

学位論文

microRNA による遺伝子発現制御機構の解析

東京大学 新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻

RNA 機能研究分野

深谷 雄志

目次

研究背景 (p3-20)

- 1-1. 小分子 RNA の生合成機構 (p5)
- 1-2. 二本鎖 RNA の Ago タンパク質への積み込み (p7)
- 1-3. シャペロンタンパク質の働き (p7)
- 1-4. 二本鎖 RNA の一本鎖化 (p8)
- 1-5. ガイド鎖の選択機構 (p10)
- 1-6. Ago タンパク質の構造 (p12)
- 1-7. 小分子 RNA による標的遺伝子発現抑制 (p14)
- 1-8. GW182 の機能 (p16)
- 1-9. miRNA による遺伝子発現抑制機構 (p18)
- 1-10. miRNA による poly(A)鎖分解機構 (p18)

I 章 miRNA による遺伝子発現制御は PABP 非依存的である (p21-54)

- 2-1. 試験管内における miRNA 依存的な poly(A)鎖分解反応の再構築 (p22)
- 2-2. poly(A)鎖の分解は PABP 非依存的である (p26)
- 2-3. PAP が poly(A)鎖の伸長を促進する (p30)
- 2-4. poly(A)鎖の分解とは独立した純粋な翻訳抑制 (p33)
- 2-5. Ago1-RISC による翻訳抑制は PABP 非依存的である (p35)
- 2-6. GW182 内の複数ドメインが poly(A)鎖分解誘導活性を持つ (p37)
- 2-7. GW182 の新たな機能性ドメイン (p40)
- 2-8. GW182 は全長のコンテキストにおいて最大の活性を発揮する (p40)
- 2-9. GW182 を介した翻訳抑制は PABP 非依存的である (p42)
- 2-10. 考察 (p44)

II 章 miRNA は複数の異なる経路を介して遺伝子発現を抑制する (p55-93)

- 3-1. Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳抑制を引き起こす (p57)
- 3-2. GW182 非依存的な翻訳抑制の試験管内再構築 (p61)
- 3-3. GW182 非依存的な翻訳抑制は CCR4-NOT 複合体を必要としない (p64)
- 3-4. Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳開始段階を阻害する (p67)
- 3-5. Ago1-RISC は eIF4A 依存的な翻訳開始段階を阻害する (p71)
- 3-6. GW182 Δ C(1-592)は GW182 非依存的な翻訳抑制を阻害する (p75)
- 3-7. GW182 は Ago1 非依存的に poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こす (p77)
- 3-8. GW182 は翻訳開始段階を阻害する (p81)
- 3-9. 考察 (p83)

III 章 miRNA は翻訳開始因子複合体の形成を阻害する (p94-119)

- 4-1. UV クロスリンクによる翻訳開始因子の検出 (p96)
- 4-2. Ago1-RISC は eIF4A の解離を引き起こす (p101)
- 4-3. 過剰量の eIF4A は Ago1-RISC による翻訳抑制を拮抗的に阻害する (p107)
- 4-4. GW182 は eIF4E, eIF4A の解離を引き起こす (p110)
- 4-5. 考察 (p114)

IV 章 総合考察 (p120-132)

- 5-1. 複数の抑制経路を介した転写後制御機構 (p120)
- 5-2. 動物と植物の miRNA 経路 (p126)
- 5-3. GW タンパク質を介した遺伝子発現制御 (p128)

研究背景

遺伝子発現の調節には転写レベルの制御に加えて、転写後段階における翻訳制御が重要な役割を果たしている。microRNA (miRNA)はゲノムにコードされた 22 塩基程度の小分子 RNA であり、自身の配列に相補的な標的遺伝子の発現を緻密に制御する転写後制御因子である。miRNA の発見は、Fire、Mello らによる RNA 干渉の発見(Fire et al., 1998)より以前に遡る。線虫の初期発生には、転写因子である *lin-14* 遺伝子の発現が適切なタイミングで抑制される必要があり (Ambros and Horvitz, 1987; Ruvkun and Giusto, 1989)、*lin-4* 遺伝子とその制御に関わることが知られていた (Ambros, 1989; Arasu et al., 1991)([図 1-1A](#))。miRNA は、*lin-4* 遺伝子がコードする *lin-14* mRNA に対して相補的な内在性小分子 RNA として、1993 年にはじめて発見された (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993)([図 1-1B、C](#))。その後の研究により、miRNA は発生や分化、形態形成といった多様な高次生命現象を制御するとともに、癌などの疾患に深く関与することが明らかとなった。現在では、真核生物に広く保存された遺伝子発現抑制機構として、その生物学的重要性が広く受け入れられている。一方で、miRNA が引き起こす遺伝子発現抑制の詳細な分子機構は未解明であり、その理解は驚くほど進んでいない。医学的側面からも、miRNA の働きを適切に制御することによって臨床応用を目指す動きが近年急速に高まっており、その仕組みの解明が切に待ち望まれている。

miRNA が機能を発揮するためには、複数のタンパク質と複合体を形成することが必要である。この RNA-タンパク質複合体は RNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれる。その構成因子として中心的な役割を果たすのが miRNA 結合タンパク質である Argonaute (Ago)と、Ago 結合タンパク質である GW182 である。少なくともこれまでの研究から、miRNA が poly(A)鎖の分解を引き起こすことで標的 mRNA の不安定化を誘導するとともに、翻訳そのものを阻害することが明らかとなっている ([図 1-1D](#))。miRNA がこれらの機能を発揮するためには、GW182 が必須の役割を担っていると考えられているものの、その分子機構に関しては相反する様々なモデルが提唱されており、正確な理解は遅々として進んでいない。

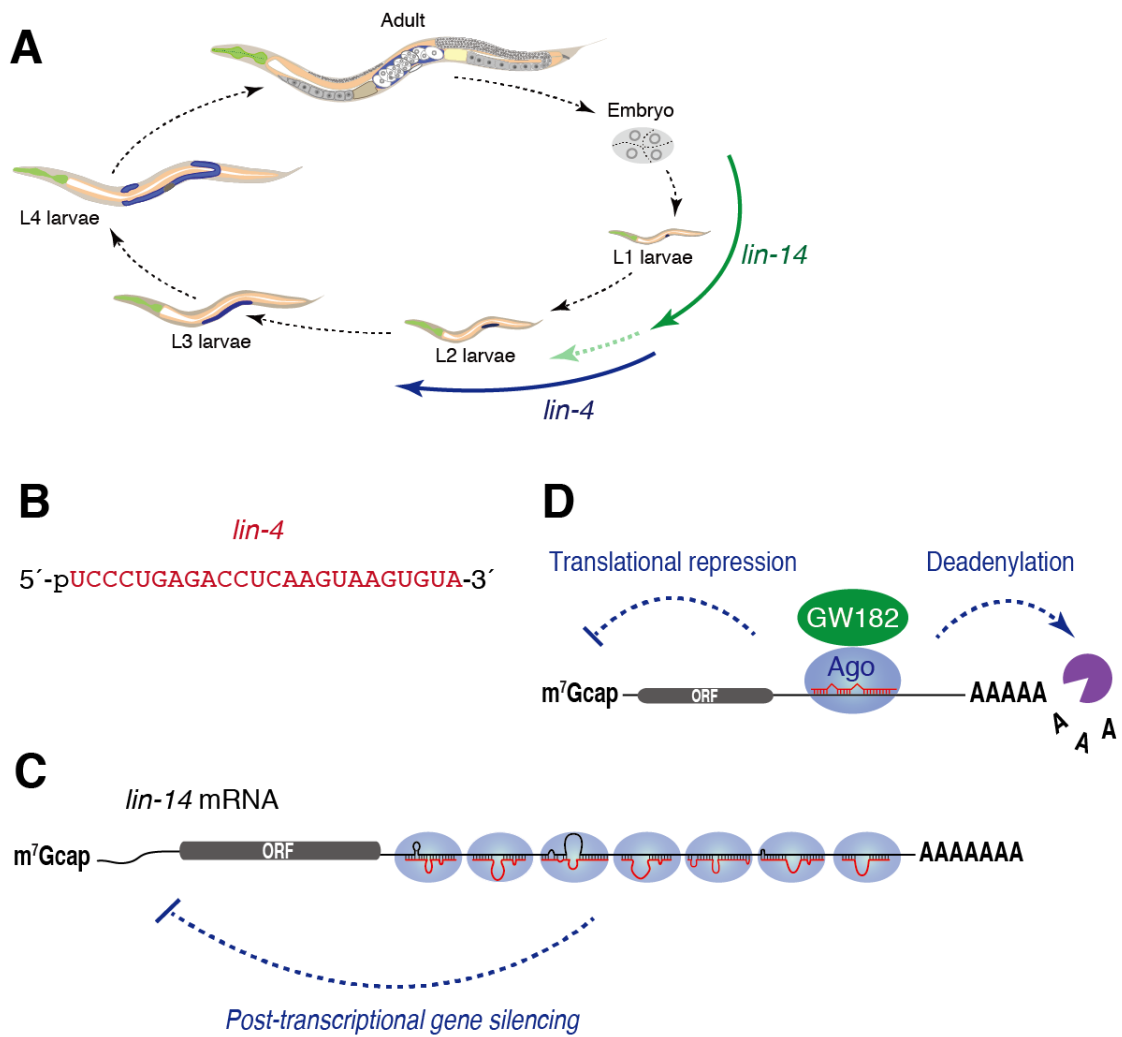


図 1-1. *lin-4* による *lin-14* 遺伝子の発現抑制

(A) 線虫の発生過程において、L1 期から L2 期への移行には *lin-14* 遺伝子の発現が適切なタイミングで抑制される必要がある。*lin-4* 遺伝子はその制御を司る。

(B) *lin-4* 遺伝子は、24 塩基の小分子 RNA をコードする。

(C) *lin-14* mRNA 3'UTR は、*lin-4* に対して部分相補的な標的配列を7ヶ所もつ。

(D) miRNA は poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こす。

1-1. 小分子 RNA の生合成機構

小分子 RNA である miRNA と small interfering RNA (siRNA) は、それぞれ異なる生合成過程を経る (図 1-2)。miRNA はゲノムにコードされており、RNA polymerase II によって primary miRNA (pri-miRNA) と呼ばれる長いヘアピン型の前駆体として転写される (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a)。核内で、Drosha と呼ばれる RNaseIII 型タンパク質が pri-miRNA を切断することによって、60-70 塩基程度の precursor miRNA (pre-miRNA) と呼ばれる中間体が生成される (Lee et al., 2002; Lee et al., 2003)。pre-miRNA は Exportin-5/RanGTP によって細胞質へ輸送され (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004)、RNaseIII 型タンパク質である Dicer-1 の基質となることで、21-23 塩基程度の miRNA 二本鎖 (miRNA/miRNA*) が生み出される (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001)。

一方で siRNA は、おもにウイルスに由来する外因性の長い二本鎖 RNA (Galiana-Arnoux et al., 2006; Wang et al., 2006)、あるいは、ゲノム中のトランスポゾンや反復配列に由来する長い二本鎖 RNA を前駆体として生み出される (Babiarz et al., 2008; Czech et al., 2008; Ghildiyal et al., 2008; Kawamura et al., 2008; Okamura et al., 2008; Tam et al., 2008; Watanabe et al., 2008)。これらの前駆体二本鎖 RNA は、細胞質において Dicer-2 による切断反応の基質となり、21 塩基程度の siRNA 二本鎖が生み出される (Zamore et al., 2000; Bernstein et al., 2001; Lee et al., 2004b)。内在性の二本鎖 RNA 前駆体に由来する siRNA は、他のものと区別して endo-siRNA と呼ばれる。

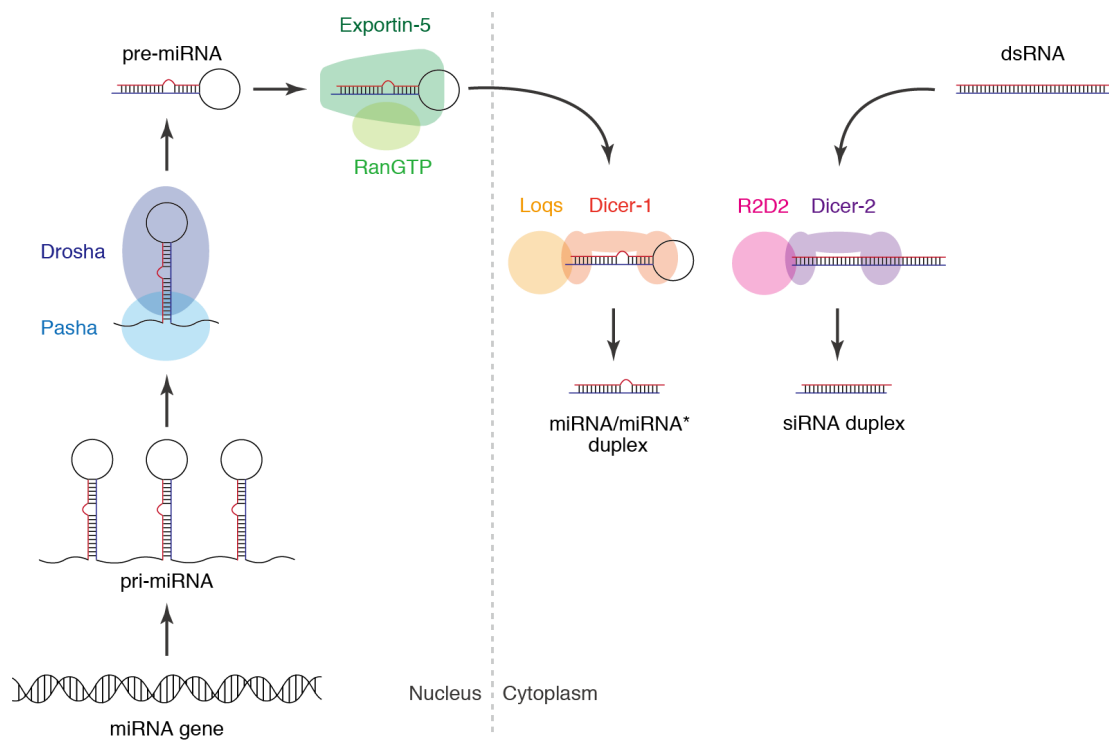


図 1-2. ショウジョウバエにおける小分子二本鎖 RNA 生合成過程

Drosha は Pasha と呼ばれるパートナータンパク質と複合体を形成することで、切断反応の効率と正確性が促進される (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004)。同様に Dicer-1 は Loqs、Dicer-2 は R2D2 と複合体を形成して切断反応を行う。Loqs には複数のアイソフォームが存在しており、Loqs-PA と Loqs-PB が Dicer-1 に結合する (Forstemann et al., 2005; Jiang et al., 2005; Saito et al., 2005)。Dicer-2 による endo-siRNA 生合成過程には、R2D2 ではなく Loqs-PD が必要である (Okamura et al., 2008; Hartig et al., 2009; Zhou et al., 2009; Miyoshi et al., 2010a; Hartig and Forstemann, 2011)。

1-2. 二本鎖 RNA の Ago タンパク質への積み込み

miRNA/miRNA*二本鎖、および siRNA 二本鎖は 5'末端にモノリン酸基、3'末端に水酸基を持ち、二本鎖 RNA の 3'末端が互いに 2 塩基突出した形で作り出される (Elbashir et al., 2001; Hutvagner et al., 2001)。これらの小分子 RNA は二本鎖のまま Ago タンパク質へと取り込まれ、その後一本鎖化される (Matranga et al., 2005; Miyoshi et al., 2005; Rand et al., 2005; Leuschner et al., 2006)(図 1-3)。二本鎖のうち、Ago 内部に保持され、標的認識に用いられる鎖はガイド鎖と呼ばれる。パッセンジャー鎖と呼ばれるもう一方の鎖は、Ago 内部から排除され、速やかに分解される。ショウジョウバエには Ago1、Ago2 の二種類の Ago タンパク質が存在する。小分子二本鎖 RNA は、その構造的特徴に応じて、各 Ago タンパク質へと振り分けられる (Forstemann et al., 2007; Tomari et al., 2007)。miRNA/miRNA*二本鎖の中央部分に存在するミスマッチは、Ago1 への優先的な取り込みを促進する。一方で、中央部分における塩基相補性が高い形で生み出される siRNA 二本鎖は、Ago2 へと優先的に取り込まれる (Kawamata et al., 2009)。小分子二本鎖 RNA の Ago2 への取り込みは、Dicer-2 とそのパートナータンパク質である R2D2 を必要とするが、Dicer-2 が持つ RNA 切断活性はこの過程には関与しない (Liu et al., 2003; Lee et al., 2004b; Pham et al., 2004; Tomari et al., 2004b)。一方で、Ago1 への積み込み過程は Ago2 とは異なり、Dicer-1 や Dicer-2/R2D2 を必要としない (Kawamata et al., 2009)。ほ乳類の Ago タンパク質は、ショウジョウバエ Ago1 と同様に、Dicer タンパク質を介さずに小分子二本鎖 RNA を取り込むことが出来る (Ye et al., 2011; Betancur and Tomari, 2012)。

1-3. シャペロンタンパク質の働き

小分子二本鎖 RNA が Ago1、および Ago2 タンパク質へ積み込まれる過程には ATP が必須である (Nykanen et al., 2001; Pham et al., 2004; Tomari et al., 2004a; Kawamata et al., 2009; Yoda et al., 2010)。この反応は、シャペロンタンパク質である Hsp90/Hsc70 複合体の ATP 依存的な活性によって触媒される

(Iki et al., 2010; Iwasaki et al., 2010; Miyoshi et al., 2010b)([図 1-3](#))。Hsp90/Hsc70 複合体は、Ago タンパク質を“開いた形”へと構造変化させることで、小分子二本鎖 RNA の積み込みに必須の役割を担っていると考えられている (Kawamata and Tomari, 2010)。一方、二本鎖として取り込まれた小分子 RNA を一本鎖化する反応は Hsp90/Hsc70 複合体、および ATP を必要としない (Kawamata et al., 2009; Iwasaki et al., 2010; Yoda et al., 2010)。

1-4. 二本鎖 RNA の一本鎖化

小分子二本鎖 RNA を一本鎖化する反応は、Ago1 と Ago2 間で大きく異なる ([図 1-3](#))。二本鎖 RNA を取り込んだ Ago2 は、パッセンジャー鎖を自身のエンドヌクレアーゼ活性によって切断し、一本鎖化を促進する (Matranga et al., 2005; Miyoshi et al., 2005; Rand et al., 2005; Leuschner et al., 2006)。この切断反応は、ガイド鎖の 5'末端から数えて 10 塩基目と 11 塩基目の間で起こる。一方、Ago1 に取り込まれる miRNA/miRNA*二本鎖の多くは 10 塩基目と 11 塩基目を含む中央部分にミスマッチを持つため、切断反応を受けない。つまり、Ago1 はパッセンジャー鎖の切断に依存しない機構によって一本鎖化を行う (Kawamata et al., 2009)。miRNA/miRNA*二本鎖の中央部分以外にあるミスマッチは、二本鎖 RNA を乖離しやすい状態にすることで、切断非依存的な一本鎖化反応を促進すると考えられている (Kawamata et al., 2009)。

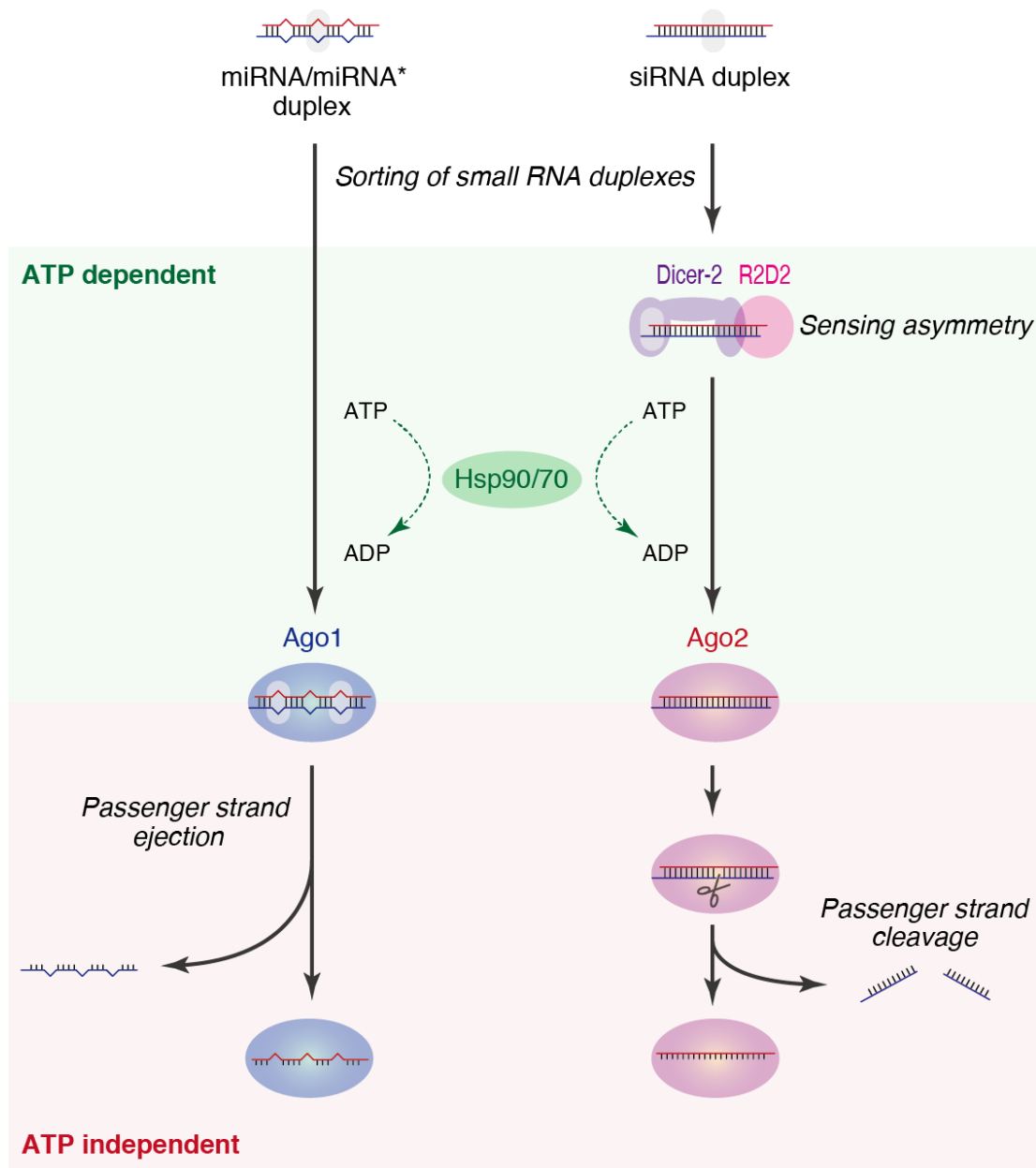


図 1-3. ショウジョウバエ Ago1 と Ago2 における RISC 形成過程

小分子二本鎖 RNA は中央部分ミスマッチの有無によって Ago1、Ago2 へと振り分けられる。この過程は、小分子二本鎖 RNA の生合成とは独立している。小分子二本鎖 RNA が Ago タンパク質へと積み込まれる反応は Hsp90/Hsc70 複合体が介在する ATP 依存的な過程であるのに対し、二本鎖 RNA の一本鎖化は ATP 非依存的な反応である。

1-5. ガイド鎖の選択機構

Ago タンパク質に取り込まれた小分子二本鎖 RNA が一本鎖化する過程はランダムではなく、選択的に一方の鎖が Ago 内部に保持される (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003)。この非対称性を決定する要因は、二本鎖 RNA の両末端における熱力学的安定性である (図 1-4)。二本鎖 RNA のより不安定な 5' 末端を形成している鎖がガイド鎖として Ago タンパク質内に保持され、もう一方の鎖はパッセンジャー鎖として排除される。siRNA 二本鎖の場合、Dicer-2/R2D2 複合体がその熱力学的非対称性をあらかじめ認識した上で、Ago2 へと受け渡している (Tomari et al., 2004b)。一方、Ago1 は Ago2 とは異なり、Dicer-1 および、Dicer-2/R2D2 に依存せずに、miRNA/miRNA*二本鎖の熱力学的非対称性を認識している (Kawamata et al., 2009)。ほ乳類 Ago タンパク質もショウジョウバエ Ago1 同様、Dicer 非依存的に二本鎖小分子 RNA の熱力学的非対称性を認識している (Betancur and Tomari, 2012)。

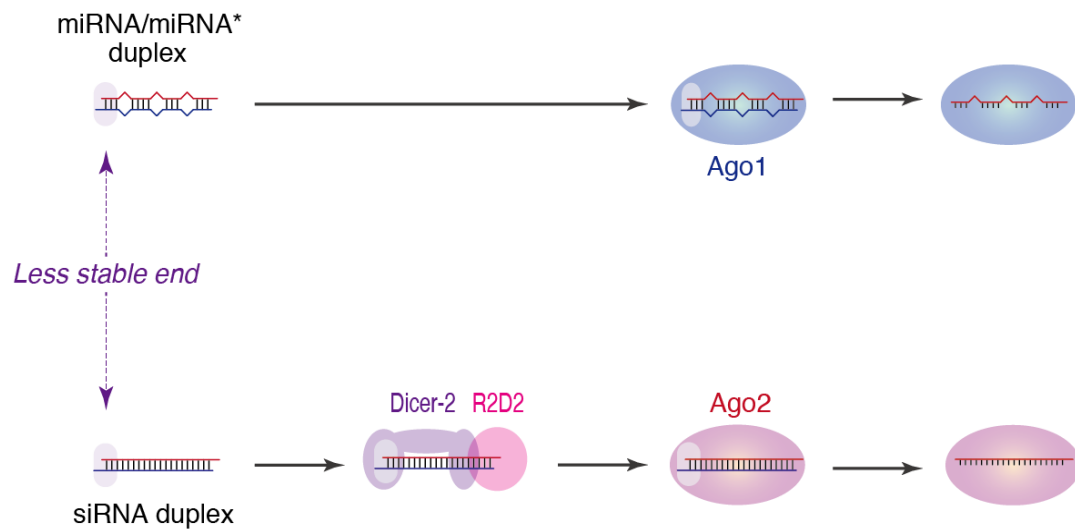


図 1-4. 小分子二本鎖 RNA の非対称性認識機構

siRNA 二本鎖の熱力学的非対称性は Dicer-2/R2D2 複合体によってあらかじめ認識され、その後 Ago2 へと受け渡される。二本鎖 RNA のより不安定な 5' 末端は Dicer-2、より安定な 5' 末端は R2D2 へと結合する (Tomari et al., 2004b)。一方、Ago1 は Dicer タンパク質非依存的に非対称性を認識している。

1-6. Ago タンパク質の構造

Argonaute (Ago) 遺伝子はシロイヌナズナを用いたスクリーニング解析から、花器官や葉の形成不全を引き起こす原因遺伝子として、1998 年にはじめて同定された (Bohmert et al., 1998)。変異体の葉の形が Argonaut と呼ばれるタコの貝殻に似ていることからこの名前が付けられた。その後、線虫を用いたスクリーニング解析から、Ago が小分子 RNA による遺伝子発現制御に関わることが明らかとなった (Tabara et al., 1999)。

Ago タンパク質は Nドメイン、PAZドメイン、MIDドメイン、PIWIドメインの4つのドメインから構成されている (図 1-5)。PIWIドメインは RNaseH 型の活性中心を形成しており、標的 mRNA やパッセージ鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を担っている (Parker et al., 2004; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005)。MIDドメインと PIWIドメインとの境界領域は、ガイド鎖の 5'末端リン酸基を認識するための結合ポケットを形成している (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005; Frank et al., 2010)。一方、PAZドメインは疎水的なアミノ酸残基によって構成される窪みを利用して、ガイド鎖の 3'末端を係留している (Ma et al., 2004; Wang et al., 2008a)。Nドメインは、Ago タンパク質に取り込まれた二本鎖 RNA を引きはがして一本鎖化する過程に寄与すると考えられている (Kwak and Tomari, 2012)。PIWIドメインにはトリプトファン結合ポケットが存在しており、GW182 との相互作用に関与すると考えられている (Till et al., 2007; Schirle and MacRae, 2012)。

