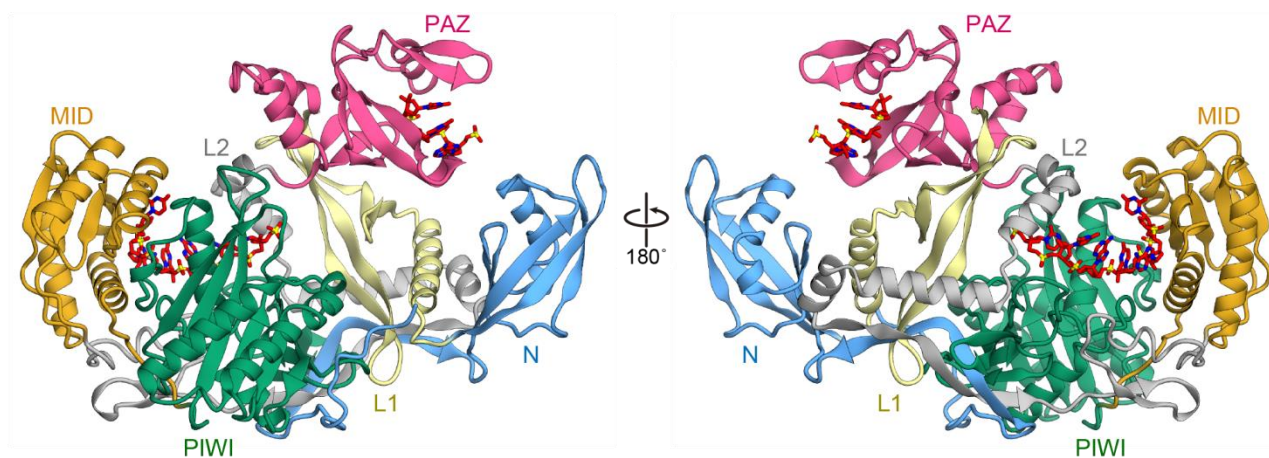


図 2-19 Siwi の全体構造

Siwi の結晶構造. アミノ酸残基 130–899 の領域についてモデル構築した. 5'末端が MID ドメインにアンカーされた状態で 7 ヌクレオチド, 3'末端が PAZ ドメインにアンカーされた状態で 3 ヌクレオチド, RNA が結合していた.

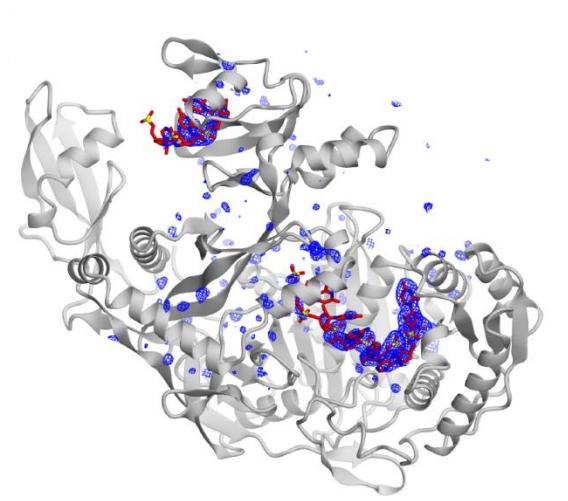
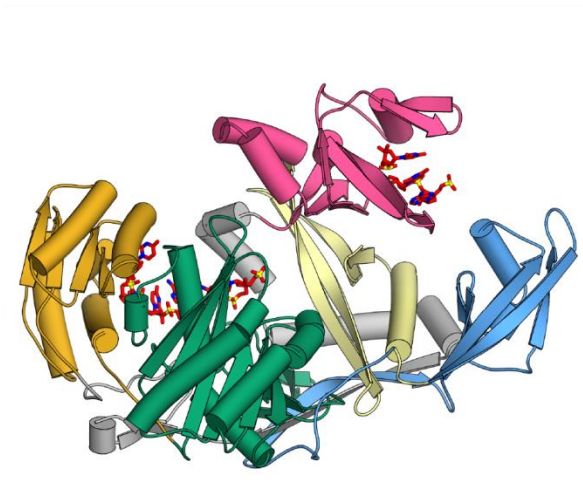


図 2-20 Siwi に結合するガイド鎖 RNA

ガイド鎖 RNA について $F_o - F_c$ simulated annealing omit map を青のメッシュで示した (Contour level = 3.0 σ). 5'セグメントとして 7 ヌクレオチド, 3'セグメントとして 3 ヌクレオチド, それぞれ RNA 鎖を電子密度マップにアサインした.

Siwi- ガイド鎖 RNA



hAgo2- ガイド鎖 RNA
(PDB ID : 4W5N)

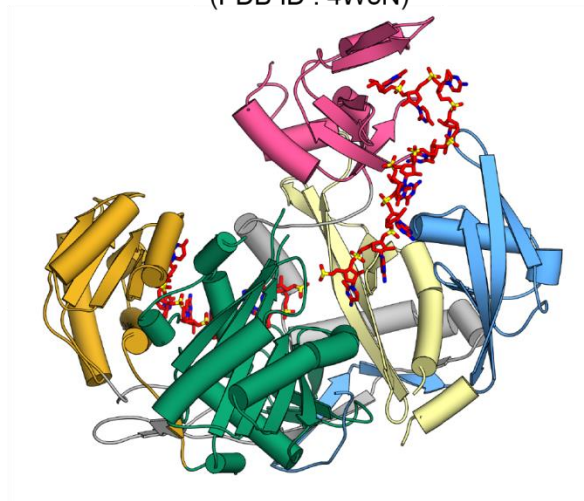


図 2-21 Siwi と hAgo2 の構造比較

今回結晶構造を決定した Siwi- ガイド鎖 RNA 二者複合体 (左) と主に hAgo2- ガイド鎖 RNA 二者複合体 (右) の構造比較を行った。 それぞれをシリンダーモデルで表示した。

