

学位論文

二本鎖RNA結合タンパク質TRBPの
抗ウイルス反応における機能解析

(Functional analysis of a double-stranded RNA binding protein,
TRBP, in an antiviral response)

平成25年12月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻

高橋 朋子

目次

目次.....	i
略語表.....	v
要旨.....	vii
Abstract.....	viii
1. 序論	1
1.1. TRBP 遺伝子.....	1
1.2. TRBP のドメイン構造	2
1.3. TRBP による免疫不全ウイルス HIV-1 の活性化	3
1.4. TRBP によるインターフェロン誘導型セリン／スレオニンキナーゼ PKR 機能の抑制	3
1.5. TRBP と PACT の PKR 活性に対する相反する作用.....	4
1.6. TRBP と細胞増殖、発がん性	5
1.7. TRBP の小分子 RNA による遺伝子サイレンシングにおける機能.....	5
1.8. DNA/RNA キメラ型 siRNA.....	8
1.9. 研究の目的.....	8
2. TRBP と PACT の二本鎖 RNA 結合様式の <i>in vitro</i> 解析	10
2.1. 序	10
2.2. 材料と方法.....	10
2.2.1. オリゴヌクレオチド.....	10
2.2.2. 大腸菌発現用 TRBP、PACT タンパク質発現コンストラクトの作製.....	11
2.2.2.1. pET28a-TRBP ベクターの作製.....	11

2.2.2.2. pET28a-PACT ベクターの作製.....	11
2.2.3. 大腸菌での TRBP、PACT タンパク質の発現とその作製.....	12
2.2.4. ゲルシフトアッセイ.....	12
2.2.5. ゲルろ過クロマトグラフィー.....	13
2.2.6. ウェスタンブロット.....	13
2.3. 結果.....	13
2.3.1. TRBP の siRNA 結合様式.....	13
2.3.1.1. 野生型 TRBP と siRNA のゲルシフトアッセイ.....	13
2.3.1.2. TRBP と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー.....	15
2.3.1.3. 変異型 TRBP と siRNA のゲルシフトアッセイ.....	16
2.3.1.4. 変異型 TRBP と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー.....	17
2.3.2. PACT の siRNA 結合様式.....	19
2.3.2.1. 野生型 PACT と siRNA のゲルシフトアッセイ.....	19
2.3.2.2. PACT と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー.....	19
2.3.2.3. 変異型 PACT と siRNA のゲルシフトアッセイ.....	20
2.3.2.4. 変異型 PACT と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー.....	21
2.4. 考察.....	22
 3. DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いた siRNA 非シード領域と RLC	
/RISC タンパク質の相互作用の解析.....	26
3.1. 序.....	26
3.2. 材料と方法.....	26
3.2.1. オリゴヌクレオチド.....	26
3.2.2. 細胞の培養.....	27
3.2.3. DNA/RNA キメラ型 siRNA による RNAi 効果の解析.....	27
3.2.4. 各タンパク質のノックダウンとリアルタイム PCR によるノックダウン	

効率の測定	28
3.2.5. 各タンパク質ノックダウンによる RNAi 効果の解析	28
3.2.6. Protein-BLAST による Dicer helicase/ATPase ドメインと相同性のある タンパク質の検索	27
3.2.7. 免疫沈降法による TRBP と相互作用するタンパク質の解析	29
3.3. 結果	29
3.3.1. DNA/RNA キメラ型 siRNA の非シード領域の機能	29
3.3.2. 非シード領域の 4 つの領域を DNA に置換した影響の解析	31
3.3.3. 各タンパク質のノックダウンが DNA/RNA キメラ型 siRNA の RNAi 活性に与える影響	31
3.3.4. DNA/RNA キメラ型 siRNA と Ago のゲルシフトアッセイ	32
3.3.5. DNA/RNA キメラ型 siRNA と TRBP のゲルシフトアッセイ	33
3.3.6. TRBP と相互作用する新規のタンパク質の探索	34
3.3.7. RIG-I like receptor (RLR) が RNAi に与える影響	35
3.4. 考察	35
4. アポトーシス誘導による TRBP のプロセッシング	38
4.1. 序	38
4.2. 材料と方法	38
4.2.1. 培養細胞発現用タンパク質発現コンストラクトの作製	38
4.2.2. Caspase-3 による TRBP、PACT タンパク質の <i>in vitro</i> 切断アッセイ	39
4.2.3. TNF α /CHX による TRBP、PACT タンパク質の <i>in vivo</i> 切断アッセイ ...	39
4.2.4. アミノ酸 N 末端シーケンスによる Caspase-3 による TRBP 切断部位の同定	39
4.2.5. 免疫沈降法によるプロセッシングされた TRBP と相互作用タンパク質の 解析	40

4.2.6. マウス TRBP ノックアウト細胞を用いたプロセシングされた TRBP の RNAi 効果の解析	40
4.3. 結果	41
4.3.1. アポトーシス誘導における TRBP タンパク質の観察	41
4.3.2. TRBP 内のプロセシングモチーフの検索	41
4.3.3. TRBP の Caspase-3 による <i>in vitro</i> 切断アッセイ	43
4.3.4. N 末端アミノ酸シーケンスによる TRBP の Caspase-3 切断部位の 同定	43
4.3.5. プロセシングされた TRBP と相互作用タンパク質	44
4.3.6. プロセシングされた TRBP と siRNA との相互作用	44
4.3.7. プロセシングされた TRBP の RNAi 活性	45
4.4. 考察	45
 5. 総合考察	 48
 図表	 52
参考文献	134
謝辞	143

略語表

略称	英語表記	日本語表記
AIDS	acquired immune deficiency syndrome	後天性免疫不全症候群
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
bp	base pair	塩基長
CBB	Coomassie Brilliant Blue	
CHX	cycloheximide	シクロヘキシミド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
dsRBD	double-stranded RNA binding domain	二本鎖 RNA 結合ドメイン
DTT	dithiothreitol	
eIF	eukaryotic translation initiation factor	真核生物翻訳開始因子
GST	glutathione-S-transferase	
HIV-1	human immunodeficiency virus-1	ヒト免疫不全ウイルス
IPTG	isopropyl thiogalactoside	
Kd	dissociation constant	解離定数
LB	Luria-Bertani	
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2	
LTR	long terminal repeat	末端反復配列
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5	
miRNA	microRNA	マイクロ RNA
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA、伝令 RNA
NMR	nuclear magnetic resonance analysis	核磁気共鳴分析
OD	optical density	濁度、光学密度
PACT	protein activator of PKR	
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PKR	protein kinase R	
pre-miRNA	precursor miRNA	マイクロ RNA 前駆体
pri-miRNA	primary miRNA	マイクロ RNA 初期転写産物
PVDF	polyvinylidene difluoride	フッ化ポリビニリデン
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	

略称	英語表記	日本語表記
RISC	RNA-induced silencing complex	
RLC	RISC-loading complex	
RLR	RIG-I-like receptor	
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNAi	RNA interference	RNA 干渉
RNase	ribonuclease	RNA 分解酵素
rpm	round per minute	回転毎分
SDS	sodium dodecyl suldate	ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
TAR RNA	trans-activation response RNA	
TNF α	tumor necrosis factor α	腫瘍壊死因子 α
TRBP	TAR-RNA binding protein	
WT	wild type	野生型

要旨

TAR RNA-binding protein (TRBP)は、small interfering RNA (siRNA) による RNA interference (RNAi)に関わる分子であるが、それだけでなく Protein kinase R (PKR)の活性化に伴うインターフェロン応答機構にも関与している。RNAi もインターフェロン応答も抗ウイルス反応であり、これらは相互に制御を受けると推定されるが、その詳細は不明である。本研究では、これら 2 つの経路に共通に関わる TRBP の作用機序を明らかにすることで、両者のクロストークの機構を解明することを目指している。

TRBP は二本鎖 RNA 結合ドメインとタンパク質相互作用ドメインをもつ。本研究ではまず二本鎖 RNA 結合ドメインを介した siRNA との結合様式を解析した。よく似たドメイン構造をもつ Protein activator of PKR (PACT)と比較解析した結果、TRBP は PACT に比べ高い siRNA 結合能を持ち、モノマーで結合するが、PACT の siRNA 結合能は TRBP に比べ低く、ダイマーでのみ結合することが明らかとなった。さらに、siRNA の一部を系統的に DNA に置換した siRNA との結合実験の結果、TRBP の結合には少なくとも 2 ヶ所の RNA 領域が必要であることがわかった。一方、タンパク質相互作用ドメインは、インターフェロン応答の過程でプロセッシングされることを見出した。TRBP は PACT とヘテロダイマーを形成するが、プロセッシングを受けた TRBP は PACT と相互作用しない。一方で、TRBP は PKR の活性を抑制するのに対し、PACT は促進するという反対の作用を持つことから、TRBP はプロセッシングによって間接的に PKR の活性を制御していると考えられ、TRBP は自身の構造変換によって異なる機能を発揮する可能性が示唆された。

Abstract

TAR RNA-binding protein (TRBP) is not only a regulator of RNA interference induced by small interfering RNA (siRNA), but also a regulator of interferon response induced by activation of protein kinase R (PKR). Both RNAi and interferon response are involved in an innate antiviral response, and their pathways are considered to interact each other. The aim of this research is to reveal the mechanism of their crosstalk by functional analysis of TRBP, which is a factor involved in both pathways.

TRBP has double stranded (ds)-RNA binding domains and protein interaction domain. I first examined the *in vitro* binding pattern using siRNA and recombinant human TRBP through its dsRNA binding domains compared with PACT which has a similar domain structure with TRBP. It was revealed that TRBP has a higher affinity to siRNA than that of PACT and could bind to siRNA as a monomer, and PACT has a lower affinity to siRNA than that of TRBP and could bind to siRNA only as a dimeric form. Moreover, the binding experiments using siRNA with systematic DNA substitutions showed that two independent RNA-regions are necessary for interacting with TRBP. On the other hand, I found that protein interaction domain of TRBP is proteolytically processed during interferon response. Wild-type TRBP and PACT form a heterodimer, but proteolytically cleaved form of TRBP could not interact with PACT. TRBP and PACT have opposite effects on PKR activation: TRBP inhibits PKR activity but PACT enhances it. Thus, TRBP may control PKR activity indirectly by the structural rearrangement to perform different protein interactions.

1. 序論

The trans-activation response (TAR)-RNA binding protein (TRBP)は、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus : HIV-1)の 5'LTR にある TAR と呼ばれるステムループ型の二本鎖 RNA 領域に結合するタンパク質として同定された、二本鎖 RNA 結合タンパク質である (Gatignol et al., 1991)。ヒトの TRBP は 3 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン(double-stranded RNA binding domain: dsRBD) からなるが (図 1)、dsRBD とは TRBP やヒトの Protein kinase R (PKR)、大腸菌の RNaseIII、Drosophila の Staufen、Xenopus の Xlrpba において、二本鎖 RNA 結合能をもつ領域のアミノ酸配列の比較により、保存性の高い領域として見出されたドメインである(Johnston et al. 1992, Gatignol et al. 1993)。

TRBP は当初、HIV-1 の 5'LTR にある TAR と呼ばれるステムループ型の二本鎖 RNA 領域に結合することで HIV-1 の複製を促進する因子として注目されたが、その後、インターフェロン誘導型のプロテインキナーゼである PKR とヘテロダイマーを形成し、PKR の活性化を阻害することも明らかとなった (Park et al. 1994, Consentino et al. 1995)。さらに microRNA (miRNA)や small interfering RNA (siRNA)などの小分子 RNA による遺伝子サイレンシングに必須な二本鎖 RNA 切断酵素 (RNase III)である Dicer と相互作用し、この経路を促進することも明らかとなり (Chendrimada et al. 2005, Hasse et al. 2005)、近年最も注目される二本鎖 RNA 結合タンパク質の一つである。

1.1. TRBP 遺伝子

ヒトの TRBP 遺伝子は 12 番染色体に位置する (Kozak et al. 1995)。二つのプロモーターと転写開始点を持ち、一つ目のエキソンが異なる TRBP1 と TRBP2 が転写、翻訳される (Bannwarth et al. 2001)。TRBP2 は 366 アミノ酸、TRBP1 は TRBP2 の N 末端の 21 アミノ酸を欠いた 345 アミノ酸から成るが、この二つのタンパク質の機能的な違いは確認されていない。また、主に転写、翻訳されるのは TRBP2 である (Bannwarth et al. 2001)。TRBP 遺伝子の二つのプロモーターは、転写因子 NF-Y によって正に制御されている

(Bannwarth et al. 2006)。NF-Y 量が少ないアストロサイトでは、TRBP の発現量が少なく、NF-Y 量が多いリンパ球細胞では、TRBP の発現量が多いことが報告されている (Bannwarth et al. 2006)。また、精巣でも TRBP の発現量が高いことが報告されている (Zhong et al. 1999)。TRBP 遺伝子のノックアウトマウスは離乳期に致死となることから、発生や分化における重要な機能が示唆される (Zhong et al. 1999)。

TRBP タンパク質は哺乳類で非常に高度に保存されている (図 2)。マウスの TRBP ホモログである PRBP 遺伝子は 15 番染色体に位置するが、そのタンパク質はヒトの TRBP と 95% 相同である (Kozak et al. 1995)。また、ハエや線虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、甲殻類などでの哺乳類以外の生物でも幅広くホモログが見つかった (図 3)。

1.2. TRBP のドメイン構造

TRBP は 3 つの dsRBD (dsRBD1, dsRBD2, dsRBD3) をもつ約 37 kDa の二本鎖 RNA 結合タンパク質である (図 1)。dsRBD1 は X 線結晶構造解析、dsRBD2 は NMR により二本鎖 RNA との複合体の構造解析がなされており、dsRBD1 と dsRBD2 は dsRBD に典型的な α - β - β - α 構造をとる (Yang et al. 2010, Yamashita et al. 2011)。dsRBD1 においては Q36, E37, H58, K80, K84、dsRBD2 は Q165, E166, H188, K210, K214, R215 を介して二本鎖 RNA と相互作用していると考えられている。dsRBD2 は、dsRBD1 に比べ、ドメイン構造の熱安定性が高い (Yamashita et al. 2011)。

dsRBD1 と dsRBD2 は dsRBD の保存性が高く、ともに二本鎖 RNA への結合能を持つが、dsRBD2 の方が dsRBD1 に比べ二本鎖 RNA への結合力が強い (Daviet et al. 2000)。dsRBD2 のリジンとアルギニンが多く存在する領域 (210-KKLAKRNAAKMLLR-224) は KR ヘリックスモチーフと呼ばれ、この領域が二本鎖 RNA への結合に強く寄与していると考えられている (Erard et al. 1998, Daviet et al. 2000)。dsRBD3 は dsRBD1, dsRBD2 に比べ、dsRBD の保存性が低く、二本鎖 RNA に結合しない。しかしながら、dsRBD3 は Dicer や PACT, Merlin などのタンパク質との相互作用ドメインであり、Merlin-Dicer-PACT-liaison (Medipal) ドメインと呼ばれることもある (Laraki et al. 2008, Daniels et al. 2009)。

1.3. TRBP によるヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の活性化

HIV-1 はプラス鎖の一本鎖 RNA ゲノムをもつウイルスであり、HIV に感染すると、CD4 陽性リンパ球のレベルが低下し、後天性免疫不全症候群 (AIDS)を発症する。HIV は血清学的、遺伝子学的性状の異なる HIV-1 と HIV-2 の 2 つに大別される。HIV-1 は自身のもつ逆転写酵素により宿主 DNA ゲノムに組み込まれ潜伏するが、その転写はウイルス由来のタンパク質である Tat と HIV-1 転写産物の LTR にある TAR と呼ばれるステムループ型の二本鎖 RNA 領域との相互作用によりトランス活性化される (Southgate et al. 1990, Selby et al. 1990, Berkhout et al. 1990)。しかしながらその活性化は Tat と TAR RNA との相互作用だけでは説明できず、宿主のタンパク質が HIV-1 の転写活性化に関与すると考えられた (Seigel et al. 1986, Hart et al. 1989, Newstein et al. 1990)。TRBP は TAR RNA に結合するタンパク質の、ヒト cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定された分子である (Gatignol et al., 1991)。

TRBP は当初 HIV-1 の転写を活性化すると考えられたが、現在では翻訳を活性化すると考えられている。転写産物の 5'LTR に TAR RNA が存在すると、その二次構造により翻訳が抑制されるが、TRBP が TAR RNA に結合することで翻訳が活性化される (Dorin et al. 2003)。一方で、TAR RNA には PKR も結合するが、PKR は二本鎖 RNA に結合することで活性化し、翻訳抑制を引き起こす (Roy et al. 1991, Nekhai et al. 1996, Carpick et al. 1997)。このとき、TRBP は PKR に結合することで、二本鎖 RNA による PKR の活性化を抑制し、HIV-1 転写産物の翻訳を促進するように働く (Duarte et al. 2000, Battisti et al. 2003, Ong et al. 2005)。さらに、TRBP 量の少ないアストロサイトでは、HIV-1 の転写や複製が抑制されることが報告されている (Bannwarth et al. 2001, Ong et al. 2005)。

1.4. TRBP によるインターフェロン誘導型セリン／スレオニンキナーゼ PKR 機能の抑制

PKR はインターフェロン誘導型のセリン／スレオニンキナーゼであり、二本鎖 RNA への結合、もしくはホモダイマー形成や Protein activator of PKR (PACT)などの他のタンパク質との相互作用により活性化される (Meurs et al. 1990)。活性化した PKR は翻訳開始

因子である Eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) の α サブユニットをリン酸化し、翻訳抑制を引き起こす (Ernst et al. 1978, Gale et al. 2000, García et al. 2006)。PKR の過剰発現はウイルスの複製を抑制し、PKR 量の減少はウイルスの複製を活性化する (Dimitrova et al. 2005, Jha et al. 2011)。また、PKR の過剰発現は細胞の増殖を抑制する。しかしながら複数のガン細胞では PKR が発現上昇していることも観察され、複雑な制御機構が予想される (Blalock et al. 2010, Mounir et al. 2010)。

TRBP は 3 つの dsRBD を介し PKR と直接結合し、PKR の活性化を抑制する (Park et al. 1994, Cosentino et al. 1995)。また二本鎖 RNA に結合することで間接的に PKR の活性化を抑制することも示唆されている。

1.5. TRBP と PACT の PKR 活性に対する相反する作用

PACT は PKR をベイトとした酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングによって、PKR と相互作用する因子として同定された (Patel et al. 1998)。PACT も TRBP と同様に 3 つの dsRBD (dsRBD1, dsRBD2, dsRBD3) をもつ、約 34kDa の細胞質に局在する二本鎖 RNA 結合タンパク質である (Peters et al. 2001)。TRBP と PACT はそれぞれホモダイマーとヘテロダイマーを形成する (Cosentino et al. 1995, Kok et al. 2007)。TRBP と PACT の相同性は高く、dsRBD1 は 56%、dsRBD2 は 60%、dsRBD3 は 58% の相同性を示すが、dsRBD2 と dsRBD3 間のリンカー領域は TRBP の相当する領域と比重して、PACT は 20 アミノ酸短い (図 4)。TRBP と PACT は非常によく似たタンパク質でありながら、TRBP が PKR の活性化を抑制するのに対し、PACT は PKR の活性化を促進するという反対の作用をもつことが知られている。PACT も TRBP と同様、3 つの dsRBD を介し PKR と相互作用するが、TRBP と PACT の機能の違いがどのように生じるかは明らかではない。PKR に変異を導入した酵母ツーハイブリッド法により、PKR は同じアミノ酸を介して TRBP および PACT と相互作用していることが明らかとなった (Gupta et al. 2003)。しかしながら TRBP と PACT の dsRBD を相互に置換したキメラ型のタンパク質を用いた解析から、PACT の dsRBD3 には PKR を活性化する効果があることが明らかとなった (Gupta et al. 2003)。しかしながら、PACT の dsRBD はいずれも構造解析が成

されておらず、また TRBP も dsRBD3 はいまだ構造解析が成されていない。TRBP と PACT の機能的な違いが何によりもたらされるのか、更なる研究が必要である。

1.6. TRBP と細胞増殖、発がん性

ヌードマウスに TRBP を過剰発現する細胞を移植すると、腫瘍を形成することが報告されている (Benkirane et al. 1997)。このような TRBP の示す発がん性は PKR の活性化を抑制することによるものであると考えられているが、TRBP による発がん性は、がん抑制因子として知られる Merlin との相互作用によっても制御されていることが報告されている (Lee et al. 2004)。Merlin は TRBP の C 末端に存在する 237-366 番目のアミノ酸と相互作用し、ユビキチン化によって TRBP 量を調節している (Lee et al. 2006)。TRBP は脳での発現量が低いことが報告されているが、脳の細胞で Merlin の発現量が減少すると脳特異的な腫瘍が形成される。そのため、TRBP 発現量は転写因子である NF-Y による自身のプロモーターの転写制御と、Merlin による翻訳後の制御という二つの制御を受けていると考えられている。また、Merlin は細胞が高密度なときに発現量が高く、TRBP 量を減少させ、細胞が低密度なときは発現量が低く、TRBP 量を増加させることも報告されている (Lee et al. 2006)。

1.7. TRBP の小分子 RNA による遺伝子サイレンシングにおける機能

1998 年、Fire らにより線虫で RNA interference (RNAi)が発見された (Fire et al. 1998)。RNAi は、約 21 塩基の二本鎖 RNA である small interfering RNA (siRNA)による遺伝子発現抑制機構であり、真核生物に広く保存されている (Novina et al. 2004, Ketting et al. 2011)。近年のトランスクリプトーム解析により、生体内にはタンパク質をコードしないノンコーディング RNA が大量に存在することが明らかとなっているが、その中でも小分子のノンコーディング RNA である miRNA や siRNA が、発生や分化などの様々な段階で遺伝子の発現を調節していることが明らかになってきた。miRNA は、すでにヒトでは 1000 種類以上が同定され、siRNA もレトロトランスポゾンなど内因性の二本鎖 RNA から生成されることが明らかとなっている。また、ウイルス性の miRNA や siRNA

も同定され、宿主細胞における遺伝子サイレンシングに関わることも報告されている (Pfeffer et al. 2004)。

TRBP は miRNA や siRNA など小分子 RNA による遺伝子サイレンシングに必須な RNase III である Dicer と相互作用し、その反応を促進する因子として同定された (Chendrimada et al. 2005, Hasse et al. 2005)。ゲノムにコードされた miRNA は、primary-miRNA (pri-miRNA) というステムループ型の前駆体として、RNA ポリメラーゼ II により核内で転写される (Lee et al. 2004) (図 5)。その後、RNase III である Drosha と二本鎖 RNA 結合タンパク質である DGCR8 により、precursor-miRNA (pre-miRNA) へとプロセッシングされる (Lee et al. 2003, Han et al. 2004)。Pre-miRNA は Exportin 5 により細胞質へと輸送され (Yi et al. 2003, Lund et al. 2004)、Dicer と TRBP または PACT により成熟型の二本鎖 miRNA になった後、片側の RNA 鎖 (miRNA 鎖) が Argonaute (Ago) を主要因子とするエフィクター複合体である RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ (Martinez et al. 2002, Doi et al. 2003, Liu et al. 2004, Rivas et al. 2005)、相補的な配列をもつ mRNA の分解または翻訳抑制を引き起こす (Filipowicz et al. 2005)。Ago に取り込まれなかった RNA 鎖 (miRNA スター鎖) は分解される (Liu et al. 2009)。ヒトでは、1 つの Dicer と 4 つの Ago (Ago1-4) タンパク質が同定されており、Ago の中では Ago2 のみが RNA の切断活性をもつ (Liu et al. 2004, Meister et al. 2004)。そのためターゲット mRNA の切断を起こす RNAi は Ago2 に RNA が取り込まれたときのみ起こると考えられている。二本鎖の siRNA では、2 本の RNA 鎖のうち Ago2 に取り込まれ、ターゲット mRNA と塩基配列相補相互的に対合し、切断を行う RNA 鎖をガイド鎖、Ago2 には取り込まれず、分解される鎖をパッセンジャー鎖と呼ぶ。siRNA や miRNA といった小分子 RNA による RNA サイレncing のメカニズムについてはハエで精力的に研究されている。ハエは 2 つの Dicer (Dicer-1, Dicer-2) と 2 つの Ago タンパク質 (Ago1, Ago2) をもつが、これらの使い分けがヒトに比べより明確であるためであり、miRNA による遺伝子サイレンシングには Dicer-1 と Ago1 が、siRNA による遺伝子サイレンシングでは Dicer-2 と Ago2 が使われる (Lee et al. 2004, Förstemann et al. 2007)。ハエの TRBP ホモログと考えられている R2D2 や Loquacious (Loqs) は、サイレンシング活性を促進する役

割がある (Lie et al. 2003)。

ヒトの TRBP は Dicer による小分子 RNA のプロセッシングを促進し、プロセッシングされた RNA を Ago へロードされるのを補助する役割があると考えられている。小分子 RNA、Dicer、TRBP、Ago の複合体を RISC-loading complex (RLC) と呼ぶが (Tomari et al. 2004, Maniataki et al. 2005)、TRBP は dsRBD3 を介して、RLC 中で Dicer の Helicase/ATPase ドメインと相互作用する (Daniels et al. 2009)。ランブル鞭毛虫の Dicer は X 線結晶構造解析に成功しており、その PAZ ドメインが siRNA の 3' 側の 2 塩基突出部分を認識して結合することが明らかとなっている (Macrae et al. 2006)。また近年ではクラリオ電子顕微鏡での解析が進み、ヒトの Dicer は L 字型をしていることが明らかとなっている (Wang et al. 2009, Lau et al. 2009)。最近、ヒトの Ago を用いた X 線結晶構造解析結果も報告されて、Mid ドメインと PAZ ドメインがそれぞれ siRNA の 5' 側と 3' 側に結合することが明らかとなっている (Elkayam et al. 2012, Schirle et al. 2012)。また siRNA の 1 塩基目は Mid ドメインのポケットに認識されるが、この時アデニンとウラシルは、グアニンとシトシンに比べ安定に結合しやすいことが報告されている (Frank et al. 2010)。

ヒト細胞における TRBP のノックダウン実験やマウスの TRBP ノックアウト細胞を用いた解析では、TRBP の抑制によって RNAi 活性の減少が見られることから、TRBP は RNAi に関与する重要な因子であると考えられるが (Daniels et al. 2009)、TRBP の RNA サイレンシングにおける詳細な作用機序は明らかではない。また TRBP は、一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (single molecule fluorescence resonance energy transfer: smFRET) を用いた研究により、二本鎖 RNA 上を ATP 非依存的にスライドすることが報告されている (Koh et al. 2013)。このことは TRBP と二本鎖 RNA の安定した均一な複合体を得ることを困難とするため、全長での構造解析が難しい大きな理由の 1 つと考えられる。また、TRBP と非常によく似た因子でありながら、PKR の活性化に関しては反対の作用を示す PACT は、RNA サイレンシングでは TRBP と同様の機能をもつと考えられているが、その作用機序も明らかではない。

1.8. DNA/RNA キメラ型 siRNA

本研究では RNAi 経路における siRNA とタンパク質との相互作用を調べるために、DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いた (図 6)。当研究室では siRNA を両末端から一塩基ずつ体系的に DNA に置換して RNAi 活性を測定することで、siRNA ガイド鎖の 5'側 1-8 塩基目と、それと対合するパッセンジャー鎖の塩基を RNAi 効果が減少することなく、DNA に置換することが出来ることを明らかにしている (Ui-Tei et al. 2008)。またこのような DNA を含むキメラ型 siRNA による RNA サイレンシング効果のマイクロアレイ解析により、パッセンジャー鎖によるオフターゲット効果は大幅に減少することも明らかにしている。ガイド鎖の 5'側 2-8 塩基目はシードと呼ばれる領域で、ターゲット mRNA と塩基配列相補的に認識、対合する領域である。DNA は RNA と遜色なく mRNA と対合できるため、RNAi 効果が減少することなく、DNA に置換することが出来ると考えられた。一方で、シード以外の領域は RNA サイレンシング活性を保持したまま DNA に置換することは難しい領域で、RNA 結合タンパク質の結合領域などの RNA としての重要な機能をもつ領域であると考えられる。siRNA は 3'末端に 2 塩基突出をもつ 21 塩基の回転対称な構造をもつ二本鎖 RNA であるが、パッセンジャー鎖はシード以外の領域が DNA に置換されているために RISC への取り込み効率が減少し、パッセンジャー鎖によるオフターゲット効果は大幅に減少したと考えられた (図 7)。

1.9. 研究の目的

TRBP は小分子 RNA による遺伝子サイレンシングと、PKR 活性化による翻訳抑制の経路において重要な因子であるが、この二つの経路はともに二本鎖 RNA 誘導型の経路であり、抗ウイルス反応の一つであると言える。TRBP は両経路に共通した因子であり、両経路のクロストークを制御する機能を担う分子であると考えられる。本研究ではまず TRBP と非常によく似たタンパク質である PACT との比較により、TRBP の二本鎖 RNA への結合様式について検討した。次に、DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いた解析により、siRNA の部位特異的な役割と、二本鎖 RNA 結合タンパク質との相互作用について解析し、これらの結果から RNA サイレンシングと抗ウイルス反応のクロストークの可能性

を考察する。最後に TRBP がアポトーシス誘導時に Caspase によりプロセッシングさせることを明らかにし、TRBP の構造変換による 2 つの経路における機能変換の機構に作用について考察する。

2. TRBP と PACT の二本鎖 RNA 結合様式の *in vitro* 解析

2.1. 序

TRBP と PACT はともに 3 つの dsRBD をもつ非常によく似た構造の二本鎖 RNA 結合タンパク質である。TRBP は dsRBD1 と dsRBD2 が二本鎖 RNA との相互作用領域であり、dsRBD3 は Dicer など他のタンパク質との相互作用領域であることが知られているが、PACT においては 3 つの dsRBD が二本鎖 RNA への結合にどのように寄与しているのか明らかでない。小分子 RNA による遺伝子サイレンシングでは、TRBP と PACT は小分子 RNA の Dicer によるプロセッシングや Ago への取り込みを促進する作用が示唆されているが、両者の違いは明らかではない。本研究では TRBP と PACT の RNAi 経路における機能的な違いを明らかにするために、まず小分子 RNA の中で最も単純な構造をもつ siRNA との *in vitro* 結合実験を行うことで、TRBP と PACT の二本鎖 RNA 結合様式の比較解析を行った。

2.2. 材料と方法

2.2.1. オリゴヌクレオチド

使用したオリゴヌクレオチドは化学合成したものをを用いた (Proligo, Sigma-Aldrich) (表 1)。ゲルシフトアッセイに用いた RNA は、7 M 尿素入り 15%ポリアクリルアミドゲルで泳動し、切出精製した後、ガイド鎖を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (6000 Ci/mmol; Perkin Elmer)を用いて ^{32}P ラベルし、95°C、5 分インキュベートし徐々に室温に戻すことでパッセンジャー鎖とアニーリングした。アニーニング後、15%ポリアクリルアミドゲルで泳動し、アニーリングの確認を行った。

2.2.2.大腸菌発現用 TRBP、PACT タンパク質発現コンストラクトの作製

ヒト TRBP2 タンパク質と PACT タンパク質をそれぞれ大腸菌内で発現させ、精製するために、それぞれの遺伝子の CDS 全長の N 末端に His-tag、C 末端に Myc-tag を融合した His-TRBP-Myc 発現コンストラクト (pET28a-TRBP)と His-PACT-Myc 発現コンストラクト (pET28a-PACT) を作製した。作製した発現ベクターはシークエンサーによって配列を確認し、*Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 codon plus に形質転換し増幅させ、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いて精製した。

2.2.2.1. pET28a-TRBP ベクターの作製

まず制限酵素サイト (HindIII/NotI)を付加したプライマーを用いて HeLa 細胞より合成した cDNA を鋳型に PCR を行うことで CDS を増幅し、同じ制限酵素で切断した pcDNA3.1-myc/His A ベクターに挿入した。C 末端に Myc タグを付加した TRBP フラグメントを制限酵素サイト (NheI/HindIII)を付加したプライマーを用いて増幅し、同じ制限酵素で切断した pET28a ベクターに挿入することで、His-TRBP-Myc 発現コンストラクト (pET28a-TRBP)を作製した。また、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) により、80, 81 番目のリジンをアラニンに置換した dsRBD1 変異体、210, 211 番目のリジンをアラニンに置換した dsRBD2 変異体、80, 81, 210, 211 番目のリジンをアラニンに置換した dsRBDmt1+2 変異体、dsRBD3 を欠損した変異体を作製した。使用したプライマーは表 2 に示した。

2.2.2.2. pET28a-PACT ベクターの作製

まず制限酵素サイト (BamHI/SalI)を付加したプライマーを用いて HeLa 細胞より合成した cDNA を鋳型に PCR を行うことで CDS を増幅し、同じ制限酵素で切断した pET28a ベクターに挿入した。また、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) により、84, 85 番目のリジンをアラニンに置換した dsRBD1 変異体、177, 178 番目のリジンをアラニンに置換した dsRBD2 変異体、84, 85, 177, 178 番目のリジンをアラニンに置換した dsRBDmt1+2 変異体、dsRBD3 を欠損した変異体を作製した。使用したプライマーは表 2 に示した。

2.2.3. 大腸菌での TRBP、PACT タンパク質の発現とその精製

それぞれのタンパク質発現ベクターを *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS に形質転換し、LB 培地で2日間前培養した後、本培養を開始した。OD₆₀₀=0.6 付近で IPTG を終濃度 0.3 mM になるように加え、さらに6時間培養後集菌した。集菌した大腸菌に Binding Buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール) を加え溶解した後、超音波で大腸菌を破碎した。遠心後、Binding Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose カラムに上清を添加した。カラムボリュームの10倍量の Binding Buffer を流した後、カラムボリュームの5倍量の Wash Buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 300 mM NaCl, 20 mM イミダゾール) を流し、Elution Buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール) で目的のタンパク質を溶出した。ゲルシフトアッセイに用いるサンプルは、PD-10 Desalting columns (Amersham)を用いてアッセイ用 buffer (20 mM Tris-HCl [pH8.0], 300 mM NaCl)に buffer 交換した。また、精製したタンパク質は、等量の 2×SDS-PAGE sample buffer (4 %SDS, 0.1 M Tris-HCl[pH6.8], 12 %メルカプトエタノール, 20 %グリセロール, 0.01 %ブロモフェノールブルー)を混合し、5分間煮沸した後、12.5 %変性アクリルアミドゲルを用いて泳動し、Coomassie Brilliant Blue (CBB)染色により目的のタンパク質の精製を確認した。タンパク質の定量には Protein Assay (BIO-RAD)を用いた。

2.2.4. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、精製した TRBP または PACT タンパク質と ³²P ラベルした siRNA (0.5 nM)を反応液中で混合し、氷上で30分静置後、9%非変性アクリルアミドゲルで150 V、約70分間泳動した。反応液の組成は、20 mM Tris [pH7.5], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM DTT, 50 ng/μl サーモンスパーム DNA, 0.4 U/μl RNasin (Promega)である。泳動後、ゲルをろ紙の上に乗せ、ゲルドライヤーで乾燥させ、イメージングプレート(FUJIFILM)を用いて感光し、FLA-2000(FUJIFILM)で検出した。スーパーシフト実験には抗 Myc 抗体または抗 Flag 抗体 (Cell Signaling)を氷上で一時間プレインキュベートした後、siRNA を混合した。

2.2.5. ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーは、精製した TRBP または PACT タンパク質と siRNA (300 nM)を反応液中で混合し、氷上で 30 分静置後、Superdex 200 HR 10/30 カラム (GE healthcare)に添加した。反応液の組成は、20 mM Tris (pH7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM DTT である。タンパク質サイズマーカーにはカタラーゼ (232 kDa)、アルドラーゼ (158 kDa)、アルブミン (67 kDa)、オボアルブミン (43 kDa)、リボヌクレアーゼ A (13.7 kDa)を使用した。

2.2.6. ウェスタンブロット

ゲルろ過クロマトグラフィーで得られたそれぞれの溶出フラクションを等量の 2×SDS-PAGE sample buffer (4% SDS, 0.1 M Tris-HCl [pH6.8], 12% 2-メルカプトエタノール, 20%グリセロール, 0.01%BPB)と混合し、5 分間煮沸した後、12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。タンパク質は PVDF 膜に転写し、5%スキムミルク-TBST (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100)で一時間ブロッキング後、2000 倍希釈した抗 Myc 抗体 (Cell Signaling)と 4℃で一晩反応させた。TBST で 3 回洗浄後、5000 倍希釈した HRP 標識された抗ラビット抗体と室温で一時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、メンブレンを ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare)と反応させ、LAS3000 (FUJIFILM)で検出した。それぞれのバンドの定量は Image Gauge 4.0 (FUJIFILM)で行った。

2.3. 結果

2.3.1. TRBP の siRNA 結合様式

2.3.1.1. 野生型 TRBP と siRNA のゲルシフトアッセイ

ヒト TRBP の siRNA への結合様式を解析するために、N 末端に His、C 末端に Myc タグを融合した野生型 TRBP タンパク質 (TRBP-WT)を大腸菌内で発現させ、Ni-NTA agarose を用いて精製した。精製した TRBP-WT タンパク質は可溶性であり、ほぼ純品で精製されていることは SDS-PAGE により確認した (図 8)。二種類の RNAi 効果の高い

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA (siLuc-1, siLuc-2)の両方の RNA 鎖を 1 本ずつ電気泳動で分離、切出精製し、ガイド鎖を ^{32}P ラベルした後、パッセンジャー鎖とアニールした。アニーニングは 15%非変性ポリアクリルアミドゲルで確認した。精製した TRBP-WT タンパク質の濃度 (0~1,300 nM)を段階的に調整し、siRNA (0.5 nM)と混合し、30 分反応させた後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動したところ、二段階の結合パターンが観察された (図 9)。同様の結果はパッセンジャー鎖を ^{32}P ラベルした場合でも得られた。まず、TRBP-WT 濃度が低いところ (1.3~5.1 nM)では一段階目の結合 (TRBP-WT complex 1)が見られた ($K_d = 4.00\sim 5.30$ nM)が、TRBP-WT 濃度が高くなるにつれて二段階目の結合 (TRBP-WT complex 2)が見られた ($K_d = 44.0\sim 440$ nM) (表 3)。Complex 2 の増加に伴い、Complex 1 は減少していったことから、Complex 2 は Complex 1 に少なくとも一分子の TRBP-WT が追加して結合したと考えられた。同様の実験を RNAi 効果が中程度の siRNA (siLuc-3, siLuc-4)、RNAi 効果が低い siRNA (siLuc-5, siLuc-6)でも行った。RNAi 効果によらず、これらの siRNA は RNAi 効果の高い siRNA (siLuc-1, siLuc-2)と同様の二段階の結合パターンを示した (図 10)。解離定数 K_d は配列によりわずかな差は見られたがほぼ同程度 (Complex 1: 5.80~33.0 nM, Complex 2: 81.0~430 nM)であり、siRNA と TRBP の結合力の強さと RNAi 効果の程度は関連しないと考えられた (表 3)。また、TRBP は siRNA 両末端の熱力学的安定性を感知し、より安定な末端に結合するという報告がある (Gredell et al. 2010)。siRNA の 3'末端 2 塩基突出部分の影響を調べるために、平滑末端の siRNA (siRNA-1B, siRNA-2B)と、3'末端 2 塩基突出部分を DNA に置換した siRNA (siLuc-1D, siLuc-2D)を用意した。これらの siRNA を用いて同様にゲルシフトアッセイを行ったところ、3'末端の塩基や形状の違いによらず、これらの siRNA は siLuc-1, siLuc-2 と同様の結合パターンを示した (図 11.12)。解離定数 K_d も同程度 (Complex 1: 4.50~11.0 nM, Complex 2: 60.0~243 nM)であり、TRBP と siRNA の相互作用領域は、主に siRNA の末端ではなく、二本鎖 RNA 領域であると考えられた (表 3)。ちなみに TRBP は二本鎖 DNA (siDNA-1, siDNA-2)や一本鎖 RNA (ssLuc-1, ssLuc-2)には結合しない (図 13.14)。

TRBP-WT を用いたゲルシフトアッセイで見られた complex 1 が、TRBP-WT が特異

的に siRNA に結合したものであることを確かめるために、精製した TRBP-WT と結合する抗 Myc 抗体と、結合しない抗 Flag 抗体を加えて TRBP-WT と一時間反応後、³²P ラベルした siRNA と 30 分反応させ、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。抗 Myc 抗体を加えた場合には TRBP-WT complex 1 に加え、スーパーシフトしたバンドが観察されたが、Flag 抗体を混合した場合には、スーパーシフトしたバンドは観察されなかった。したがって、TRBP-WT を用いた時に形成された complex 1 は TRBP-WT を少なくとも一分子含むことが明らかになった (図 15.)。

2.3.1.2. TRBP-WT と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー

TRBP-WT と siRNA のゲルシフトアッセイにより観察された complex 1 と complex 2 がそれぞれ何分子の TRBP-WT と siRNA により構成されているのかを調べるために、Superdex 200 HR 10/30 カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、複合体の分子量を求めた。まず siRNA (siLuc-1)のみを溶出したところ、一つの溶出ピークが観察された (図 16A)。タンパク質サイズマーカーを用いて分子サイズを計算したところ、siRNA は約 23 kDa のタンパク質と同程度の溶出ピークを示すことがわかった。使用した siRNA-1 の精製度とサイズはアガロースゲル電気泳動により確認した (図 16A 挿入図)。次に TRBP-WT (1,300 nM)と siLuc-1 を混合し、形成した complex 2 を溶出したところ、110 kDa と 23 kDa 付近にピークが観察された (図 16B)。23 kDa のピークは siLuc-1 であるため、110 kDa のピークが complex 2 であると考えられた。His タグと Myc タグを含む TRBP-WT の分子量は約 44 kDa なので、110 kDa のピークは、一分子の siRNA-1 と二分子の TRBP-WT を含むと考えられた。

次に、TRBP-WT (5.1 nM)と siLuc-1 を混合し、形成された complex 1 を溶出したところ、溶出ピークは 23 kDa 付近にのみ観察され、complex 1 の溶出ピークは検出出来なかった(図 16C)。これはおそらくタンパク質の濃度が検出限界以下であったためだと考えられる。しかしながら、得られた溶出フラクションを泳動し、12.5 %変性アクリルアミドゲルで泳動し、Myc 抗体を用いて Western blot を行い、TRBP-WT を検出したところ、48-75 kDa のタンパク質を含むフラクション (fraction 14)で TRBP-WT の溶出ピークが観

察された。したがって complex 1 は一分子の siRNA-1 と一分子の TRBP-WT を含むと考えられた。

TRBP-WT の complex 2 についてより詳細に調べるために、complex 2 に ^{32}P ラベルしていない siRNA (0-600 nM) を追加し、30 分反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した (図 17)。追加した siRNA 濃度が増加するにつれて、complex 2 が complex 1 に解離して様子ことが観察された。これは、complex 2 は complex 1 に加え、更に TRBP-WT を少なくとも一分子含んでおり、その一分子は siRNA とは相互作用していない可能性を示唆している。以上より、TRBP-WT の complex 2 は一分子の siLuc-1 と二分子の TRBP-WT タンパク質を含むと考えられた。

2.3.1.3. 変異型 TRBP と siRNA のゲルシフトアッセイ

TRBP は 3 つの dsRBD (dsRBD1, dsRBD2, dsRBD3) をもつ二本鎖 RNA 結合タンパク質である。3 つの dsRBD が siRNA への結合にどのように寄与するかを調べるために、dsRBD1 に変異を導入した TRBP-dsRBDmt1、dsRBD2 に変異を導入した TRBP-dsRBDmt2、dsRBD1 と dsRBD2 の両方に変異を導入した TRBP-dsRBDmt1+2、dsRBD3 を欠損した TRBP- Δ dsRBD3 タンパク質を TRBP-WT と同様の方法で大腸菌内で発現させ、精製した (図 18A)。dsRBDmt1 は 80, 81 番目のリジンをアラニンに、dsRBDmt2 は 210, 211 番目のリジンをアラニンに、dsRBDmt1+2 は 80, 81, 210, 211 番目のリジンをアラニンに置換することで作製した。タンパク質の精製度は SDS-PAGE で確認した (図 18B)。精製した変異型 TRBP と二種類の siRNA (siLuc-1, siLuc-2) を用いてゲルシフトアッセイを行なったところ、TRBP-dsRBDmt1 および TRBP-dsRBDmt2 では、TRBP が低濃度のときは結合が観察されず、高濃度のときに一段階の Complex (TRBP-dsRBDmt1 complex, TRBP-dsRBDmt2 complex) を形成することが観察された (図 19, 20)。 K_d は TRBP-dsRBDmt1 は 250~260 nM, TRBP-dsRBDmt2 は 370~520 nM であり (表 3)、TRBP-dsRBDmt2 の方が TRBP-dsRBDmt1 に比べ siRNA へのアフィニティーが低いことから、dsRBD2 の方が dsRBD1 に比べ強い RNA 結合活性をもつことが考えられた。TRBP-dsRBDmt1+2 では、タンパク質が高濃度でも結合はほとんど見られなかった (図

21)。TRBP-dsRBDmt1+2 で見られたわずかな結合は、変異導入した dsRBD1 と dsRBD2、もしくは dsRBD3 によるわずかな RNA 結合活性によるものであると考えられた。そこでこのことを検証するために TRBP-dsRBDmt1+2 の dsRBD3 を欠損した TRBP-dsRBDmt1+2 Δ 3 発現コンストラクトを作製し、精製を試みたが、不安定なタンパク質であり、可溶性のタンパク質を精製することが出来なかった。TRBP- Δ dsRBD3 では、TRBP-WT と同様に 2 つの Complex (TRBP- Δ dsRBD3 complex 1 と TRBP- Δ dsRBD3 complex 2) が観察され、*K_d* も TRBP-WT と同程度であった (complex 1: 5.00~12.0 nM, complex 2: 180~220 nM) (図 22) (表 3)。