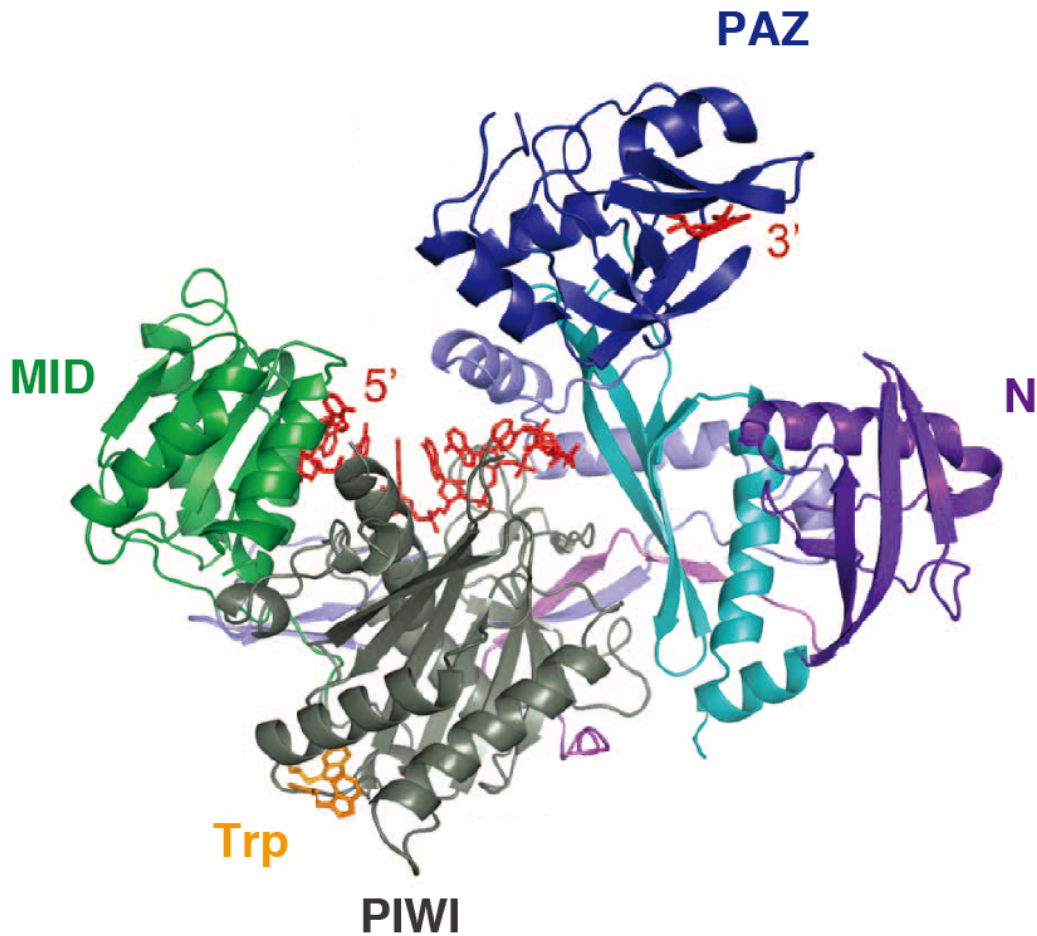


図 1-5. ヒト Ago タンパク質の結晶構造

Ago タンパク質は N ドメイン, PAZ ドメイン, MID ドメイン, PIWI ドメインから構成される。ガイド鎖の 2 塩基目から 6 塩基目は Ago タンパク質内で、あらかじめ A 型らせん状に配置されており (Wang et al., 2008b; Elkayam et al., 2012; Nakanishi et al., 2012; Schirle and MacRae, 2012)、この領域での塩基対形成が標的配列の認識に特に重要である (Lewis et al., 2003)。PIWI ドメインにはトリプトファン結合ポケットが存在し、GW182 との相互作用に関わると考えられている。図は (Schirle and MacRae, 2012) より一部改変。

1-7. 小分子 RNA による標的遺伝子発現抑制

ショウジョウバエ Ago タンパク質が形成するエフェクター複合体 Ago1-RISC、および Ago2-RISC は異なる分子機構を介して標的 mRNA からのタンパク質合成を抑制する (Forstemann et al., 2007)([図 1-6](#))。Ago2-RISC は、標的配列とガイド鎖との高い配列相補性を介して、Ago2 自身のエンドヌクレアーゼ活性によって標的 mRNA を切断している。一方、Ago1 に取り込まれる miRNA の多くは、標的配列との塩基対形成において中央部分にミスマッチを持つため、切断反応を引き起こさない。そこで Ago1-RISC は、poly(A)鎖の分解を介して標的 mRNA の不安定化を誘導するとともに、翻訳そのものを阻害している (Behm-Ansmant et al., 2006)。miRNA による poly(A)鎖の分解と翻訳抑制は、ショウジョウバエだけではなく線虫、ゼブラフィッシュ、マウスからヒトにまで動物種間で広く保存されている (Bagga et al., 2005; Giraldez et al., 2006; Mishima et al., 2006; Wu et al., 2006; Fabian et al., 2009)。これまでの研究から、Ago1-RISC が機能を発揮するためには、GW182 と呼ばれる Ago1 結合タンパク質が必須であると考えられている (Rehwinkel et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006)。対照的に、Ago2 は GW182 とは結合しない (Behm-Ansmant et al., 2006)。すなわち、Ago2-RISC の働きは GW182 非依存的である。

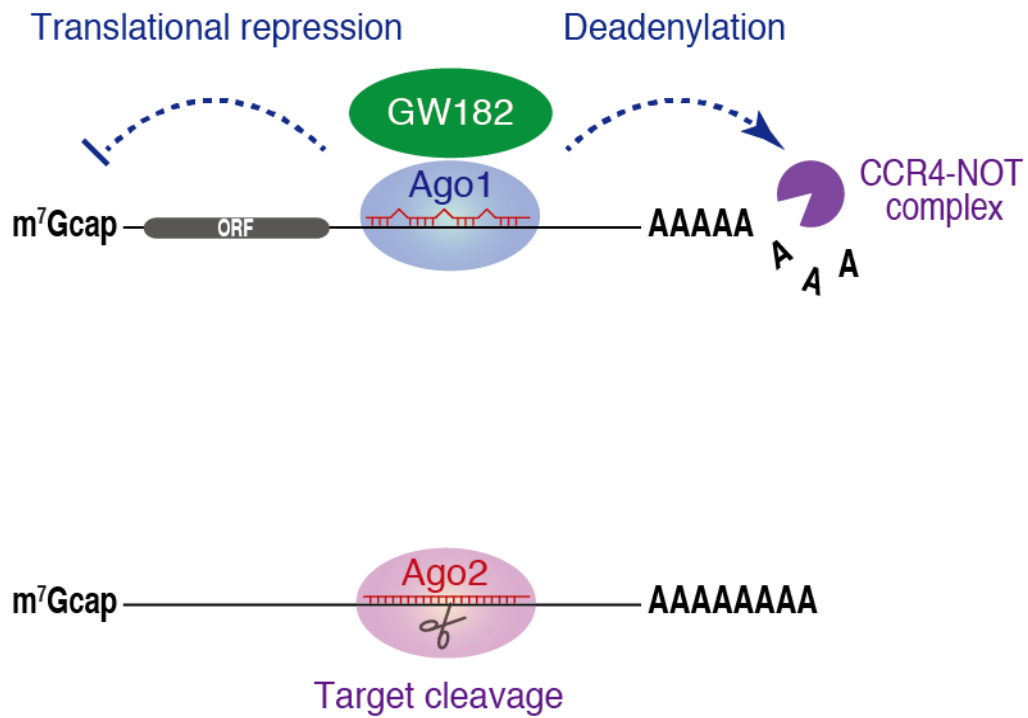


図 1-6. Ago1-RISC、Ago2-RISC による遺伝子発現抑制

Ago2-RISC は、標的 mRNA の切断反応によって遺伝子発現を抑制するのに対し、Ago1-RISC は切断非依存的に poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こす。poly(A)鎖の分解はおもに CCR4-NOT 複合体によって触媒されている。

1-8. GW182 の機能

GW182 は自己免疫疾患の抗原として、2002 年に初めて同定された (Eystathioy et al., 2002)。mRNA 分解・蓄積の場であると考えられている細胞質顆粒、Processing body (P-body) に GW182 が局在することから、転写後制御に関与することが示唆されていた (Eystathioy et al., 2003)。その後、GW182 は Ago タンパク質との結合を介して、miRNA による遺伝子発現抑制に関わることが示された (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005; Meister et al., 2005)。miRNA や Ago タンパク質を介さずに、直接 GW182 を mRNA 上へ係留させるだけで poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こすことから、GW182 は miRNA による標的配列認識よりも下流で働く因子であると考えられている (Behm-Ansmant et al., 2006)。

GW182 は N 末端から、グリシン-トリプトファン残基の連続する GW リpeat 領域 (GW-repeat)、ユビキチン会合ドメイン (UBA)、グルタミンリッチ型ドメイン (Q-rich)、poly(A) 鎖結合タンパク質(PABP)認識モチーフ (PAM2-motif)、RNA 認識ドメイン (RRM)、C-term ドメインからなるマルチドメインタンパク質である (図 1-7)。N 末端の GW-repeat は Ago1 への結合に必須である (Behm-Ansmant et al., 2006; Till et al., 2007; Takimoto et al., 2009; Chekulaeva et al., 2010)。Q-rich ドメインは P-body への移行に必須であるが (Eulalio et al., 2009a)、局在自体は miRNA の機能発揮に必要なではない (Eulalio et al., 2007)。RRM ドメインは RNA 結合活性を持たないため、GW182 単独では RNA と結合することは出来ない (Eulalio et al., 2009c)。近年の変異体解析によって、PAM2-motif、C-term を含む C 末端側の領域が GW182 の機能に重要であることが示されている (Eulalio et al., 2009a; Lazzaretti et al., 2009; Lian et al., 2009; Zipprich et al., 2009)。PAM2-motif と C-term ドメインは直接 PABP と結合しており (Fabian et al., 2009; Jinek and Doudna, 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Kozlov et al., 2010)、この相互作用が miRNA による遺伝子発現抑制に必要なであるというモデルが提唱されている。



図 1-7. ショウジョウバエ GW182 の模式図

N 末端の GW-repeat は Ago1 に直接結合している。C 末端には複数の PABP 結合領域が存在し、ショウジョウバエではおもに C-term ドメインが結合に寄与している。一方、ほ乳類 GW182 タンパク質はおもに PAM2-motif を介して PABP と結合している。

1-9. miRNA による遺伝子発現抑制機構

mRNA は 5'末端に 7-methyl-Gcap (m^7 Gcap)構造を持ち、eIF4E と呼ばれる m^7 Gcap 結合タンパク質によって直接認識される。eIF4E は、足場タンパク質である eIF4G と結合し、さらに DEAD-box RNA ヘリカーゼである eIF4A が eIF4G を介して呼び込まれる。eIF4E、eIF4G、eIF4A からなる翻訳開始因子複合体は eIF4F 複合体と呼ばれ、その形成がリボソームの呼び込みに必須である (Gingras et al., 1999)([図 1-8A](#))。さらに、poly(A)鎖結合タンパク質である PABP は、eIF4G と直接結合しており、eIF4F 複合体を安定化することで翻訳を促進している (Borman et al., 2000; Gray et al., 2000; Wakiyama et al., 2000; Kahvejian et al., 2005)。

近年の解析により、GW182-PABP 相互作用が Ago1-RISC の機能発揮に必要であることが示唆された (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Jinek et al., 2010)。つまり、GW182 が eIF4G-PABP 相互作用を競合的に阻害することで翻訳を抑制するとともに、PABP 自身の機能阻害によって poly(A)鎖の分解を促進しているというモデルが広く受け入れられている ([図 1-8B](#))。その一方、そもそも poly(A)鎖を持たない mRNA も翻訳抑制を受けるなど、上記のモデルでは説明できない実験結果も数多く報告されている (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2008; Beilharz et al., 2009; Chekulaeva et al., 2009; Eulalio et al., 2009b; Iwasaki et al., 2009; Chekulaeva et al., 2010)。このように、GW182-PABP の相互作用が果たす役割については不明な点が多い。

1-10. miRNA による poly(A)鎖分解機構

miRNA による poly(A)鎖の分解には、Ago1 結合タンパク質である GW182 が必須である (Behm-Ansmant et al., 2006)。しかし、GW182 自身は触媒活性を持っておらず、さらに下流の因子を介して poly(A)鎖の分解を誘導している。この活性を主に担うのは、CCR4-NOT 複合体と呼ばれる poly(A)鎖分解酵素複合体である (Tucker et al., 2001; Behm-Ansmant et al., 2006; Chen et al., 2009;

Fabian et al., 2009; Piao et al., 2010)。しかし、どのように GW182 が CCR4-NOT 複合体を標的 mRNA 上へと呼び込むのかは不明である。ごく最近、GW182-PABP 相互作用が miRNA による poly(A)鎖の分解に重要な役割を担うことが示唆された (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Jinek et al., 2010)。このことから、GW182 が PABP との相互作用を介して CCR4-NOT 複合体を呼び込むというモデルが提唱されている。つまり、GW182 は PABP を介して間接的に CCR4-NOT 複合体を呼び込む、または poly(A)鎖から PABP を解離させることで CCR4-NOT 複合体による基質認識を促進していると考えられている (図 1-8B)。

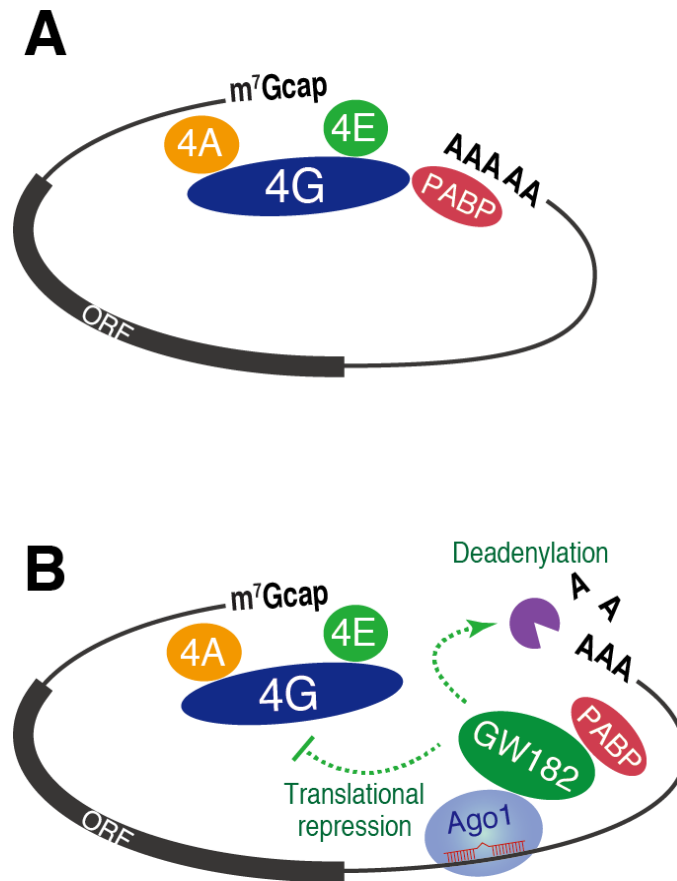


図 1-8. GW182-PABP 相互作用モデル

(A) eIF4E、eIF4A、eIF4G からなる eIF4F 複合体の形成はリボソームの呼び込みに必須である。PABP は eIF4G との相互作用を介して、複合体形成を安定化する。
 (B) GW182 は PABP-eIF4G 相互作用を競合的に阻害することで翻訳を抑制するとともに、PABP との結合を介して CCR4-NOT 複合体を呼び込むと考えられている。

I章

miRNA による遺伝子発現制御は PABP 非依存的である

目的

miRNA は RISC と呼ばれるエフェクター複合体を形成し、標的 mRNA の poly(A)鎖の分解と翻訳抑制によって遺伝子発現を抑制している。RISC 構成因子として中心的な役割を担うのは、miRNA 結合タンパク質である Ago1 と、Ago1 結合タンパク質である GW182 である。近年の解析から、GW182 が poly(A)鎖結合タンパク質である PABP と相互作用することによって、翻訳抑制と poly(A)鎖の分解を誘導しているというモデルが提唱されている (Fabian et al., 2009; Jinek and Doudna, 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010)。一方で、そもそも poly(A)鎖を持たない標的 mRNA が miRNA による翻訳抑制を受けるなど、このモデルでは説明できない実験結果も数多く報告されている。このように GW182-PABP 相互作用の果たす役割は不明な点が多く、従来のモデルを再検証する必要がある。また、poly(A)鎖の分解を受けた mRNA は翻訳効率も必然的に低下し、逆に、翻訳抑制を受けた mRNA は poly(A)鎖の分解が促進されるといったように、「poly(A)鎖の分解」と「翻訳抑制」は相互に影響を及ぼしあうニワトリと卵の関係にあるため、各抑制経路の因果関係は長らく不明のままであった (Omer et al., 2009)。

そこで私は、試験管内で miRNA の働きを忠実に再現する新たな実験系を構築し、「翻訳抑制」と「poly(A)鎖の分解」の因果関係、および、GW182-PABP 相互作用の果たす役割について詳細な解析を行った。

結果

2-1. 試験管内における miRNA 依存的な poly(A)鎖分解反応の再構築

これまでに、ショウジョウバエ初期胚抽出液を用いて、miRNA による poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を試験管内で再構築した例が報告されている (Thermann and Hentze, 2007; Iwasaki et al., 2009; Zdanowicz et al., 2009; Moretti et al., 2010)。しかし、高い活性を持つ胚抽出液を安定的に調製することは技術的に困難であり、定量的な解析には不向きであった。さらに、任意の遺伝子を簡便に過剰発現、ノックダウン出来ないなど、技術的な制約が大きかった。そこでこれらの問題点を克服するため、ショウジョウバエ初期胚由来の培養細胞である S2 細胞 (Schneider et al., 1972) の細胞質抽出液を用いて、miRNA の働きを試験管内で忠実に再現することを目指した。

miRNA による poly(A)鎖の分解反応を純粹に解析するため、ORF を持たない 380 塩基ほどの短い標的 RNA を設計した (図 2-1A; mini-*let-7-A*₁₁₄)。この標的 RNA は、*let-7* と呼ばれる miRNA に対して相補的な配列を 8カ所持っている。S2 細胞は *let-7* を内在に発現しておらず (Sempere et al., 2002)、外から加えた *let-7/let-7** 二本鎖の有無によって、その活性を厳密にコントロールすることが出来る (図 2-1B)。また、標的配列は *let-7* と中央部分にミスマッチを持つように設計しているため (図 2-1C)、Ago1 は切断反応を引き起こさない。

はじめに、S2細胞抽出液、または初期胚抽出液と *in vitro* で合成した *let-7/let-7** 二本鎖を混ぜ合わせ、*let-7* を取り込んだ Ago1-RISC を試験管内で形成させた。そこへ、5'末端に放射性標識を導入した標的 RNA を加え、各タイムポイントにおける RNA サンプルを回収し、変性ウレアポリアクリルアミドゲル電気泳動によって poly(A)鎖の安定性を解析した。その結果、FLAG-Ago1 を過剰発現させた S2細胞抽出液において、初期胚抽出液と同程度の poly(A)鎖分解活性がみられた (図 2-2A、B、D)。一方、過剰発現を行わないただの S2細胞抽出液では poly(A)鎖の分解はみられなかった (図 2-2C、D)。このことは、S2細胞抽出液中の内在性 Ago1 が既に内在の miRNA によって占拠されており、外来の *let-7/let-7** 二本鎖を取り込むことができなかつたためであると考えられる。以下、FLAG-Ago1 を過剰発現させ

たS2細胞抽出液を用いて解析を行った。試験管内で再現された poly(A)鎖分解反応の配列特異性を調べるため、*let-7* に対して相補的なアンチセンスオリゴ (Anti-*let-7* ASO) を過剰に加え、Ago1-RISC による標的認識を競合的に阻害した (Hutvagner et al., 2004)。その結果、poly(A)鎖の分解が著しく損なわれたことから (図 2-2E)、試験管内で再現された反応が配列特異的であることが確かめられた。

mRNA の 5' 末端にある m⁷Gcap 構造は、翻訳開始因子である eIF4E によって認識される。miRNA を介した poly(A)鎖の分解が、eIF4E による m⁷Gcap 構造の認識に依存するのか検証するため、eIF4E 阻害剤である m⁷GDP 存在下で解析を行った。m⁷GDP は、eIF4E による m⁷Gcap 構造の認識を競合的に阻害することで翻訳効率を著しく低下させる一方 (図 2-2F)、poly(A)鎖の分解には影響を及ぼさなかった (図 2-2G)。つまり、5' 末端における翻訳開始因子複合体の形成やリボソームの呼び込みとは独立して、Ago1-RISC が poly(A)鎖の分解を引き起こしていることが確かめられた。この結果は、過去の報告と一致している (Eulalio et al., 2007; Wakiyama et al., 2007; Eulalio et al., 2009b; Fabian et al., 2009; Iwasaki et al., 2009)。

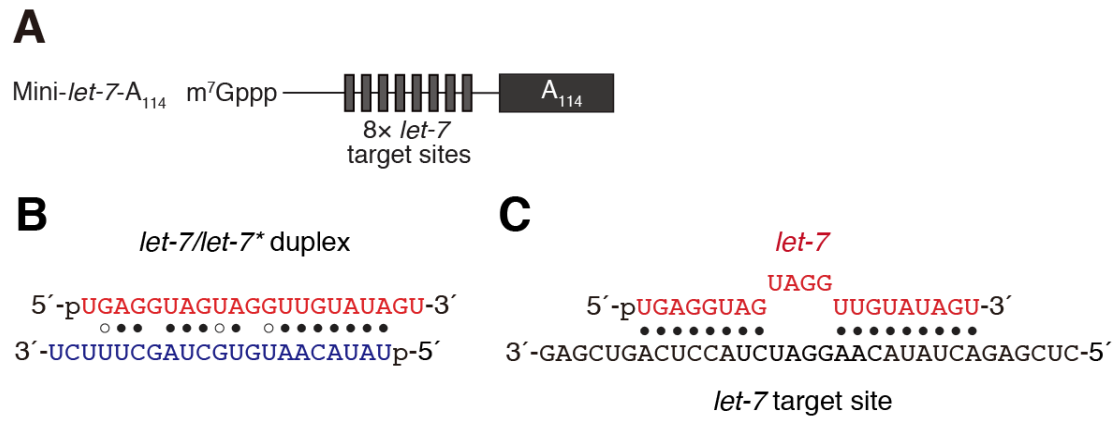


図 2-1. 標的 RNA と *let-7/let-7**二本鎖の模式図

(A) mini-*let-7-A*₁₁₄ の模式図

(B) *let-7/let-7**二本鎖の模式図

(C) *let-7*と標的部位の塩基対形成。中央部分に4塩基のミスマッチを持つ。

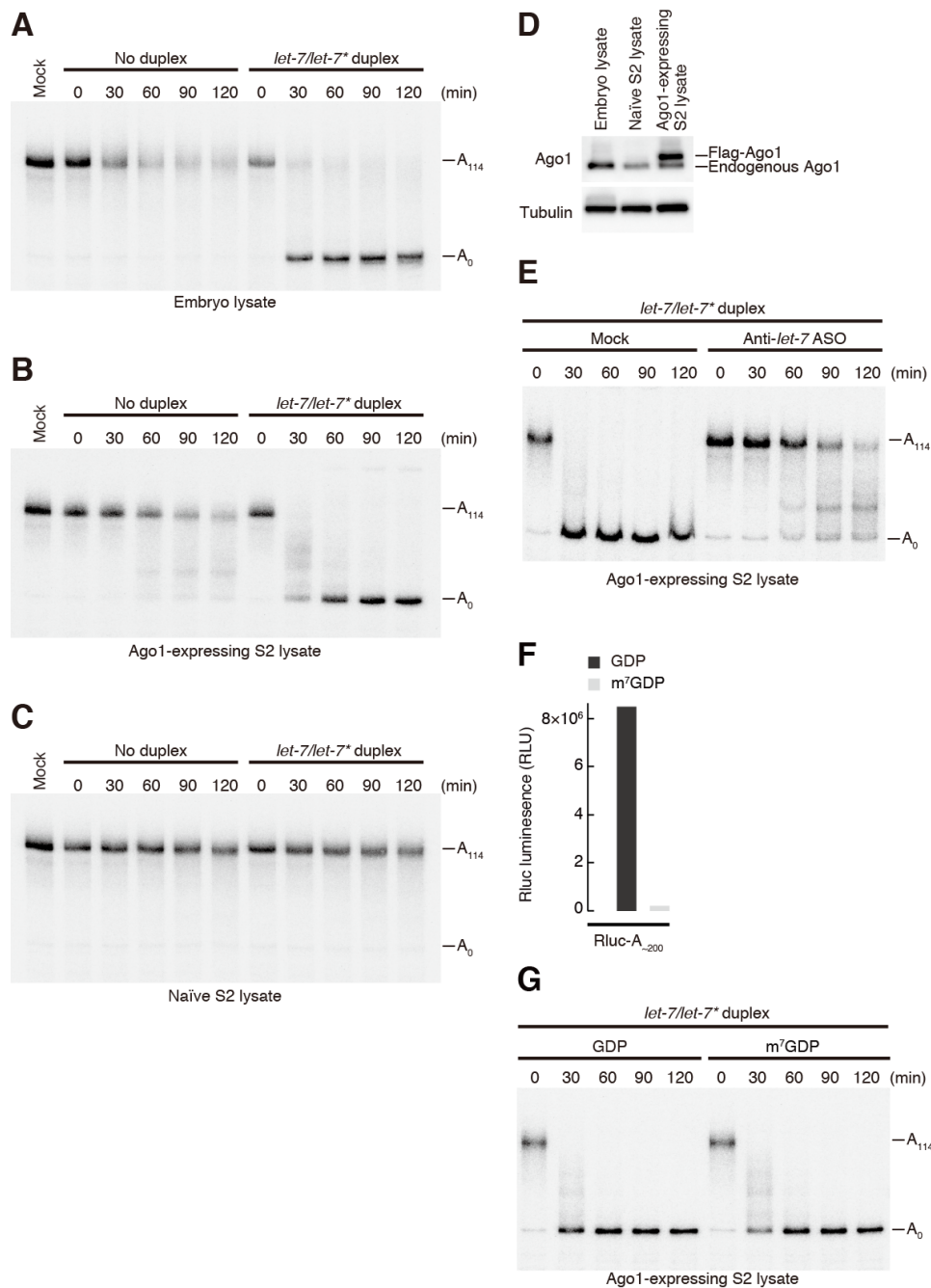


図 2-2. Ago1-RISC による poly(A)鎖分解反応の試験管内再構築

(A–C) Ago1-RISC による mini-*let-7*-A₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。(A)はショウジョウバエ初期胚抽出液、(B)は FLAG-Ago1 を発現した S2 細胞抽出液、(C)は FLAG-Ago1 を発現していないただの S2 細胞抽出液。

(D) ウェスタンブロッティングによって Ago1 タンパク質を検出した。FLAG-Ago1 を発現していない S2 細胞抽出液中では Ago1 量が限られている。

(E) 2'-O-Met 化した *let-7* アンチセンスオリゴ (Anti-*let-7* ASO) によって、poly(A)鎖の分解が阻害された。Ago1 に *let-7* を取り込ませた後、500 nM Anti-*let-7* ASO を反応液に加えている。

(F) Rluc-A₂₀₀ の翻訳活性は、1 mM m⁷GDP によって著しく阻害された。

(G) mini-*let-7*-A₁₁₄ の poly(A)鎖の分解は、1 mM m⁷GDP による影響を受けない。

2-2. poly(A)鎖の分解は PABP 非依存的である

mRNA の 3' 末端にある poly(A)鎖は、poly(A)鎖結合タンパク質である PABP によって認識される。PABP は mRNA の安定性制御に関わるとともに、eIF4G との相互作用を介して翻訳開始因子複合体の形成を促進する。近年、マウス腹水癌由来の培養細胞 (Krebs-2細胞)抽出液を用いた試験管内再構築系において、内在性 PABP の除去が miRNA による poly(A)鎖の分解を阻害することが示された (Fabian et al., 2009)。さらに、PABP 結合領域を欠損した変異型 GW182 が野生型に比べて低い poly(A)鎖分解誘導活性を示すことから (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Jinek et al., 2010)、GW182-PABP 相互作用が miRNA による poly(A)鎖の分解に必要であるというモデルが提唱されている。

