

# 論文審査の結果の要旨

氏名 高橋 朋子

本論文は5章からなる。第1章は序論であり、2本鎖RNA結合タンパク質 TAR RNA-binding protein (TRBP)の抗ウイルス反応における機能解析を行うにあたり、その背景となる研究および目的について述べられている。特に、TRBP タンパク質の構造的特徴と RNA サイレンシングおよびインターフェロン応答における既知の機能について概説されている。第2章は、TRBP と Protein activator of PKR (PACT)の二本鎖 RNA 結合様式の *in vitro* 解析について述べられている。TRBP と PACT はともに3つの2本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) をもつ、よく似た構造のタンパク質である。TRBP は最初の2つの dsRBD が2本鎖 RNA との相互作用ドメインであり、3番目の dsRBD は Dicer などの他のタンパク質との相互作用ドメインであることが知られているが、PACT については3つの dsRBD が2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はなかった。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になった。TRBP は最初の2つの dsRBD によってモノマーで siRNA へ結合するが、PACT は3つの dsRBD によってダイマーを形成し siRNA へ結合することが明らかとなった。これらの結果は、生体内において PACT に比べ TRBP はより RNA interference (RNAi)経路に取り込まれやすいことを示唆していた。第3章では、siRNA の一部を DNA に置換した、一連の DNA/RNA キメラ型 siRNA を用いて、siRNA の非シード領域と RISC loading complex (RLC)/RNA-induced silencing complex (RISC)に含まれるタンパク質との相互作用の解析を行った。先行研究により、siRNA ガイド鎖の5'末端から8塩基のシード領域(2-8塩基)を含む領域は DNA に置換しても RNAi 活性に大きな影響を与えない領域であることが明らかになっていった。本研究では、非シード領域(9-21塩基)を詳細に解析することにより、siRNA ガイド鎖の5'末端から13、14塩基目も DNA に置換できる領域であることが、新たに明らかになった。さらに、TRBP および Argonaute (Ago)タンパク質との相互作用をゲルシフトアッセイで解析した結果、siRNA のシード領域は4つの領域に分画できることが明らかになった。19-21塩基目は Ago の結合に必要な最低限の領域であるが、15-18塩基目も Ago の結合を促進するように働く領域であり、9-12塩基目と15-18塩基目の2つの領域は TRBP の結合と同時に必要な領域であることがあきらかになった。しかしながら、TRBP の siRNA への結合力は、定量的に解析した結果、9-12と15-21塩基が RNA であっても、全長が RNA の場合に比べると数千倍弱いことが明らかになった。一方で、9-12と15-21塩基が RNA の siRNA による細胞内での RNAi 活性は、全長が RNA である siRNA とあまり変わらない。このことから、細胞内では、TRBP と相互作用する未同定の分子が RNAi の誘導に必要であることが示唆された。第4章では、TRBP が RNAi だけではなく、インター

フェロン応答経路を制御する機構についての検討を行っている。インターフェロン応答で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 Protein kinase R (PKR)が活性され、その下流の翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$ をリン酸化することで翻訳抑制を起こしアポトーシスが誘導される。本研究では、アポトーシス誘導時の TRBP の機能解析を行っている。その結果、TRBP はアポトーシスが誘導されるとタンパク分解酵素であるカスパーゼによって、2つ目と3つ目の dsRBD の間で切断を受けることが明らかになった。TRBP は、ロックダウンすると RNAi 効果が減弱するため、本来は RNAi 活性を促進する作用をもっている。しかしながら、カスパーゼによる切断を受けると RNAi 活性の促進効果は消失した。さらに、TRBP は PACT とヘテロダイマーを形成することができるが、カスパーゼによって切断された TRBP は PACT とのヘテロダイマーを形成することができなくなり、PACT を遊離することが明らかにされた。そのため、遊離された PACT は、PKR と相互作用することでアポトーシスを誘導すると推定された。このことから、TRBP は自身の構造変換によって RNAi 経路とインターフェロン応答経路における機能をうまく調節していると考えられた。第5章は、総合考察であり、本論文の内容をまとめると共に、将来展望について述べられている。

なお、本論文第2章は、宮川拓也氏、善野修平氏、西賢二氏、田之倉優氏、程久美子氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。