以上より TRBP の 3 つの dsRBD のうち、dsRBD1 と dsRBD2 は siRNA との結合に重要だが、dsRBD3 は必ずしも必要ではないことが示された。また、dsRBD2 の方が dsRBD1 に比べ強い RNA 結合活性をもつことが示された。

TRBP-WT の complex 2 と変異型 TRBP の complex (TRBP-dsRBDmt1 complex, TRBP-dsRBDmt2 complex, TRBP- Δ dsRBD3 complex 2) を非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動したときの移動度を比較したところ (図 23)、TRBP-dsRBDmt1 の complex と TRBP-dsRBDmt2 の complex は、TRBP-WT の complex 2 に比べ移動度が遅かった。また、TRBP-dsRBDmt1 の complex は TRBP-dsRBDmt2 の complex に比べ移動度が遅かった。この結果より TRBP-dsRBDmt1 complex と TRBP-dsRBDmt2 による complex は、TRBP 二分子以上の多量体を形成していること、更に TRBP-dsRBDmt1 の complex は TRBP-dsRBDmt2 の complex より大きい多量体を形成していることが示唆された。

2.3.1.4. 変異型 TRBP と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー

変異型 TRBP (TRBP-dsRBDmt1, TRBP-dsRBDmt2, TRBP- Δ dsRBD3) についても同様に、ゲルシフトアッセイにより観察された複合体がそれぞれ何分子の TRBP タンパク質と siRNA により構成されているのかを調べるために、Superdex 200 HR 10/30 カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、複合体の分子量を求めた。まず TRBP- Δ dsRBD3 (1,300 nM) と siLuc-1 を混合し、形成した TRBP- Δ dsRBD3 complex 2 を溶出したところ、90 kDa と 23 kDa 付近にピークが観察された (図 24)。23 kDa のピー

クは siLuc-1 であるため、90 kDa のピークが TRBP-ΔdsRBD3 の complex 2 であると考えられた。His タグと Myc タグを含む TRBP-ΔdsRBD3 の分子量は約 37 kDa であるため、90 kDa のピーク (TRBP-ΔdsRBD3 complex 2) は、一分子の siLuc-1 と二分子の TRBP-ΔdsRBD3 を含むと考えられた。TRBP-WT の complex 2 と同様に、TRBP-ΔdsRBD3 の complex 2 に ³²P ラベルしていない siRNA (0-600 nM) を追加し、30 分反応後泳動したところ、追加の siRNA 濃度の増加に伴い、TRBP-ΔdsRBD3 の complex 2 が TRBP-ΔdsRBD3 の complex 1 に解離していくことが観察された (図 25)。このことから、TRBP-ΔdsRBD3 の complex2 は TRBP-ΔdsRBD3 の complex 1 に加え、更に TRBP-ΔdsRBD3 を少なくとも一分子多く含んでいる可能性を示唆している。以上より、TRBP-ΔdsRBD3 の complex 2 は、一分子の siRNA-1 と二分子の TRBP-ΔdsRBD3 を含むと考えられた。

次に TRBP-dsRBDmt1 の complex と TRBP-dsRBDmt2 の complex について検討した。ゲルシフトアッセイによる結果では、TRBP-dsRBDmt1 と TRBP-dsRBDmt2 の complex は、TRBP を二分子以上含む多量体を形成していることが示唆された。そのため、まず TRBP-dsRBDmt1 濃度を 0.33-1,300 nM まで段階的に調整し、それぞれの濃度における TRBP-dsRBDmt1 と siRNA の complex を形成させ、溶出したところ、180~250 kDa のピークが観察された (図 26A)。TRBP-dsRBDmt2 濃度を 0.33-1,300 nM まで段階的に調整し、それぞれの濃度における TRBP-dsRBDmt2 の complex を形成させ、溶出した場合は、120~170 kDa のピークが観察された (図 26B)。TRBP-WT と TRBP-ΔdsRBD3 の complex 2 ではタンパク質濃度を段階的に調整しても溶出ピークの変化は観察されなかったことから (図 27)、TRBP-dsRBDmt1 と TRBP-dsRBDmt2 は、TRBP-WT や TRBP-ΔdsRBD3 と比べ、低濃度での安定な複合体を形成しにくく、高濃度において多量体を形成していると考えられる。これは dsRBD1 または dsRBD2 の RNA 結合活性が変異導入により失われたためと考えられる。また、ゲルシフトアッセイでもゲルろ過クロマトグラフィーでも、TRBP-dsRBDmt1 の complex は TRBP-dsRBDmt2 の complex に比べ、より大きな多量体を形成した。dsRBD2 の方が dsRBD1 に比べ強い RNA 結合活性をもつため、TRBP-dsRBDmt1 complex は TRBP-dsRBDmt2 complex に比べ、より不安定であると考えられた。

2.3.2. PACT の siRNA 結合様式

2.3.2.1. 野生型 PACT と siRNA のゲルシフトアッセイ

PACT の siRNA への結合様式はこれまで全く明らかにされていない。PACT の siRNA への結合様式を解析するために、TRBP と同様に N 末端に His、C 末端に Myc タグのついた野生型 PACT タンパク質 (PACT-WT) を大腸菌内で発現させ、Ni-NTA agarose を用いて精製した。精製した PACT-WT は可溶性であり、精製度は SDS-PAGE により確認した (図 28)。精製した PACT-WT タンパク質の濃度 (0-1,300 nM) を段階的に調整し、siRNA (0.5 nM) と混合し、30 分反応させた後、9% 非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動したところ、TRBP-WT とは異なり、PACT-WT は濃度の高いところで siRNA との一段階の結合 (PACT-WT complex 2) が観察された (図 29)。 K_d は 220~401 nM であり、TRBP-WT complex 2 とほぼ同程度であった (表 3)。

PACT-WT についても同様に、siRNA の 3' 末端 2 塩基突出部分の効果を調べるために、平滑末端の siRNA (siLuc-1B, siLuc-2B) と、3' 末端 2 塩基突出部分を DNA に置換した siRNA (siLuc-1D, siLuc-2D) を用いて同様にゲルシフトアッセイを行った。その結果、PACT-WT も 3' 末端の塩基や形状の違いによらず、siLuc-1, siLuc-2 と同様の結合パターンを示した (図 30, 31)。 K_d も同程度 (222~1,030 nM) (表 3) であり、PACT-WT も TRBP-WT と同様に、主に siRNA の二本鎖 RNA 領域に結合することが明らかとなった。

2.3.2.2. PACT と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー

PACT と siRNA のゲルシフトアッセイにより見られた複合体がそれぞれ何分子の PACT と siRNA により構成されているのかを調べるために、Superdex 200 HR 10/30 カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、複合体の分子量を求めた。精製 PACT タンパク質 (1,300 nM) と siRNA-1 を混合し、形成した複合体を溶出したところ、130 kDa と 23 kDa 付近にピークが観察された (図 32)。His タグと Myc タグを含む精製 PACT タンパク質の分子量は約 40 kDa であるため、130 kDa のピーク (Complex 2) は、二分子の siRNA-1 と二分子の PACT タンパク質を含むと考えられた。

PACT-WT complex 2 についてより詳細に調べるために、PACT-WT complex 2 に ^{32}P ラ

ベルしていない siRNA-1 (0-600 nM)を追加し、30 分反応後泳動した (図 33)。TRBP-WT complex 2 では追加した siRNA の濃度が増加するにつれて、TRBP-WT complex 2 が TRBP-WT complex 1 に解離する様子が観察されたが、PACT-WT complex 2 では複合体の解離、もしくは siRNA が取り込まれたことによる複合体サイズの増加は観察されなかった。ゲルろ過クロマトグラフィーで求められた吸光度と、モル吸光係数を用いた計算では、PACT-WT complex 2 は一分子の siRNA-1 と二分子の PACT-WT を含む複合体であると考えられた。したがって、PACT-WT タンパク質は 2 分子の相互作用によって安定なダイマーを形成し、ダイマーと 1 分子の siRNA が結合することによって安定な complex 2 を形成していると考えられた。

2.3.2.3. 変異型 PACT と siRNA のゲルシフトアッセイ

PACT は TRBP と同様に 3 つの dsRBD (dsRBD1, dsRBD2, dsRBD3)をもつ二本鎖 RNA 結合タンパク質である。3 つの dsRBD が siRNA への結合にどのように寄与するのかを調べるために、dsRBD1 に変異を導入した PACT-dsRBDmt1、dsRBD2 に変異を導入した PACT-dsRBDmt2、dsRBD1 と dsRBD2 両方に変異を導入した PACT-dsRBDmt1+2、dsRBD3 を欠損した PACT- Δ dsRBD3 タンパク質を PACT-WT と同様の方法で大腸菌内で発現させ、精製した。dsRBDmt1 は 84, 85 番目のリジンアラニンに、dsRBDmt2 は 177, 178 番目のリジンアラニンに、dsRBDmt1+2 は 84, 85, 177, 178 番目のリジンアラニンに置換することで作製した。タンパク質の精製度は SDS-PAGE で確認した (図 34)。精製した変異型 PACT と二種類の siRNA (siLuc-1, siLuc-2)を用いてゲルシフトアッセイを行なったところ、PACT-dsRBDmt1 および PACT-dsRBDmt2 では、PACT が高濃度のときに PACT-WT と同様、一段階の complex (PACT-dsRBDmt1 complex 2, PACT-dsRBDmt2 complex 2)が形成された (図 35, 36)。しかしながら、 K_d は PACT-dsRBDmt1 は 1,900~3,900 nM, PACT-dsRBDmt2 は 4,600~5,700 nM であり、PACT-WT (220~401 nM)に比べ siRNA 結合活性は低かった (表 3)。また、PACT-dsRBDmt2 の方が PACT-dsRBDmt1 に比べ siRNA へのアフィニティーが低いことから、dsRBD2 の方が dsRBD1 に比べ強い RNA 結合活性をもつと考えられた。

PACT-dsRBDmt1+2 では、タンパク質が高濃度のところでも結合はほとんど見られなかった (図 37)。しかしながら、PACT- Δ dsRBD3 では、PACT-WT とは異なり、二つの複合体 (PACT- Δ dsRBD3 の complex1 と complex 2)が観察された (図 38)。二つの複合体の中では、PACT- Δ dsRBD3 complex1 が主な複合体であったが、PACT- Δ dsRBD3 の complex1 と complex 2 の K_d はほぼ同程度で、810~1,500 nM であった (表 3)。

以上より PACT の 3 つの dsRBD のうち、dsRBD1 と dsRBD2 は siRNA への結合に必要なが、dsRBD3 は必ずしも必要ではないことが明らかとなった。また、PACT-dsRBDmt2 の方が PACT-dsRBDmt1 に比べ siRNA へのアフィニティーが低いことから、dsRBD2 の方が dsRBD1 に比べ強い RNA 結合活性をもつことが明らかになった。

PACT-WT の complex 2 と変異型 PACT の complex (PACT-dsRBDmt1 complex 2, PACT-dsRBDmt2 complex 2, PACT - Δ dsRBD3 complex 1, 2)を非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動したときの移動度を比較したところ (図 39)、PACT-dsRBDmt1 と PACT-dsRBDmt2 の complex 2 は、PACT-WT の complex 2 と移動度は同程度だったが、PACT- Δ dsRBD3 complex 1 の移動度は野生型に比べ、早かった。このことから、PACT-dsRBDmt1 と PACT-dsRBDmt2 の complex 2 は、PACT-WT complex 2 と同様、二分子の PACT タンパク質を含む複合体を形成していること、また PACT- Δ dsRBD3 complex 1 は dsRBD3 が欠損していることにより、PACT-WT complex 2 よりも低分子量の複合体を形成している可能性が示唆された。

2.3.2.4. 変異型 PACT と siRNA 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー

変異型 PACT (PACT-dsRBDmt1, PACT-dsRBDmt2, PACT- Δ dsRBD3)についても同様に、ゲルシフトアッセイにより観察された複合体がそれぞれ何分子の PACT タンパク質と siRNA により構成されているのかを調べるために、Superdex 200 HR 10/30 カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、複合体の分子量を求めた。まず PACT-dsRBDmt1 (1,300 nM)または PACT-dsRBDmt2 (1,300 nM)と siLuc-1 を混合し、形成した PACT-dsRBDmt1 と PACT-dsRBDmt2 の complex 2 をそれぞれ溶出したところ、PACT-WT と同様に 130 kDa と 23 kDa 付近にピークが観察された (図 40A, B)。23 kDa

のピークは siLuc-1 であるため、130 kDa のピークが PACT-dsRBDmt1 の complex 2 または PACT-dsRBDmt2 の complex 2 であると考えられた。His タグと Myc タグを含む PACT-dsRBDmt1 または PACT-dsRBDmt2 の分子量は約 40 kDa であるため、130 kDa のピーク (PACT-dsRBDmt1 complex 2, PACT-dsRBDmt2 complex 2)は、二分子の siLuc-1 と二分子の PACT-dsRBDmt1 もしくは PACT-dsRBDmt2 を含むと考えられる。しかしながら PACT-WT と同様、モル吸光係数を用いた計算では、一分子の siRNA と二分子の PACT タンパク質を含むと考えられる結果が得られ、どちらが正しいのかは決定できなかった。。次に PACT-ΔdsRBD3 complex 1 について検討した。ゲルシフトアッセイによる結果では、PACT-ΔdsRBD3 は PACT-WT とは異なり、2 つの複合体 (PACT-ΔdsRBD3 の complex 1 と complex 2)を形成した。そこで、PACT-ΔdsRBD3 (1,300 nM)と siLuc-1 を混合し、形成した PACT-ΔdsRBD3 の complex 1 と complex 2 をゲルろ過カラムで溶出したところ (図 40C)、130 kDa と 64 kDa 付近に 2 つの複合体の溶出ピークが観察された。PACT-ΔdsRBD3 の分子量は約 33 kDa であるため、64 kDa のピークは、一分子の siRNA-1 と一分子の PACT-ΔdsRBD3 を含むと考えられた。また、130 kDa のピークは、二分子の siRNA-1 と二分子の PACT-ΔdsRBD3 を含むと考えられた。

PACT-WT の complex 2 と同様に、complex 1 に ^{32}P ラベルしていない siRNA (0-600 nM) を追加し、30 分反応後泳動したところ (図 41)、追加した siRNA の濃度の増加に伴う PACT-ΔdsRBD3 complex 1 の複合体の変化は観察されなかった。したがって、PACT-ΔdsRBD3 の complex 1 はすでに相互作用できる十分な量の siRNA を含んでいると考えられる。以上のことから、PACT-WT は一分子では siRNA に結合せず、二分子で siRNA に結合するが、PACT-ΔdsRBD3 は dsRBD3 を介したホモダイマー形成が出来なくなるにより、主に一分子で siRNA に結合すると考えられた。PACT-WT は TRBP-WT に比べ、siRNA への結合活性が低く、また dsRBD3 を介したホモダイマー形成が非常に安定であると考えられた。

2.4. 考察

TRBP と PACT はともに三つの dsRBD から成るよく似た構造をもち、RNAi 経路にお

いて、siRNA の Dicer から Ago への受け渡しを促進するという同様の機能を示すことが示唆されてきたが、本研究により TRBP と PACT の siRNA への結合様式は異なることが明らかとなった。

精製タンパク質を用いたゲルシフトアッセイでは、野生型 (TRBP-WT, PACT-WT), dsRBD1 変異体 (TRBP-dsRBDmt1, PACT-dsRBDmt1), dsRBD2 変異体 (TRBP-dsRBDmt2, PACT-dsRBDmt2), dsRBD3 欠損体 (TRBP- Δ dsRBD3, PACT- Δ dsRBD3) は siRNA に結合したが、dsRBD1 と dsRBD2 の両者の変異体 (TRBP-dsRBDmt1+2, PACT-dsRBDmt1+2) は siRNA に結合しなかった。以上のことから、TRBP と PACT はともに siRNA への結合には、dsRBD1 と dsRBD2 の両方が同時に必要であり、dsRBD3 は必要ではないことが明らかになった。また、変異型 TRBP と siRNA の K_d は TRBP-dsRBDmt1 が 250~260 nM、TRBP-dsRBDmt2 が 370~520 nM であり、dsRBD2 は dsRBD1 に比べ siRNA への結合活性が強かった。これは Daviet et al. による TAR RNA への結合活性の結果と一致する。変異型 PACT と siRNA の K_d は PACT-dsRBDmt1 が 1,900~3,900 nM、PACT-dsRBDmt2 が 4,600~5,700 nM であった。PACT も dsRBD2 は dsRBD1 に比べ siRNA への結合活性が強いことが明らかになった。

TRBP-WT の siRNA への結合は二段階で観察された (図 42A)。まず TRBP-WT は低い濃度で siRNA 一分子と TRBP-WT 一分子から成る TRBP-WT complex 1 を形成した。TRBP-WT タンパク質の濃度の増加に伴い、TRBP-WT complex 1 のバンドが薄くなり、siRNA 一分子と TRBP 二分子から成る TRBP-WT complex 2 が増加した。TRBP- Δ dsRBD3 でも同様のパターンが観察された (図 42B)。興味深いことに、TRBP-WT complex 2 や TRBP- Δ dsRBD3 complex 2 に追加する siRNA 量を増加すると、complex 2 が complex 1 に解離した。これは、complex 2 では 2 分子の TRBP-WT と 1 分子の siRNA が結合しているが、2 分子の PACT のうち 1 分子は siRNA と結合しているが、もう 1 分子の PACT とホモダイマーを形成するためと考えられる。これは、TRBP はホモダイマー形成能より、siRNA への結合活性の方が強いとめだと考えられる。

TRBP-dsRBDmt1 と TRBP-dsRBDmt2 は、低い濃度では複合体は形成せず、高い濃度で complex が形成された。また、ゲルろ過クロマトグラフィーでは、TRBP-dsRBDmt1

と TRBP-dsRBDmt2 の complex は濃度依存的に凝集し、多量体を形成する性質をもつことが示された。凝集体の分子サイズは TRBP-dsRBDmt2 による complex に比べ、TRBP-dsRBDmt1 の complex の方が大きかったことから、TRBP-dsRBDmt1 の方が安定な複合体を形成していると考えられる。

PACT-WT の siRNA への結合は一段階で観察された (図 42C)。PACT-WT は濃度が低いときは siRNA に結合せず、高い濃度で siRNA 一分子 (もしくは二分子) と PACT 二分子から成る PACT-WT complex 2 を形成した。PACT-WT complex 2 に siRNA を追加しても、complex 1 への解離は観察されなかった。これは PACT のホモダイマー形成能は siRNA への結合活性よりも強いと考えられた。

PACT- Δ dsRBD3 は 2 つの complex (PACT- Δ dsRBD3 complex 1 と PACT- Δ dsRBD3 complex 2) を形成したが、そのうち PACT- Δ dsRBD3 complex 1 が主であった (図 42D)。PACT- Δ dsRBD3 complex 1 はゲルろ過クロマトグラフィーによる結果より、一分子の siRNA と一分子の PACT- Δ dsRBD3 が含まれると考えられた。PACT は dsRBD3 を欠損すると主として complex 1 を形成したことから、dsRBD3 は siRNA への結合に必要なではないが、ホモダイマー形成には非常に重要な役割を担うドメインであると考えられた。

PACT-WT は 5.1 nM で 0.5 nM の siRNA と PACT-WT の complex 2 を形成したのに対し、PACT-dsRBDmt1 と PACT-dsRBDmt2 は、160 nM でそれぞれの complex 2 を形成した。これは dsRBD1 と dsRBD2 が協調することで、はじめて siRNA へ結合するためであると考えられた。TRBP-dsRBDmt1 と TRBP-dsRBDmt2 では濃度依存的に凝集した多量体を形成すると考えられたが、PACT-dsRBDmt1 と PACT-dsRBDmt2 では多量体の形成は認められなかった。このことから、PACT のホモダイマーは dsRBD3 を介した相互作用により非常に安定であると考えられる。

TRBP は PACT に比べ、siRNA への結合活性が強かった。これは生体内において PACT に比べ TRBP はより RNAi 経路に取り込まれやすいことを示しているかもしれない。生体内では、TRBP と PACT の siRNA との相互作用は、Dicer などその他のタンパク質による制御も受けると考えられる。しかしながら、1 分子の TRBP タンパク質は、PACT に比べ、より強いアフィニティーで一分子の siRNA と結合するのに対し、PACT は強い

アフィニティーでホモダイマーを形成し、弱いアフィニティーで 1 分子の siRNA と結合するという結合様式の違いは、siRNA の RISC-loading や、RLC の安定性に影響を与える可能性が考えられる。更に TRBP は生体内で Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Erk によりリン酸化されるという報告がある (Paroo et al. 2009)。TRBP は dsRBD1 と dsRBD2 のリンカーに位置する S142, S152 と、dsRBD2 と dsRBD3 のリンカーに位置する S283, S286 の 4 カ所のセリンがリン酸化されるが、リン酸化により、RLC が安定化され、Dicer と TRBP のタンパク質が増加すると報告されている。TRBP と PACT は生体内でヘテロダイマーを形成するが、PACT の S287 がリン酸化されると、TRBP との相互作用が弱くなるという報告もある (Singh et al. 2011)。本研究は TRBP と PACT の機能の違いを比較解析するために、siRNA という完全に相補的な二本鎖 RNA を用いて、最もシンプルな実験系を用いた解析を行った。本研究では検討していないが、miRNA や pre-miRNA を用いた解析はより生物学的な意義があるかもしれない。すなわち、miRNA や pre-miRNA は通常バルジやインターナルループなどの一本鎖 RNA 領域を含む。しかしながら、TRBP や PACT は一本鎖 RNA には結合しないことから、miRNA の二次構造により、TRBP や PACT は異なった影響を与えることが予想される。

3. DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いた siRNA 非シード領域と RLC/RISC タンパク質の相互作用の解析

3.1. 序

当研究室では RNAi 経路における siRNA とタンパク質との相互作用を調べるために、siRNA を両末端から一塩基ずつ体系的に DNA に置換して RNAi 活性を測定することで、siRNA ガイド鎖の 5'側 1-8 塩基目と、それと対合するパッセンジャー鎖の塩基を RNAi 効果が減少することなく、DNA に置換することが出来ることを明らかにしている (Ui-Tei et al. 2008) (図 6)。ガイド鎖の 5'側 2-8 塩基目はシードと呼ばれる領域で、ターゲット mRNA と塩基配列相補的に認識、対合する領域であるために、この領域は RNAi 効果が減少することなく、DNA に置換することが出来ると考えられる。一方、シード以外の領域 (非シード領域)は RNAi 効果が減少することなく DNA に置換することが出来ないが、それは非シード領域が RNA であることが必須となる機能に関わる領域であると考えられた。そのような重要な機能として、二本鎖 RNA 結合タンパク質との相互作用が考えられる (図 7)。本章ではこの非シード領域と Ago や TRBP などの RISC タンパク質との相互作用について検討した結果について考察する。

3.2. 材料と方法

3.2.1. オリゴヌクレオチド

使用したオリゴヌクレオチドは化学合成したものを用いた (Proligo, Sigma-Aldrich) (表 1, 5)。DNA/RNA キメラ型の siRNA は、ガイド鎖とパッセンジャー鎖をアニーリング buffer (10 mM Tris-HCl [pH7.5], 20 mM NaCl)中で混合し、95℃で 5 分インキュベートし徐々に室温に戻すことでパッセンジャー鎖とアニーリングした。アニーニング後、3%

アガロースゲルで泳動し、アニーリングの確認を行った。もしくは二本鎖で購入したものをを用いた。

3.2.2. 細胞の培養

ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa 細胞) とチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1 細胞) は 10% 非働化ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) (SIGMA) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen) を用いて 5 % CO₂ 存在下 37°C で培養した。マウス ES 細胞 (E14TG2a 細胞) は、20% FBS (Hyclone), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 8 µg/ml アデノシン, 8.5 µg/ml グアノシン, 7.3 µg/ml チミジン, 7.3 µg/ml ウリジン, 2.4 µg/ml チミジン, 0.1 mM 非必須アミノ酸 (Gibco), 1000 units/ml leukemia inhibitor factor (Chemicon International) を含む DMEM で培養した。*Drosophila* S2 細胞は Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco BRL) を用いて 25°C で培養した。

3.2.3. DNA/RNA キメラ型 siRNA による RNAi 効果の解析

トランスフェクションの前日に、HeLa 細胞は 1×10^5 cells / well、CHO-K1 細胞は 3×10^5 cells / well、E14TG2a 細胞は 2×10^5 cells / well、S2 細胞は 1×10^6 cells / well で 24 well の細胞培養用プレート (直径 15 mm) に播いた。ホタルルシフェラーゼ発現ベクター (pGL3-Control または pGL2-Control; Promega) (0.5 µg または 1 µg)、ホタルルシフェラーゼに対する合成 siRNA、内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター (pRL-SV40; Promega) (0.1 µg) を同時に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした。S2 細胞のトランスフェクションには、リン酸カルシウム沈殿法を用いた。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収し、ARVO sx 1420 MULTILABEL COUNTER (PerkinElmer life sciences) を用いて、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) によってルシフェラーゼの相対活性値 (ホタルルシフェラーゼ活性/ウミシイタケルシフェラーゼ活性) を測定した。使用した siRNA の配列は表 1 に示した。使用したベクターは、*E. coli* BL21 codon plus に形質転換し、Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) を用いて精製した。また E14TG2a 細胞は 0.1% ゼラチン処理したものを PBS

で洗浄したプレートを用いた。

3.2.4. 各タンパク質のノックダウンとリアルタイム PCR によるノックダウン効率の測定

トランスフェクションの前日に、HeLa 細胞を 1×10^5 cells / well で 24 well の細胞培養プレート (直径 15 mm) に播いた。各タンパク質に対する特異的な siRNA の配列は siDirect 2.0 を用いて設計した (Naito et al. 2009)。タンパク質ノックダウン用の siRNA は各 well に 25 pmol ずつ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出し、DNase 処理を行い精製した。得られた RNA はランダムヘキサマープライマーを用いて、Transcriptor High Fidelity cDNA Kit (Roche) で逆転写を行い cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を使用して、各遺伝子特異的プライマーを用いて FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) で、95°C-10 分、95°C-15 秒～60°C-1 分で 40 サイクル反応させ、各遺伝子の mRNA 量の変動を測定した。使用したプライマーは表 4 に示した。

3.2.5. 各タンパク質ノックダウンによる RNAi 効果の解析

タンパク質ノックダウン用の siRNA をトランスフェクションした 24 時間後にホタルルシフェラーゼ発現ベクター (pGL3-Control または pGL2-Control; Promega) (0.5 µg または 1 µg)、ホタルルシフェラーゼに対する合成 siRNA、内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター (pRL-SV40; Promega) (0.1 µg) を同時に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの相対活性値を測定した。使用した siRNA の配列は表 5 に示した。

3.2.6. Protein-BLAST による Dicer helicase/ATPase ドメインと相同性のあるタンパク質の検索

ヒト Dicer の Helicase/ATPase ドメインを NCBI の Protein-BLAST にて、RefSeq に登録されたタンパク質から検索した。アルゴリズムは blastp (protein-protein BLAST)を用いた。

3.2.7. 免疫沈降法による TRBP と相互作用するタンパク質の解析

トランスフェクションの前日に、HeLa 細胞 2×10^5 cells / ml を 6 ml ずつ 6 cm dish に播いた。TRBP, PACT, RIG-I, MDA5, LGP2 の発現ベクターはそれぞれ 3 μ g ずつ Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて細胞にトランスフェクションした。24 時間後、細胞をトリプシンで回収し、PBS で洗浄した。細胞は 1 ml の lysis buffer (10 mM Hepes [pH7.9], 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 0.5% NP40, 1 \times complete protease inhibitor)で氷上で 30 分溶解した。15000 rpm で 10 分遠心し、回収した上清を 48000 rpm で 30 分遠心した。回収した上清の一部は input サンプルとして分注し、保存した。抗 Myc 抗体を使用して免疫沈降を行う場合は、Lysis buffer で buffer 置換した Protein A agarose 30 μ l と 2.5 μ g を 4 $^{\circ}$ C で反応させておいた。コントロールとしてマウス IgG 2.5 μ g も反応させた。抗体を結合させた Protein A agarose に回収した上清 450 μ l と lysis buffer 50 μ l を添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。軽く遠心後、buffer を除き、wash buffer (10 mM Hepes [pH7.9], 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 0.5% NP40, 1 \times complete protease inhibitor)で懸濁したサンプルを新しいサンプリングチューブに移した。500 μ l の wash buffer で 3 回洗浄後、buffer を除き、lysis buffer 30 μ l で buffer 交換を行った。Buffer を除いた後、2 \times SDA-PAGE sample buffer を添加し、5 分間煮沸した後、10%、または 12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。

3.3. 結果

3.3.1. DNA/RNA キメラ型 siRNA の非シード領域の機能

これまでの研究により siRNA ガイド鎖の 5'末端から 1-8 塩基目と、それと対合する

パッセンジャー鎖の塩基は RNAi 効果が減少することなく、DNA に置換することが出来ることが明らかになっている (Ui-Tei et al. 2008)。この領域はシードと呼ばれる領域で、ターゲット mRNA を塩基配列相補的に認識、対合することが主な役割であるために、DNA に置換しても RNAi 効果は減少しないと考えられる。一方、非シード領域は DNA に置換すると RNAi 活性がほとんど消失することから、RNA として重要な機能を担う領域と考えられる。最も考えられるのは、二本鎖 RNA 結合タンパク質との相互作用領域である可能性である本研究では RNA であることが必須の領域をさらに詳細に解析するために、まず、ヒト子宮頸癌由来細胞 (HeLa 細胞)、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1 細胞)、マウス ES 細胞 (E14TG2a 細胞)、*Drosophila* S2 細胞を用いて、DNA/RNA キメラ型 siRNA の非シード領域を 2 または 3 塩基ずつ DNA に置換し、RNAi 効果の測定を行った。測定には、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に対する、RNAi 効果の高い二種類の siRNA (siLuc-1, siLuc-2) を用い、siRNA 濃度は 50 nM もしくは 5 nM で行った (図 43, 44)。siLuc-1 と siLuc-2 では同様の傾向が見られた。

まず、siLuc-1 または siLuc-2 の非シード領域を 2-3 塩基ずつ DNA に置換した結果、ガイド鎖の 5' 末端から 9-12 塩基目と 15-19 塩基目は両領域とも DNA に置換すると大幅に RNAi 活性が抑制されるが、13, 14 塩基目は DNA に置換しても RNAi 活性が抑制されないことが明らかとなった (図 43A, 44A)。末端領域である 19-21 塩基目の DNA 置換の効果は細胞種によって異なり、CHO-K1 細胞と S2 細胞では RNAi 効果は大幅に減少しなかったが、HeLa 細胞では、19-21 塩基目を DNA に置換すると、RNAi 効果が大幅に減少した。E14TG2a 細胞で中程度であった。これらの結果をもとに、非シード領域は 4 つの領域に分類することが出来ると考え、高い RNAi 活性のために RNA である必要がある 9-12 塩基目と 15-19 塩基目をそれぞれ A 領域と C 領域と名付けた。また DNA に置換しても RNAi 活性に大きな影響を与えない 13,14 塩基目を B 領域、末端領域である 19-21 塩基目を T 領域と名付けた (図 45)。

9-12, 15-19 塩基目を両 RNA 鎖とも DNA に置換した際にみられた RNAi 活性の減少は、ガイド鎖のみを DNA に置換した場合にも観察されたが、パッセンジャー鎖のみを DNA に置換した場合には観察されなかった (図 43B,C, 44B,C)。哺乳類細胞とは異なり、

Drosophila S2 細胞ではシード領域を DNA に置換した場合のパッセンジャー鎖が与える影響が大きかったが (図 43,44 の lane 1)、非シード領域の DNA 置換が与える影響は哺乳類細胞と同様の傾向が見られた。

3.3.2. 非シード領域の 4 つの領域を DNA に置換した影響の解析

上述の結果より、非シード領域は 4 つの領域に分類することが出来ることが明らかになったので、それらの各領域を DNA に置換した場合の RNAi 活性を測定した (図 46, 47)。シード領域は DNA に置換しても RNAi 活性に影響を与えない (lane 1, 2)。一方、すべての領域を DNA に置換した場合には RNAi 活性は完全に消失した (lane 11)。予想された通り、B 領域を DNA に置換した場合 (TCA-RNA) には、RNAi 活性の減少は観察されなかった (lane 3)。B 領域と T 領域を DNA に置換した場合 (CA-RNA) には HeLa 細胞と S2 細胞では RNAi 活性が減少したが、E14TG2a 細胞と CHO-K1 細胞では大幅な減少は観察されなかった (lane 4)。T 領域の DNA 置換が RNAi 活性に与える影響は、細胞のタイプに依存して異なっていた。これは生物種における RLC/RISC 形成の違いを示唆しているかもしれない。また A 領域または C 領域を DNA に置換した場合には RNAi 活性は抑制された (lane 5-8)。したがって A, C, T 領域は協調的に RNAi 活性に寄与していると考えられた。また、4 つの領域のパッセンジャー鎖のみを DNA に置換した場合 (lane 9) には RNAi 活性に影響はなかったが、ガイド鎖を DNA に置換した場合 (lane 10) には RNAi 活性が大幅に減少した。

3.3.3. RLC/RISC タンパク質のノックダウンが DNA/RNA キメラ型 siRNA の RNAi 活性に与える影響

ガイド鎖の 5'末端から 9-12 塩基目と 15-19 塩基目は RNA であることが望ましい領域であることが明らかとなったが、それはおそらくこの領域が RNAi 活性に必要な二本鎖 RNA 結合タンパク質の結合サイトになっているためである可能性が考えられる。その相互作用タンパク質を同定するために、RNAi 経路に関与することが知られる Ago, Dicer, TRBP, PACT タンパク質をノックダウンによる抑制が RNAi 効果に与える影響について

HeLa 細胞を用いて解析した。Ago, Dicer, TRBP, PACT に対する siRNA (siAgo2, siDicer, siTRBP, siPACT)をそれぞれ細胞にトランスフェクションした際の mRNA のノックダウン効率をリアルタイム PCR により測定したところ、Ago, Dicer, TRBP, PACT の mRNA 量はそれぞれ 24, 25, 21, 28%まで減少しており、十分にノックダウン出来ていることを確認した (図 48)。これらのノックダウンによる RNAi 効果に対する影響の測定は siLuc-1 と siLuc-2 を用いて、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に対する RNAi 活性を測定し、50% 阻害濃度 (50% inhibitory concentration: IC₅₀)を算出することで求めた (図 49, 50)。算出した IC₅₀ は、コントロール siRNA (GFP に対する siRNA)をトランスフェクションした場合の値を用いて、正規化した (図 51)。使用した siRNA の配列 (siLuc-1 と siLuc-2)により、IC₅₀ の値は異なっていたが、いずれの場合も Ago2 と TRBP をノックダウンすることによって RNAi 活性の抑制が観察された。DNA/RNA キメラ型 siRNA でも同様であった。一方、Dicer をノックダウンした場合には RNAi 活性の抑制効果は観察されなかった。Dicer は short-hairpin 型の RNA (shRNA)による RNAi では必須であることが報告されているが (Kanellopoulou et al. 2005)、siRNA や DNA/RNA キメラ型 siRNA による RNAi では必須ではないと考えられた。実際、マウスの Dicer ノックアウト細胞では siRNA は十分ノックダウン活性があるのに対して、shRNA による RNAi 効果は観察されなかった (図 52)。また、PACT をノックダウンした場合にも顕著な RNAi 活性の抑制は観察されなかった。

3.3.4. DNA/RNA キメラ型 siRNA と Ago のゲルシフトアッセイ

これまでの結果より、A, C, T 領域は RNA であることが望ましい領域であり、この領域は Ago もしくは TRBP との相互作用領域であると考えた。siRNA の 3'末端は Dicer の PAZ ドメイン、次に Ago の PAZ ドメインと相互作用すると考えられている。しかしながら Dicer のノックダウンは siRNA や DNA/RNA キメラ型 siRNA による RNAi 効果に何の影響も与えなかったため、T 領域は、Dicer ではなく Ago の PAZ ドメインとの相互作用領域になっている可能性が高いと考え、ヒト Ago1 の PAZ ドメインを大腸菌内で発現、精製し、siRNA または DNA/RNA キメラ型 siRNA とのゲルシフトアッセイを行

った (図 53)。ヒト Ago1 タンパク質の調製と、siRNA または DNA/RNA キメラ型 siRNA とのゲルシフトアッセイは前橋工科大学 善野修平教授により行われた。まず Ago の PAZ ドメインは、siRNA (lane 1)に強く結合した。また、TCA-RNA (lane 2)と TC-RNA (lane 5)においても強い結合が観察され、T-RNA (lane 7)においても弱い結合が観察された。しかしながら、CA-RNA (lane 3)、A-RNA (lane 4)、C-RNA (lane 6)との結合は認められなかった。また、3' overhang の RNA をもつ DNA/RNA ハイブリッド (lane 8)には結合したが、5' overhang の RNA をもつ DNA/RNA ハイブリッド (lane 9)には結合しなかった。更に、長い RNA の 3' overhang をもつ RNA (lane 10)には結合したが、長い RNA の 5' overhang をもつ RNA (lane 11)には結合しなかった。以上の結果から、T 領域は Ago の PAZ ドメインとの最小相互作用領域であり、C 領域は相互作用を促進する領域であると考えられた (図 57)。

3.3.5. DNA/RNA キメラ型 siRNA と TRBP のゲルシフトアッセイ

RNA であることが望ましい領域である、T, C, A 領域が TRBP との相互作用領域であるかを検討するために、大腸菌内で発現、精製した TRBP タンパク質と siRNA または DNA/RNA キメラ型 siRNA とのゲルシフトアッセイを行った。RNA の配列は siLuc-1 (図 54)と siLuc-2 (図 55)の二種類を用いた。その結果、siRNA の配列に関わらず、TRBP タンパク質が siRNA と強く結合し、TCBA-RNA、TCA-RNA、CA-RNA とも十分な結合が観察された。しかし、それ以外の DNA/RNA キメラ型 siRNA とは結合しなかった (図 56)。以上より、C, A 領域は十分な TRBP との相互作用領域になっている可能性が高いと考えられた (図 57)。、使用した RNA に対して 50%の結合を示す TRBP 濃度を算出したところ (図 54C, 55C)、siRNA では、4.0-5.3 nM であるのに対して、TCBA-RNA では 15-26 μ M、TCA-RNA では 58-70 μ M、CA-RNA では 59-64 μ M であり、1000 倍程度結合活性が低かった。 *In vitro* において siRNA と DNA/RNA キメラ型 siRNA への TRBP の結合力に約 1000 倍という差が観察されたにも関わらず、細胞内においては DNA/RNA キメラ型 siRNA の RNAi 効果は TRBP のノックダウンにより抑制された。そのため、細胞内では、TRBP を siRNA または DNA/RNA キメラ型 siRNA へとリクルートする因

子が存在するのではないかと考えられた。TRBP の相互作用因子としては Dicer が知られているが、Dicer のノックダウンは siRNA や DNA/RNA キメラ型 siRNA による RNAi 効果に影響を与えなかった。また、Dicer のノックアウト細胞を用いて siRNA による RNAi 活性と shRNA による RNAi 活性を測定したところ、shRNA による RNAi 活性は Dicer ノックアウト細胞ではほぼ観察されなかったのに対し、siRNA は十分な RNAi 活性を有していた (図 52)。以上より、siRNA による RNAi には Dicer は必要ではないことが示された。したがって、細胞内で TRBP を siRNA または DNA/RNA キメラ型 siRNA へとリクルートする因子として、Dicer と類似の他のタンパク質が存在する可能性が考えられた。

3.3.6. TRBP と相互作用する新規のタンパク質の探索

Dicer は Helicase/ATPase ドメインを介して、TRBP の dsRBD3 と相互作用する。そのため Dicer の Helicase/ATPase ドメインのアミノ酸配列を用いて Protein-BLAST により、類似性のあるタンパク質を Ref seq に登録されているタンパク質から検索した。その結果、細胞内ウイルスセンサーとして知られる、Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) および Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) の調節因子である、Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) の Helicase/ATPase ドメインが非常に相同性が高いことが明らかとなった (図 58, 59)。RIG-I, MDA5, LGP2 は RIG-I like receptors (RLRs) と呼ばれるファミリーに属するタンパク質であり、細胞内に侵入したウイルスの二本鎖 RNA や 5'ppp をもつ一本鎖 RNA を認識することで、インターフェロン応答を誘導する因子である (Yoneyama et al. 2004, Saito et al. 2007)。RNA 酵母ツーハイブリッド法を用いた実験により、Dicer の Helicase/ATPase ドメイン内の 267-431 番目のアミノ酸が TRBP との相互作用領域であることが報告されているが (Daniels et al. 2009)、LGP2 では Dicer のこの領域と相同性が高い領域が保存されているのに対して、RIG-I と MDA5 では保存されていなかった。そこで TRBP と LGP2 が相互作用する可能性を検討するために、HeLa 細胞で Myc タグのついた TRBP と共に Flag タグのついた LGP2, あるいは Flag タグのついた RIG-I を発現させ、Myc タグを用いて TRBP の免疫沈降を行うことにより、TRBP

と相互作用するタンパク質を同定した (図 60)。TRBP は PACT と相互作用することがわかっているため、ポジティブコントロールとして Myc タグのついた TRBP と Flag タグのついた PACT を発現させ免疫沈降を行ったところ、TRBP と PACT の相互作用が検出された。また、ネガティブコントロールとして用いた、TRBP と相互作用しないと考えられる EGFP は相互作用しなかった。同様の条件で、期待通りに LGP2 は TRBP との相互作用が確認されたが、RIG-I は相互作用しなかった。以上より、TRBP と相互作用する新規のタンパク質として、LGP2 を同定した。

3.3.7. RIG-like receptors (RLRs)が RNAi に与える影響

TRBP の新規相互作用因子として、RLRs の一つである LGP2 を同定した。そこで LGP2 を含む RLRs が RNAi に関与する可能性について検討するために、まず RIG-I, MDA5 あるいは LGP2 と siRNA とのゲルシフトアッセイを行った (図 61)。リコンビナント RLR タンパク質は千葉大学医学部真菌医学センター感染免疫分野の米山光俊教授より分与していただいたもので、RIG-I と MDA5 は昆虫細胞 (High five 細胞)、LGP2 は大腸菌内で発現させ、精製したものである。ゲルシフトアッセイの結果、RIG-I と LGP2 は siRNA に結合したが、MDA5 は siRNA に結合しないことが明らかとなった。RIG-I は短い二本鎖 RNA や 5'ppp をもつ一本鎖 RNA を認識し、MDA5 は長い二本鎖 RNA を認識すると報告されており、矛盾しない結果である (Takahasi et al. 2008)。

3.4. 考察

これまでの研究により siRNA には 2 つの領域があることが明らかとなっていた (図 6)。一つ目は siRNA ガイド鎖の 5'末端から 1-8 塩基目の 8 塩基の領域とそれと対合するパッセンジャー鎖の領域である。この領域はシードと呼ばれるターゲット mRNA の配列認識に関わる領域を含んでおり、主な機能はターゲット mRNA と塩基対合を形成することであると考えられるため、RNAi 活性を低下させることなく、DNA に置換することが出来ると推定される。一方、シード以外の非シード領域は RNAi 活性を低下させることなく、DNA に置換することが出来ず、二本鎖 RNA 結合タンパク質との相互作用に

必要な領域であると考えられた。本研究ではこの非シード領域は更に 4 つの領域 (T, C, B, A) に分類できることを明らかにした (図 57)。T 領域は Ago PAZ ドメインの結合に必要な最小領域であり、C 領域は Ago PAZ ドメインの結合を促進する領域と考えられた。また、A, C 領域は TRBP の結合に必要な領域であった。TRBP は dsRBD1 と dsRBD2 を介して二本鎖 RNA と結合するが、構造解析や変異導入による解析により、dsRBD1 と dsRBD2 はともに α - β - β - α 構造をとっており、3 つのアミノ酸が二本鎖 RNA への結合に関与していることが明らかにされている (Yang et al. 2010, Yamashita et al. 2011)。TRBP の dsRBD は二本鎖 RNA のメジャーグループとマイナーグループを認識するが、その間の距離は約 11 塩基長であり、DNA/RNA キメラ型 siRNA の A 領域と C 領域の長さとはほぼ一致する。二本鎖 RNA では、メジャーグループの反対側にはマイナーグループが、マイナーグループの反対側にはメジャーグループが位置しているため、siRNA の非シード領域には両側から 2 セットのメジャーグループとマイナーグループが位置することになる。そのため、TRBP の dsRBD1 と dsRBD2 はそれぞれ非シード領域において二本鎖 RNA を両側から認識し、結合する可能性が考えられる。

RNAi に関与する主要なタンパク質である Ago2, Dicer, TRBP, PACT のノックダウン実験では、Ago2 と TRBP のノックダウンは有意に RNAi 活性を抑制し、TRBP のノックダウンに比べ、Ago2 のノックダウンはより強く RNAi 活性を抑制することがわかった。一方、Dicer や PACT のノックダウンでは有意な RNAi 効果の抑制は見られなかったが、基質によっては、TRBP にかわって PACT が機能する場合もあるのかもしれない。Dicer のノックダウンは RNAi 効果にほとんど何の影響も及ぼさなかったことから、siRNA による RNAi には必要ではなかった。

In vitro でのゲルシフトアッセイの結果から、siRNA や DNA/RNA キメラ型 siRNA に対し TRBP が 50% 結合した濃度を算出したところ、DNA/RNA キメラ型 siRNA の TRBP 50% 結合濃度は、siRNA の場合に比べ、約 1000 倍高濃度であった (図 54, 55)。しかしながら、siRNA や DNA/RNA キメラ型 siRNA の細胞内での RNAi 活性は 10 倍程度の違いしかなかった。細胞内では TRBP と相互作用する、Dicer 以外の因子が存在する可能性が見出された。このような因子を探索した結果、本研究では、TRBP と相互作用す