ショウジョウバエ miRNA 経路における PABP の働きを調べるため、マウス Krebs-2細胞抽出液で確立されている手法によって、S2 細胞抽出液中から内在性 PABP を除去することを試みた。PABP 結合タンパク質である PABP-interacting protein 2 (PAIP2) をグルタチオンセファロースビーズ上に固定し、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) で内在 RNA を除去した細胞抽出液と混ぜ合わせ、その上清を回収することで、内在 PABP を 95%以上除けることが報告されている (Svitkin and Sonenberg, 2004)。しかしこの方法では、S2細胞抽出液中から PABP を効率的に除去することは出来なかった (図 2-3A)。さらに、MNase 処理によって S2 細胞抽出液の翻訳活性自体が著しく低下した (図 2-3B)。つまり、Krebs-2細胞抽出液で確立されている手法は、S2 細胞抽出液には適応不可能であった。そこで、精製 PAIP2 タンパク質を細胞抽出液中に過剰量加えることで、内在性 PABP を機能的に阻害することを試みた。PAIP2 は PABP に直接結合し、その poly(A)鎖結合活性を阻害するとともに、eIF4G-PABP 相互作用を競合的に阻害することでタンパク質合成を負に制御する翻訳抑制因子である (Khaleghpour et al., 2001a; Khaleghpour et al., 2001b)。PAIP2 は poly(A)鎖を持たないルシフェラーゼ mRNA (Rluc-A₀) の翻訳活性には大きな影響を与えないのに対し、poly(A)鎖を持つルシフェラーゼ mRNA (Rluc-A_{~200}) の翻訳活性を Rluc-A₀ と同程度にまで低下させた (図 2-4A)。この結果は、内在性 PABP の働きが PAIP2 よ

てほぼ完全に阻害されていることを示している。さらに PAIP2 は、GW182-PABP 相互作用も阻害した (図 2-4B)。

PAIP2 存在下での Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解を解析したところ、これまでの知見に一致して PABP 阻害時に反応効率が低下する様子がみられた (図 2-4C)。しかし、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないバックグラウンドの挙動を解析すると、PABP 阻害時に poly(A)鎖が伸長するという予想外の結果が得られた (図 2-4D)。このことから、PABP 阻害時にみられた poly(A)鎖分解反応の停滞は、バックグラウンドの拮抗的な伸長反応による見かけ上の結果であることが考えられた。つまり、ショウジョウバエ Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解は、PABP の機能、および GW182-PABP 相互作用に本質的には依存しないことが示唆された。

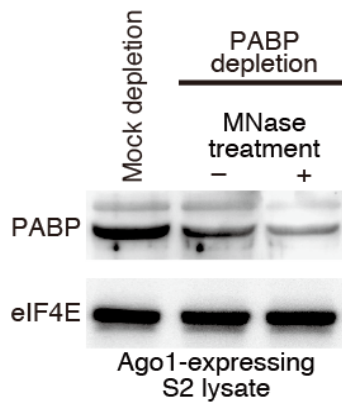
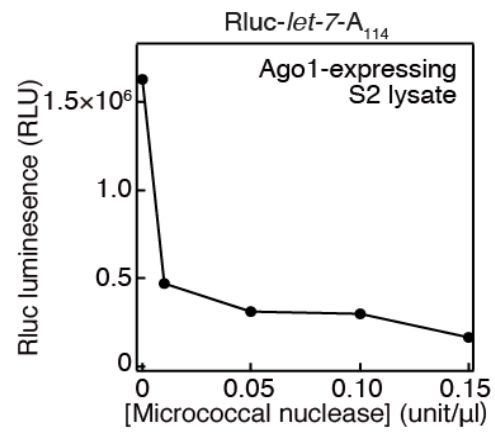
A**B**

図 2-3. PAIP2 による内在性 PABP の除去

(A) グルタチオンセファロースビーズ上に固定化した GST-PAIP2 による内在性 PABP の除去。MNase 処理は除去効率を促進するものの、完全に PABP を取り除くことは出来なかった。ここでは、(B)に示す最大濃度の MNase (0.15 unit/ μ l) を作用させている。

(B) MNase 処理した S2 細胞抽出液における Rluc-*let-7-A*₁₁₄ の翻訳活性。

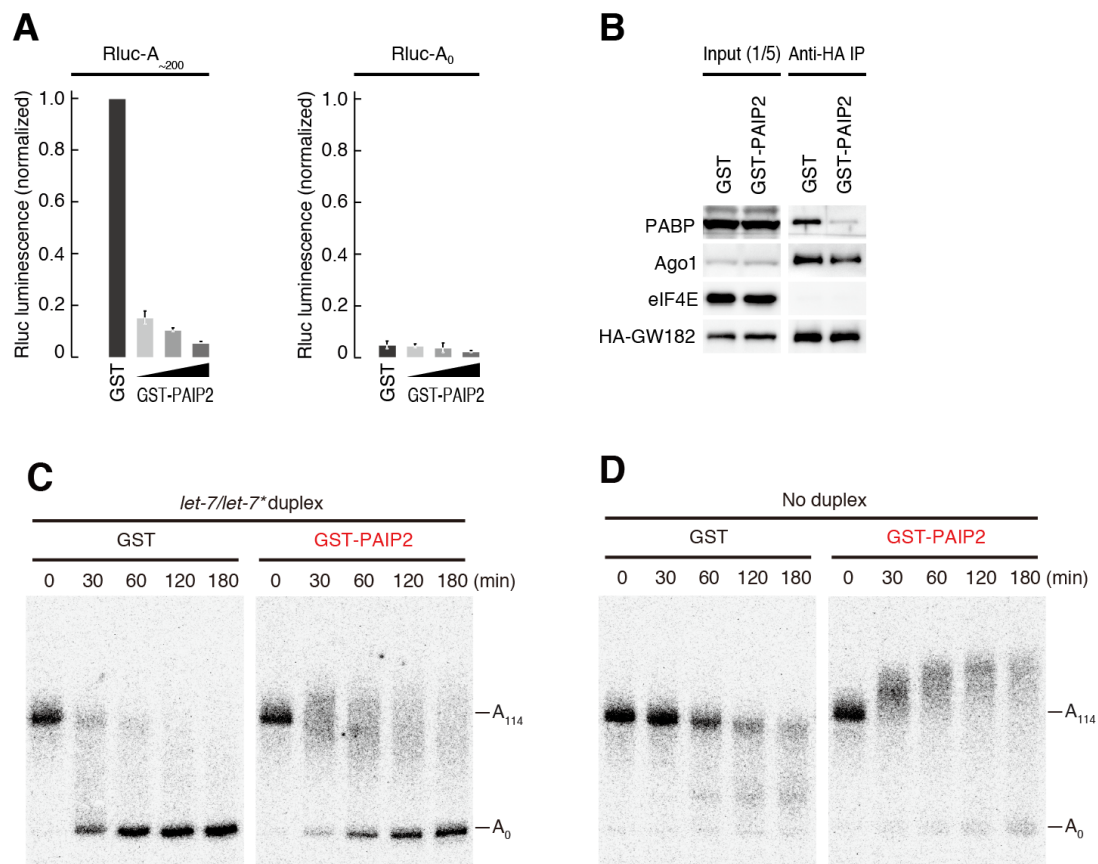


図 2-4. PABP は miRNA による poly(A)鎖の分解に必須ではない

(A) 10 μ M GST、または 2.5、5、10 μ M GST-PAIP2 存在下における Rluc-A_{~200} と Rluc-A₀ の翻訳活性。各測定値は、10 μ M GST 作用時における Rluc-A_{~200} の値に対してノーマライズしている。GST-PAIP2 によって Rluc-A_{~200} の翻訳活性は Rluc-A₀ 程度にまで低下した。Rluc-A₀ の翻訳活性は GST-PAIP2 による影響を受けなかった。

(B) HA-GW182 を発現する S2 細胞から抽出液を調製し、10 μ M GST、または 10 μ M GST-PAIP2 を加えた。その後、anti-HA 抗体によって HA-GW182 を免疫沈降し、PABP との相互作用を検出した。GW182-PABP 相互作用は GST-PAIP2 によって阻害された。

(C) 10 μ M GST、または 10 μ M GST-PAIP2 存在下での、Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。GST-PAIP2 によって poly(A)鎖の分解が阻害されてみえる。

(D) *let-7/let-7**二本鎖を加えていないバックグラウンドにおける、mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖伸長反応。

2-3. PAP が poly(A)鎖の伸長を触媒する

PAIP2 存在下における poly(A)鎖の伸長反応は、透析によって細胞抽出液中のヌクレオチドを除去することによって阻害された (図 2-5A)。ATP,CTP,UTP,GTP のうち、ATP を加え戻した場合にのみ伸長反応が回復したことから、アデニンが末端に付加されていることが確認された。そこで代表的な poly(A)付加酵素である Poly(A) Polymerase (PAP)を欠損した変異体ショウジョウバエ (*hiiragi*) (Murata et al., 1996; Murata et al., 2001)の初期胚抽出液を用いて解析を行ったところ、PABP 阻害時でも伸長活性はみられなかった (図 2-5B)。そこへ精製 PAP タンパク質を加え戻すことで、poly(A)鎖伸長活性が回復したことから (図 2-5B)、PAP が伸長反応を触媒する責任因子であると結論づけた。伸長反応が起こらない *hiiragi* 初期胚抽出液を用いて Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解反応を解析したところ、PABP 阻害が反応停滞を引き起こす様子はみられなかった (図 2-5C)。この結果は、Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解が本質的に PABP 非依存的であることを改めて強く示唆している。

次に、精製 PABP タンパク質を S2 細胞抽出液に加えて poly(A)鎖の分解反応を解析した (図 2-6A)。その結果、過剰量の PABP は poly(A)鎖の分解に阻害的に働くことが分かった (図 2-6B)。一方、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないバックグラウンドにおいて poly(A)鎖が安定化される様子がみられた (図 2-6C)。つまり、PABP によって poly(A)鎖が安定化されたことによる見かけ上の結果として、分解が阻害されていたと考えられる。このように PABP の有無によって潜在的に poly(A)鎖の安定性は変動し、あたかも miRNA の働きが阻害されて見えていたと考えられる。

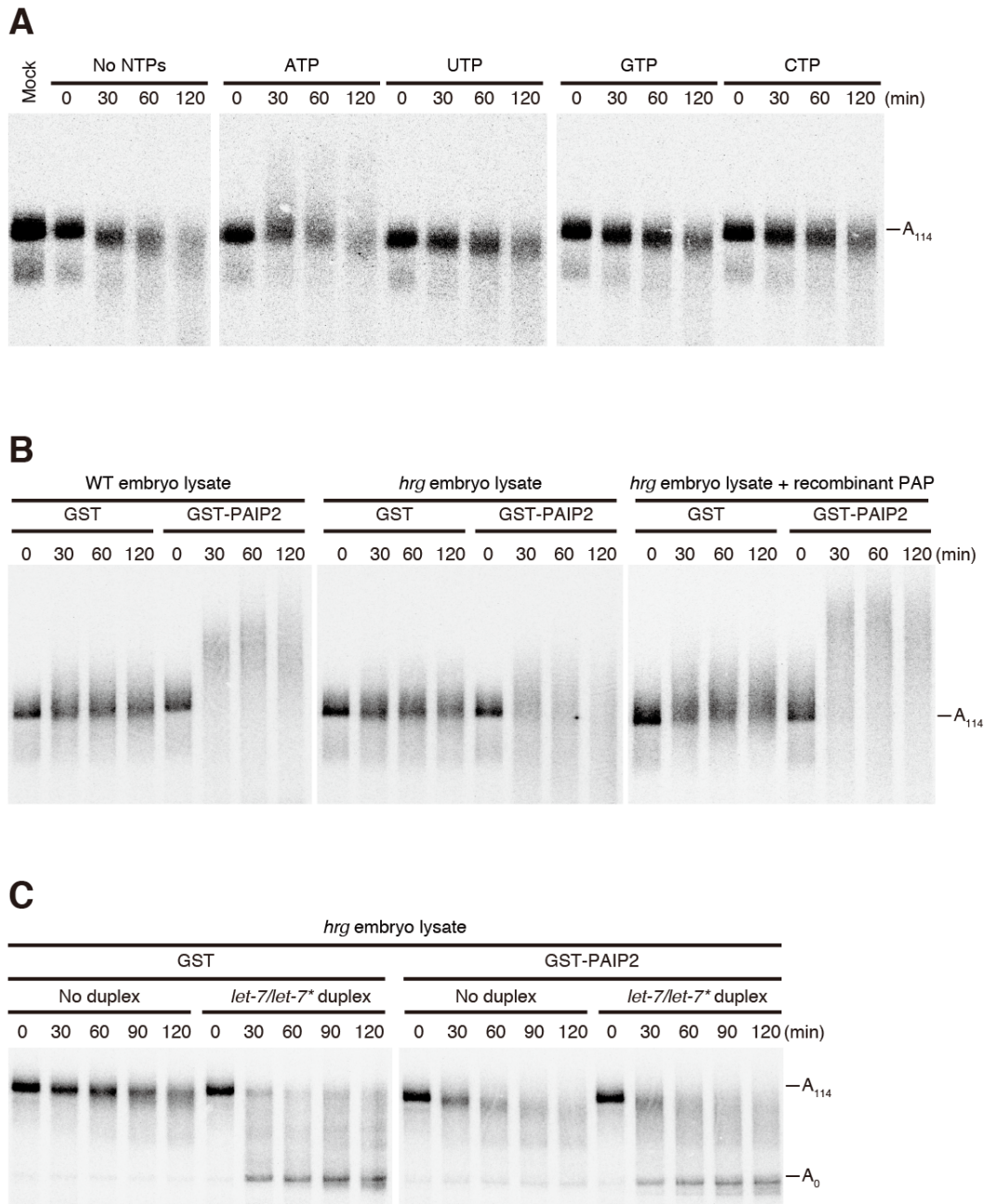


図 2-5. PABP 阻害時の poly(A)付加反応は PAP によって触媒される

(A) 透析した S2 細胞抽出液へ NTP を加え戻し、GST-PAIP2 を作用させて mini-*let-7-A*₁₁₄ の伸長反応を解析した。ATP を加え戻した場合にのみ伸長反応がみられたことから、poly(A) が末端に付加されていることが確かめられた。全体の poly(A) 付加活性は透析操作によって弱まっている。

(B) *hrg*¹⁰ 初期胚抽出液では poly(A) 付加活性はみられなかったが、精製 PAP (Hrg) タンパク質を加え戻すことで活性が回復した。

(C) *hrg*¹⁰ 初期胚抽出液では、Ago1-RISC による poly(A) 鎖の分解は GST-PAIP2 によって阻害されなかった。この結果は、PABP が poly(A) 鎖の分解に必須ではないことを示唆している。

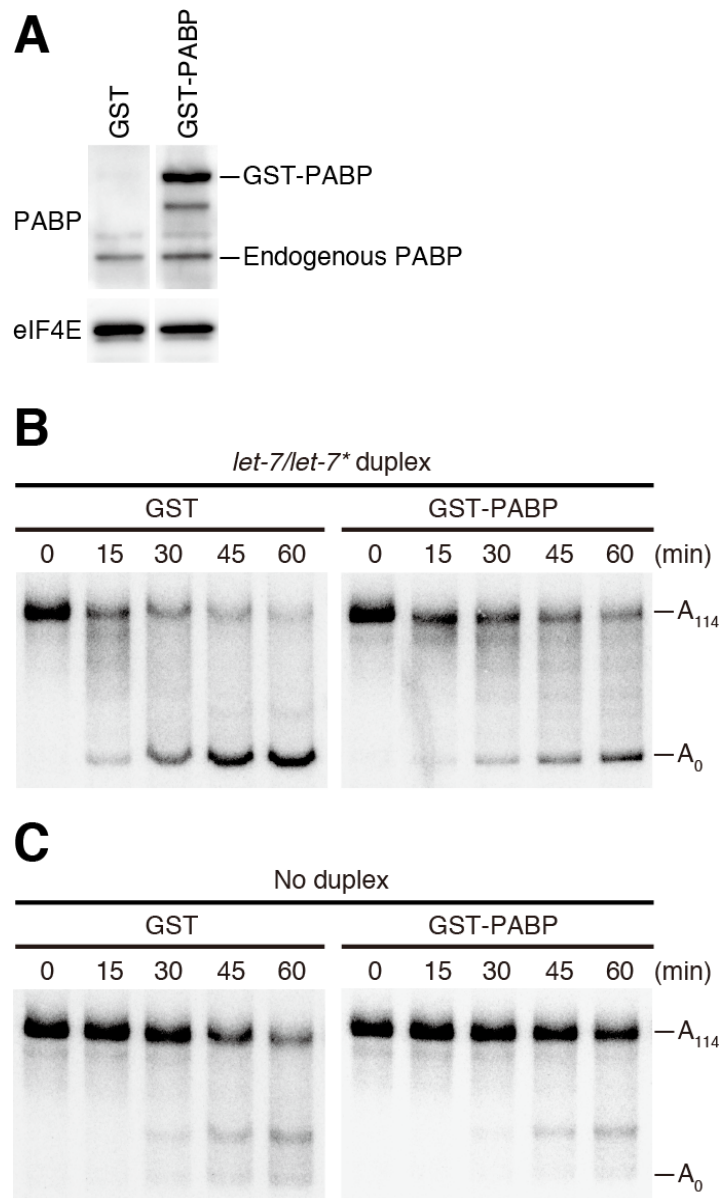


図 2-6. PABP は poly(A)鎖を安定化する

(A) GST、または GST-PABP を加えた S2 細胞抽出液をウエスタンブロッティングによって解析した。GST-PABP は内在に対して三倍程度存在する。

(B) GST、または GST-PABP 存在下での Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖分解反応。GST-PABP は poly(A)鎖の分解を阻害した。

(C) *let-7/let-7**二本鎖を加えていないバックグラウンドにおいて、GST-PABP は mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖を安定化した。

2-4. poly(A)鎖の分解とは独立した純粋な翻訳抑制

次に、試験管内で Ago1-RISC による翻訳抑制の再構築を試みた。3'UTR に *let-7* 標的配列、3'末端に114塩基の poly(A)配列を持つルシフェラーゼ mRNA を用いて (図 2-7A; Rluc-*let-7*-A₁₁₄)、*let-7/let-7**二本鎖の有無における翻訳活性を測定した。その結果、*let-7*を取り込んだ Ago1-RISC を形成させた場合にのみ、poly(A)鎖の分解と翻訳抑制が引き起こされていた (図 2-7B、C)。Anti-*let-7* ASO によって翻訳抑制が解除されることから (図 2-7B)、Ago1-RISC による翻訳抑制が配列依存的であることが確かめられた。

poly(A)鎖の分解の影響を排除して翻訳抑制のみを純粋に解析するため、poly(A)鎖の末端に無関係な配列を 40 塩基付加した特殊なレポーターmRNA を設計した (図 2-7D; Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀)。このレポーターmRNA の翻訳は PAIP2 によって阻害されることから (図 2-7E)、内側に閉じ込められた poly(A)鎖であっても天然型と同じく PABP 依存的に翻訳を促進することが確かめられた。内側に閉じ込められた poly(A)鎖は、Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解をほぼ完全に免れたが (図 2-7C)、標的 mRNA からのタンパク質合成は阻害されたままであった (図 2-7F)。つまり、Ago1-RISC が poly(A)鎖の分解とは独立して翻訳抑制を引き起こしていることが明らかとなった。

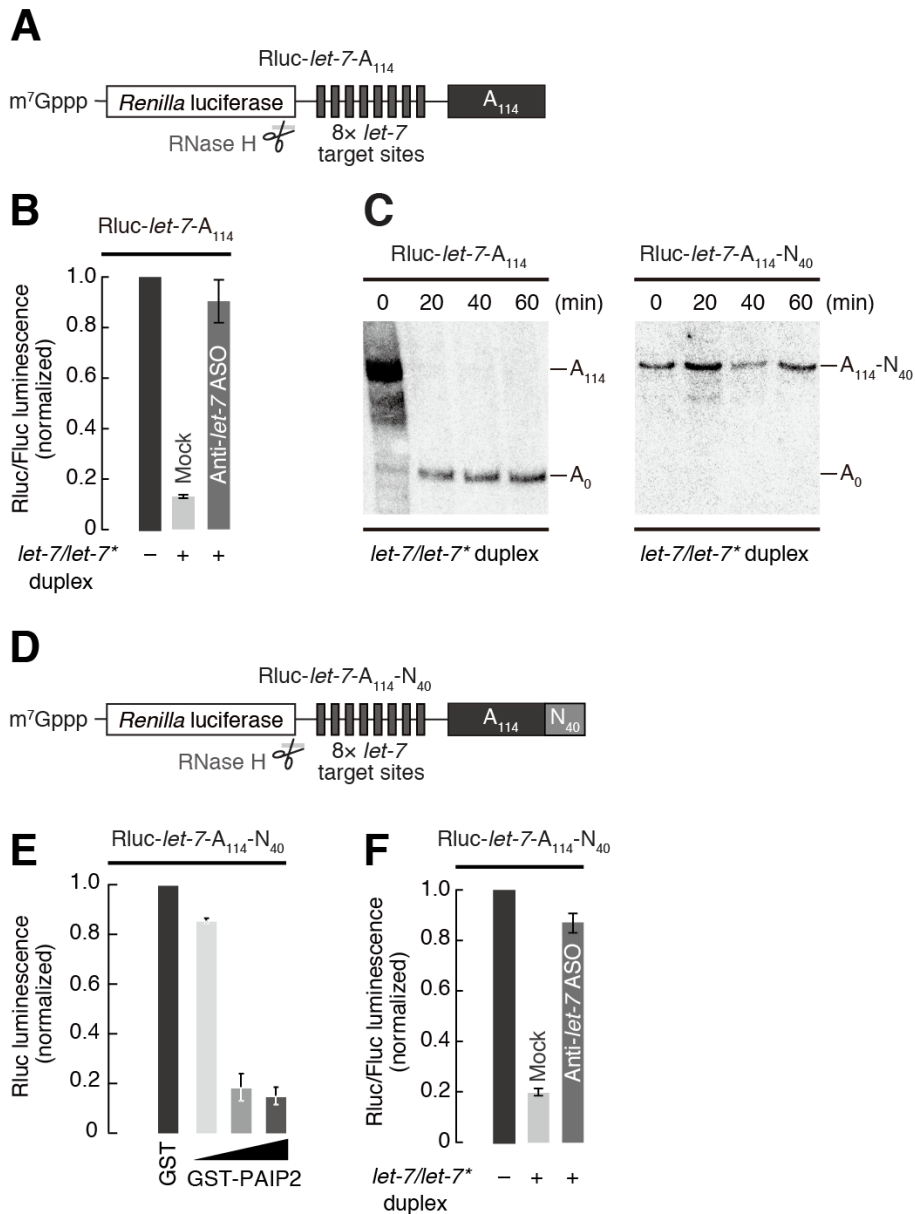


図 2-7. Ago1-RISC による翻訳抑制は poly(A)鎖の分解に依存しない

(A) Rluc-let-7-A₁₁₄ レポーター mRNA の模式図。ハサミは(C) の RNaseH 解析における切断部位を示す。

(B) Ago1-RISC による Rluc-let-7-A₁₁₄ の翻訳抑制。Rluc/Fluc 値は *let-7/let-7** 二本鎖を加え無いときの値に対してノーマライズしている。Anti-*let-7* ASO によって翻訳抑制は解除される。

(C) Ago1-RISC による抑制下にある Rluc-let-7-A₁₁₄、Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ を RNaseH/ノーザンブロットングによって解析した。Rluc-let-7-A₁₁₄ の poly(A)鎖はすみやかに分解されるのに対して、Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ は分解を受けなかった。

(D) poly(A)鎖の分解を受けない Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。

(E) Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳活性は GST-PAIP2 によって阻害された。0.5、1、10 μM の GST-PAIP、または 10μM GST を作用させた。各測定値は 10 μM GST 作用時における値に対してノーマライズしている。

(F) Ago1-RISC による Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。Anti-*let-7* ASO によって翻訳抑制は解除される。

2-5. Ago1-RISC による 翻訳抑制は PABP 非依存的である

近年の解析から、GW182 が eIF4G-PABP 相互作用を競合的に阻害することで翻訳抑制を引き起こすというモデルが提唱されている (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010)。一方で、poly(A)鎖を持たない mRNA であっても miRNA による翻訳抑制を受けるなど (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2008; Beilharz et al., 2009; Chekulaeva et al., 2009; Eulalio et al., 2009b; Iwasaki et al., 2009; Chekulaeva et al., 2010)、このモデルでは説明できない実験結果も数多く報告されている。そこで、あらかじめ PAIP2 を作用させた条件下でルシフェラーゼ解析を行った。PAIP2 存在下では eIF4G-PABP 相互作用が阻害されるため、そもそもレポーター mRNA の翻訳活性が著しく低下する (図 2-4A、図 2-7E)。驚くべきことに Ago1-RISC は、PAIP2 によって翻訳活性が低下した状態にある標的 mRNA であっても、翻訳抑制を引き起こした (図 2-8A)。つまり、Ago1-RISC が GW182-PABP 相互作用に依存せずに翻訳抑制を引き起こしていることが示唆された。同様に、精製 PABP を過剰に加えた場合でも Ago1-RISC による翻訳抑制は損なわれなかった (図 2-8B)。

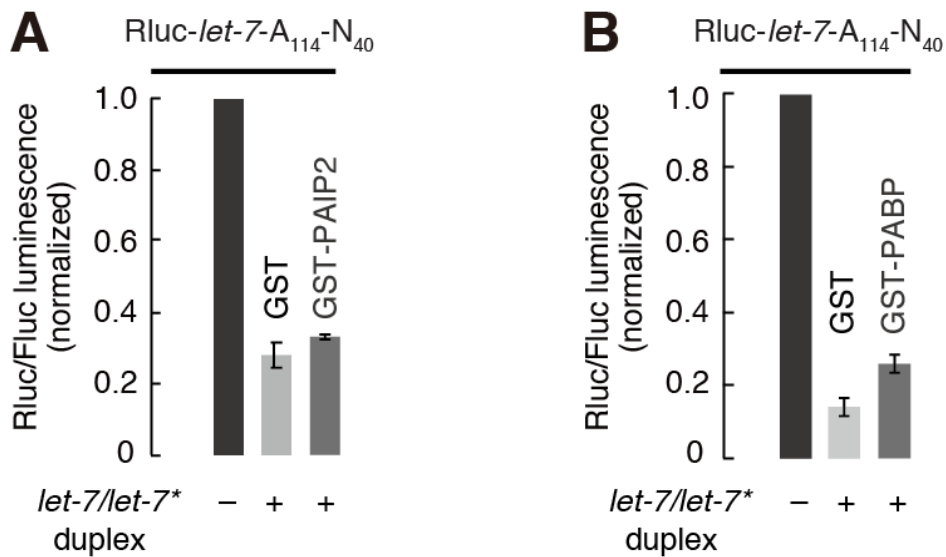


図 2-8. Ago1-RISC による翻訳抑制は PABP 非依存的である

(A) 10 μ M GST、または 10 μ M GST-PAIP2 存在下での Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。抑制活性は GST-PAIP2 による影響を受けなかった。

(B) GST、または GST-PABP 存在下での、Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。GST-PABP によって抑制は損なわれなかった。図 2-6A の S2 細胞抽出液で解析を行っている。

2-6. GW182 内の複数ドメインが poly(A)鎖分解誘導活性を持つ

以上の解析結果は、Ago1-RISC による翻訳抑制と poly(A)鎖の分解が PABP 非依存的であることを示唆している。一方、GW-repeat と UBA ドメインの一部のみを保持したドミナントネガティブ変異体 GW182 である GW182 Δ C(1-592) (Eulalio et al., 2008; Iwasaki et al., 2009; Moretti et al., 2010)を細胞抽出液中に過剰量加えることで、翻訳抑制と poly(A)鎖の分解の両方が阻害された (図 2-9A、B)。このことから、両経路で GW182 が中心的な役割を担っていると考えられる。そこで次に、詳細な GW182 の機能解析を行った。バクテリオファージ由来の λ Nペプチドを融合した GW182 を発現させた S2 細胞抽出液を調製し、BoxB 配列を持つ RNA と混ぜ合わせることで (図 2-9C; mini-BoxB-A₁₁₄)、miRNA や Ago1 を介さずに直接 GW182 を標的 RNA 上に作用させることが出来る (Pillai et al., 2004)。野生型、および変異型 GW182 の活性の定量的に解析するため、各 GW182 断片の S2 細胞抽出液中における発現量を厳密にノーマライズした (図 2-9D-F)。

