

## 論文の内容の要旨

論文題目: ヒト microRNA 関連因子の結晶解析試料調製法の確立  
(Crystallographic sample preparation procedures of  
human microRNA-associated proteins)

氏名: 山下 征輔

### miRNA 経路の概略と本論文の構成

microRNA (miRNA)は 21~25 塩基の 1 本鎖 RNA であり、相補的な mRNA に結合してその発現を抑制する(図 1)。miRNA は前駆体として転写された後、Dicer などの酵素によるプロセッシングを経て Argonaute (Ago)に取り込まれる。Ago は取り込んだ miRNA によって標的 mRNA 上に移行し、TNRC6 タンパク質を介して翻訳抑制因子をリクルートする。この過程は複数のタンパク質や RNA が結合・解離する動的な反応であるが、経路を正しく進行させる分子基盤には不明な点が多い。結晶構造解析は複合体の結合様式やそれに伴う構造変換を直接観察できる手法であり、このような課題に対して有効な手段となりうる。私はヒト miRNA 経路の主要因子である hAgo2 をメインターゲットとして結晶化試料の調製に取り組み、その手法を確立させた。また Dicer、TRBP についても、それぞれ単体、および Dicer・TRBP 複合体での調製に成功した。このうち TRBP の N 末端側の二本鎖 RNA 結合ドメイン(double-stranded RNA-binding domain、dsRBD)の結

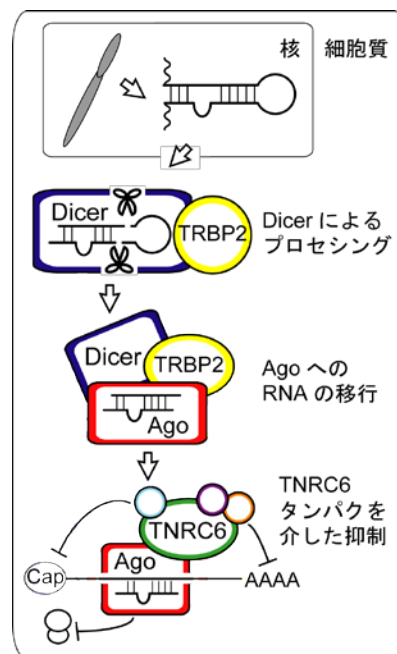


図 1. miRNA 経路の概略

miRNA は Argonaute と結合して、標的 mRNA の遺伝子発現を阻害する。

晶構造解析を行い、さらに全長および各ドメインについて生化学解析を行った。本論文ではこれらの成果を記す。

### hAgo2 の大量調製法の確立

hAgo2 全長について当初は単独での精製を試みていたが、以下の課題により精製試料を得ることができなかった。まず、発現したタンパク質の多くが可溶性の凝集を形成しており、単量体として存在する hAgo2 はごく一部であった。そのうえ、これらのタンパク質は培養細胞由来の RNA と強く結合しており、緩衝液による洗浄では除去することができなかった。カラムクロマトグラフィーにより、タンパク質と核酸を解離させるかあるいは核酸を含まないタンパク質試料のみを分離回収する必要があったが、それに取り組むためには hAgo2 試料が少ないという状況であった。

そこで Ago2 の発現量向上や安定化を期待して、相互作用するタンパク質との共発現を試みた。まず Ago2 と Dicer の 2 者共発現や Ago2 と Dicer、TRBP の 3 者共発現を行ったが全く改善が認められなかった。次に、TNRC6B タンパク質と共発現させたところ、hAgo2 の発現量が顕著に向上した(図 2)。同時に培養細胞由来のシャペロンタンパク質である Hsp90、Hsp70 の結合も大きく減少しており、複合体の構造解析を目指すにあたって良好な結果であると考えられた。

ただしこの共発現試料には、TNRC6B が hAgo2 よりも少ないモル数しか含まれていなかった。またゲル濾過クロマトグラフィーによる解析から、複合体が部分的に解離していることがわかった。そこで TNRC6B と hAgo2 を 1 本のポリペプチド、すなわち融合タンパク質として発現させた。融合タンパク質とすることで、2 つのタンパク質を同じモル比で発現させることができ、加えてポリペプチド鎖が分離することを防ぐことができる。融合タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーで解析し、大部分が溶液中で単量体として存在していることを確認した。