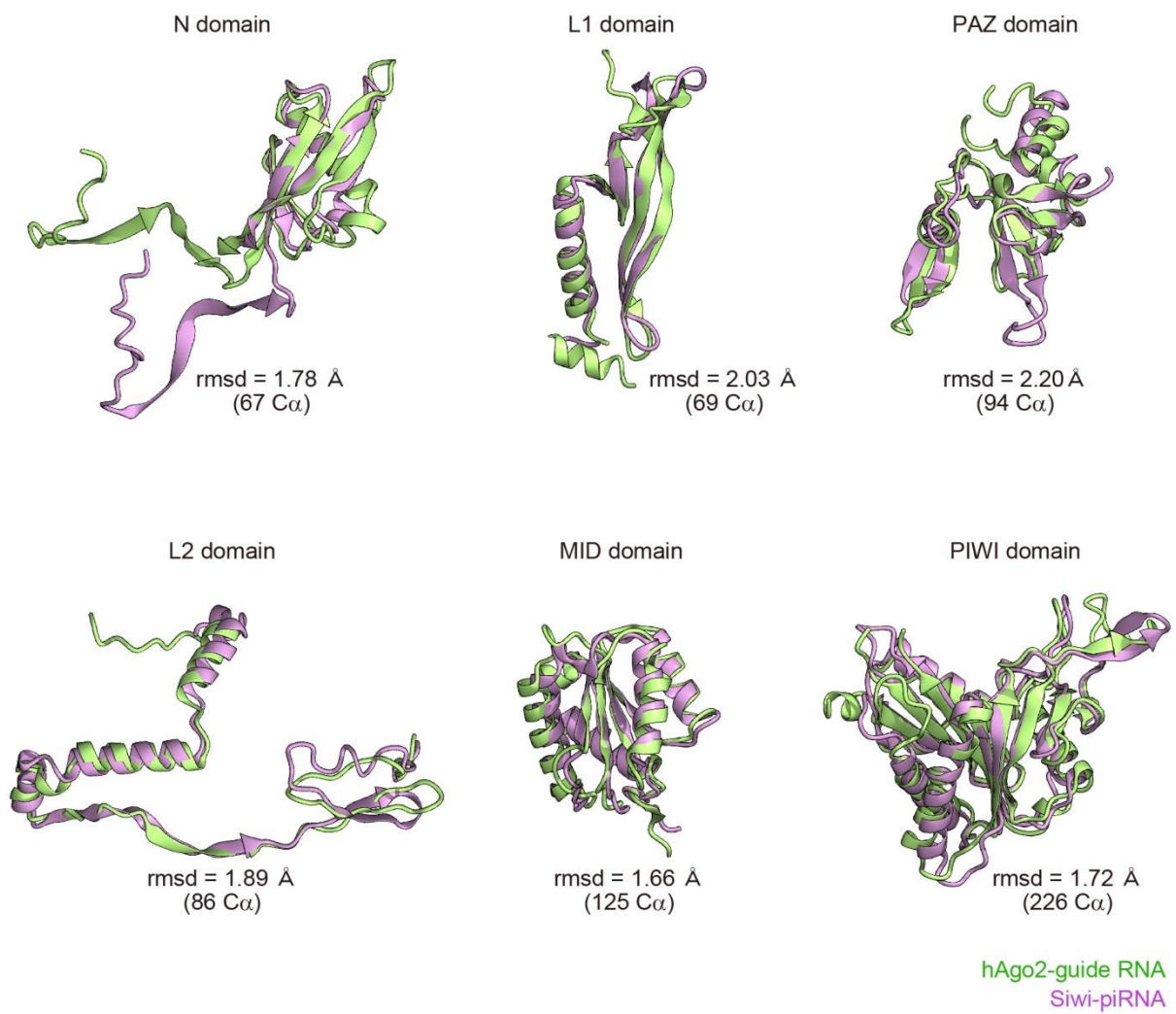


図 2-22 各ドメインの構造比較

hAgo2 (薄紫色) と Siwi (薄緑色) の各ドメインについて重ね合わせを行った。概ねよく重なったことがわかる。

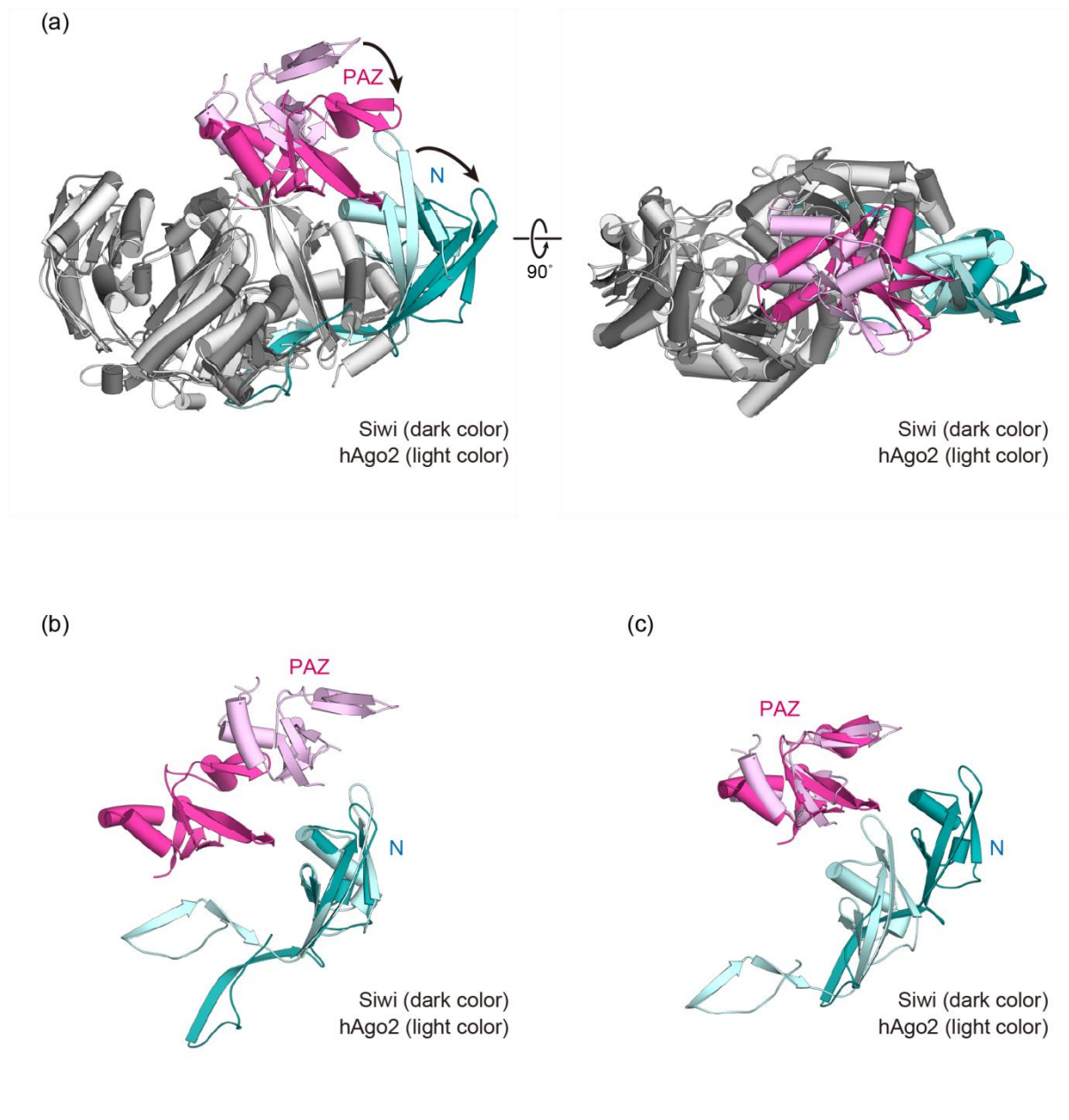


図 2-23 全体構造の比較

(a) Siwi と hAgo2 の全体構造比較。Siwi を濃色で、hAgo2 を淡色で表示した。L1/L2/MID/PIWI ドメインはよく重なったのに対して、N/PAZ ドメインについては大きな配向の差異がみられた。N ドメイン、PAZ ドメインはコア領域に対してそれぞれ 35° 分子外側、 40° 分子内側に向いた配置をしていた。

(b, c) Siwi と hAgo2 の N/PAZ ドメインのみをとりだして N ドメイン (b)、PAZ ドメイン (c) について重ね合わせを行った。

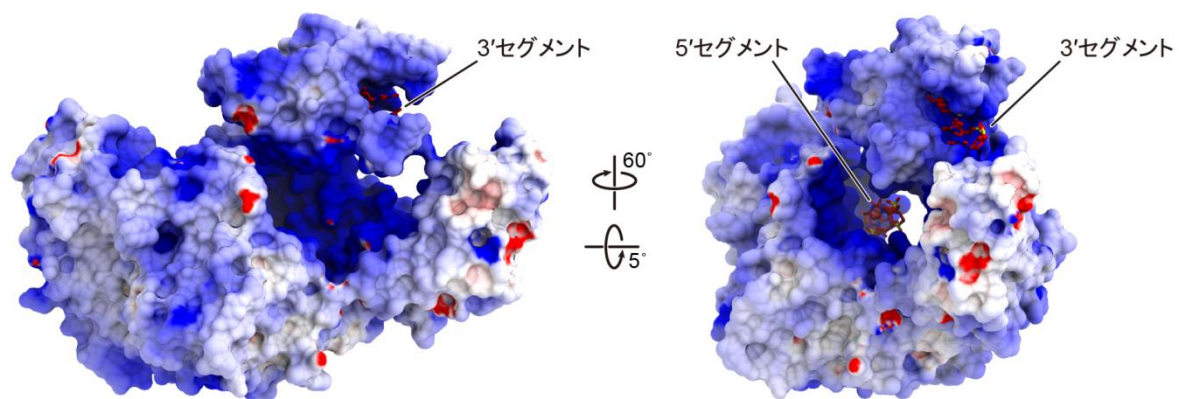
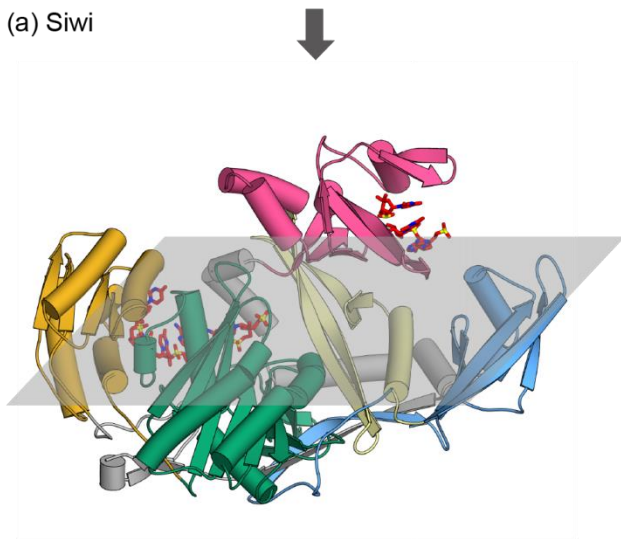
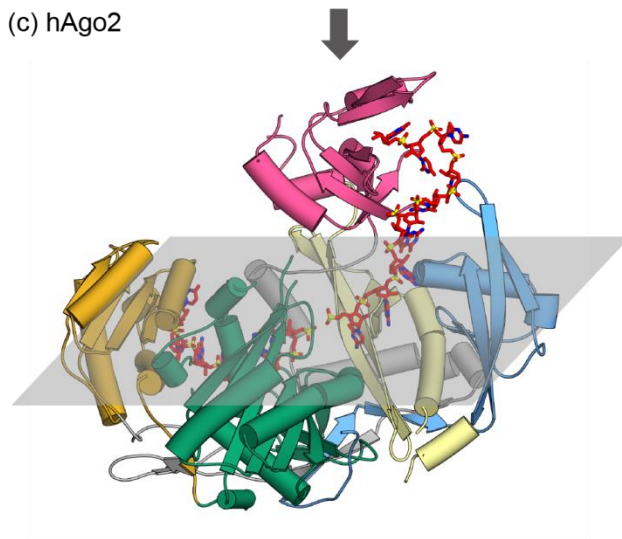


図 2-24 正電荷を帯びた核酸結合チャネル
Siwi の表面電荷. -10 kT/e (赤) $\sim 10 \text{ kT/e}$ (青) のグラデーションにて着色した.

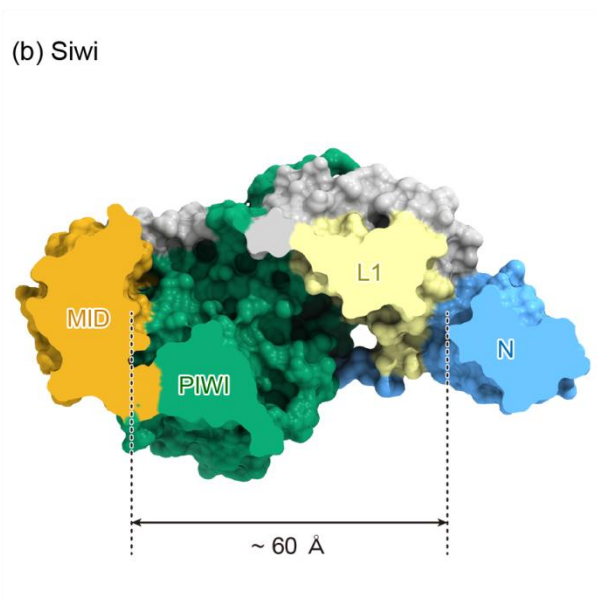
(a) Siwi



(c) hAgo2



(b) Siwi



(d) hAgo2

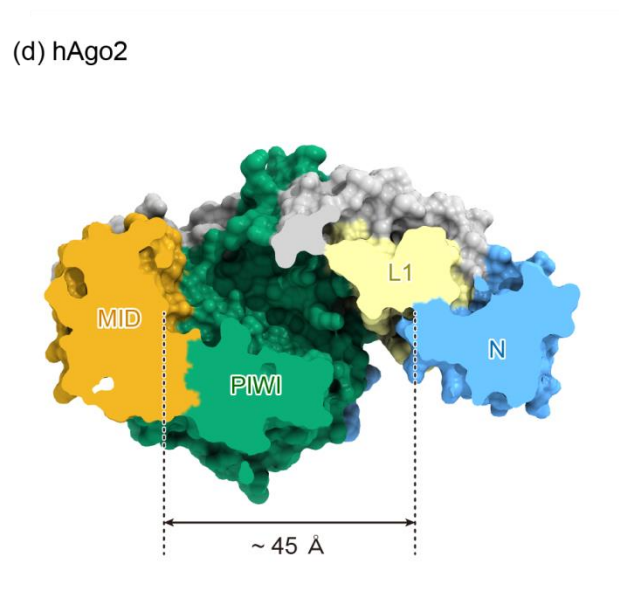


図 2-25 伸長した核酸結合チャネル

(a, b) Siwi の核酸結合チャネル. (a) の灰色で示した面で分子を切断し, 分子上側から見た図を (b) に示した.
(c, d) hAgo2 の核酸結合チャネル. (c) の灰色で示した面で分子を切断し, 分子上側から見た図を (d) に示した.

