

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 神谷 敦史

細胞内において、遺伝子の発現は様々な機構により厳密に制御されている。遺伝子発現の制御機構についての従来の研究は転写制御に関するものが中心であったが、近年は転写後の発現制御に注目が集まっている。たとえば、スプライシングの制御や mRNA の安定性の制御、mRNA からタンパク質への翻訳効率の制御などが精力的に研究されるようになり、その重要性が認識されるようになった。特に、20 塩基程度の 1 本鎖 RNA 配列である miRNA は数多くの標的遺伝子の発現を負に制御しており、細胞内の生理現象に広範に関与していることが明らかになりつつある。

D8 は TGF- β によって発現誘導される遺伝子として同定された。D8 は 569 アミノ酸から成るタンパク質で、N 末端側に RNA 結合ドメインである KH ドメインが 2 つ存在する。先行研究により、D8 がアポトーシス誘導因子 Bim の mRNA に結合し、Bim mRNA の安定化と翻訳促進を引き起こすことによってアポトーシスを誘導することが明らかになっていた。しかし、その具体的な機構については全く明らかにされていなかった。本論文では D8 による Bim の転写後調節機構の解明を試み、RNA 結合タンパク質と miRNA が Bim の転写後調節に関わっていることを明らかにした。

まず、D8 による Bim の発現制御に関与している因子の探索を行った。その結果、miRNA の生合成経路を阻害した細胞では D8 による Bim の転写後調節が見られなくなることから、D8 による Bim の発現制御には miRNA が関与していることが明らかになった。

次に、D8 による Bim の発現制御に関与している miRNA の同定を試みた。D8 による発現制御に必要な Bim mRNA 領域を特定し、その領域に存在する miRNA のターゲットサイトに変異を導入することにより、関与している miRNA の同定を行った。その結果、miR-92a/b が D8 による Bim の発現制御に関与していることが明らかになった。miR-92a/b を過剰発現させた細胞では Bim の発現量が減少したが、D8 の過剰発現によりその発現量の減少を打ち消すことができた。また、miR-92a/b の機能を阻害した細胞では Bim の発現量が増加したが、その細胞にさらに D8 を過剰発現しても、相乗的に Bim の発現量が増大することはなかった。D8 の過剰発現によって miR-92a/b の発現量は変化しないことから、miR-92a/b は Bim の発現を抑制しており、D8 は miR-92a/b 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と考えられた。

さらに、D8 による Bim の発現制御への RNA 結合タンパク質の関与についても検討した。Bim mRNA 3'UTR の中央領域には RNA 結合タンパク質 Pumilio の結合配列が多数存在する。Pumilio は mRNA に結合して翻訳を抑制する機能が報告されていることから、Pumilio が Bim の転写後調節に関与している可能性が考えられた。Bim mRNA

の 3'UTR を用いたレポーターアッセイの結果、Pumilio は Bim の発現を負に制御していることが示唆された。また、D8 も Pumilio 結合配列が存在する 3'UTR 領域に作用し、Bim の発現を正に制御している可能性が示唆された。Pumilio と D8 による Bim の発現制御の関連性を検討した結果、D8 は Pumilio による Bim の発現抑制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示された。

最後に、D8 が Pumilio の機能を阻害する機構を検討した。プルダウンアッセイによって Pumilio と Bim mRNA 断片の結合を調べた結果、Pumilio は Pumilio 結合配列を含む Bim mRNA 配列に結合するが、D8 の過剰発現によってその結合を阻害できることが明らかになった。よって、D8 は Pumilio と Bim mRNA の結合を阻害することによって Pumilio の機能を阻害し、Bim の発現を正に制御していると考えられた。

以上の結果より、miR-92a/b と Pumilio が Bim mRNA の発現を抑制しており、D8 はそれら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ことが明らかとなった。RNA 結合タンパク質が miRNA の機能を制御している例はほとんど報告されておらず、特にアポトーシスの分野では本研究が初めての報告である。したがって、本論文における研究結果は新規性が高く、学術上の貢献が大きい。なお、本論文は小田健昭、秋山徹との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。