予想されるように、野生型 GW182 がもっとも強い poly(A)鎖分解誘導活性を示した (図 2-10)。近年の解析結果と一致して (Fabian et al., 2009; Lazzaretti et al., 2009; Zipprich et al., 2009; Jinek et al., 2010)、PABP 結合領域を含む C 末端断片(830–1384)も poly(A)鎖の分解を誘導する活性を持っていた (図 2-10)。一方、PABP 結合領域を全く含まない N 末端領域 (1-605)や中央領域 (605-940)であっても、C 末端領域 (830–1384)と同程度の poly(A)鎖分解誘導活性を持つことが明らかとなった (図 2-10)。つまり GW182 は、C 末端領域とは独立に poly(A)鎖の分解を誘導できることが示唆された。しかしながら、各断片の活性は全長に比べて遙かに弱いものがあった。この結果は、GW182 Δ C(1-592)がドミナントネガティブ変異体として振る舞うことと一致している (図 2-9A)。興味深いことに、N 末端領域 (1-605)と中央領域 (605-940)をつなぎ合わせた断片 (1-940)は、PABP 結合領域を全く持たないにも関わらず、各断片と比較して顕著に強い poly(A)鎖分解誘導活性を示した。以上の結果は、miRNA による poly(A)鎖の分解が PABP 非依存的であるという考えを強く支持している。

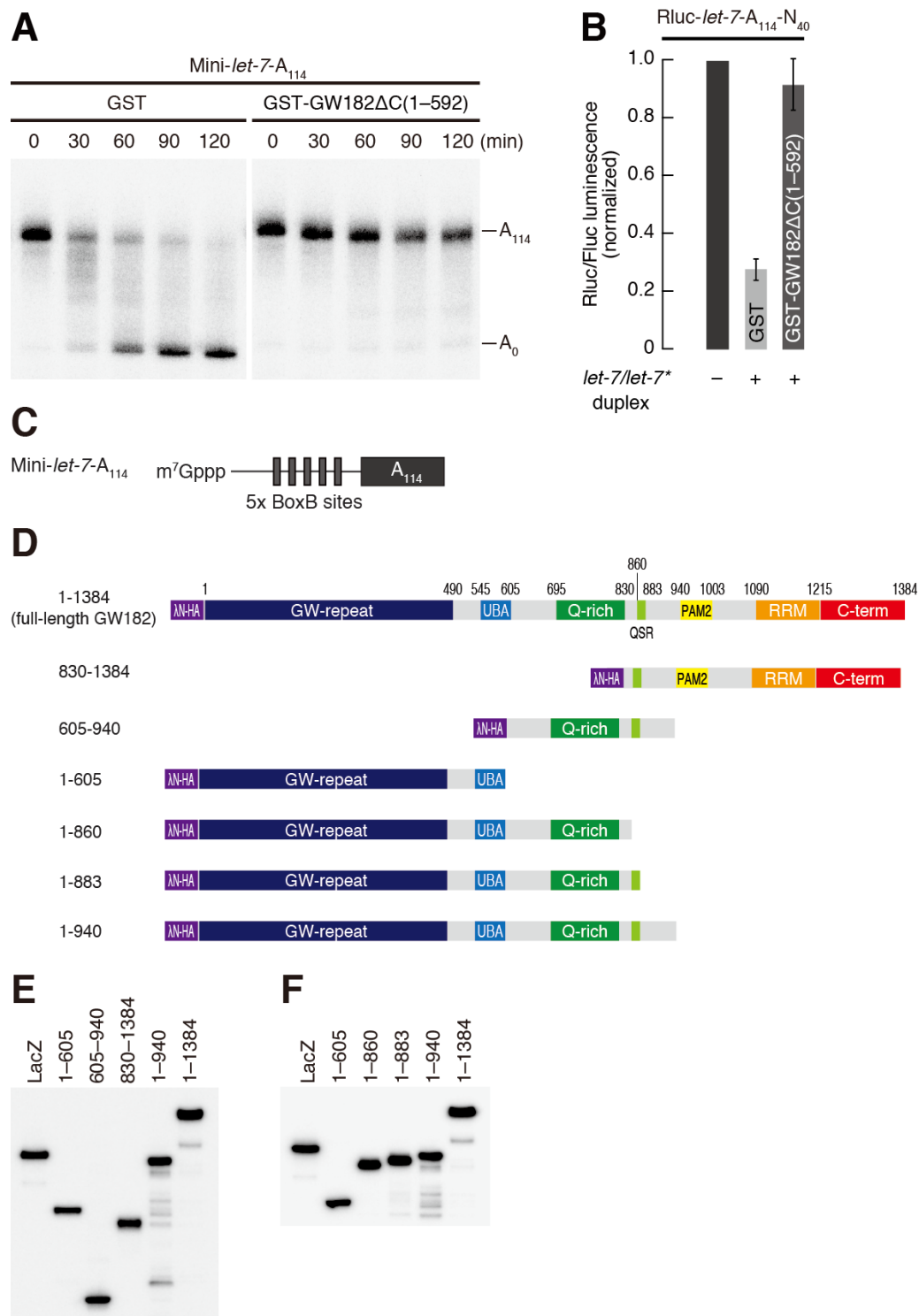


図 2-9. Ago1-RISC の働きは GW182 に依存的である

(A) Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解は、10 μM GST-GW182ΔC(1-592)によって阻害される。

(B) Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制は、10 μM GST-GW182ΔC(1-592) によって阻害される。

(C) mini-BoxB-A₁₁₄ の模式図。

(D) 解析に用いた N 末端 λN-HA タグ融合 GW182 の模式図。

(E, F) N 末端 λN-HA タグ融合 GW182 のウエスタンブロット解析。

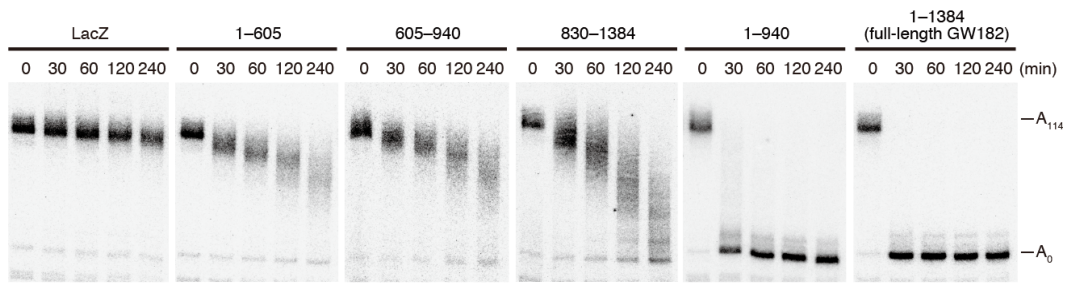


図 2-10. GW182 各断片による poly(A)鎖の分解

C 末端断片(830-1384)だけでなく、N 末端断片 (1-605)や中央領域断片 (605-940)も poly(A)鎖の分解を誘導した。N 末端断片と中央領域断片を組み合わせた (1-940)は全長に匹敵する強い活性を示した。 λ N-HA-LacZ はネガティブコントロールとして用いた。

2-7. GW182 の新たな機能性ドメイン

近年の解析から、PABP 結合領域を含む C 末端領域を欠損させた変異型 GW182 (1-861)が、野生型に比べて著しく弱い抑制活性しか持たないことが示された (Eulalio et al., 2009a; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010)。一方、今回の解析から、同じく PABP 結合領域を持たない変異型 GW182 (1-940) であっても、強い poly(A)鎖分解誘導活性を持つことが明らかとなった (図 2-10)。このことは、GW182 を構成するアミノ酸残基 861 番目から 940 番目の間に、この差を生み出す未知の機能性ドメインが存在していることを示唆している。生物種間のアミノ酸配列を比較すると、861 番目から 883 番目の領域で保存性が高いことが明らかとなった (図 2-11A)。そこで 1-860、1-883 という二つの N 末端断片を新たに作製し、その活性を評価した (図 2-9D,F)。その結果、1-860 は 1-605 に比べて強い活性を示すものの、861 番目から 883 番目の領域を足しあわせた断片 (1-883)は 1-940 に匹敵するさらに強い活性を持つことが明らかとなった (図 2-11B)。そこで 861-883 までの領域を、保存されているアミノ酸配列に基づいて、QSR モチーフと名付けた。

2-8. GW182 は全長のコンテキストにおいて最大の活性を発揮する

今回の解析から、PABP 結合領域を持たない変異型 GW182 (1-940)であっても、そのほかの断片に比べて顕著に強い活性を持つことが明らかとなった。しかし、早いタイムポイントにおける poly(A)鎖の分解を解析したところ、1-940 は野生型 GW182 に比べて反応速度が有意に遅れる様子が観察された (図 2-11C)。つまり、GW182 は全長の状態で初めて最大の活性を発揮している。GW182 には複数の機能性ドメインが存在しているが、それらが全長のコンテキストで協調的に働くことによって poly(A)鎖の分解を効率的に引き起こしていると考えられる。

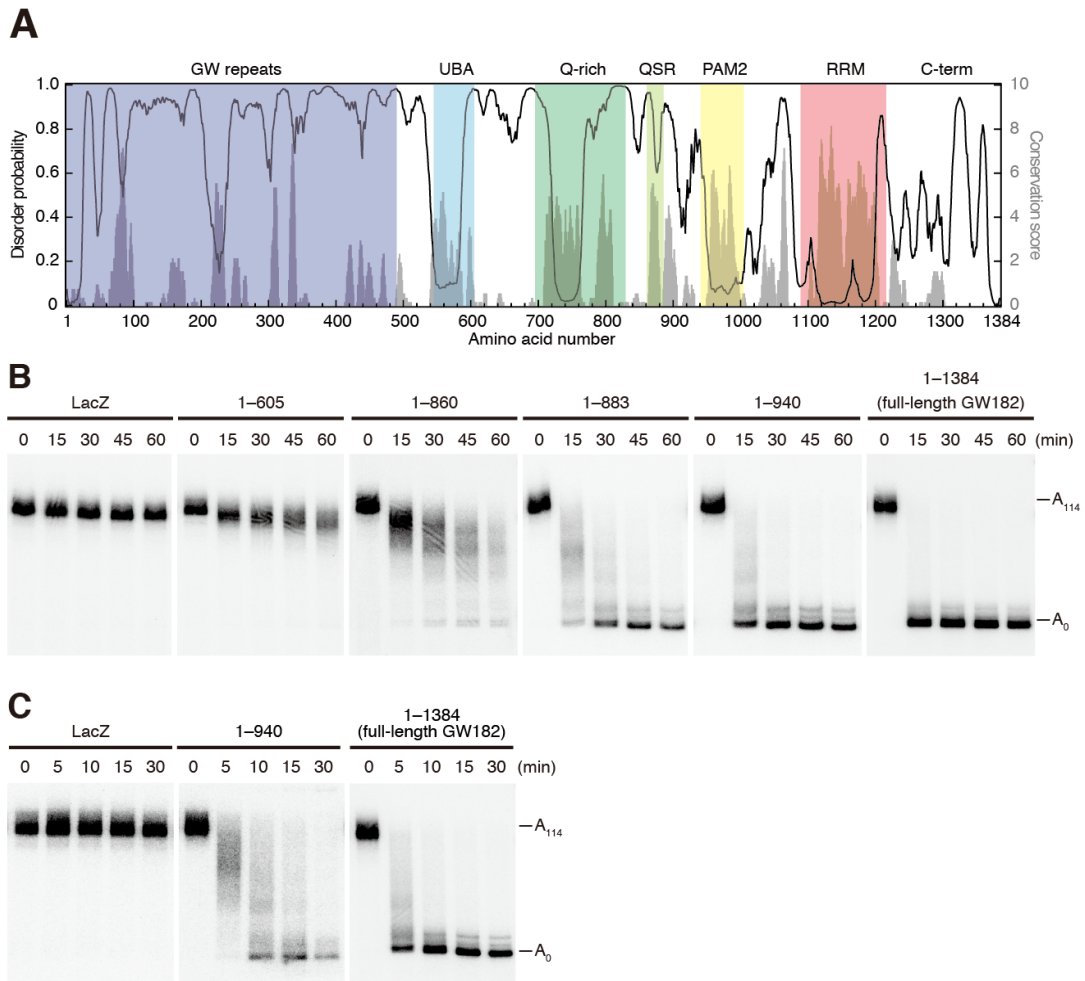


図 2-11. 新たな機能ドメイン、QSR モチーフの同定

(A) GW182 タンパク質の disorder 予測とアミノ酸配列の保存性。5アミノ酸のウィンドウでスライドさせた平均値として conservation score を求めた。disorder probability は DISOPRED2 によって計算した。解析は Pieter Bas Kwak 博士と泊幸秀博士によって行われた。

(B) Q-rich と PAM2-motif のリンカーにある QSR モチーフは poly(A)鎖の分解効率を上昇させる。

(C) N 末端断片 (1-940)と野生型 GW182 による poly(A)鎖の分解を早いタイムポイントで解析した。

2-9. GW182 を介した翻訳抑制は PABP 非依存的である

GW182 を構成する各ドメインの翻訳抑制活性を解析するため、3'UTR に BoxB 配列、3'末端に114塩基の poly(A)配列と 40 塩基の保護配列を持つルシフェラーゼ mRNA を設計した (図 2-12A; Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀)。poly(A)鎖の分解と同様に、野生型 GW182 がもっとも強い翻訳抑制を引き起こした (図 2-12B)。一方で、1-605、605-940、830-1384 の各断片は弱い活性しか示さなかった。N 末端領域 (1-605)と中央領域 (605-940)をつなぎ合わせた 1-940 は、野生型 GW182 に次ぐ強い翻訳抑制を引き起こした。このことから、GW182 は PABP 非依存的に翻訳抑制を引き起こすことが示唆された。

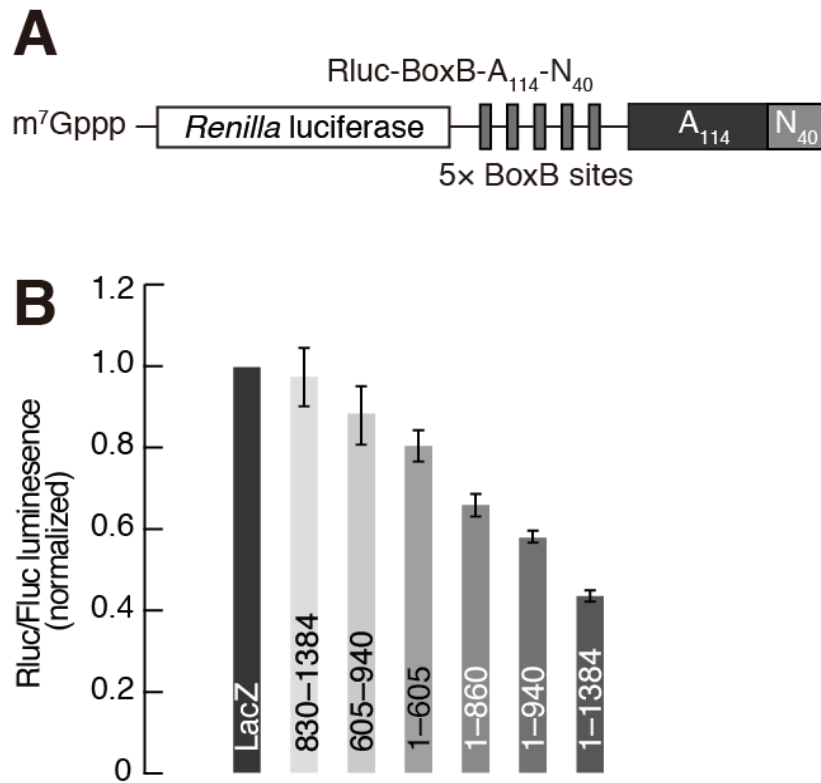


図 2-12. GW182 による純粋な翻訳抑制

(A) poly(A)鎖の分解を受けない Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。
 (B) GW182 各断片による Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。Rluc/Fluc 値は λN-HA-LacZ を作用させたときの値に対してノーマライズしている。

2-10. 考察

miRNA は標的 mRNA の翻訳抑制と poly(A)鎖の分解によって、タンパク質合成を阻害する。これまで、miRNA による翻訳抑制がどのような因果関係によって引き起こされるのかについては長年議論されてきたものの、明確な結論は得られていなかった (Omer et al., 2009)。従来の解析では、poly(A)鎖をそもそも持たない標的 mRNA や、ヒストンステムループと呼ばれる特殊な二次構造を介して poly(A)鎖非依存的に翻訳を活性化する特殊な標的 mRNA が用いられてきた (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2008; Beilharz et al., 2009; Chekulaeva et al., 2009; Eulalio et al., 2009b; Iwasaki et al., 2009; Chekulaeva et al., 2010)。しかし、poly(A)鎖を持たない mRNA はそもそも翻訳活性が低いことや、ヒストンステムループが通常の翻訳経路とは異なる特殊な分子機構を介して翻訳を活性化していることから (Marzluff et al., 2008)、その解析結果を正確に解釈することは困難であった (Nissan and Parker, 2008)。本研究では、poly(A)鎖自体の機能は維持したまま、その分解を特異的に阻害することで、miRNA による翻訳抑制が poly(A)鎖の分解とは独立していることを明確に結論づけた (図 2-7C-F、図 2-12)。つまり翻訳抑制は、単に poly(A)鎖が分解されたことによる結果ではないことが示された。さらに、この“純粹”な翻訳抑制は PABP 非依存的であることが明らかとなった (図 2-8A、図 2-12)。同様の結論は、ゼブラフィッシュ初期胚を用いた *in vivo* 解析からも導かれており (Mishima et al., 2012)、PABP に依存しない miRNA の働きは種間で保存されていることが示唆された。poly(A)鎖の分解も同じく、そもそも翻訳が完全に阻害された条件でも影響を受けることなく進行することから (Eulalio et al., 2007; Wakiyama et al., 2007; Eulalio et al., 2009b; Fabian et al., 2009; Iwasaki et al., 2009)(図 2-2F、G)、miRNA による poly(A)鎖の分解と翻訳抑制は、互いに独立した反応であることが考えられる。

近年の解析から、GW182 は PABP との相互作用を介して poly(A)鎖の分解を引き起こすというモデルが提唱されていた (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Jinek et al., 2010)。つまり GW182 は、

PABP を介して間接的に poly(A)鎖分解酵素を呼び込む、あるいは poly(A)鎖から PABP を解離させることによって poly(A)鎖分解酵素の基質認識を促していると考えられてきた。しかし今回の解析結果から、少なくともショウジョウバエ S2 細胞抽出液中において、miRNA が GW182-PABP 相互作用に依存せずに poly(A)鎖の分解を引き起こしていることが明らかとなった。一方で、マウス Krebs-2細胞抽出液を用いた試験管内再構築系では、PABP の除去が poly(A)鎖の分解を著しく阻害するという、相反する実験結果も報告されている (Fabian et al., 2009)。興味深いことに、ショウジョウバエ初期胚を用いた試験管内再構築系において、GW182-PABP 相互作用は必須ではないものの、Ago1-RISC の標的 mRNA 上へ呼び込みを促進していることが示された (Moretti et al., 2012)。マウス Krebs-2細胞抽出液中では、エフェクター複合体の標的 mRNA 上へ呼び込みが律速段階となることで、GW182-PABP 相互作用に対する高い依存性を示している可能性も考えられる。

変異体を用いた過去の解析から、PAM2-motif、C-term ドメインを含む C 末端領域が GW182 の機能発揮に重要であると考えられてきた (Eulalio et al., 2009a; Fabian et al., 2009; Jinek and Doudna, 2009; Lazzaretti et al., 2009; Lian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Zipprich et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Kozlov et al., 2010)。この領域が PABP と直接結合していることから、GW182-PABP 相互作用の重要性が盛んに議論されてきた。しかし今回、GW182 各断片の発現量を厳密にノーマライズした定量的な解析によって、C 末端領域だけではなく N 末端領域の GW-repeat や UBA ドメイン、Q-rich ドメインを含む中央付近の領域も同等の抑制活性を持つことが明らかとなった (図 2-10)。さらに、Q-rich ドメインと PAM2-motif の間に QSR と名付けた新たな機能ドメインを発見した (図 2-11A、B)。GW182 を構成する各ドメインの相対的な寄与は生物種間や実験系によって異なることも考えられるため、GW182-PABP 相互作用が miRNA による遺伝子発現制御に全く寄与しないとは断言できない。実際にゼブラフィッシュ初期胚では、PAM2-motif を介した PABP との相互作用は必須ではないものの、抑制活性に一部寄与することが報告されている (Mishima et al., 2012)。ごく最近、GW182 は poly(A)鎖分解酵素複合体である CCR4-NOT 複合体の構成因子、

NOT1 と直接結合することが示された (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011)。この相互作用は QSR を含む領域や、N 末端から C 末端にかけて複数箇所存在している結合モチーフの協調的な働きによって担われていることが明らかとなった。重要なことに、GW182-NOT1 相互作用は PABP 非依存的であることが示された。このことから GW182 は PABP に依存せずに、自ら積極的に CCR4-NOT 複合体を標的 mRNA 上へと呼び込んでいると考えられる。

本研究により、miRNA は PABP 非依存的に翻訳抑制と poly(A)鎖の分解を引き起こすことが明らかとなった。さらに miRNA による翻訳抑制は、poly(A)鎖の分解とは全く独立した反応であることが明らかとなった。しかし、miRNA による翻訳抑制がタンパク質合成過程のどの段階をどのように阻害しているのかといった詳細な作用機序は未解明であり、その理解には今後のさらなる解析が必要である。

実験手法

Buffer、40x Reaction Mix の 組成

1x lysis buffer

30 mM Hepes-KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂

2x proteaseK buffer

200 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 2% (w/v) SDS

RNaseH buffer

40 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 0.4 U/μl

RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega)

ホルムアミド loading dye

10 mM EDTA pH 8.0, 98% (w/v) deionized formade, 0.025% (w/v) xylene cyanol, 0.025% bromophenol blue

40x Reaction Mix

水	50 μl
1M DTT	2 μl
1 M KOAc	16 μl
100 mM ATP	4 μl
100 mM GTP	1 μl
0.5 M Mg(OAc) ₂	2.24 μl
1 mM amino acid mixture (Sigma)	20 μl
500 mM creatine monophosphate	20 μl
2 U/μl creatine phosphokinase (Calbiochem)	6 μl
40 U/μl RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega)	1 μl

ライセートの調製

初期胚抽出液

発生 0-12 時間のショウジョウバエ初期胚を集め、水で洗う。50% ハイター (花王) に1分間浸し、その後流水で3分間洗う。キムタオルで水分を除き、初期胚に対して等量の (1x lysis buffer, 5 mM DTT, 1x protease inhibitor cocktail [Riche])を

加えて、ダウンス型ホモジェナイザーによって20回つぶす。破碎液を 4°C、 1.7×10^4 g で 20 分遠心し、上清を回収した。

S2 細胞抽出液

S2 細胞を回収し、PBS によって1回洗う。細胞ペレットに対して等量の(1x lysis buffer, 5 mM DTT, 1x protease inhibitor cocktail [Riche])を加えて、ダウンス型ホモジェナイザーによって20回つぶす。破碎液を 4°C、 1.7×10^4 g で 20 分遠心し、上清を回収した。

プラスミドの作製

pUC57-A₁₁₄

A₁₁₄ 配列と EcoT22I 切断部位、40 塩基対の任意の配列は、人工遺伝子合成によって pUC57 vector の PstI、HindIII 切断部位間にクローニングした (GenScript)。

pUC57-mini-*let-7*-A₁₁₄

8ヶ所の *let-7* 標的配列を含む DNA 断片は、psiCHECK2-*let-7* 8x (Iwasaki et al., 2009)を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG ACG AGC AGT AAT TCT AGG CG-3')と (5'-CCC CCC TGC AGG CGG CCA GCG GCC GCG TCG A-3')によって増幅し、pUC57-A₁₁₄ の Sall、PstI 切断部位間に挿入した。

pUC57-mini-BoxB-A₁₁₄

5ヶ所の BoxB 配列を含む DNA 断片は、pAC5.1 Fluc-BoxB 5x (Chekulaeva et al., 2009)を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGC TCG AGT TCC CTA AGT CCA ACT ACC A-3')と (5'-CCC CCG CGG CCG CAT AAT ATC CTC GAT AGG GCC-3')によって増幅し、psiCHECK2 vector (Promega)の XhoI、NotI 切断部位間に挿入した (psiCHECK2-BoxB)。さらに psiCHECK2-BoxB を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CAT AGT CCA ACT ACC AAA CT-3')と (5'-CCC CCC TGC AGG CGG CCA GCG GCC GCA TAA T-3')によって DNA 断片を増幅し、pUC57-A₁₁₄ の Sall、PstI 切断部位

間に挿入した。

pUC57-Rluc-*let-7*-A₁₁₄

8ヶ所の *let-7* 標的配列と *Renila luciferase* を含む DNA 断片は、psiCHECK2-*let-7* 8x (Iwasaki et al., 2009)を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG C-3')と (5'-CCC CCC TGC AGG CGG CCA GCG GCC GCG TCG A-3')によって増幅し、pUC57-A₁₁₄ の Sall、PstI 切断部位間に挿入した。

pUC57-Rluc-BoxB-A₁₁₄

5ヶ所の BoxB 配列と *Renila luciferase* を含む DNA 断片は、psiCHECK2-BoxB を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG C-3')と (5'-CCC CCC TGC AGG CGG CCA GCG GCC GCA TAA T-3') によって増幅し、pUC57-A₁₁₄ の Sall、PstI 切断部位間に挿入した。

pAC5.1- λ N-HA-GW182 欠損変異体シリーズ

pAC5.1- λ N-HA-LacZ、GW182、1-605 は過去に記述されている (Chekulaeva et al., 2009)。830-1384, 605-940, 1-860, 1-940 の GW182 各断片は pAC5.1- λ N-HA-GW182 を鋳型として、下記のプライマーを用いた inverse PCR 法により作製した。830-1384 (5'-GTT CCA GAT TAC GCT TCT CTA AGT AAC TCA GGC AA-3') と (5'-AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA AGC CAT CA-3'); 605-940 (5'-GTT CCA GAT TAC GCT TCT TAT GCC GAC CAC AAT AG-3') と (5'-GTG GTC GGC ATA AGA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GT-3'); 1-860 (5'-ATT AAT AAG CCA AGT TAA GCG GCC GCT CGA GTC TA-3') と (5'-TCG AGC GGC CGC TTA ACT TGG CTT ATT AAT ATT GA-3'); 1-883 (5'-GTA TTA GAT AAG GAG TAA GCG GCC GCT CGA GTC TA-3') と (5'-TCG AGC GGC CGC TTA CTC CTT ATC TAA TAC TGG AA-3'); 1-940 (5'-GAT AAC GAG AAT AAA TAA GCG GCC GCT CGA GTC TAG AG-3') と (5'-GAC TCG AGC GGC CGC TTA TTT ATT CTC GTT ATC AGA TG-3')。

pGEX5X-3-PAIP2

paip2 遺伝子は、ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGA ATT CCA TGT TGT TAA AAG TGC CAT C-3') と (5'-CCC CGT CGA CTT ATG AGG CAG GGA AAT CTA-3') によって増幅し、pGEX5X-3 vector (GE Healthcare Biosciences) の EcoRI、Sall 切断部位間に挿入した。

pGEX5X3-PABP

pabp 遺伝子は、ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGC TCG AGA TGG CTT CTC TAT ACG TCG G-3') と (5'-CCC CCG TCG ACT TAG TTG GCG GGC TCG GTG A-3') によって増幅し、pGEX5X-3 vector (GE Healthcare Biosciences) の XhoI、Sall 切断部位間に挿入した。

pCold I-PAP

hiiragi 遺伝子は、ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-CAC CAT GTG GAA TTC CGA ACC AAC-3') と (5'-TCA CGA ACA TGC CAC CTC CG-3') によって増幅し、pENTR-D-TOPO vector (Invitrogen) へクローニングした。さらに、LR clonase (Invitrogen) によって pCold I (Takara Bio) 改変ベクターへと組み替えた。