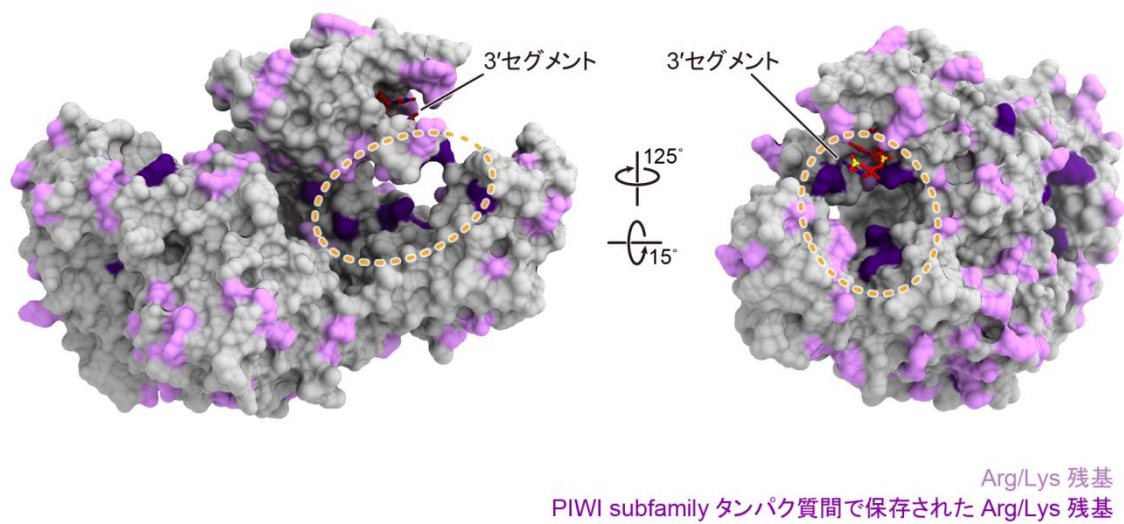
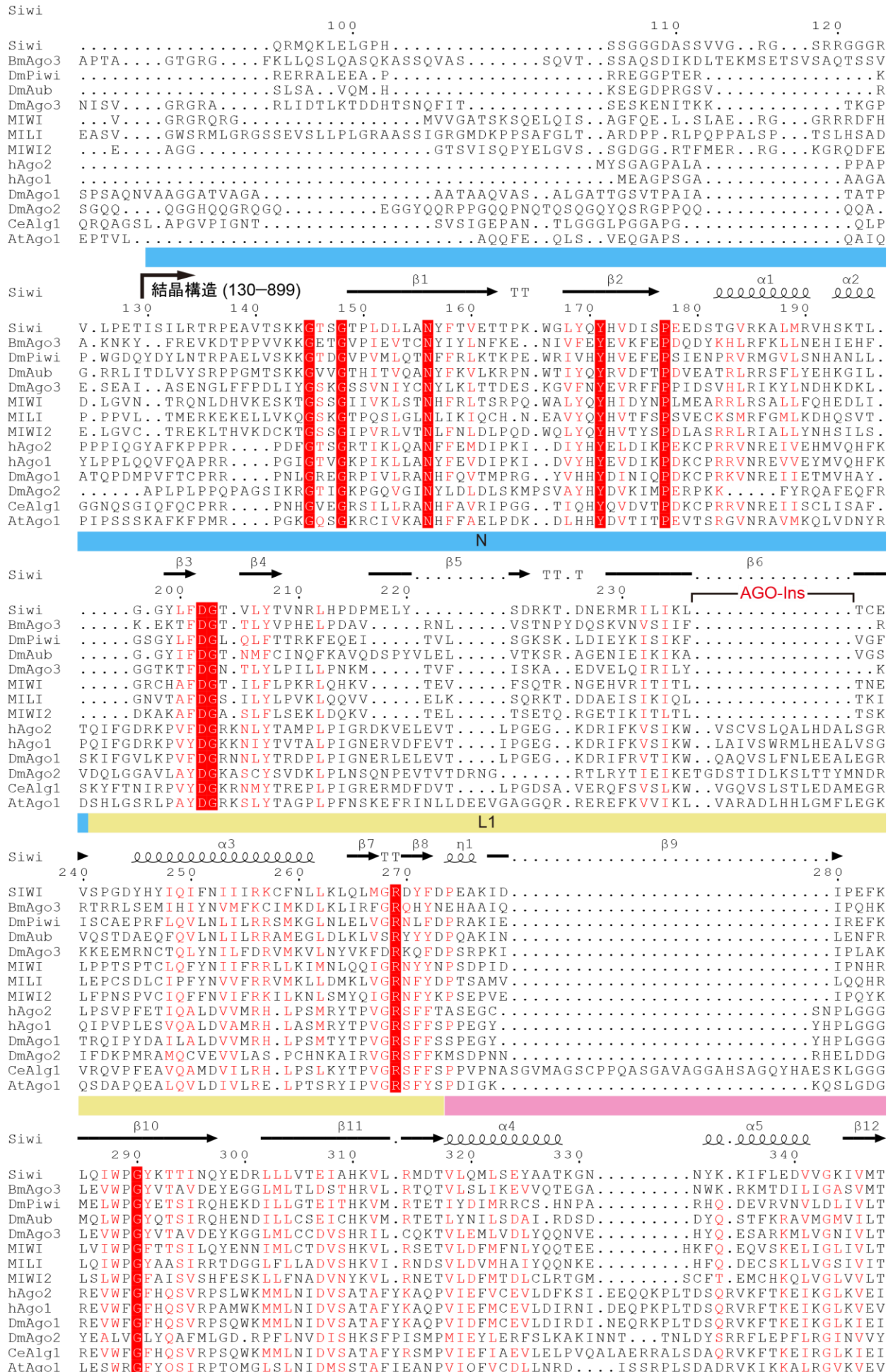


図 2-26 Arg/Lys 残基

Arg/Lys 残基を薄紫色で、Arg/Lys 残基のなかでも PIWI subfamily タンパク質間で保存されたものを濃紫色でそれぞれ Siwi の分子表面にプロットした。チャンネルの伸長した領域に複数保存された Arg/Lys 残基が見られた (オレンジの点線円で示した領域)。





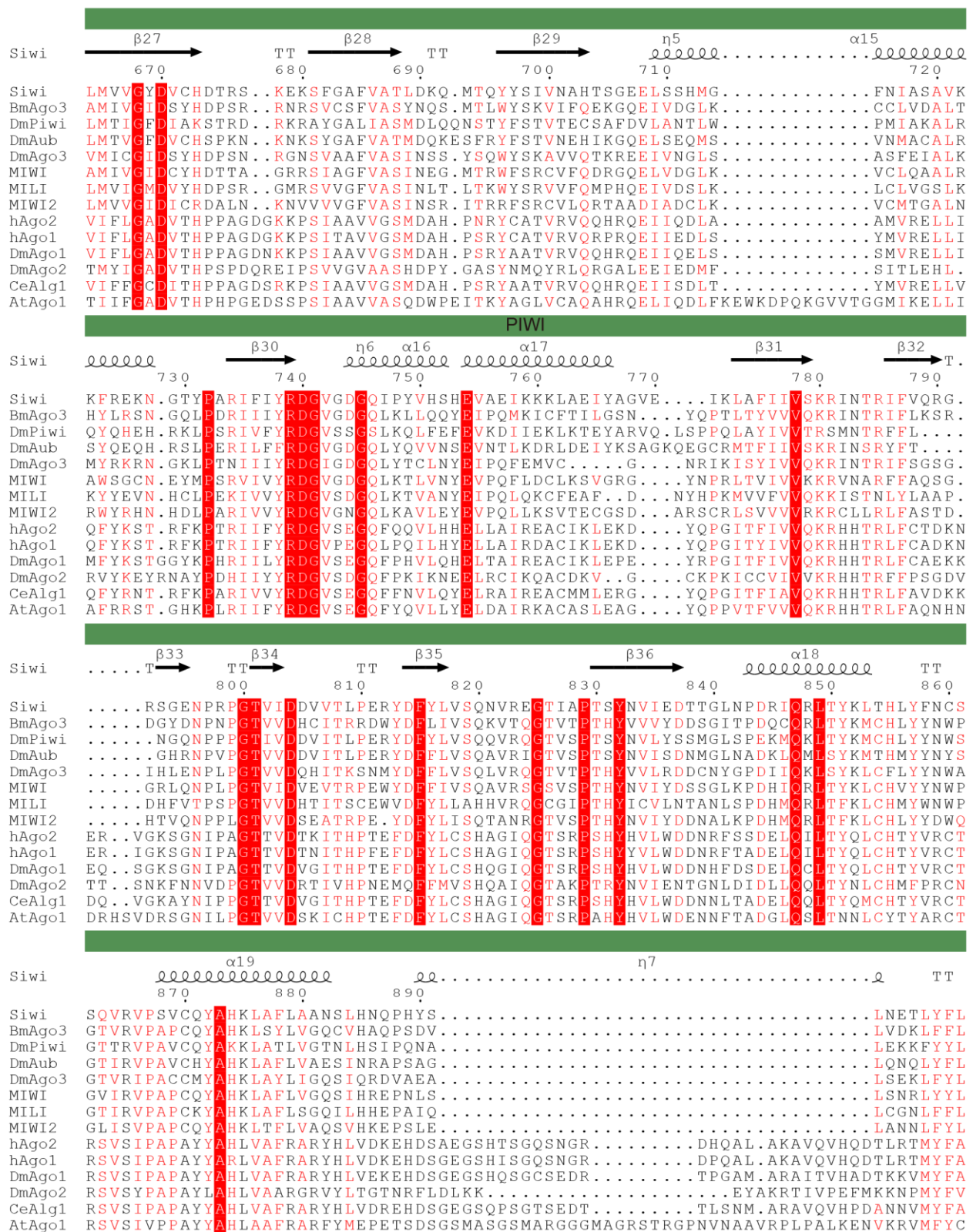


図 2-27 真核生物由来 Argonaute のアミノ酸一次配列アラインメント

PIWI subfamily タンパク質および AGO subfamily タンパク質の一次配列アラインメントを示した。特徴的な AGO-Ins, nucleotide specificity loop をそれぞれ示した。(Ce : *Caenorhabditis elegans*, At : *Arabidopsis thaliana* を示す。)

