

・論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 北條 広朗

1 序論

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の複合体 (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、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。

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。また、このアデ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 (Katoh,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。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'末端オリゴアデニル化の顕著な増加が観察されている。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. 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、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。

次に、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。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。miR-122 に特異的に結合するタンパク質を探索し、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。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わることを知られている。そこで、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。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。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。さらに、ゲルシフトアッセイの結果より、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。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。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 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が判明した。

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 の分解が促進された。この結果より、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。

本研究において 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。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、miRNA の分解の詳細な分子機構を明らかにしたのは初めての例である。

3. miRNA のアデニル化の分子メカニズムの解析

miR-122 の代謝制御機構を理解するためには、GLD-2 が miR-122 を特異的にアデニル化するメカニズムを解き明かす必要がある。そこで、miR-122 特異的な 3'アデニル化に関わる因子の同定を試みた。

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を明らかになっている。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。