るタンパク質として新規に LGP2 を同定した。LGP2 は細胞内ウイルスセンサーである、RIG-I や MDA5 の調節因子であることが知られている。Dicer はその Helicase/ATPase ドメイン内の 267-431 番目のアミノ酸が TRBP との相互作用領域として同定されているが、LGP2 ではこの領域の相同性が保存されている。しかしながら、RIG-I と MDA5 では保存されていなかった。実際、免疫沈降法による解析で、TRBP は LGP2 と相互作用したが、RIG-I とは相互作用しなかった。またゲルシフトアッセイにより、LGP2 は siRNA に結合することも明らかとなった。今後は、LGP2 の RNAi における機能を解析したいと考えている。一般に細胞内に二本鎖 RNA が導入された際、その二本鎖 RNA が 30 塩基以下である場合は、RNAi 経路に取り込まれ、30 塩基以上である場合はインターフェロン応答が誘導されることが考えられている。この両経路のクロストークの機構を TRBP が制御している可能性があり、興味深い。

4. アポトーシス誘導による TRBP の プロセッシング

4.1. 序

TRBP は RNAi を促進する機能をもつだけでなく、同時に、インターフェロン誘導型のプロテインキナーゼである PKR の活性化を阻害する機能を持ち、TRBP は RNAi とインターフェロン応答という二本鎖 RNA により誘導される 2 つの経路のクロストークに関わる因子であると考えられる。PKR は活性化されると、翻訳開始因子である eIF2 α をリン酸化することで翻訳抑制を引き起こし、アポトーシスを誘導する。PKR の活性化は、二本鎖 RNA もしくは PACT によって誘導される。TRBP は、PKR に直接結合し活性化を抑制すること、また PACT や二本鎖 RNA に結合することにより、PKR 活性化を間接的に抑制するメカニズムも示唆されている。本研究では、アポトーシス誘導時における TRBP の機能を考察するために、細胞を Tumor necrosis factor α (TNF α) と Cycloheximide (CHX) 処理して、検討した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 培養細胞発現用タンパク質発現コンストラクトの作製

ヒト TRBP タンパク質を培養細胞内で発現させるために、CDS 全長の C 末端に Myc-tag と His-tag を融合した TRBP-Myc-His 発現コンストラクト (pcDNA3.1-TRBP) を作製した。まず、制限酵素サイト (NdeI/NotI) を 5' 末端に付加した合成オリゴヌクレオチドを用いて、HeLa 細胞より合成した cDNA を鋳型に PCR により CDS を増幅し、同じ制限酵素で切断した pcDNA3.1 ベクターに挿入した。PCR プライマーとして用いたオリゴヌクレオチド配列は表 2 に示した。3 ヶ所の Caspase-3 切断モチーフに site-directed mutagenesis 法により変異を導入した発現コンストラクト (pcDNA3.1-TRBP D234A, pcDNA3.1-TRBP D254A, pcDNA3.1-TRBP D266A、および Caspase による切断を受けた後の TRBP N 末端側、C 末端側を発現するコンストラクト (pcDNA3.1-TRBP 1-234aa,

pcDNA3.1-TRBP 235-366aa)を作製した。pcDNA3.1-TRBP ベクターを鋳型とし、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) により、変異導入を行った。作製した発現ベクターはシーケンスによって配列を確認し、*Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 codon plus に形質転換し増幅させ、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いて精製した。

4.2.2. Caspase-3 による TRBP、PACT タンパク質の *in vitro* 切断アッセイ

In vitro caspase assay 用 buffer (70 mM Tris-HCl [pH7.5]、15 mM EDTA, 15 mM DTT, 1.25 %グリセロール)、大腸菌精製 TRBP タンパク質、Caspase-3 タンパク質 (Abcam, ab52101)をそれぞれ 4 : 1 : 1 の割合で混合し、37℃で反応した。一定時間後、反応液と等量の 2×SDS-PAGE sample buffer を加えることで、反応を停止し、5 分間煮沸した後、12.5 %変性アクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、CBB で染色した。

4.2.3. TNF α /CHX による TRBP、PACT タンパク質の *in vivo* 切断アッセイ

HeLa 細胞を 1.5×10^5 cells / well で 12well の細胞培養用プレート (直径 30 mm)に播いて翌日、pcDNA3.1-TRBP ベクター (1 ug/well)を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。更に翌日、10 ng/ml tumor necrosis factor α (TNF α) (Sigma-Aldrich), 20 μ g/ml cycloheximide (CHX, Wako)を含む培地と培地交換し、アポトーシスを誘導した。一定時間後、細胞をトリプシンを用いて回収した。遠心によって回収した細胞は RIPA buffer (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % デオキシコール酸ナトリウム, 0.1 % SDS, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1×complete protease inhibitor) で溶解し、遠心後、上清を回収して Protein assay (BioRad)を用いて定量した。12.5 %変性アクリルアミドゲルを用いて泳動した後、Western blot を行った。

4.2.4. アミノ酸 N 末端シーケンスによる Caspase-3 による TRBP 切断部位の同定

In vitro で Caspase-3 により切断された TRBP タンパク質の C 末端側の N 末端アミノ

酸シーケンスを行った。精製 TRBP と Caspase-3 を反応させた後、12.5 %変性アクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、PVDF 膜に転写した。切断された TRBP タンパク質の C 末端側のバンドを切り出し、東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻 田之倉研究室の、宮川拓也助教に解析を依頼した。

4.2.5. 免疫沈降法によるプロセッシングされた TRBP と相互作用タンパク質の解析

トランスフェクションの前日に、HeLa 細胞 2×10^5 cells / ml を 6 ml ずつ 6 cm dish に播いた。TRBP と PACT 発現ベクターはそれぞれ 3 μ g ずつ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした。24 時間後、細胞をトリプシンで回収し、PBS で洗浄した。細胞は 1 ml の lysis buffer (10 mM Hepes [pH7.9], 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 0.5% NP40, 1 \times complete protease inhibitor)で氷上で 30 分溶解した。15000 rpm で 10 分遠心し、回収した上清を 48000 rpm で 30 分遠心した。回収した上清の一部は input サンプルとして分注し、保存した。抗 Myc 抗体を使用して免疫沈降を行う場合は、Lysis buffer で buffer 置換した Protien A agarose 30 μ l と 2.5 μ g を 4°C で反応させておいた。コントロールとしてマウス IgG 2.5 μ g も反応させた。抗体を結合させた Protein A agarose に回収した上清 450 μ l と lysis buffer 50 μ l を添加し、4°C で 2 時間反応させた。軽く遠心後、buffer を除き、wash buffer (10 mM Hepes [pH7.9], 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 0.5% NP40, 1 \times complete protease inhibitor)で懸濁したサンプルを新しいサンプリングチューブに移した。500 μ l の wash buffer で 3 回洗浄後、buffer を除き、lysis buffer 30 μ l で buffer 交換を行った。Buffer を除いた後、2 \times SDA-PAGE sample buffer を添加し、5 分間煮沸した後、10%または 12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。

4.2.6. マウス TRBP ノックアウト細胞を用いたプロセッシングされた TRBP の RNAi 効果の解析

マウス TRBP ノックアウト細胞は McGill 大学の Anne Gatignol 博士より供与された。

トランスフェクションの前日に、TRBP ノックアウト細胞 1×10^5 cells / well で 24 well の細胞培養用プレート (直径 15 mm) に播いた。TRBP 発現ベクター (0.5 μ g)、ホタルルシフェラーゼ発現ベクター (pGL3-Control; Promega) (0.5 μ g)、ホタルルシフェラーゼに対する合成 siRNA、内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター (pRL-SV40; Promega) (0.1 μ g) を同時に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの相対活性値を測定した。使用した siRNA の配列は表 1 に示した。

4.3. 結果

4.3.1. アポトーシス誘導における TRBP タンパク質の観察

アポトーシス時における TRBP の機能について考察するために、TRBP-Myc 発現ベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、翌日、細胞の培地を 10 ng/ml の腫瘍壊死因子 α (Tumor necrosis factor- α : TNF α) と 20 μ g/ml シクロヘキシミド (Cycloheximide: CHX) を含む培地に交換することで、アポトーシスを誘導した。TNF α /CHX 処理後、顕微鏡にて形態観察を行ったところ、4 時間後に細胞が丸くなり、6 時間でほぼすべての細胞が浮いてくるというアポトーシスでよく見られる形態の変化が観察された (図 62A)。TNF α /CHX によるアポトーシス誘導後、0, 1, 2, 4 時間で細胞を回収し、アポトーシスマーカーである Caspase-3 の活性化と PARP の切断を Western blot で検出したところ、TNF α /CHX によるアポトーシス誘導後 2 時間で、Caspase-3 の活性化と PARP の切断が確認され、アポトーシスが誘導されたことがわかった (図 62B)。そこで Western blot で抗 Myc 抗体を用いて TRBP タンパク質を検出したところ、アポトーシス誘導後 2 時間後から TRBP がプロセシングされたと予想される約 18 kDa の新規のバンドが検出された (図 63)。

4.3.2. TRBP 内のプロセシングモチーフの検索

TNF α /CHX によるアポトーシス誘導で、TRBP は何かのプロテアーゼによりプロセシングされたと考えられる。Western blot で検出されたバンドサイズ (約 18 kDa) から、

TRBP は dsRBD2 と dsRBD3 のリンカー領域周辺でプロセシングされたと考えられた。アポトーシス誘導により活性化される代表的なプロテアーゼは Caspase である。そのため、TRBP の dsRBD2 と dsRBD3 のリンカー領域周辺に Caspase による切断モチーフが存在するのかを検索した結果、Caspase による切断モチーフ (DXXDG) と類似した配列が 231-DARDG-235, 251-FRLDG-255, 263-CTWDS-267 の 3 カ所に存在することがわかった (図 64)。そのため、234 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型 TRBP (TRBP-D234A)、254 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型 TRBP (TRBP-D254A)、266 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型 TRBP (TRBP-D266A) 発現ベクターを作製した (図 65)。TRBP-WT 発現ベクターと同様に、変異型 TRBP 発現ベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、翌日 TNF α /CHX によりアポトーシス誘導後、細胞を回収して Western blot を行ったところ、TRBP-D234A を発現させた場合でのみ、アポトーシス誘導による TRBP のプロセシングが観察されなくなった (図 66)。以上より、アポトーシス誘導により観察された TRBP のプロセシングは、D234 付近で起こることが明らかとなった。次にこの TRBP のプロセシングが TNF α /CHX により誘導される Caspase として知られている Caspase-8/6, Caspase-3 によるものであるかを検討するために、Caspase-3 阻害剤 (Ac-DMQD-CHO)、Caspase-8/6 阻害剤 (Ac-IETD-CHO)、Caspase-1 阻害剤 (Ac-YUKD-CHO) を添加し、同様に Western blot を行った結果 (図 67)、Caspase-3 阻害剤 (Ac-DMQD-CHO) を添加した場合において TRBP のプロセシングが強く抑制された。また、Caspase-3 の上流にある Caspase-8/6 の阻害剤 (Ac-IETD-CHO) を添加した場合においても中程度の抑制が見られた。一方、TNF α /CHX により活性化される Caspase-8/6 と異なり、主に炎症反応に寄与するとされる Caspase-1 の阻害剤 (Ac-YUKD-CHO) を添加した場合は、TRBP のプロセシングは抑制されなかった。以上より、TRBP はアポトーシス誘導時、TNF α /CHX により活性化される Caspase-8/6 と Caspase-3 の活性化経路によりプロセシングを受けることが明らかとなった。また、TRBP と非常によく似たタンパク質である PACT は、アポトーシスを誘導してもプロセシングされなかった (図 68)。

4.3.3. TRBP の Caspase-3 による *in vitro* 切断アッセイ

細胞内で観察された TRBP の Caspase-3 によるプロセシングが *in vitro* でも観察されるのかを調べた。大腸菌内で発現させ、精製した TRBP タンパク質と Caspase-3 タンパク質を混合し、37℃で反応させた後、反応液を変性ゲルで泳動し、CBB で染色することで、TRBP を検出した (図 69)。その結果、TRBP タンパク質のみを 37℃で反応させた場合は、TRBP のプロセシングは確認されなかったが、TRBP と Caspase-3 を混合し反応させたサンプルでは、反応後 2 時間で TRBP のプロセシングが観察された。PACT は *in vitro* でも Caspase-3 によるプロセシングは受けなかった (図 70)。また 3 つの Caspase-3 切断モチーフ内のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型 TRBP タンパク質 (TRBP-D234A, TRBP-D254A, TRBP-D266A) も精製し (図 71A)、同様に Caspase-3 と反応した結果 (図 71B)、細胞内での結果と同様に TRBP-D234A でのみ、Caspase-3 によるプロセシングが抑制された。以上より、TRBP は *in vitro* でも Caspase-3 により D234 付近でプロセシングされることが明らかとなった。

4.3.4. N 末端アミノ酸シーケンスによる TRBP の Caspase-3 切断部位の同定

Caspase-3 による TRBP のプロセシングサイトを正確に決定するために、精製した TRBP と Caspase-3 を混合し、37℃で反応させた後、反応液を変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、PVDF 膜にタンパク質を転写させた後、CBB で染色し、プロセシングされた TRBP タンパク質の C 末端側のフラグメントと一致するバンドを切り出し、東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻 田之倉研究室の、宮川拓也助教に N 末端アミノ酸シーケンス解析を依頼した。その結果、プロセシングされた TRBP の C 末端側のフラグメントのアミノ酸は N 末端側から順番に Gly-Asn-Glu-Val-Glu-Pro-Asp-Asp-Asp であり、これは TRBP が D234 と G235 の間でプロセシングを受けた場合に生成される産物と同じ配列であった (図 72)。したがって、TRBP は Caspase-3 により、D234 と G235 の間でプロセシングされると結論した。

4.3.5. プロセシングされた TRBP と PACT の相互作用

ここまでの研究により、TRBP はアポトーシスの誘導により、活性化された Caspase により D234 と G235 の間でプロセシングを受けることが明らかとなった。TRBP は 3 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) をもつタンパク質だが、これら 3 つの dsRBD を介して PACT や PKR とも相互作用することが知られている。N 末端側の 2 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD1, dsRBD2) は二本鎖 RNA への結合に関与するが、C 末端側の dsRBD3 は二本鎖 RNA には結合せず、他のタンパク質との相互作用ドメインであることが明らかになっている。TRBP は dsRBD2 と dsRBD3 の間のリンカー領域でプロセシングされるため、PACT や PKR との相互作用様式が変換する可能性が考えられる。そこで、プロセシングされる前の TRBP 発現コンストラクトに加えて、プロセシングされた TRBP (TRBP-1-234aa と TRBP-235-366aa) 発現ベクターを作製した (図 73A, 75A)。TRBP-235-366aa の mRNA の発現は確認できたが、タンパクの発現は検出できなかったことから、プロセシングされた C 末端のタンパク質は非常に不安定であると考えられた。TRBP と相互作用することが知られている PACT との相互作用を検出するために、Myc タグ付きの TRBP (TRBP-WT) とプロセシングされた N 末端の TRBP (TRBP-1-234aa) を HeLa 細胞で発現させ、Myc 抗体を使って TRBP を免疫沈降し、PACT を western blot により検出したところ、野生型 TRBP (TRBP-WT) は PACT と相互作用するが、プロセシングされた TRBP (TRBP-1-234aa) は相互作用しないことが明らかとなった (図 73B)。この結果から、TRBP はプロセシングされることにより、PACT と相互作用しなくなることが明らかとなった。

4.3.6. プロセシングされた TRBP と siRNA との相互作用

プロセシングされた TRBP と siRNA との相互作用についてゲルシフトアッセイを行うことで調べた。これまでの研究より TRBP は dsRBD1 と dsRBD2 を介して siRNA と相互作用することが明らかとなっている。N 末端に His タグ、C 末端に Myc タグを融合した TRBP-1-234aa タンパク質を大腸菌内で作製し、精製した後 (図 74A)、siRNA とゲルシフトアッセイを行った (図 74B)。その結果、TRBP 濃度の低いところで Complex 1

が観察され、TRBP 濃度の高いところで Complex 2 が観察されるという、TRBP-WT と同様の結合パターンが観察された。Kd も Complex 1 が 1.12-2.03 nM、Complex 2 が 142-608 nM であり TRBP-WT と同程度であった。したがって、TRBP は Caspase によるプロセッシングをうけても dsRBD1 と dsRBD2 を介した、siRNA との相互作用は保持されることが明らかとなった。

4.3.7. プロセッシングされた TRBP の RNAi 活性

TRBP は Caspase によってプロセッシングされると Dicer と相互作用する dsRBD3 が切り離される。このときの RNAi 活性を調べるために、ヒト HeLa 細胞における TRBP のノックダウン実験、およびマウス TRBP ノックアウト細胞を用いた野生型および変異型 TRBP 過剰発現による、RNAi 効果の測定を行った (図 75)。まず、ヒト HeLa 細胞において TRBP をノックダウンすると、RNAi 効果の抑制が観察され、TRBP は RNAi を促進する効果があることがわかる (図 75B)。次にマウス TRBP ノックアウト細胞に野生型 TRBP (TRBP-WT) 発現コンストラクトをトランスフェクションし、shRNA による RNAi 効果を測定したところ (図 75C)、TRBP-WT の発現により RNAi 効果の促進効果が観察された。一方、プロセッシングされた TRBP (TRBP-1-234aa) を発現させた場合では、RNAi 効果の促進効果は観察されなかった。以上より、TRBP は RNAi を促進する機能を持つが、アポトーシス誘導時は Caspase によるプロセッシングを受けることにより、その機能を失う可能性が考えられた。

4.4. 考察

本研究により、TRBP は通常 RNAi を促進する機能をもつが、アポトーシス誘導により Caspase が活性化されると D234 と G235 の間でプロセッシングを受け、その機能を失うような構造変換がおこると考えられた。D234/G235 は dsRBD2 と dsRBD3 の間のリンカー領域に位置する。TRBP は三つの dsRBD を持つが、N 末端側の dsRBD1 と dsRBD2 は二本鎖 RNA への結合に関与するが、C 末端側の dsRBD3 は二本鎖 RNA への結合には関与せず、主に他のタンパク質との相互作用領域として重要な機能を担うと考えられる。

実際、免疫沈降法によりタンパク質相互作用の解析では、プロセシングされた TRBP (TRBP-1-234aa)は TRBP の相互作用タンパク質として知られる PACT との相互作用が消失した。また、TRBP は dsRBD3 を介して Dicer や PKR とも相互作用するため、Dicer や PKR との相互作用様式も変換する可能性が高い。また、TRBP の相互作用因子として新規に同定した LGP2 も、その Helicase/ATPase ドメインを介して、TRBP の dsRBD3 と相互作用している可能性が高いため、TRBP のプロセシングにより、その機能が変換する可能性がある。

PACT はインターフェロン誘導型のプロテインキナーゼである PKR の活性化因子であることが知られている。一方 TRBP は PKR の活性を阻害するとされているが、その機構は不明であった。TRBP はアポトーシス誘導によるプロセシングにより PACT との相互作用が消失したが、PACT はアポトーシス誘導によりプロセシングを受けなかったことから、アポトーシス誘導により TRBP との相互作用が消失した PACT は、PKR との相互作用が増加し、PKR が活性化され、アポトーシスが促進されることが推定される (図 76)。

マウス TRBP ノックアウト細胞を用いて、TRBP-WT と TRBP-1-234aa による shRNA による RNAi 効果に対する影響を検討したところ、TRBP-WT は RNAi の促進効果があるのに対し、TRBP-1-234aa は RNAi の促進効果を持たないことが明らかとなった (図 74C)。RNAi は真核生物に広く保存された、生体維持のために重要な遺伝子制御メカニズムであり、抗ウイルス反応の一種である。アポトーシス誘導により TRBP がプロセシングされると、shRNA による RNAi 活性が減少すると考えられる。また、TNF α により誘導された Caspase の活性化は、二本鎖 RNA により誘導されたインターフェロン応答でも起こると考えられる。TRBP は、二本鎖 RNA により誘導される経路である RNAi とインターフェロン応答の両経路に関与する因子であり、両経路のクロストークの機構に深く関わる可能性が考えられる。本研究で明らかになった活性化した Caspase による TRBP のプロセシングは、両経路に影響を与えることが予想される。また、インターフェロン応答は哺乳類でのみ保存されたシステムだが、哺乳類と哺乳類以外の複数の TRBP ホモログのアミノ酸配列を比較したところ、TRBP の Caspase によるプロセシ

グモチーフは哺乳類の TRBP ホモログでのみ保存されていた (図 77)。TRBP のプロセシングとそれに伴う応答は哺乳類細胞特異的なシステムの一つであるのかもしれない。

5. 総合考察

本研究では、RNAi とインターフェロン応答の両経路に共通して関わる TRBP タンパク質の機能を、まず、siRNA との結合様式を TRBP と非常によく似たタンパク質である PACT と比較解析することにより、解析した。その結果、TRBP と PACT はともに 3 つの dsRBD をもつという非常によく似たドメイン構造をもつにも関わらず、siRNA へのアフィニティーや結合様式が異なることが明らかとなった。TRBP と PACT は共に N 末端側の 2 つの dsRBD によって siRNA と結合することによって、siRNA と結合することが明らかになったが、TRBP は PACT に比べ、siRNA との結合力は高く、モノマーで siRNA と結合する。一方、PACT は siRNA との結合力よりも自身の結合力の方が siRNA との結合力より高いため、ダイマーを形成してから siRNA と結合するという異なる結合様式を示すことが明らかになった。このことは、TRBP はもともと N 末端側の 2 つの dsRBD (dsRBD1 と dsRBD2) によってホモダイマーを形成するため、dsRBD3 を欠損してもホモダイマー形成に影響がなかったのに対し、PACT は 3 つの dsRBD の相互作用によってホモダイマーを形成するため、dsRBD3 を欠損するとホモダイマーを形成しにくくなることに起因すると考えられた。本研究では最もシンプルな二次構造の小分子 RNA である siRNA を用いたが、miRNA のように二本鎖 RNA 領域にミスマッチやバルジの入った小分子 RNA では異なる結合様式を示す可能性も考えられる。

DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いた、siRNA と RLC/RISC タンパク質との相互作用解析では、ヒト HeLa 細胞で TRBP と PACT のそれぞれのノックダウンを行うと、TRBP のノックダウンが有意に RNAi 活性を抑制したのに対し、PACT のノックダウンは有意に RNAi 活性を抑制しなかった。しかしながら、マウスの TRBP ノックアウト細胞において、PACT をノックダウンしたところ、RNAi 効果の抑制が観察された。siRNA による RNAi には TRBP がより強く関与していると考えられるが、PACT も TRBP の機能を補助するような形で関与しているのかもしれない。また、Dicer のノックダウンは siRNA や DNA/RNA キメラ型 siRNA による RNAi 活性には影響を与えなかった。そこでマウ

スの Dicer ノックアウト細胞を用いて、siRNA もしくは shRNA によって RNAi が誘導できるかどうかを解析したところ、siRNA による RNAi 活性は十分認められたのに対し、shRNA による RNAi 活性は認められなかった。この結果から、shRNA による RNAi には Dicer による shRNA のプロセッシングが必要だが、siRNA による RNAi には Dicer によるプロセッシングは必要ではないからであると考えられた。更に siRNA が RISC に取り込まれる過程には、Dicer は必要ではないことが示唆された。加えて、本研究では TRBP の新規相互作用タンパク質として LGP2 を同定した。LGP2 は細胞内ウイルスセンサーである RIG-I や MDA5 の調節因子であるため、TRBP がこれら細胞内ウイルスセンサーの調節に関与している可能性が強く示唆された。siRNA とのゲルシフトアッセイにより、LGP2 と RIG-I は siRNA に結合することも明らかになった。TRBP の LGP との相互作用領域はヘリケースドメイン内にあると推定されるので、相互作用領域を特定した上で、unwinding 活性については、検討中である。

本研究では、アポトーシス誘導における TRBP の機能変換についても調べた。TRBP はアポトーシス誘導により Caspase が活性化されると、dsRBD2 と dsRBD3 の間でプロセッシングされることが明らかとなった。TRBP は dsRBD1 と dsRBD2 を介して二本鎖 RNA と相互作用が、他のタンパク質との相互作用は、dsRBD1 と dsRBD2 を介しても行われるが、dsRBD3 が重要な役割を担っている。同様に TRBP のプロセッシングにより PKR との相互作用も消失することによって、PKR は PACT との相互作用が強くなる可能性が考えられる。さらに、実際、プロセッシングされた TRBP は PACT との相互作用が消失した。TRBP は dsRBD3 と介して Dicer と相互作用することが知られているため、TRBP はプロセッシングにより Dicer と相互作用する dsRBD3 が切り離されるが、dsRBD3 は非常に不安定なタンパク質であるため、切り離されて分解されるのかもしれない。さらに新規相互作用因子として同定した LGP2 も TRBP の dsRBD3 と相互作用していると考えられるため、TRBP の Caspase によるプロセッシングにより、TRBP と相互作用しなくなるかもしれない。

細胞内におけるウイルス応答として、RNAi と PKR 活性化によるインターフェロン応答が挙げられるが、TRBP は RNAi 促進因子であると同時に、PACT や PKR との相互作

用を介した PKR 活性化の抑制因子である。さらに TRBP のプロセッシングは RNAi 活性を減少させたが、この RNAi 活性の減少がウイルスに対する反応として、正に働くのか負に働くのか興味深い。LGP2 とも相互作用することが明らかになったため、PKR の活性化を誘導する RIG-I や MDA5 の活性調節も行っている可能性が考えられる。

ウイルスは細胞に感染すると、細胞内のシステムを利用し、増殖するが、近年ではウイルスはウイルス性の siRNA や miRNA を発現し、RNAi 経路に影響を与えることが明らかになっている。その代表的なものに、HIV-1 の TAR RNA 由来の miRNA がある。TAR RNA は HIV-1 転写産物すべての 5'末端に存在する。この TAR RNA に TRBP が結合すると、HIV-1 転写産物の翻訳が促進されるが、Dicer もこの TAR RNA に結合し、TAR miRNA を生成することが明らかになっている (Klase et al. 2007)。TAR miRNA は大量に生成されることにより、内在性の miRNA を RISC から追い出し、それらの機能を消失させる可能性が示唆されている。また、HIV-1 転写産物の 5'末端にある TAR RNA はその転写産物の翻訳を抑制するが、TAR miRNA が HIV-1 転写産物の翻訳活性を抑制、もしくは促進するのかについても大変興味深い。もともと、ウイルス性の miRNA は、DNA ウイルスであるエプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr virus: EBV)の感染細胞で初めて発見された (Pfeffer et al. 2004)。また、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: KSHV)やヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus: HCMV)、単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus: HSV)やマレック病ウイルス (Marek's disease virus: MDV)などの DNA ウイルスでもウイルス性の miRNA が見つかっている (Ganem et al. 2008, Dolken et al. 2009, Boss et al. 2009)。HSV や MDV では潜伏期にウイルス性の miRNA が転写されることが明らかとなっており、ウイルス性の miRNA がウイルスの潜伏を制御する可能性も示唆されている (Boss et al. 2009)。レトロウイルスのウイルス性 miRNA は当初検出されないという報告が複数なされたが (Pfeffer et al. 2005, Lin and Cullen, 2007)、次世代シーケンサーを用いた解析により、HIV-1 感染細胞で複数のウイルス性小分子 RNA が発現していることが明らかになった。またその中で最も発現量が高かったのは、TAR RNA であった (Yeung et al. 2009)。TRBP は RNAi、インターフェロン応答、更に TAR-RNA を介した HIV-1 の複製にも関与して

おり、二本鎖 RNA により誘導される経路に多様な機能で関与し、クロストークを促進していると考えられる。今後はこれら二本鎖 RNA により誘導される経路と TRBP の機能について、ウイルス応答という観点からも解析を進めたいと考えている。また、細胞内には内在的に二本鎖 RNA が存在するが、TRBP が細胞内でどのような二本鎖 RNA 領域と相互作用しているのかについて、次世代シーケンサーを用いた網羅的な情報科学的解析も行いたいと考えている。その際、TRBP と非常によく似たタンパク質である PACT についても比較解析を行いたい。

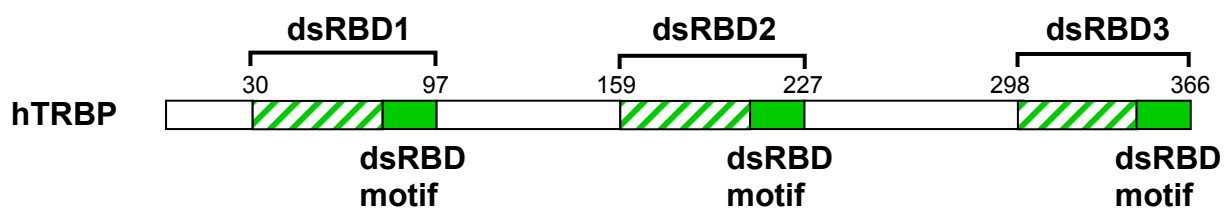


図1 ヒトTRBPのドメイン構造

ヒトのTRBPは3つのdsRBD (dsRBD1, dsRBD2, dsRBD3)をもつ。dsRBDの中で二本鎖RNAとの結合に強く関与していると考えられる領域をdsRBD motifと記した。

Human	-----MSEEEQSGSTTTGCGLP-----SIEQMLAANPG	28
Fly	MDQENFHGSSLPQQLQNLHIQPPQASPNVQTFAPRRHYNNLVGLGNG-----NAVSGSP	56
Worm	-----MDLTKLTFESVFGGSDVPMKPSR-----SEDNKTTP	30
Zebrafish	-----MNDEKSQDNGKRNSGYT-----SIEQMLAVNPG	28
Frog	-----MLASSPG	7
Pigeon	-----MLAASPG	7
Lizard	-MRLAGRGGGGGGGPWLPLSRPLSAGLEGGRKCGGGSGGAGGNERGGGGGALREREERRRQVKDAPRGIEQMLASNPG	79
Shrimp	-----MYHQPPP-----NVDSSSN	14
dsRBD1		
Human	KTPISL-LQEYGT-----RIGKTP-----VYDLL-----KAEGQA-----HQPNTF	63
Fly	VKGAPL-GQRHVKLKKEKISAQVAQLSQPGQLQLSDVGDPALAG-GSGLQ-----GGVGLMGVILPSDEALK	121
Worm	RNRDTDLEMLKKTPLMVLEEA-----AKAVYQKTPWGTVELPEGFEMTLILNEITVKGQA-----TSK	89
Zebrafish	KTPISL-LQEYGT-----RIGKTP-----VYDLL-----KAEGQA-----HQPNTF	63
Frog	KTPISL-LQEYGT-----RVGKTP-----VYDLL-----KAEGQA-----HQPNTF	42
Pigeon	KTPISL-LQEYGT-----RVGKTP-----GYDLL-----KAEGQA-----HQPNTF	42
Lizard	KTPISL-LQEYGT-----RIGKTP-----VYDLL-----KAEGQA-----HQPNTF	114
Shrimp	VEGMSG-ALPSKTPVSLLOE-----LCMRGIGSP-----KYDLL-----QIEGAV-----HEPTFV	59
*		
Human	FRV--TVGDTSCST-----GQGSPSKKA-----AKHKAAEVALKHLKGGG	99
Fly	FVSETDANGLAMKTPVSILOELLSRRGITPGYELVQIEGAIHEPTFRFVSFKDKD-----TPFTAMGAGRSKKEAKH	194
Worm	KAARQKAAVEYLR-----KVVEKGKHEIFFIPGTTKEEALSNIDQISDKA	134
Zebrafish	FRV--SVGDINCT-----GHGSPSKKA-----AKHKAAEVALKHLKGGM	99
Frog	FRV--SVGDINCT-----GQGSPSKKA-----AKHKAAEVALSLLKEGE	78
Pigeon	FRV--TVGDISCT-----GQGSPSKKA-----AKHKAAEVALKHLKGGD	78
Lizard	FRV--TVGDISCT-----GQGSPSKKA-----AKHKAAEVALRLLKGGN	150
Shrimp	YRV--TVGEFAAN-----GSGQSKKK-----AKHAAKAVLDIIQGG	95
*		
dsRBD2		
Human	MLEPALED-----SSFSPLDSSLPEDIPVFTAAAAATPVPSVVLTRSPMELQPPVSPQSECNPV--GALOELV	168
Fly	AAARALIDKLIGAQLPESPSSAGPSVTGLT-----VAGSGGDGNANATGG-----GDASDKTVGNPIGWLOEMC	259
Worm	EELKRSTS-----DAVQDN-----DNDDSIPTSAEFP-----PGISPTN--NWVG--KLQEK--	177
Zebrafish	LGGIG--G-----NGMEGDGFVGIEME-----GECPOSEMKSSE-----STQQAECNPV--GALQELV	148
Frog	MFG--V--M-----CEENSVVLSVEQPAELKEVADVSPPTTRNHTIEMKPL-----SAQQSECNPV--GALQELV	139
Pigeon	ML--DPPS-----PEEPRLGGTGPPQ-----TRGTPLDMKPPV-----SPQSECNPV--GALQELV	127
Lizard	MLEPA--A-----MEETRSPMEL-----KSPV-----SPQSECNPV--GALQELV	188
Shrimp	AAGAGGPT-----SGGAPGAPPEL-----STQIVSPYD-----DGIPG--NPV--GSLQELC	138
Human		
Human	VQKGWRLPEYTVTOESGPAHRKEFT-MTCRVERFIEIGSGTSKKLAKRNAAAKML----LRV-----HTVPLDAR-----	233
Fly	MQRRWPPPSYETETEVGLPHERLFT-IACSILNYREMKGKSKKIAKRLAAHRM-----MRLQETPIDSGKISDSICGEL	334
Worm	SQKSKLQAPIYEDS-KNERTERFLVICTMCNQKTRGIRS-K-KKDAKLNAAWLMWKALEDGIESLE-SYDMVDVI-----	248
Zebrafish	VQKGWRLPEYTVTOESGPAHRKEFT-MTCRVERFIEIGSGTSKKLAKRNAAAKML----SRI-----HDVPVDMR-----	213
Frog	VQKGWRLPEYTVTOESGPAHRKEFT-MTCRVERFIEIGSGTSKKLAKRNAAAKML----LQI-----HQVPAEHR-----	204
Pigeon	VQKGWRLPEYTVTOESGPAHRKEFT-MTCRVERFIEIGSGTSKKLAKRDAAAKML----VRI-----HNVPMEP-----	192
Lizard	VQKGWRLPEYTVTOESGPAHRKEFT-MTCRVERFIEIGSGTSKKLAKRNAAAKML----VRI-----HNVPLDPR-----	253
Shrimp	MARRWPPPTYELTSEEGFHERTFIS-IACITGNTREITGKSKKLAKRQAAYKMTQLLKDQFVEAPQVNVLADDD-----	212
** ** *		
Human		
Human	----DGNEVEPDDDHFSIGVGSRLDGLRNRGPCTWDSLR-NSVGEKILSLRSCSLGSLGALGPACCRVLSELSEEQ--A	306
Fly	EGEPRSEN--YYGELKDISVPTLTQHNSNKVSQFHKLTK-NATGKKLLKLQKTCL-----KNNKIDYIKLLGEIATEN	405
Worm	----ENLEEAEHLLEIQDAQSKIKDKHSALIDILSDKKRFSYDSMDFNVLSVS-----TMGIHQVLLLEISFRRLVS	315
Zebrafish	----SSHEAEAEEDTFNMQIGGRLEGKSKGLGCTWDSLR-NSAGEKILQLRCHPLGQSDSIDSNFCSLRELSEEQ--R	286
Frog	----ESGETEPEEDQFS--VG-KLDGSRSRGTACTWDSLR-NSSGEKILHLRSNPL--TILSSGFCSLQLDLSEEQ--S	271
Pigeon	----DGSEAE-----GDEEQFCMAGPR-RE-GLR-----GRPPPGFLQELSEEQ--S	231
Lizard	----EGSEAEVEEDQFSITAGNKMVGKRGSGCTWDSLR-NSAGEKILHLKSNPL--GVINAGFCSLLEELSEEQ--S	323
Shrimp	-DEIAQKLAARYSGL-KDSKVLSTTSDSRKVSHFHKNLK-QSPGKKLHELQTIISL-----NVNLFVQMLQDIAQEAN	284
Human		
Human	-FHVSYLIDIEELSL-----SGLCQCLVELSTPATVC-----HGSATTREAAARGEAAARRALOYLKIMAGSK	366
Fly	QFEVTVYDIEEKT-----SGQFQCLVQLSTLPVGV-----HGSGPTAADAQRHAAQNALEYLKIM-TKK	465
Worm	-PDPDDLEMGAEHTQTTEIMKATAEKEKLRKNMPSDGLVFAHGSSAEAKQACKSAIHFNTYDFTD	385
Zebrafish	-FGVSYLDIEERSL-----SGLYQCLVELSTQPTITVC-----HGFASSLDAARASAAHNALQYLKIMAGGK	346
Frog	-FOISYLDIDERSL-----SGLCQCLVELSTQPTTVC-----HGSATTDAARANAAHNALQYLKIMAGGK	331
Pigeon	-FAISYLDIDALSL-----SGLHQCLVELSTQPATVC-----HGSASRDGARSQAARNALQYLKIMAGGK	291
Lizard	-FDISYLDIDEMSL-----SGLYQCLVELSTQPTTVC-----HGSATSRHAARVDAARNALQYLKIMAGGK	383
Shrimp	-FVVTVYDIEELSV-----SGQHQCLVQLSTLPVAVC-----YGTGANVKEAQSAAHNALEYLRIMT-NK	343
* * * *		
dsRBD3		

図3 ヒトと哺乳類以外のTRBPのアミノ酸配列の比較

ヒト (Homo sapiens, NP_599150)、ハエ (Drosophila melanogaster, NP_609646.1)、線虫 (Caenorhabditis elegans, NP_499265.1)、ゼブラフィッシュ (Danio rerio, NP_956291.1)、カエル (Xenopus laevis, NP_001085574.1)、ハト (Columba livia, XP_005514793.1)、トカゲ (Anolis carolinensis, XP_003216784.1)、エビ (Penaeus monodon, AGD 81191.1) のアミノ酸配列を比較し、ヒトのTRBPと異なるアミノ酸を赤字で示した。また、すべての生物で同じアミノ酸には “*”、類似性の高いアミノ酸には “.” を記した。

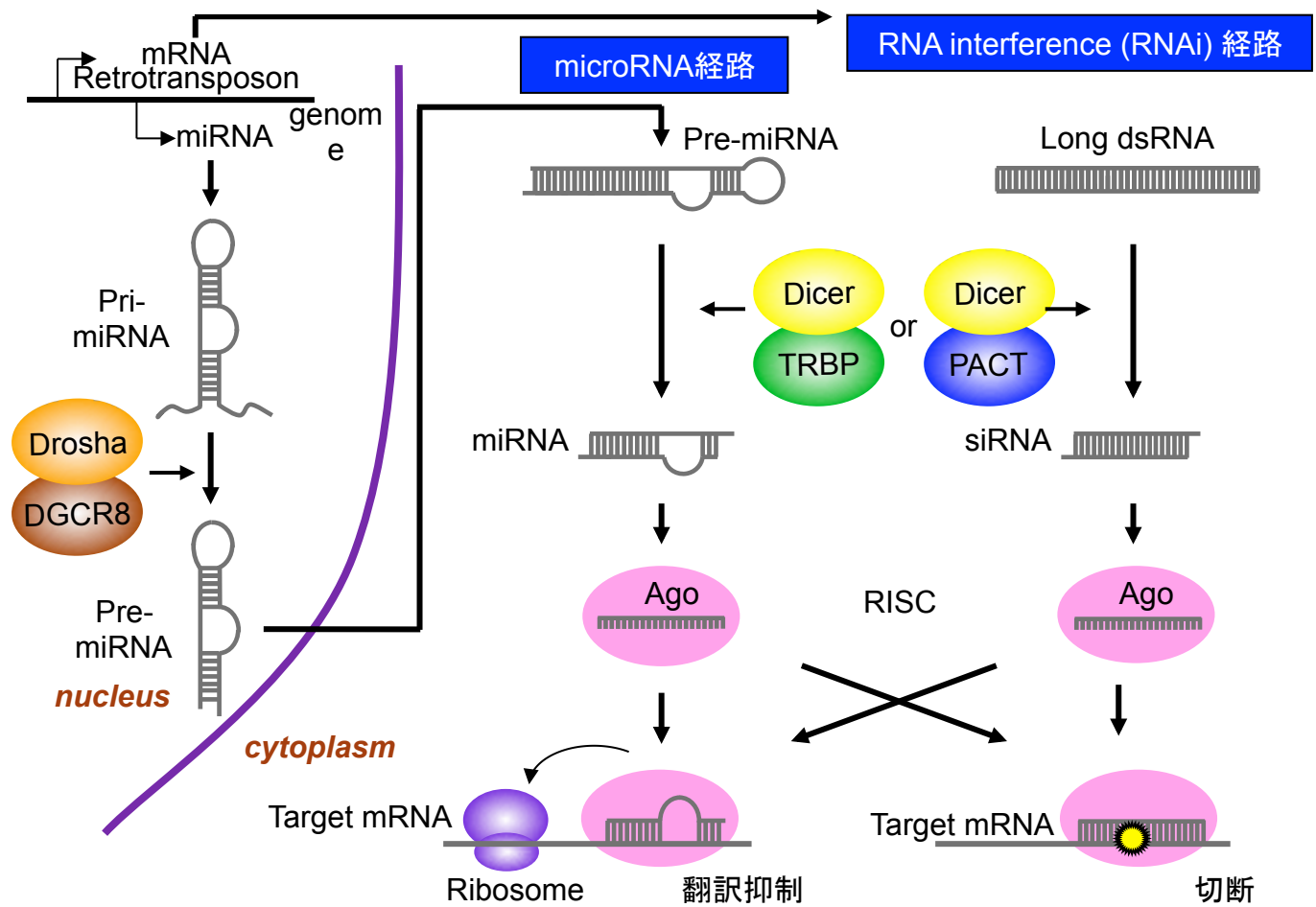


図5 小分子RNAによる遺伝子サイレンシングの概略

DNA/RNA キメラ型siRNA

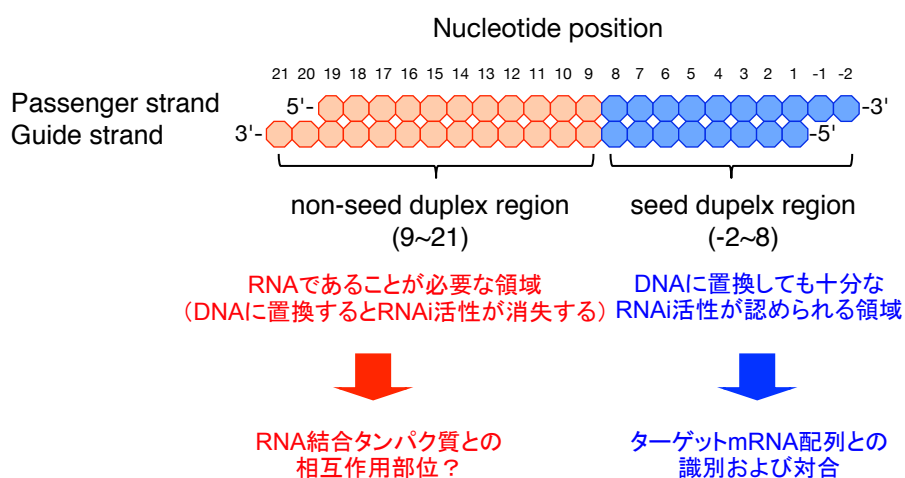


図6 DNA/RNAキメラ型siRNA

siRNAガイド鎖5'側から1-8塩基と、それと対合するパッセンジャー鎖の塩基はDNAに置換してもガイド鎖のRNAi効果が十分認められるが、9-21塩基はDNAに置換するとRNAi効果が大きく減少する。RNAを赤、DNAを青で示した。

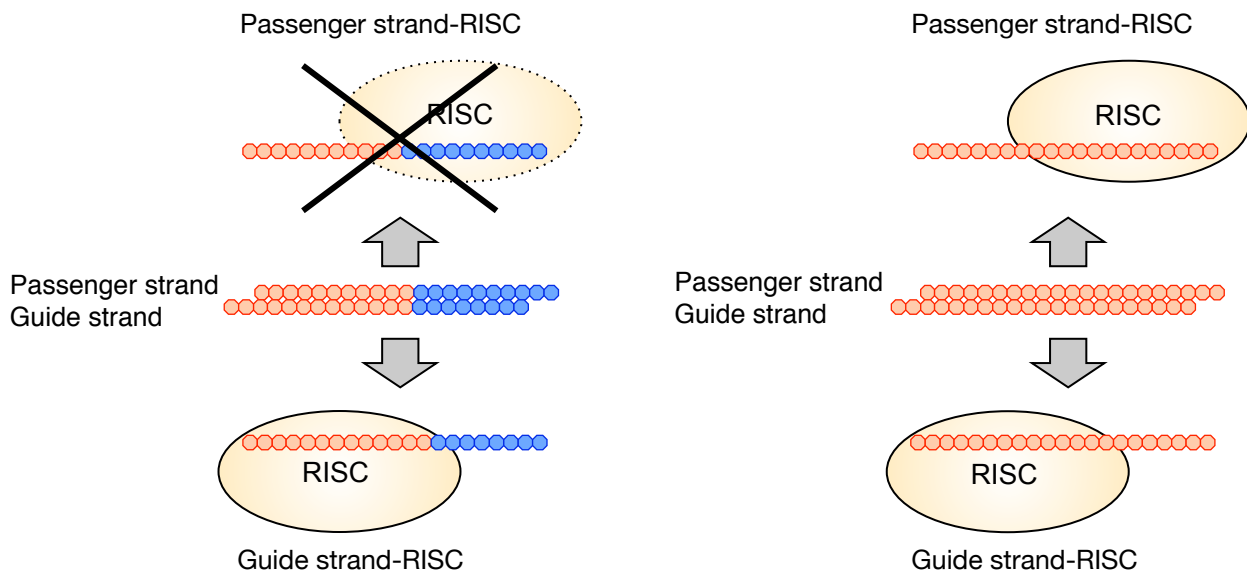


図7 DNA/RNAキメラ型siRNAまたはsiRNAにより形成されるRISCの模式図
DNA/RNAキメラ型siRNAではガイド鎖のみがRISCに取り込まれるが、パッセンジャー鎖は取り込まれない。一方、siRNAではガイド鎖とパッセンジャー鎖の両方がRISCに取り込まれるため、二種類のRISCが形成される。RNAを赤、DNAを青で示した。