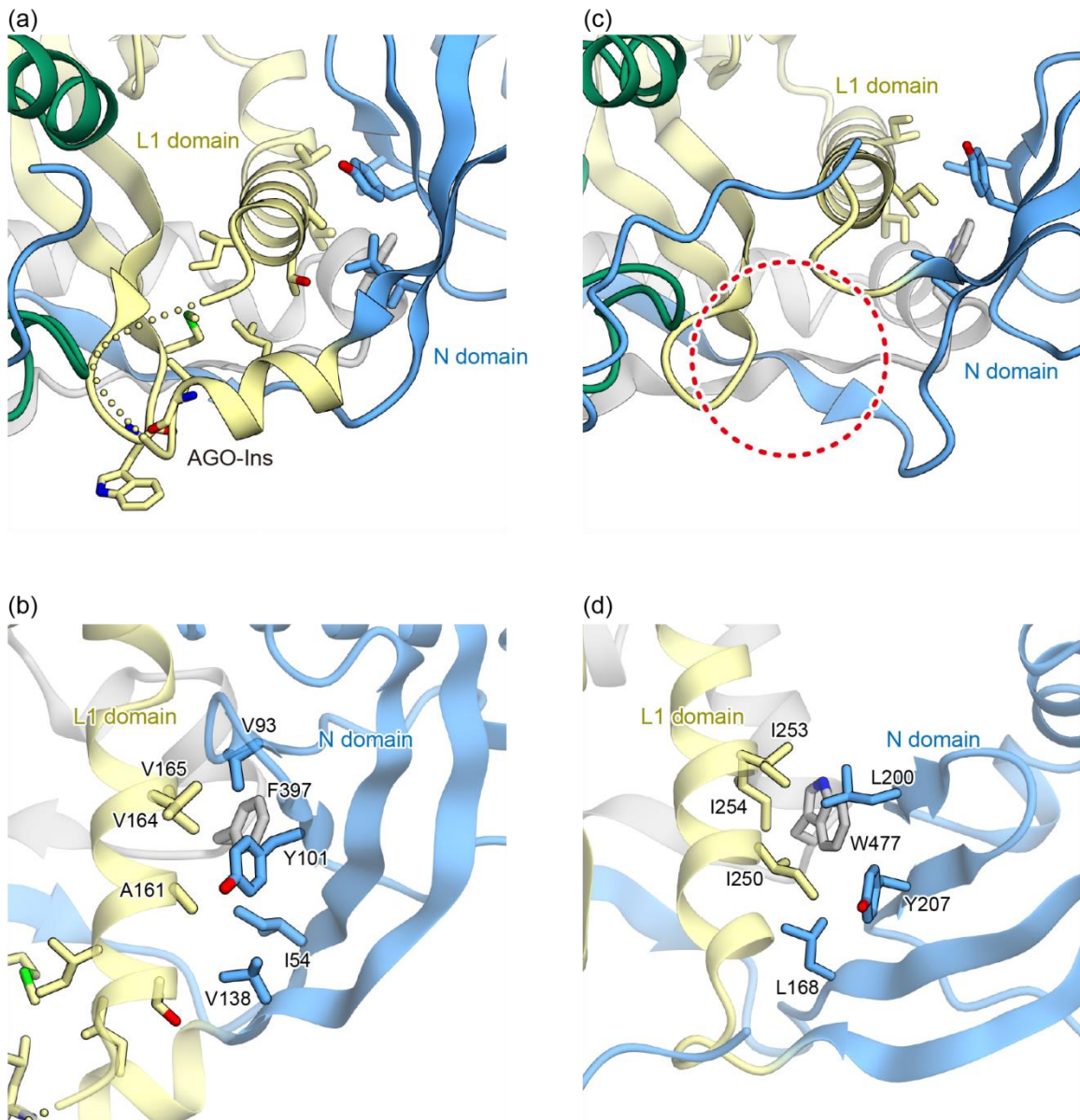


図 2-28 AGO-Ins が構造におよぼす影響

(a) hAgo2 での AGO-Ins を介した L1 ドメイン内の疎水性相互作用.

(b) hAgo2 での N ドメイン -L1 ドメイン間の疎水性相互作用.

(c) Siwi では AGO-Ins (赤点線円) を介した L1 ドメイン内の疎水性相互作用が失われていた.

(d) Siwi での N ドメイン -L1 ドメイン間の疎水性相互作用.

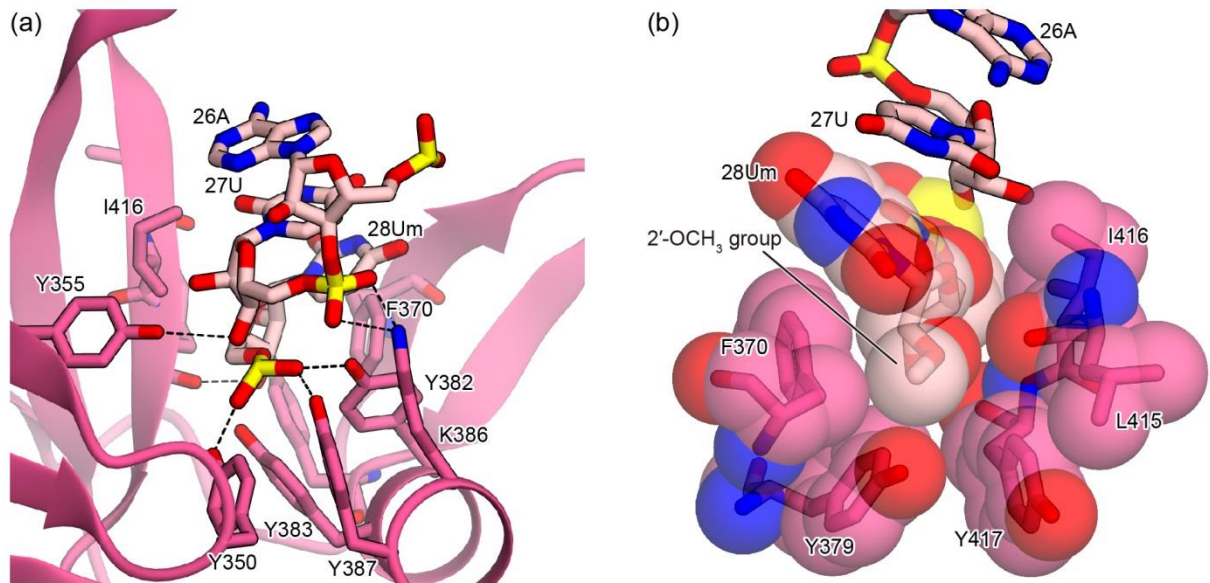


図 2-29 PAZ ドメインによる 3'セグメントの認識
 (a) ガイド鎖 RNA の 3'セグメント -PAZ ドメイン間の相互作用.
 (b) 3'末端 -2'-OCH₃ 基の疎水性ポケットによる認識.

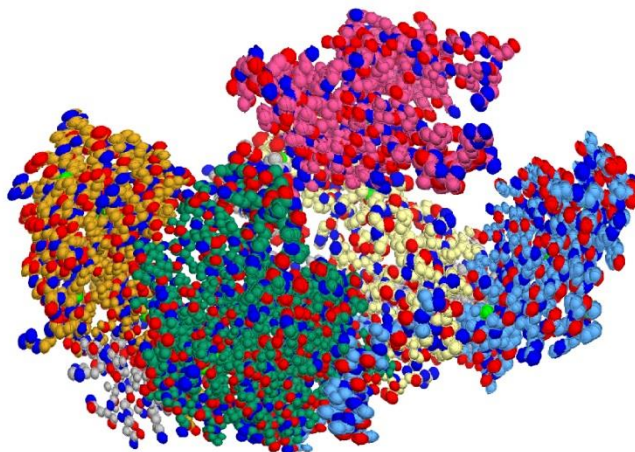


図 2-30 異方性温度因子
 Siwi の異方性温度因子を示した。 MID-PIWI ロープは異方性温度因子が低い一方、 PAZ ドメインは相対的に異方性温度因子が高い。

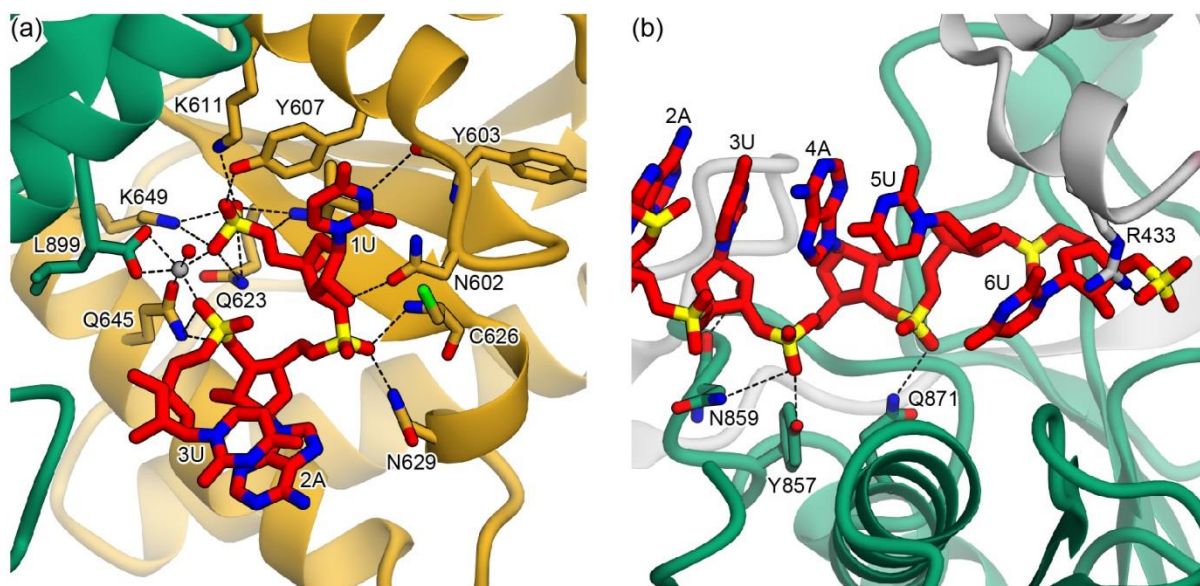
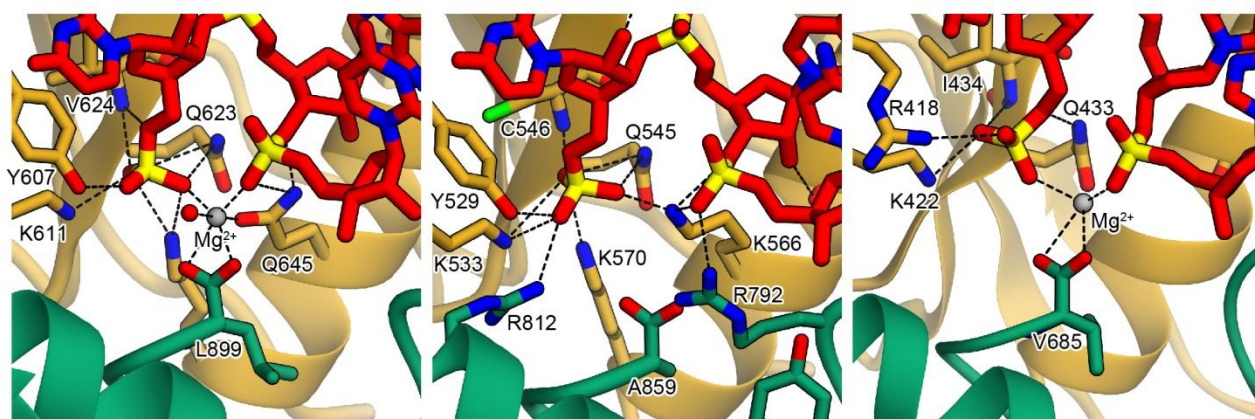