多くのタンパク質試料を得られるようになったため、RNA を含まない試料の調製法を探索する段階に進むことができた。

各種検討を進め、以下の手順により精製試料の調製に成功している。タンパク質は昆虫細胞で発現させ、ニッケルカラム精製で第一段階目の精製をした。透析により緩衝液中の

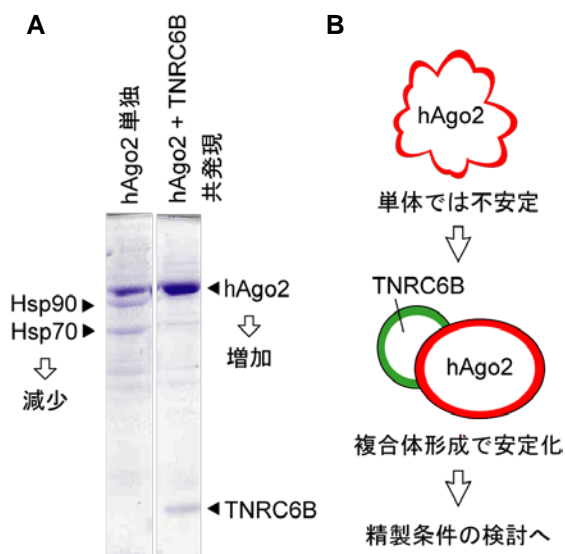


図 2. TNRC6B と hAgo2 の共発現実験

(A)ホニユウ類細胞で発現させ、アフィニティ精製した試料の SDS-PAGE 染色図。  
(B)hAgo2 安定化のイメージ図。

NaCl 濃度を下げた後、陰イオン交換カラムに通した。このとき、核酸を結合するものは陰イオン交換カラムに結合し、核酸を含まないもののみが素通り画分に回収される。引き続きヘパリンカラムとゲル濾過カラムにより高純度に精製した(図 3)。TNRC6B-hAgo2 はゲル濾過カラムにおいて単一のピークとして溶出され、結晶化に適切な試料であると考えられた。精製試料は限外濾過により濃縮し、最終的に 2 L の培養液から約 0.9 mg のタンパク質を得ることができた。調製した試料について RNA との結合など生化学的性質を確認しており、近い将来の構造解析が可能であると考えている。

このほか miRNA 因子として Dicer、TRBP についてもそれぞれ大量発現系を構築し、単体および Dicer・TRBP 複合体として大量調製に成功している。こちらもタンパク質試料の結晶化や、RNA との複合体としての結晶化が期待される。

### TRBP の機能・構造解析

TRBP は 3 つの dsRBD から構成されるタンパク質である。Dicer に結合してその安定性や酵素活性を向上させるほか、Ago2 の RNA 取り込みに関与する可能性も示唆されている。1 つめと 2 つめの dsRBD (dsRBD1 と dsRBD2) が RNA 結合能を持ち、3 つめの dsRBD は Dicer との結合領域として機能することが報告されている。しかしそれぞれの dsRBD の詳細な活性や、dsRBD を 2 つ持つ理由についてはよくわかっていない。今回私は結晶構造解析から、dsRBD1 の立体構造を明らかにした。また、既に我々の研究グループにおいて dsRBD2 の NMR 構造が解かれていた。従って、dsRNA との結合に関わる dsRBD の構造を 2 つとも得ることができた。そこでまず dsRBD1 の構造について考察し、次に各 dsRBD および全長 TRBP について生化学解析を行った。

dsRBD1 は一般的な dsRBD フォールドを取っており、また予想される RNA 結合残基も保存されていた。そのため他の dsRBD と類似の様式により RNA と結合すると考えられた。実際に各種変異体を用いた RNA 結合実験を行い、dsRBD1 の結合モデルと矛盾しないことを確認した。

次に等温滴定カロリーメトリー(ITC)の手法により、各種 TRBP コンストラクトと 21 nt siRNA との親和性を定量的に測定した(図 4)。siRNA との解離定数は dsRBD1 のドメイン