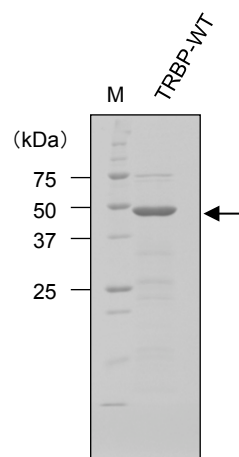


図8 精製したTRBP-WTの電気泳動パターン

精製したTRBP-WTタンパク質を12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、CBBで染色した。

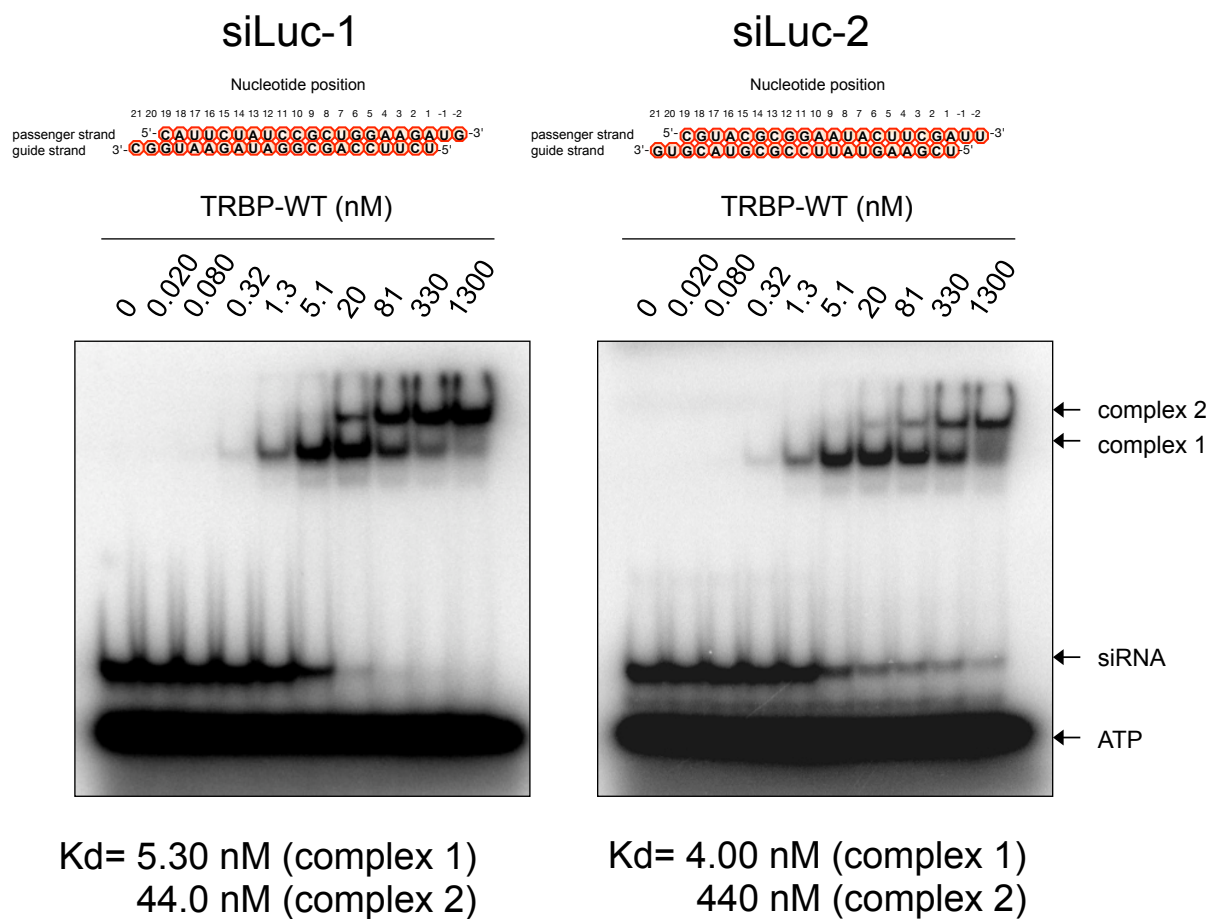


図9 TRBP-WTとsiRNAのゲルシフトアッセイ

³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

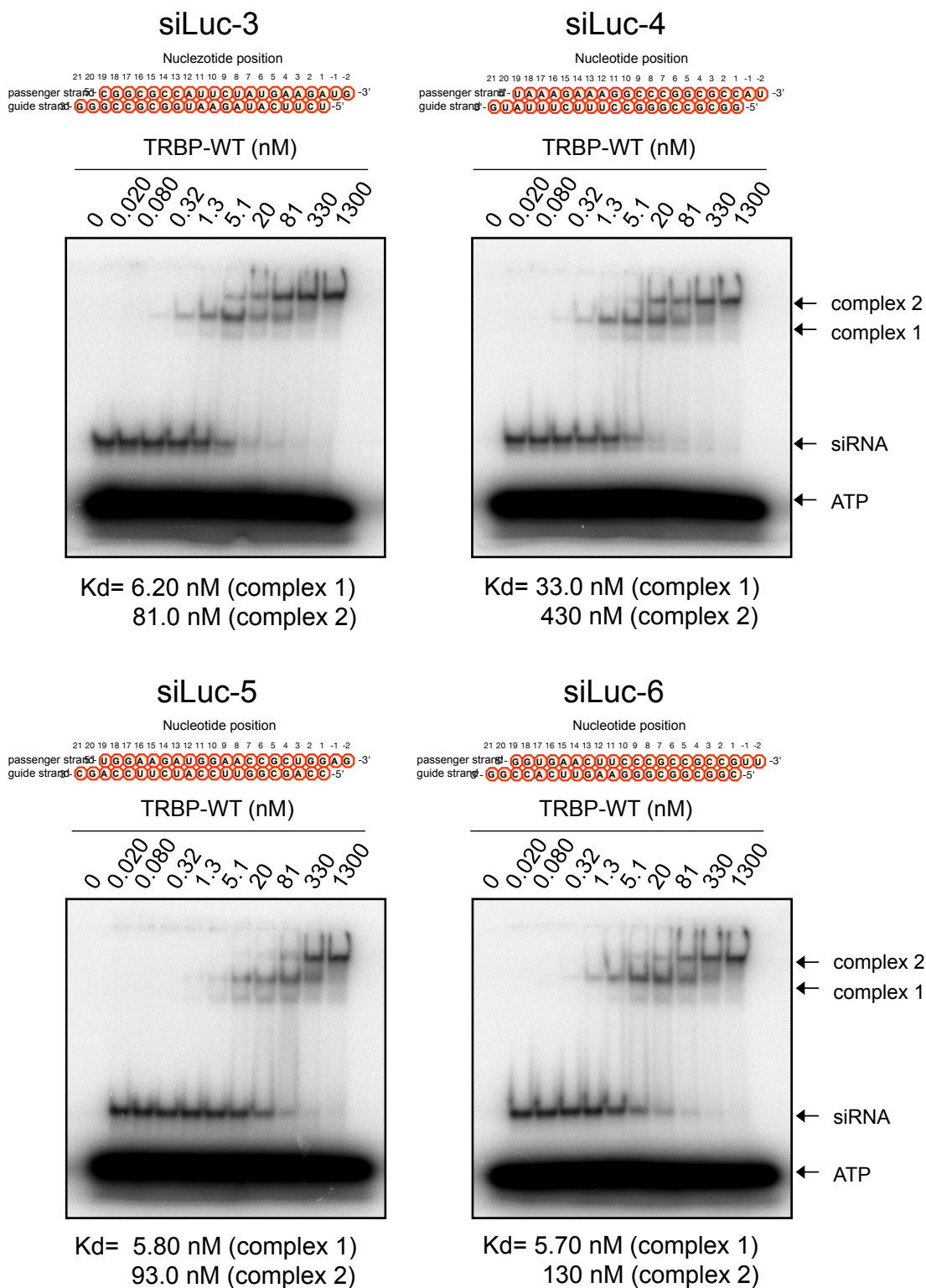


図10 TRBP-WTとRNAi効果の異なるsiRNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはRNAi効果が中程度のsiRNA (siLuc-3、siLuc-4)とRNAi効果が低いsiRNA (siLuc-5、siLuc-6)の4つの配列を用いた。

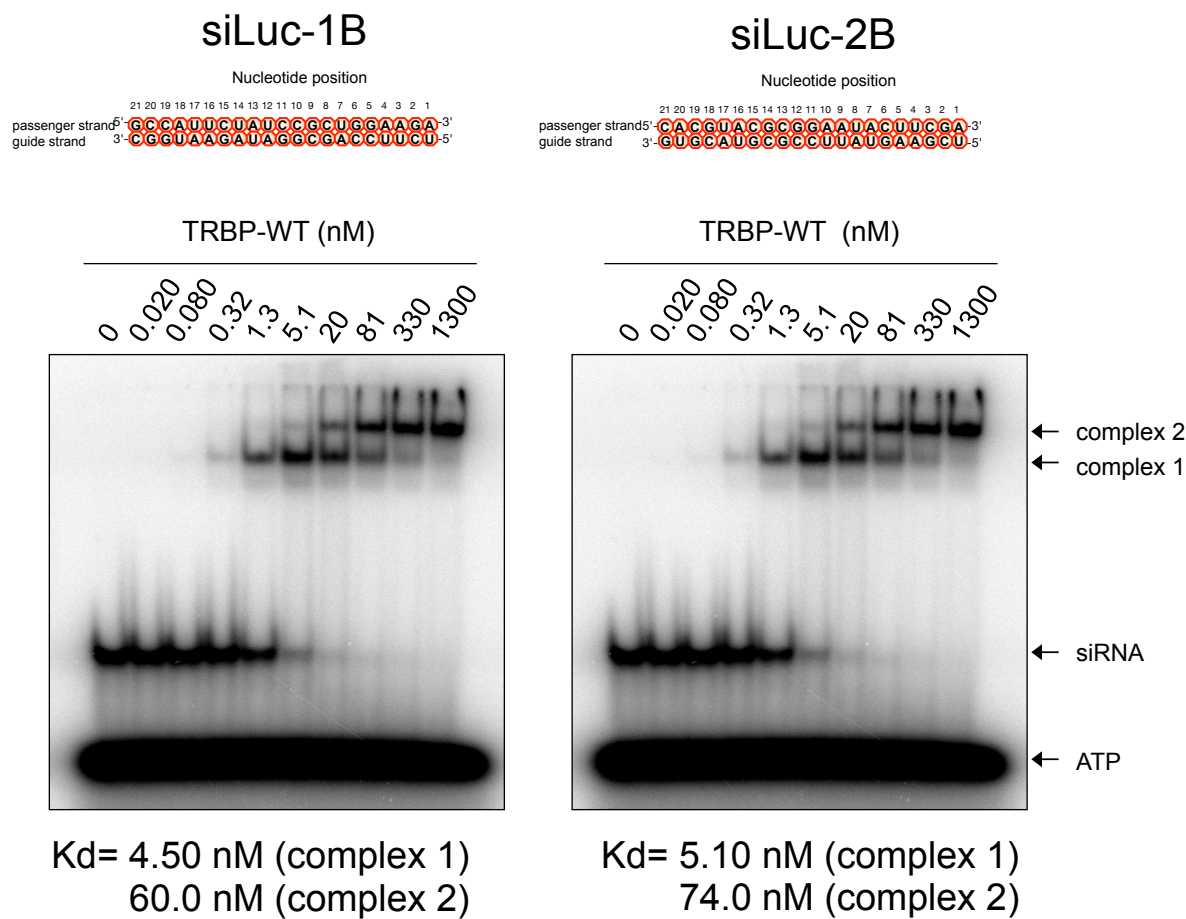


図11 TRBP-WTと平滑末端の二本鎖RNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、
 非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1BとsiLuc-2Bの2つの配列を用いた。

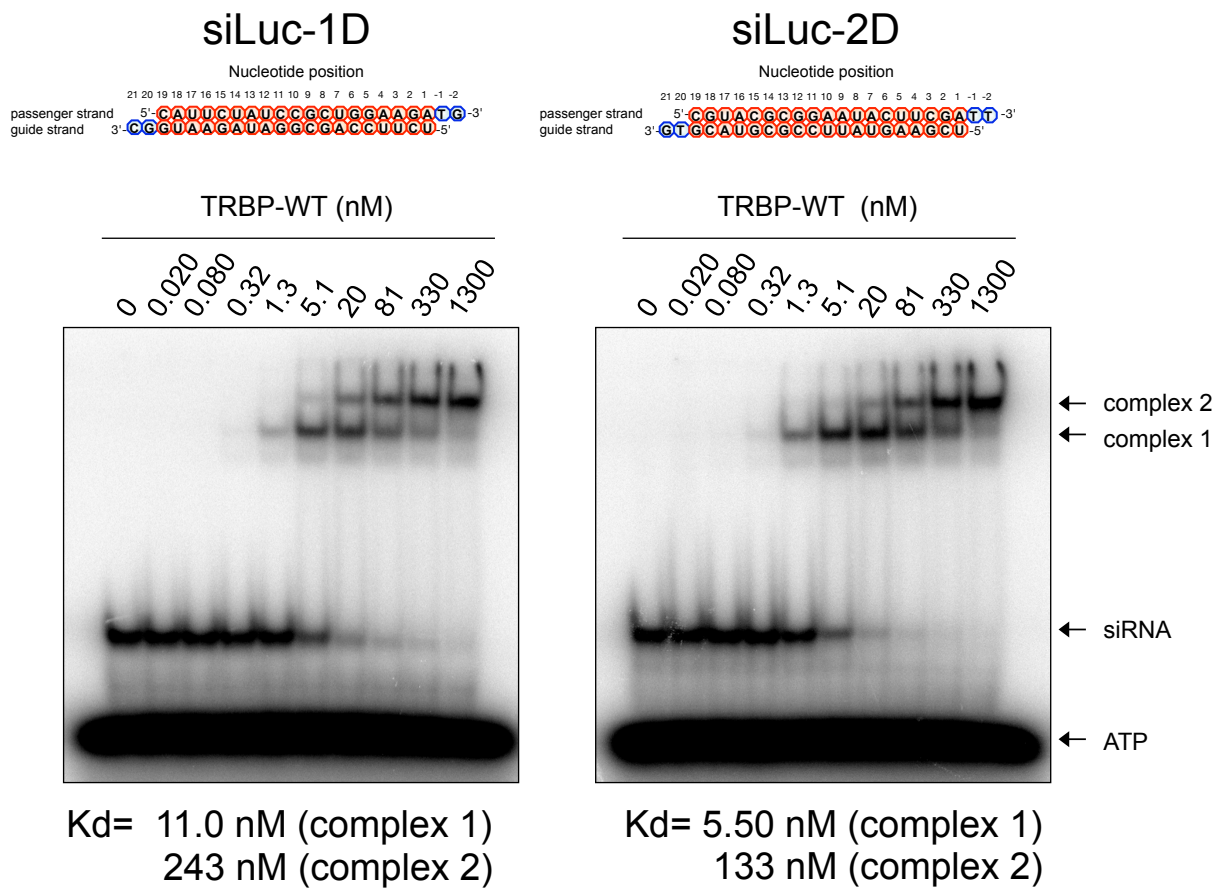


図12 TRBP-WTと3'突出部分のDNAの二本鎖RNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1300 nMのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1DとsiLuc-2Dの2つの配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

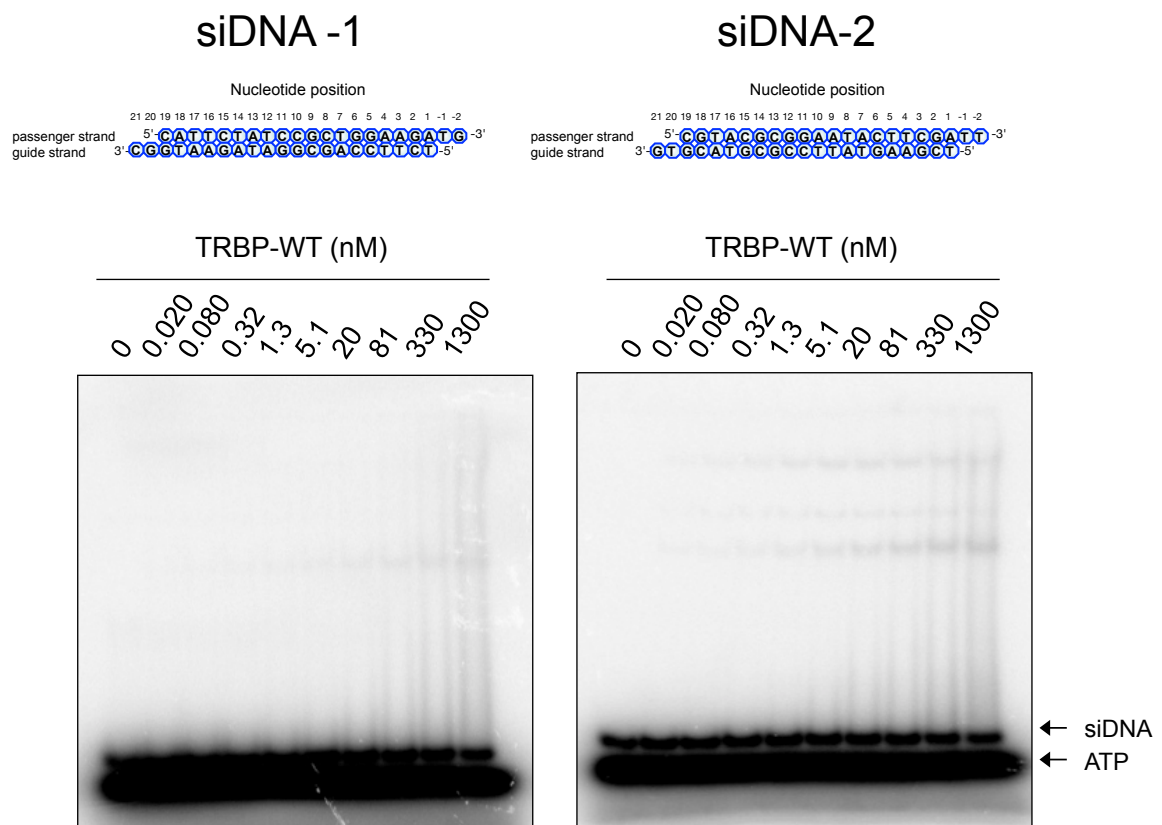


図13 TRBP-WTと二本鎖DNA (siDNA)のゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiDNAと0-1,300 MのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。二本鎖DNAはsiDNA -1とsiDNA -2の2つの配列を用いた。DNAは青で示した。

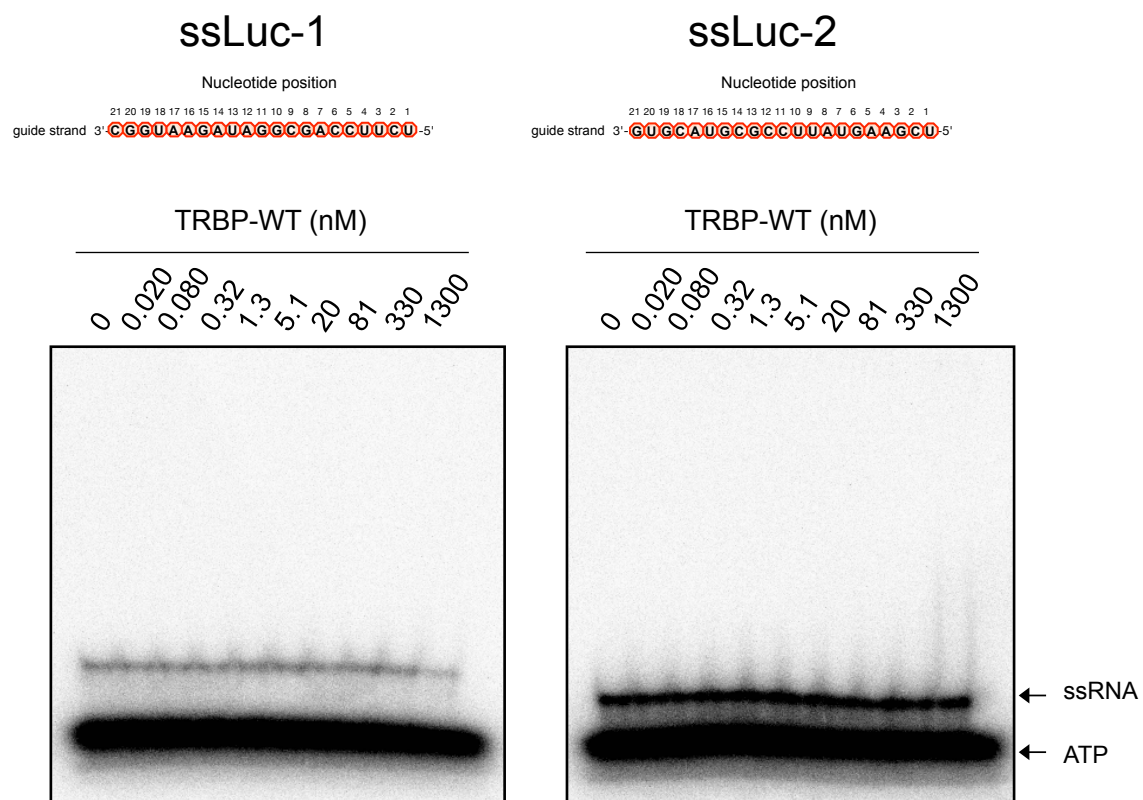


図14 TRBP-WTと一本鎖RNA (ssRNA)のゲルシフトアッセイ

^{32}P ラベルした0.5 nMのssRNAと0-1,300 nMのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。一本鎖RNAはssLuc-1とssLuc-2の2つの配列を用いた。

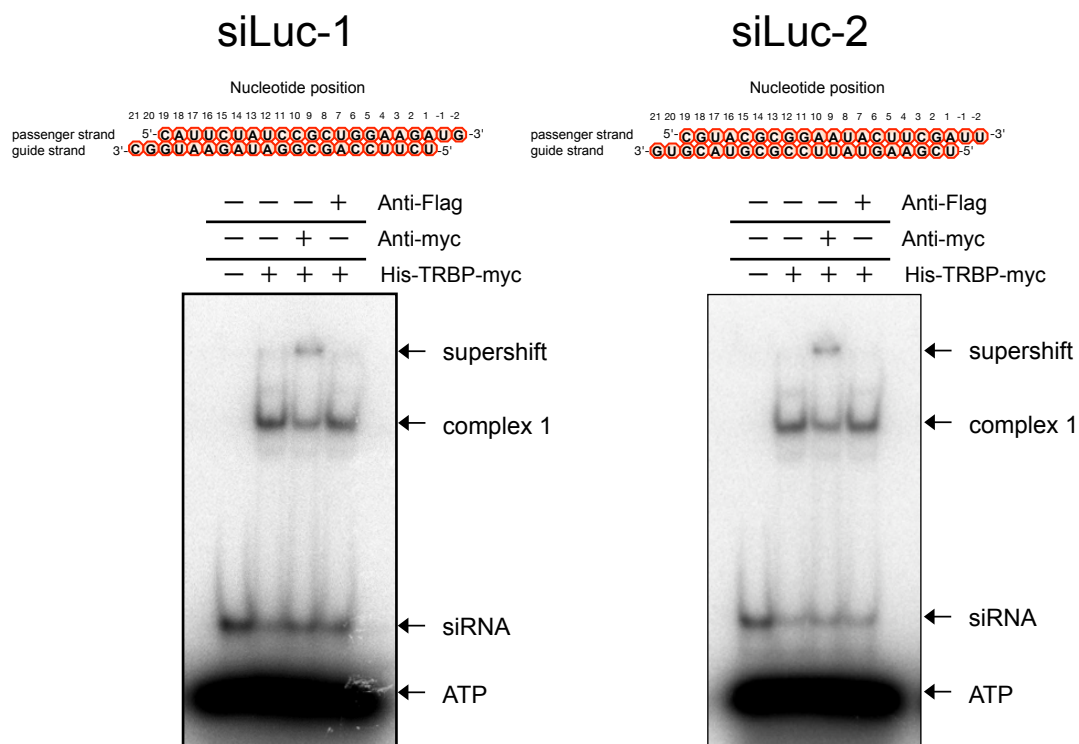
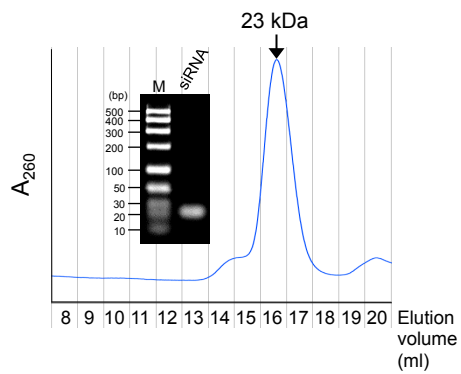


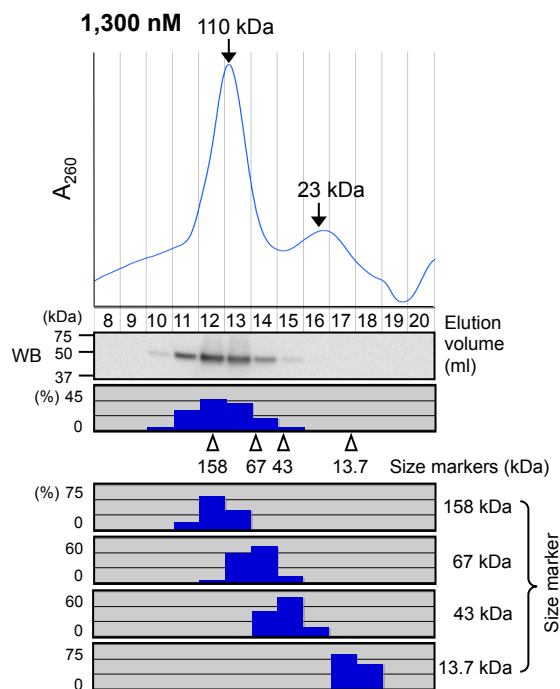
図15 TRBP-WTとsiRNAの特異的結合の確認

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと1.3 nMのTRBP-WT、抗Myc抗体、もしくは抗Flag抗体を氷上で混合し、60分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

A siRNA



B TRBP-WT + siRNA



C TRBP-WT + siRNA

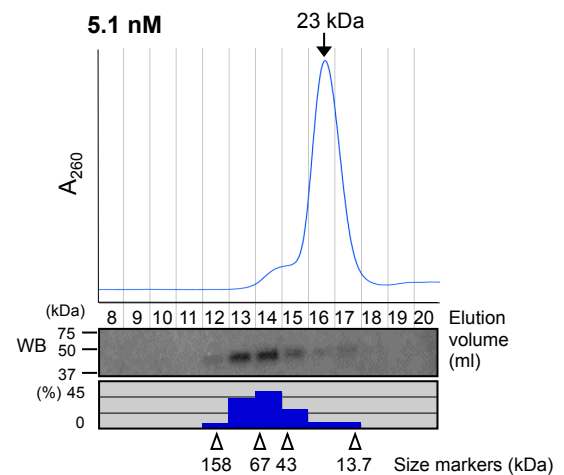


図16 TRBP-WTとsiRNAのゲルろ過クロマトグラフィー
siRNAのみ (A)、siRNAと1,300 nMのTRBP-WT (B)、siRNAと5.1 nMのTRBP-WT (C)をSuperdex 200 HR 10/30 カラムで溶出した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

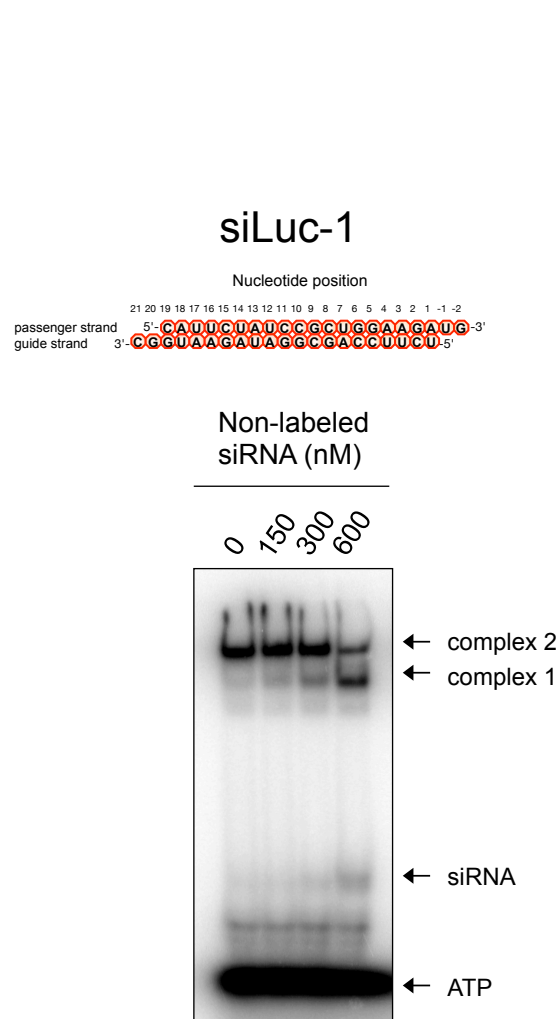
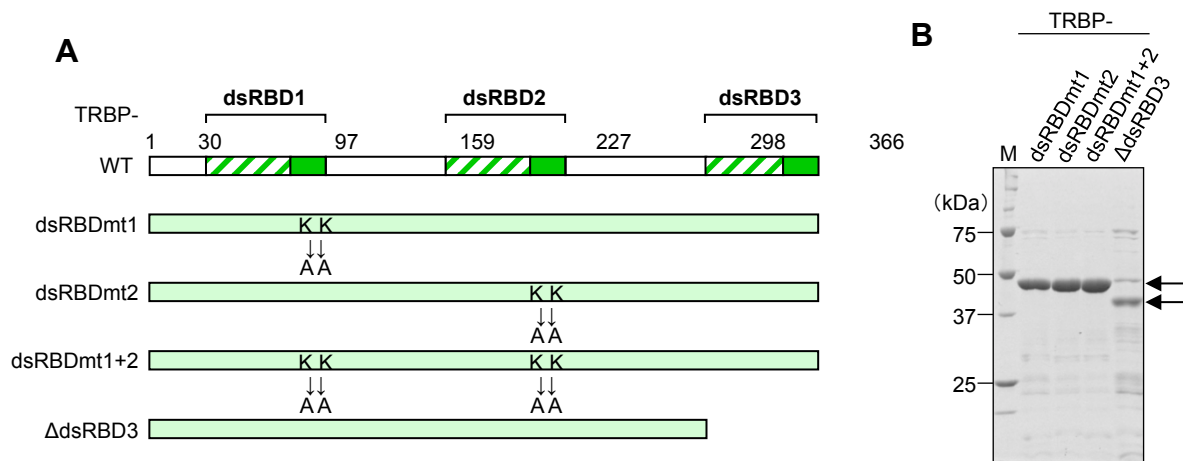


図17 TRBP-WTとsiRNAの競合実験

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと1300 nMのTRBP-WTを混合し、30分反応後、 ^{32}P ラベルしていないsiRNAを0-600 nM加え、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。



- TRBP-dsRBDmt1 : dsRBD1の80番目と81番目の リジンをアラニンに置換
- TRBP-dsRBDmt5 : dsRBD2の210番目と211番目のリジンをアラニンに置換
- TRBP-dsRBDmt1+2 : dsRBD1の80番目と81番目、dsRBD2の210番目と211番目の
リジンをアラニンに置換
- TRBP-ΔdsRBD3 : dsRBD3の298～366アミノ酸 を欠損

図18 変異型TRBPの作製

(A) TRBPのそれぞれのdsRBDに変異を導入した変異型TRBPを作製した。

(B) TRBP-WTと同様の方法で大腸菌で発現、精製し、12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した後、CBBで染色した。

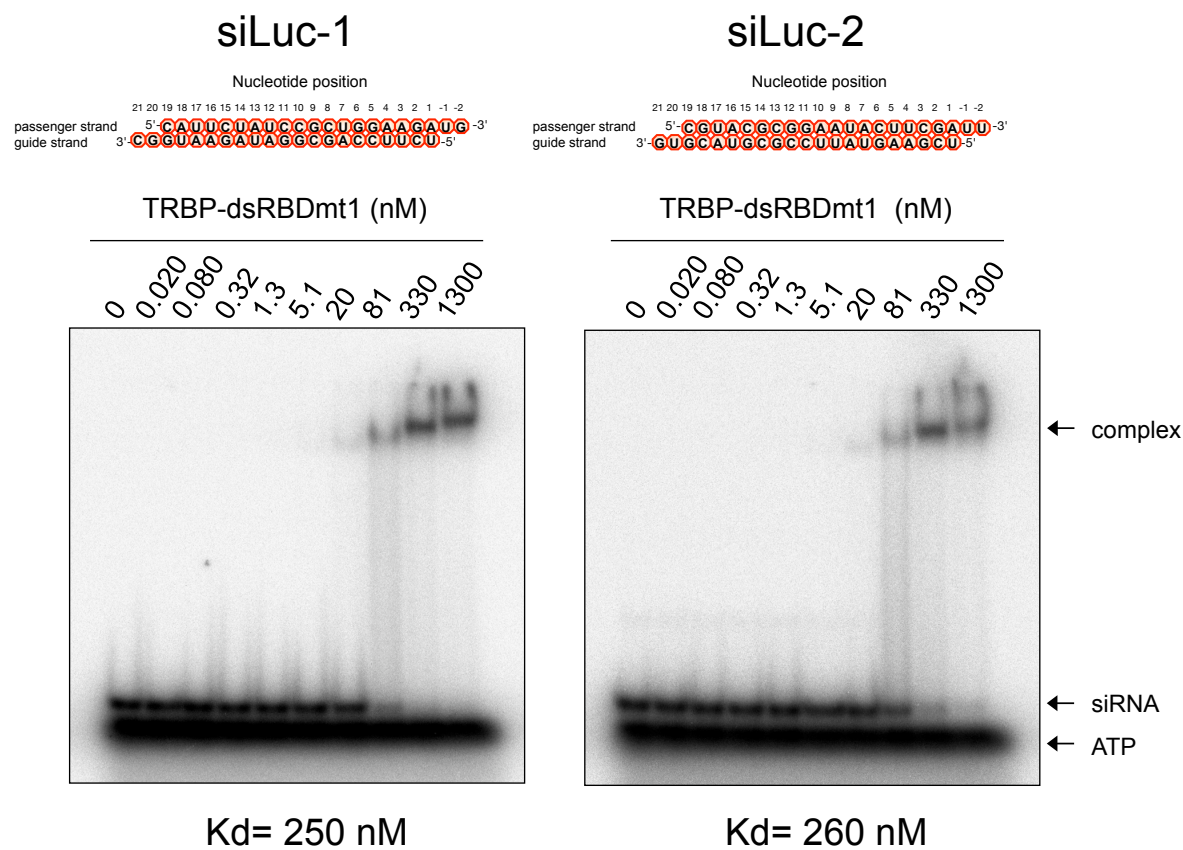


図19 TRBP-dsRBDmt1とsiRNAのゲルシフトアッセイ

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1300 nMのTRBP-dsRBDmt1を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

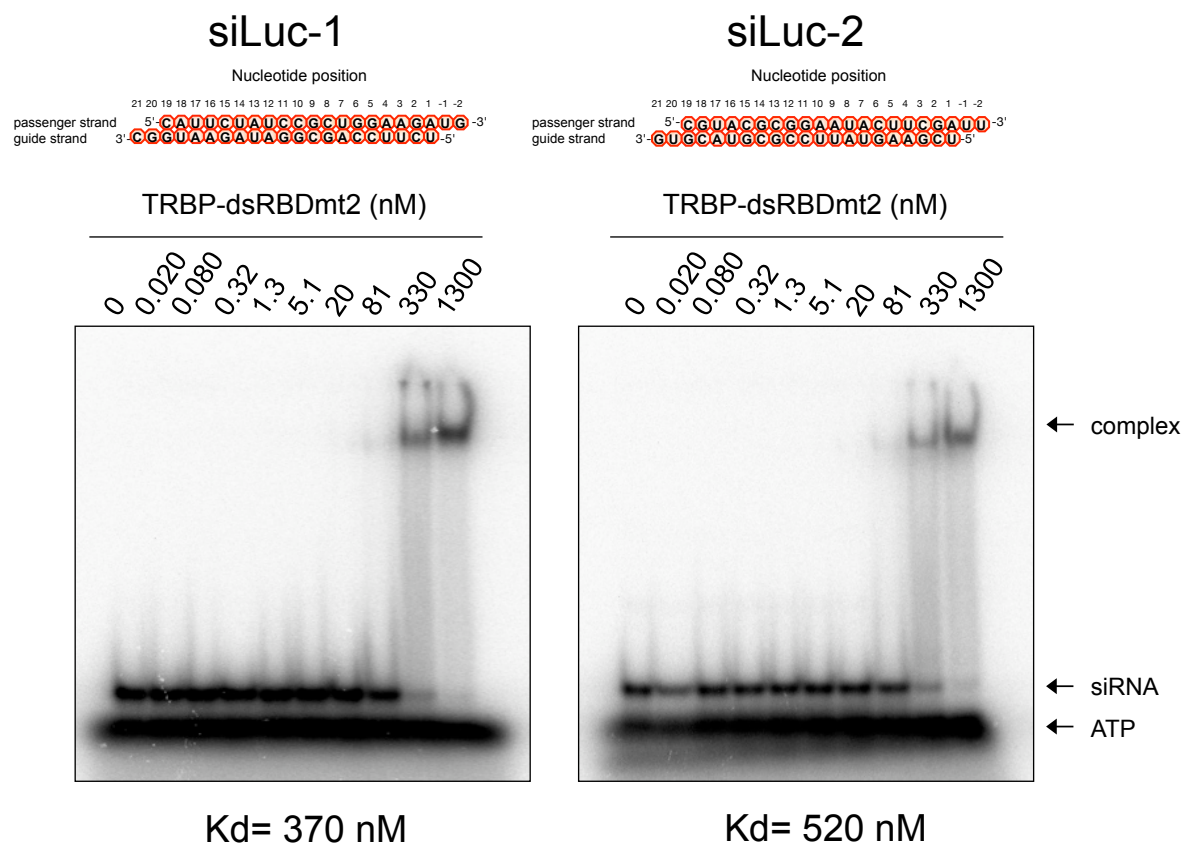


図20 TRBP-dsRBDmt2とsiRNAのゲルシフトアッセイ

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-dsRBDmt2を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

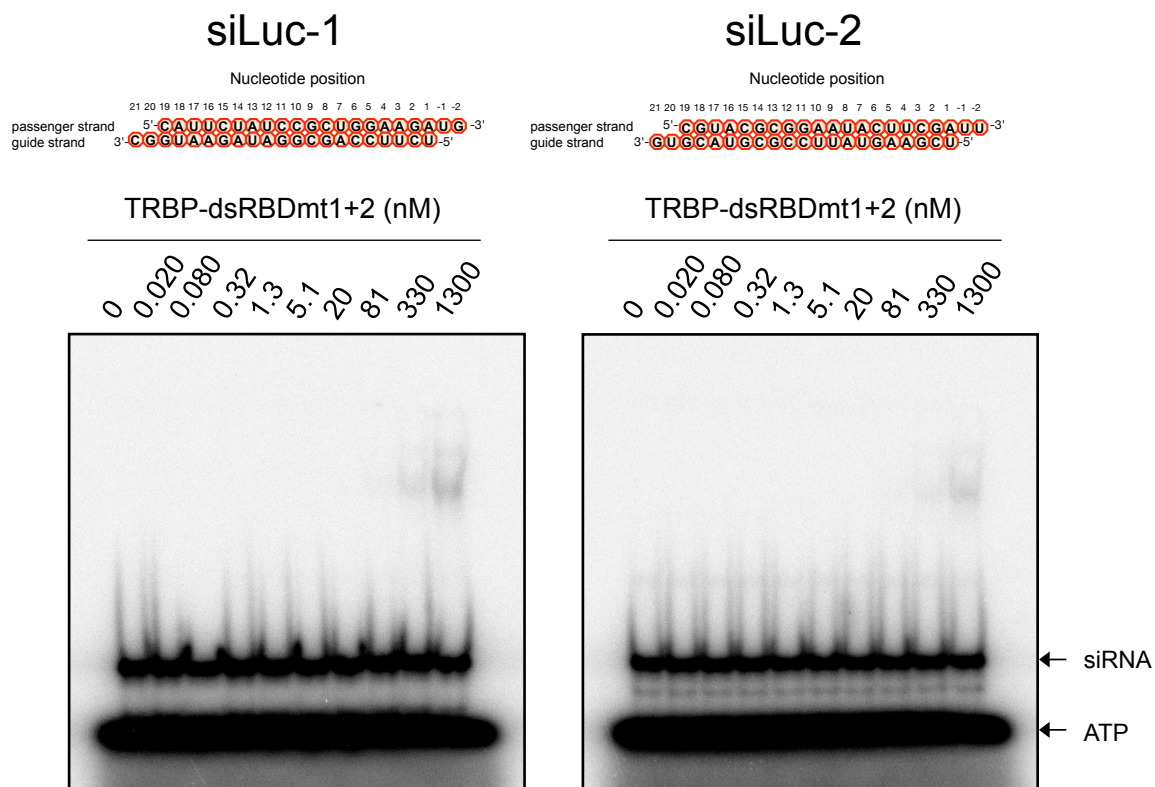


図21 TRBP-dsRBDmt1+2とsiRNAのゲルシフトアッセイ

³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-dsRBDmt1+2を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

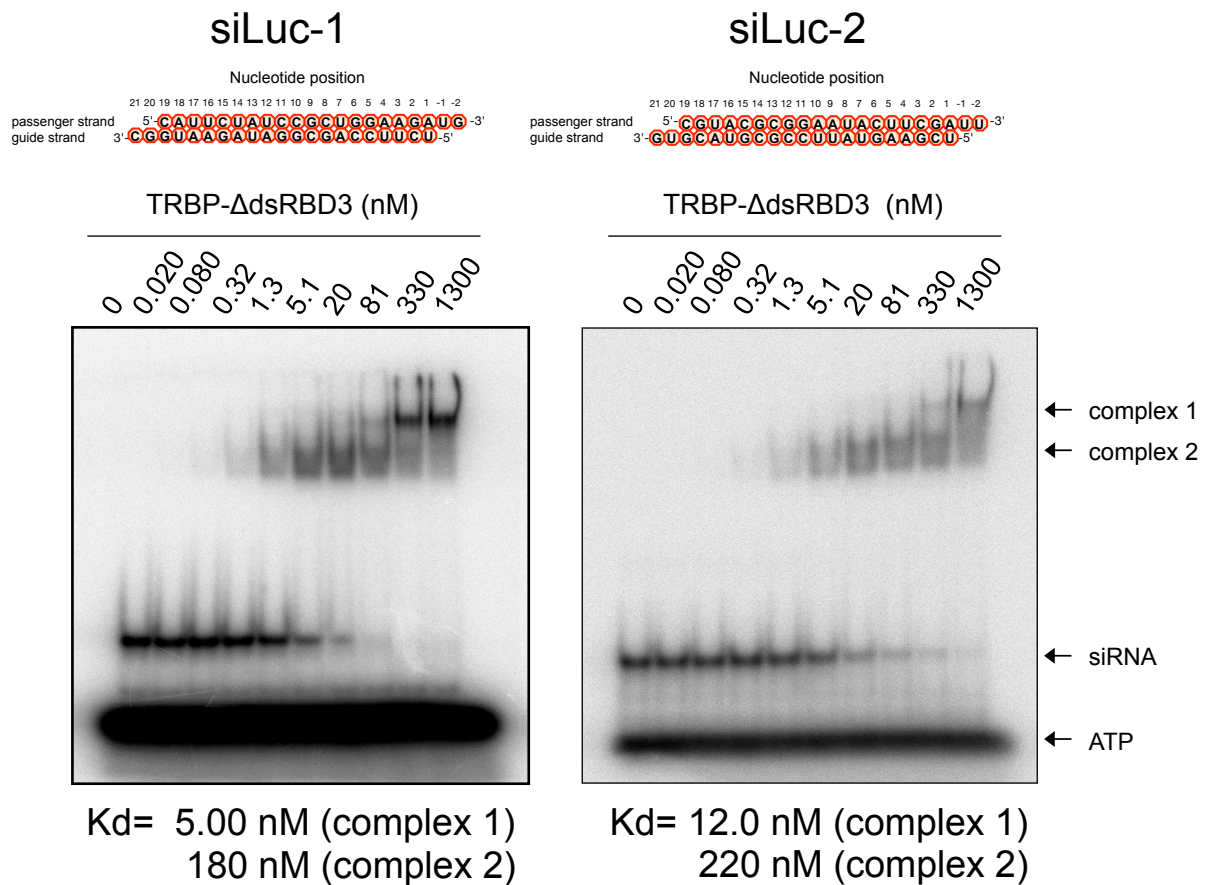


図22 TRBP-ΔdsRBD3とsiRNAのゲルシフトアッセイ

³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-dsRBDmt 1を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

