

論文内容の要旨

論文題目 小分子 RNA 複合体の形成過程とその機能

氏名 岩崎信太郎

近年の研究により、タンパク質をコードしない 18-30 塩基程度の小分子 RNA が遺伝子発現を制御していることが明らかになってきた。この機構は RNA サイレンシングと呼ばれ広く真核生物に保存されており、発生、細胞増殖、細胞周期、稔性、がん化、トランスポゾンの抑制など、多岐に渡る生命現象を調節していることが知られている。またこの機構を利用した「RNA 干渉」は、任意の遺伝子を特異的にノックダウンできることから、現在では生物学の研究に欠かせない手法となっている。

通常、小分子 RNA はその配列と相補的な配列をもつ mRNA を負に制御する。しかしながら、小分子 RNA はそれ単独で機能できず、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる RNA-タンパク質複合体を形成し、初めて機能することができる。小分子 RNA と直接結合し、RISC の中核を成すのが Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質である。Ago は自身を取り込んだ小分子 RNA と相補的な配列をもつ RNA に結合し、mRNA の切断、翻訳の抑制、poly(A)鎖の短縮、mRNA の分解といった複雑かつ多様な反応を引き起こすことが知られている。

近年の研究によって RNA サイレンシング経路のアウトラインは明らかになったものの、不明な点が数多く残されている。特に、どのように RISC が形成されるのか、またどのように RISC が標的 mRNA の翻訳抑制を起こすのか、については RNA サイレンシングの中核部分であるのかかわらず、明確な結論は得られていない。私はこれらの点を解明するためにショウジョウバエ胚及び S2 細胞抽出液を利用した *in vitro* 系を用いて研究を行った。

I 章 Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーによる RISC loading

代表的な小分子 RNA として microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) がよく知

られている。これらの前駆体はそれぞれ異なるが、miRNA/miRNA*二本鎖、siRNA 二本鎖と呼ばれる小分子 RNA 二本鎖中間体として生合成される点で共通している。

小分子 RNA 二本鎖から RISC が形成される過程を RISC assembly と呼ぶ (図 1)。RISC assembly は少なくとも 2 つの素過程を経る。始めに小分子 RNA 二本鎖が Ago へと取り込まれる。この素過程を RISC loading (Ago への小分子 RNA 二本鎖の積み込み) と呼ぶ。この時、一時的に形成される小分子 RNA 二本鎖と Ago の

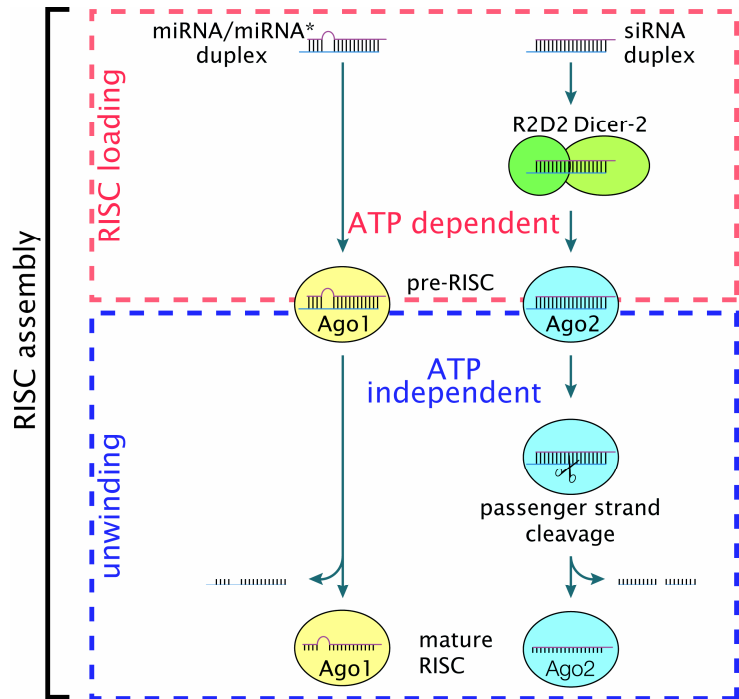


図 1 ショウジョウバエにおける RISC assembly の模式図

複合体を pre-RISC と呼ぶ。その後、pre-RISC 中で小分子 RNA 二本鎖のうち、片方の RNA 鎖が解離し、もう片方の RNA 鎖のみが Ago に保持される。この素過程を unwinding (小分子 RNA 二本鎖の一本鎖化) と呼ぶ。最終的に形成される一本鎖小分子 RNA と Ago の複合体を RISC と呼ぶ。

