

博士論文

哺乳動物 **microRNA** の
選択的安定化機構の解析

Mechanistic insights into the selective
stabilization of mammalian microRNAs

東京大学大学院工学系研究科

化学生命工学専攻

鈴木研究室

北條 広朗

指導教員 鈴木勉 教授

1 章 研究の背景

microRNA (miRNA)と呼ばれる 22 塩基程度の一本鎖 RNA は、Argonaute (Ago)タンパク質や他のタンパク質と複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC)を形成し、相補的な配列を有する mRNA の 3'非翻訳領域に結合することで、標的 mRNA の分解または翻訳抑制を引き起こし、様々な遺伝子の発現を制御している。現在、ヒトでは 2000 種類ほどの miRNA が報告されており、ひとつの miRNA が複数の mRNA を標的とするため、全遺伝子の 70%程度が miRNA による制御を受けていると見積もられている。そのため miRNA は、発生、分化、細胞増殖、代謝など、様々な生命現象に関わることが明らかになっている。また、miRNA の発現異常は癌をはじめとする様々な疾患と密接に関わっており、診断マーカーや創薬のターゲットとしても注目されている。

miRNA は、DNA から長いヘアピン状の一次転写産物として転写された後、核と細胞質においてそれぞれ Drosha と Dicer というエンドヌクレアーゼによる 2 度のプロセッシングを経て成熟する。各 miRNA の発現量は転写段階だけではなく、転写後における前駆体のプロセッシング過程や成熟 miRNA の安定性や分解過程の制御によっても調節されていることが知られている。これまでに miRNA の生合成過程はよく研究されてきたが、成熟後の miRNA の安定性や分解機構の理解はあまり進んでいないのが現状である。

miRNA とその前駆体の 3'末端はしばしばウリジル化、アデニル化、2'-O-メチル化などの修飾を受けることが知られている。哺乳動物においては let-7 前駆体 (pre-let7) の 3'末端オリゴウリジル化が pre-let-7 の Dicing 過程を阻害したり、分解へと導くことが知られている。植物では miRNA の 3'末端は 2'-O-メチル化されており、この修飾は 3'末端のウリジル化とそれに伴う分解を防ぐ機能がある。このように、3'末端への塩基付加や修飾は miRNA の生合成や代謝経路に重要な機能を持つことが明らかになりつつある。

哺乳動物の肝臓特異的に高発現する **miR-122** はコレステロールや脂肪酸の代謝、C 型肝炎ウイルスの複製などに関与する **miRNA** である。当研究室における先行研究により、**miR-122** の 3' 末端が成熟後にアデニル化されていることが見出されている(図 1)。また、このアデ

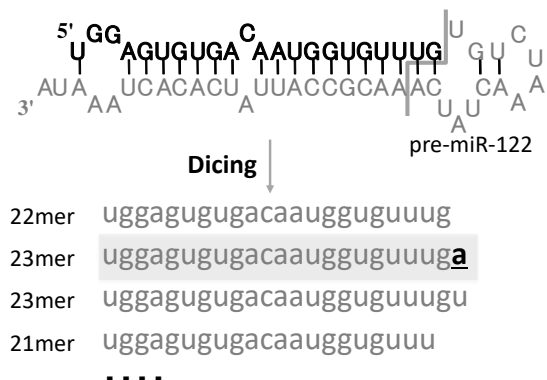


図 1 miR-122 は成熟後に 3'アデニル化される

ニル化を触媒する酵素として、細胞質における mRNA のポリ A 付加酵素として知られていた GLD-2 が同定されている。さらに、GLD-2 ノックアウトマウスの肝臓では miR-122 の定常状態量が特異的に減少しており、

GLD-2 によるアデニル化は、miR-122 を選択的に安定化していることが示されている (Kato, T. et al, *Genes & Development*, 2009)。

さらに、GLD-2 によるアデニル化と拮抗するメカニズムとして、脱アデニル化酵素である PARN が miR-122 の脱アデニル化に関わることが見出されている。PARN は元々 mRNA の脱アデニル化酵素として同定されており、mRNA 上では GLD-2 と同じ複合体 (CPEB 複合体) に含まれていることが知られている。実際に、ヒト肝がん細胞 Huh7 において PARN をノックダウンすると、miR-122 の 3'末端

