

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成19年度博士課程 進学

氏 名 神谷敦史

指導教官名 秋山 徹

論文題目 **microRNA 制御を介したアポトーシス誘導機構の解析**

アポトーシスは、細胞の状態や個体の生育段階に応じて特定の細胞が死ぬ現象である。アポトーシスを誘導する経路にはデスレセプター依存的なシグナル経路とミトコンドリア依存的な経路が存在するが、このうちミトコンドリア依存的な経路において重要な役割を果たしているのが、**Bcl-2** ファミリータンパク質である。

Bcl-2 ファミリータンパク質にはアポトーシス促進に働くタンパク質群 (**Bim**、**Bmf**、**Bax** 等) とアポトーシス抑制に働くタンパク質群 (**Bcl-2**、**Bcl-w**、**Bcl-xL** 等) が存在し、これらのタンパク質のバランスによって、アポトーシスが引き起こされるかどうかが決定的である。どの **Bcl-2** ファミリータンパク質がどの程度の重要性を持つのかは、細胞種やアポトーシス誘導シグナルによって異なると考えられている。

これまでの当研究室の先行研究により、大腸癌由来の **RKO** 細胞において **DNA** ストレスによって引き起こされるアポトーシスでは、以下のようなシグナル経路が重要であることがわかっている。1) **RKO** 細胞に **DNA** ストレスを与えると、転写因子 **p53** が活性化される。2) 核内に移行した活性化型 **p53** は、**D8** 遺伝子の転写を活性化する。3) **D8** は **RNA** 結合タンパク質をコードしており、**D8** タンパク質は細胞質において **Bcl-2** ファミリータンパク質である **Bim** の **mRNA** を安定化及び翻訳促進を誘導する。4) 発現量が増加した **Bim**

がアポトーシス阻害因子である Bcl-2 と結合することにより、アポトーシスが引き起こされる。しかし、D8 が Bim の発現を正に制御することはわかっていたものの、それがどのような機構により行われているのかは明らかでなかった。そこで本研究では、アポトーシス制御機構のさらなる解明を目指して、D8 による Bim の発現制御機構を調べることにした。

D8 と miRNA による Bim の発現制御

通常、mRNA の安定性及び翻訳の制御は 3'UTR を介して行われていると考えられている。一般的に 3'UTR が長い mRNA ほど分解速度が速く、翻訳制御の影響も受け易い。特に Bim mRNA は約 4,000 b の長い 3'UTR を持ち、半減期は非常に短い。実際に、Bim は miR-92、miR-221/222 といった miRNA による翻訳抑制を受けていることが報告されており、Bim 発現量制御における転写後調節の重要性が示唆されている。

特に近年は miRNA と mRNA 3'UTR の関連について研究が進み、mRNA の安定性制御や翻訳調節に関しての理解が急速に進みつつある。miRNA は Argonaute を中心とした RISC 複合体に取り込まれ、相補する配列を持つ mRNA に結合することで翻訳を抑制する。当初 miRNA は翻訳の抑制のみを行っていると考えられていたが、最近では翻訳の抑制と mRNA の分解を両方担うケースが数多く報告されている。D8 の Bim に対する機能も mRNA の安定性と翻訳効率を共に制御するというものであり、miRNA の関与が疑われた。

そこで、D8 による Bim の制御に、miRNA が関与しているかどうかを検討した。miRNA の生合成に必要である Drosha 及び Dicer を siRNA によりノックダウンしたところ、D8 を過剰発現させた場合と同程度に Bim mRNA が増加した。しかし、Drosha をノックダウンした状態では D8 を過剰発現しても、それ以上の Bim mRNA 量の増加は見られなかった。D8 の過剰発現と miRNA の生合成阻害が同様の効果を示し、互いに相乗的に作用しないことから、これらは同一の経路を介して Bim mRNA を制御していると考えられる。よって、D8 が miRNA の機能を阻害することにより Bim 発現量を増加させている可能性が示唆された。

次に、D8 が阻害する miRNA を同定することにした。Bim mRNA の 3'UTR 上に存在する miRNA ターゲットサイトを、インフォマティクス的手法により予測し、Bim の抑制に関与しているかどうかを個別に検討した。ルシフェラーゼアッセイによる解析を行った結果、Bim mRNA 3'UTR の 3'末端側に存在する miR-25/92 のターゲットサイトが Bim の発現を強く抑制していることがわかった。この miR-25/92 のターゲットサイトに変異を導入した配列を用いてルシフェラーゼアッセイを行うと、野生型の Bim 3'UTR 配列に比べて高い活性を示したが、D8 の過剰発現と組み合わせてもそれ以上の活性の増大は示さなかった。