図 2-31 MID/PIWI ドメインと 5'セグメントの結合

(a) MID/PIWI ドメインの境界面が形成する核酸結合ポケットによる認識. 1 位のヌクレオチドはフリップアウトしポケットに収容されていた.

(b) PIWI ドメイン -5'セグメント間の相互作用.



Siwi- ガイド鎖 RNA

hAgo2- ガイド鎖 RNA
(PDB ID : 4W5N)

TtAgo- ガイド鎖 DNA
(PDB ID : 3DLH)

図 2-32 リン酸基の認識

Siwi, hAgo2, TtAgo によるガイド鎖 1 位, 3 位のリン酸基の認識. Siwi において赤色球は水分子を示す. Siwi, TtAgo ではマグネシウムイオンを介してリン酸基と結合していたのに対して, hAgo2 では Lys 残基を介して直接リン酸基と結合していた.

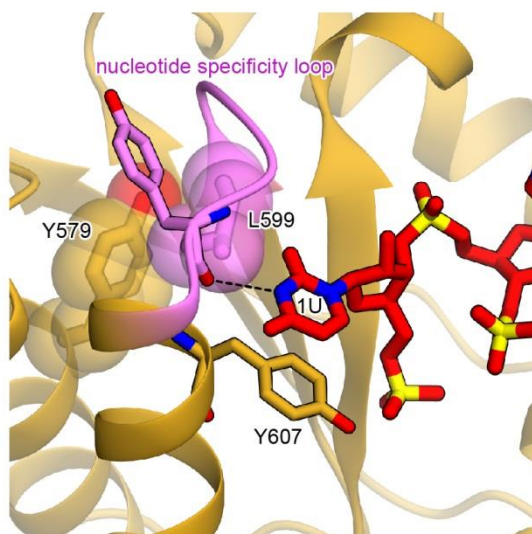
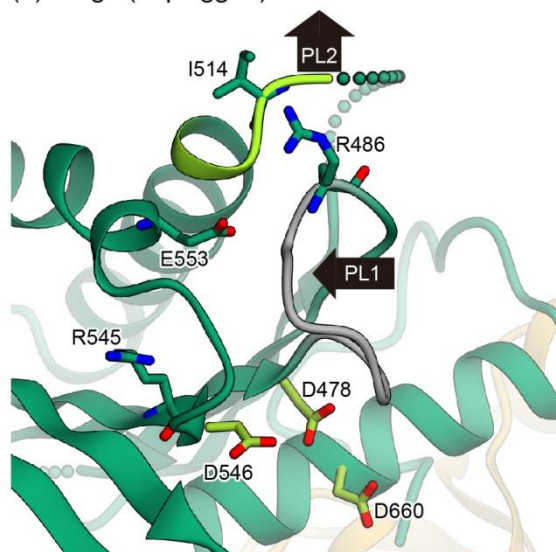


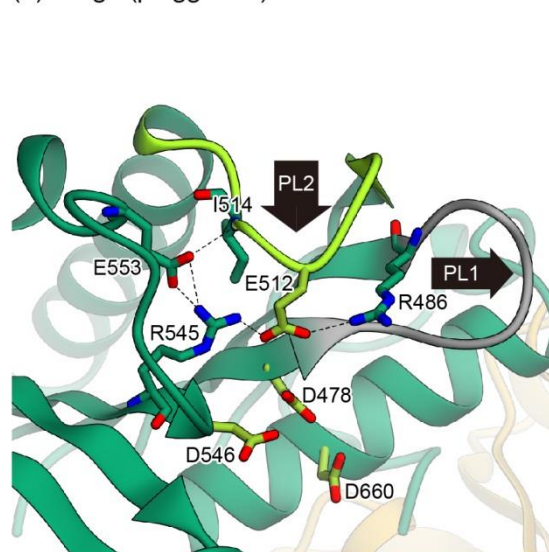
図 2-33 nucleotide specificity loop による g1U 認識

g1U は Tyr607 とのスタッキング相互作用を除いて、nucleotide specificity loop 内の主鎖カルボニル基とただひとつの水素結合を介して認識されていた。

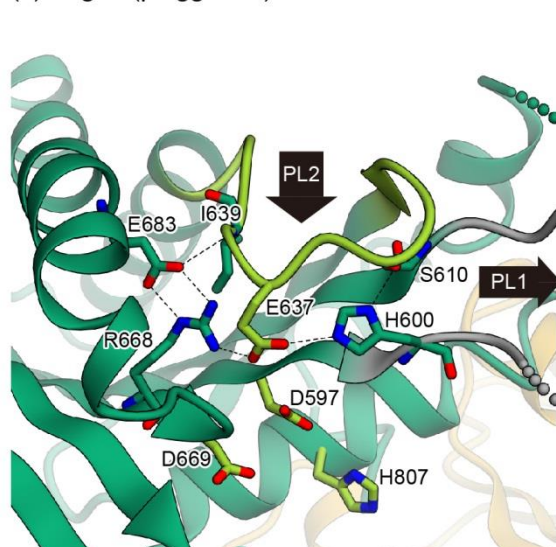
(a) TtAgo (unplugged)



(b) TtAgo (plugged-in)



(c) hAgo2 (plugged-in)



(d) Siwi (unplugged)

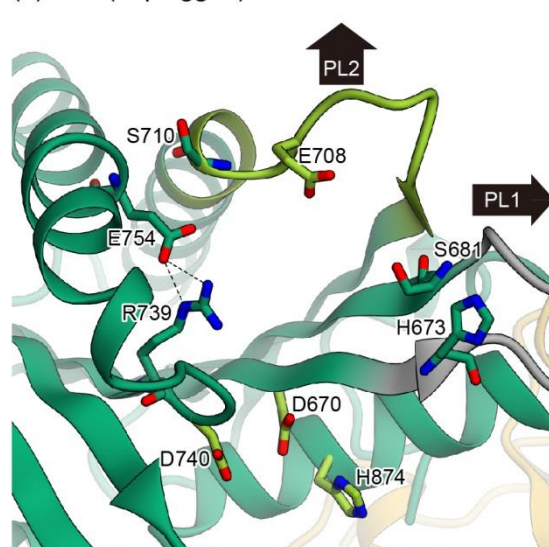


図 2-34 触媒テトラッド

(a) TtAgo- ガイド鎖 DNA 二者複合体 (PDB ID : 3DLH). 触媒テトラッドは形成されていない.

(b) TtAgo- ガイド鎖 DNA- 標的 RNA 三者複合体 (PDB ID : 3HJF). 標的 RNA の結合に呼応して触媒テトラッドが形成された.

(c) hAgo2- ガイド鎖 RNA 二者複合体 (PDB ID : 4W5N). 標的 RNA 非存在下でも触媒テトラッドが形成されていた.

(d) Siwi- ガイド鎖 RNA 二者複合体. PL1 ゲートは開いているが, PL2 は unplugged 状態であった.