これまでの研究により RISC loading には ATP の加水分解が必要であること、また精製した Ago だけでは小分子 RNA 二本鎖を取り込むことができないことが分かっていた。これらの結果は、RISC loading には Ago 以外に ATP の加水分解を行う何らかの因子が必要であることを示唆する。しかし、それが一体どのような因子なのかについては全く分かっていなかった。そこで私は、RISC loading を担う因子を同定することを目的として実験を行った。

ショウジョウバエには Ago1 および Ago2 と呼ばれる 2 種類の Ago が存在する。RISC loading を担う因子の手がかりを得るために Ago1、Ago2 に結合する因子の同定を試みた。その結果、Hsp70 の恒常的発現性ホモログである Hsc70-4、Hsp90 のホモログである Hsp83、また Hsc70 や Hsp90 の活性を補助する因子である Hop や Droj2 が Ago1、Ago2 共通の結合タンパク質として同定された。これらの因子は Hsc70/Hsp90 シャペロンマシンナリーを形成することが知られている。Hsc70、Hsp90 の特異的阻害剤を用いて Hsc70、Hsp90 が RISC assembly に必要かを検証したところ、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシンナリーは Ago1 と Ago2 の RISC loading に必要であるのに対し、unwinding には必要ないということが明らかになった。またヒトの RISC loading においても同様の結果が得られた。

さらに Ago2、Dcr-2/R2D2、Tanslin/Trax、Hsc70-4、Hsp83、DroJ2、Hop、p23 の 10 精製タンパク質と siRNA 二本鎖によって、RISC assembly を再構成することに成功した。これを RISC assembly pure system と名付けた。この結果は RISC assembly 反応には以上の 11 因子で十分で

あることを意味している。

通常、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーは ATP 依存的に、結合したタンパク質の構造を変化させ活性を制御することが知られている。以上の結果から、「RISC loading とは Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが ATP を消費し、Ago の構造変化を促すことで小分子 RNA 二本鎖と結合できる状態にする反応である」というモデルが考えられる (図 2)。

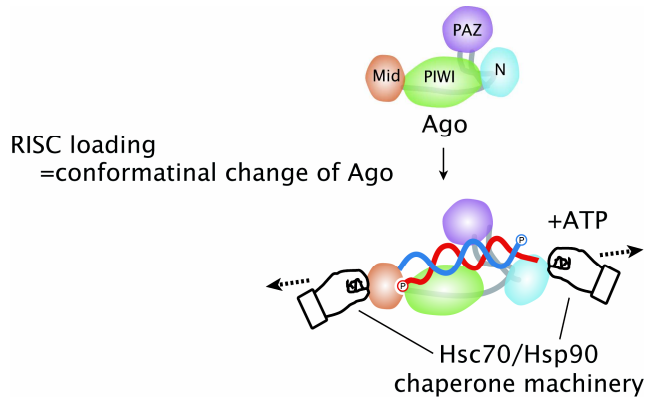


図 2 Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーによる RISC loading のモデル図

実際に Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーによって Ago の構造変化が起きているのか、また Ago1 の RISC assembly にはどんな因子で十分なのかなど、今後詳細に研究されるべきである。

II 章 ショウジョウバエ Ago1 および Ago2 による翻訳抑制機構

これまでの研究から小分子 RNA が標的 mRNA の翻訳を抑制することが明らかにされてきた。しかしながら、その具体的メカニズムについては諸説あり、明確な結論は得られていない。これまで、生物種によって複数個存在する Ago タンパク質間の違いに関してはほとんど解析されてこなかった。私は Ago ごとの翻訳抑制のメカニズムが異なることによって矛盾した結果が生じているのではないか、という仮説を立てた。私は Ago ごとの作用機序の違いに着目し、小分子 RNA による翻訳抑制機構の解明を目的として研究を行った。

ショウジョウバエでは小分子 RNA 二本鎖はそ

の構造的特徴により、Ago1 と Ago2 のどちらに取り込まれるかが決定される。miRNA/miRNA* 二本鎖のように中心付近にミスマッチがある場合は Ago1 へ、siRNA 二本鎖のようにミスマッチがない場合は Ago2 へと取り込まれる (図 3)。これを「小分子 RNA 二本鎖の振り分け機構」と呼ぶ。この振り分け機構を利用することによって、ショウジョウバエ胚抽出液中で小分子 RNA を Ago1 と Ago2 のどちらに取り込ませるかを厳密に制御することが可能になった。また、ショウジョウバエ胚抽出液中では翻訳反応を再現することが可能である。これらを組み合わせることによって、Ago1 と Ago2 による効果を厳密に区別し、小分子 RNA による翻訳抑制を再現できる in vitro