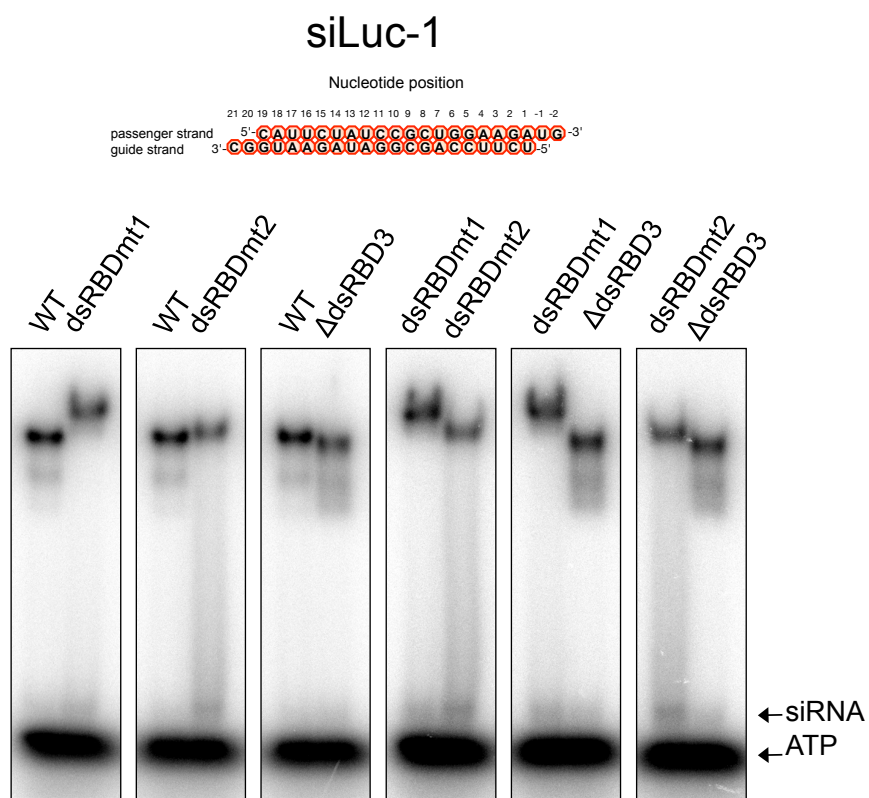


図23 TRBP-WTまたは変異型TRBPとsiRNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのTRBP-WT、TRBP-dsRBDmt1、TRBP-dsRBDmt2、
 TRBP-ΔdsRBD3を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。
 siRNAはsiLuc-1を用いた。

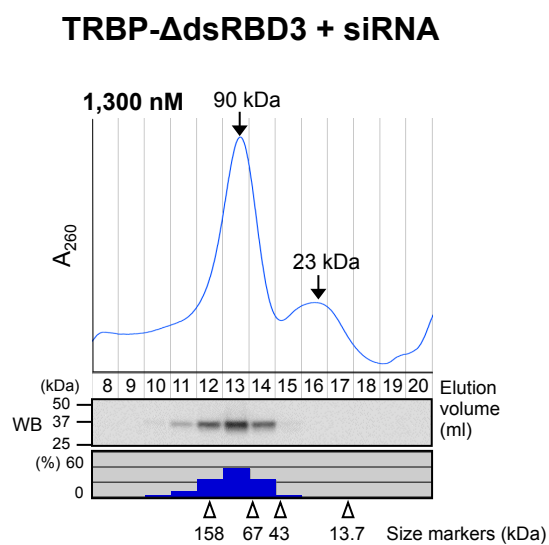


図24 TRBP-ΔdsRBD3とsiRNAのゲルろ過クロマトグラフィー
 siRNAと1,300 nMのTRBP-ΔdsRBD3を混合し、30分反応後、Superdex 200 HR 10/30 カラムで溶出した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

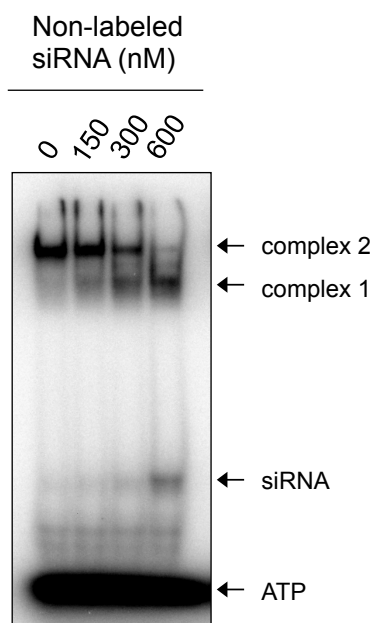
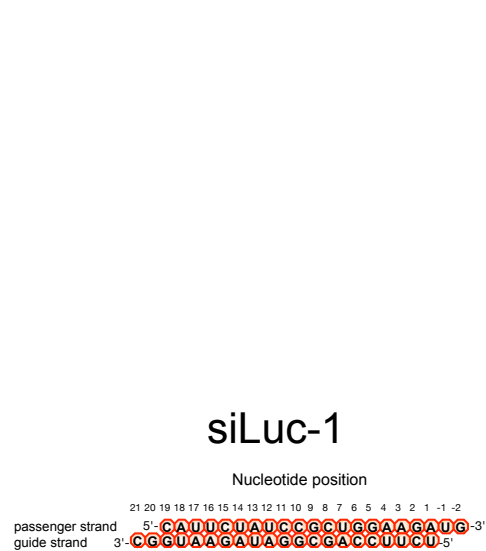
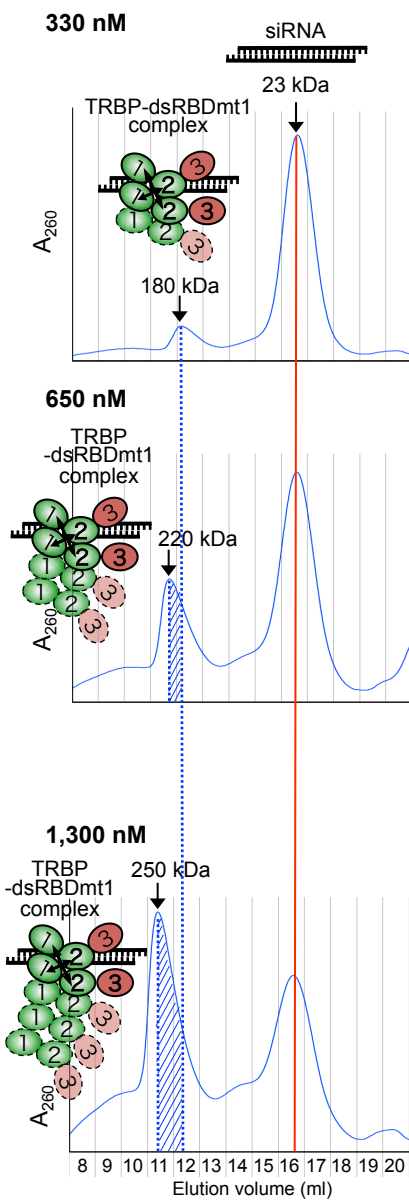


図25 TRBP-ΔdsRBD3とsiRNAの競合実験

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと1,300 MのTRBP-ΔdsRBD3を混合し、30分反応後、 ^{32}P ラベルしていないsiRNAを0-600 nM加え、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

A TRBP-dsRBDmt1 + siRNA



B TRBP-dsRBDmt2 + siRNA

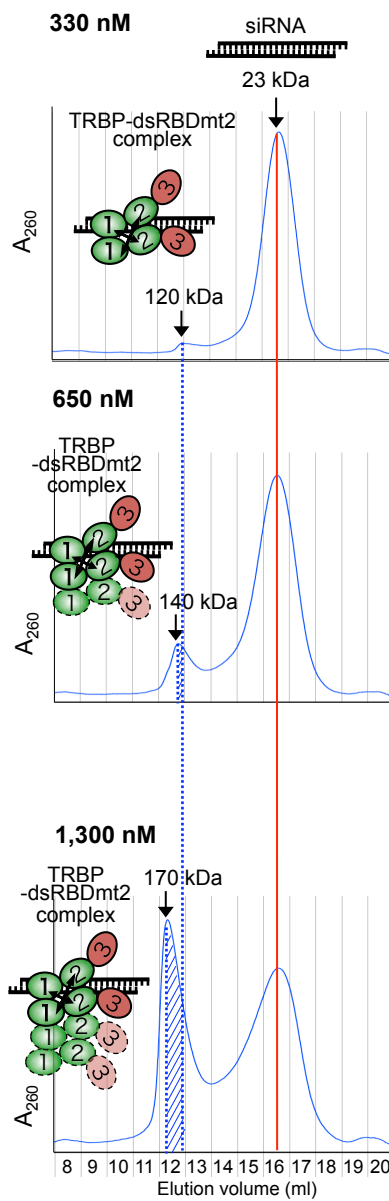
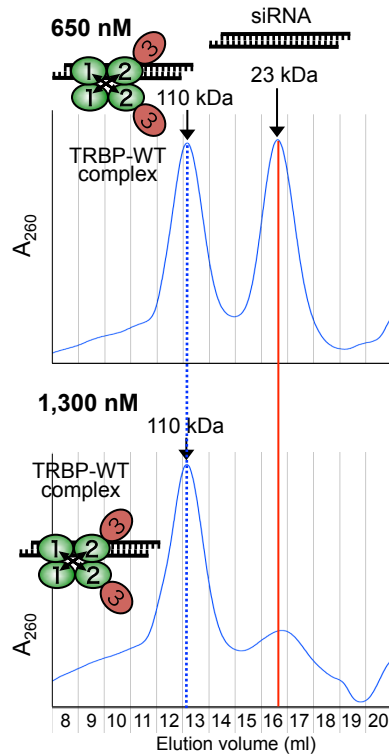


図26 変異型TRBPとsiRNAのゲルろ過クロマトグラフィー
siRNAと330-1,300 nMのTRBP-dsRBDmt1 (A)、TRBP-dsRBDmt2 (B)を混合し、30分反応後、Superdex 200 HR 10/30 カラムで溶出した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

A TRBP-WT + siRNA



B TRBP- Δ dsRBD3 + siRNA

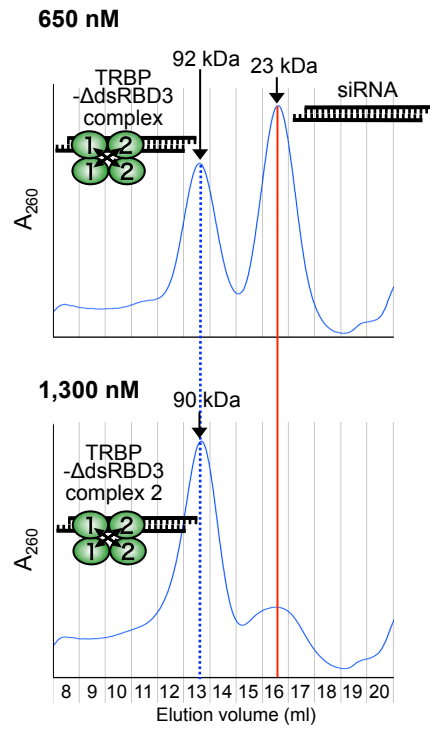


図27 TRBP-WTまたはTRBP- Δ dsRBD3とsiRNAのゲルろ過クロマトグラフィー
 siRNAと650-1,300 nMのTRBP-WT (A)、TRBP- Δ dsRBD3 (B)を混合し、30分反応後、Superdex 200 HR 10/30
 カラムで溶出した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

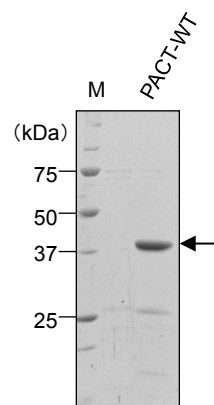


図28 精製したPACT-WTの電気泳動パターン
精製したPACT-WTタンパク質を12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、CBBで染色した。

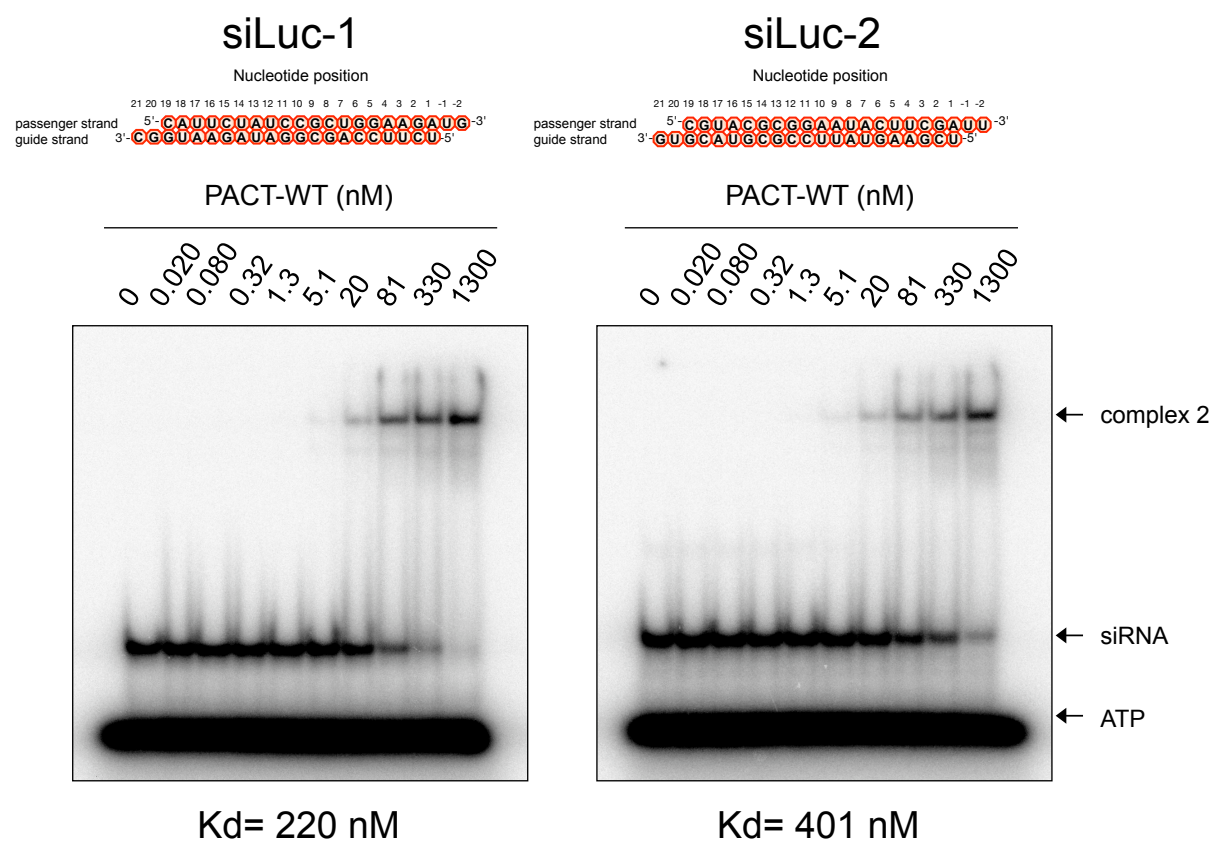


図29 PACT-WTとsiRNAのゲルシフトアッセイ

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-WTを氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

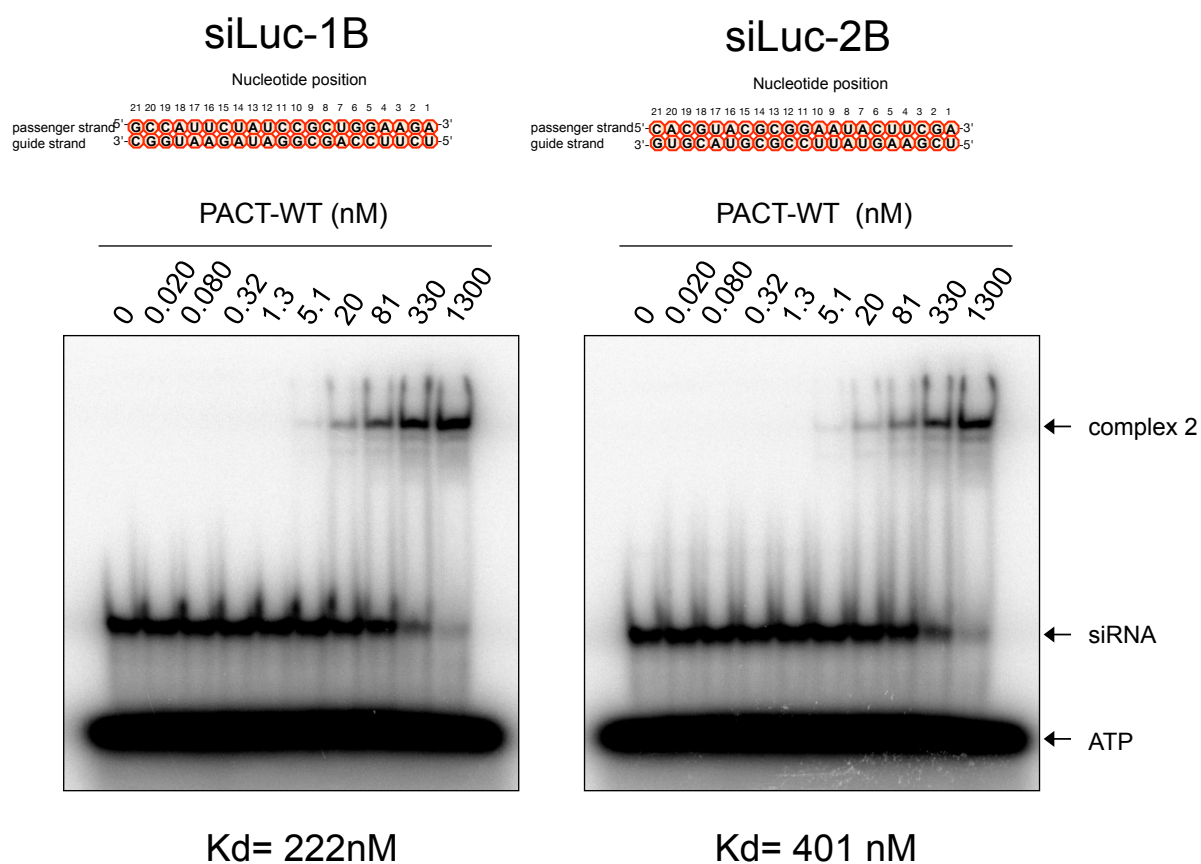


図30 PACT-WTと平滑末端の二本鎖RNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-WTを氷上で混合し、30分反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1BとsiLuc-2Bの2つの配列を用いた。

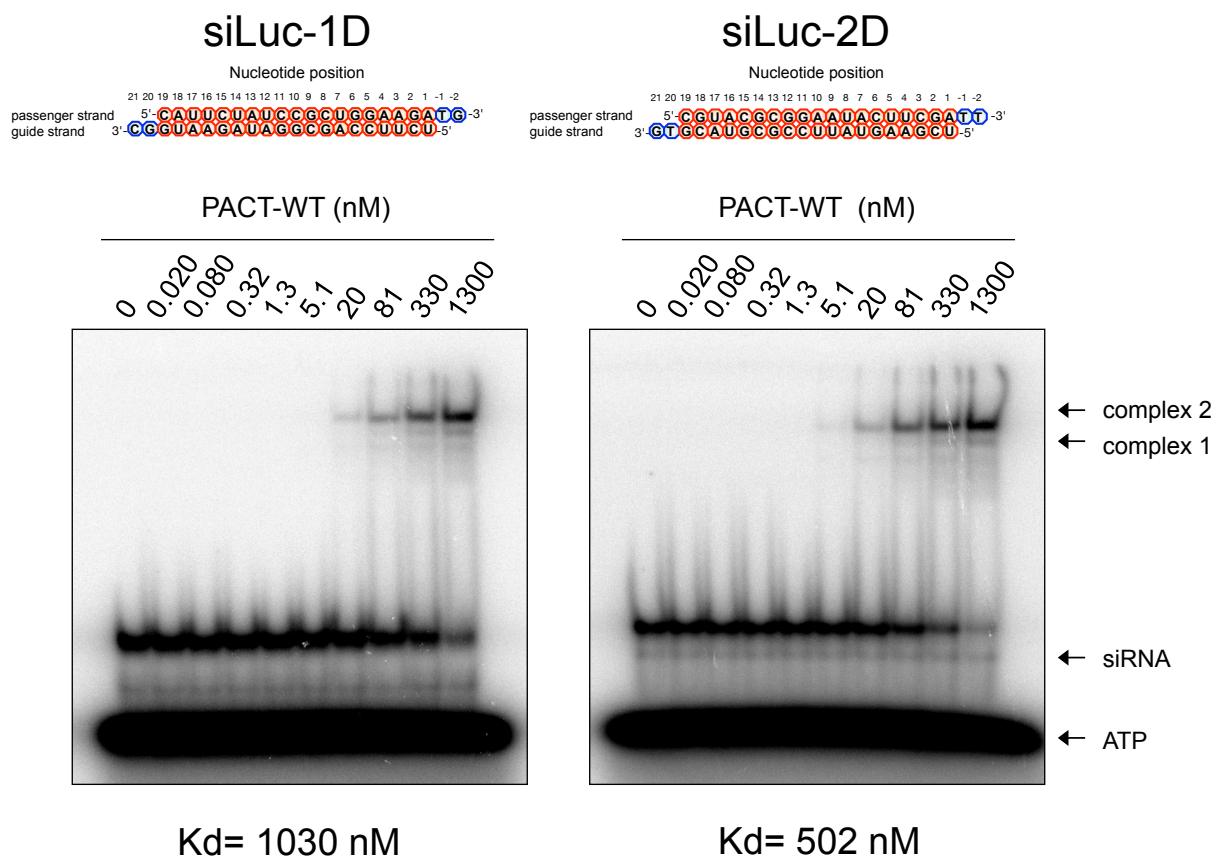


図31 PACT-WTと3'突出部分のDNAの二本鎖RNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-WTを氷上で混合し、30分反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1DとsiLuc-2Dの2つの配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

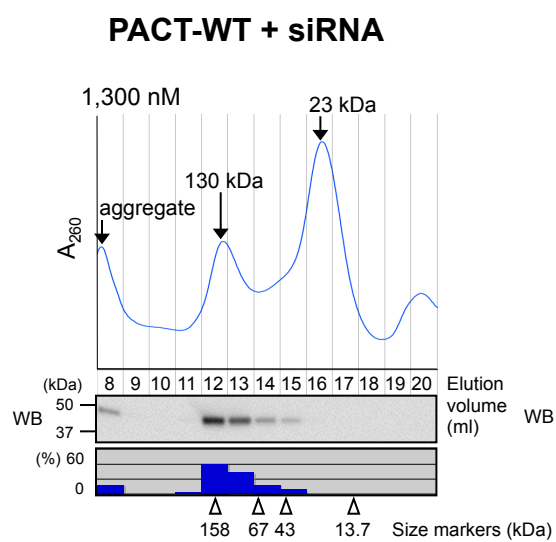


図32 PACT-WTとsiRNAのゲルろ過クロマトグラフィー
siRNAと1,300 nMのPACT-WTを混合し、30分反応後、Superdex 200 HR 10/30 カラムで溶出した。

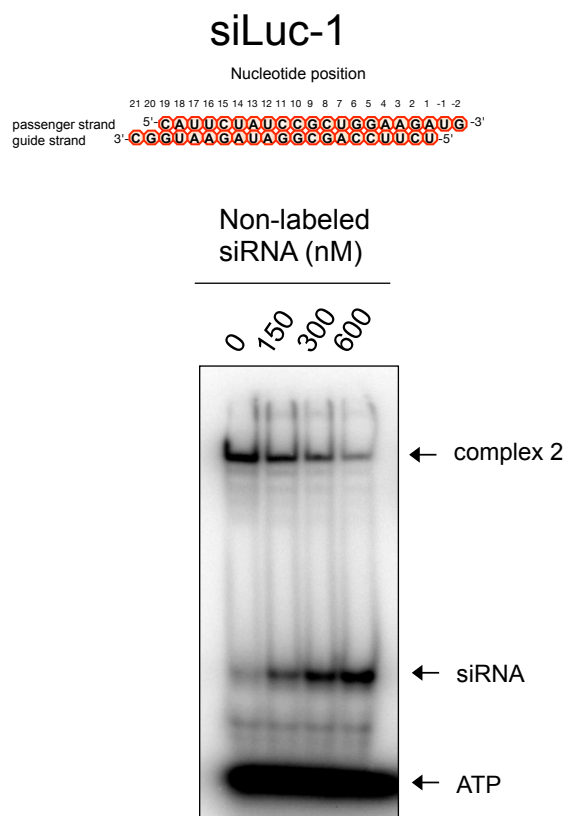
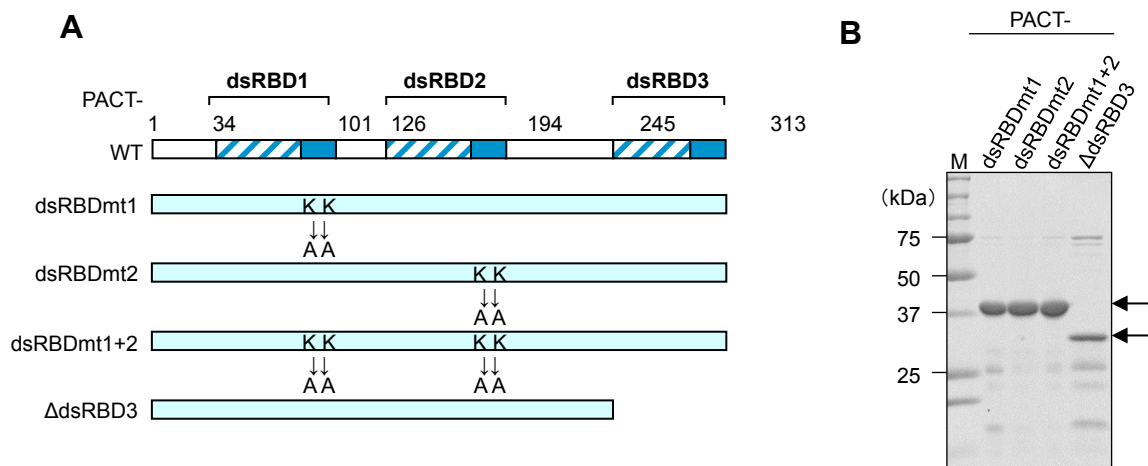


図33 PACT-WTとsiRNAの競合実験

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと1,300 MのPACT-WTを混合し、30分反応後、 ^{32}P ラベルしていないsiRNAを0-600 nM加え、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiRNA-1の配列を用いた。



PACT-dsRBDmt1 : dsRBD1の84番目と85番目の リジンをアラニンに置換

PACT-dsRBDmt2 : dsRBD2の117番目と178番目のリジンをアラニンに置換

PACT-dsRBDmt1+2 : dsRBD1の84番目と85番目、dsRBD2の117番目と178番目の
リジンをアラニンに置換

PACT-ΔdsRBD3 : dsRBD3のアミノ酸 を欠損

図34 変異型PACTの作製

(A) PACTのそれぞれのdsRBDに変異を導入した変異型PACTを作製した。

(B) PACT-WTと同様の方法で精製し、12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した後、CBBで染色した。

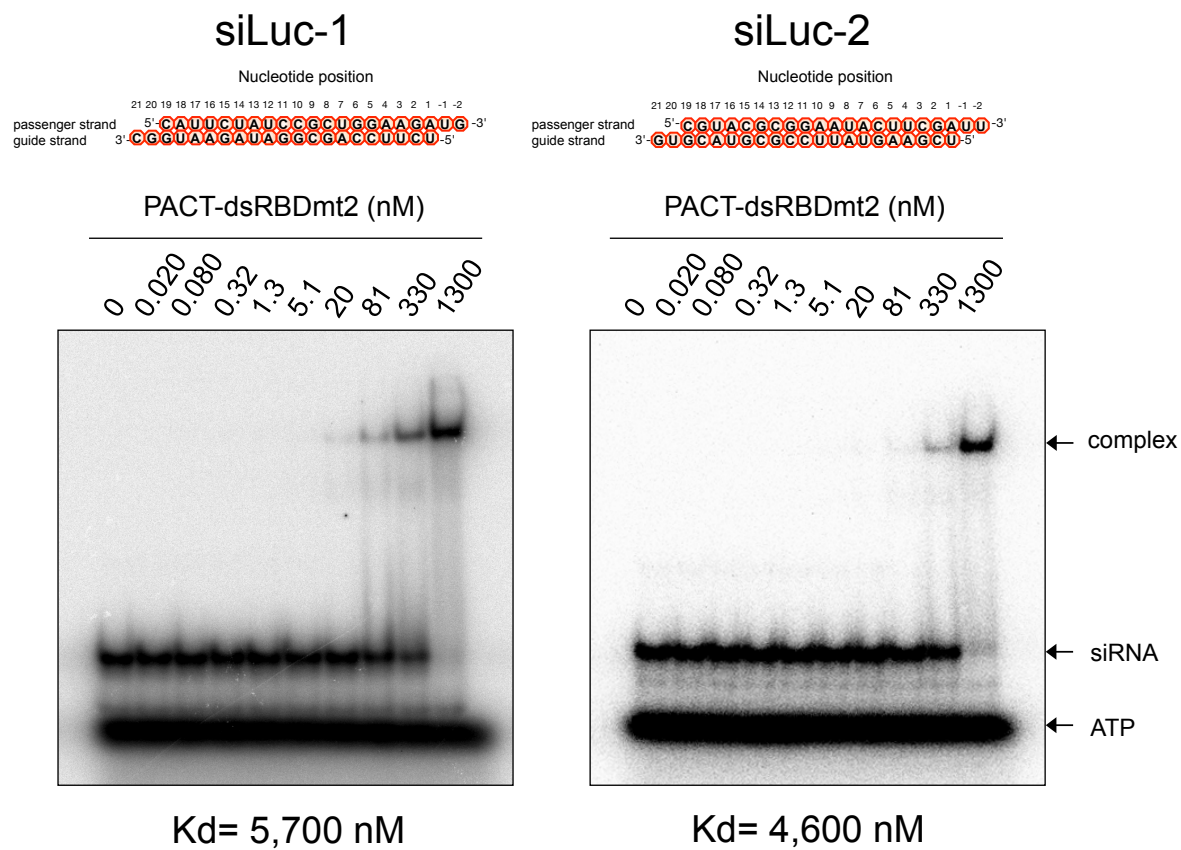


図36 PACT-dsRBDmt2とsiRNAのゲルシフトアッセイ

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-dsRBDmt2を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

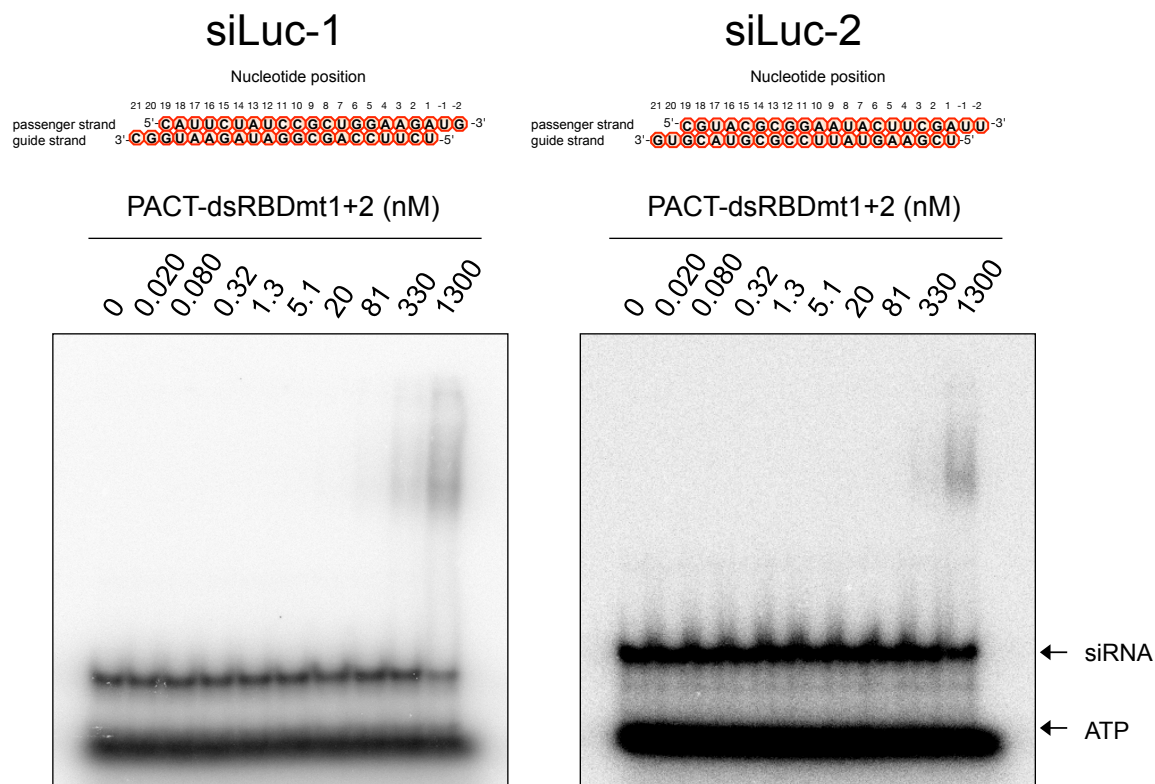


図37 PACT-dsRBDmt1+2とsiRNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-dsRBDmt1+2を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

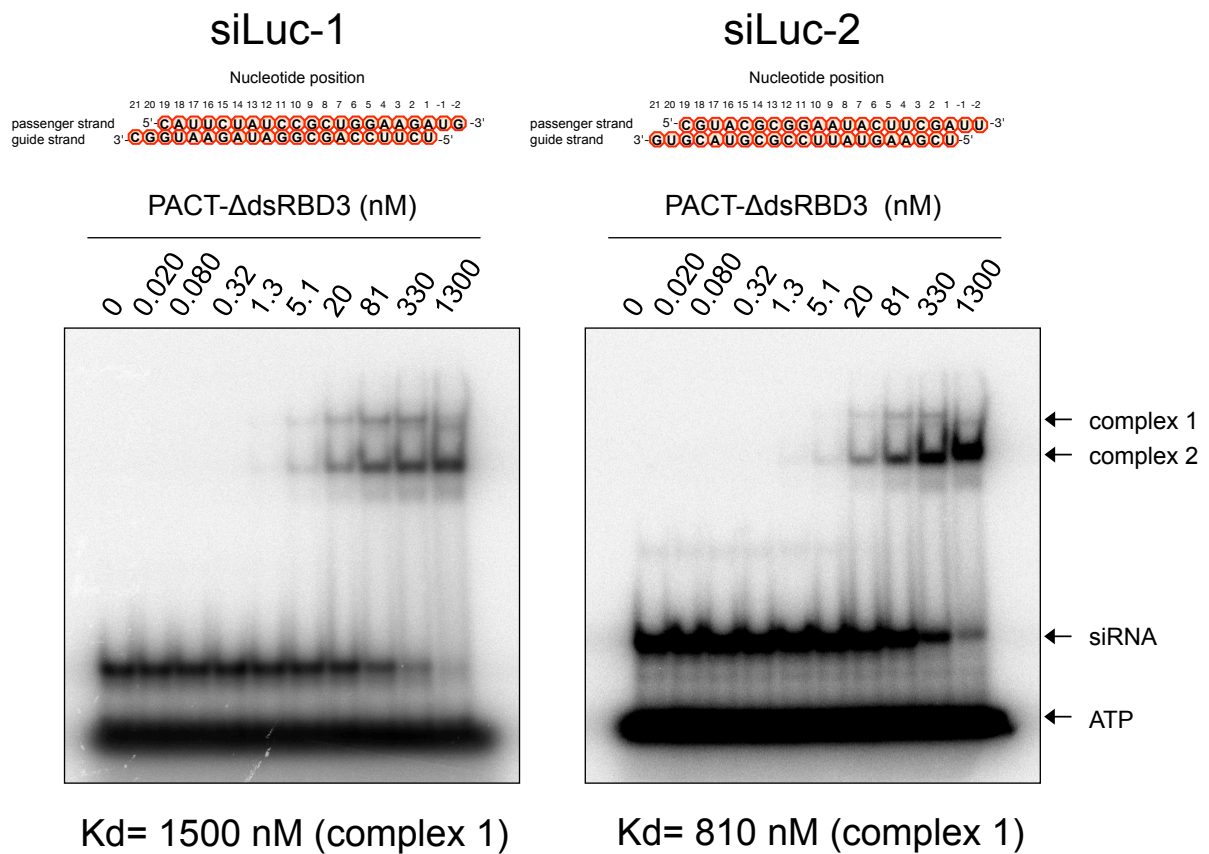


図38 PACT-ΔdsRBD3とsiRNAのゲルシフトアッセイ

³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-ΔdsRBD3を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

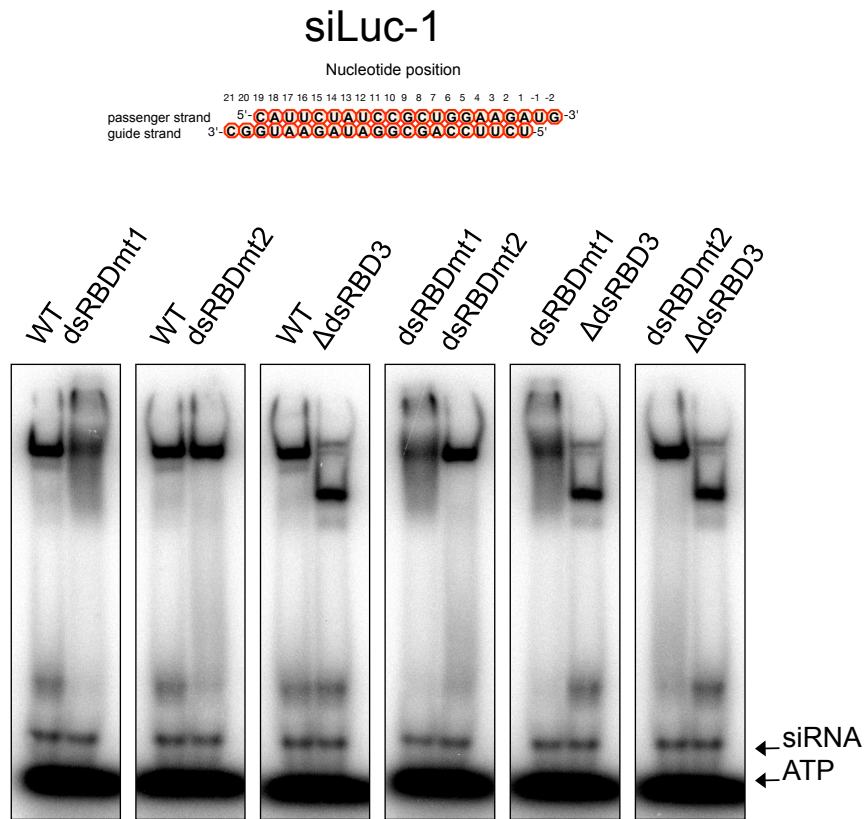


図39 PACT-WTまたは変異型PACTとsiRNAのゲルシフトアッセイ
³²Pラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのPACT-WT、PACT-dsRBDmt1、PACT-dsRBDmt2、PACT-ΔdsRBD3を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1を用いた。

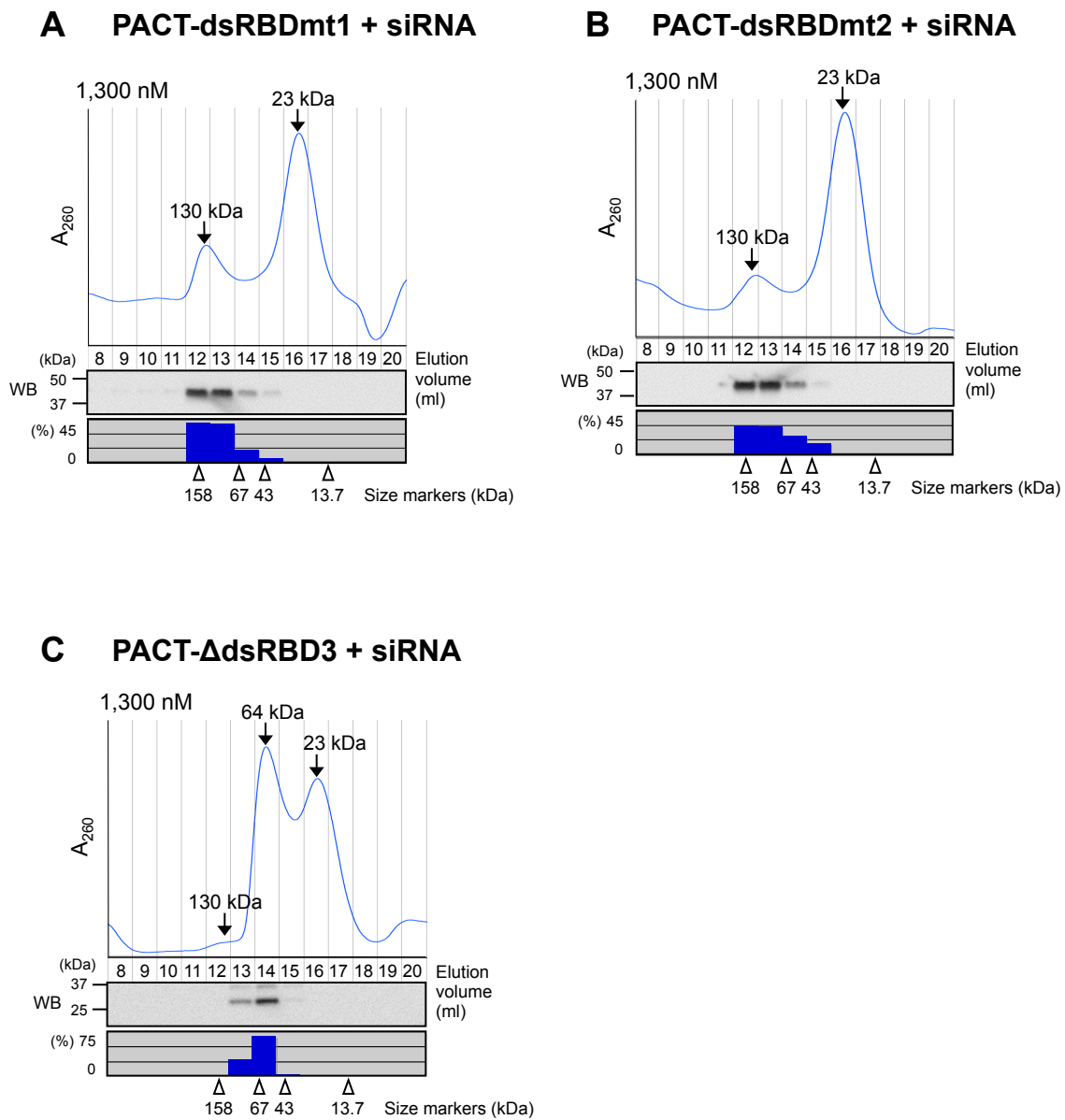


図40 変異型PACTとsiRNAのゲルろ過クロマトグラフィー
 siRNAと1,300 nMのPACT-dsRBDmt1 (A)、PACT-dsRBDmt2 (B)、PACT- Δ dsRBD3 (C)を混合し、30分反応後、Superdex 200 HR 10/30 カラムで溶出した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

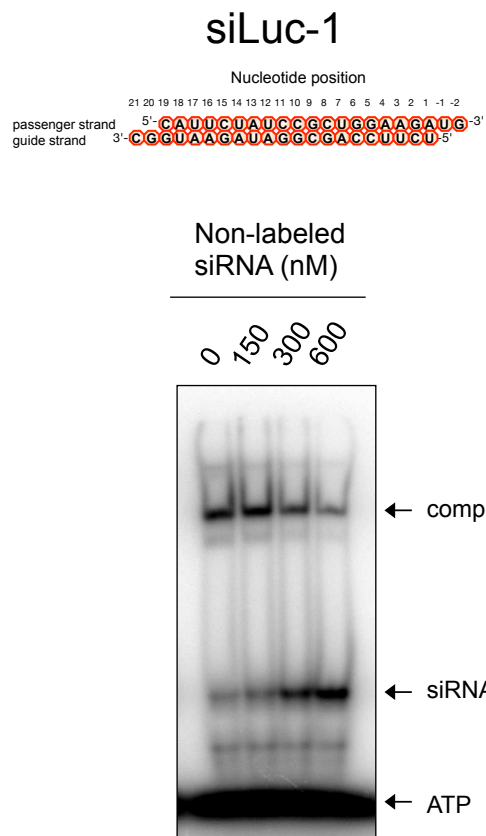


図41 PACT-ΔdsRBD3とsiRNAの競合実験

^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと1,300 MのPACT-ΔdsRBD3を混合し、30分反応後、 ^{32}P ラベルしていないsiRNAを0-600 nM加え、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。