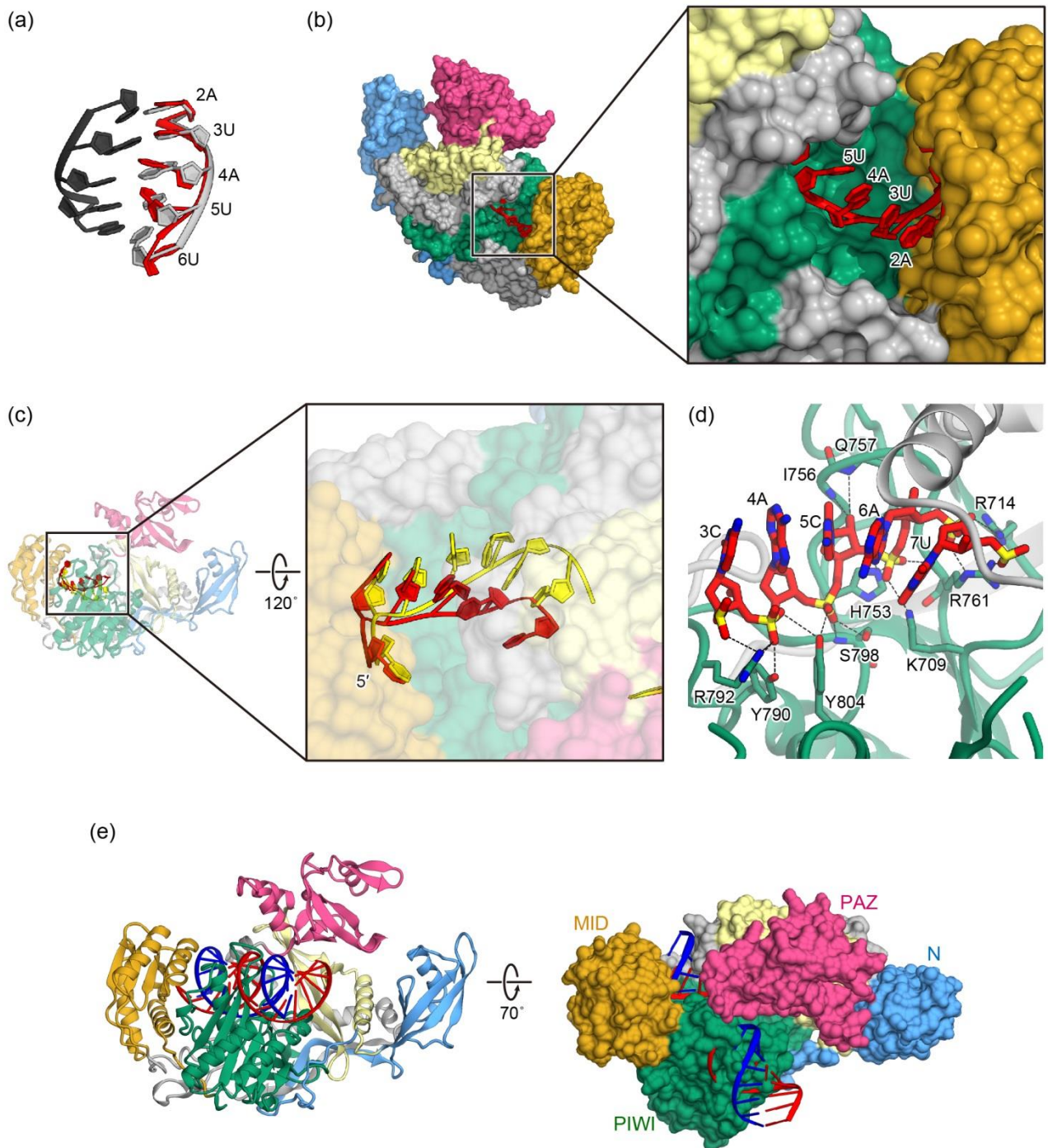


図 2-35 ガイド鎖 RNA の軌道

(a) Siwi に結合したガイド鎖 RNA の 2-6 位の軌道を赤で示した。理想的な A 型構造二本鎖 RNA を灰色、黒色で示した。

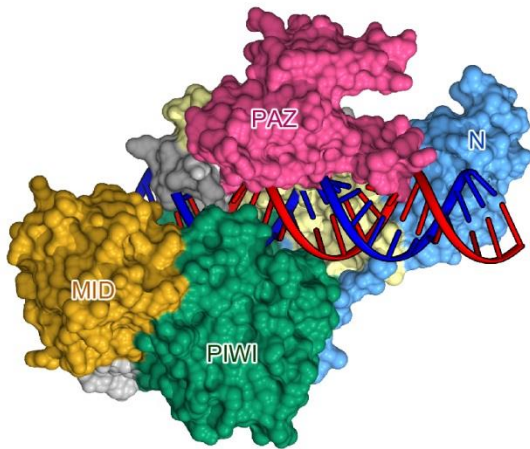
(b) Siwi に結合したガイド鎖 RNA のシード領域のうち 2-4 位が溶媒に露出していた。

(c) Siwi (赤), hAgo2 (黄) に結合したガイド鎖 RNA の軌道の重ね合わせ。

(d) hAgo2 の PIWI ドメインによるガイド鎖 RNA の 5'セグメントの認識。

(e) Siwi 結合型ガイド鎖 RNA の軌道に基づいてガイド鎖 RNA- 標的 RNA 結合モデルを作成した。ガイド鎖 RNA を赤色、標的 RNA を青色で示した。二本鎖 RNA は核酸結合チャネルから大きくはずれ、PIWI ドメインと立体障害を起こしていた。

(a)



(b)

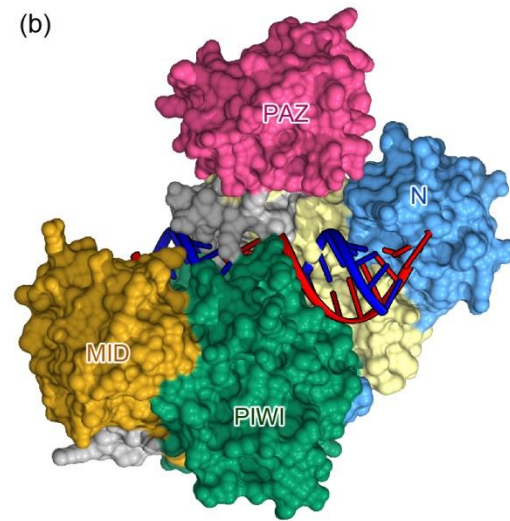
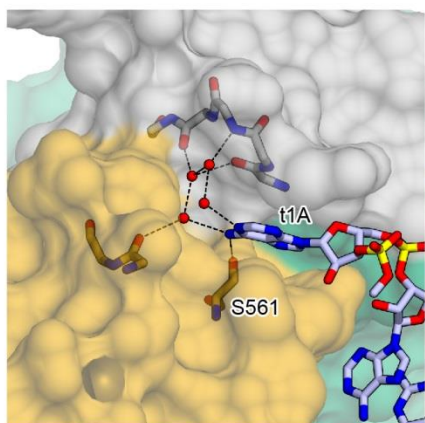


図 2-36 二本鎖 RNA 結合モデル

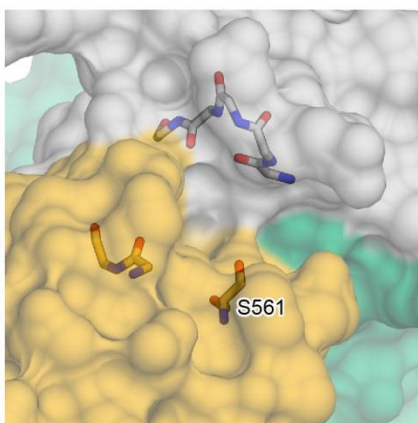
(a) Siwi- ガイド鎖 RNA- 標的 RNA (28 塩基対) 結合モデル.

(b) hAgo2- ガイド鎖 RNA- 標的 RNA (21 塩基対) 結合モデル.

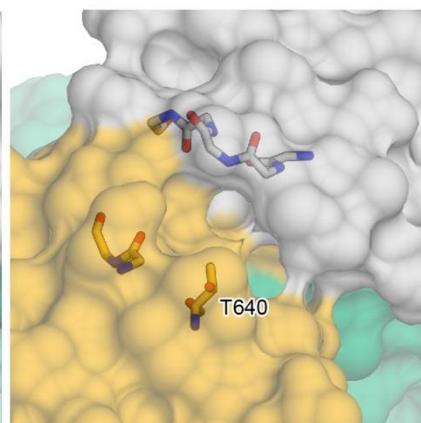
ともにガイド鎖 RNA を赤色, 標的 RNA を青色で示した.



hAgo2- ガイド鎖 RNA- 標的 RNA
(PDB ID : 4W5O)



hAgo2- ガイド鎖 RNA
(PDB ID : 4W5N)



Siwi- ガイド鎖 RNA

図 2-37 Argonaute の t1A 結合ポケット

hAgo2 三者複合体, hAgo2 二者複合体, Siwi 二者複合体の t1A 結合ポケットをそれぞれ示した。赤色球は水分子を示す。
hAgo2 三者複合体において主に水分子を介した水素結合ネットワークにより t1A が認識されていた。

総括

本研究では 2 つの piRNA 経路因子に着目し、それらの piRNA 経路における生理機能を解明すべく、X 線結晶構造解析および機能解析を行った。

第一章では多機能タンパク質 Mael について X 線結晶構造解析を行い、ショウジョウバエ由来 MAEL ドメインの立体構造を分解能 1.6 Å で決定した。これまでに立体構造が決定されているタンパク質と構造比較することで MAEL ドメインは RNase H 様フォールドをとるものの、DEDDh モチーフなどの既知の触媒残基を失っていることを明らかにした。さらに高純度に精製したタンパク質を用いて生化学的解析を行った結果、予想外に MAEL ドメインは一本鎖 RNA 切断活性を示すことを明らかにした。また、グアニン残基に対して切断嗜好性を示すことや、RNA 切断活性が種を越えて保存されていることなども明らかにした。ショウジョウバエ卵巢体細胞由来培養細胞 OSC を用いた細胞生物学的解析によって、OSC におけるトランスポゾン抑制には Mael の RNA 切断活性は関与していない可能性が示唆された。これらの結果をうけて Mael の piRNA 経路における役割を考察し、そのモデルを提唱した。さらに未だ同定できていない MAEL ドメインの触媒残基について active site switch model の可能性を論じた。

第二章では中核因子 PIWI タンパク質について X 線結晶構造解析による構造決定を目指した。そのために成体マウス精巣からの MIWI 精製系およびカイコ卵巢生殖細胞由来培養細胞 BmN4 からの Siwi 精製系を構築した。どちらにおいても生殖細胞内在性 piRNA と結合した安定した状態で PIWI タンパク質を精製することに成功した。MIWI に関しては良質な結晶が得られなかったものの、高純度に精製したタンパク質を用いて生化学的解析を行い、スライサー活性を保有することを示した。Siwi に関しては良質な結晶を得ることができ、最終的に分解能 2.4 Å でその立体構造を決定した。Siwi は piRNA を含んでおり、結晶構造は piRISC として機能的なものを反映していた。Siwi と hAgo2 の構造比較から、N ドメインの配向が Argonaute の複数の機能に関与することが示唆された。今後、PIWI タンパク質の作動機構の全貌を解明するには、たとえば hAgo2 のように標的 RNA も含めた三者複合体の立体構造や PIWI タンパク質と相互作用因子との複合体構造などの決定が必要となる。本研究で得た知見を足がかりとしてそうした研究につなげていくことが次の検証課題となるだろう。

参考文献

1. Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 22–32 (2008).
2. Meister, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 447–459 (2013).
3. Swarts, D. C. *et al.* The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 743–753 (2014).
4. Lin, H. & Spradling, A. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **124**, 2463–2476 (1997).
5. Cox, D. N. *et al.* A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* **12**, 3715–3727 (1998).
6. Cox, D. N. *et al.* Piwi Encodes a Nucleoplasmic Factor Whose Activity Modulates the Number and Division Rate of Germline Stem Cells. *Development* **127**, 503–514 (2000).
7. Aravin, A. a. *et al.* Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* **11**, 1017–1027 (2001).
8. Vagin, V. V, Sigova, A., Li, C., Gvozdev, V. & Zamore, P. D. A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science* **313**, 320–324 (2006).
9. Kalmykova, A., Klenov, M. & Gvozdev, V. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2052–2059 (2005).
10. Aravin, A. *et al.* The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Dev. Cell* **5**, 337–350 (2003).
11. Saito, K. *et al.* Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* **20**, 2214–2222 (2006).
12. Brennecke, J. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089–1093 (2007).
13. Gunawardane, L. S. *et al.* A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* **315**, 1587–90 (2007).
14. Aravin, A. *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203–207 (2006).

15. Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. & Carmell, M. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **442**, 199–202 (2006).
16. Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z. & Lin, H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* **20**, 1709–1714 (2006).
17. Lau, N. *et al.* Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* **313**, 363–367 (2006).
18. Aravin, A. *et al.* A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to De Novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* **31**, 785–799 (2008).
19. Houwing, S. *et al.* A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish. *Cell* **129**, 69–82 (2007).
20. Malone, C. D. & Hannon, G. J. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* **136**, 656–68 (2009).
21. Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. & Aravin, A. a. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 246–58 (2011).
22. Ishizu, H., Siomi, H. & Siomi, M. C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev.* **26**, 2361–73 (2012).
23. Luteijn, M. J. & Ketting, R. F. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 523–34 (2013).
24. Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C. & Siomi, H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 405–433 (2015).
25. Malone, C. D. *et al.* Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* **137**, 522–35 (2009).
26. Nishimasu, H. *et al.* Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* **491**, 284–7 (2012).
27. Ipsaro, J. J., Haase, A. D., Knott, S. R., Joshua-Tor, L. & Hannon, G. J. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* **491**, 279–83 (2012).
28. Han, B. W., Wang, W., Li, C., Weng, Z. & Zamore, P. D. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. *Science* **348**, 817–821 (2015).
29. Mohn, F., Handler, D. & Brennecke, J. piRNA-guide slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phase piRNA biogenesis. *Science* **348**, 812–817 (2015).
30. Li, C. *et al.* Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* **137**, 509–21 (2009).
31. Sienski, G., Dönertas, D. & Brennecke, J. Transcriptional silencing of transposons by

- Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* **151**, 964–80 (2012).
32. Wang, S. H. & Elgin, S. C. R. Drosophila Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21164–9 (2011).
 33. Le Thomas, A. *et al.* Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes Dev.* **27**, 390–9 (2013).
 34. Rozhkov, N. V., Hammell, M. & Hannon, G. J. Multiple roles for Piwi in silencing Drosophila transposons. *Genes Dev.* **27**, 400–412 (2013).
 35. Clegg, N. J. *et al.* maelstrom is required for an early step in the establishment of Drosophila oocyte polarity: posterior localization of grk mRNA. *Development* **124**, 4661–71 (1997).
 36. Clegg, N., Findley, S., Mahowald, A. & Ruohola-Baker, H. maelstrom is required to position the MTOC in stage 2–6 Drosophila oocytes. *Dev. Genes Evol.* **211**, 44–48 (2001).
 37. Pek, J. W., Lim, A. K. & Kai, T. Drosophila maelstrom ensures proper germline stem cell lineage differentiation by repressing microRNA-7. *Dev. Cell* **17**, 417–24 (2009).
 38. Sato, K., Nishida, K. M., Shibuya, A., Siomi, M. C. & Siomi, H. Maelstrom coordinates microtubule organization during Drosophila oogenesis through interaction with components of the MTOC. *Genes Dev.* **25**, 2361–2373 (2011).
 39. Pek, J. W., Ng, B. F. & Kai, T. Polo-mediated phosphorylation of Maelstrom regulates oocyte determination during oogenesis in Drosophila. *Development* **139**, 4505–13 (2012).
 40. Malarkey, C. S. & Churchill, M. E. a. The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 553–62 (2012).
 41. Genzor, P. & Bortvin, A. A Unique HMG-Box Domain of Mouse Maelstrom Binds Structured RNA but Not Double Stranded DNA. *PLoS One* **10**, e0120268 (2015).
 42. Zhang, D., Xiong, H., Shan, J., Xia, X. & Trudeau, V. L. Functional insight into Maelstrom in the germline piRNA pathway: a unique domain homologous to the DnaQ-H 3'-5' exonuclease, its lineage-specific expansion/loss and evolutionarily active site switch. *Biol. Direct* **3**, 48 (2008).
 43. Lim, A. K. & Kai, T. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6714–6719 (2007).
 44. Findley, S. D., Tmanaha, M., Clegg, N. & Ruohola-Baker, H. Maelstrom, a Drosophila spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1

- homolog, Aubergine, in nuage. *Development* **130**, 859–871 (2003).
45. Soper, S. F. C. *et al.* Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Dev. Cell* **15**, 285–97 (2008).
 46. Aravin, A. A. *et al.* Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS Genet.* **5**, e1000764 (2009).
 47. Castañeda, J. *et al.* Reduced pachytene piRNAs and translation underlie spermiogenic arrest in Maelstrom mutant mice. *EMBO J.* 1–21 (2014). doi:10.15252/embj.201386855
 48. Otwinowski, Z. & Minor, W. Macromolecular Crystallography Part A. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 (1997).
 49. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
 50. Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A.* **64**, 112–22 (2008).
 51. Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. & Paciorek, W. Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 2023–2030 (2003).
 52. Terwilliger, T. C. Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 38–44 (2003).
 53. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
 54. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948–1954 (2002).
 55. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with *MOLREP*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
 56. Niki, Y., Yamaguchi, T. & Mahowald, A. P. Establishment of stable cell lines of *Drosophila* germ-line stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16325–30 (2006).
 57. Saito, K. *et al.* A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature* **461**, 1296–9 (2009).
 58. Saito, K. *et al.* Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* **24**, 2493–8 (2010).
 59. Majorek, K. A. *et al.* The RNase H-like superfamily: new members, comparative structural analysis and evolutionary classification. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4160–79 (2014).
 60. Holm, L. & Rosenström, P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids*

- Res.* **38**, W545–9 (2010).
61. Jiang, X. *et al.* Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression. *J. Biol. Chem.* **288**, 16949–59 (2013).
 62. Martínez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., García-Sastre, A. & de la Torre, J. C. Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J. Virol.* **81**, 12696–703 (2007).
 63. Qi, X. *et al.* Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**, 779–83 (2010).
 64. Hastie, K. M., Kimberlin, C. R., Zandonatti, M. a, MacRae, I. J. & Saphire, E. O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2396–401 (2011).
 65. Zuo, Y., Deutscher, M. P. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1017–1026 (2001).
 66. Hastie, K. M., King, L. B., Zandonatti, M. a & Saphire, E. O. Structural basis for the dsRNA specificity of the Lassa virus NP exonuclease. *PLoS One* **7**, e44211 (2012).
 67. Pace, C. N., Heinemann, U., Hahn, U. & Saenger, W. Ribonuclease T1: structure, function, and stability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343–360 (1991).
 68. Muerdter, F. *et al.* A genome-wide RNAi screen draws a genetic framework for transposon control and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Mol. Cell* **50**, 736–48 (2013).
 69. Handler, D. *et al.* The genetic makeup of the *Drosophila* piRNA pathway. *Mol. Cell* **50**, 762–77 (2013).
 70. Dönertas, D., Sienski, G. & Brennecke, J. *Drosophila* Gtsf1 is an essential component of the Piwi-mediated transcriptional silencing complex. *Genes Dev.* **27**, 1693–705 (2013).
 71. Ohtani, H. *et al.* DmGTSF1 is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the *Drosophila* ovary. *Genes Dev.* **27**, 1656–61 (2013).
 72. Sugiyama, T. *et al.* SHREC, an effector complex for heterochromatic transcriptional silencing. *Cell* **128**, 491–504 (2007).
 73. Yamane, K. *et al.* Asf1/HIRA facilitate global histone deacetylation and associate with HP1 to promote nucleosome occupancy at heterochromatic loci. *Mol. Cell* **41**, 56–66 (2011).
 74. Reyes-Turcu, F. E. & Grewal, S. I. S. Different means, same end-heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast.

- Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 156–63 (2012).
75. Reuter, M. *et al.* Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* **480**, 264–7 (2011).
 76. Chen, K. *et al.* Metazoan Maelstrom is an RNA-binding protein that has evolved from an ancient nuclease active in protists. *RNA* 1–7 (2015). doi:10.1261/rna.049437.114.
 77. Bohmert, K. *et al.* AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* **17**, 170–80 (1998).
 78. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
 79. Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. & Sharp, P. A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* **13**, 3191–7 (1999).
 80. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. a & Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33 (2000).
 81. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296 (2000).
 82. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, a., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877–6888 (2001).
 83. Elbashir, S. M. *et al.* RNA interference is mediated 1- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188–200 (2001).
 84. Nykänen, A., Haley, B. & Zamore, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**, 309–321 (2001).
 85. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. & Hannon, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146–50 (2001).
 86. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563–574 (2002).
 87. Martinez, J. & Tuschl, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* **18**, 975–80 (2004).
 88. Liu, J. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437–1441 (2004).
 89. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139 (2009).

90. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–88 (2013).
91. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
92. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D68–D73 (2014).
93. Han, J. *et al.* Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).
94. Auyeung, V. C., Ulitsky, I., McGeary, S. E. & Bartel, D. P. Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell* **152**, 844–858 (2013).
95. Nguyen, T. A. *et al.* Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* **161**, 1374–1387 (2015).
96. Park, J.-E. *et al.* Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* **475**, 201–205 (2011).
97. Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H. & Tomari, Y. Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1153–1158 (2011).
98. Kawamata, T. & Tomari, Y. Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 368–376 (2010).
99. Kobayashi, H. & Tomari, Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* (2015). doi:10.1016/j.bbagr.2015.08.007
100. Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 94–108 (2009).
101. Hirakata, S. & Siomi, M. C. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* (2015). doi:10.1016/j.bbagr.2015.09.002
102. Kawaoka, S., Izumi, N., Katsuma, S. & Tomari, Y. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. *Mol. Cell* **43**, 1015–22 (2011).
103. Kirino, Y. & Mourelatos, Z. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA* **13**, 1397–1401 (2007).
104. Horwich, M. D. *et al.* The Drosophila RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Curr. Biol.* **17**, 1265–1272 (2007).
105. Saito, K. *et al.* Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* **21**, 1603–1608 (2007).