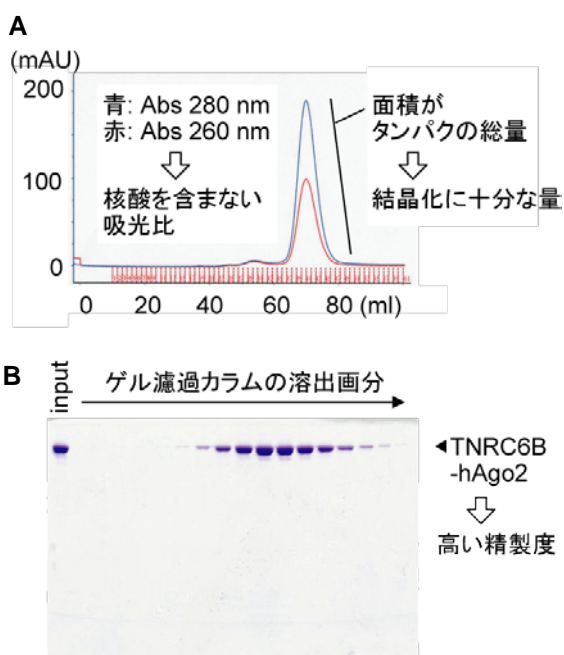

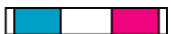



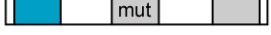


図 3. TNRC6B-hAgo2 の大量調整

TNRC6B-hAgo2 融合タンパク質のゲル濾過カラム精製における(A)紫外吸光チャートと(B)SDS-PAGE 染色図

断片が 220 nM、dsRBD2 のドメイン断片 113 nM であり、いずれの dsRBD も 1 分子の siRNA に対して約 2 分子結合した。すなわち、多少の親和性の差はあるものの両者はほぼ同様の活性を持つことがわかった。また TRBP 全長の、dsRBD1、dsRBD2 の一方を変異させたタンパク質も同様の結合パターンを示したことから、各 dsRBD は他の領域に妨げられず siRNA に結合することが示された。一方、野生型の全長 TRBP タンパク質と dsRBD3 の欠損変異体は 1:1 の結合比にて、1 nM 以下の結合定数という強い結合能を示した。これらの結果から、全長 TRBP は dsRBD1 と dsRBD2 が同時に 1 分子の siRNA に結合することで高い親和性を発揮していることがわかった。

ITC 測定の結果は、TRBP が単量体として siRNA に結合することを示唆していた。一方で、TRBP は二量体を形成するという報告がなされていた。そこで分析超遠心により会合状態を調べた。その結果、TRBP は 54  $\mu$ M の平衡定数で、単量体と二量体の平衡にあることがわかった。ITC 測定はおよそ 1  $\mu$ M 程度のタンパク質濃度で行ったため、単量体として siRNA に結合したという結果は適切であるといえる。また生体内においても二量体化の寄与は大きくないと予想される。このほか、アミノ酸配列の比較から、dsRBD2 のループ部位に dsRBD1 に含まれないトリプトファン残基があることを見出した。立体構造を確認したところ、この残基の側鎖はタンパク質内部へ埋め込まれるように存在し、周囲の残基と疎水性相互作用を形成していた。そのためドメインの構造安定化に寄与していると予想し、変異体実験により確認した。

A	コンストラクト	解離定数 (nM)	siRNA 1 分子に対する結合比
	dsRBD1 dsRBD2 dsRBD3		
	1 345		
FL- WT		0.24	1.01
dsRBD12- WT		0.25	1.13
dsRBD1- WT		220	1.85
dsRBD2- WT		113	2.43
FL- M1		201	2.47
FL- M2		486	1.95

2 つの dsRBD では結合比 1:1 でナノモルレベルの解離定数

1 つの dsRBD だと結合比 2:1 で数百 nM の解離定数

図 4. TRBP dsRBD の立体構造と RNA 結合実験の結果

(A) TRBP のドメイン構成と、各コンストラクトの ITC 測定の結果

(B) dsRBD1, dsRBD2 の立体構造と RNA との結合モデル