標的 RNA の調製

Mini-*let-7-A*₁₁₄, mini-BoxB-*A*₁₁₄ RNA

EcoT22I で切断した pUC57-mini-*let-7-A*₁₁₄、および pUC57-mini-BoxB-*A*₁₁₄ を鋳型として、Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre) を用いて転写を行った。[α -³²P] GTP と ScriptCap m⁷G Capping System (Epicentre) によって、放射性標識された m⁷Gcap 構造を RNA の 5' 末端に付加した。

Rluc-*let-7-A*₁₁₄/*A*₁₁₄-N₄₀, Rluc-BoxB-*A*₁₁₄-N₄₀ mRNA

EcoT22I (*A*₁₁₄ の場合)、または HindIII (*A*₁₁₄-N₄₀ の場合) で切断した pUC57-Rluc-*let-7-A*₁₁₄、pUC57-Rluc-BoxB-*A*₁₁₄ を鋳型として、Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre) を用いて転写を行った。ScriptCap m⁷G Capping

System (Epicentre)によって m⁷Gcap 構造を RNA の 5'末端に付加した。

Fluc mRNA

転写の鋳型となる DNA 断片は、pGL3 Basic (Promega) をもとにプライマー(5'-GTA CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG TAA AGC CAC CAT GGA AGA C-3') and (5'-CAC TGC ATT CTA GTT GTG GTT TGT CC-3')によって増幅し、Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre)を用いて転写を行った。ScriptCap m⁷G Capping System (Epicentre)によって m⁷Gcap 構造を RNA の 5'末端に付加した。

*let-7/let-7**二本鎖 RNA の調製

人工合成した RNA (5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU-3') と(5'-UAU ACA AUG UGC UAG CUU UCU-3')の 5'末端を、T4 polynucleotide kinase (Takara Bio)によってリン酸化した。リン酸化反応液中の ATP は MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare Bioscience)によって除いた。ガイド鎖とパッセージャー鎖をモル率 2:3 で混ぜ合わせ、95°Cで 3 分、室温で 30 分置くことでアニーリングを行った。二本鎖 RNA は、1x lysis buffer に溶けている。

タンパク質精製

GST, GST-PAIP2, GST-GW182ΔC(1-592)は、大腸菌株中 BL21 中で発現させた。対数増殖期に 1 mM IPTG を添加し、25°Cで 24 時間培養後に大腸菌を回収した。(1x lysis buffer、1x protease inhibitor cocktail [Roche], 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 100 μg/ml pefabloc, 20 μg/ml pepstatin, 5 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml leupeptin)中にペレットを懸濁し、ソニケーションで細胞を破碎後、4°C、1x 10⁴ g で 20 分間遠心を行った。回収した上清と glutathione sepharose 4B (GE Healthcare Bioscience)を混ぜ合わせ、4°Cで 1 時間反応させた後、レジンを (1x lysis buffer, 1 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT)で 5回洗い、1x lysis buffer で2回リンスした。タンパク質は (1x lysis buffer, 20 mM glutathione, 1 mM DTT, 30% glycerol)中に溶出した。

His-PAP は、大腸菌株中 BL21 中で発現させた。対数増殖期に 1 mM IPTG を添加し、15°C で 24 時間培養後に大腸菌を回収した。(200 mM KOAc, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 20 mM imidazole pH 7.5, 2 mM Mg(OAc)₂, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 100 µg/ml pepabloc, 20 µg/ml pepstatin, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 1x protease inhibitor cocktail [Roche], 5% glycerol) 中にペレットを懸濁しソニケーションで細胞を破碎後、4°C、1x 10⁴ g で 20 分間遠心を行った。タンパク質は His-tarp FF crude (GE Healthcare Bioscience) を用いて精製し、PD-10 (GE Healthcare Bioscience) によって (1x lysis buffer, 30% glycerol, 1 mM DTT) 中へと置換した。

GST-PABP は、大腸菌株中 BL21 中で発現させた。対数増殖期に 1 mM IPTG を添加し、25°C で 24 時間培養後に大腸菌を回収した。GST-PABP はその大部分が不溶性画分に存在したが、高塩 buffer (2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1x protease inhibitor cocktail [Roche], 1% Triton X-100, 1 mM DTT) でペレットを懸濁することにより、その一部が可溶化した。懸濁液はソニケーションによる破碎後、4°C、5000 rpm で 20 分間遠心した。回収した上清に、glutathione sepharose 4B (GE Healthcare Bioscience) を混ぜ合わせ 4°C で 1 時間反応させた後、レジンを高塩 buffer で 5 回洗い、1x lysis buffer で 2 回リンスした。タンパク質は (1x lysis buffer, 1 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 20 mM glutathione, 1 mM DTT, 30% glycerol) 中に溶出し、NAP-5 (GE Healthcare Bioscience) によって (1x lysis buffer, 30% glycerol, 1 mM DTT) 中へと置換した。

トランスフェクション

10 ml の S2 細胞 (1x 10⁶ cells/ml) に対して 10 µg の発現プラスミドを FuGENE HD transfection reagent (Roche) を用いてトランスフェクションし、72 時間後に細胞抽出液を調製した。

マイクロコッカルヌクレアーゼ処理

100 µl の S2 細胞抽出液に対して、1 µl のマイクロコッカルヌクレアーゼ (15,000 U/ml; Takara Bio)、1 µl の 100 mM Ca(OAc)₂ を加え、20°C で 20 分間静置した。

1 μ l の 200 mM EGTA を加えることで反応を止めた。

GST-PAIP2 による PABP 除去

15 μ g の GST、GST-PAIP2 を 40 μ l の glutathione sepharose 4B (GE Healthcare Bioscience) と混ぜ合わせ、4°C で 2 時間置いた。1x lysis buffer で 3 回洗った後、レジンと 30 μ l のマイクロコッカルヌクレアーゼ処理した細胞抽出液を混ぜ合わせ、4°C で 2 時間反応させた。その後、上清を回収し解析に用いた。

ウエスタンブロッティング

ブロッティングは、分子量の異なる GW182 各断片間の転写効率の差を最小化するため、オーバーナイトで wet transfer した。anti-FLAG 抗体 (1:5000; Sigma)、anti-HA 抗体 (1:5000; Covance)、anti-PABP 抗体 (1:1000; (Duncan et al., 2009)), anti-eIF4E 抗体 (1:5000; (Nakamura et al., 2004)), anti-Ago1 抗体 (1:1000; (Miyoshi et al., 2005)) を一次抗体として用いた。SuperSignal West Dura (Pierce) によって化学発光を誘導し、LAS-3000 (Fujifilm Life Science) によって画像を取得した。

共免疫沈降

λ N-HA-GW182 を発現する S2 細胞抽出液 10 μ l に、終濃度 10 μ M の GST、GST-PAIP2 を加え 30 分室温に置いた。あらかじめ anti-HA 抗体 (Roche) と 1 時間反応させた dynabeads proteinG beads (Invitrogen) を S2 細胞抽出液と混ぜ合わせ、4°C で 2 時間置いた。反応後、ビーズを (1x lysis buffer, 150 mM NaCl, 0.1 % NP-40) で 3 回洗い、1x lysis buffer で 1 回リンスした。サンプルは 10 % SDS-PAGE に泳動し、ウエスタンブロットによって解析した。

試験管内 poly(A)鎖分解反応

10 μ l の S2 細胞抽出液、あるいは初期胚抽出液に対して、6 μ l の 40x reaction mix、2 μ l の 500 nM *let-7/let-7**二本鎖を加え、室温で 30 分静置した。そこへ、~ 5 nM の放射性標識した標的 RNA を加え、さらに室温で静置した。各タイムポイントで 3 μ l の反応液を分取し、110 μ l の proteaseK mixture (2x proteaseK buffer,

0.2 µg/µl glycogen, 2 µg/µl proteaseK)と混ぜ合わせることで反応を停止させた。65°Cに 20 分置いた後、エタノール沈殿によって RNA を回収した。RNA サンプルはホルムアミド loading dye へ懸濁し、5% 変性ウレアポリアクリルアミドゲルによって分離した。画像は PhosphorImager (FLA-7000; Fujifilm Life Science)によって取得した。

試験管内翻訳反応

5 µl の S2 細胞抽出液に対して、3 µl の 40x reaction mix、1 µl の 500 nM *let-7/let-7**二本鎖を加え、室温で 30 分静置した。そこへ、1 µl の 5nM Rluc レポーター mRNA/Fluc コントロール mRNA を加え、さらに室温で1時間静置した。70 µl の Passive Lysis Buffer (Promega)を加え反応を停止させ、そこから 20 µl 分取してルシフェラーゼ解析 (Dual-Luciferase Reporter Assay System; Promega)を行った。測定値 (Rluc/Fluc)は、*let-7/let-7**二本鎖を加えなかったときの値に対してノーマライズした。グラフは3回の独立試行の平均値と標準偏差を示している。

RNaseH 解析

試験管内翻訳反応後、Trizol Reagent (Ambion)によって反応液中から全 RNA を回収し RNaseH buffer 中に懸濁した。そこへ、*Renilla luciferase* に対して相補的なオリゴ (5'-TGT ACT TAC CCA TTT CAT CT-3')を加え、65°Cで 10 分、室温で 10 分置くことでアニーリングを行った。0.1 U/ml RNaseH (Takara Bio)を加え、37°Cに30分置いた後、25 mM EDTA を加えて反応を止めた。反応液は 5% 変性ウレアポリアクリルアミドゲルで分離を行い、Hybond N⁺ (GE Healthcare Bioscience)へと転写した。T4 polynucleotide kinase (Takara Bio)と[γ-³²P] ATP によって RNA プローブ (5'-UGA GGU AGA UCC UUG UAU AGU-3')の 5'末端に放射性標識を導入し、Perfecthyb Plus (Sigma)を用いて45°Cでハイブリダイゼーションさせた。

II 章

miRNA は複数の異なる経路を介して遺伝子発現を抑制する

目的

miRNA は標的 mRNA の「poly(A)鎖の分解」と「翻訳抑制」という二つの独立した経路を介して遺伝子発現を抑制している。過去の研究から、Ago 結合タンパク質である GW182 が、PABP の機能を阻害することで、poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こしていると考えられてきた。しかし、ショウジョウバエ S2 細胞抽出液を用いた *in vitro* 解析、およびゼブラフィッシュ初期胚を用いた *in vivo* 解析から、miRNA による遺伝子発現抑制が PABP 非依存的であることが明らかとなった (Fukaya and Tomari, 2011; Mishima et al., 2012)。さらにごく最近、GW182 は CCR4-NOT 複合体構成因子である NOT1 と直接結合することで、PABP 非依存的に poly(A)鎖の分解を誘導していることが示された (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011)。一方、翻訳抑制に関しては、PABP 非依存的であることが明らかとなったものの、翻訳のどの段階をどのように阻害しているかは不明である。

miRNA による翻訳抑制の作用段階に関してはこれまで、相反する実験結果が報告されてきた。ショ糖密度勾配遠心法によって、*lin-4* と呼ばれる miRNA の働きが解析された当初、その標的である *lin-14* mRNA はポリソーム領域に検出された (Olsen and Ambros, 1999)。つまり、miRNA は翻訳開始以降の、リボソームが伸張する段階を阻害することが示唆された。同様の解析結果は、線虫だけでなく (Seggerson et al., 2002)、ヒトやマウスでも報告されている (Kim et al., 2004; Nelson et al., 2004b; Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006)。その一方、翻訳抑制を受けた標的 mRNA がポリソーム領域から、リボソームと結合していない軽い領域へ移行するという、相反する実験結果も数多く報告されている (Pillai et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2006; Kiriakidou et al., 2007; Ding and Grosshans, 2009; Janas et al., 2012)。さらに、通常の m⁷Gcap 構造を必要としない Internal ribosome entry site (IRES) や、非天然型 Acap 構造

を持つ特殊な標的 mRNA が、翻訳抑制を受けないといった実験結果も報告されており、miRNA が翻訳開始段階を阻害することが示唆されている (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Wang et al., 2006; Kiriakidou et al., 2007; Mathonnet et al., 2007; Thermann and Hentze, 2007; Wakiyama et al., 2007; Zdanowicz et al., 2009)。同様に、S2 細胞を用いた Ribosome Stalling 解析や、ゼブラフィッシュ初期胚を用いた Ribosome Profiling 解析からも、翻訳開始段階が miRNA による翻訳抑制の標的であることが示唆されている (Bazzini et al., 2012; Djuranovic et al., 2012)。興味深いことに、miRNA はポリソーム領域に、リボソームの形成とは独立した pseudo-polysome と呼ばれる巨大 RNP 複合体の形成を引き起こすことが報告されている (Thermann and Hentze, 2007; Moretti et al., 2010; Moretti et al., 2012)。このことから、pseudo-polysome の形成が原因となつて、翻訳抑制を受けた標的 mRNA がポリソーム領域に検出されていた可能性が考えられる。しかし、pseudo-polysome の機能やその構成因子は全くわかっていない。さらに、シヨ糖密度勾配遠心法を用いた過去の解析はいずれも、翻訳抑制と poly(A)鎖の分解の総合的なアウトプットとしての抑制作用を解析しており (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002; Kim et al., 2004; Nelson et al., 2004b; Pillai et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2006; Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006; Kiriakidou et al., 2007; Thermann and Hentze, 2007; Kong et al., 2008; Wang et al., 2008; Ding and Grosshans, 2009; Moretti et al., 2010; Janas et al., 2012; Moretti et al., 2012)、どのような因果関係によって miRNA による抑制作用が引き起こされていたのかは不明であった。

そこで私は、poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を切り分けて解析できる独自の試験管内再構成系を用いて、miRNA による翻訳抑制の詳細な分子機構を解析した。

結果

3-1. Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳抑制を引き起こす

in vitro 反応系において、通常 3'末端に露出している poly(A)鎖のさらに末端に 40 塩基の無関係な配列を付加することで、poly(A)鎖自身の機能を維持したまま、分解を特異的に阻害することができる (Fukaya and Tomari, 2011) (1章)。そこで細胞内において、poly(A)鎖の分解を阻害して、翻訳抑制のみを切り分けて解析を行うため、3'UTR に *let-7* 標的配列、3'末端に poly(A)鎖と 40 塩基の保護配列、さらにその末端にハンマーヘッドリボザイム配列を持つルシフェラーゼ mRNA を設計した (Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀-HhR; 図 3-1A)。その比較として、通常の poly(A)鎖をもつものも用意した (Rluc-*let-7*-poly(A); 図 3-1A)。ハンマーヘッドリボザイムは、自身の自己切断活性によって、A₁₁₄-N₄₀ の直下で mRNA を切断するので、通常のポリアデニル化反応を介さずに 3'末端を形成することが出来る。レポーターmRNA をコードするプラスミドを、*pri-let-7* の最小領域をコードするプラスミドと同時に S2 細胞中へとトランスフェクションし、72時間後に翻訳活性と標的 mRNA の安定性を解析した。S2 細胞は内在に *let-7* を発現していないので (Sempere et al., 2002)、*pri-let-7* 発現プラスミドのトランスフェクションによって、その活性を厳密にコントロールすることが出来る。

その結果、通常の poly(A)鎖をもつ Rluc-*let-7*-poly(A)は、miRNA による翻訳抑制だけではなく、poly(A)鎖の分解も受けていた (図 3-1B、C)。一方で、Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀-HhR は、poly(A)鎖の安定性が維持されたまま翻訳抑制を受けていた (図 3-1B、C)。つまり、細胞内においても miRNA は、poly(A)鎖の分解とは独立して翻訳抑制を引き起こすことができる。Ago1ノックダウンによって poly(A)鎖の分解と翻訳抑制がともに阻害されたことから (図 3-1B-D)、Ago1-RISC の働きが poly(A)鎖の分解とそれとは独立した“純粋な”翻訳抑制に必須であることが確かめられた。次に、Ago1 結合タンパク質である GW182 の役割を検証するため、GW182 ノックダウン下で同様の解析を行った。解析中の S2 細胞内から GW182 を効率的に除去するため、レポータープラスミドをトランスフェクションする48時間前から、二本鎖 RNA を培地中へ添加し、GW182 のノックダウンを行った (図 3-

1D)。GW182 非存在下では、Rluc-*let-7*-poly(A)の poly(A)鎖の分解が阻害されることから、これまでの考えに一致して、GW182 は Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解に必須であった (図 3-1C)。一方で驚くべきことに、GW182 ノックダウン下においても、Ago1-RISC は翻訳抑制を引き起こすことが明らかとなった (図 3-1B)。つまり、Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解には GW182 が必須であるのに対し、翻訳抑制は GW182 を必要としないことが示唆された。GW182 非依存的な翻訳抑制の一般性を検証するため、内在遺伝子である *vha68-1* mRNA の 3'UTR をもつレポーターmRNA を設計した (Rluc-*vha68-1*-poly(A), Rluc-*vha68-1*-HhR; 図 3-2A)。*vha68-1* mRNA の 3'UTR は、miR-9b に対する標的配列を二カ所もっている (Rehwinkel et al., 2006) (図 3-2B、C)。このような内在遺伝子の 3'UTR であっても、GW182 非依存的に翻訳が抑制されたことから (図 3-2D、E)、Ago1-RISC による GW182 非依存的な翻訳抑制は、3'UTR や miRNA の種類に依存しない一般的な現象であることが示唆された。

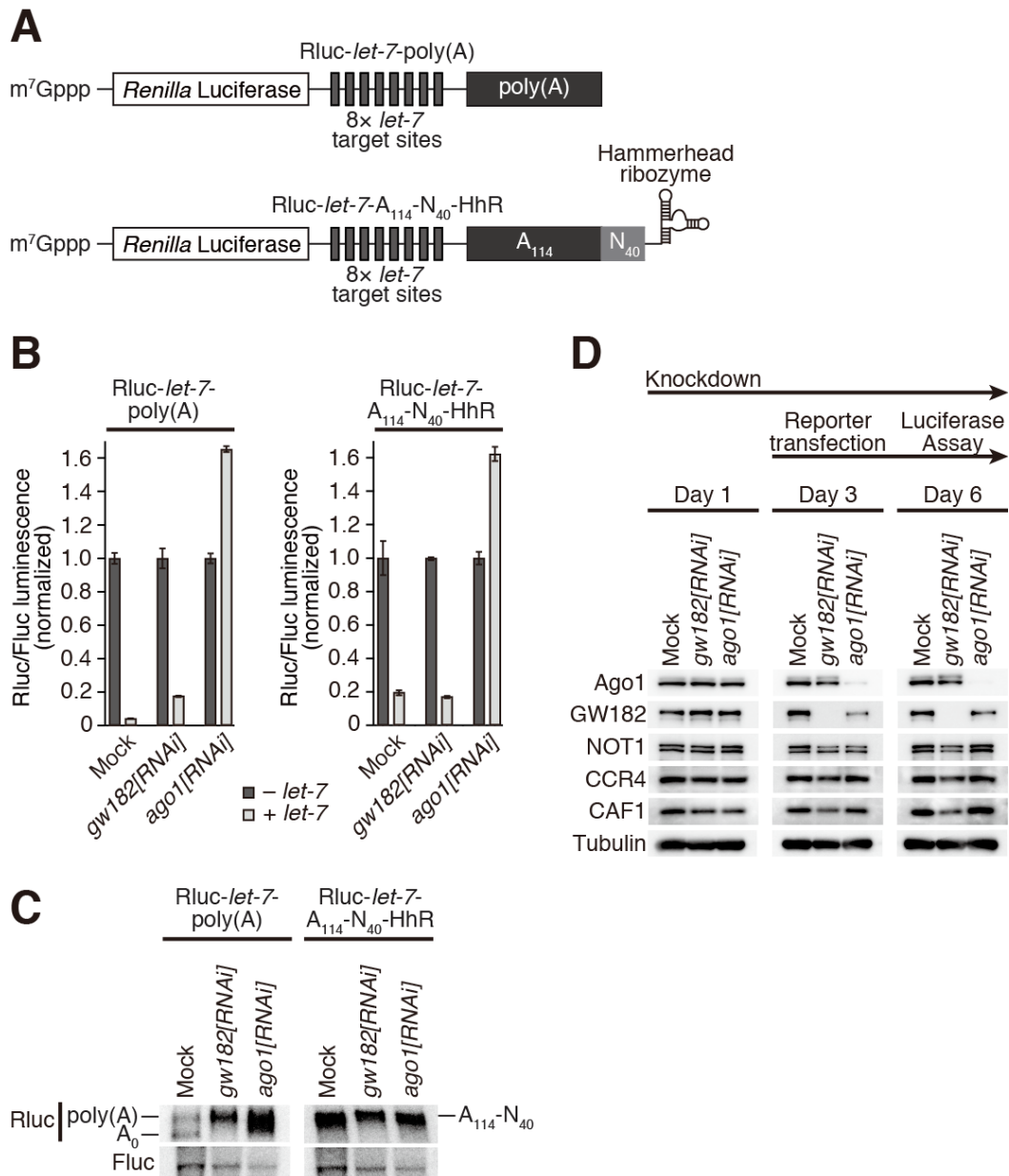


図 3-1. Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳を抑制する

(A) Rluc-let-7-poly(A)、Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀-HhR レポーター mRNA の模式図。
 (B) Ago1-RISC による Rluc-let-7-poly(A)、Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀-HhR の翻訳抑制。Mock として GFP ノックダウンを行っている。Rluc/Fluc 値は *let-7* を発現させないときの値に対してノーマライズしている。抑制活性は Ago1 ノックダウンにより失われるが、GW182 ノックダウンでは損なわれない。
 (C) ノーザンブロットングによって、miRNA による抑制下にある RNA サンプルを解析した。Ago1、および GW182 ノックダウンによって poly(A)鎖の分解と mRNA の不安定化は解除される。一方で、Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀-HhR はそもそも不安定を受けない。
 (D) 一日目に Ago1、または GW182 のタンパク質コード領域に対する二本鎖 RNA を S2 細胞培地中へと添加し、三日目に Rluc と Fluc を発現するプラスミドを、*let-7* 発現プラスミドと同時にトランスフェクションした。六日目にルシフェラーゼ解析によって翻訳活性を測定した。

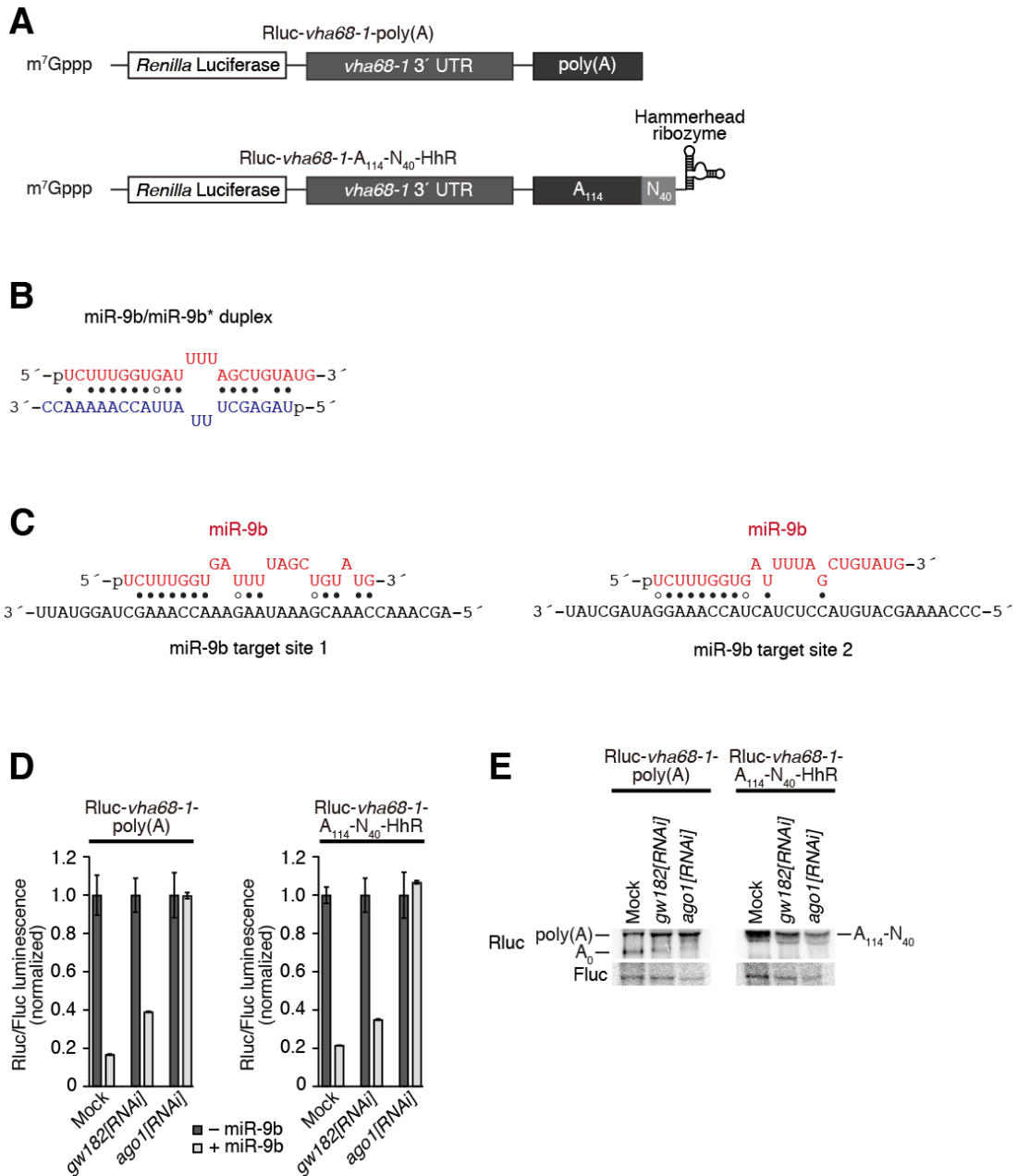


図 3-2. 内在標的配列をもつレポーター mRNA も GW182 非依存的に翻訳抑制される

(A) Rluc-*vha68-1*-poly(A)、Rluc-*vha68-1*-A₁₁₄-N₄₀-HhR レポーター mRNA の模式図。

(B) miR-9b/miR-9b* 二本鎖の模式図。

(C) miR-9b と標的配列の塩基対形成。

(D) Ago1-RISC による Rluc-*vha68-1*-poly(A)、Rluc-*vha68-1*-A₁₁₄-N₄₀-HhR の翻訳抑制。Mock として GFP ノックダウンを行っている。Rluc/Fluc 値は miR-9b を発現させないときの値に対してノーマライズしている。抑制活性は Ago1 ノックダウンにより失われるが、GW182 ノックダウンでは損なわれない。

(E) ノーザンブロッティングによって miRNA による抑制下にある RNA サンプルを解析した。Ago1、および GW182 ノックダウンによって poly(A)鎖の分解と mRNA の不安定化は解除される。一方で、Rluc-*vha68-1*-A₁₁₄-N₄₀-HhR はそもそも不安定を受けない。

3-2. GW182 非依存的な翻訳抑制の試験管内再構成

FLAG-Ago1 を過剰発現したショウジョウバエ S2 細胞抽出液を用いることで、試験管内で miRNA の働きを忠実に再現することが出来る (Fukaya and Tomari, 2011) (I 章)。5'末端を放射性標識した ORF を持たない標的 RNA (mini-*let-7-A*₁₁₄; 図 3-3A)を用いることで、翻訳とは独立した poly(A)鎖の分解反応を解析することが出来る。一方で、末端に40塩基の保護配列を付加した poly(A)鎖を持つルシフェラーゼ mRNA (Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀; 図 3-3A)を用いることで、poly(A)鎖の分解とは独立した翻訳抑制のみを純粋に切り分けて解析することが可能である。実際に、*let-7* を取り込んだ Ago1-RISC を作用させた場合においてのみ、mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解と (図 3-3C)、Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制が観察された (図 3-3D、E)。S2 細胞での *in vivo* 解析と同様に (図 3-1C)、GW182 をノックダウンした S2 細胞抽出液中においても、Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解が著しく阻害されていた (図 3-3B、C)。そこへ HA-GW182 を相補することで活性が回復することから (図 3-3F、G)、poly(A)鎖の分解経路における GW182 の必須の役割が確かめられた。対照的に、Ago1-RISC による翻訳抑制は細胞抽出液中においても GW182 非依存的に起こることが明らかとなった (図 3-3B、D、E)。FLAG-Ago1 を発現させていない S2 細胞抽出液中では、内在の Ago1 が既に内在性 miRNA によって占拠されており、外から加えた *let-7/let-7**二本鎖を取り込めないため、翻訳抑制と poly(A)鎖の分解活性は弱かった (図 3-4A-C)。さらにそこから Ago1 タンパク質を除くことによって、miRNA の働きがより阻害されることから (図 3-4A-C)、細胞抽出液中においても Ago1 が必須の役割を担っていることが確かめられた。また、GW182 非依存的な翻訳抑制は、内在遺伝子 *vha68-1* の 3'UTR を持つレポーター-mRNA でも観察された (図 3-4D-F)。このように、細胞内でみられた GW182 非依存的な翻訳抑制を、試験管内で再現することに成功した。

