

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 北 條 広 朗

microRNA (miRNA)と呼ばれる 22 塩基程度の一本鎖 RNA は、Argonaute タンパク質や他のタンパク質との複合体を形成し、相補的な配列を有する mRNA の 3'非翻訳領域に結合し、標的 mRNA の分解または翻訳抑制を引き起こすことで、様々な遺伝子の発現を制御している。

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。先行研究により、miR-122 はアデニル化酵素 GLD-2 による 3'アデニル化によって選択的に安定化されていることが示されている。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、ポリ (A)特異的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。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。そこで提出者は 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。

はじめに、PARN をノックダウンした細胞において miRNA を解析したところ、PARN をノックダウンすることにより miR-122 の定常状態量、細胞内での寿命がともに上昇することを見出した。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す。以上より、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。

さらに、提出者は PARN の miRNA に対する特異性を決定する因子を同定するために、miR-122 に対して特異的に結合するタンパク質をプルダウンし、質量分析法により解析した。その結果、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 PARN と直接相互作用することで一部の mRNA の脱アデニル化と分解に関わることが知られる。CUGBP1 と miRNA の相互作用を解析するために CUGBP1 を免疫沈降したところ、miR-122 が共沈することを見出した。さらに miR-122 に加えて、GU-rich な配列を有する miR-93 と miR-652 が共沈することを見出した。以上の相

相互作用はゲルシフトアッセイにおいても同様の結果を得ることに成功しており、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を示した。

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生化学的に検証するために、組換え CUGBP1 存在下において PARN による分解を観察したところ、CUGBP1 を加えることで PARN による miR-122 の分解を促進するという結果を得た。この結果により、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。

加えて、論文提出者は 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が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。また、試験管内において QKI-7 は GLD-2 による miR-122 のアデニル化を促進した。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。これまでに miRNA の特定の配列モチーフが miRNA の安定性を制御することは知られていたが、そのような分解の詳細な分子機構をはじめて明らかにした本成果は当分野の発展に大きく寄与するものである。

以上の研究は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。