表 1
PARN ノックダウンによる miR-122 オリゴアデニル化の増

miR-122 variants	sequences	reads	
		WT	PARN KD
21-nt	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUU	98	181
22-nt	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	149	476
23-nt (3'-u)	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGu	121	192
23-nt (3'-a)	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGa	63	97
24-nt (3'-aa)	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGaa	0	10
25-nt (3'-aaa)	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGaaa	0	2
26-nt (3'-aaaa)	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGaaaa	0	15
27-nt (3'-aaaaa)	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGaaaaa	0	3
other variants		26	70
total miR-122		457 (2.77%)	1,046 (3.29%)
total sequence reads		16,517	31,793

オリゴアデニル化の顕著な増加が観察されている (表 1)。GLD-2 によるアデニル化と PARN による脱アデニル化は全ての miRNA に一様に起きているわけではなく、miR-122 を含む一部の miRNA が選択的に受ける制御である。しかし、どのようなメカニズムで GLD-2 や PARN が miR-122 を特異的に認識するかについては未解明であった。本研究では miR-122 の代謝制御機構を明らかにするため、GLD-2 と PARN による miR-122 の選択的なアデニル化および脱アデニル化の分子機構の解析を行った。

2 章 PARN/CUGBP1 による miRNA の脱アデニル化・不安定化機構

はじめに、組換え GLD-2、PARN を用いた *in vitro* のアデニル化および脱アデニル化の実験を行った。その結果、GLD-2 は *in vitro* で miR-122 の 3'末端をオリゴアデニル化する活性を有し(図 2a)、一方 PARN は 3'末端がオリゴアデニル化された miR-122 を好んで分解することが確かめられた(図 2b)。これまでの知見では、GLD-2 は miRNA の 3'末端を一塩基のみアデニル化すると考えられていたが、この結果は PARN ノックダウンにおいて増加していた miR-122 のオリゴアデニル化

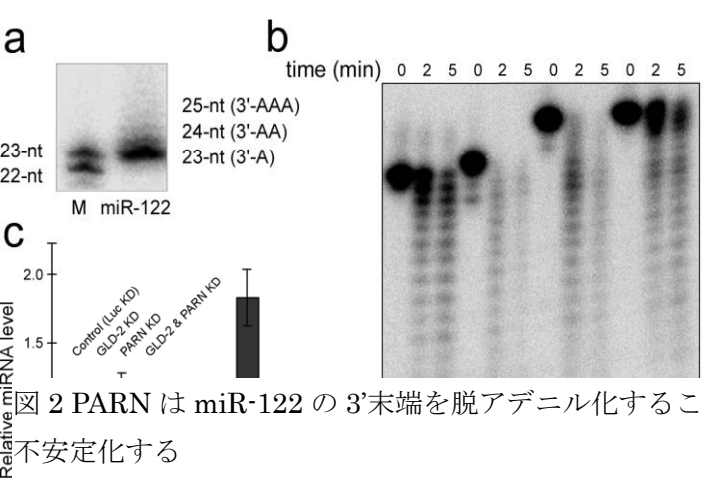


図 2 PARN は miR-122 の 3'末端を脱アデニル化することで不安定化する
(a) GLD-2 による *in vitro* adenylation
(b) PARN による *in vitro* deadenylation
(c) GLD-2、PARN ノックダウン時の miRNA の変動解析

(表 1)は、GLD-2 の活性によるものであることを示している。

前述したように GLD-2 によるアデニル化は miR-122 の安定化に寄与することが分かっている。そこで、PARN による脱アデニル化が miR-122 の安定性に影響するかを解析するため、Huh7 細胞において GLD-2、PARN、またはその両方をノックダウンし、miRNA の定常状態量を解析した。定量的 RT-PCR 法による解析の結果、GLD-2 のノックダウンによって miR-122 が減少した一方で、PARN のノックダウンにおいては miR-122 が増加していた(図 2c)。この結果は、PARN による脱アデニル化が miR-122 の不安定化に関わることを示している。さらに、GLD-2 と PARN を同時にノックダウンするとそれぞれの効果が相殺された(図 2c)ことから、miR-122 の定常状態量は GLD-2 によるアデニル化と PARN による脱アデニル化のバランスによって制御されることが明らかとなった。