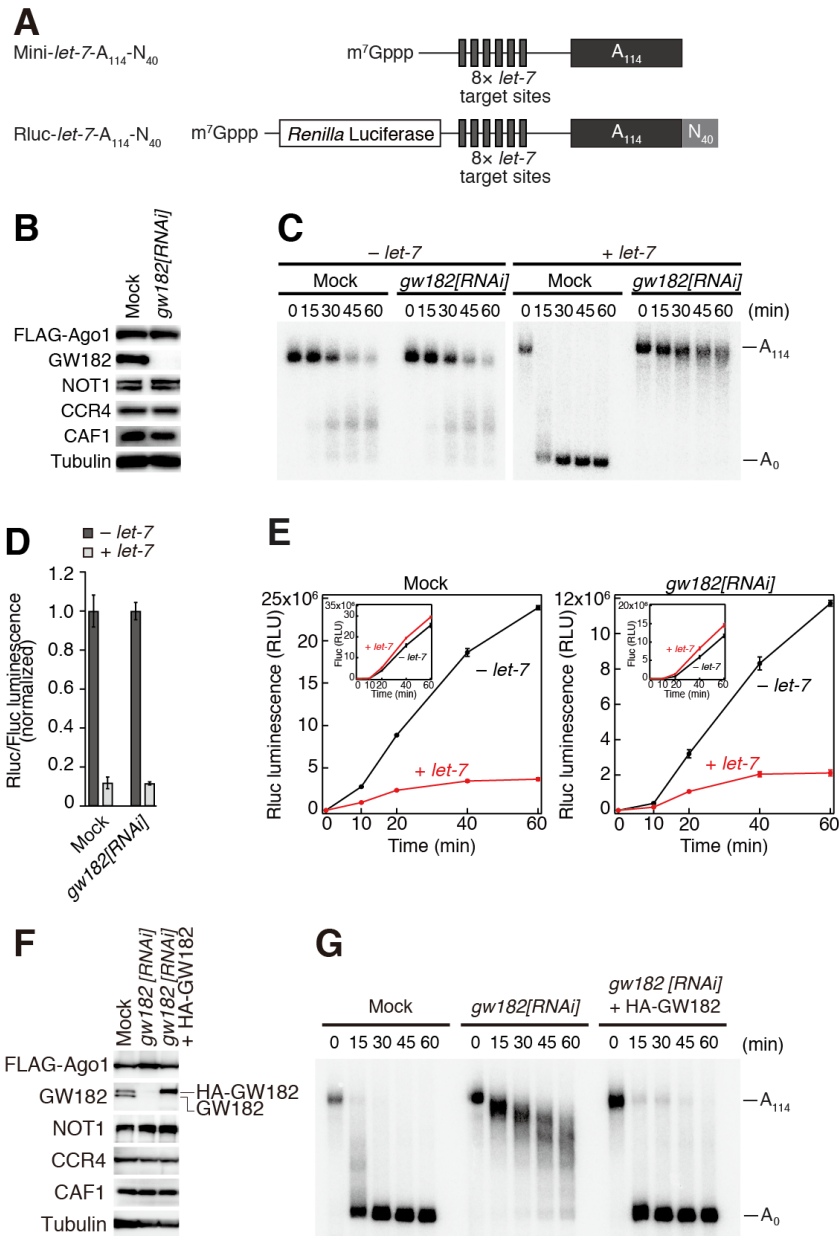


図 3-3. Ago1-RISC による GW182 非依存的な翻訳抑制

(A) mini-*let-7-A*₁₁₄、Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。

(B) ウェスタンブロットングによって(C-E)に用いた細胞抽出液を解析した。

(C) Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。GW182 ノックダウンによって poly(A)鎖の分解が阻害される。

(D) Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。Rluc/Fluc 値は *let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対してノーマライズしている。Ago1-RISC による翻訳抑制に GW182 は必須ではない。

(E) GW182 ノックダウン下における Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳キネティクス。

(F) ウェスタンブロットングによって(G)に用いた細胞抽出液を解析した。GW182 の 5'UTR と 3'UTR に対する二本鎖 RNA を S2 細胞へ添加しノックダウンを行い、HA-GW182 を発現することで相補した。

(G) Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。HA-GW182 を相補することで poly(A)鎖の分解活性が回復した。

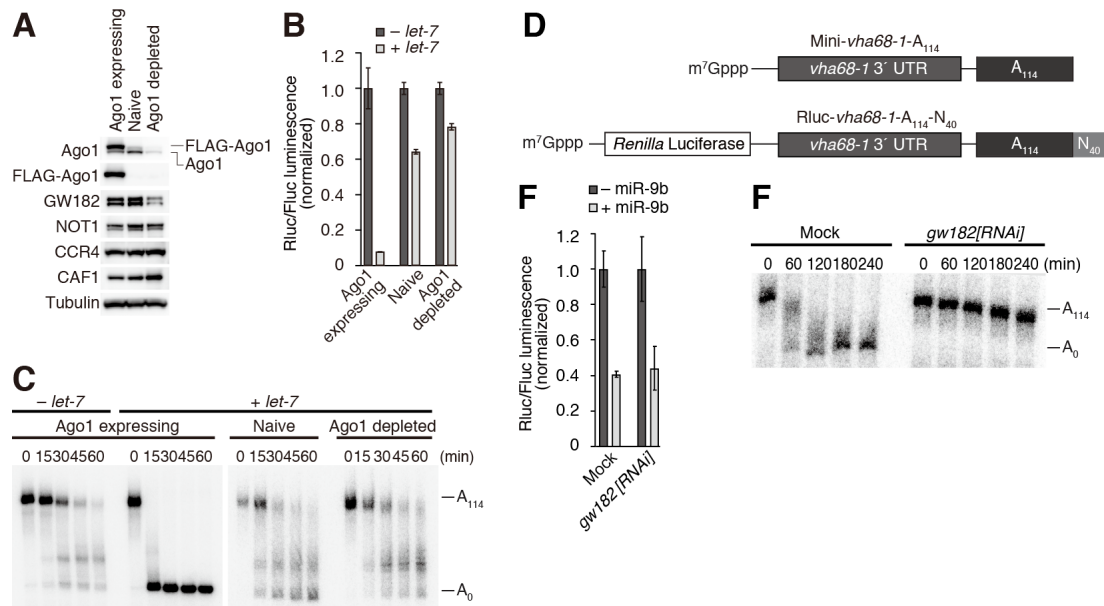


図 3-4. GW182 非依存な翻訳抑制に Ago1 必須である

(A) ウェスタンブロッティングによって(B、C)に用いた細胞抽出液を解析した。
 (B) FLAG-Ago1 を発現しない S2 細胞抽出液、または Ago1 を除去した S2 細胞抽出液中における Rluc-*let-7-A₁₁₄-N₄₀* の翻訳抑制。抑制活性は、*let-7/let-7**二本鎖を取り込むことができる Ago1 量に大きく依存する。
 (C) Ago1-RISC による mini-*let-7-A₁₁₄* の poly(A)鎖の分解。分解活性は、*let-7/let-7**二本鎖を取り込むことができる Ago1 量に大きく依存する。
 (D) mini-*vha68-1-A₁₁₄*、Rluc-*vha68-1-A₁₁₄-N₄₀* レポーター mRNA の模式図。
 (E) Ago1-RISC による Rluc-*vha68-1-A₁₁₄-N₄₀* の翻訳抑制。Rluc/Fluc 値は miR-9b/miR-9b*二本鎖を加えていないときの値に対してノーマライズしている。Ago1-RISC による翻訳抑制に GW182 は必須ではない。
 (F) Ago1-RISC による mini-*vha68-1-A₁₁₄* の poly(A)鎖の分解。GW182 ノックダウンによって poly(A)鎖の分解は損なわれる。

3-3. GW182 非依存的な翻訳抑制は CCR4-NOT 複合体を必要としない

poly(A)鎖分解酵素複合体である CCR4-NOT 複合体は、miRNA による poly(A)鎖の分解に必須の役割を担う (Behm-Ansmant et al., 2006; Chen et al., 2009; Fabian et al., 2009; Piao et al., 2010)。興味深いことに、CCR4-NOT 複合体を直接 mRNA 上に係留させることで、自身の持つ poly(A)鎖分解活性とは独立して、翻訳抑制を引き起こすことが報告されている (Cooke et al., 2010)。このことから、CCR4-NOT 複合体がもつ翻訳抑制活性が miRNA 経路に関与することが示唆されている (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011)。そこで、CCR4-NOT 複合体の活性サブユニットである CAF1、および GW182 との相互作用に必須な足場タンパク質である NOT1 をノックダウンした S2 細胞から細胞質抽出液を調製し (図 3-5A)、解析を行った。その結果、CAF1、および NOT1 ノックダウンによって poly(A)鎖の分解が著しく阻害されたことから (図 3-5B)、これらの因子が Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解に必須であることが確かめられた。対照的に、Ago1-RISC による翻訳抑制は CAF1、および NOT1 ノックダウンでは損なわれなかったことから (図 3-5C)、CCR4-NOT 複合体は翻訳抑制には必須ではないことが示唆された。さらに、これらの因子を GW182 と同時にノックダウンした場合においても、翻訳抑制が解除されなかったことから (図 3-5A、C)、Ago1-RISC は GW182、および CCR4-NOT 複合体非依存的に翻訳抑制を引き起こしていることが考えられる。

ごく最近、マウス培養細胞において、ショウジョウバエ *Hyperplastic Disc (Hyd)* ホモログである EDD が、GW182 との相互作用を介して miRNA 経路に関与することが報告された (Su et al., 2011)。そこで HYD ノックダウンを行ったところ、GW182 の安定性が低下することが明らかとなった (図 3-6A)。その結果として、poly(A)鎖の分解が一部阻害されていたが (図 3-6B)、一方で翻訳抑制は損なわれなかったことから (図 3-6C)、HYD は Ago1-RISC による翻訳抑制に必須ではないことが示唆された。

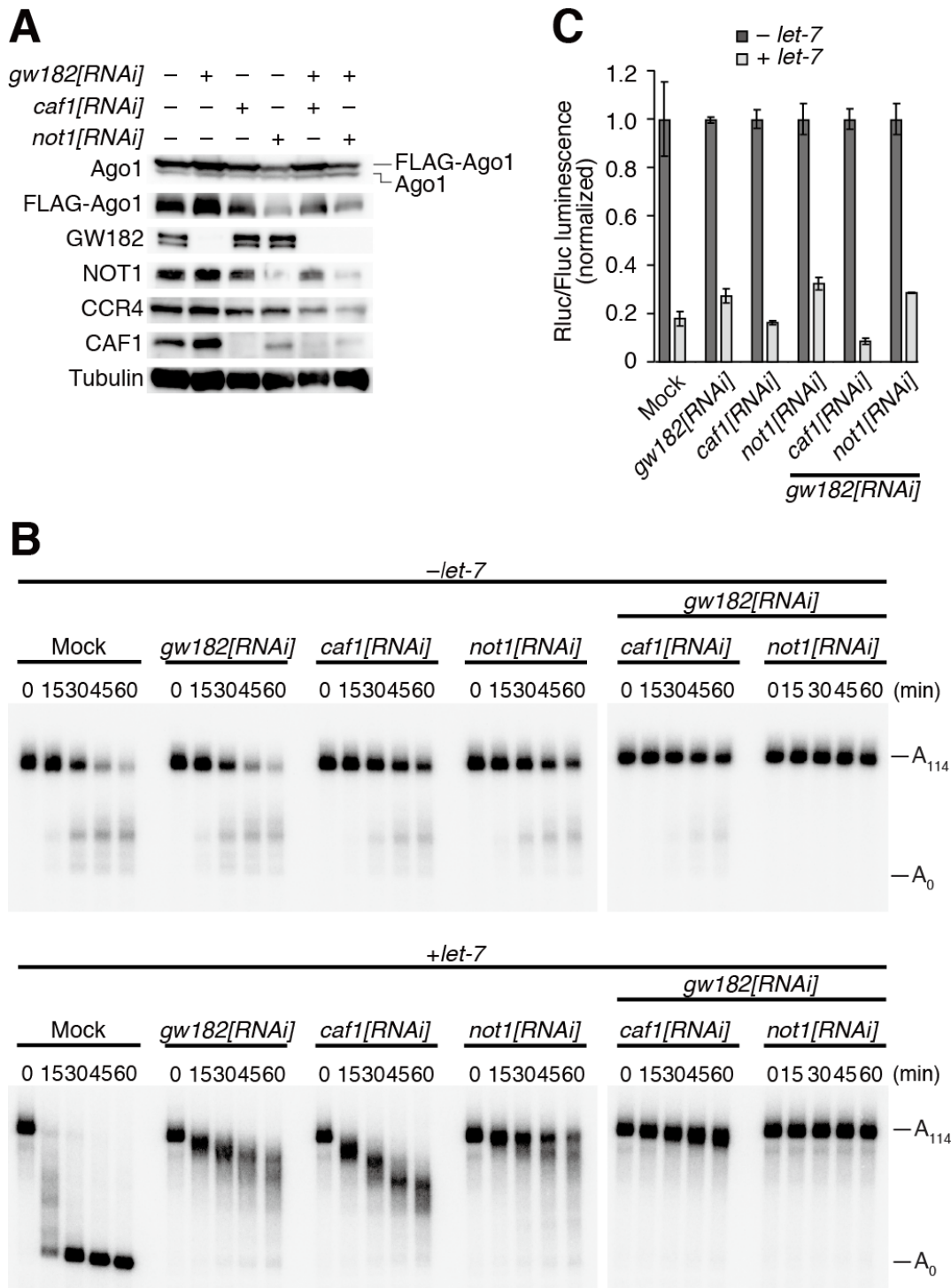


図 3-5. Ago1-RISC による翻訳抑制は CCR4-NOT 複合体非依存的である
 (A) RNA 干渉によって CAF1、NOT1、または GW182 ノックダウンを行った。すべてのサンプルで FLAG-Ago1 の過剰発現を行っている。Mock として GFP ノックダウンを行っている。
 (B) Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。CAF1、NOT1、および GW182 は poly(A)鎖の分解に必須である。
 (C) Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。CAF1、NOT1、および GW182 は Ago1-RISC による翻訳抑制に必須ではない。

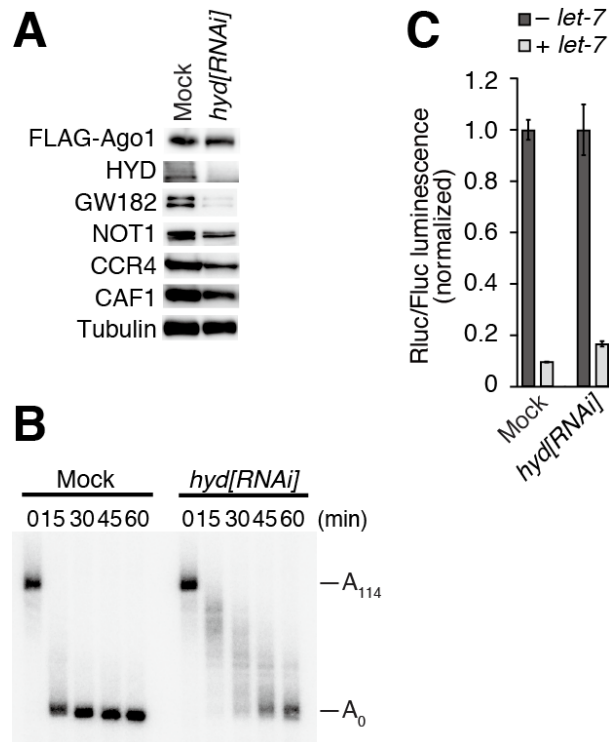


図 3-6. Ago1-RISC による翻訳抑制は HYD 非依存的である

(A) RNA 干渉によって HYD ノックダウンを行った。Mock として GFP ノックダウンを行っている。

(B) Ago1-RISC による mini-*let-7-A*₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。GW182 の発現量が低下することで、poly(A)鎖の分解活性が低下している。

(C) Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。HYD は Ago1-RISC による翻訳抑制に必須ではない。

3-4. Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳開始段階を阻害する

Ago1-RISC が翻訳過程のどの段階を阻害するのか明らかにするため、内側に閉じ込めた poly(A)鎖と、*let-7* 標的配列を持つ mRNA を設計し (sORF-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀; 図 3-7A)、シヨ糖密度勾配遠心法による解析を行った。RNA の長さが解析の分解能に大きく影響を与えるため (Gray and Hentze, 1994)、ORF を 186 塩基の短いものにしてある。シヨ糖密度勾配遠心法では、その密度勾配と遠心条件に応じて、mRNA 上の 48S、80S およびポリソームの形成を解析することが出来る (図 3-7B; 詳細は実験手法)。

リボソームの伸長を阻害する薬剤であるシクロヘキミドをあらかじめ作用させた S2 細胞抽出液と、放射性標識された標的 mRNA を混ぜ合わせ反応を行うことで、開始コドン上における 80S リボソームの形成を検出することが出来る (図 3-7C、中央)。そこへ、*let-7* を取り込ませた Ago1-RISC を作用させると、80S リボソームの形成が阻害されることから、Ago1-RISC は翻訳の開始段階を抑制していることが示唆された (図 3-7C、中央)。過去の解析から、miRNA が 60S リボソームの会合を阻害することで、80S リボソームの形成を妨げていることが示唆されている (Chendrimada et al., 2007; Wang et al., 2008)。理論的には、60S リボソームの会合阻害は、開始コドン上での 48S 複合体の蓄積を引き起こすはずであるが、今回そのような結果は得られなかった (図 3-7C、中央)。このことから、Ago1-RISC が 60S リボソームの会合阻害ではなく、それより以前の 48S 複合体の形成を阻害している可能性が考えられた。そこで、あらかじめ GMP-PMP によって 60S リボソームの会合を阻害して解析を行ったところ、予想通り Ago1-RISC は 48S 複合体の形成を妨げていた (図 3-7C、左)。以上の結果から Ago1-RISC が、標的 mRNA 上にリボソームが呼び込まれるまでの、ごく初期の翻訳開始段階を阻害していることが示唆された。

次に、放射性標識された標的 mRNA を S2 細胞抽出液と混ぜ合わせ、翻訳反応後にシクロヘキシミドを加えることで、ポリソームの形成を解析した。*let-7* 非存在下では複数のリボソームが mRNA 上に見られるのに対し、Ago1-RISC 作用時にはリボソームとは異なる巨大な RNP 複合体が形成される様子が観察された (図 3-7C、右)。このような RNP 複合体の形成は、eIF4E 阻害剤である m⁷GpppG や、

eIF4A 阻害剤であるヒプリスタノール (Bordeleau et al., 2006)を用いてリボソーム形成を阻害した際にもみられることから (図 3-8A,B)、過去に報告された pseudo-polysome と呼ばれる巨大 RNP 複合体と同一のものであると結論づけた (Thermann and Hentze, 2007; Moretti et al., 2010; Moretti et al., 2012)。興味深いことに、GW182 ノックダウンによって、pseudo-polysome の形成が阻害された (図 3-7D、右)。さらに、GW182 結合パートナーである PABP をノックダウンした際にも同様の結果が得られたことから (図 3-8C-E)、これらの因子が pseudo-polysome 構成因子であることが示された。一方で GW182、PABP 非存在下では 48S リボソームより軽い画分に新たな RNP 複合体 (以下、miRNP と呼ぶ)が検出された (図 3-7D、8E)。Ago1 ノックダウンによってその形成が阻害されることから (図 3-8F、G)、miRNP は標的 mRNA と Ago1 タンパク質を含む複合体であると考えられる。重要なことに、Ago1-RISC による 48S 複合体と 80S リボソームの形成阻害は、GW182 ノックダウンによる影響を受けなかった (図 3-7D)。つまり、Ago1-RISC は GW182 や pseudo-polysome の形成を介さずに、翻訳開始段階を阻害することが強く示唆された。

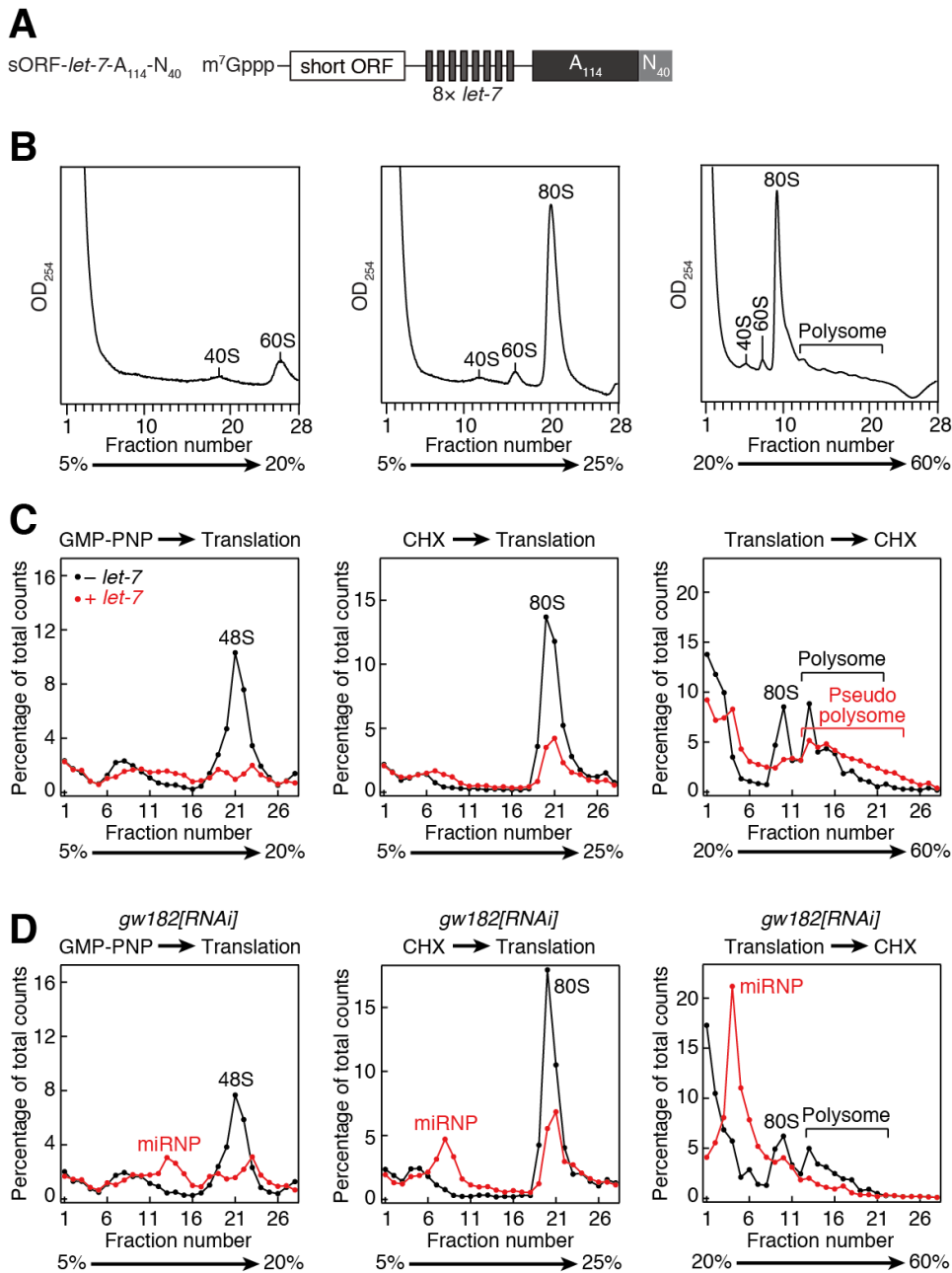


図 3-7. Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳開始段階を阻害する

(A) sORF-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。

(B) 48S (左)、80S (中央)、ポリソーム (右) 検出時における UV 254 nm の吸光度。

(C) sORF-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ のショ糖密度勾配遠心解析。黒線は *let-7*/*let-7**二本鎖非存在下、赤線は *let-7*/*let-7**二本鎖存在下における標的 mRNA の分布を示している。Ago1-RISC によって 48S (左)、および 80S (中央)の形成が阻害されている。また、Ago1-RISC は pseudo-polysome の形成を引き起こす (右)。

(D) GW182 ノックダウン下でのショ糖密度勾配遠心解析。GW182 非存在下においても Ago1-RISC は 48S (左)、および 80S (中央)の形成を阻害する。pseudo-polysome の形成は GW182 ノックダウンによって損なわれる (右)。

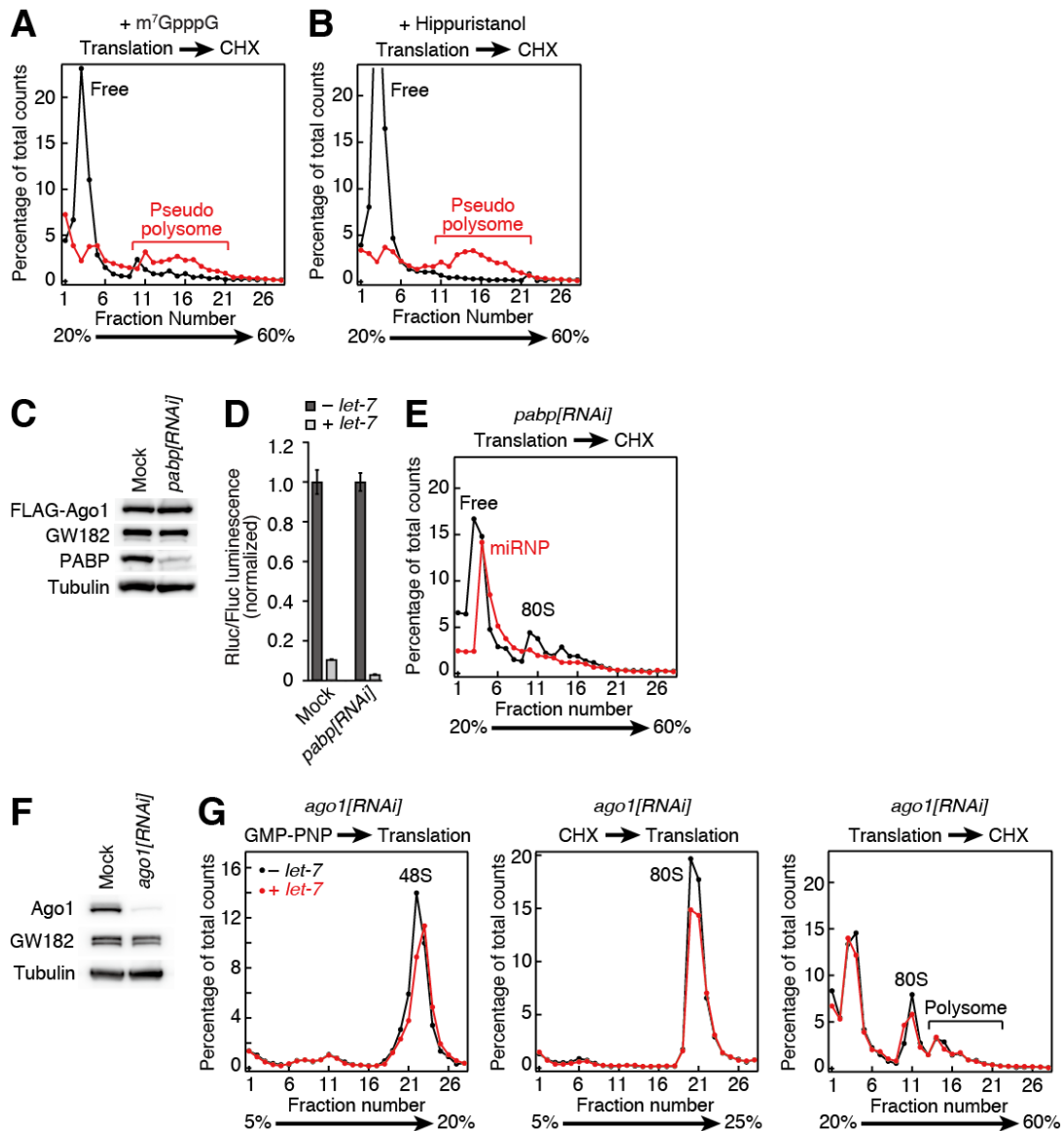


図 3-8. pseudo-polysome の形成は PABP 依存的である

(A, B) pseudo-polysome 形成は、(A) eIF4E 阻害剤である m^7GpppG や、(B) eIF4A 阻害剤であるヒプリスタノールによる影響を受けない。