106. Kwak, P. B. & Tomari, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 145–151 (2012).
107. Schürmann, N., Trabuco, L. G., Bender, C., Russell, R. B. & Grimm, D. Molecular dissection of human Argonaute proteins by DNA shuffling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 818–26 (2013).
108. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
109. Iwakawa, H. & Tomari, Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* **25**, 651–665 (2015).
110. Kirino, Y. *et al.* Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat. Cell Biol.* **11**, 652–658 (2009).
111. Nishida, K. M. *et al.* Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *EMBO J* **28**, 3820–3831 (2009).
112. Siomi, M. C., Mannen, T. & Siomi, H. How does the Royal Family of Tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway? *Genes Dev.* **24**, 636–646 (2010).
113. Song, J., Smith, S. K. & Hannon, G. J. Crystal Structure of Argonaute Slicer Activity. *Science* **305**, 1434–1441 (2004).
114. 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).
115. Yuan, Y. R. *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).
116. Rashid, U. J. *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).
117. Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T. & Patel, D. J. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456**, 209–213 (2008).
118. Wang, Y. *et al.* Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* **456**, 921–926 (2008).
119. Wang, Y. *et al.* Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**, 754–761 (2009).
120. Sheng, G. *et al.* Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 6–11 (2013). doi:10.1073/pnas.1321032111
121. Ma, J.-B. *et al.* Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A.

- fulgidus Piwi protein. *Nature* **434**, 666–670 (2005).
122. 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).
 123. Parker, J. S., Parizotto, E. A., Wang, M., Roe, S. M. & Barford, D. Enhancement of the Seed-Target Recognition Step in RNA Silencing by a PIWI/MID Domain Protein. *Mol. Cell* **33**, 204–214 (2009).
 124. Parker, J. S. How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* **1**, 3 (2010).
 125. Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* **426**, 465–469 (2003).
 126. Yan, K. S. *et al.* Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* **426**, 468–474 (2003).
 127. Song, J.-J. *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).
 128. 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).
 129. Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 576–577 (2004).
 130. 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).
 131. Boland, A., Tritschler, F., Heimstädt, S., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep.* **11**, 522–527 (2010).
 132. Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10466–10471 (2011).
 133. Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N. & Nagar, B. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.* **31**, 3588–3595 (2012).
 134. Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P. & Patel, D. J. Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* **486**, 368–74 (2012).
 135. Schirle, N. T. & Macrae, I. J. The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science* **336**, 1037–1040 (2012).
 136. Elkayam, E. *et al.* The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell* **150**, 100–110 (2012).
 137. Nakanishi, K. *et al.* Eukaryote-specific insertion elements control human ARGONAUTE slicer activity. *Cell Rep.* **3**, 1893–900 (2013).

138. Faehnle, C. R., Elkayam, E., Haase, A. D., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1. *Cell Rep.* **3**, 1901–1909 (2013).
139. Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J. & MacRae, I. J. Structural basis for microRNA targeting. *Science* **346**, 608–613 (2014).
140. Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J., Chandradoss, S., Joo, C. & MacRae, I. J. Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets. *Elife* **1**, 1689–1699 (2015).
141. Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J.-B. & Patel, D. J. Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 903–910 (2011).
142. Simon, B. *et al.* Recognition of 2'-o-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure* **19**, 172–180 (2011).
143. Cora, E. *et al.* The MID-PIWI module of Piwi proteins specifies nucleotide- and strand-biases of piRNAs. *RNA* **20**, 773–81 (2014).
144. Kawaoka, S. *et al.* The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA* **15**, 1258–64 (2009).
145. Hirano, T., Iwasaki, Y. W., Lin, Z. Y. & Imamura, M. adult testes of the common marmoset , a model primate Small RNA profiling and characterization of piRNA clusters in the adult testes of the common marmoset , a model primate. *RNA* **20**, 1–15 (2014).
146. Nishida, K. M. *et al.* Respective Functions of Two Distinct Siwi Complexes Assembled during PIWI-Interacting RNA Biogenesis in Bombyx Germ Cells. *Cell Rep.* **10**, 1–11 (2014).
147. Walter, T. S. *et al.* Lysine Methylation as a Routine Rescue Strategy for Protein Crystallization. *Structure* **14**, 1617–1622 (2006).
148. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214 (2013).
149. Terwilliger, T. C. Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **56**, 965–972 (2000).
150. Dong, A. *et al.* In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nat. Methods* **4**, 1019–1021 (2007).
151. Suzuki, H. I. *et al.* Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 512–521 (2015).
152. Mi, S. *et al.* Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* **133**, 116–127 (2008).
153. Wang, W. *et al.* The Initial Uridine of Primary piRNAs Does Not Create the Tenth

- Adenine that Is the Hallmark of Secondary piRNAs. *Mol. Cell* **56**, 708–716 (2014).
154. De Fazio, S. *et al.* The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* **480**, 259–263 (2011).
 155. Wang, Y. *et al.* Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* **456**, 921–926 (2008).
 156. Xiol, J. *et al.* RNA Clamping by Vasa Assembles a piRNA Amplifier Complex on Transposon Transcripts. *Cell* 1–14 (2014). doi:10.1016/j.cell.2014.05.018
 157. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
 158. Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2008).
 159. Grimson, A. *et al.* MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).

外部発表

発表論文

1) Naoki Matsumoto, Kaoru Sato, Hiroshi Nishimasu, Yurika Namba, Kana Miyakubi, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Haruhiko Siomi, Mikiko C. Siomi, Osamu Nureki

"Crystal Structure and Activity of the Endoribonuclease Domain of the piRNA Pathway Factor Maelstrom"

Cell Reports, 11, 366–75, April 21, 2015

2) Hiroshi Nishimasu, Hirotsugu Ishizu, Kuniaki Saito, Satoshi Fukuhara, Miha K. Kamatani, Luc Bonnefond, Naoki Matsumoto, Tomohiro Nishizawa, Keita Nakanaga, Junken Aoki, Ryuichiro Ishitani, Haruhiko Siomi, Mikiko C. Siomi, Osamu Nureki

"Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis"

Nature, 491, 284–287, Nov 8, 2012

学会発表

国際会議・シンポジウムにおける発表

1) Naoki Matsumoto, Hiroshi Nishimasu, Kaoru Sato, Ryuichiro Ishitani, Mikiko C. Siomi, Haruhiko Siomi, Osamu Nureki

"X-ray crystal structure of Maelstrom"

Keystone Symposia, Gene Silencing by Small RNAs (B1), ポスター発表 (257)

バンクーバー, カナダ, 2012 年 2 月

2) Naoki Matsumoto, Hiroshi Nishimasu, Kaoru Sato, Ryuichiro Ishitani, Haruhiko Siomi, Mikiko C. Siomi, Osamu Nureki

"X-ray crystal structure of Maelstrom"

RNA2013 The Eighteenth Annual Meeting of the RNA Society, ポスター発表 (245-C)

ダボス, スイス, 2013 年 6 月

国内学会・シンポジウムにおける発表

3) 松本 直樹, 西増 弘志, 佐藤 薫, 石谷 隆一郎, 塩見 春彦, 塩見 美喜子, 濡木 理

"piRNA 経路因子 Maelstrom の結晶構造"

第 14 回日本 RNA 学会年会, 口頭発表 (O-05)

仙台, 2012 年 7 月

4) 松本 直樹, 西増 弘志, 佐藤 薫, 西田 知訓, 石谷 隆一郎, 塩見 春彦, 塩見 美喜子, 濡木 理

"piRNA 経路因子 Maelstrom の構造機能解析"

第 36 回日本分子生物学会年会, ポスター発表 (1P-0065)

神戸, 2013 年 12 月

5) 松本 直樹, 佐藤 薫, 難波 祐里香, 宮首 佳奈, 堂前 直, 石谷 隆一郎, 塩見 春彦, 西増 弘志, 塩見 美喜子, 濡木 理

"piRNA 経路因子 Maelstrom の構造と機能"

第 37 回日本分子生物学会年会, ポスター発表 (1P-0050)

横浜, 2014 年 11 月

6) 松本直樹, 佐藤薫, 西増弘志, 難波祐里香, 石谷隆一郎, 塩見春彦, 塩見美喜子, 濡木理

"piRNA 経路因子 Maelstrom の構造機能解析"

第 17 回日本 RNA 学会年会, 口頭発表 (O-9)

札幌, 2015 年 7 月

謝辞

本研究は指導教官である濡木理博士の御指導ならびに御支援の下で行われたものです。濡木博士には研究生活において多くの助言を頂き、常に温かく見守り励ましていただきました、篤く感謝申し上げます。西増弘志博士には構造生物学に必要な知識・実験手法全般に関して熱心に指導していただき、また論文執筆に際して論文の書き方から懇切丁寧に指導していただきました、心よりの恩と感謝の念を抱いております。石谷隆一郎博士には研究方針や構造解析などにおいて多数の助言を頂きました、深く感謝致します。また、研究面で行き詰ったときのみならず日頃より有益な助言を頂きました西澤知宏博士に感謝申し上げます。中根崇智研究員には特に構造解析において貴重な助言を頂きました、感謝申し上げます。

第一章、第二章ともに東京大学 塩見美喜子博士、慶應大学 塩見春彦博士との共同研究として行われたものです。研究を遂行するにあたり塩見研究室に出入りすることもありましたが、両博士は私を温かく迎え入れていただき、研究生活において多くの貴重な助言を頂きました、深く感謝申し上げます。また研究面において多大な御協力ならびに御指導を頂きました塩見研究室の皆様には感謝申し上げます。中でも、第一章において OSC を用いたレスキューアッセイを行っていただいた佐藤薫博士、難波祐里香さん、宮首佳奈さんに深く感謝致します。また第一章の生化学的解析に関して有益な助言を下さいました石津大嗣博士に感謝致します。第二章においては特に抗 MARWI 抗体を提供していただき、かつ初期実験やスライサー活性測定を行っていただきました平野孝昌博士に深く感謝申し上げます。また第二章において抗 Siwi 抗体を提供していただき、BmN4 細胞の培養に関して多数の助言を下さいました西田知訓博士に深く感謝致します。

第一章において N 末端解析を行っていただいた理化学研究所 堂前直博士に深く感謝申し上げます。また本研究の X 線回折実験は放射光施設 SPring-8 BL32XU ならびに BL41XU にて行われたものです。データ取得や解析方法に関して様々な助言を頂きました平田邦生博士をはじめとするビームラインスタッフの皆様には篤く感謝申し上げます。

そして、濡木研究室の皆様には、研究生活において多大な御協力ならびに御指導御支

援を頂きました，深く感謝致します．学術支援専門職員の倉林亜理沙さんには実験面において，秘書の山崎利枝子さんには生活面において多大な御協力を頂きました，深く感謝申し上げます．また，濡木研究室のなかでも，学部時代からの同期である熊崎薫さんには日頃より多くの刺激をうけ，実りある研究生生活を送ることができました，感謝しております．

最後に私の 6 年にわたる研究生生活を終始温かく支援してくださいました家族に深く心より感謝致します．