PARN ノックダウンにおいては、miR-122 に加えて、miR-93、miR-652 の 3'末端のオリゴアデニル化も増加していたことから、PARN は miR-122 に加えて miR-93 と miR-652 もターゲットとすることが分かっている。そこで、PARN がどのように miR-122 を含む一部の miRNA を選択的に分解するのかを解析することにした。そのために、miR-122 に特異的に結合するタンパク質の探索を行った。miR-122 を固定化した樹脂を

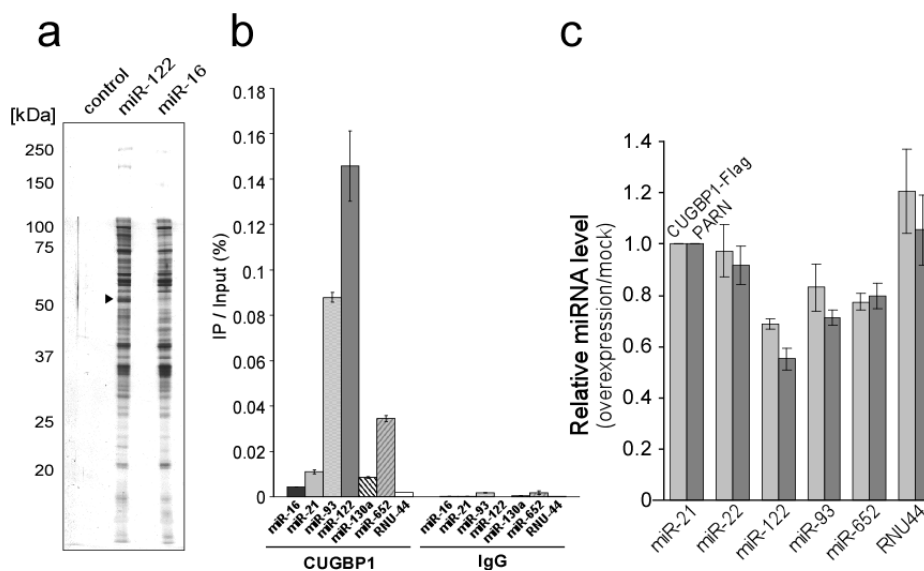


図 3 CUGBP1 は miR-122 に結合し PARN をリクルートする

(a)miRNA に結合するタンパク質のアフィニティ精製

(CUGBP1 を矢印で示している)

(b) CUGBP1 と共沈する miRNA の解析

(c) CUGBP1,PARN 過剰発現時の miRNA の変動解析

作製し、Huh7 細胞の抽出液から miR-122 特異的に結合するタンパク質のプルダウンを行った。miR-122 特異的に結合したタンパク質を質量分析法により解析した結果、RNA 結合タンパク質 CUGBP1 が miR-122 に結合することを見出した(図 3a)。一方、CUGBP1 はネガティブコントロールとして用いた miR-16 には結合しなかった(図 3a)。CUGBP1 は GU-rich な配列 (GU-rich element: GRE) を有する mRNA に特異的に結合することが知られている RNA 結合タンパク質である。また、CUGBP1 は PARN と直接相互作用することで GRE を持つ mRNA の脱アデニル化と分解に関与することが知ら

れている。実際に miR-122 は GU-rich な配列を有しているが、これまでに CUGBP1 と miRNA の相互作用は知られていない。そこで、miR-122 が実際に細胞内で CUGBP1 と相互作用しているかを解析するため、Huh7 細胞において CUGBP1 を免疫沈降し、共沈する miRNA を解析した。CUGBP1 と共沈した RNA に含まれる miRNA を定量的 RT-PCR 法によって解析したところ、CUGBP1 は細胞内で miR-122 と相互作用することが判明した (図 3b)。さらに miR-122 に加えて、PARN による脱アデニル化を受けることが分かっている miR-93 と miR-652 の共沈も確認することができた (図 3b)。CUGBP1 は PARN と直接相互作用することが知られているため、CUGBP1 が配列特異的に miRNA に結合し、PARN をリクルートすることで miRNA の分解に関わっているのではないかと考えた。実際に CUGBP1、PARN をそれぞれ Huh-7 細胞で過剰発現したところ、miR-122、miR-93、miR-652 が減少することが確かめられた (図 3c)。この結果は、CUGBP1 が GU-rich な配列を有する miRNA に PARN をリクルートすることで不安定化に寄与していることを示唆している。