(C) RNA 干渉によって PABP ノックダウンを行った。Mock として GFP に対する RNA 干渉を行っている。

(D) Ago1-RISC による Rluc-*let-7-A*_{114-N40} の翻訳抑制。PABP は Ago1-RISC による翻訳抑制に必須ではない。

(E) PABP は pseudo-polysome の形成に必要である。

(F) RNA 干渉によって内在性 Ago のノックダウンを行った。

(G) miRNP、および pseudo-polysome の形成には Ago1 が必須である。

3-5. Ago1-RISC は eIF4A 依存的な翻訳開始段階を阻害する

mRNA の 5' 末端にある m⁷Gcap 構造は、eIF4E と呼ばれる m⁷Gcap 結合タンパク質によって直接認識される。eIF4E は足場タンパク質である eIF4G と結合し、さらに DEAD-box RNA ヘリカーゼである eIF4A が eIF4G を介して呼び込まれる。eIF4G は 43S 複合体の構成因子である eIF3 と結合しており、RNA 上にリボソームを呼び込む役割を担う (Gingras et al., 1999)。過去に、eIF4G を直接 5'UTR に係留することで、eIF4E による m⁷Gcap 認識、および eIF4E-eIF4G 相互作用を介さずに翻訳が活性化されることが報告されている (De Gregorio et al., 1999)。そこで、MS2 配列を介して 5'UTR 上に任意のタンパク質を直接係留可能な特殊なレポーター mRNA を構築した (Acap-Loop-MS2-Rluc-A₁₁₄-N₄₀; 図 3-9A)。この mRNA は 5' 末端に Acap と呼ばれる非天然型の cap 構造をもつため、eIF4E による認識をそもそも受けない。さらに、その直下に強力なステムループ構造が存在するため、通常の状態では翻訳反応がほぼ完全に排除されている。そこへ、MS2-eIF4G を人工的に作用させることで翻訳を活性化することに成功した (図 3-9B,C)。MS2-eIF4G によって活性化された翻訳は、m⁷GpppG の影響を受けないのに対し (図 3-9D)、ヒプリスタノールによって阻害されることから (図 3-9E)、eIF4E 非依存的・eIF4A 依存的であることが確かめられた。興味深いことに、Ago1-RISC はこのような特殊な標的 mRNA であっても、翻訳抑制を引き起こした (図 3-9F,G)。つまり Ago1-RISC は、eIF4E による m⁷Gcap 構造の認識と、eIF4E-eIF4G 相互作用よりも下流の段階を阻害していることが示唆された。

eIF4A の RNA ヘリカーゼ活性は、リボソームが mRNA 上に呼び込まれる過程に必須であることが知られている (Pause et al., 1994; Morino et al., 2000)。そこで、eIF4A を必要としない特殊な翻訳が Ago1-RISC による翻訳抑制を受けるのか検証するため、*reaper* と呼ばれるアポトーシス誘導遺伝子の 5'UTR を持つレポーター mRNA を設計した (Acap-*reaper*-Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀; 図 3-10A)。*reaper* 5'UTR は eIF4A 非依存的に翻訳を促進することが過去に報告されている (Hernandez et al., 2004; Iwasaki et al., 2009)。実際に、eIF4A 阻害剤であるヒプリスタノール存在下でも、*reaper* 5'UTR を介した翻訳は損なわれなかった (図 3-10B)。次に、eIF4A 非依存的な翻訳を純粹に解析するため、ヒプリスタノール存在

下で Ago1-RISC による翻訳抑制を解析した。その結果、eIF4A 非依存的な翻訳は、Ago1-RISC による抑制をほぼ完全に免れていた (図 3-10C)。以上の結果は、Ago1-RISC が eIF4A 依存的な翻訳開始段階を阻害していることを示唆している。

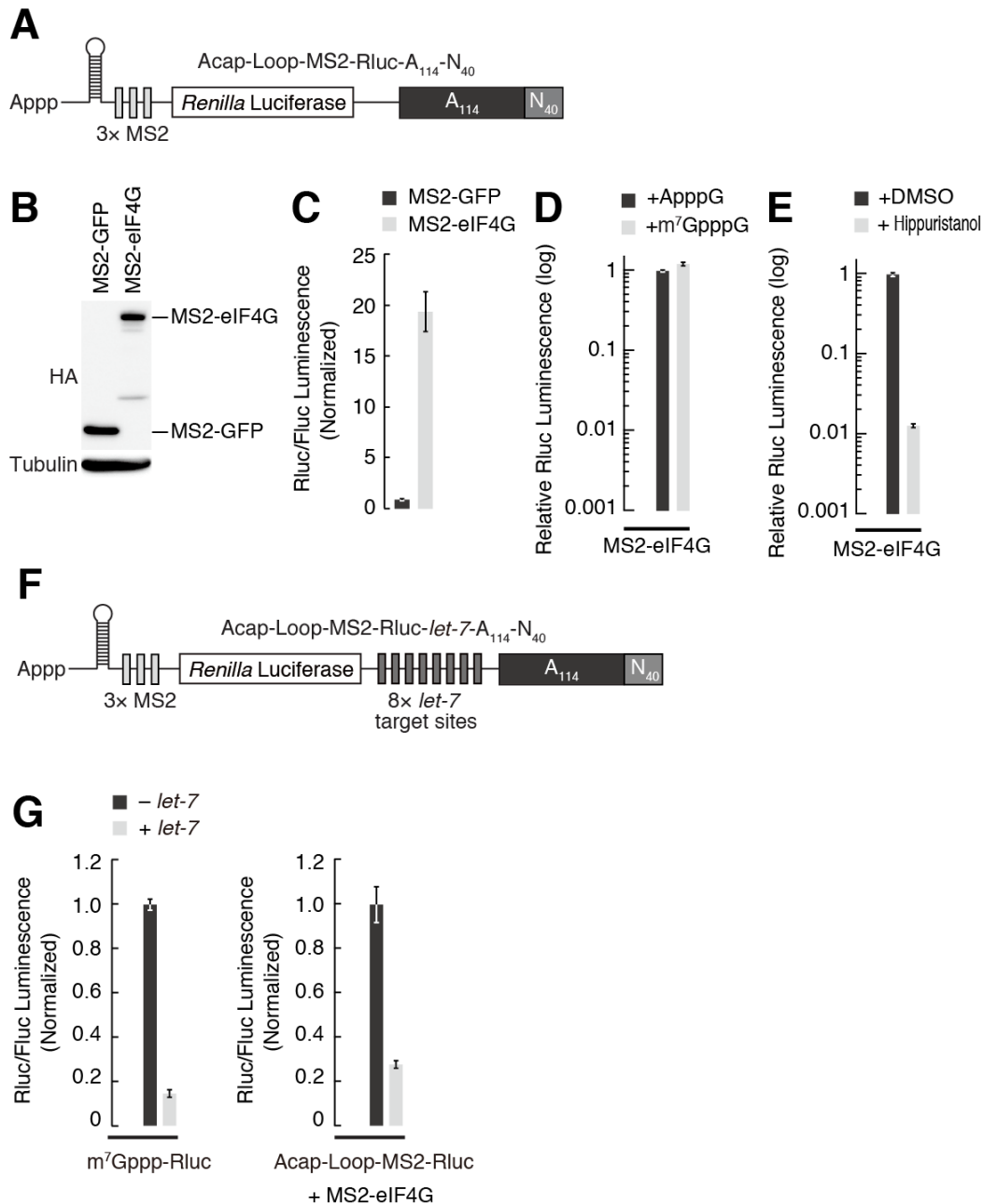


図 3-9. Ago1-RISC は eIF4E 非依存的な特殊な翻訳を抑制する

(A) Acap-Loop-MS2-Rluc-A₁₁₄-N₄₀ レポーター-mRNA の模式図。

(B) S2 細胞内で MS2-GFP、MS2-eIF4G を発現させた。

(C) MS2-eIF4G を発現する S2 細胞抽出液における Acap-Loop-MS2-Rluc-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳活性。Rluc/Fluc 値は MS2-GFP を作用させたときの値に対してノーマライズしている。MS2-eIF4G は翻訳を20倍程度活性化する。

(D) eIF4E 阻害剤である m⁷GpppG は、MS2-eIF4G を介した Acap-Loop-MS2-Rluc-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳には影響を与えない。

(E) eIF4E 阻害剤であるヒプリスタノールは、MS2-eIF4G を介した Acap-Loop-MS2-Rluc-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳を阻害する。

(F) Acap-Loop-MS2-Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ レポーター-mRNA の模式図。

(G) Ago1-RISC は、MS2-eIF4G を介した Acap-Loop-MS2-Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳を抑制する。

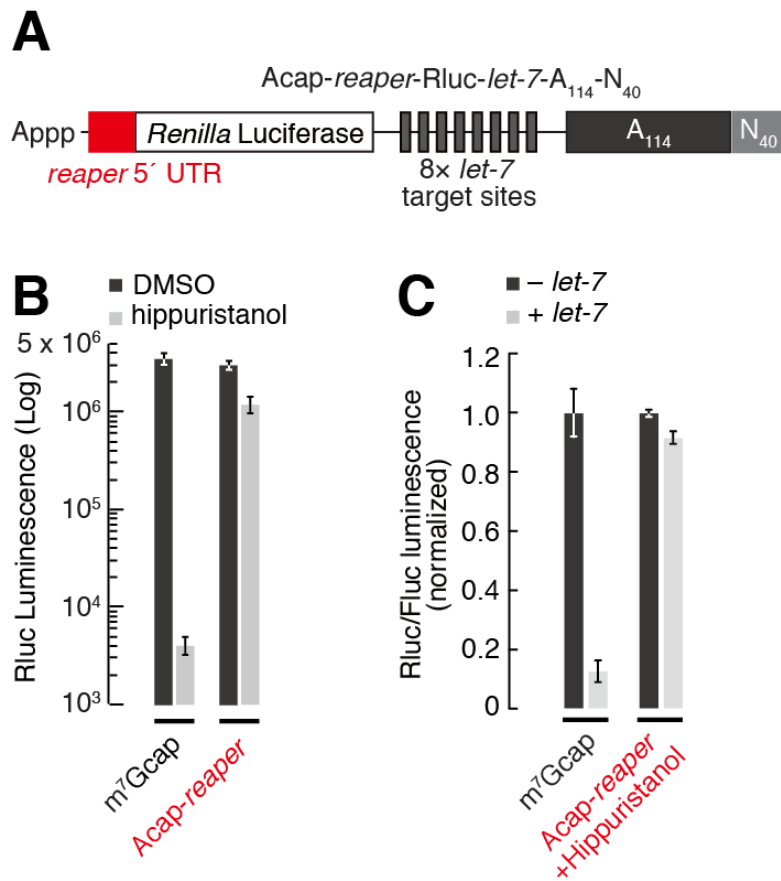


図 3-10. Ago1-RISC は eIF4A 非依存的な特殊な翻訳を抑制できない
 (A) Acap-reaper-Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ レポーター-mRNA の模式図。
 (B) Acap-reaper-Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳は、eIF4A 阻害剤であるヒプリスタノールによって損なわれない。
 (C) Ago1-RISC は Acap-reaper-Rluc-let-7-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳を抑制できない。

3-6. GW182ΔC(1-592)は GW182 非依存的な翻訳抑制を阻害する

今回の解析によって、GW182 非依存的な翻訳抑制経路の存在が強く示唆された。しかしその一方で、Ago1 結合領域と UBA ドメインの一部からなる GW182 の N 末端断片、GW182ΔC(1-592)が Ago1-RISC による翻訳抑制を阻害することが知られている (Eulalio et al., 2008; Iwasaki et al., 2009; Takimoto et al., 2009; Moretti et al., 2010; Fukaya and Tomari, 2011)。そこで、GW182 をノックダウンした S2 細胞抽出液に対して GW182ΔC(1-592)を作用させた。興味深いことに、Ago1-RISC による GW182 非依存的な翻訳抑制は、GW182ΔC(1-592)によって阻害された (図 3-11A)。さらに GW182ΔC(1-592)は、Ago1-RISC による 48S 複合体と 80S リボソームの形成抑制も阻害していた (図 3-11B)。ではどのようにして GW182ΔC(1-592)は、GW182 非依存的な翻訳抑制を阻害するのであろうか。もちろん、ノックダウンで内在の GW182 が完全に除去されていない可能性も否定できない。しかし、GW182 ノックダウンによって poly(A)鎖の分解が完全に阻害されていることを考えると (図 3-3C)、その可能性は低いと考えられる。GW182 が N 末端の GW モチーフを介して、Ago1 のトリプトファンポケットへ結合していることから (Till et al., 2007; Schirle and MacRae, 2012)、GW182 とは異なる第三の抑制因子が同じ結合様式で Ago1 に結合している可能性が考えられる。あるいは、GW182ΔC(1-592)が Ago1 に結合することで、第三の因子に対する結合領域がアロステリックに阻害されている可能性も考えられる。しかし現時点では、GW182 非依存的な翻訳抑制がどの因子によって担われているのか不明であり、この点を明らかにするためには今後の更なる解析が必要である。少なくとも、GW182ΔC(1-592)による脱抑制効果を報告したこれまでの解析結果は (Eulalio et al., 2008; Iwasaki et al., 2009; Takimoto et al., 2009; Moretti et al., 2010; Fukaya and Tomari, 2011)、必ずしも GW182 自身の翻訳抑制に対する寄与を意味しているわけではないと考えられる。

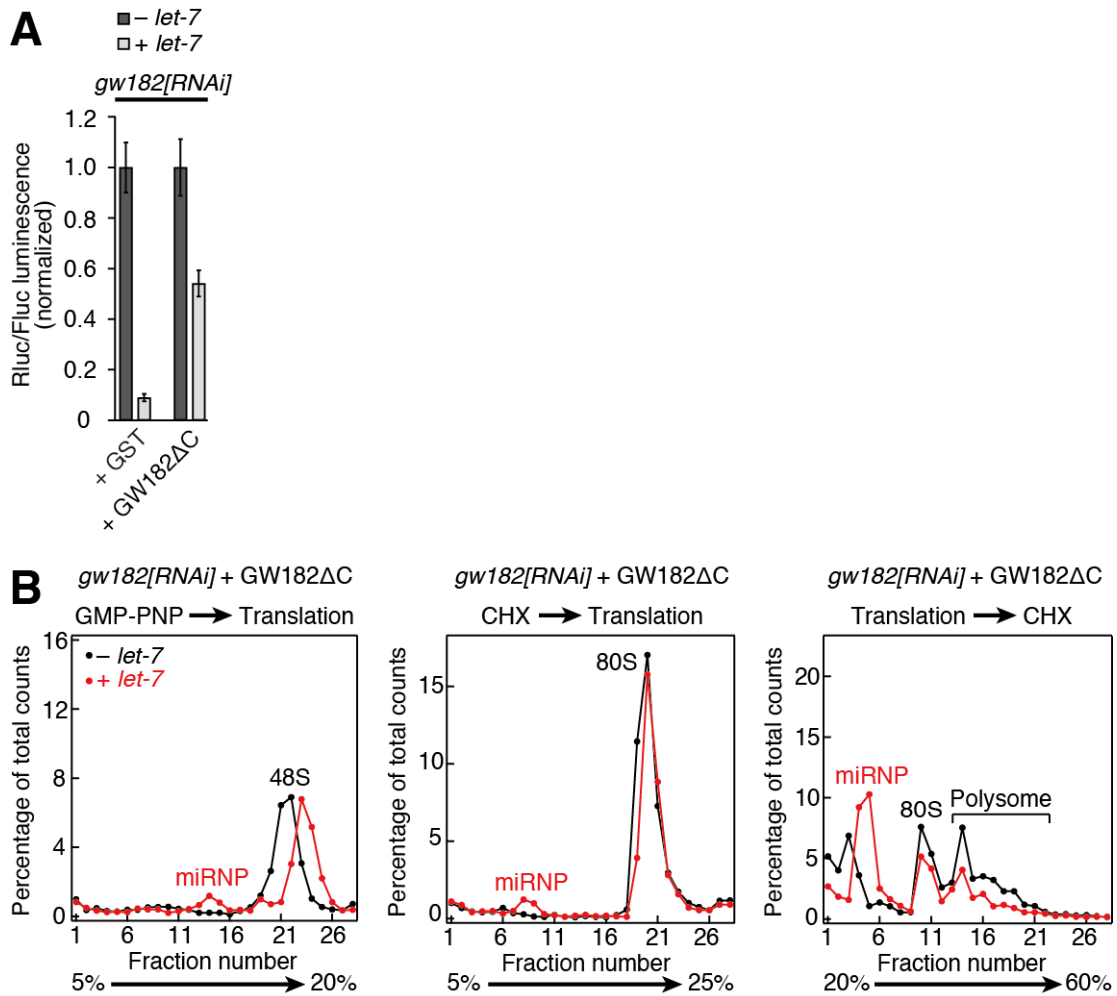


図 3-11. GW182ΔC(1-592)は GW182 非依存的な翻訳抑制を阻害する

(A) Ago1-RISC による GW182 非依存的な翻訳抑制は、GW182ΔC(1-592)によって阻害される。

(B) Ago1-RISC による GW182 非依存的な翻訳開始段階の阻害は、GW182ΔC(1-592)によって損なわれる。

3-7. GW182 は Ago1 非依存的に poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こす

Ago1 や miRNA を介さずに、GW182 を直接 RNA 上に係留することで、poly(A)鎖の分解と翻訳抑制が誘導されることが知られている (Behm-Ansmant et al., 2006)。そこで λ N-GW182 を発現させた S2 細胞抽出液を調製し、BoxB 配列をもつレポーターRNA を混ぜ合わせて解析を行った (図 3-12A,B)。その結果、GW182 は poly(A)鎖の分解と、それとは独立した純粋な翻訳抑制を引き起こした (図 3-12C,D)。内在に存在する Ago1 を抽出液中から除去しても、いずれの活性も損なわれなかったことから (図 3-12B-D)、GW182 は Ago1 非依存的に poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こしていることが示唆された。

近年、poly(A)鎖を持たないレポーターmRNA に対する GW182 依存的な翻訳抑制が、NOT1 ノックダウンによって一部解除されることが示された (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011)。このことから、CCR4-NOT 複合体が poly(A)鎖を分解する活性とは独立に、翻訳抑制にも寄与するというモデルが提唱されている (Hafner et al., 2011)。そこで、実際に NOT1 をノックダウンして解析を行ったところ (図 3-13A)、poly(A)鎖の分解だけではなく (図 3-13B)、翻訳抑制が一部解除される様子がみられた (図 3-13C)。しかしこのとき、 λ N-GW182 そのものの発現量が減少しており (図 3-13A)、NOT1 ノックダウンによる脱抑制がどのような因果関係によるものかを正確に解釈することは不可能である。CCR4-NOT 複合体が翻訳抑制に寄与することを示した過去の報告では、NOT1 ノックダウンによる λ N-GW182 発現量の変動を示しておらず、その結果については慎重に解釈する必要がある (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011)。一方で、CCR4-NOT 複合体の活性サブユニットである CAF1 のノックダウンは、 λ N-GW182 の発現量には影響を与えなかった (図 3-14A)。このとき、GW182 を介した poly(A)の分解が顕著に阻害されていたが (図 3-14B)、翻訳抑制は影響を受けなかった (図 3-14C)。このことから、CCR4-NOT 複合体の活性サブユニットである CAF1 は、GW182 を介した翻訳抑制に必須ではないことが考えられる。

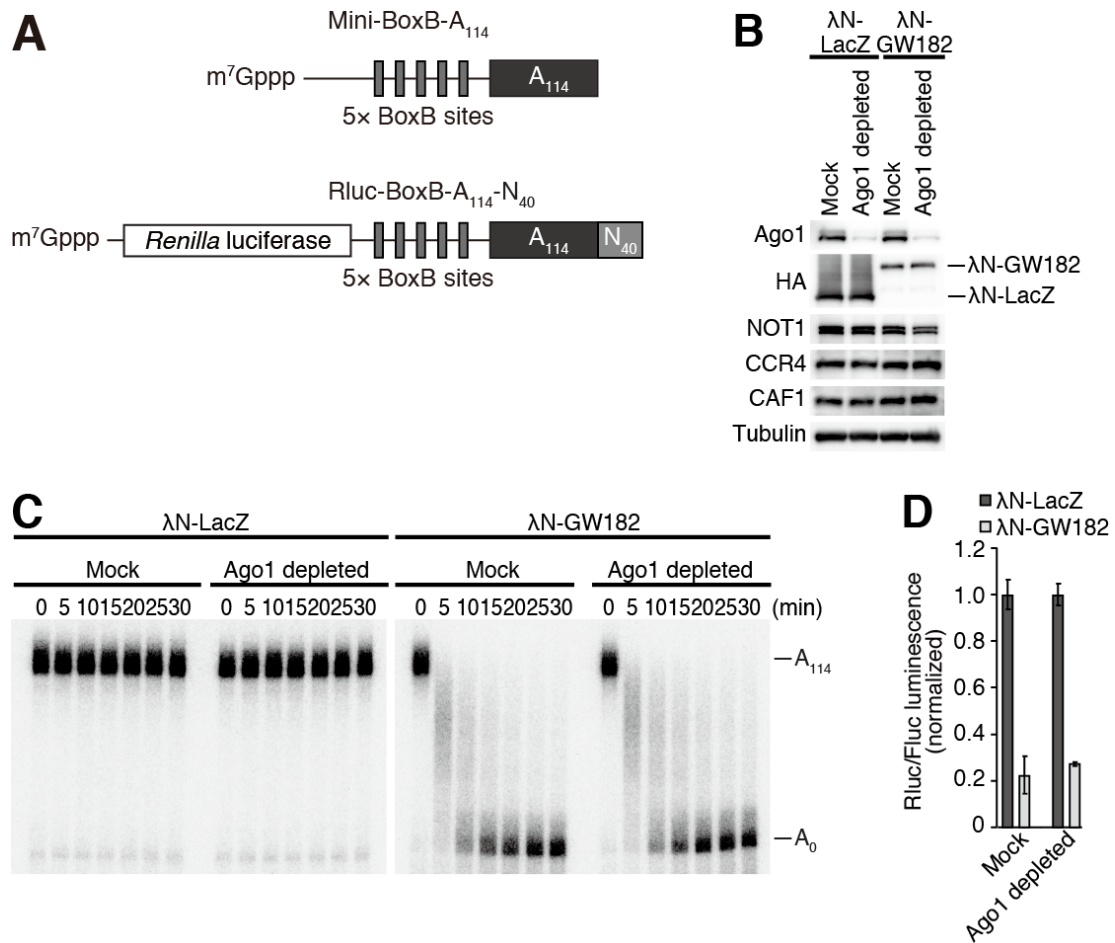


図 3-12. GW182 は Ago1 非依存的に翻訳抑制を引き起こす

(A) mini-BoxB-A₁₁₄、Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。

(B) ウェスタンブロッティングによって(C、D)に用いた細胞抽出液を解析した。

(C) GW182 による mini-BoxB-A₁₁₄ の poly(A)鎖の分解。内在性 Ago1 の除去は poly(A)鎖の分解を阻害しない。

(D) GW182 による Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。内在性 Ago1 の除去は GW182 を介した翻訳抑制を阻害しない。

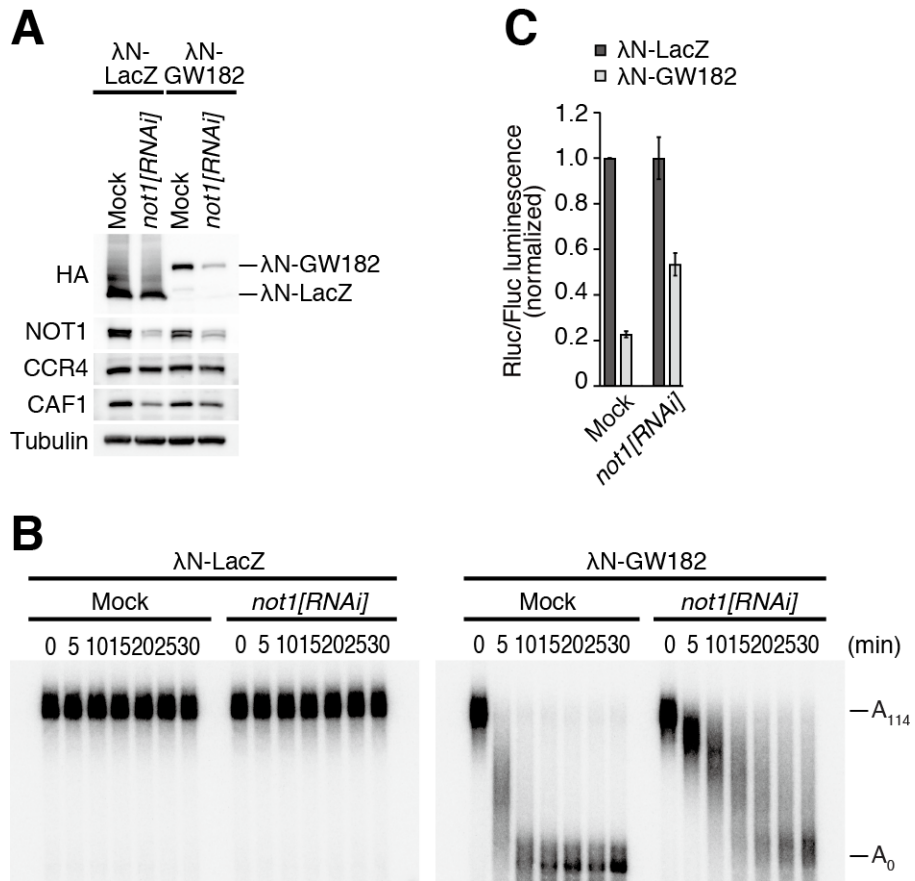


図 3-13. NOT1 ノックダウンによって λN-GW182 の発現量が低下する
 (A) NOT1 ノックダウンによって λN-GW182 の発現量が著しく低下する。
 (B) GW182 による mini-BoxB-A₁₁₄ の poly(A) 鎖の分解活性は NOT1 ノックダウンによって阻害される。
 (C) GW182 による Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制は NOT1 ノックダウンによって一部解除される。