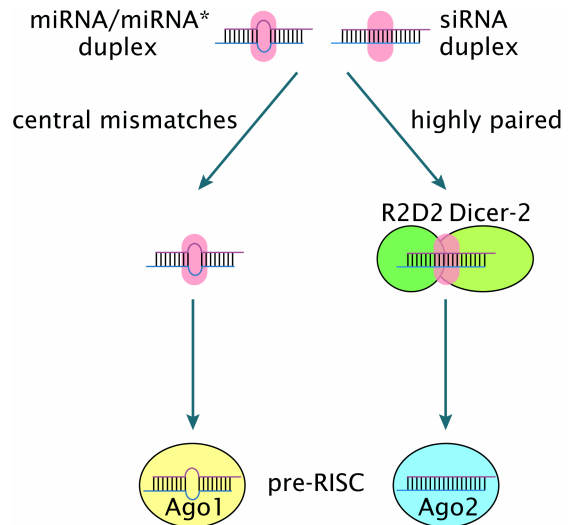


図 3 ショウジョウバエにおける小分子 RNA 二本鎖の振り分け機構の模式図

系を構築することに成功した。この実験系を用いた解析から、Ago1、Ago2 はいずれもが翻訳抑制を引き起こすが、その様式に明確な違いがあることが明らかとなった。

mRNA の翻訳は翻訳開始因子 eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)、eIF4G、eIF4A などを含んだ複合体が cap 構造を認識して始まる。Ago1 はこれらの因子による cap 構造の認識段階には作用せず、より下流の翻訳段階を抑制する (図 4A)。また、同時に ATP 依存的な標的 mRNA の poly(A)鎖の短縮を引き起こす。通常翻訳中の mRNA 上では poly(A)鎖に結合する poly(A)-binding protein、eIF4G、eIF4E、cap 構造を介した loop が形成され、翻訳が効率的に起こる。poly(A)鎖の短縮が起こるとこの loop が壊れ、翻訳の効率が低下すると考えられる。さらに Ago1 による cap 構造の認識以降の翻訳抑制と poly(A)鎖の短縮の両方の経路に Ago1 結合タンパク質である GW182 が必要であることが明らかになった。

これに対し、Ago2 による翻訳抑制 poly(A)鎖の短縮を伴わず、また GW182 も関与しない。Ago2 は eIF4E に結合し、eIF4E と eIF4G との結合を阻害することで cap 構造の認識段階を阻害する (図 4B)。Ago2 と eIF4E との結合は、Ago2 が標的 RNA と結合している場合、強固になる。このメカニズムによって Ago2 は標的 mRNA 上の eIF4E と結合しやすくなり、また標的以外の mRNA の翻訳が抑制されるのを防いでいると考えられる。

本研究によってショウジョウバエ Ago1、Ago2 による翻訳抑制のメカニズムに大きな違いがあることが明らかとなった。この結果はこれまでの矛盾した報告を説明できる可能性がある。一方で、Ago1 の翻訳抑制が cap 構造の認識以降に作用していることが明らかとなったが、それが具体的にどの段階なのかについては明らかになっていない。また、ヒトでは Ago は 4 つ存在するが、それらによる翻訳抑制のメカニズムに違いがあるのかという点についても不明である。これらの点についてさらなる解析が望まれる。

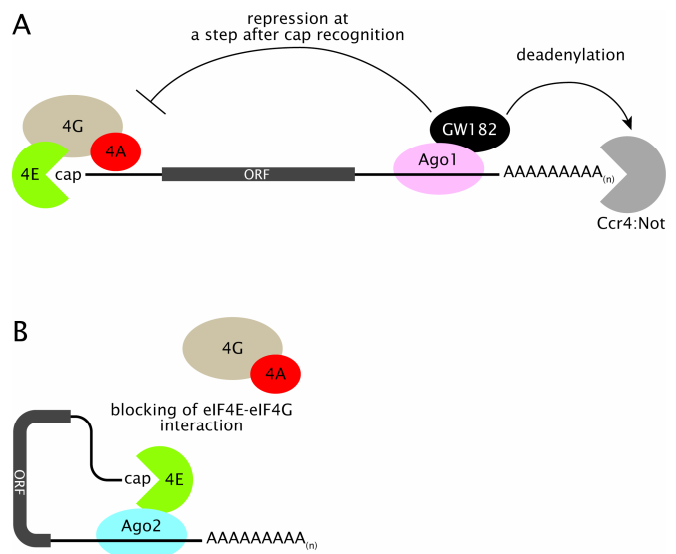


図 4 ショウジョウバエ Ago1 (A)と Ago2 (B)による翻訳抑制機構のモデル図

RNAサイレンシングを理解することは、その中核を成す Ago の性質を理解することであると言い換えられる。I 章と II 章は Ago の性質を多角的に検証したものであり、本研究によって RNAサイレンシングの理解がより深くなったと考える。