さらに、組換え CUGBP1 と化学合成した miRNA を用いてゲルシフトアッセイを行い、CUGBP1 が GU-rich な miRNA と直接結合するかを解析した。ゲルシフトアッセイの結果、CUGBP1 は miR-122 と非常に強く結合し、さらに miR-93、miR-652 といった GU-rich な配列を有する miRNA とも結合することが確かめられた (図 4a)。一方、その他の miRNA (miR-16、miR-21、miR-130a) は CUGBP1 との結合は観察されなかった (図 4a)。本実験により、CUGBP1 が PARN のターゲットとなっている GU-rich な配列を有する miRNA と直接結合することが示された。

また、miR-122 の変異体を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、CUGBP1 は miR-122 の 5' 端から 5~11 塩基目を改変した miR-122 とは全く結合しないことを見出した。この結果より、CUGBP1 は miR-122 の 5 塩基目~11 塩基目の GU-rich な領域を強く認識していること

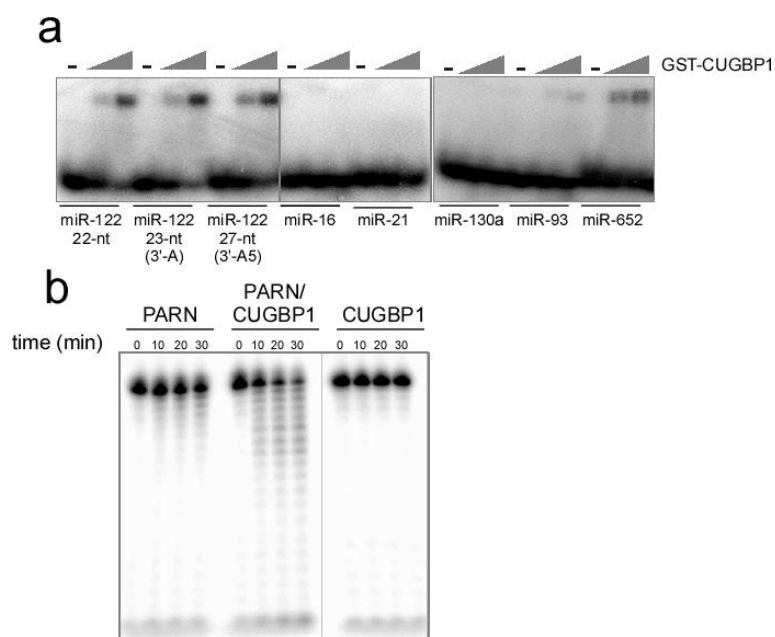


図 4 CUGBP1 は PARN による miR-122 の分解を促進する
(a) ゲルシフトアッセイによる CUGBP1 と miRNA の相互作用解析
(b) CUGBP1 存在下・非存在下における PARN による *in vitro* deadenylation

が示された。

次に CUGBP1 が PARN による miR-122 の脱アデニル化と分解を促進するかどうかを検証するために、組換え CUGBP1 存在下において PARN による分解を観察した。期待された通り、CUGBP1 を加えることで PARN による miR-122 (27-nt, 3'-aaaaa) の分解が促進された (図 4b)。さらに、CUGBP1 は 3' 末端がアデニル化されていない miR-122 の分解も促進することが判明した。CUGBP1 はコントロールに用いた miR-21 の分解は促進しないことから、CUGBP1 は miR-122 特異的に結合し、PARN をリクルートすることで分解を促進していることが判明した。

通常、miRNA は Ago タンパク質に強固に結合し、RISC 複合体を形成しているため、PARN による miR-122 の分解が RISC 上で生じているか、あるいは RISC の外で起きているのかについて検証を行うことにした。miR-122 を *in vitro* で Ago2 にローディングし、PARN による分解実験を行ったところ、PARN は Ago2 上の miRNA をほとんど分解することがなく、CUGBP1 の添加により分解が促進されることもなかった (図 5a)。この結果は、Ago2 にロードされた miRNA はエキソヌクレアーゼによる分解から保護されているという過去の報告とも一致し、PARN による分解は RISC の外で起きていることを強く示唆している。すなわち、CUGBP1 が RISC から解離した miRNA を認識し、PARN をリクルートしていると考えられる。次に、Huh7 細胞における CUGBP1 と Ago2 の相互作用および局在を解析したところ、免疫沈降実験の結果では CUGBP1 と Ago2 の直接の相互作用は観察されなかった。ところが、Huh7 において CUGBP1 と Ago2 は細胞質の P-body 上で共局在することが分かった (図 5b)。この結果は CUGBP1 が P-body において Ago2 から解離した miRNA を認識していることを示唆する。