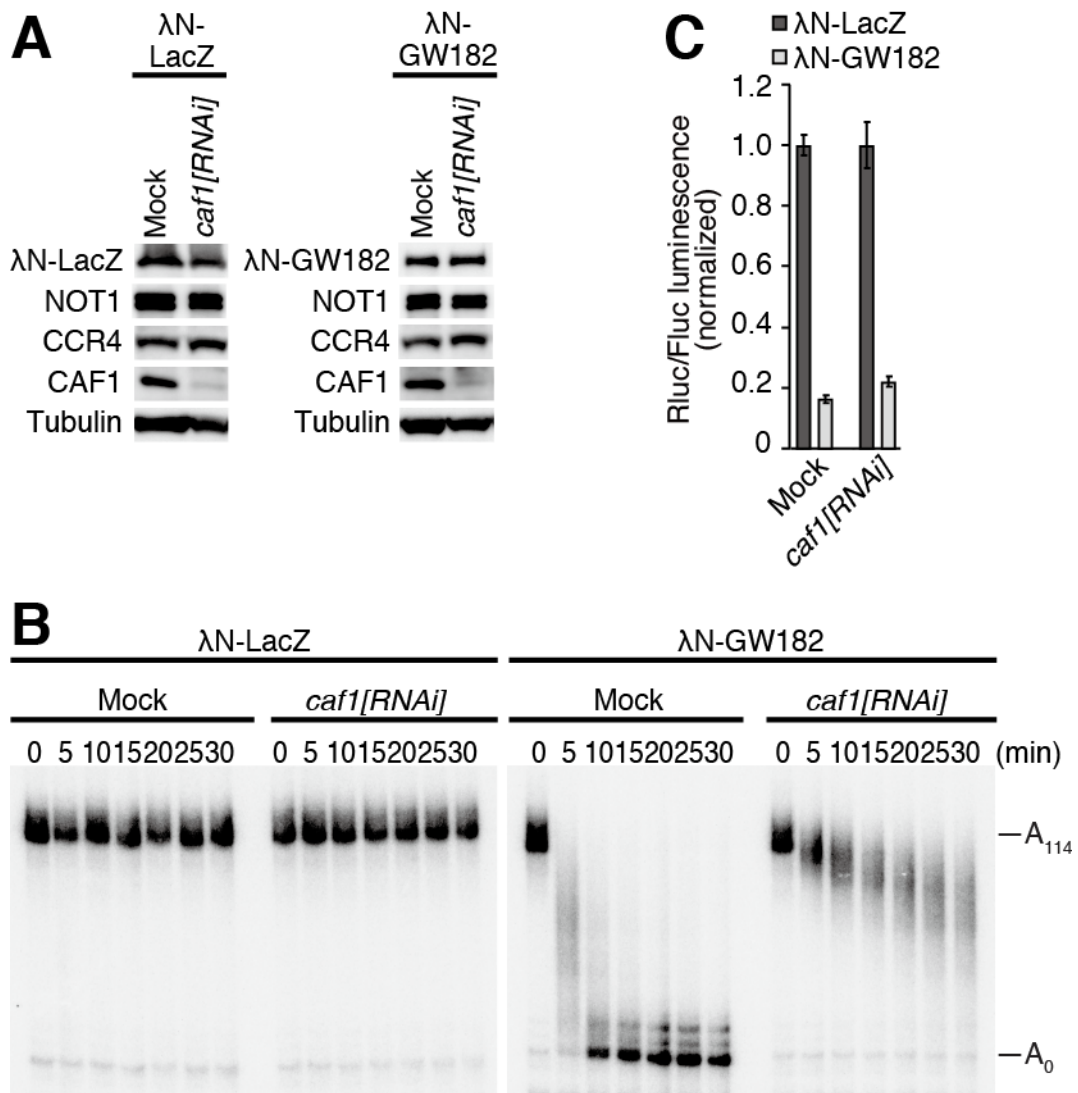


図 3-14. GW182 による翻訳抑制は CAF1 非依存的である

(A) CAF1 ノックダウンは λN-GW182 の発現量そのものには影響を与えない。

(B) GW182 による mini-BoxB-A₁₁₄ の poly(A) 鎖の分解は CAF1 ノックダウンによって阻害される。

(C) GW182 による Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制は CAF1 ノックダウンによる影響を受けない。

3-8. GW182 は翻訳開始段階を阻害する

GW182 を介した翻訳抑制が、タンパク質合成のどの段階を阻害するのか解析するため、シヨ糖密度勾配遠心法による解析を行った。そこで、BoxB 配列をもつレポーター mRNA と (sORF-BoxB-A₁₁₄-N₄₀; 図 3-15A)、その比較として BoxB 配列を除いたレポーター mRNA を設計した (sORF-A₁₁₄-N₄₀; 図 3-15A)。解析の結果、GW182 が 48S 複合体と 80S リボソームの形成阻害を引き起こすことが明らかとなった (図 3-15B)。このことから、GW182 が翻訳開始段階を阻害していることが考えられる。さらに、GW182 はポリソーム領域に pseudo-polysome の形成を引き起こしていた (図 3-15B、右)。この結果は、GW182 が pseudo-polysome の構成因子であるという先ほどの解析結果 (図 3-7D) に一致している。

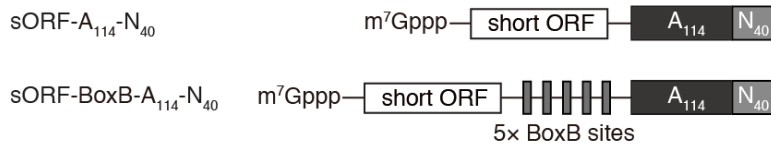
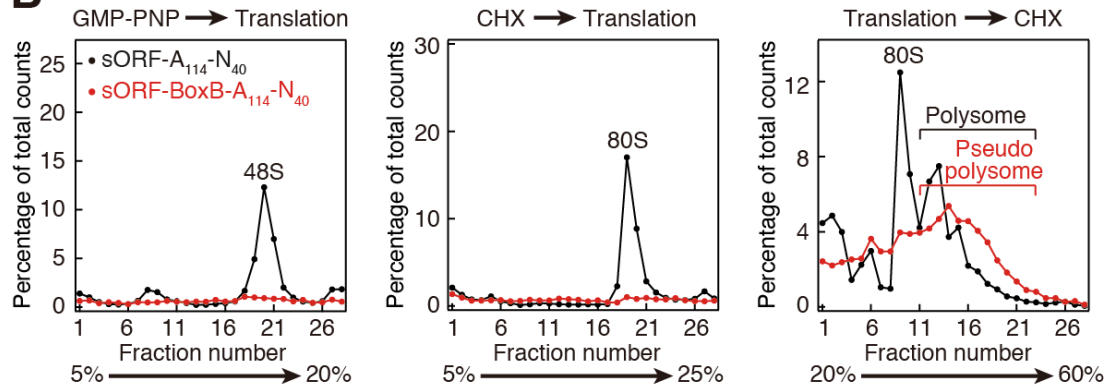
A**B**

図 3-15. GW182 は翻訳開始段階の阻害を引き起こす

(A) sORF-A₁₁₄-N₄₀、sORF-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ レポーター-mRNA の模式図。

(B) sORF-A₁₁₄-N₄₀ (黒線)、sORF-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ (黒線)のシヨ糖密度勾配遠心解析。GW182 は 48S (左)、および 80S (中央)の形成を阻害するとともに、pseudo-polysome の形成を引き起こした (右)。

3-9. 考察

これまで、miRNA による翻訳抑制と poly(A)鎖の分解において GW182 が必須の役割を担っていると考えられてきた。しかし今回、翻訳抑制と poly(A)鎖の分解を切り分けて解析できる独自の実験系を駆使することによって、poly(A)鎖の分解には GW182 が必須であるのに対し、翻訳抑制は GW182 依存的、非依存的に起こることが明らかとなった。このように miRNA による遺伝子発現制御には、少なくとも三つの異なる抑制経路が存在していることが分かった (図 3-16)。これらの複数の抑制経路は互いに影響を及ぼし合うことが考えられるが、今回の解析結果は本質的には各経路がそれ自身として独立して作用することを示している。一方で、最終的な抑制作用に対する各抑制経路の寄与の度合いは、生物種や細胞種、あるいは 3'UTR の配列などによって異なる可能性も考えられる。実際 Izaurralde らは、S2 細胞において、3'UTR 配列の異なるレポーター mRNA 間で、GW182 ノックダウンによる脱抑制の程度が異なることを報告している (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2008; Eulalio et al., 2009b)。つまり、標的配列のコンテキストや、3'UTR に結合する RNA 結合タンパク質の有無によって GW182 に対する依存度が異なる可能性が考えられる。この考えに一致して、Duchaine らは、線虫初期胚抽出液を用いた試験管内再構成系において、poly(A)鎖の分解と翻訳抑制のパターンが 3'UTR の配列によって大きく異なることを示した (Wu et al., 2010)。近年のゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、ヒトにおけるキネティクス解析から、miRNA は poly(A)鎖の分解や標的 mRNA の不安定化より以前に、それとは独立した翻訳抑制を引き起こしていることが明らかとなった (Bazzini et al., 2012; Bethune et al., 2012; Djuranovic et al., 2012)。一方で、Ago タンパク質、GW182、あるいは poly(A)鎖分解酵素の発現レベルが組織間で異なることを考えると、poly(A)鎖の分解と翻訳抑制のキネティクスや寄与の程度は、用いる解析系によって変動する可能性もある。生体内において各抑制経路どのように miRNA の働きに貢献しているのかは、今後のさらなる解析が必要である。今回、複数の抑制経路の存在が明らかとなったことで、過去の一見相反する実験結果を紐解いて理解することが可能になると期待される。

miRNA が阻害する翻訳段階を明らかにする上で、シヨ糖密度勾配遠心法による解析は非常に有効な手法であった。しかし miRNA が、翻訳抑制だけではなく poly(A)鎖の分解を引き起こすことや、pseudo-polysome のような巨大 RNP 複合体の形成を誘導するために、その実験結果の正確な解釈は困難であった。今回の解析では、これらの複雑な miRNA の働きのうち“翻訳抑制”のみを純粹に切り分けることで、miRNA が poly(A)鎖の分解や pseudo-polysome の形成とは独立して、翻訳開始段階を阻害していることを初めて明らかにした。poly(A)鎖の分解が mRNA の closed-loop 構造形成を阻害することを考えると、miRNA はさらに複雑に翻訳開始段階を抑制していることが考えられる。より詳細なメカニズムを解き明かすためには、今後のより詳細な解析が必要である。

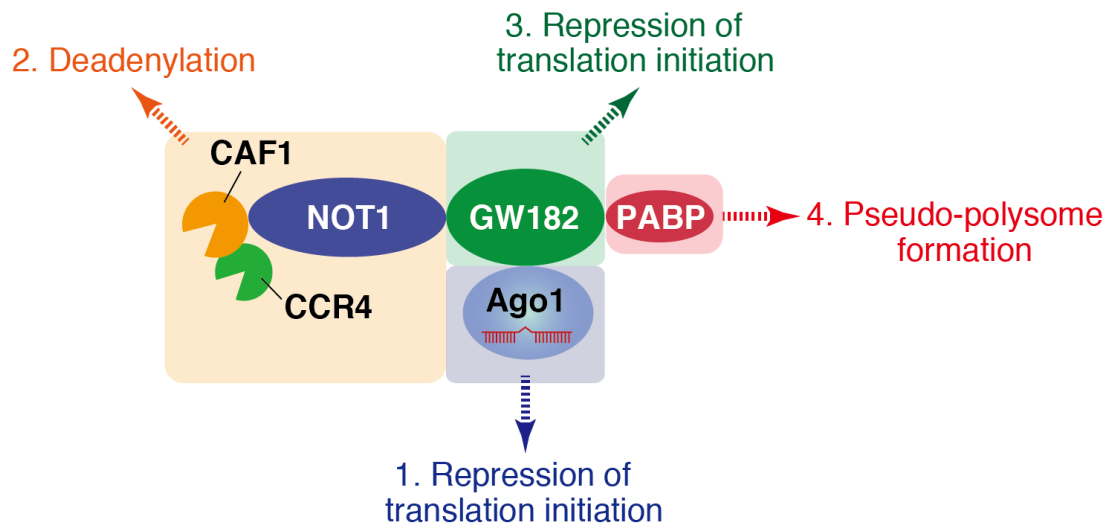


図 3-16. miRNA は異なる複数の経路を介して遺伝子発現を抑制する

Ago1-RISC は GW182 非依存的に翻訳開始段階を阻害する (1)。Ago1-RISC へ呼び込まれた GW182 は CCR4-NOT 複合体を介して標的 mRNA の poly(A)鎖の分解を引き起こすとともに (2)、翻訳開始段階を阻害する (3)。さらに GW182 は、PABP 依存的に pseudo-polysome の形成を引き起こす (4)。各抑制経路の相対的な寄与は実験系や生物種によって異なることが考えられる。

実験手法

Buffer 組成

1x hypotonic lysis buffer

10 mM Hepes-KOH pH7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂

プラスミドの作製

pUC57-Rluc-*vha68-1*-A₁₁₄

vha68-1 mRNA の 3'UTR 配列は、ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGC TCG AGG CGG AAA CGG ACA GAA ACC A-3') と (5'-CCC CCG CGG CCG CTT TGT AAC ATT CAT AAT ACA-3') によって増幅し、pUC57-Rluc-*let-7*-A₁₁₄ の XhoI、NotI 切断部位間に挿入した。

pAWH-Rluc-*let-7*-poly(A)

Rluc-*let-7* 配列は、psiCHECK2-*let-7* 8x (Iwasaki et al., 2009) を鋳型としてプライマー (5'-CAC CAT GGC TTC CAA GGT GTA CGA-3') と (5'-GTC CGA AGA CTC ATT TAG ATC CT-3') を用いて増幅した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へクローニングし、LR clonase (Invitrogen) によって pAWH vector (The *Drosophila* Gateway Vector Collection) へ組み替えた。

pAWH-Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀-HhR

Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀-HhR 配列は、pUC57-Rluc-*let-7*-A₁₁₄ (Fukaya and Tomari, 2011) を鋳型として、プライマー (5'-CAC CAT GGC TTC CAA GGT GTA CGA C-3') と (5'-CCT GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG ACC GGA AAA CAC ATC CGG TGA CAG GAA GCT TAA ACC GAG AGG AGA-3') を用いて増幅した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へクローニングし、LR clonase (Invitrogen) によって pAWH vector (The *Drosophila* Gateway Vector Collection) へ組み替えた。

pAWH-Rluc-*vha68-1*-poly(A)

vha68-1 mRNA の 3'UTR 配列は、ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-TAG GCG ATC GCT CGA GCG GAA ACG GAC AGA AAC CA-3') と (5'-AAG CTG GGT CGG CGC TTT GTA ACA TTC ATA ATA CA-3') を用いて増幅し、In-fusion HD (Clontech) によって pAWH-Rluc-*let-7*-poly(A) の XhoI、AclI 切断部位間に挿入した。

pAWH-Rluc-*vha68-1*-A₁₁₄-N₄₀-HhR

vha68-1 mRNA の 3'UTR 配列は、ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-GGG GGC TCG AGG CGG AAA CGG ACA GAA ACC A-3') と (5'-CCC CCC TGC AGT TTG TAA CAT TCA TAA TAC A-3') を用いて増幅し、pAWH-Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀-HhR の XhoI、PstI 切断部位間に挿入した。

pAWH-Fluc

Fluc 配列は psiCHECK2 (Promega) を鋳型として、プライマー (5'-CAC CAT GGC CGA TGC TAA GAA CAT-3') と (5'-TTA CAC GGC GAT CTT GCC GC-3') を用いて増幅した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へクローニングし、LR clonase (Invitrogen) によって pAWH vector (The *Drosophila* Gateway Vector Collection) へ組み替えた。

pASW-pri-*let-7*

DNA 断片 (5'-CAC CCC TTT TTC TCT CTG GCA AAT TGA GGT AGT AGG TTG TAT AGT AGT AAT TAC ACA TCA TAC-3') と (5'-CGG CTT GTA GTC AAG CAA AGA AAG CTA GCA CAT TGT ATA GTA TGA TGT GTA ATT ACT ACT-3') をアニーリングし、PCR によって平滑末端化した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へクローニングし、LR clonase (Invitrogen) によって pASW vector (Iwasaki et al., 2010) へ組み替えた。

pASW-pri-miR-9b

DNA 断片 (5'-CAC CAT TAT TCT TAA ATT TGT TTA ACT TAT ATG TTG CTC

TTT TGT TTG CAT ATT ATT TGC TCT TTG GTG ATT TTA GCT GTA TGG TGT
TTA TGT ATA TTC-3') と (5'-AGA AAA GTA AAG AAT ACC AAA TAA AAT CAA
CTC AAA CAT AAT GCA GAA ACC ATT TGG TTT TTG GTA ATA AAG CTC
TAT GGA ATA TAC ATA AAC AC-3') をアニーリングし、PCR によって平滑末端化
した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen)へクローニングし、LR clonase
(Invitrogen)によって pASW vector (Iwasaki et al., 2010)へ組み替えた。

pUC57-sORF-*let-7-A*₁₁₄ and pUC57-sORF-A₁₁₄

Renilla luciferase に由来する short ORF は、psiCHECK2 (Promega)を鋳型とし
てプライマー (5'-ATT CGA GCT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GTC GCC ACC
ACC ATG GCT ATG TTC ATC GAG TCC GAC CC-3') と (5'-TAT AGT CTC GAG
CGA TCG CCT AGA ATT ACT GC-3')を用いて増幅した。PCR 断片は pUC57-
mini-*let-7-A*₁₁₄、または pUC57-A₁₁₄ (Fukaya and Tomari, 2011)の SacI、XhoI
切断部位間に挿入した。

pUC57-sORF-BoxB-A₁₁₄

5ヶ所の BoxB 配列を含む DNA 断片は pAC5.1 Fluc-BoxB-5x (Chekulaeva et
al., 2009)を鋳型として、プライマー (5'-GGG GGC TCG AGT TCC CTA AGT CCA
ACT ACC A-3') と (5'-CCC CCG CGG CCG CAT AAT ATC CTC GAT AGG GCC-
3')を用いて増幅し、pUC57-sORF-*let-7-A*₁₁₄ の XhoI、NotI 切断部位間に挿入し
た。

pUC57-Loop-MS2-Rluc-*let-7-A*₁₁₄

DNA 断片 (5'-GGG GGG CTA GCC TCT TCC GAG GGC GTC AAA TAA AGG
TAA GGT CGA AGC GCC TAG GCC GGA GCG CCC AGA TAT GGG CGC TCC
GGC CTA GGC CTA AGT CCA ACT ACC-3') と (5'-CCC CCC CAT GGA CGA
GGA ATC CCC CGA CAT GGG TGA TCC TCA TGT TTT ATA TCG ACA TGG
GTG ATC CTC ATG TTT TAT ATC GAC ATG GGT GAT CCT CAT GTT TGG TAG
TTG GAC TTA G-3') をアニーリングし、PCR によって平滑末端化した。PCR 断片
は pUC57-Rluc-*let-7-A*₁₁₄ の NheI、NcoI 切断部位間に挿入した。

pUC57-*reaper*-Rluc-*let-7-A*₁₁₄

reaper mRNA の 5'UTR 配列はショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型として、プライマー (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGT GAA TAA GAG AGA CAC CAG A-3') と (5'-CCC CCC CAT GGT GTT GGT TTA TCT TTC TTC T-3') を用いて増幅し、pUC57-Rluc-*let-7-A*₁₁₄ の *Sac*I、*Nco*I 切断部位間に挿入した。

pAMHW

MS2 配列は pCS2-HA- λ N-MS2-globin 3'UTR (三嶋雄一郎博士より分与頂いた) を鋳型として (5'-ACC CCG GAT CCA GAT ATC GAG GCC TGT CTA GAG AAG CTC CGC CAC CAT GGC TTC TAA CTT TAC TCA-3') と (5'-GAT GCG GCC TCC ACC GCG GTG GAG ATC CAT AGC CAT CAA GCT TGG AGG AGA TCC ACC GGT AGA TGC CGG AGT TGG CCG-3') を用いて増幅し、Infusion HD (Clontech) によって pAHW (The *Drosophila* Gateway Vector Collection) の *Eco*RV、*Sac*II 切断部位間に挿入した。

pAMHW-eIF4G

eIF4G 遺伝子は ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA を鋳型として、プライマー (5'-CAC CAT GCA ACA GGC TAT ACC AAC-3') と (5'-TTA GTT GGC ATC ATC GT TTA-3') によって増幅した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へクローニングし、LR clonase (Invitrogen) によって pAMHW vector へ組み替えた。

pAMHW-GFP

gfp 遺伝子は pCAG-EGFP を鋳型として、プライマー (5'-CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT-3') と (5'-TTA CTT GTA CAG CTC GTC CA-3') によって増幅した。PCR 断片は pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へクローニングし、LR clonase (Invitrogen) によって pAMHW vector へ組み替えた。

標的 RNA の調製

標的 RNA の 3'末端が *A*₁₁₄ の場合は *Eco*T22I、*A*₁₁₄-*N*₄₀ の場合は *Hind*III でプラスミドを処理し、それを鋳型として Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit

(Epicentre)によって試験管内で転写を行った。ScriptCap m⁷G Capping System (Epicentre)によって、合成した RNA の 5'末端に m⁷Gcap 構造を付加した。放射性標識の導入には[α-³²P] GTP (PerkinElmer)を用いた。放射性標識した RNA は 5% 変性ウレアゲルに泳動後、切り出して精製した。

S2 細胞抽出液の調製

S2 細胞を回収し、PBS によって1回洗う。細胞ペレットに対して等量の (1x hypotonic lysis buffer, 5 mM DTT, 1x protease inhibitor cocktail [Riche])を加えて、氷上で 15 分静置した。30 秒間ボルテックスで激しく攪拌し、4°C、1.7x 10⁴ g で 20 分遠心した後に、上清を回収した。

RNA 干渉に用いる二本鎖 RNA の調製

ショウジョウバエ S2 細胞 cDNA をもとに、下記のプライマーによってノックダウンに用いた二本鎖 RNA の鋳型 DNA を合成した。GW182 のタンパク質コード領域 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT AGC GGA AAC TCC AGC AA-3') と (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGA TGA CCC CAC ATT TC-3'); GW182 の 3'UTR (5'-CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA TCA ATT ACC AGT TCC ATT-3') と (5'-CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAG TTA TAT CTA TGA ACG-3'); GW182 の 5'UTR (5'-CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA CAC GGA AAG AAC AAG GAT-3') と (5'-CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGT GCT CAA GTG TTC TAA CTG-3'); Ago1 (5'-ATT TGA TTT CTA TCT ATG CAG CCA-3') と (5'-GCC CTG GCC ATG GCA CCT GGC GTA-3'); NOT1 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG AAT GCA GCC GGA GAT GGT CGA A-3') と (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG AGA ACA GAT TGC GCA GCA TCA T-3'); CAF1 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA TGA AAT GGA CAA TGC CCT CG-3') と (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT TTG AAG AAG GCC ATG CCC GT-3'); PABP (5'-CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA TTT CGA CGA TGA AAA AC-3') と (5'-CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG TCT TCT GGG CAC GAG CCA CG-3'); HYD (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCG GGA TCG TCA GTA CTA C-3') と (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGA CCA GCG CCA CTG GTA C-3')。GFP に対する二本鎖 RNA は以前に報告されて

いる方法に準拠した (Forstemann et al., 2005)。すべての二本鎖 RNA は Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit (Epicentre)によって試験管内で転写した。

RNA 干渉

10 ml の S2 細胞 (1×10^6 cells/ml)に対して、20 μ g の二本鎖 RNA を添加した。96 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液を調製した。図 3-3B の GW182 ノックダウンでは、10 ml の S2 細胞 (1×10^6 cells/ml)に対して、50 μ g の二本鎖 RNA を添加し、72 時間後に再び 50 μ g の二本鎖 RNA を添加した。その 24 時間後、細胞を5倍希釈し、72 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液を調製した。

miR-9b/miR-9b*二本鎖 RNA の調製

人工合成した RNA (5'-UCU UUG GUG AUU UUA GUC GUA UG-3') と(5'-UAG AGC UUU AUU ACC AAA AAC C-3')の 5'末端を、T4 polynucleotide kinase (Takara Bio)によって燐酸化した。燐酸化反応液中の ATP は MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare Bioscience)によって除いた。ガイド鎖とパッセージャー鎖をモル率 2:3 で混ぜ合わせ、95°Cで 3 分、室温で 30 分置くことでアニーリングを行った。二本鎖 RNA は、1x lysis buffer に溶けている。

トランスフェクション

10 ml の S2 細胞 (1×10^6 cells/ml)に対して、10 μ g の発現プラスミドを XtremeGENE HP (Roche)によってトランスフェクションし、72 時間後に細胞抽出液を調製した。トランスフェクションと RNA 干渉を組み合わせで行う場合は、二本鎖 RNA を添加した24時間後にトランスフェクションを行った。

S2 細胞におけるルシフェラーゼレポーター解析

10 ml の S2 細胞 (1×10^6 cells/ml)に対して、20 μ g の二本鎖 RNA を添加した。48 時間後、再び 1×10^6 cells/ml になるよう S2 細胞を希釈し、96well プレートへ播種した。20 ng の pAWH-Rluc-*let-7*-poly(A)、または 100 ng の pAWH-Rluc-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀-HhR を、30ng の pAHW-Fluc と 300 ng の pASW-pri-*let-7*、または

pASW 空ベクターとともに X-tremeGENE HP (Riche)によってトランスフェクションした。72 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いてルシフェラーゼの発光値を記録した。測定値 (Rluc/Fluc)は、*let-7*を発現させないものに対してノーマライズを行った。グラフは3回の独立試行の平均値と、標準偏差を示している。

ノーザンブロットニング

S2 細胞全 RNA は 1.3% 変性ホルムアルデヒドアガロースゲルによって分離し、Hybond-N⁺ membrane (GE Healthcare Biosciences)に転写した。Rluc、または Fluc に対する RNA プローブの鋳型 DNA は、psiCHECK2 (Promega)をもとにプライマー (5'-ATG GCT TCC AAG GTG TAC GA-3') と (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCG TCC TCC TGG CTG AA-3')、または (5'-ATG GCC GAT GCT AAG AAC AT-3') と (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TTA CAC GGC GAT CTT GCC GC-3')を用いて増幅した。[α -³²P] UTP と MaxiScript kit (Ambion)によって放射性標識された RNA プローブの転写を行い、終濃度 20%のホルムアミドを含む Perfecthyb Plus (Sigma)中でハイブリダイゼーションを行った。

ウエスタンブロットニング

anti-FLAG 抗体 (1:5000; Sigma)、anti-HA 抗体 (1:5000; Covance)、anti-PABP 抗体 (1:5000; (Duncan et al., 2009)), anti-eIF4E 抗体 (1:5000; (Nakamura et al., 2004)), anti-Ago1 抗体 (1:1000; (Miyoshi et al., 2005)), anti-GW182 抗体 (1:1000; (Miyoshi et al., 2009)), anti-CCR4 抗体 (1:1000; (Temme et al., 2004)), anti-CAF1 抗体(1:5000; (Temme et al., 2004)), anti-NOT1 抗体 (1:5000; (Temme et al., 2010)), anti-HYD 抗体 (1:1000; Abcam)、anti-Tubulin 抗体 (1:5000: Sigma)を一次抗体として用いた。SuperSignal West Dura (Pierce)によって化学発光を誘導し、LAS-3000 (Fujifilm Life Science)によって画像を取得した。

シヨ糖密度勾配遠心

20 μ l の細胞抽出液に対して、12 μ l の 40x reaction mix、4 μ l の 500 nM *let-*

7/*let-7**二本鎖、4 μ l の 10 mM シクロヘキシミド (80S リボソームの検出)、または 4 μ l の 10 mM GMP-PNP と 4 μ l の 10 mM シクロヘキシミド (48S リボソームの検出)を混ぜ合わせ、25 °Cで 30 分間静置した。そこへ、~ 20 nM の放射性標識された mRNA を 1 μ l 加え、さらに 25 °Cで 30 分間静置した。氷上に置いて反応を止め、(10 mM HEPES-KOH pH7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KOAc)を含む 5-25%の直線シヨ糖密度勾配液 (80S リボソームの検出)、または (10 mM HEPES-KOH pH7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KOAc)を含む 5-20%の直線シヨ糖密度勾配液 (48S リボソームの検出)へ重層し、SW 41 Ti ローター (Beckman Coulter)を用いて4°C、36,000 rpm で 160 分 (80S リボソームの検出)、または4°C、40,000 rpm で 210 分 (48S リボソームの検出)超遠心した。ポリソームを検出する場合、20 μ l の細胞抽出液に対して、12 μ l の 40x reaction mix、4 μ l の 500 nM *let-7/let-7**二本鎖を加え、25 °Cで 30 分間静置した。そこへ、~ 20 nM の放射性標識された mRNA を 1 μ l 加え、さらに 25 °Cで 30 分間静置した。氷上に置いて反応を止め、4 μ l の 10 mM シクロヘキシミドを加えた。反応液は (10 mM HEPES-KOH pH7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KOAc)を含む 20-60%の直線シヨ糖密度勾配液へ重層し、4°C、36,000 rpm で 210 分超遠心した。超遠心後の密度勾配液は Gradient Station (Biocomp)と MicroCollector (ATTO)によって分画し、チェレンコフ光を Tri-carb 2810TR (PerkinElmer)で測定した。グラフは各画分の測定値のインプット値に対する割合として表示している。254 nm の吸光度は UV Monitor (ATTO)によって測定した。