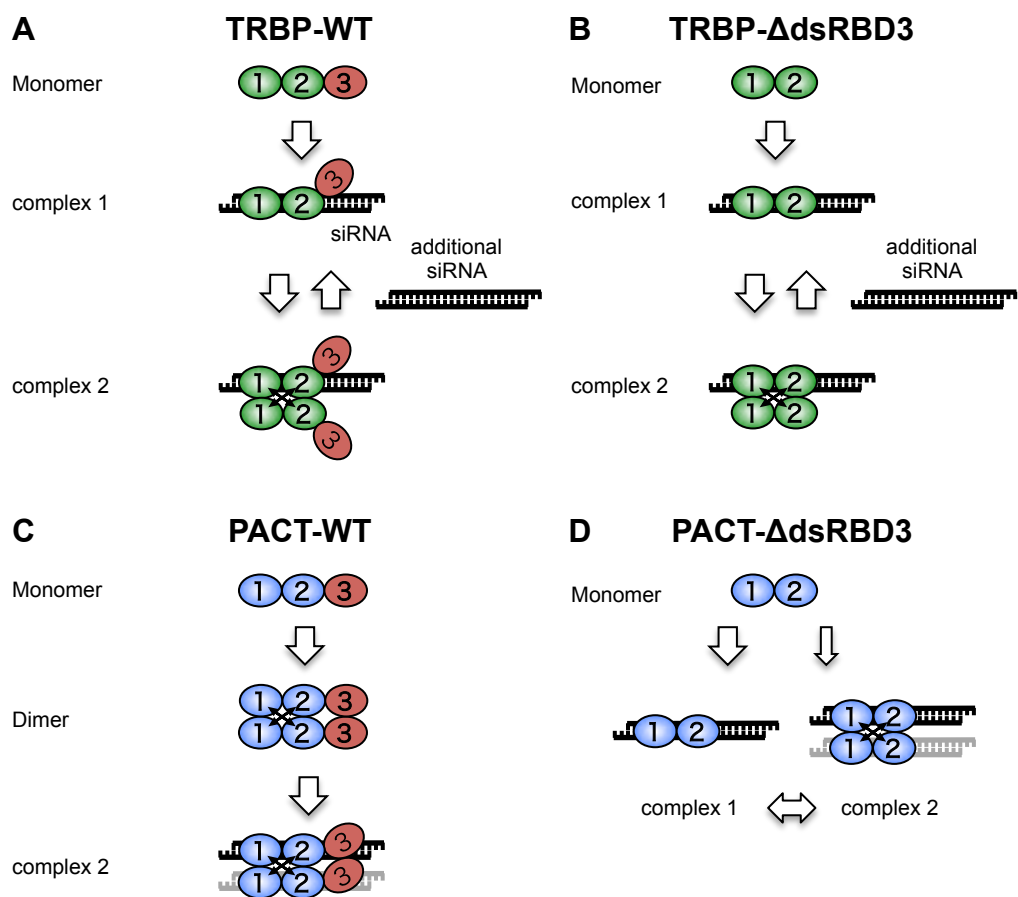


図42 TRBPとPACTのsiRNA結合様式のモデル

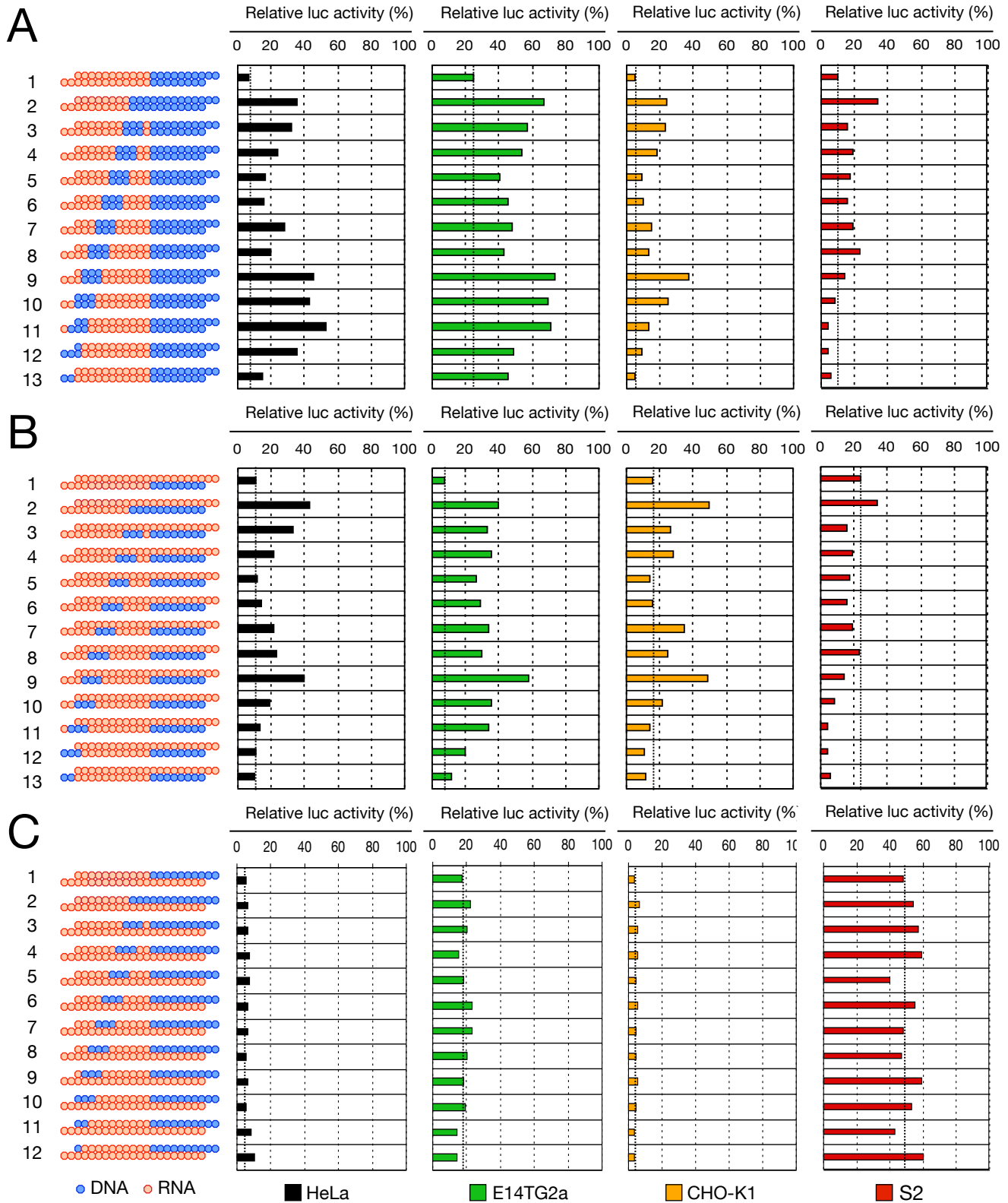
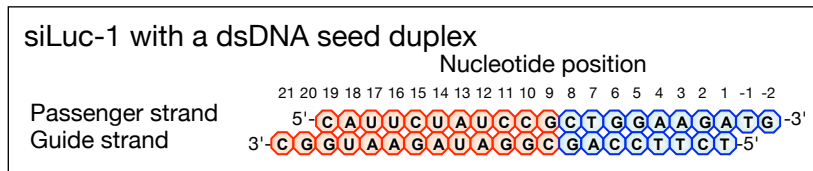


図43 非シード領域を3塩基ずつDNAに置換した場合のRNAi効果
両RNA鎖 (A)、ガイド鎖 (B)、パッセンジャー鎖 (C)をDNAに置換した場合のRNAi活性を示した。siRNAはsiLuc-1の列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

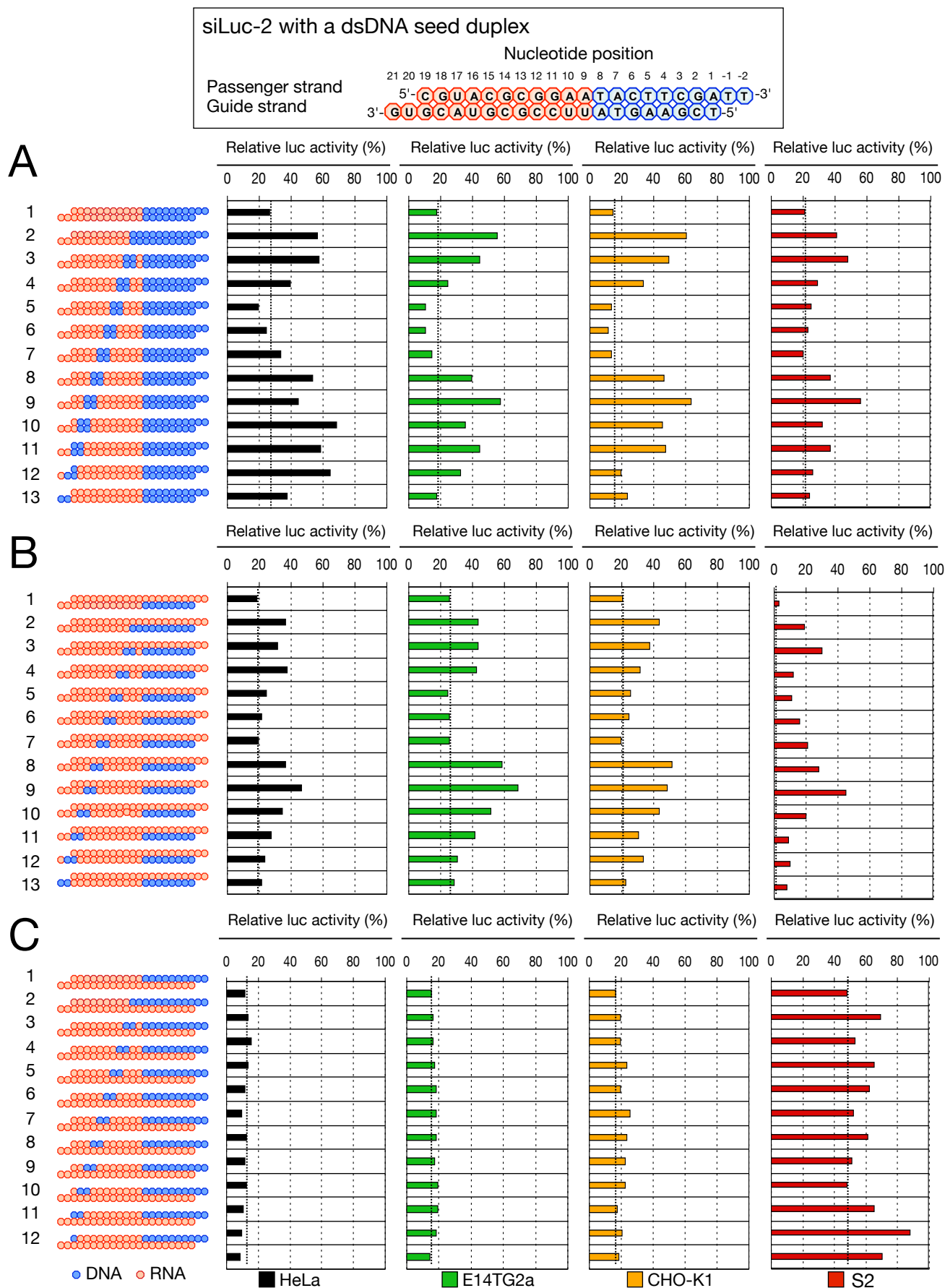


図44 非シード領域を3塩基ずつDNAに置換した場合のRNAi効果
 siRNA-2の両RNA鎖 (A)、ガイド鎖 (B)、パッセンジャー鎖 (C)をDNAに置換した場合のRNAi活性を示した。siRNAはsiLuc-2の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。 95

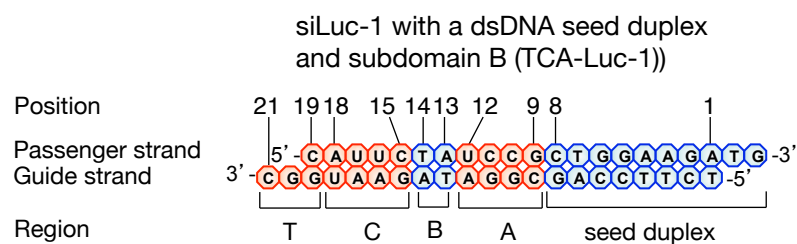


図45 DNA/RNAキメラ型siRNAの非シード領域の機能的分割

非シード領域はRLC/RISCタンパク質との相互作用様式から以下の4つの領域に分割することが出来る。RNAを赤、DNAを青で示した。

A領域 (9-12塩基目): 高いRNAi活性のためにRNAである必要がある、DNAに置換すると大幅にRNA活性が減少する。

B領域 (13,14塩基目): DNAに置換してもRNAi効果に大幅な影響を与えない。

C領域 (15-18塩基目): 高いRNAi活性のためにRNAである必要がある、DNAに置換すると大幅にRNAi活性が減少する。

T領域 (19-21塩基目): 末端領域であり、生物種により異なるがHeLa細胞やS2細胞ではDNAに置換するとRNAi活性が減少する。

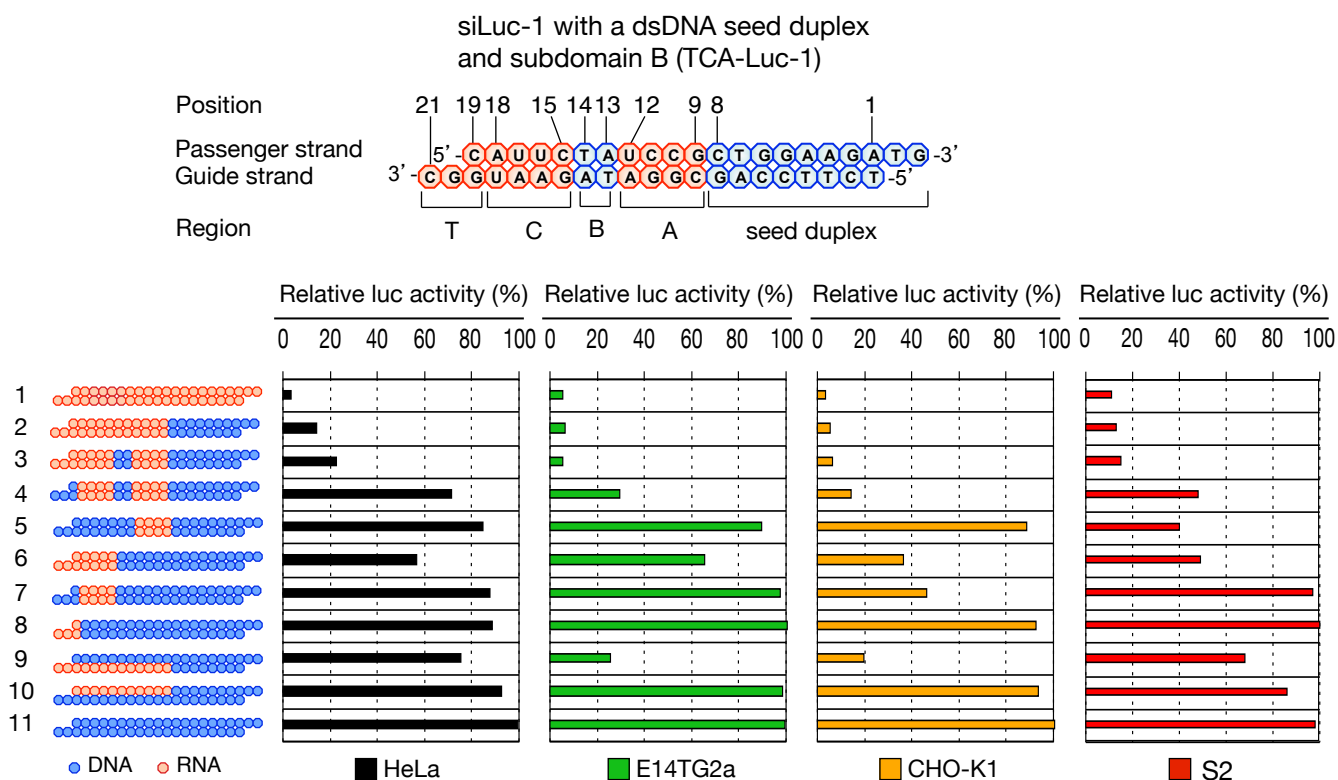


図46 siLuc-1におけるA, B, C, T領域をDNAに置換した場合のRNAi効果
 siRNAのA, B, C, T領域をDNAに置換した場合のRNAi効果を測定した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。
 RNAを赤、DNAを青で示した。

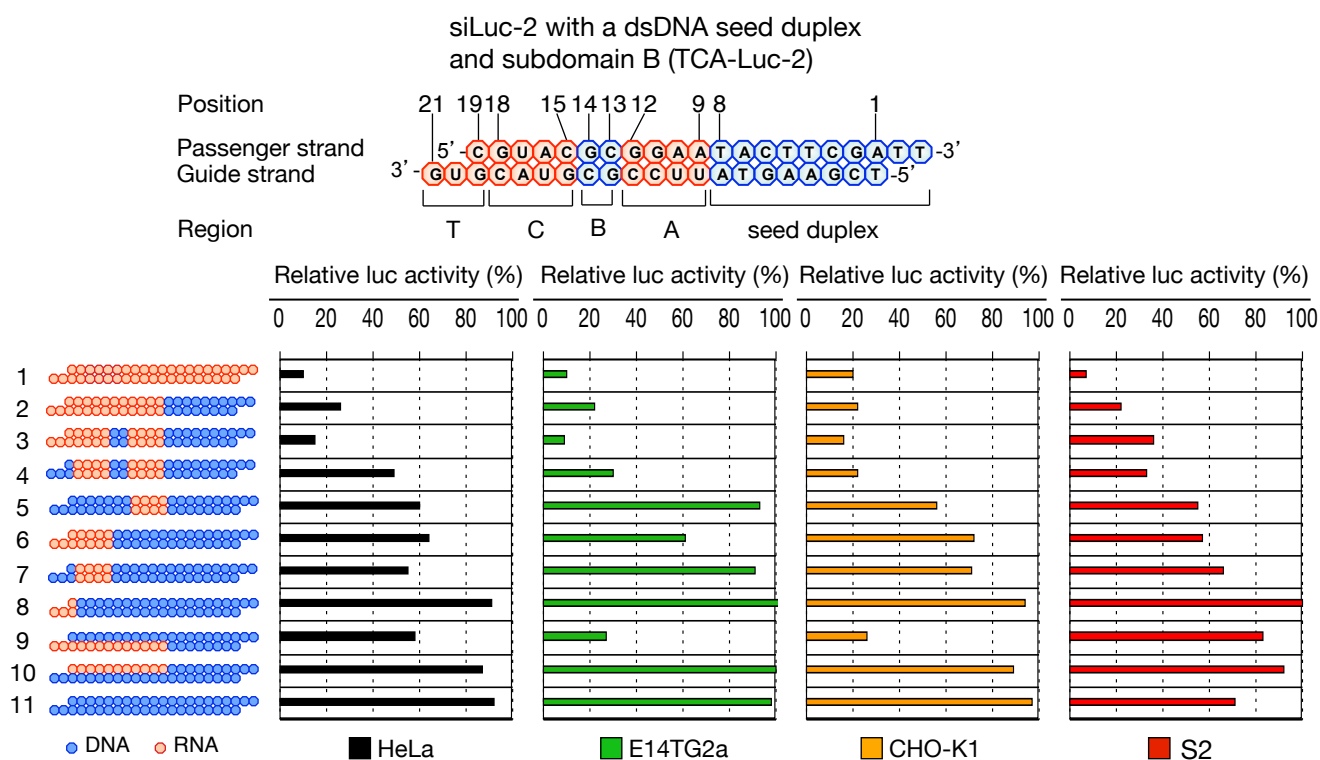


図47 siLuc-2におけるA, B, C, T領域をDNAに置換した場合のRNAi効果
siRNAのA, B, C, T領域をDNAに置換した場合のRNAi効果を測定した。siRNAはsiLuc-2の配列を用いた。
RNAを赤、DNAを青で示した。

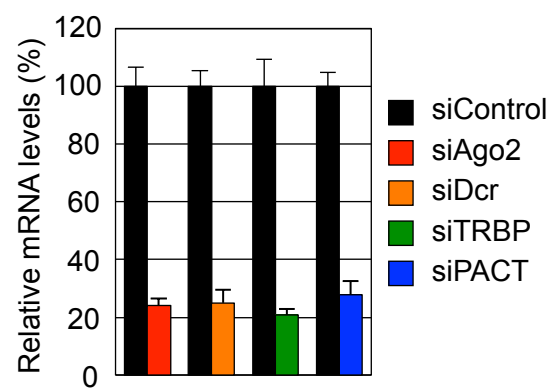


図48 各遺伝子に対するsiRNAを用いたノックダウン効果の測定
各タンパク質に対するsiRNAをトランスフェクション後、細胞を回収し、RNA抽出後、各遺伝子特異的プライマーを用い、リアルタイムPCRにより mRNA量を測定した。

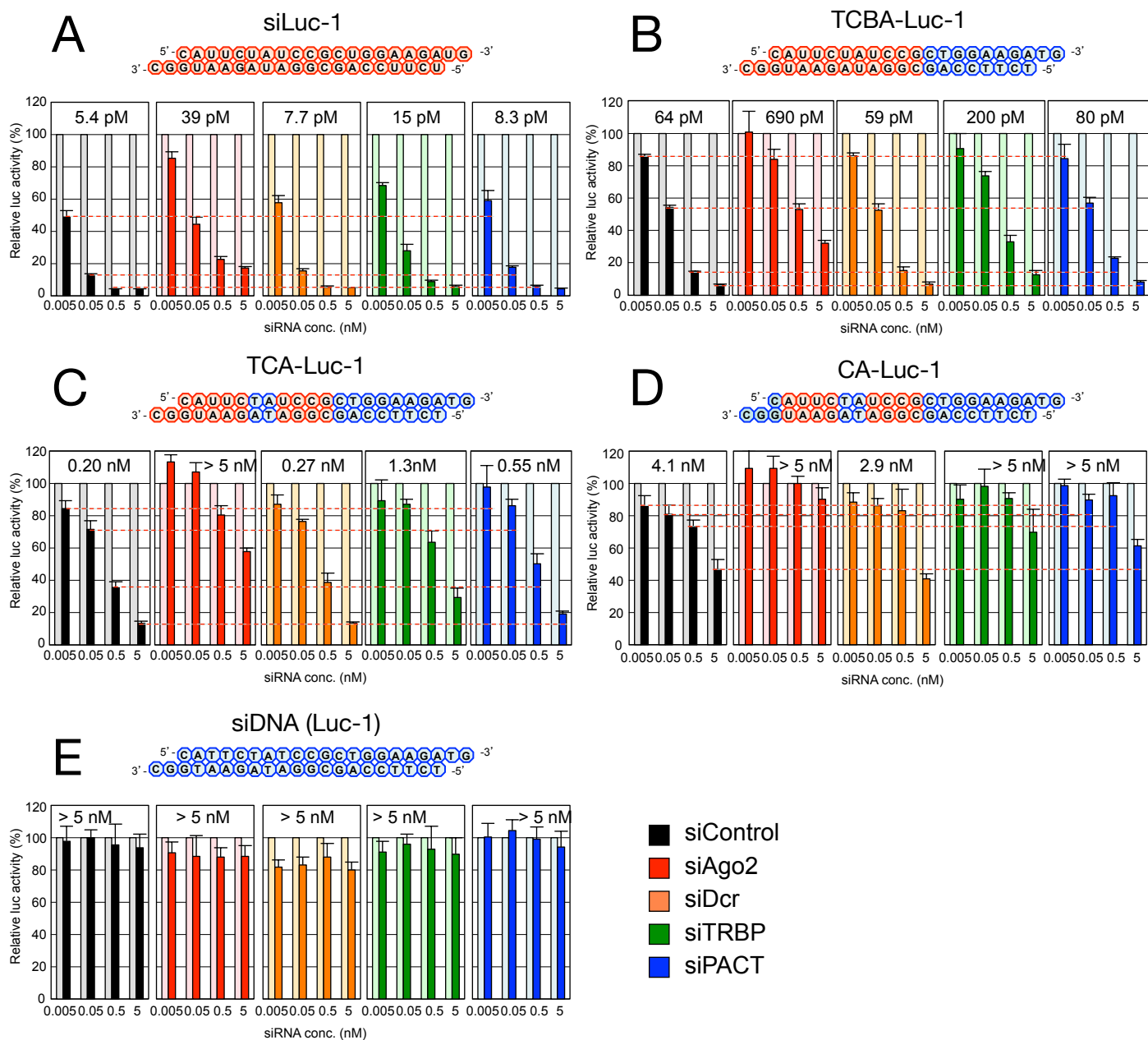


図49 siLuc-1とDNA/RNAキメラ型siRNAにおける各遺伝子に対するノックダウンがRNAi効果に与える影響

各遺伝子をRNAiでノックダウンした際の、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAのRNAi効果を測定した。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

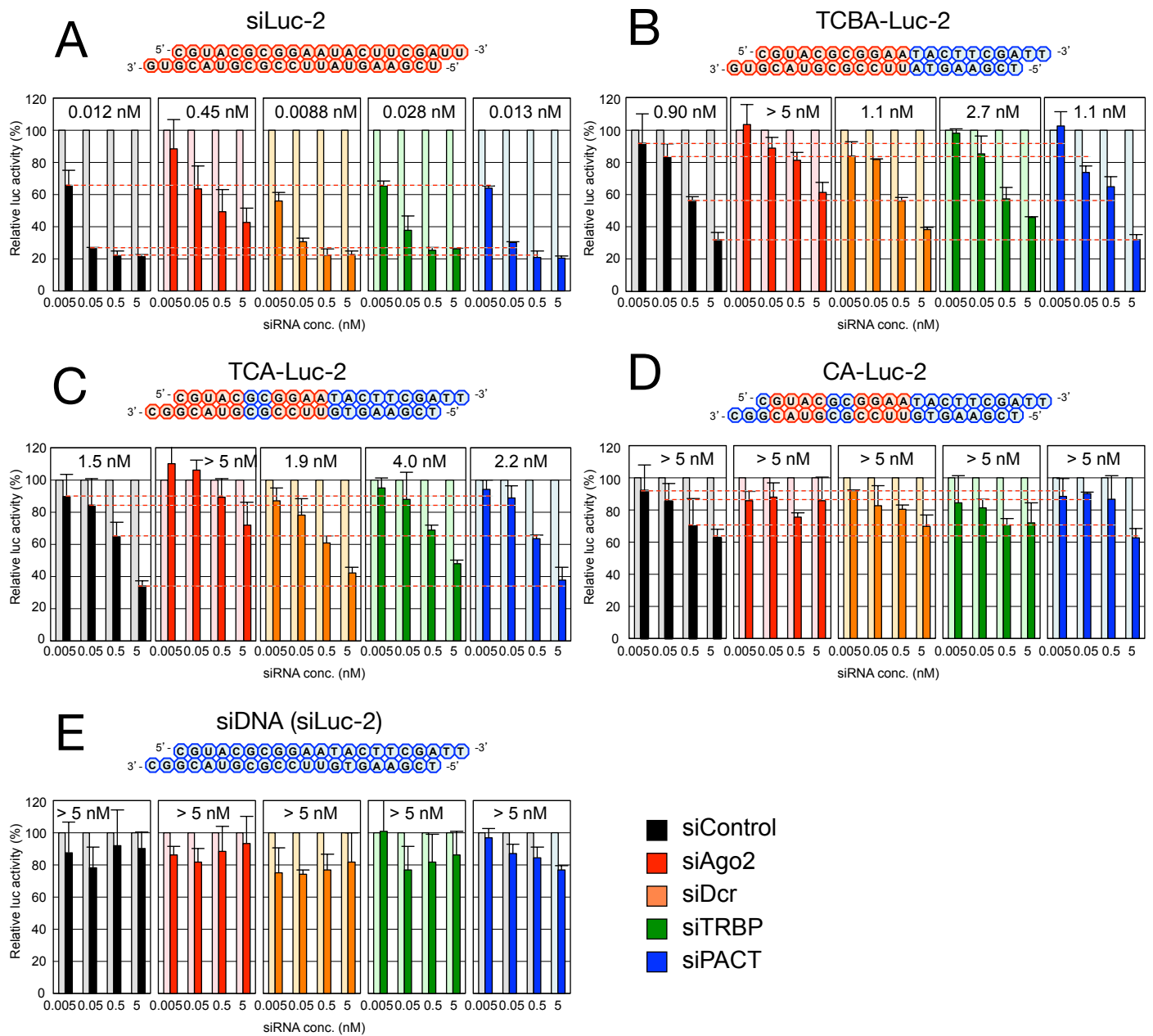


図50 siLuc-2とDNA/RNAキメラ型siRNAにおける遺伝子に対するノックダウンがRNAi効果に与える影響

各遺伝子をRNAiでノックダウンした際の、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAのRNAi効果を測定した。siRNAはsiLuc-2の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

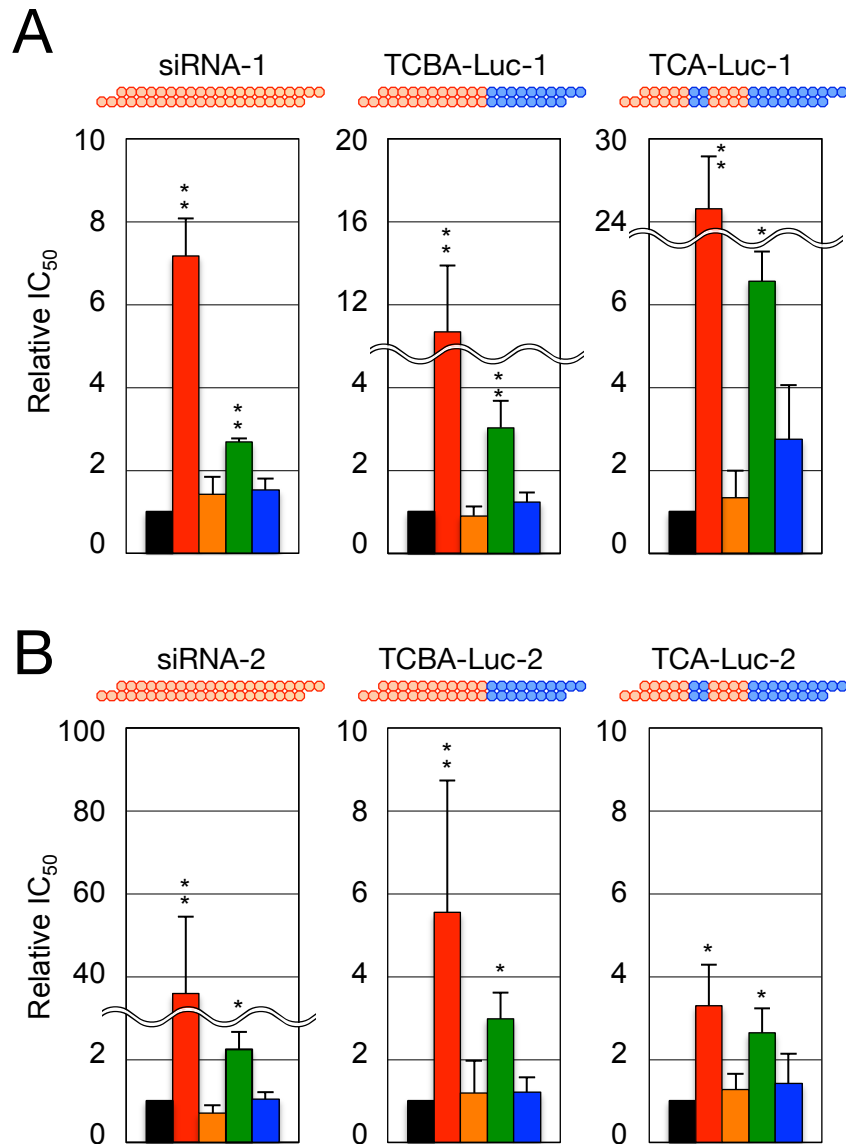


図51 各遺伝子に対するノックダウンがRNAi効果に与える影響

各遺伝子をRNAiでノックダウンした際の、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAのRNAi効果を測定した。算出したIC₅₀は、コントロールsiRNAをトランスフェクションした場合で、正規化した。siRNAはsiLuc-1 (A)とsiLuc-2 (B)の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

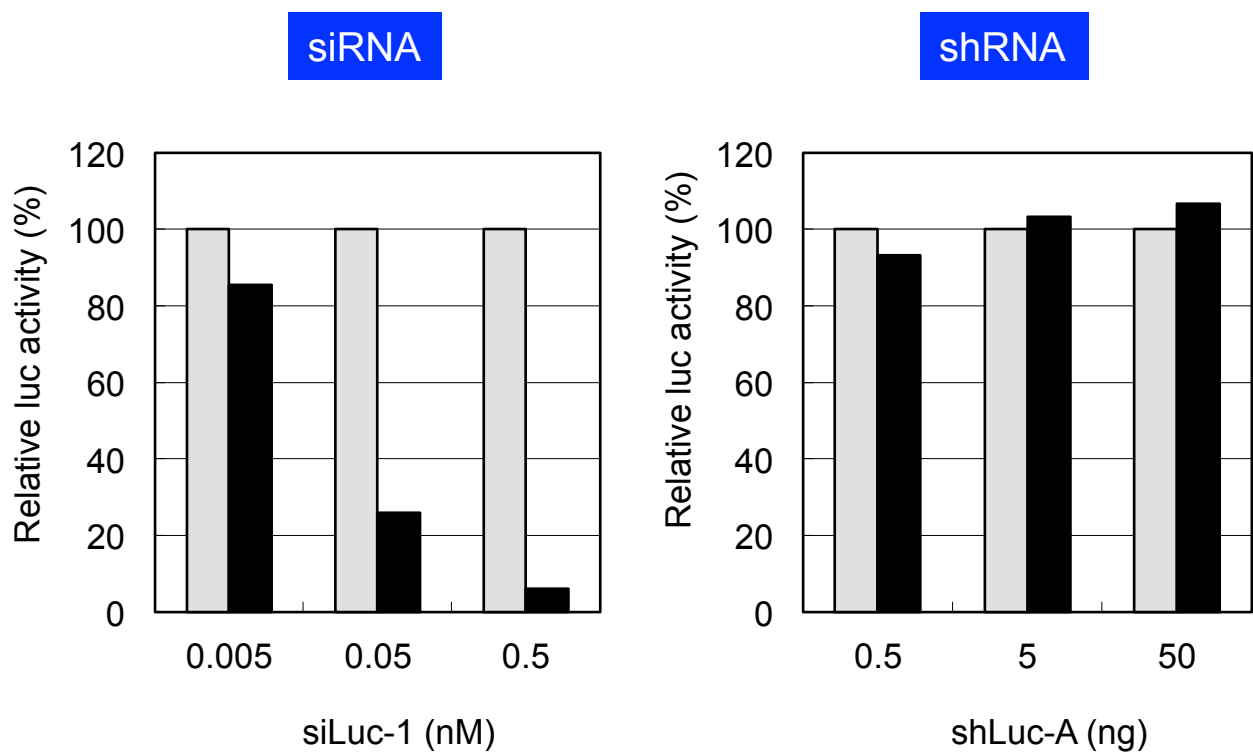


図52 Dicerノックアウト細胞におけるsiRNAまたはshRNAによるRNAi効果
siRNAはsiLuc-1、shRNAはshLuc-Aの配列を用いた。

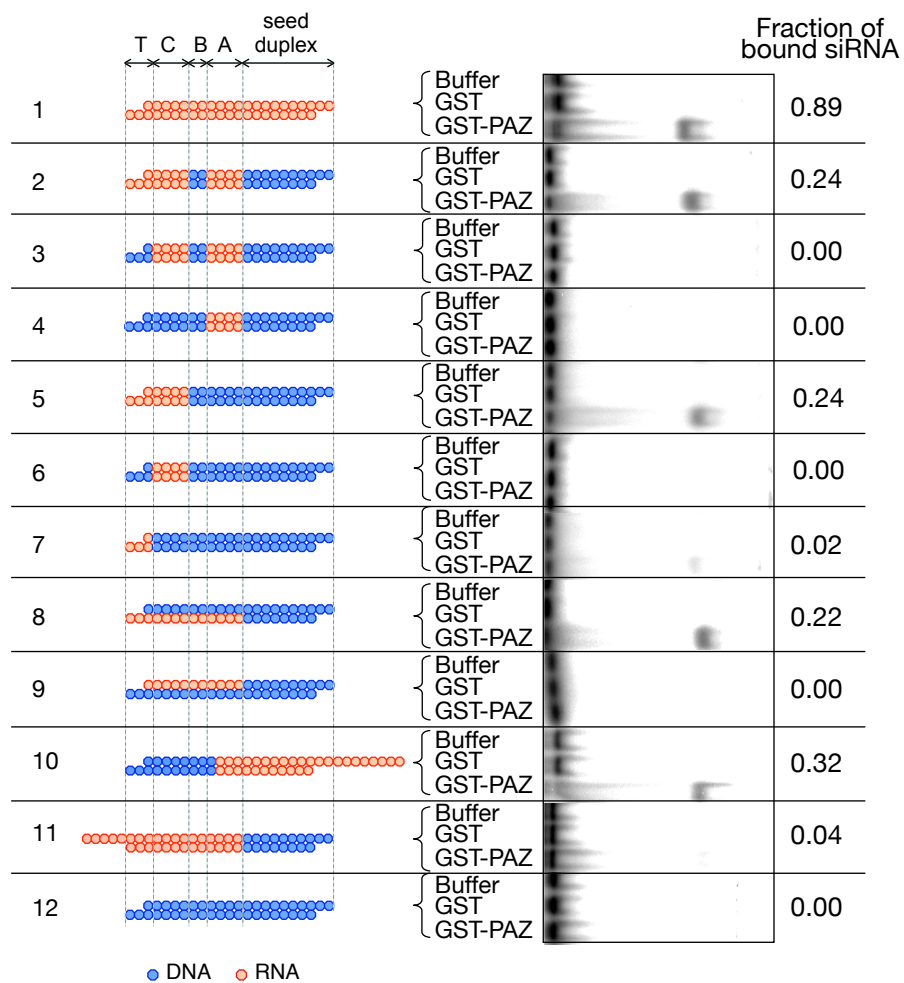


図53 ヒトAgoタンパク質のPAZドメインとsiRNAまたはDNA/RNAキメラ型siRNAのゲルシフトアッセイ

Ago1 PAZドメインを大腸菌内で作製、精製し、 ^{32}P ラベルしたRNAとゲルシフトアッセイを行った。siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

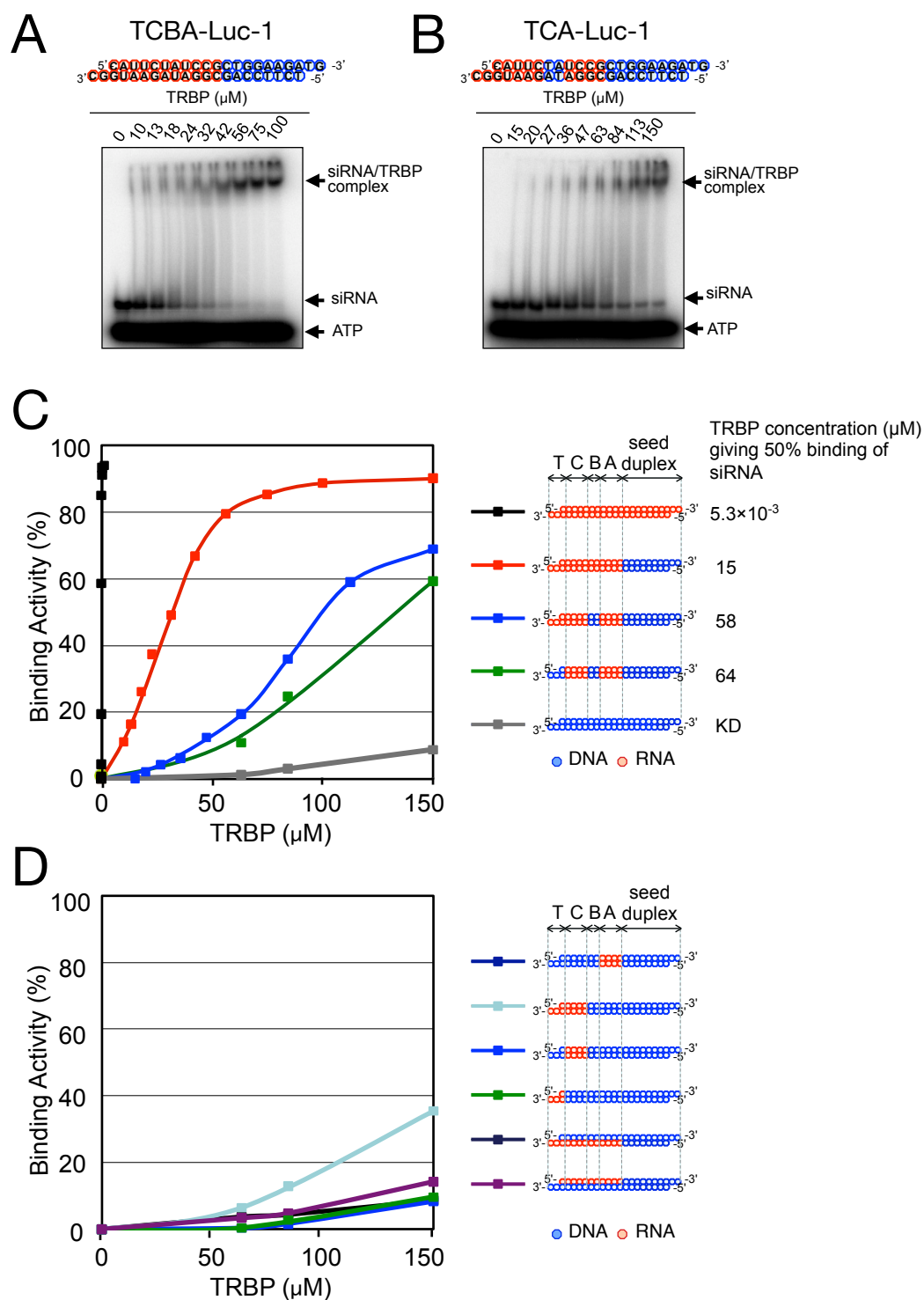


図54 TRBPとsiRNA (siLuc-1)またはDNA/RNAキメラ型siRNAのゲルシフトアッセイ (A, B) ^{32}P ラベルした0.5 nMのシード領域をDNAに置換したDNA/RNAキメラ型siRNA (A)もしくは、さらにB領域もDNAに置換したDNA/RNAキメラ型siRNA (B)と0-150 μM のTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。(C,D) 各TRBP-WT濃度における、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAがTRBP-WTに結合した割合をプロットした。また、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAがTRBP-WTに50%結合した濃度を右に示した(C)。siRNAとDNA/RNAキメラ型siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

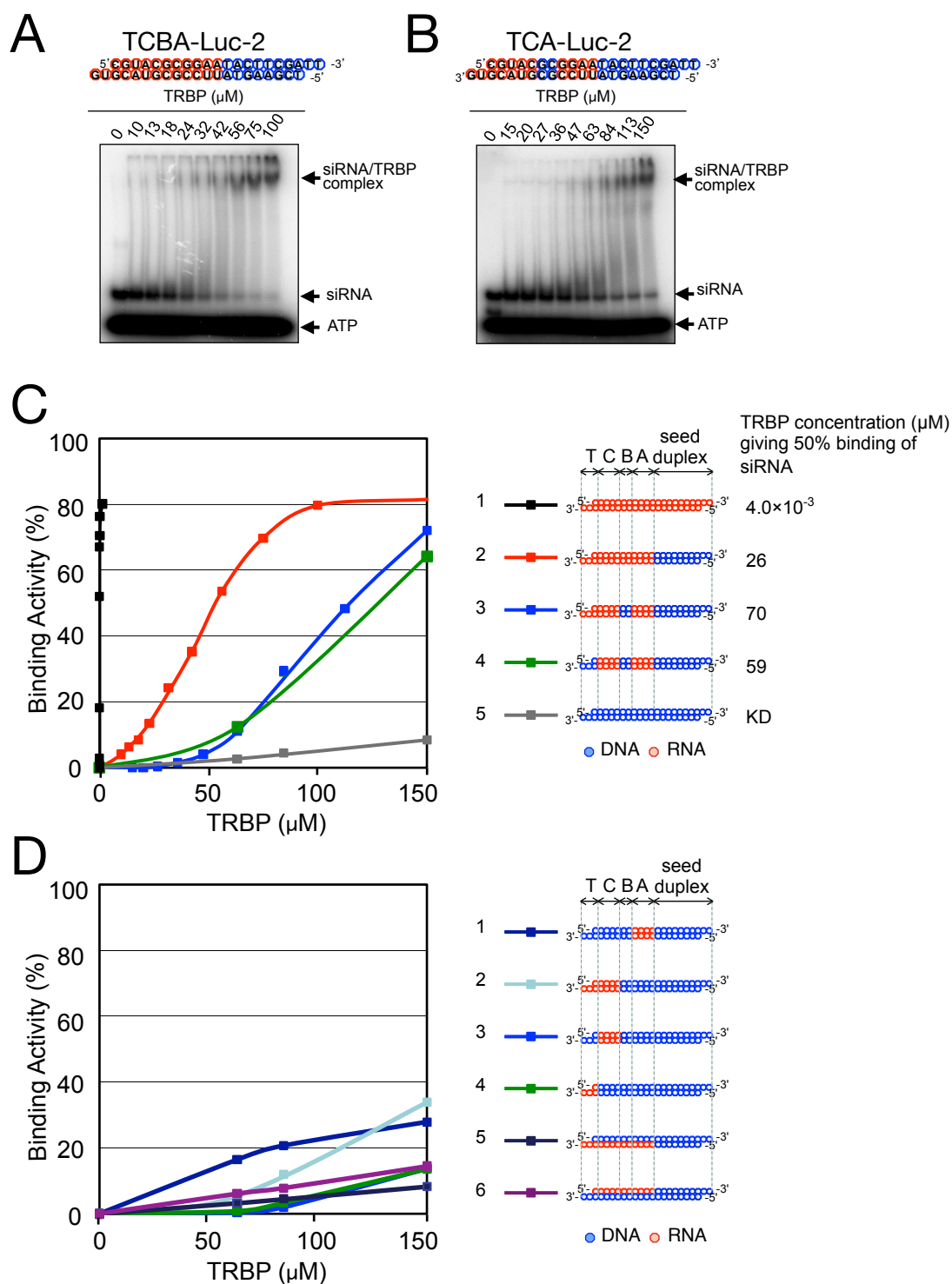


図55 TRBPとsiRNA (siLuc-2)またはDNA/RNAキメラ型siRNAのゲルシフトアッセイ (A, B) ³²Pラベルした0.5 nMのシード領域をDNAに置換したDNA/RNAキメラ型siRNA (A)もしくは、さらにB領域もDNAに置換したDNA/RNAキメラ型siRNA (B)と0-150 μMのTRBP-WTを氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。(C,D) 各TRBP-WT濃度における、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAがTRBP-WTに結合した割合をプロットした。また、siRNAもしくはDNA/RNAキメラ型siRNAがTRBP-WTに50%結合した濃度を右に示した(C)。siRNAとDNA/RNAキメラ型siRNAはsiLuc-1の配列を用いた。RNAを赤、DNAを青で示した。

