

審査の結果の要旨

氏名 藏田 真也

本論文は、RNA干渉において中心的な役割を担っているヒトDicerの基質認識と作用メカニズムについて生化学的な解析を行ったものである。

MicroRNA(miRNA)は、転写後の遺伝子発現調節を担う約21塩基のタンパク質をコードしていない1本鎖RNAである。miRNAは、その発現パターンを時期特異的・組織特異的に変化させることで、発生や分化の調節、細胞増殖、アポトーシスの制御、形態形成、腫瘍形成などのあらゆる高次生命現象に関与している。核内で転写されたmiRNA前駆体(pre-miRNA)は、RNaseIIIファミリーに属するDicerによって約21塩基の2本鎖miRNAに切断される(dicing)。その2本鎖のうち一方をガイド鎖として取り込んだRISCがターゲットmRNAを認識し、分解または翻訳反応を阻害することで遺伝子発現が抑制される。miRNAにはdicingに由来すると考えられる鎖長の異なるバリエーションが存在するが、ガイド鎖5'末端側の鎖長が1塩基異なるだけでターゲットmRNAが変わる可能性があることやRNA干渉の効率が変化することを考慮すると、生体内ではpre-miRNAのdicingパターンが正確に制御されていると推測される。そこで本論文は、組換えヒトDicerの詳細な機能解析を目的としている。

まず、本論文はDicerの切断様式について述べている。2本鎖RNAのdicing部位を迅速かつ安全に決定する、MALDI-TOF型質量分析装置(MS)を用いた方法を確立し、人工的にデザインしたヘアピン型RNA(shRNA)のdicing中間体を捉えることに成功した。これまで、ヒトDicerは2つのRNase IIIドメイン(RIIIa, RIIIb)を持ち、3'側RNA鎖の切断はRIIIaが、5'側RNA鎖の切断はRIIIbが行うことが報告されていたが、それぞれの切断には順番があること、すなわち、はじめにRIIIaが切断(1st cut)した後に遅れてRIIIbが切断(2nd cut)することを本論文で明らかにし、このような切断様式をstepwise dicingと名付けた。この切断様式はpre-miRNAを基質とした場合でも成り立つことが示され、また、他のRNaseIIIファミリータンパクと比較し、この切断様式はDicer特有であることが示唆された。次に、2本鎖RNAの3'末端構造がDicerの作用メカニズムに与える影響を解析している。これまで、dicing後の3'末端には2塩基の突出末端(overhang)が存在することが知られており、この長さがDicerの認識に必須だと言われていたが、DicerはshRNAの3'-overhangの長さに依らず、3'末端から数えて約22塩基の位置に1st cutを入れることを本論文で明らかにした。また、DicerのPAZドメインは3'末端OH基と結合することが知られていたが、この結合がdicingのはじめのステップであることが本論文で示された。さらに、overhang塩基配列を変えると、PAZと3'末端OH基の相互作用の大きさが変化し、それによりdicingパターンが変化することも明らかにした。

続いて、本論文はDicerの基質認識様式について述べている。shRNAのdicingは遅く、Dicerのパートナータンパク(TRBP)はdicingを活性化するが、pre-miRNAの1つであるpre-let-7のdicingは速く、TRBPはdicingを活性化しないことを明らかにした。また、shRNAの場合と異なり、pre-let-7のdicingにはPAZと3'末端OH基の相互作用は必要なく、5'末端から数えて約22塩基が測り取られること、すなわち、基質によってDicerの作用メカニズムが変化することも本論文で示された。そして、その作用メカニズムは、成熟するlet-7の塩基配列をDicerが認識することで変化することが示唆された。通常は2本鎖miRNAの片方の鎖がmiRNAと成熟

することから、以上の結果は、DicerがmiRNAの方向性を感知している可能性を示唆するものであり非常に意義深い。さらに、let-7は非常に起源が古く、それによる翻訳制御機構がほとんどの真核生物で保存されていることを考慮し、miRNAの進化とパートナー必要性に関連があるのではと本論文で考察している。

以上のようなヒトDicerの詳細な機能解析は、ヒトにおけるRNA干渉のメカニズム解明に貢献するだけでなく、RNA干渉を医療や医薬に応用するための重要な知見を与えると期待される。なお、以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。