これらの結果から、D8 と miR-25/92 は同様の機構を介して Bim の発現を制御していると考えられた。

内在性の Bim の発現制御についてもルシフェラーゼアッセイと同様に miR-25/92 と D8 の関連性が見出された。すなわち、miR-25/92 を過剰発現すると Bim の発現が抑制されたが、同時に D8 も過剰発現すると、miR-25/92 による発現抑制を解除することができた。また、miR-25/92 に対する antisense 配列をトランスフェクションした細胞では、Bim の mRNA 及びタンパク質量が増加した。その一方で、antisense 配列と D8 を同時に過剰発現しても、Bim の発現量は相乗的に増加しないことがわかった。一連の実験の結果より、D8 は miR-25/92 の機能を抑制することにより、Bim の発現量を増大させていると考えられる。

D8 と Pumilio による Bim の発現制御

Bim 3'UTR には UGUANAU という特徴的な配列が多数含まれている。この配列は RNA 結合タンパク質 Pumilio の認識配列であることが報告されており、Pumilio が Bim mRNA に結合している可能性が考えられた。Pumilio は RNA 結合ドメインである PUF ドメインを持つタンパク質であり、ショウジョウバエにおいては Nanos と結合して mRNA の翻訳を抑制することが知られている。Pumilio が Bim の翻訳を抑制している場合、D8 が Pumilio の機能を阻害することによって、Bim の発現を正に制御している可能性が考えられた。そこで、Bim mRNA 3'UTR に対する Pumilio の作用を、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、確かに Pumilio は Bim の発現を負に制御していることが確認できた。また、Pumilio による認識配列に変異を導入すると D8 による発現量増加が見られなくなることから、Pumilio と D8 は機能面において関連性を持っていることがわかった。

総括

本研究により、D8 は miR-25/92 の機能を抑制することで Bim の発現量を正に制御していることが明らかとなった。D8 は遺伝子の転写後調節に関わる RNA 結合タンパク質の 1 種であるが、このような RNA 結合タンパク質は単独または他のタンパク質と協調して RNA の発現制御に関わると考えられてきた。本研究のように、RNA 結合タンパク質と miRNA との関連を指摘した論文は少数しか存在しないことからわかるように、RNA 結合タンパク質と miRNA の関係についてはまだほとんど明らかにされていない。今後の解明が大いに期待される分野である。D8 に関して、D8 が miR-25/92 の機能を阻害する具体的な様式については、まだ十分明らかにされていない。現在以下のようなモデルを検討中である。一つ目は、D8 が Bim mRNA に結合することにより miRNA・RISC 複合体と Bim mRNA

の結合を阻害するというモデルである（図1）。過去の報告においても、Dnd1 がこれと類似した機構によって p27 mRNA を安定化していることが示されている。二つ目は、Bim mRNA 上の miRNA・RISC 複合体に D8 が結合して機能を阻害しているというモデルである（図2）。miRNA・RISC 複合体及び D8 が mRNA 上で巨大な RNA-タンパク質複合体を形成して、積極的に翻訳を促進している可能性も考えられる。このようなタンパク質複合体に関する報告はまだないが、近年 miRNA が翻訳促進に関与しているという報告が複数発表されていることを考慮すると、miRNA と RNA 結合タンパク質が一体となって翻訳促進に関わっているというモデルも検討する余地があると考えている。

また、今回の研究により D8 と Pumilio との関連も示すことができた。Pumilio は mRNA の翻訳を抑制することで遺伝子の発現を制御することが知られており、D8 同様に重要な RNA 結合タンパク質の一種である。線虫における Pumilio のホモログは miRNA *let-7* の機能に必要であるという報告があり、Pumilio と miRNA の関連についても示唆されている。今回の研究の中で Bim mRNA の発現が miRNA、D8 及び Pumilio の3者によって制御されていることを示したが、これらが互いにダイナミックに協調して（または競合して）Bim の発現を制御している可能性があると考えられる。RNA 結合タンパク質と miRNA の関連を追究していくことにより、包括的な転写後調節の姿を明らかにすることができると期待している。

図1 D8がRISCと競合するモデル

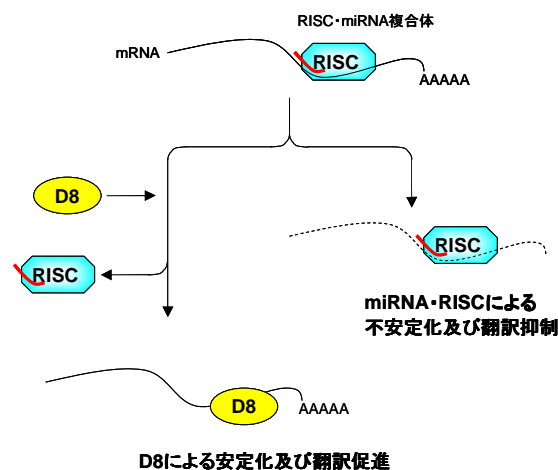


図2 D8がRISCと協調して翻訳を促進するモデル