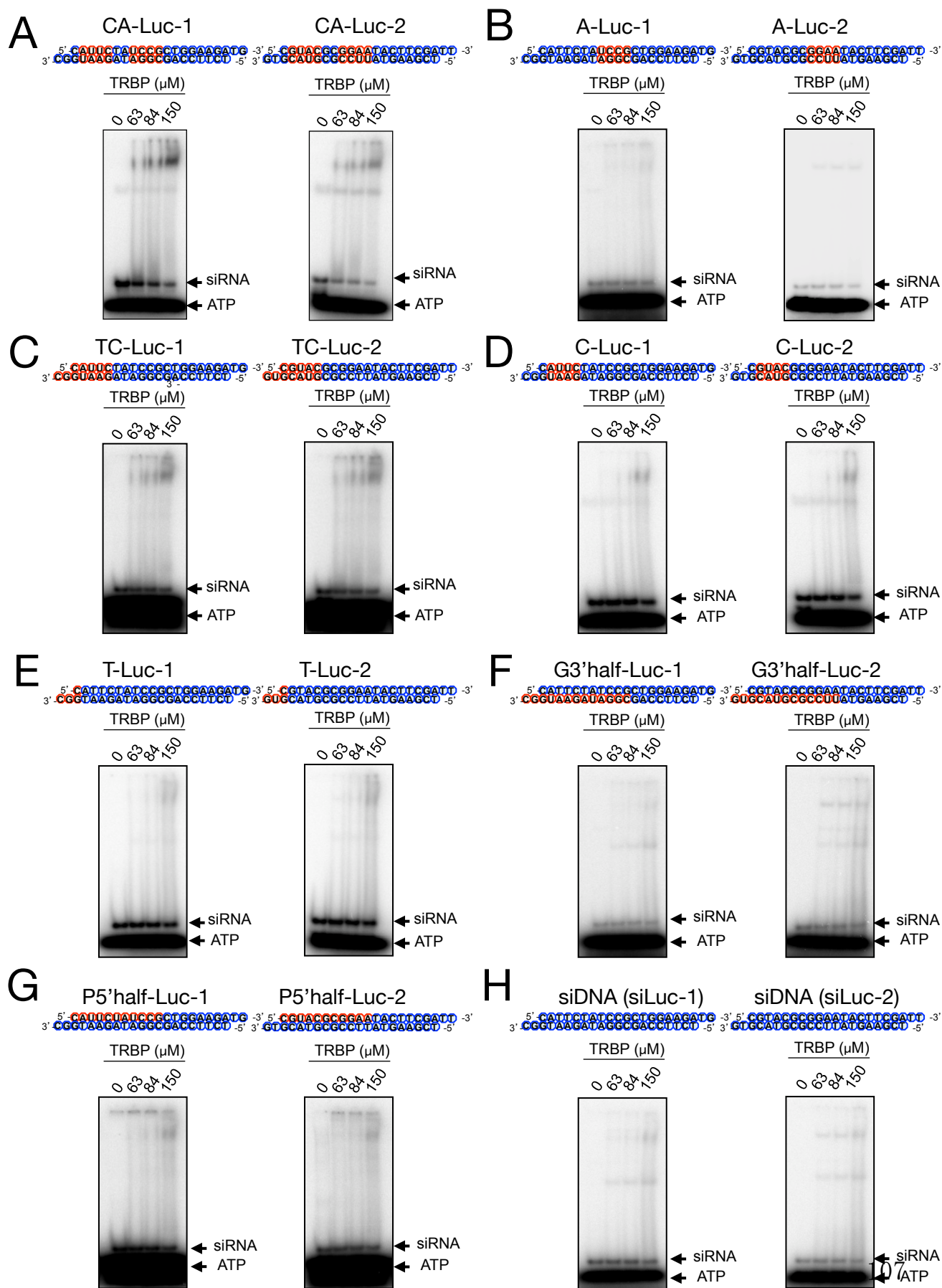


図56 TRBPとDNA/RNAキメラ型siRNAのゲルシフトアッセイ

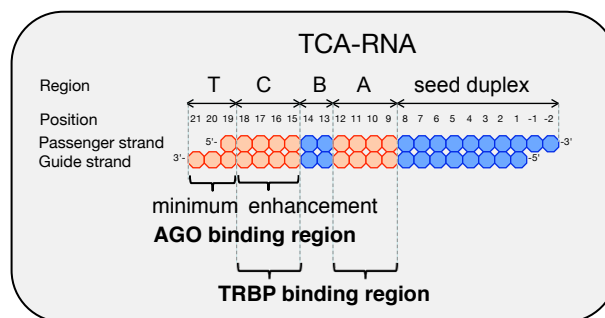


図57 DNA/RNAキメラ型siRNAの非シード領域とRLC/RISCタンパク質との相互作用領域
 非シード領域はT, C, B, A領域の4つに分割することが出来る。A, C領域はTRBPの結合領域である。
 T領域はAgoの最小結合領域であり、C領域はAgoの結合促進領域である。

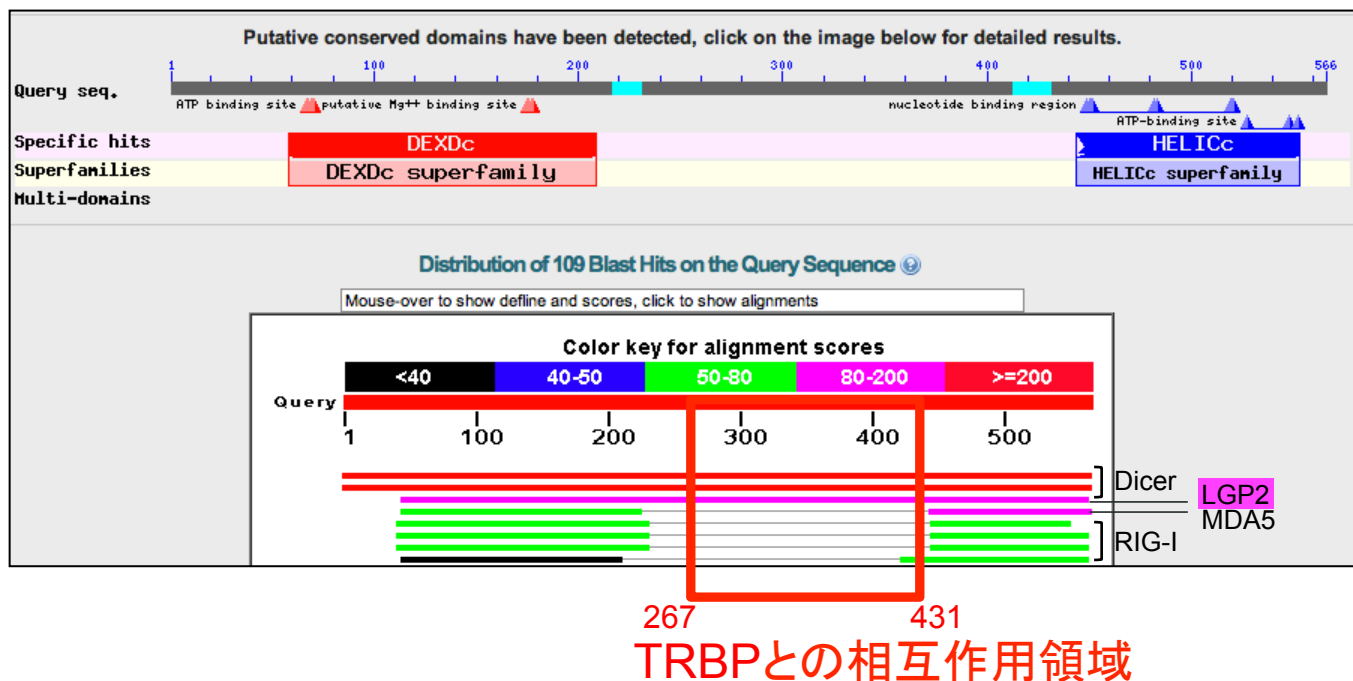


図58 Protein-BlastによるDicerのHelicase/ATPaseドメインと相同性の高いアミノ酸配列をもつタンパク質の検索結果

ヒトDicerのHelicase/ATPaseドメインと相同性の高いアミノ酸配列をもつタンパク質をProtein-Blastで検索した結果、LGP2のHelicase/ATPaseドメインが最も相同性の高いタンパク質であった。MDA5、RIG-IのHelicase/ATPaseドメインも相同性が高かったが、DicerのTRBP相互作用領域である267-431番目のアミノ酸配列は相同性が低かった。

Dicer	MKSPALQPLSMAGLQLMTPASSPMGPFGLPWQOEAIHDNIYTPRKYQVELLEAALD-HN	59
LGP2	-----MELRSYQWEVIMPALGKN	19
	*. ** *: : . ** : *	
Dicer	TIVCLNTGSGKTFIAVLLTKELSYQIRGDFSRNGKRTVFLVNSANQVAQVSAVRTHSDL	119
LGP2	IIIWLP TGAGKTRAAAYVAKRHLETVDG-----AKVVVLVNRVHLVTQHGEFRRMLDG	73
	*: * *:*** *: :*: . : * :*.*** : :*: : . * *	
Dicer	KVGEYSNLEVNASWTKERWNQEF TKHQVLIMTCYVALNVLKN---GYLSLSDINLLVFD	175
LGP2	RWTVTT--LSGDMGPRAFGHLARCHDLLICTAELLQMALTSPEEEHVELTVFSLIVVD	131
	: : . : :*: ** *: : . * . :*: :*: ** *	
Dicer	ECHLAILDHPYREIMK-----LCENCPSCPRI LGLTASILNG-KCDPEEELEEKIQKLEKI	229
LGP2	ECHHTHKDTVYNVIMSQYLELKLQRAQPLPQVLGLTASPGTGGASKLDGAINHVLQLCAN	191
	*** : * *. ** . :. . *:***** . * . : :*: *	
Dicer	LKSNAETATD--LVVLD RYTSQPCEIVVDCGPFTDRSGLYERLLMELEEALNFINDCNIS	287
LGP2	LDTWCIMSPQNCCPQLQEH SQPCKQYNLCHRRSQDP--FGDLLKKLMDQIH--DHLEMP	247
	. : . :: :*.***: * : : * : * : : : : *	
Dicer	<u>VHSKERDSTLISKQILSDCRAVLVVLGPWCADKVAGMMVRELOKYIKHEQEELHRKFLLF</u>	347
LGP2	ELSRKFGTQMYEQQVVKLSEAAALAG-----LQEQRVYALHLRR--YNDALLIH	294
	: : : :: :. . * . : :*: : * * : : :*: :	
Dicer	<u>TD TFLRKIHALCEEHFSPASLDLKFVTPKVIKLEILRKYPYEROQFESVEWYNNRNQD</u>	407
LGP2	DTVRAVDALAALQDFYHREHVTKTQILCAERRLLALFDDRK-----NELAH	340
	. . * :*: : : . : :*: : : * * . *	
Dicer	<u>NYVSWSDSEDDDEDEEIEEKEKPE</u> TNFPSPFTNILCGIIFVERRYTAVVLNRLIKEAGKQ	467
LGP2	LATHGPENPKLEMLEKILQRFSSSNSPR-----GIIFTRTRQSAHSLLLWLQOQ--Q	391
	. . : . :*: : : :*: * * * : * * : * : : *	
Dicer	DPELAYISSNFITGHGIGKNQPRNKQMEAEFRKQEEVLRK FRAHETNLLIATSIVEEGVD	527
LGP2	GLQTVDIRAQLLIGAGNS-----SQSTHMTQRDQQEV IQKFQDGT LNL LVATSVAEEGLD	446
	. : . * :*: * * . :. . *.*:*:*:*: :*:*:*:*:*: *	
Dicer	IPKCNLVVRFDLPT EYRSYVQSKGRARAPISNYIMLADT	566
LGP2	IPHCNVVRYGLLTNEISMVQARGRARADQ-----	476
	::***: * *: * *:*:*****	

図59 DicerとLGP2のATPase/Helicaseドメインのアミノ酸配列

DicerのTRBP相互作用領域である267-431番目のアミノ酸には緑色の下線を記した。この領域におけるLGP2との相同性は10%、類似性は50%であった。同じアミノ酸には“*”、類似性の高いアミノ酸には“:”を記した。

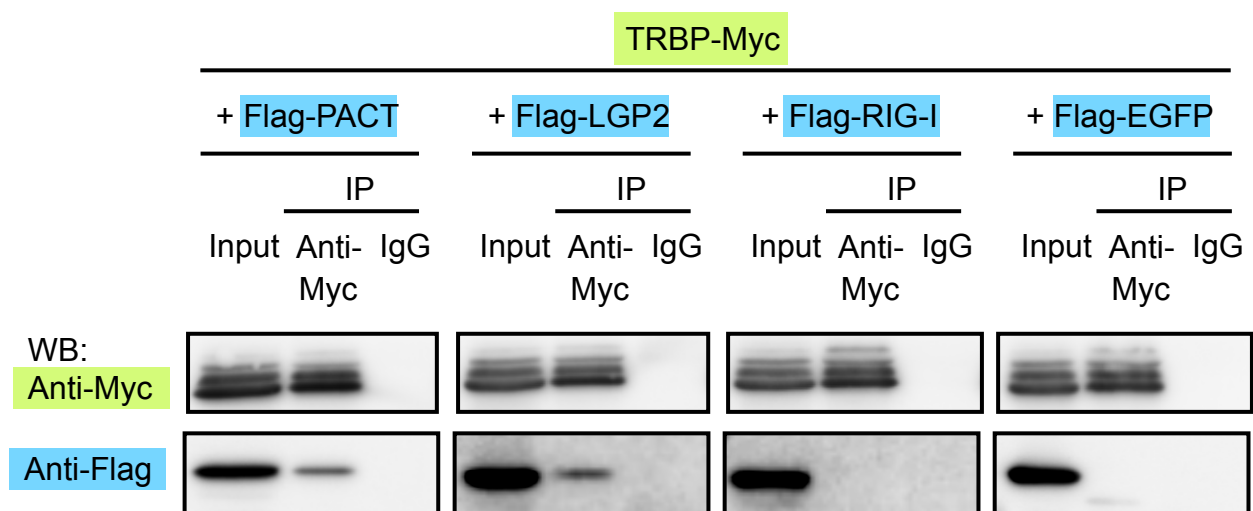


図60 TRBPとLGP2の免疫沈降法による相互作用の解析

HeLa細胞にTRBP-Myc発現ベクターとFlag-PACT, LGP2, RIG-I, EGFP発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし、抗Myc抗体を用いてTRBPを免疫沈降した。各サンプルを変性ゲルで泳動し、抗Flag抗体でウエスタンブロットすることで相互作用タンパク質を検出した。

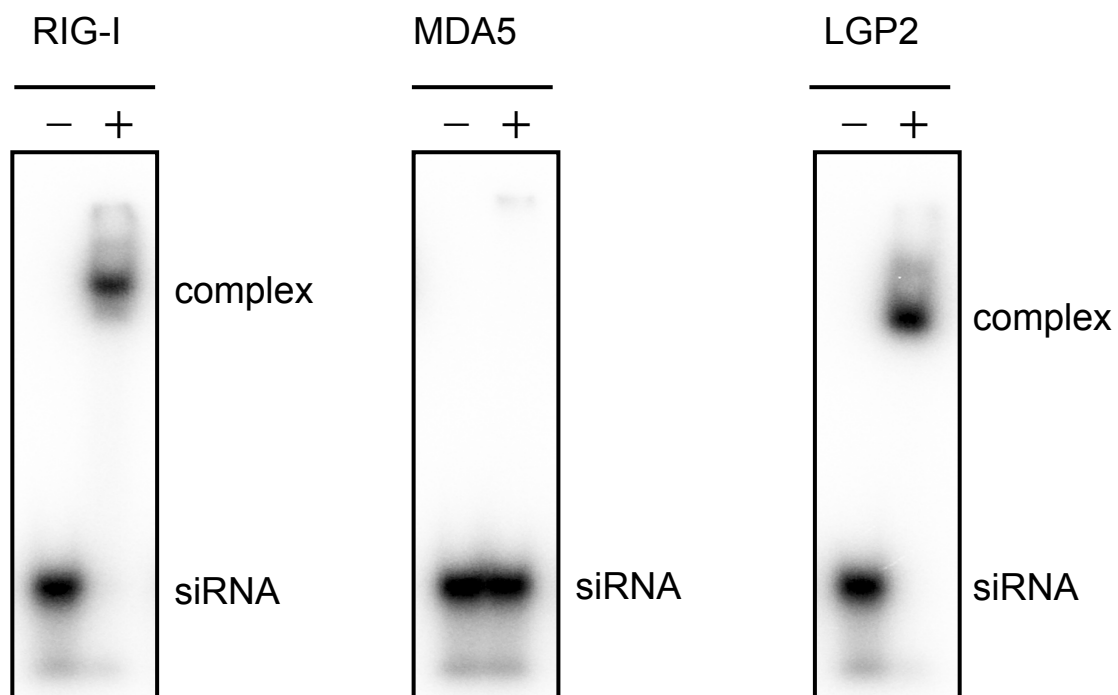


図61 siRNAと精製RLRタンパク質のゲルシフトアッセイ
 ^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと3,000 nMのRIG-I、MDA5、LGP2タンパク質を混合し、30分反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1配列を用いた。

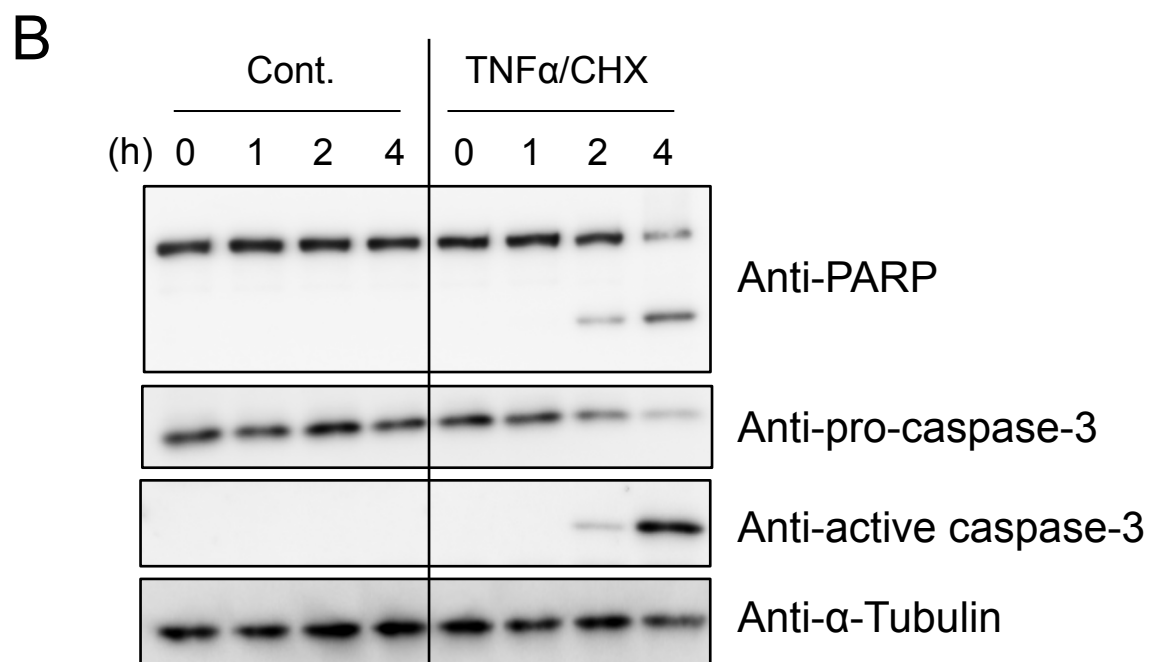
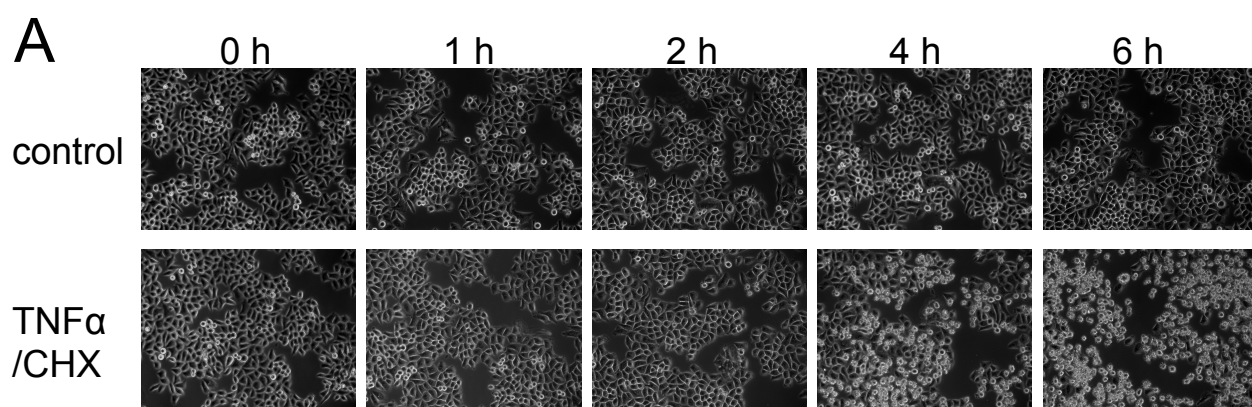


図62 TNF α /CHXによるアポトーシス誘導の確認

(A) ヒトHeLa細胞にTNF α /CHX処理後、0時間、1時間、2時間、4、6時間で細胞を顕微鏡で観察した。
 (B) TNF α /CHX処理後、0時間、2時間、4時間で細胞を回収し、抗PARP抗体、抗pro-caspase-3抗体、抗active caspase-3抗体、抗 α -Tubulin抗体を用いてウエスタンブロットした。

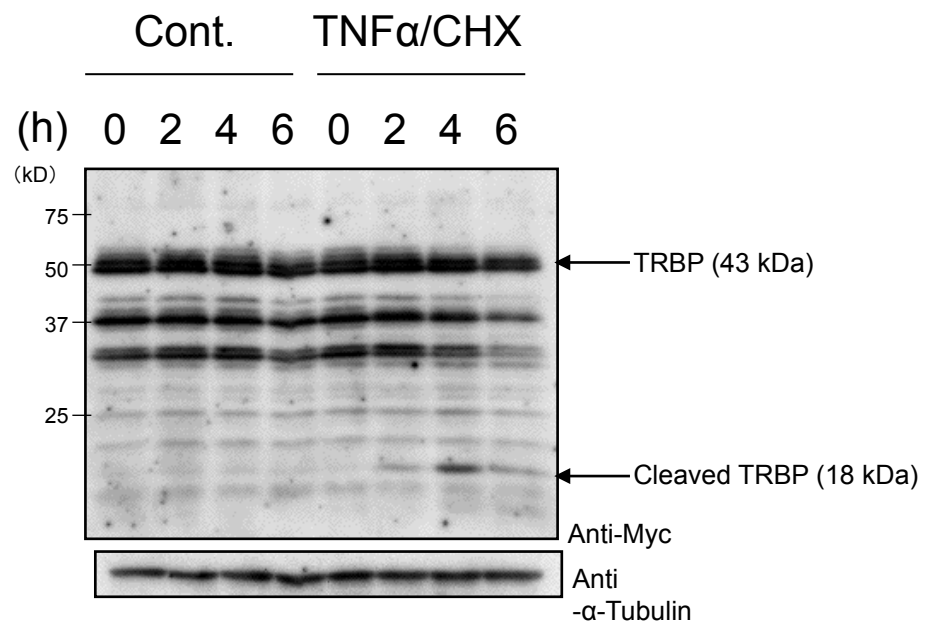


図63 アポトーシス誘導によるTRBPのプロセシング
 HeLa細胞にTRBP-Myc発現ベクターをトランスフェクションし、TNF α /CHX処理後、0時間、2時間、4時間で細胞を回収し、抗Myc抗体を用いてウェスタンブロットし、TRBPを検出した。

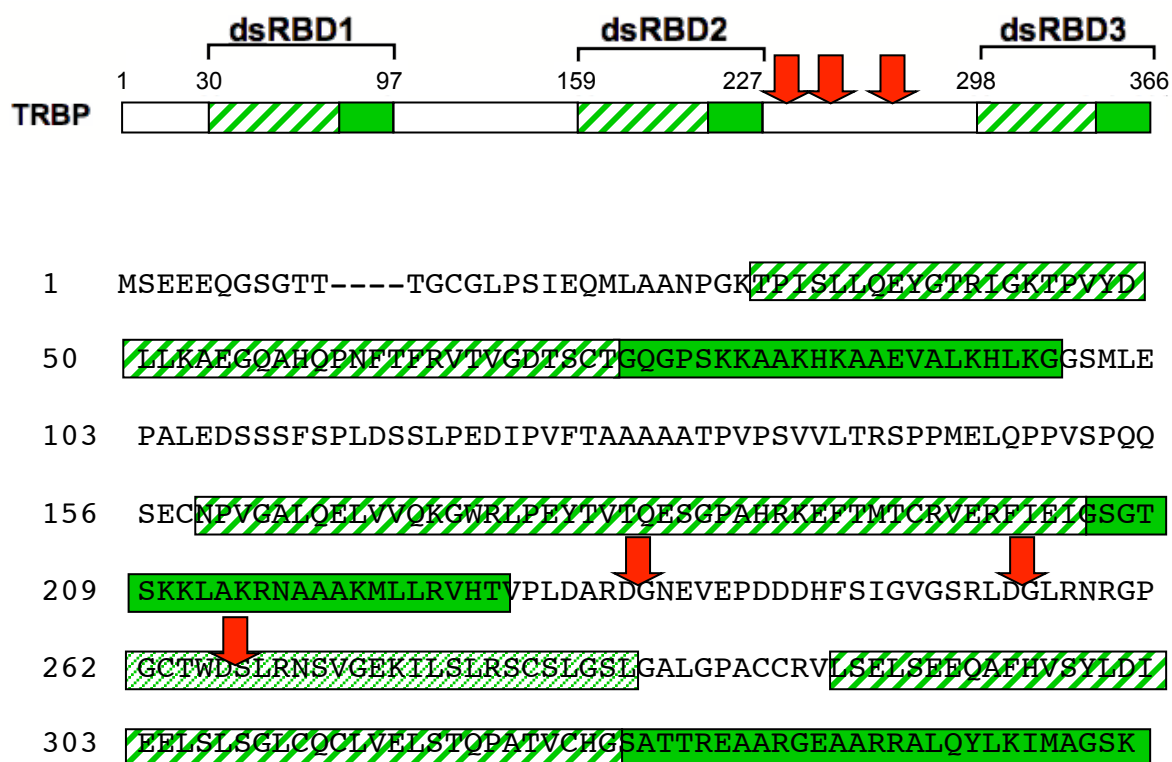
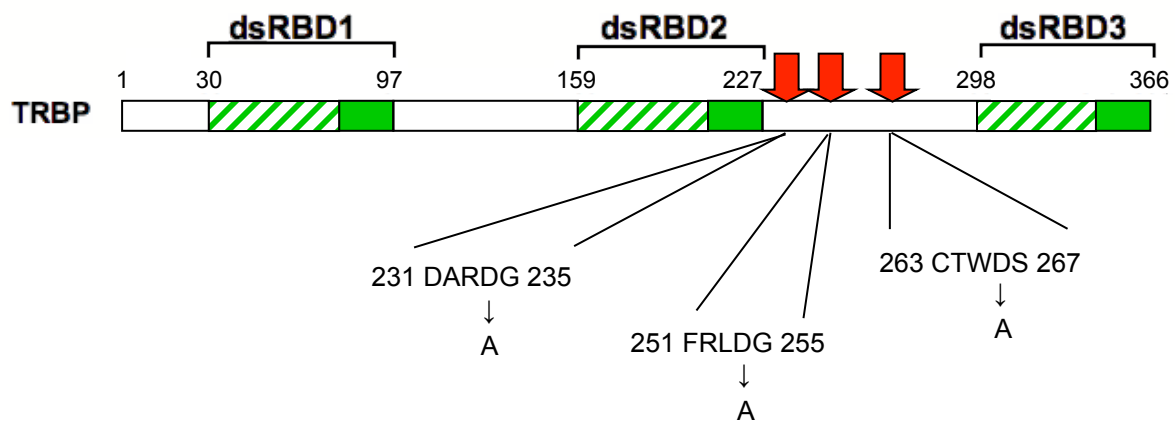


図64 TRBP内のプロセシングモチーフの探索

Caspaseの切断モチーフはDXXD↓Gであり、特にDの保存性が高い。TRBP内でCaspaseの切断モチーフを探索したところ、dsRBD2とdsRBD3の間に3つ存在することがわかった。赤矢印で予想される切断サイトを示した。



TRBP-D234A : 234番目のアスパラギン酸をアラニンに置換

TRBP-D254A : 254番目のアスパラギン酸をアラニンに置換

TRBP-D266A : 266番目のアスパラギン酸をアラニンに置換

図65 Caspaseプロセッシングモチーフに変異を導入した変異型TRBPの作製
3つのcaspase切断モチーフそれぞれに変異を導入した変異型TRBPを作製した。

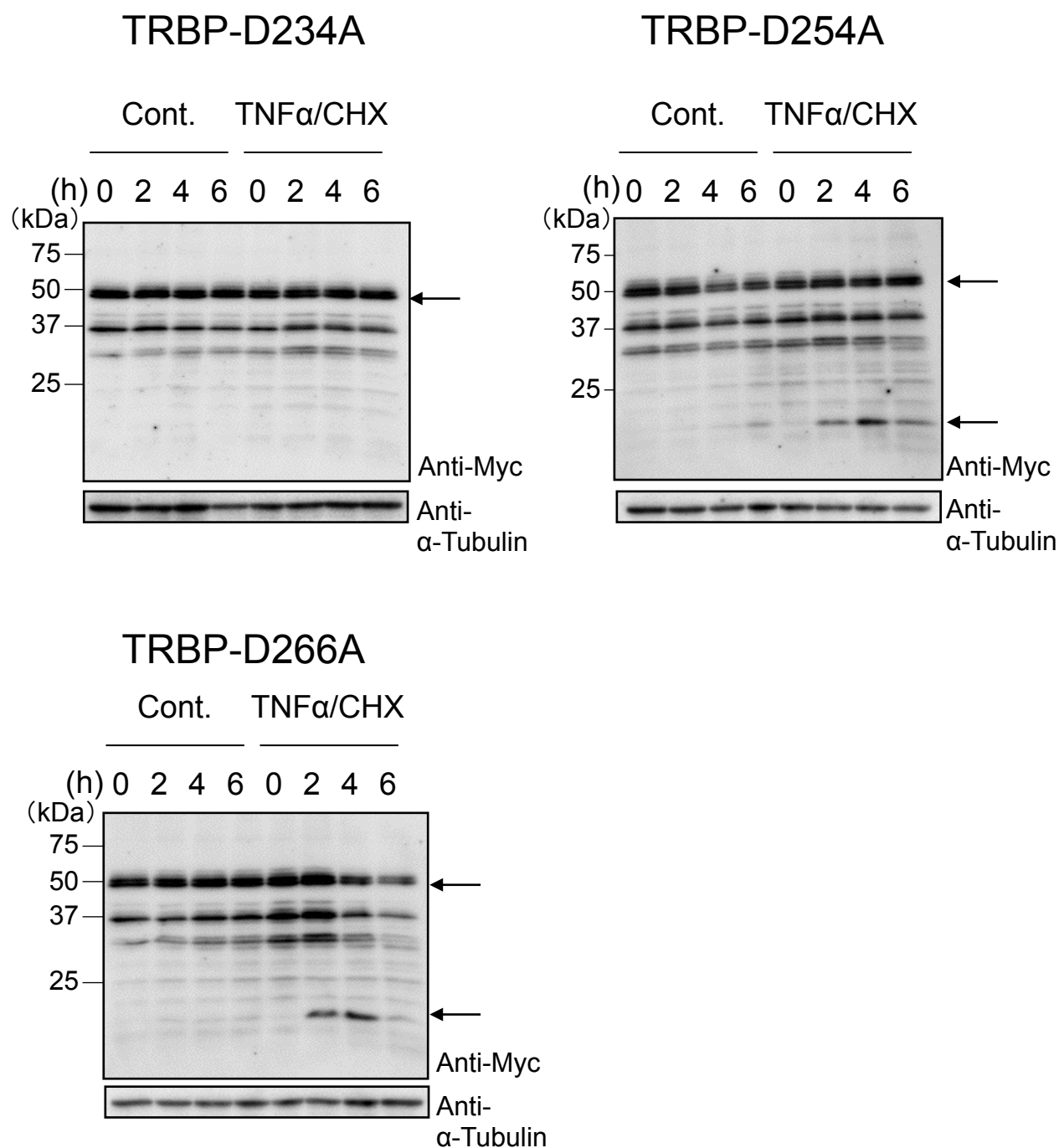


図66 TRBPのcaspaseによる切断モチーフの同定
 TRBP内のCaspase切断モチーフに変異を導入した変異型TRBP (D234A、D254A、D266A)をそれぞれ細胞内で発現させた。TNFα/CHX処理後、0時間、2時間、4時間、6時間で細胞を回収し、抗Myc抗体を用いてウエスタンブロットし、TRBPを検出した。

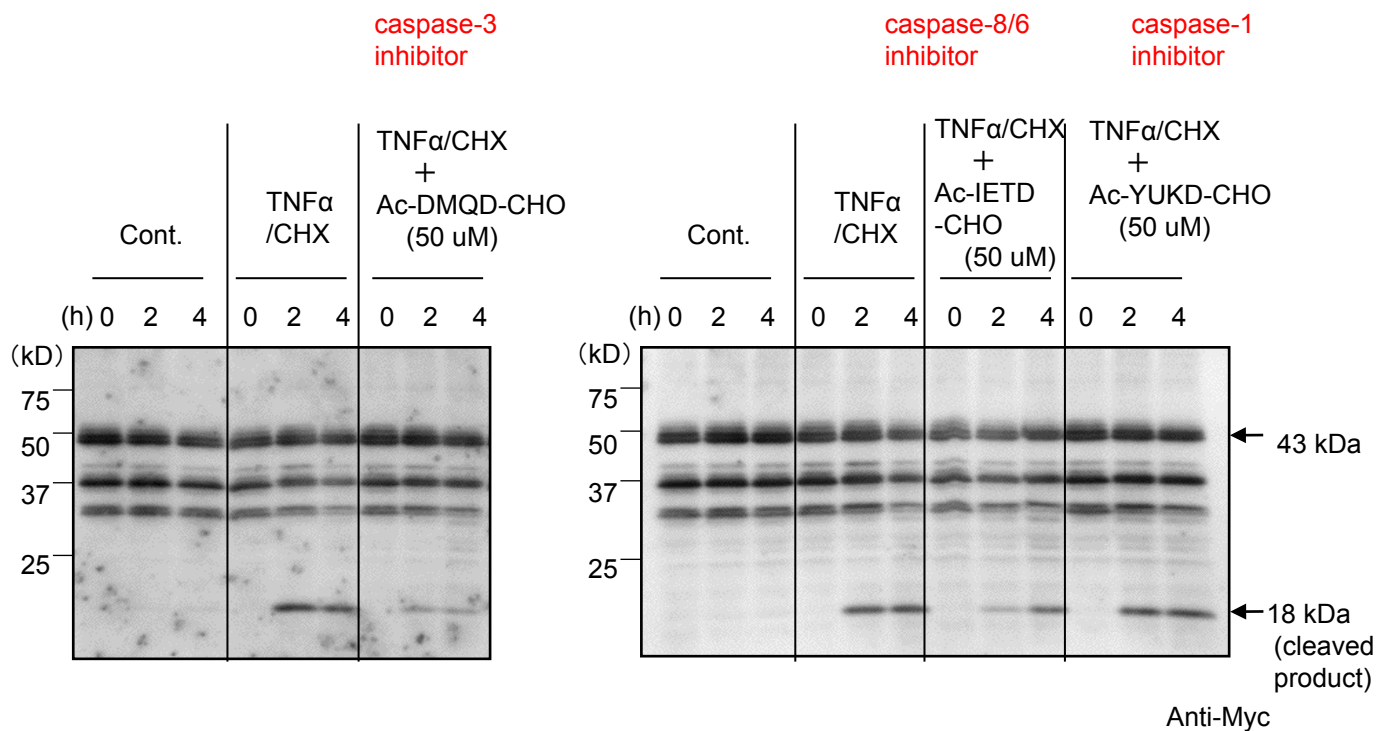


図67 Caspase阻害剤がTRBPのプロセシングに与える影響

それぞれTNF α /CHXとCaspase-3阻害剤 (Ac-DMQD-CHO)、Caspase-8/6阻害剤 (Ac-IETD-CHO)、Caspase-1阻害剤 (Ac-YUKD-CHO)を混合し、TNF α /CHX処理後、0時間、2時間、4時間、6時間で細胞を回収し、抗Myc抗体を用いてウエスタンブロットし、TRBPを検出した。

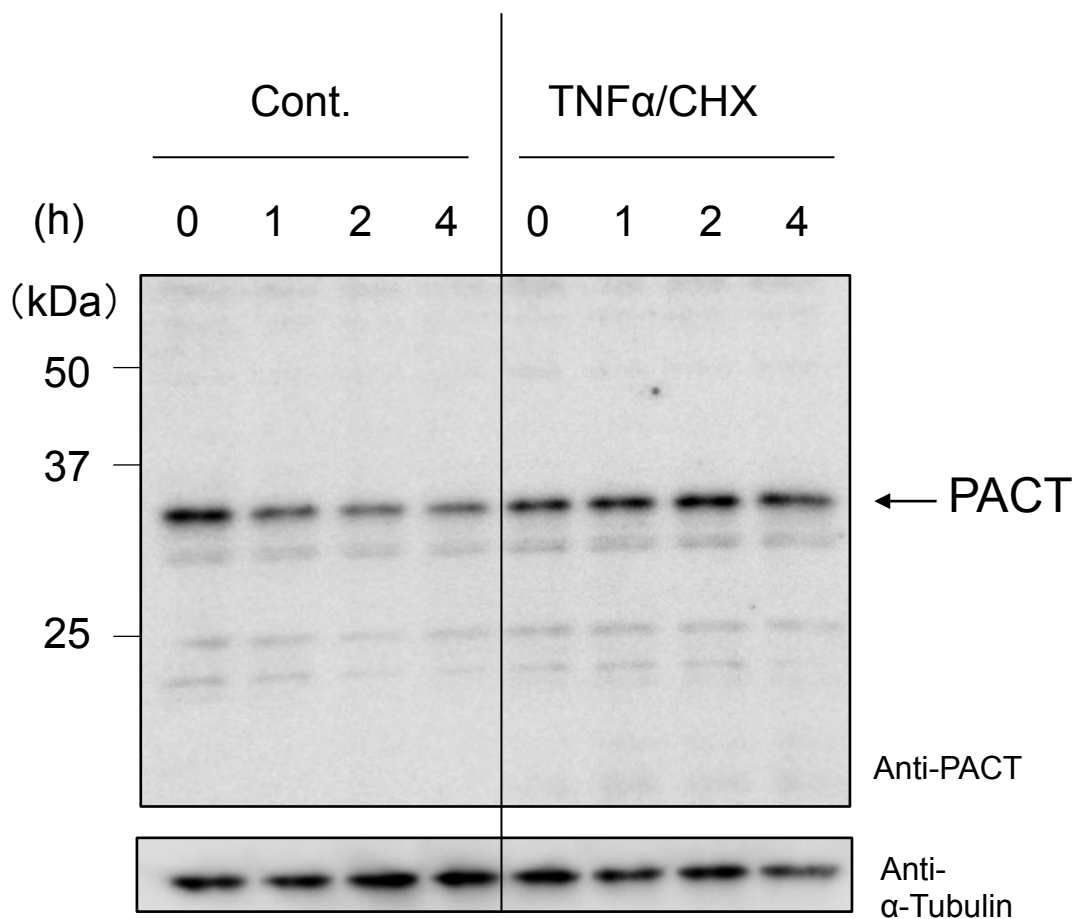


図68 アポトーシス誘導時のPACTのウエスタンブロット

HeLa細胞にTRBP-Myc発現ベクターをトランスフェクションし、TNFα/CHX処理後、0時間、2時間、4時間で細胞を回収し、抗PACT抗体を用いてウエスタンブロットし、PACTを検出した。PACTはアポトーシス誘導により、プロセッシングを受けなかった。

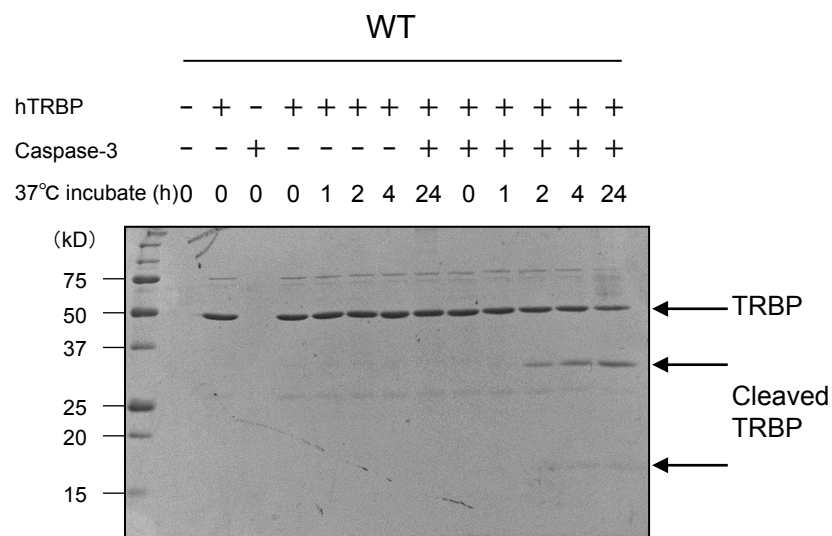


図69 Caspase-3によるTRBPの*in vitro* 切断アッセイ

TRBPとcaspase-3を混合し、37°Cで反応した。一定時間反応後、反応液と等量の2×SDS-PAGE sample bufferを加えることで、反応を停止し、5分間煮沸した後、12.5 %変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、CBBで染色した。

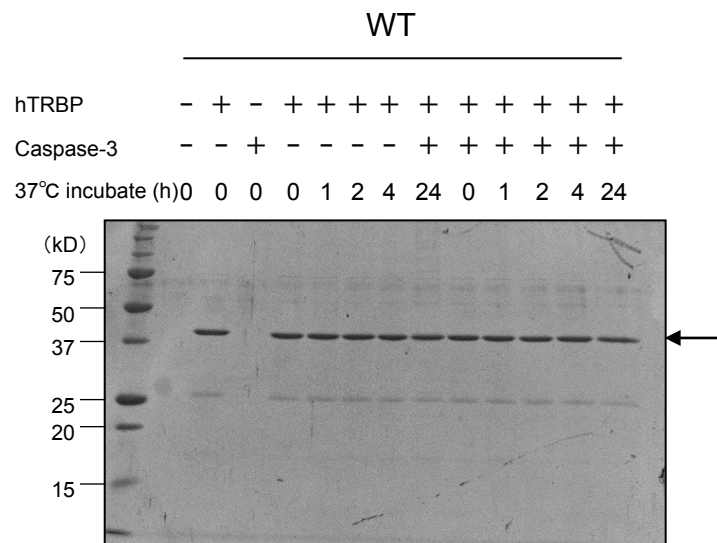


図70 Caspase-3によるPACTの*in vitro* 切断アッセイ
PACTとcaspase-3を混合し、37℃で反応した。一定時間反応後、反応液と等量の2×SDS-PAGE sample bufferを加えることで、反応を停止し、5分間煮沸した後、12.5 %変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。