本研究で、私は miR-122 の定常状態量は、GLD-2 によるアデニル化と PARN/CUGBP1 による脱アデニル化のバランスによって制御されることを明らかにした (図 6)。また、PARN/CUGBP1 による脱アデニル化は、GU-rich な配列を持つ一群の miRNA に共通にみられるメカニズムであることも解明した。この結果は、mRNA において知られていた GLD-2 によるアデニル化と PARN による脱アデニル化の拮抗反応に

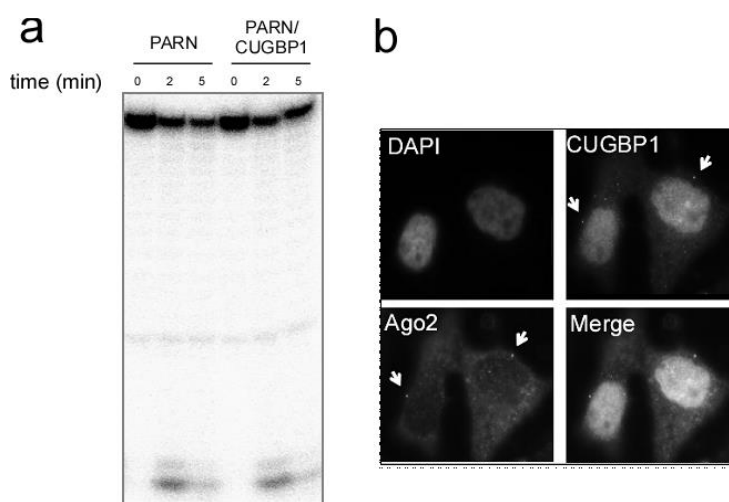


図 5 PARN/CUGBP1 による miRNA の分解は RISC 外で起きる
(a) Ago2 にロードした miRNA を用いた *in vitro* deadenylation
(b) Huh7 における CUGBP1、Ago2 の細胞内局在
P-body と思われる輝点を矢印で示している

よる制御が、GU-rich な一群の miRNA に起きていることを示したものである。また、これまでに

他のグループによる先行研究により、RNA 結合タンパク質 QKI-7 が GLD-2 と相互作用し、特定の mRNA の 3'アデニル化と安定化に関わることが明らかになっている。QKI-7 は細胞質に局在し、mRNA のスプライシング、輸送、安定性に関わることが報告されている。QKI タンパク質には C 末端のアミノ酸配列が異なる 3 つの variant が存在するが、QKI-7 と GLD-2 の相互作用は QKI-7 に特徴的な C 末端のアミノ酸配列に依存していることが知られている。そこで、QKI-7 が miR-122 の 3'アデニル化に関わる因子であるかの検証を行った。まず、QKI をノックダウンし、miRNA の定常状態量を解析したところ、GLD-2 をノックダウンした時と同様に、miR-122 が減少することを見出した。また、QKI-7 は GLD-2 だけではなく Ago2 とも相互作用し、GLD-2 は QKI-7 依存的に Ago2 と相互作用することが判明した。さらに、組換え QKI-7 と化学合成した miRNA を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、QKI-7 は miR-122 と miR-652 に対して特異的に結合することを見出した。前述したように miR-122 は GLD-2 ノックアウトマウスの肝臓において顕著に減少しているが、miR-652 も GLD-2 のノックアウトマウスの肝臓において減少していることを確認している。さらに、QKI-7 は in vitro において GLD-2 による miR-122 の 3'アデニル化反応を促進することが判明した。これらの結果より、QKI-7 が miR-

122 を含む一部の miRNA を特異的に認識し、GLD-2 をリクルートすることで、miRNA のアデニル化と安定化に関与していることが示された。本研究により、miR-122 の定常状態量は、GLD-2/QKI-7 によるアデニル化と、PARN/CUGBP1 による脱アデニル化のバランスによって制御されることが明らかになった。