

論文審査の結果の要旨

氏名 中野 悠子

本論文は、ウイルスセンサータンパク質である LGP2 と、RNA サイレンシングの促進因子である TRBP の相互作用により、抗ウイルス応答と RNA サイレンシングがクロストークしていることを明らかにし、その分子機構と制御される遺伝子ネットワークを解析した論文である。本論文は 4 章からなる。

第 1 章序論では、本研究の背景および目的について述べられている。まず、RNA サイレンシング機構と抗ウイルス応答について、それぞれの分子機構が説明されている。さらに、ウイルス RNA を認識するウイルスセンサーである RIG-I-like receptors (RLRs) と TLR3 の抗ウイルス応答における機能と、RNA サイレンシングの促進因子である TRBP の機能について説明されている。最後に、TRBP を介して RNA サイレンシングを制御する、TRBP の新規相互作用因子の存在を示唆した先行研究について説明されている。これまで、抗ウイルス応答と RNA サイレンシングは独立した経路であると考えられてきたが、先行研究における未同定の TRBP の相互作用因子の存在が、両経路をつなぐ因子である可能性を示唆していたことを説明することで、本研究に必要な背景がまとめられている。

第 2 章では、TRBP の新規相互作用因子の同定、および新規相互作用による RNA サイレンシング機構への影響について解析されている。RNA サイレンシングにおいて、TRBP は RNA 切断酵素である Dicer と相互作用し、pre-miRNA をプロセッシングすることで成熟型 miRNA の合成を促進する因子であり、結果的に RNA サイレンシング活性が促進される。論文提出者は、TRBP の新規相互作用因子を同定するために、Dicer のアミノ酸配列と類似性の高いタンパク質を探索し、RLRs が最も類似した配列を持つことを見出した。さらに、免疫沈降実験により、RLRs のうち、これまで機能不明であった LGP2 のみが TRBP と相互作用することを発見した。LGP2 が TRBP との相互作用によって RNA サイレンシング活性に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて各遺伝子ノックアウト細胞を樹立し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、LGP2 は TRBP の pre-miRNA 相互作用部位を介して TRBP と結合することで、RNA サイレンシング活性を抑制することを見出した。また、RNA 免疫沈降シーケンス

解析により、TRBP が結合しやすい pre-miRNA は特徴的な二次構造をもつ限られた pre-miRNA であることを明らかにした。

第3章では、ウイルス感染に対する宿主細胞の生体防御機構において、TRBP と LGP2 の相互作用を介して miRNA により RNA サイレンシングが制御されるというヒトの新たな生体防御機構が存在する可能性が考えられたことから、それらの miRNA によって制御される遺伝子ネットワークについて解析されている。細胞を擬似ウイルス感染状態にするために、ウイルス由来の因子をもたず、ウイルス RNA と同様の免疫応答を誘導する人工核酸を用いて実験を行っている。また、TRBP を介して制御される miRNA および遺伝子群を同定するため、野生型または TRBP ノックアウト細胞を用いた RNA シーケンス解析により経時的な遺伝子発現変動が調べられている。LGP2 が TRBP との相互作用を介して成熟化を抑制したと考えられる miRNA を同定し、それらの予測標的遺伝子の発現が変動していることを確認した。さらに、Gene Ontology 解析により、それらの予測標的遺伝子が主に転写またはアポトーシスに関わることを明らかにし、さらに転写因子もまたアポトーシス関連遺伝子を標的とすることを見出した。

第4章では、総合討論が行われている。本研究は、これまで独立した経路であると考えられてきた抗ウイルス応答と RNA サイレンシングが、LGP2 と TRBP の相互作用を介してクロストークすることを初めて明らかにした。さらに、両者のクロストークがウイルス感染細胞のアポトーシスによる細胞死を制御する可能性を見出した。LGP2 はこれまでウイルスセンサーファミリーに属していながら、その機能は不明であった。しかしながら、本研究により、LGP2 は TRBP を介して RNA サイレンシングを抑制することにより、ウイルス感染細胞のアポトーシスによる細胞死を制御する新しい生体防御機構に関わる因子として機能することが示唆された。

なお、本論文の第2章は高橋朋子氏（共筆頭著者）・尾野本浩司氏・村上文則氏・小森千晶氏・鈴木穰氏・米山光俊氏・程久美子氏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なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。