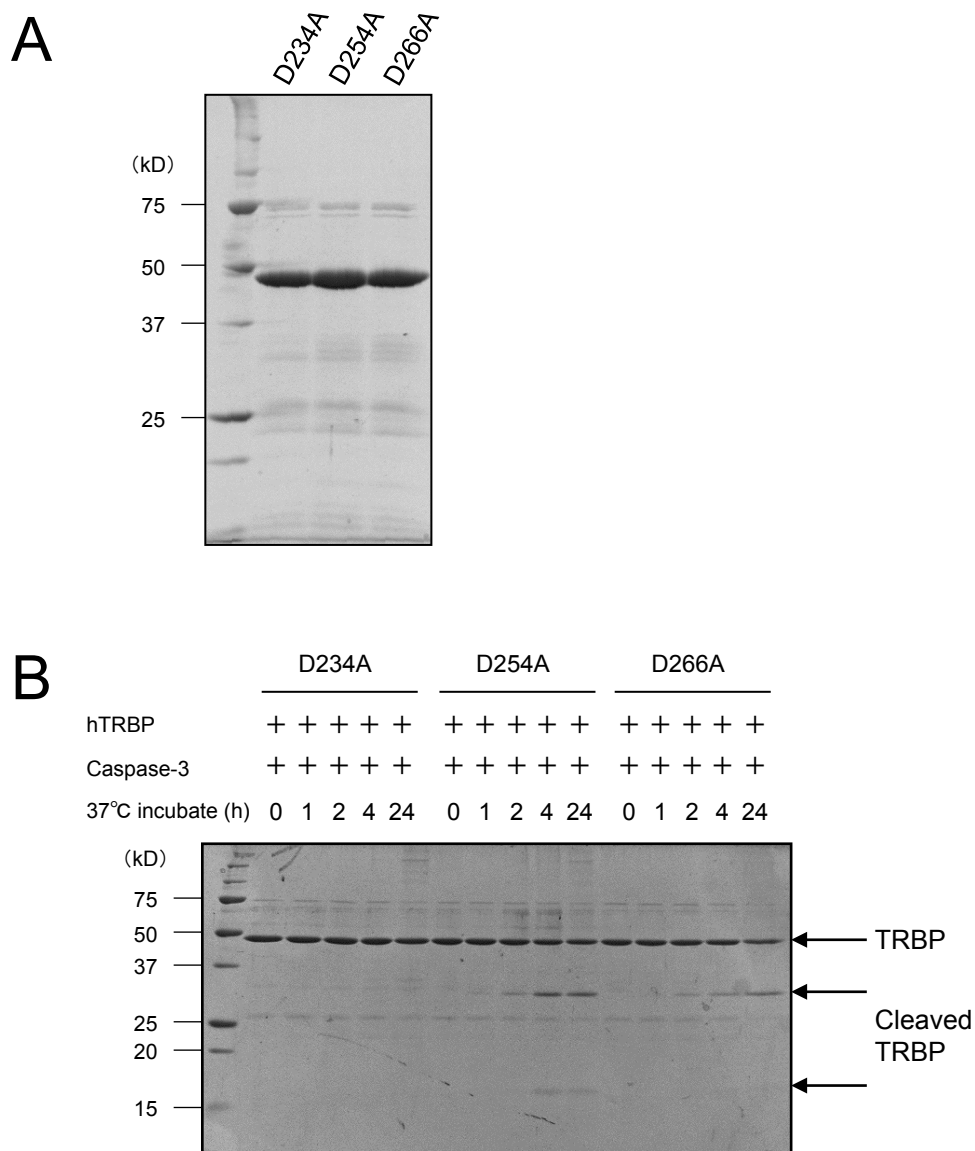


図71 Caspase-3による変異型TRBPの*in vitro* 切断アッセイ

(A) TRBP内のcaspaseプロセッシングモチーフに変異を導入した変異型TRBP (D234A、D254A、D266A)をTRBP-WTと同様の方法で大腸菌内で発現、精製し、12.5%変性ゲルで泳動した後、CBBで染色した。

(B) Caspase-3と一定時間反応後、反応液と等量の2×SDS-PAGE sample bufferを加えることで、反応を停止し、5分間煮沸した後、12.5 %変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、CBBで染色した。

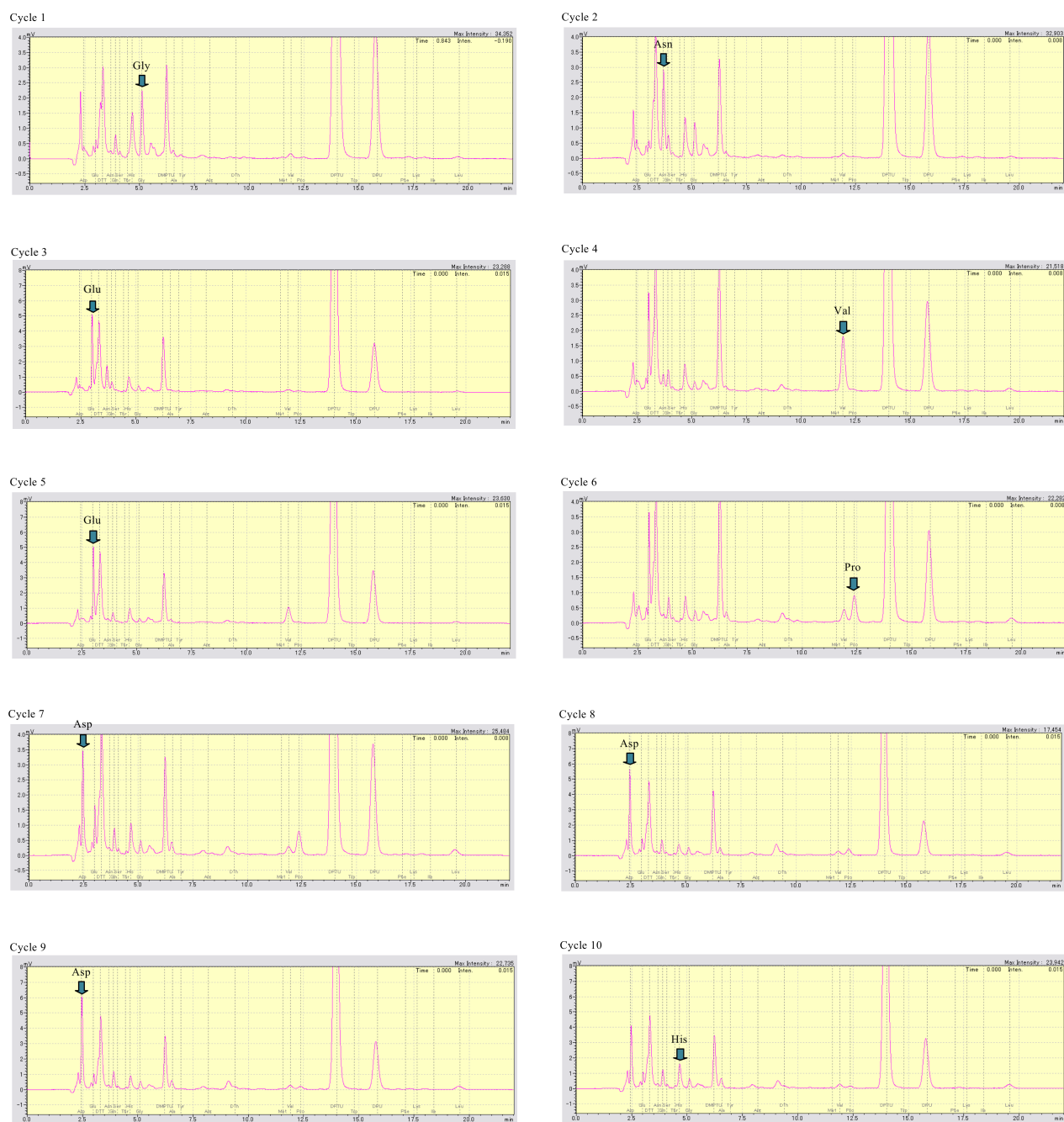


図72 TRBPのCaspase-3によりプロセッシングされたC末端フラグメントの
アミノ酸N末端シーケンス

精製したTRBPとCaspase-3を混合し、37℃で反応させた後、反応液を変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、PVDF膜にタンパク質を転写させた後、CBBで染色し、プロセッシングされたTRBPタンパク質のC末端側のフラグメントと一致するバンドを切り出し、N末端アミノ酸シーケンス解析を行った。その結果、プロセッシングされたTRBPのC末端側のフラグメントのアミノ酸はN末端側から順番にGly-Asn-Glu-Val-Glu-Pro-Asp-Asp-Aspであり、TRBPがD234とG235の間でプロセッシングを受けた場合に生成される産物と同じ配列であった。

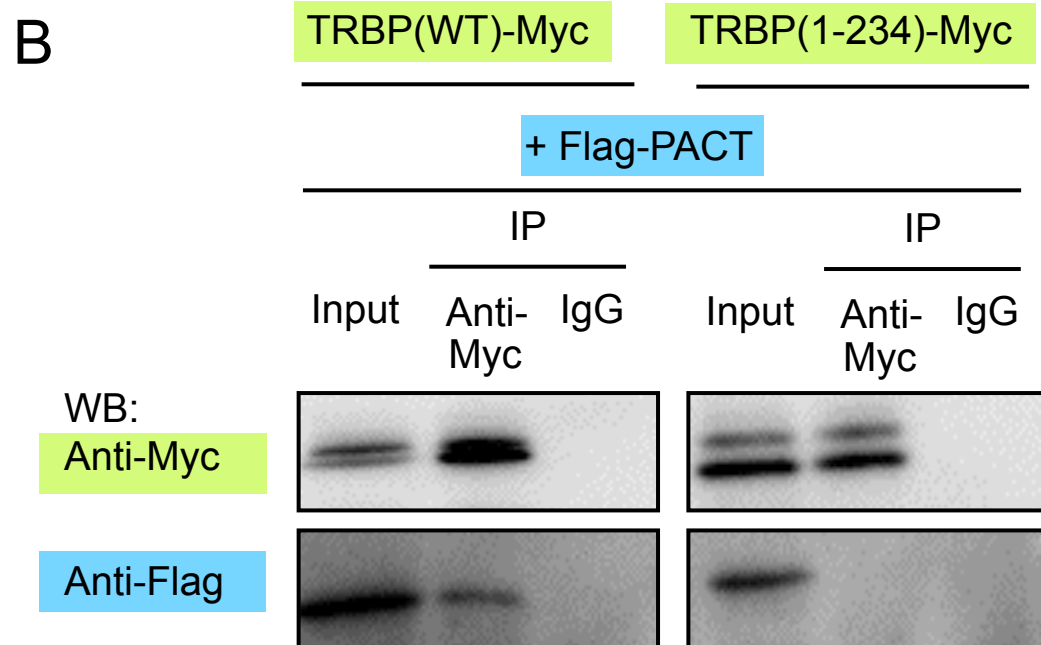
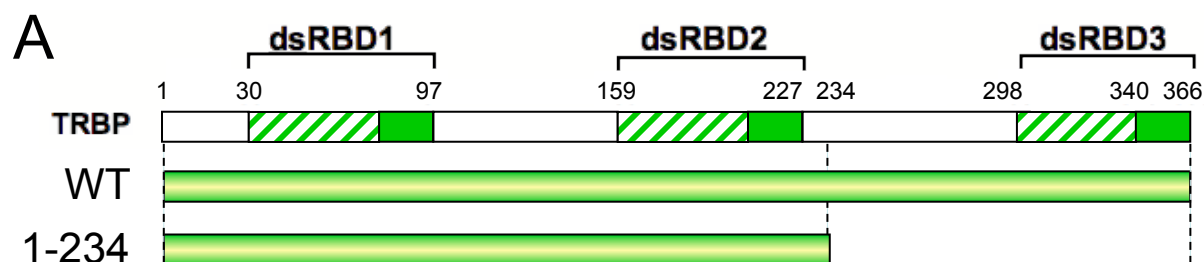


図73 TRBPまたはプロセッシングされたTRBPとPACTの免疫沈降法による相互作用の解析
 (A) C末端にMycタグを融合したTRBP-WTまたはプロセッシングされたTRBPの発現コンストラクトを作製した。
 (B) HeLa細胞にTRBPまたはプロセッシングされたTRBPの発現コンストラクトと、N末端にFlagタグを融合したPACT発現コンストラクトをトランスフェクションし、抗Myc抗体でTRBPを免疫沈降した後、ウエスタンブロットにより抗Flag抗体でPACTを検出した。

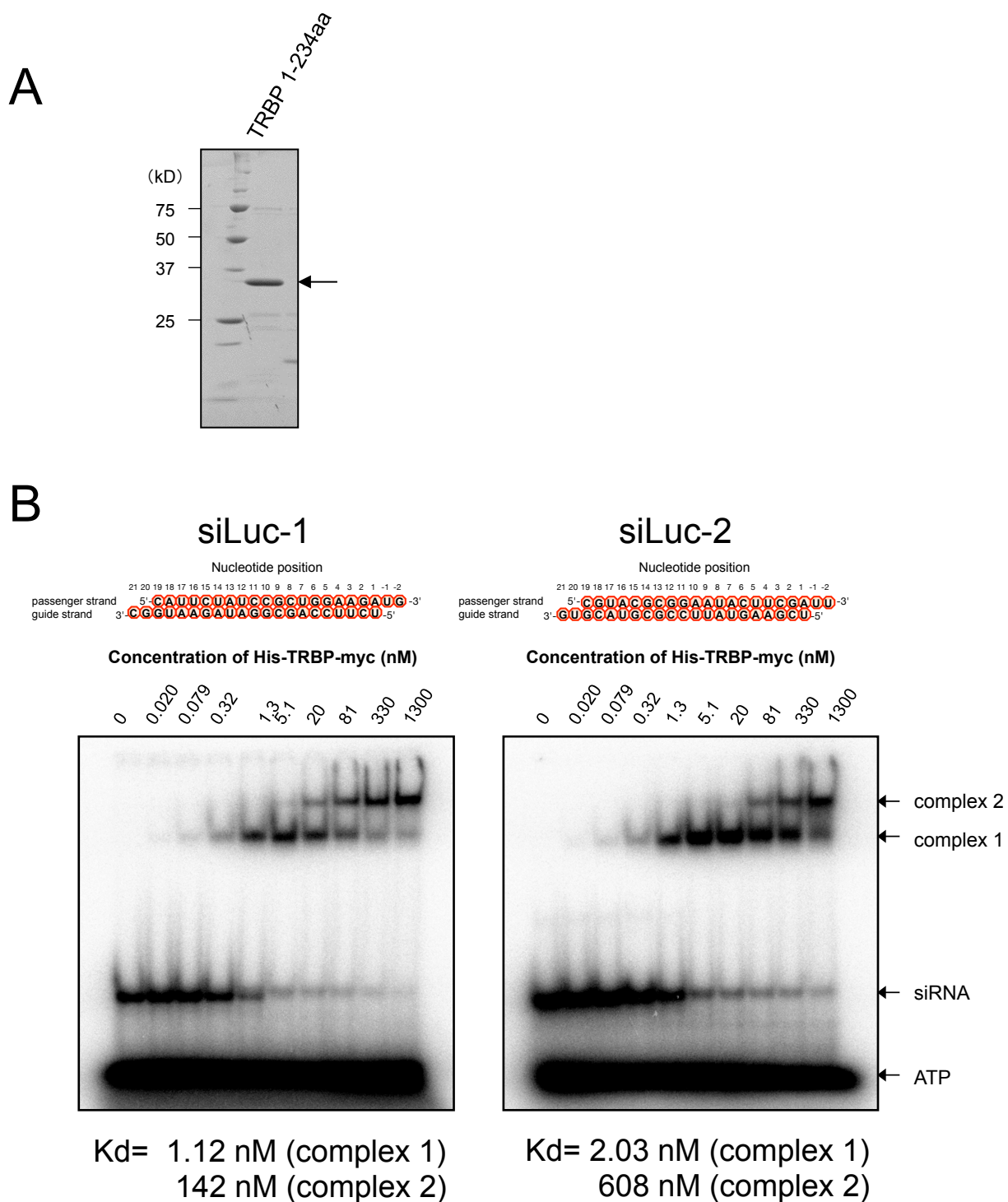


図74 プロセシングされたTRBPの精製とsiRNAのゲルシフトアッセイ

(A)精製したHis-TRBP 1-234aa-Mycタンパク質を12.5%変性ゲルで泳動し、CBBで染色した。

(B) ^{32}P ラベルした0.5 nMのsiRNAと0-1,300 nMのプロセシングされたTRBP (TRBP 1-234aa)を氷上で混合し、30分反応後、9%非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。siRNAはsiLuc-1とsiLuc-2の2つの配列を用いた。

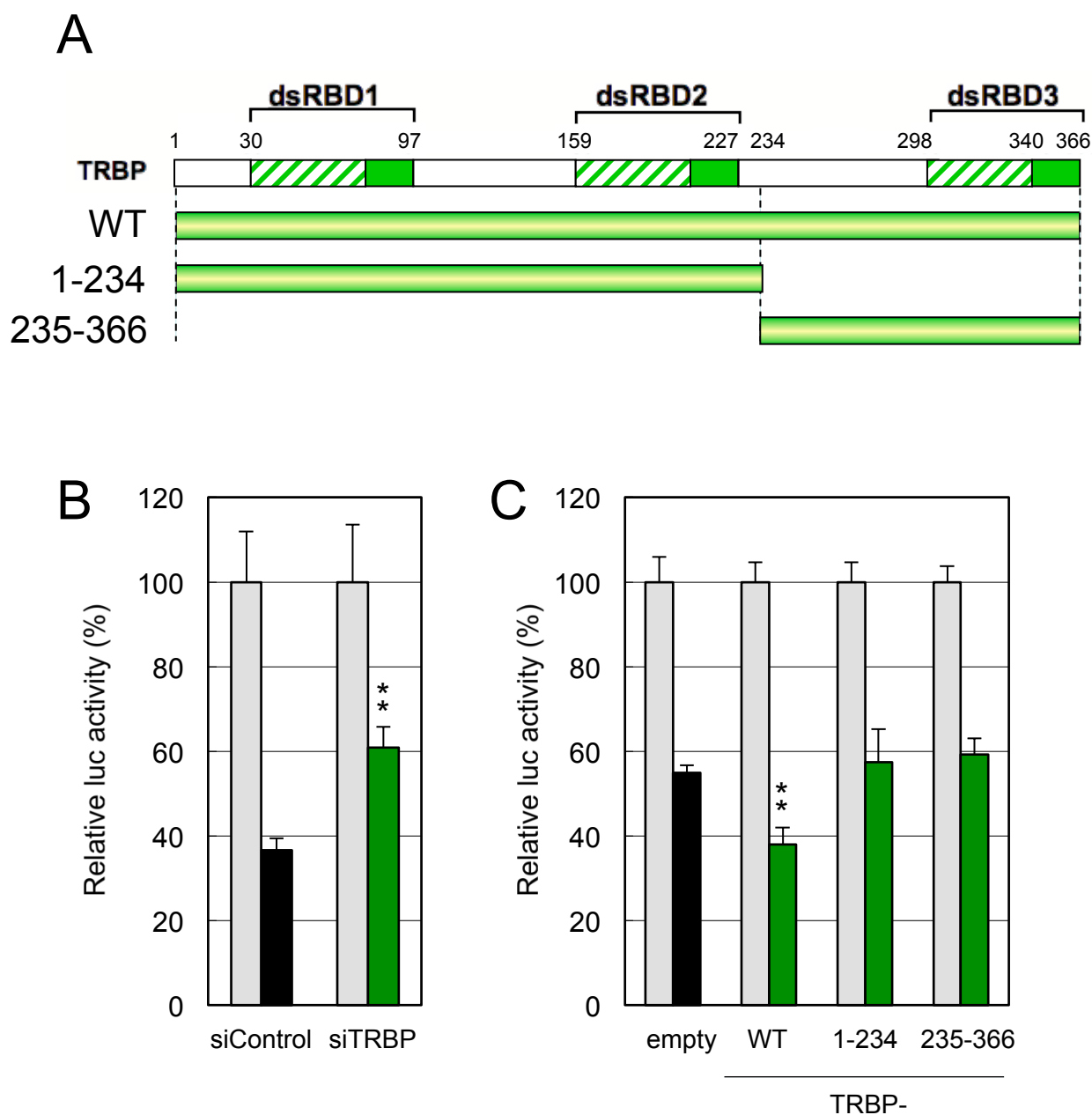
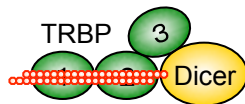


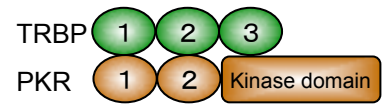
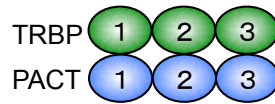
図75 TRBPまたはプロセシングされたTRBPの、マウスTRBPノックアウト細胞におけるRNAi効果

(A) C末端にMycタグを融合したTRBP-WTまたはプロセシングされたTRBPの発現コンストラクトを作製した。
 (B) HeLa細胞でTRBPをノックダウンしたときのRNAi効果 (C) マウスTRBPノックアウト細胞に、TRBP-WTまたはプロセシングされたTRBPを発現させたときのRNAi効果

通常状態

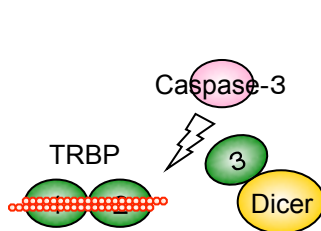


RNAiを促進

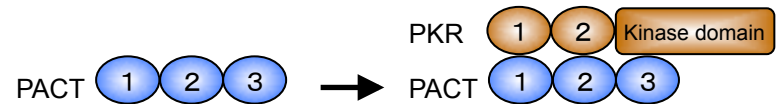
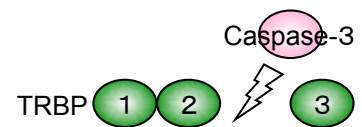
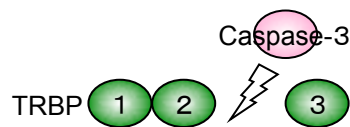


PKR不活性化

アポトーシス時



RNAiを促進しない



PKR活性化?

図76 アポトーシス誘導によるTRBPのプロセッシングが与える影響のモデル

通常状態では、TRBPはDicerとの相互作用によりRNAiを促進する。またPACTやPKRと相互作用することにより、PKRの活性化とそれに伴うアポトーシスを抑制している。

一方、Caspaseが活性化されると、TRBPは二番目と三番目の二本鎖RNA結合ドメインの間でプロセッシングされる。するとDicerとの相互作用が消失し、RNAiは抑制される。また、PACTとの相互作用も消失するので、PACTはPKRを活性化し、アポトーシスが誘導されることが考えられる。

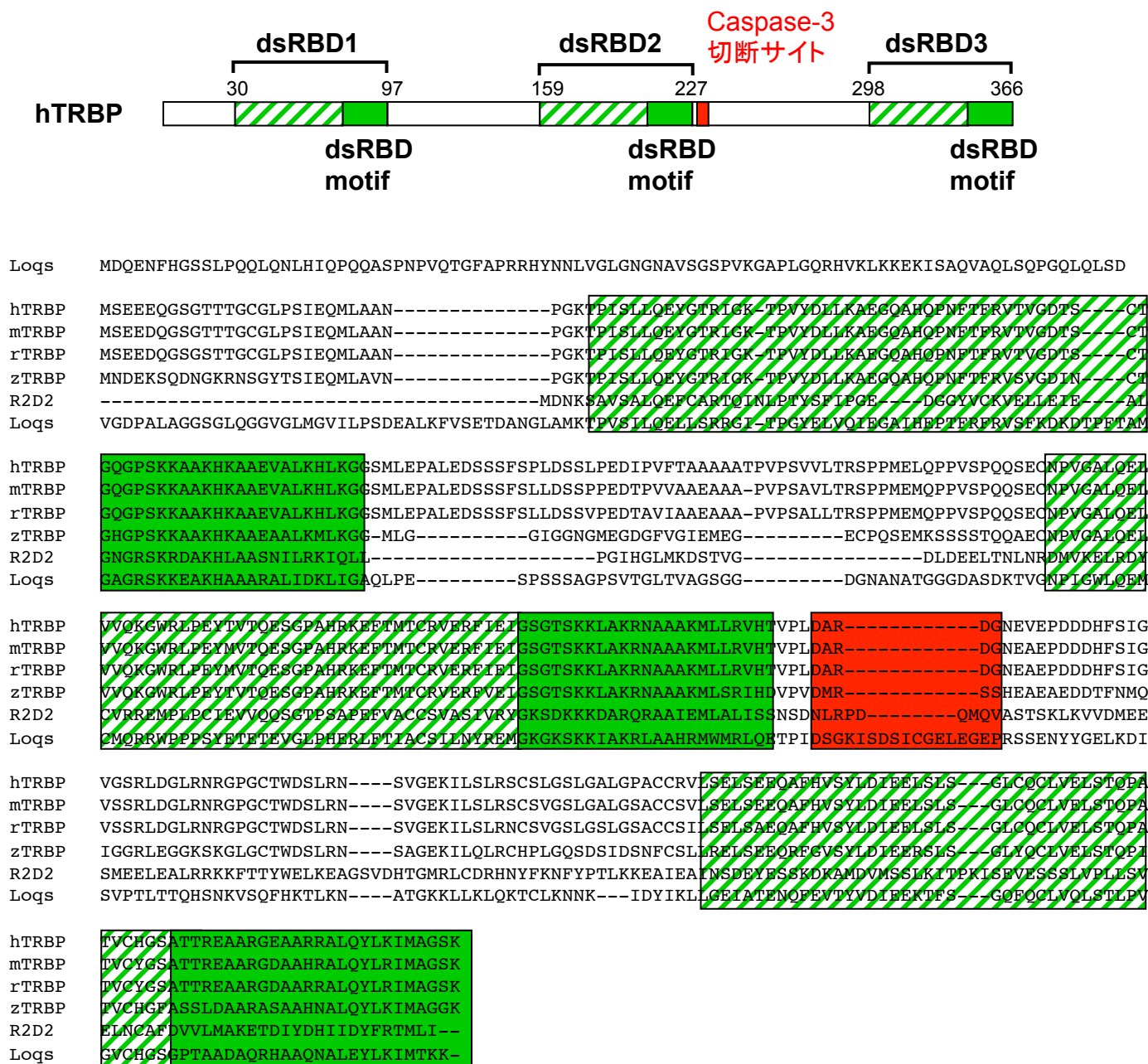


図77 哺乳類に保存されたCaspaseによるTRBPのプロセシングモチーフ
ヒト (hTRBP)、マウス (mTRBP)、ラット (rTRBP)、ゼブラフィッシュ (zTRBP)、ハエのTRBPホモログ (R2D2, Loqs) のアミノ酸配列を比較したところ、哺乳類のTRBP (hTRBP, mTRBP, rTRBP) でのみ Caspase によるTRBPのプロセシングモチーフが保存されていた。

表1 ゲルシフトアッセイ、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびRNAi活性測定に使用したsiRNAとshRNAの配列
大文字はRNA、小文字はDNAを示す。

siRNA	guide strand sequence (5'→3')	passenger strand sequence (5'→3')
siLuc-1	UCUUC CAGCGGAUAGAAUGGC	CAUUCUAUCCG CUGGAAGAUG
siLuc-2	UCGAAGUAUUC CGGUACGUG	CGUACGCGGAAUACUUCGAUU
siLuc-3	UCUUCAUAGAAUGGCGCCGGG	CGGCGCCAUUCUAUGAAGAUG
siLuc-4	CCAGCGGUCCAUCUUC CAGC	UGGAAGAUGGAACCGCUGGAG
siLuc-5	GGCGCCGGGCCUUUCUUUAUG	UAAAGAAAGGCCCGGCGCCAU
siLuc-6	CGGCGGCGGGAAGUUCACCGG	GGUGAACUUC CCGCCCGGUU
siLuc-1B	UCUUC CAGCGGAUAGAAUGGC	GCCAUUCUAUCCG CUGGAAGA
siLuc-2B	UCGAAGUAUUC CGGUACGUG	CACGUACGCGGAAUACUUCGA
siLuc-1D	UCUUC CAGCGGAUAGAAUGgc	CAUUCUAUCCG CUGGAAGAtg
siLuc-2D	UCGAAGUAUUC CGGUACGtg	CGUACGCGGAAUACUUCGAtt
siDNA (siLuc-1)	tcttccagcggatagaatggc	cattctatccgctggaagatg
siDNA (siLuc-2)	tcgaagtattccgcgtacgtg	cgtacgcggaataacttcgatt
TCBA-Luc-1	tcttccagCGGAUAGAAUGGC	CAUUCUAUCCGctggaagatg
TCA-Luc-1	tcttccagCGGAtaGAAUGGC	CAUUCtaUCCGctggaagatg
CA-Luc-1	tcttccagCGGAtaGAAUggc	cAUUCtaUCCGctggaagatg
TC-Luc-1	tcttccagcggataGAAUGGC	CAUUCtatccgctggaagatg
A-Luc-1	tcttccagCGGAtagaatggc	cattctaUCCGctggaagatg
T-Luc-1	tcttccagcggatagaatGGC	Cattctatccgctggaagatg
C-Luc-1	tcttccagcggataGAAUggc	cAUUCtatccgctggaagatg
G3'half-Luc-1	tcttccagCGGAUAGAAUGGC	cattctatccgctggaagatg
P5'half-Luc-1	tcttccagcggatagaatggc	CAUUCUAUCCGctggaagatg
TCBA-Luc-2	tcgaagtaUUC CGGUACGUG	CGUACGCGGAAtacttcgatt
TCA-Luc-2	tcgaagtaUUCGcGUACGUG	CGUACgcGGAAtacttcgatt
CA-Luc-2	tcgaagtaUUCGcGUACgtg	cGUACgcGGAAtacttcgatt
TC-Luc-2	tcgaagtattccgcGUACGUG	CGUACgcggaataacttcgatt
A-Luc-2	tcgaagtaUUCGcgtacgtg	cgtacgcGGAAtacttcgatt
T-Luc-2	tcgaagtattccgcgtacGUG	Cgtacgcggaataacttcgatt
C-Luc-2	tcgaagtattccgcGUACgtg	cGUACgcggaataacttcgatt
G3'half-Luc-2	tcgaagtaUUC CGGUACGUG	cgtacgcggaataacttcgatt
P5'half-Luc-2	tcgaagtattccgcgtacgtg	CGUACGCGGAAtacttcgatt
shLuc-A	gauuucgagucgucuuaaugugcuuccugucacacauuaagacgacucgaaucuu	

表2 野生型および変異型TRBP発現コンストラクトの作製に使用したプライマーの配列
Fはforward primer、Rはreverse primerを示す。

primer name	sequence (5'→3')
HindIII-TRBP-F	cccaagcttatgctggccgccaacccaggca
NotI-TRBP-R	atagtttagcggccgccttgctgcctgccatgatcttg
NheI-TRBP-F	aaaggggctagcatgagtgaagaggagcaaggctcc
HindIII-TRBP-R	aaagggaagctttcacagatcctcttctgagatgagtttttg
BamHI-PACT-F	cgggatccatgtcccagagcaggcaccgcg
Sall-PACT-R	gcgtcgacctttctttctgctattatcttt
BamHI-pET28a-F	gaattcggatccgctagccatatggctgccgcgcgg
Sall-pET28a-R	gagctcgtcgacgcggccgctgcaagctcctcgagc
TRBP-dsRBDmt1-F	gccgcagccaagcacaaggcagctg
TRBP-dsRBDmt1-R	agcgtctggggccctgaccagtgcag
TRBP-dsRBDmt2-F	gccttggcaaagcggaatgcggcgccaaaatgctgc
TRBP-dsRBDmt2-R	agcgggaagtgccactcccaatctcaatgaaacgctccactcg
TRBP-ΔdsRBD3-F	gcggccgctgcaagctcctcgagc
TRBP-ΔdsRBD3-R	gacacggcagcaggcagggcccaggg
PACT-dsRBDmt1-F	gccctggcgaaacatagagctgcagaggc
PACT-dsRBDmt1-R	agcacttgtagcttcacctgtgcaggttat
PACT-dsRBDmt2-F	gctgccaagccaaaaggaatgctgctgag
PACT-dsRBDmt2-R	tgatgccccctttccagtttccataaatg
PACT-ΔdsRBD3-F	gtcgacgcggccgctgcaagctcc
PACT-ΔdsRBD3-R	cagctggatgtaatctgtatttgaatac

表3 TRBPとPACTの*K_d* (nM)

*と**はそれぞれ平滑末端の21 bp 二本鎖RNAまたは3'突出部分がDNAの siRNAである。ND=not determined, NT=not tested.

Purified protein	complex	Highly functional		Intermediate		Not functional		Mean	Blunt-ended*		Mean	DNA at 3' overhang**		
		siLuc-1	siLuc-2	siLuc-3	siLuc-4	siLuc-5	siLuc-6		siLuc-1B	siLuc-2B		siLuc-1D	siLuc-2D	Mean
TRBP-WT	complex 1	5.30	4.00	6.20	33.0	5.80	5.70	10.0	4.50	5.10	4.80	11.0	5.50	8.25
	complex 2	44.0	440	81.0	430	93.0	130	203	60.0	74.0	67.0	243	133	188
TRBP-dsRBDmt1	complex	250	260	NT	NT	NT	NT	255	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TRBP-dsRBDmt2	complex	370	520	NT	NT	NT	NT	445	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TRBP-dsRBDmt1+2	complex	ND	ND	NT	NT	NT	NT	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TRBP-ΔdsRBD3	complex 1	5.00	12.0	NT	NT	NT	NT	8.50	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	complex 2	180	220	NT	NT	NT	NT	200	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PACT-WT	complex 2	220	401	NT	NT	NT	NT	311	222	401	312	1030	502	766
PACT-dsRBDmt1	complex 2	3900	1900	NT	NT	NT	NT	2900	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PACT-dsRBDmt2	complex 2	5700	4600	NT	NT	NT	NT	5150	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PACT-dsRBDmt1+2	complex	ND	ND	NT	NT	NT	NT	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PACT-ΔdsRBD3	complex 1	1500	810	NT	NT	NT	NT	1160	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	complex 2	ND	ND	NT	NT	NT	NT	ND	NT	NT	NT	NT	NT	NT

表4 リアルタイムPCRに使用したプライマーの配列
Fはforward primer、Rはreverse primerを示す。

primer name	sequence (5'→3')
hGAPDH-F	caaggctgagaacgggaagct
hGAPDH-R	gacacggaaggccatgccagt
hEIF2C2-F	acattgtggcaggacaaaga
hEIF2C2-R	gaaacttgcacttcgcatca
hDicer-F	gaagaccaggttccacgaaa
hDicer-R	gcctatgcgagcttcagact
hTRBP-F	aggtggagcctgatgatgac
hTRBP-R	gcagagccatgacacacagt
hPACT-F	acgaatacggcatgaagacc
hPACT-R	cattccttttggcttgcttt

表5 内在性遺伝子のノックダウンに使用したsiRNAの配列
大文字はRNA、小文字はDNAを示す。

siRNA	guide strand sequence (5'→3')	passenger strand sequence (5'→3')
siGY441	AUGAUAUAGACGUUGUGGCUG	GCCACAACGUCUAUAUCAUGG
siEIFC2C-1157	AAUCUCUUCUUGCCGAUCGGG	CGAUCGGCAAGAAGAGAUUAG
siDcr-2524	UCUUGUAAUCAACUCAAGCAU	GCUUGAGUUGAUUACAAGACU
siTRBP-1300	ACAGGAUCUUCUCUCCUACUG	GUAGGAGAGAAGAUCUGUCC
siPACT-849	AGAAAUUUACUAAAUUUGGC	CAAAUUUAGUAAAUUUCUCC

参考文献

- Bannwarth S, Lainé S, Daher A, Grandvaux N, Clerzius G, et al. (2006) Cell-specific regulation of TRBP1 promoter by NF-Y transcription factor in lymphocytes and astrocytes. *J Mol Biol* 355: 898-910.
- Bannwarth S, Talakoub L, Letourneur F, Duarte M, Purcell DF, et al. (2001) Organization of the human tarbp2 gene reveals two promoters that are repressed in an astrocytic cell line. *J Biol Chem* 276: 48803-48813.
- Battisti PL, Daher A, Bannwarth S, Voortman J, Peden KW, et al. (2003) Additive activity between the trans-activation response RNA-binding protein, TRBP2, and cyclin T1 on HIV type 1 expression and viral production in murine cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 767-778.
- Benkirane M, Neuveut C, Chun RF, Smith SM, Samuel CE, et al. (1997) Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J* 16: 611-624.
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB, Jeang KT (1990) TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* 62: 757-767.
- Blalock WL, Bavelloni A, Piazzzi M, Faenza I, Cocco L (2010) A role for PKR in hematologic malignancies. *J Cell Physiol* 223: 572-591.
- Boss IW, Plaisance KB, Renne R (2009) Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* 17: 544-553.
- Carpick BW, Graziano V, Schneider D, Maitra RK, Lee X, et al. (1997) Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA. *J Biol Chem* 272: 9510-9516.

- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et al. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744.
- Cosentino GP, Venkatesan S, Serluca FC, Green SR, Mathews MB, et al. (1995) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9445-9449.
- Cosentino GP, Venkatesan S, Serluca FC, Green SR, Mathews MB, et al. (1995) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9445-9449.
- Daniels SM, Melendez-Peéa CE, Scarborough RJ, Daher A, Christensen HS, et al. (2009) Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Mol Biol* 10: 38.
- Daviet L, Erard M, Dorin D, Duarte M, Vaquero C, et al. (2000) Analysis of a binding difference between the two dsRNA-binding domains in TRBP reveals the modular function of a KR-helix motif. *Eur J Biochem* 267: 2419-2431.
- Dimitrova DI, Yang X, Reichenbach NL, Karakasidis S, Sutton RE, et al. (2005) Lentivirus-mediated transduction of PKR into CD34(+) hematopoietic stem cells inhibits HIV-1 replication in differentiated T cell progeny. *J Interferon Cytokine Res* 25: 345-360.
- Doi N, Zenno S, Ueda R, Ohki-Hamazaki H, Ui-Tei K, et al. (2003) Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol* 13: 41-46.
- Dölken L, Pfeffer S, Koszinowski UH (2009) Cytomegalovirus microRNAs. *Virus Genes* 38: 355-364.
- Dorin D, Bonnet MC, Bannwarth S, Gatignol A, Meurs EF, et al. (2003) The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* 278: 4440-4448.

- Duarte M, Graham K, Daher A, Battisti PL, Bannwarth S, et al. (2000) Characterization of TRBP1 and TRBP2. Stable stem-loop structure at the 5' end of TRBP2 mRNA resembles HIV-1 TAR and is not found in its processed pseudogene. *J Biomed Sci* 7: 494-506.
- Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, et al. (2012) The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150: 100-110.
- Erard M, Barker DG, Amalric F, Jeang KT, Gatignol A (1998) An Arg/Lys-rich core peptide mimics TRBP binding to the HIV-1 TAR RNA upper-stem/loop. *J Mol Biol* 279: 1085-1099.
- Ernst V, Levin DH, London IM (1978) Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione: activation of a protein kinase that phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4110-4114.
- Filipowicz W (2005) RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122: 17-20.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Förstemann K, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD (2007) *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* 130: 287-297.
- Frank F, Sonenberg N, Nagar B (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465: 818-822.
- Gale M, Tan SL, Katze MG (2000) Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 239-280.
- Ganem D, Ziegelbauer J (2008) MicroRNAs of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Semin Cancer Biol* 18: 437-440.
- García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, et al. (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 1032-1060.

- Gatignol A, Buckler C, Jeang KT (1993) Relatedness of an RNA-binding motif in human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA-binding protein TRBP to human P1/dsl kinase and *Drosophila* staufen. *Mol Cell Biol* 13: 2193-2202.
- Gatignol A, Buckler-White A, Berkhout B, Jeang KT (1991) Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251: 1597-1600.
- Gredell JA, Dittmer MJ, Wu M, Chan C, Walton SP (2010) Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry* 49: 3148-3155.
- Gupta V, Huang X, Patel RC (2003) The carboxy-terminal, M3 motifs of PACT and TRBP have opposite effects on PKR activity. *Virology* 315: 283-291.
- Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Lain é S, Sack R, et al. (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6: 961-967.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, et al. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027.
- Hart CE, Ou CY, Galphin JC, Moore J, Bacheler LT, et al. (1989) Human chromosome 12 is required for elevated HIV-1 expression in human-hamster hybrid cells. *Science* 246: 488-491.
- Jha BK, Polyakova I, Kessler P, Dong B, Dickerman B, et al. (2011) Inhibition of RNase L and RNA-dependent protein kinase (PKR) by sunitinib impairs antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 286: 26319-26326.
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, et al. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19: 489-501.
- Ketting RF (2011) The many faces of RNAi. *Dev Cell* 20: 148-161.

- Klase Z, Kale P, Winograd R, Gupta MV, Heydarian M, et al. (2007) HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC Mol Biol* 8: 63.
- Koh HR, Kidwell MA, Ragunathan K, Doudna JA, Myong S (2013) ATP-independent diffusion of double-stranded RNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 151-156.
- Kok KH, Ng MH, Ching YP, Jin DY (2007) Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem* 282: 17649-17657.
- Laraki G, Clerzius G, Daher A, Melendez-Peña C, Daniels S, et al. (2008) Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medipal domain that mediates protein-protein interactions. *RNA Biol* 5: 92-103.
- Lau PW, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ (2009) Structure of the human Dicer-TRBP complex by electron microscopy. *Structure* 17: 1326-1332.
- Lee JY, Kim H, Ryu CH, Kim JY, Choi BH, et al. (2004) Merlin, a tumor suppressor, interacts with transactivation-responsive RNA-binding protein and inhibits its oncogenic activity. *J Biol Chem* 279: 30265-30273.
- Lee JY, Moon HJ, Lee WK, Chun HJ, Han CW, et al. (2006) Merlin facilitates ubiquitination and degradation of transactivation-responsive RNA-binding protein. *Oncogene* 25: 1143-1152.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, et al. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117: 69-81.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060.

- Lin J, Cullen BR (2007) Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol* 81: 12218-12226.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441.
- Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, et al. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301: 1921-1925.
- Liu Y, Ye X, Jiang F, Liang C, Chen D, et al. (2009) C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325: 750-753.
- Lund E, G ü ttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, et al. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311: 195-198.
- Maniatakis E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19: 2979-2990.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, L ü hrmann R, Tuschl T (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110: 563-574.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, et al. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15: 185-197.
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, et al. (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62: 379-390.
- Mounir Z, Koromilas AE (2010) Uncovering the PKR pathway's potential for treatment of tumors. *Future Oncol* 6: 643-645.
- Nekhai S, Kumar A, Bottaro DP, Petryshyn R (1996) Peptides derived from the interferon-induced PKR prevent activation by HIV-1 TAR RNA. *Virology* 222: 193-200.

- Newstein M, Stanbridge EJ, Casey G, Shank PR (1990) Human chromosome 12 encodes a species-specific factor which increases human immunodeficiency virus type 1 tat-mediated trans activation in rodent cells. *J Virol* 64: 4565-4567.
- Novina CD, Sharp PA (2004) The RNAi revolution. *Nature* 430: 161-164.
- Ong CL, Thorpe JC, Gorry PR, Bannwarth S, Jaworowski A, et al. (2005) Low TRBP levels support an innate human immunodeficiency virus type 1 resistance in astrocytes by enhancing the PKR antiviral response. *J Virol* 79: 12763-12772.
- Park H, Davies MV, Langland JO, Chang HW, Nam YS, et al. (1994) TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4713-4717.
- Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q (2009) Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139: 112-122.
- Patel RC, Sen GC (1998) PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J* 17: 4379-4390.
- Peters GA, Hartmann R, Qin J, Sen GC (2001) Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol* 21: 1908-1920.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, et al. (2005) Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2: 269-276.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, et al. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304: 734-736.
- Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, et al. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12: 340-349.
- Roy S, Agy M, Hovanessian AG, Sonenberg N, Katze MG (1991) The integrity of the stem structure of human immunodeficiency virus type 1 Tat-responsive sequence of RNA is required for interaction with the interferon-induced 68,000-Mr protein kinase. *J Virol* 65: 632-640.

- Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson et al. (2007) Regulation of innate antiviral defense through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 582-587.
- Schirle NT, MacRae IJ (2012) The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336: 1037-1040.
- Seigel LJ, Ratner L, Josephs SF, Derse D, Feinberg MB, et al. (1986) Transactivation induced by human T-lymphotropic virus type III (HTLV III) maps to a viral sequence encoding 58 amino acids and lacks tissue specificity. *Virology* 148: 226-231.
- Selby MJ, Peterlin BM (1990) Trans-activation by HIV-1 Tat via a heterologous RNA binding protein. *Cell* 62: 769-776.
- Singh M, Castillo D, Patel CV, Patel RC (2011) Stress-induced phosphorylation of PACT reduces its interaction with TRBP and leads to PKR activation. *Biochemistry* 50: 4550-4560.
- Southgate C, Zapp ML, Green MR (1990) Activation of transcription by HIV-1 Tat protein tethered to nascent RNA through another protein. *Nature* 345: 640-642.
- St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10979-10983.
- Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H et al. (2008) Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 29: 428-440.
- Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, et al. (2004) RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* 116: 831-841.
- Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, Nishi K, Yamato K, et al. (2008) Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res* 36: 2136-2151.

- Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, et al. (2009) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1148-1153.
- Yamashita S, Nagata T, Kawazoe M, Takemoto C, Kigawa T, et al. (2011) Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein. *Protein Sci* 20: 118-130.
- Yang SW, Chen HY, Yang J, Machida S, Chua NH, et al. (2010) Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Structure* 18: 594-605.
- Yeung ML, Bennasser Y, Watashi K, Le SY, Houzet L, et al. (2009) Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Res* 37: 6575-6586.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016.
- Zhong J, Peters AH, Lee K, Braun RE (1999) A double-stranded RNA binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. *Nat Genet* 22: 171-174.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心に御指導いただきました程久美子先生に深く感謝致します。また、実験の指導や助言をいただきました、善野修平先生、西賢二先生をはじめとする、程研究室のスタッフの皆様に感謝致します。

様々な助言をいただきました西郷薫先生にも感謝致します。

また、研究室生活の様々な面で篠原清子事務補佐員には大変お世話になりました。

ともに研究室生活を過ごした先輩、同期、後輩にも感謝致します。

TRBPのN末端アミノ酸シーケンス解析をしていただきました田之倉優先生と宮川拓也先生、精製 RLR タンパク質を分与いただきました米山光俊先生、TRBP ノックアウト細胞を分与いただきました Anne Gatignol 先生にも感謝致します。また、ヒト Ago1 PAZ ドメインと siRNA のゲルシフトアッセイは善野修平先生、DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いた RNAi 活性の測定の一部は、程久美子先生、従二綾氏に行っていただきました。

最後にこれまでの研究生活を支えてくれた家族と友人に感謝致します。