

III 章

miRNA は翻訳開始因子複合体の形成を阻害する

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反応経路を介して遺伝子発現を抑制している。Ago1 結合タンパク質である GW182 は、CCR4-NOT 複合体の構成因子である NOT1 と直接結合することで、poly(A)鎖分解酵素を標的 mRNA 上へと積極的に呼び込んでおり (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011)、poly(A)鎖の分解に必須の役割を担っている。一方で翻訳抑制に関しては、GW182 依存的、非依存的の二つの異なる抑制経路が存在しており、ともに 43S 複合体が標的 mRNA 上に呼び込まれる翻訳開始段階を阻害していると考えられている (Fukaya and Tomari, 2012) (II 章)。しかし、その詳細な分子機構は明らかとなっていない。

真核生物における 43S 複合体の呼び込みは、eIF4F 複合体と呼ばれる翻訳開始因子複合体の形成に大きく依存している。mRNA の 5'末端にある m⁷Gcap 構造は、eIF4F 複合体の構成因子である eIF4E 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 リボソーム構成因子である eIF3 と結合しており、mRNA 上へリボソームを呼び込む役割を担う。eIF4A は自身のヘリカーゼ活性によって、5'UTR の二次構造を解きほぐすことで、リボソームによる開始コドンの認識を促進していると考えられている (Gingras et al., 1999)。さらに、poly(A)鎖結合タンパク質である PABP は、mRNA の 3'末端にある poly(A)鎖を足場として、eIF4G と直接結合している。PABP-eIF4G 相互作用は、eIF4F 複合体を安定化することで翻訳開始を促進している (Borman et al., 2000; Gray et al., 2000; Wakiyama et al., 2000; Kahvejian et al., 2005)。miRNA がリボソームの呼び込みを抑制するためには、上記の翻訳開始段階のうち、いずれかの過程を阻害する必要があるが、その作用点は明らかとなっていない。そこで、試験管内再構築系と UV クロスリンク法を組み合わせた新たな解析手法を開発し、標

的 mRNA 上における翻訳開始因子複合体の形成を定量的に解析した。

結果

4-1. UV クロスリンクによる翻訳開始因子の検出

FLAG-Ago1 を過剰発現した S2 細胞抽出液を用いることで、試験管内において miRNA による poly(A)鎖の分解と翻訳抑制をそれぞれ切り分けて解析することができる (Fukaya and Tomari, 2011; Fukaya and Tomari, 2012)。miRNA がどの翻訳開始因子を標的としてタンパク質合成を阻害するのか解き明かすため、標的 mRNA 上に結合する翻訳開始因子を特異的に検出できる新たな解析手法の構築を目指した。そこでまず、186 塩基のタンパク質コード領域と、3'末端に40塩基の保護配列を付加した poly(A)鎖を持つ mRNA を設計し (sORF-A₁₁₄-N₄₀; 図 4-1A)、T7 ポリメラーゼによって *in vitro* で転写を行った。このとき、UTP の代わりに 4-thio-UTP を用いて転写反応を行うことで、mRNA 中のすべての U が 4-thio-U に置換された特殊な mRNA を合成した。さらに、その 5'末端に放射線標識された m⁷Gcap 構造を付加した (図 4-1C)。この mRNA の 5'UTR は、m⁷Gcap 構造から数えて 2 塩基目、あるいは 13 塩基目下流にはじめて(4-thio-)U が現れるように設計してある (2U and 13U; 図 4-1B)。S2細胞抽出液と *in vitro* で合成した mRNA を混ぜ合わせ、試験管内翻訳反応を行ったあと、UV を照射することで 4-thio-U はそのごく近傍に位置するタンパク質とのみ不可逆的な共有結合を形成する。UV 照射後、RNaseA によって mRNA を断片化し、SDS-PAGE によって反応液を分離して放射線を検出した (図 4-1C)。RNaseA は、U と C の 3'側でのみ特異的に RNA を切断するので、結果として放射性標識は 2U あるいは 13U の位置で共有結合を形成しているタンパク質のみに保持される (図 4-1B)。

解析の結果、30 kDa または 50 kDa 近傍のタンパク質が、それぞれの位置でクロスリンクされる様子がみられた (図 4-2A、B)。anti-eIF4E 抗体、または anti-eIF4A 抗体 (図 4-2C)によってこれらのタンパク質が免疫沈降されることから、それらが eIF4E と eIF4A であることが確かめられた (図 4-2A、B)。次にこれらの因子の性質を確かめるため、eIF4E 阻害剤である m⁷GpppG、または eIF4A 阻害剤であるヒプリスタノール存在下で UV クロスリンクを行った。これらの薬剤は翻訳開始因子の働きを阻害することで、レポーター mRNA からのタンパク質合成を著しく阻

害する (図 4-2D-F)。解析の結果、 m^7GpppG は eIF4E による m^7Gcap 構造の認識を競合的に阻害することで、eIF4E のクロスリンク効率を低下させていた (図 4-2G)。eIF4E による m^7Gcap 構造の認識は、eIF4A の呼び込みにも必要であるため、 m^7GpppG 存在下では eIF4A のクロスリンクも同時に阻害されていた (図 4-2H)。一方で、eIF4A の ATPase 活性と RNA 結合能を特異的に阻害する薬剤であるヒプリスタノールは (Bordeleau et al., 2006)、eIF4E には影響を与えずに eIF4A のクロスリンクのみを阻害した (図 4-2G、H)。以上の結果から、UV クロスリンクによって、eIF4E と eIF4A の挙動を忠実に再現できることが確かめられた。

次に、翻訳開始因子複合体の形成過程における poly(A)鎖、および PABP の役割を解析した。PABP は、eIF4G との相互作用を介して翻訳開始複合体の形成を安定化することで、タンパク質合成を促進に寄与している (Borman et al., 2000; Gray et al., 2000; Wakiyama et al., 2000; Kahvejian et al., 2005)。実際に S2 細胞抽出液中においても、poly(A)鎖の欠損によって翻訳効率は10分の1以下にまで低下した (図 4-3A、B)。同様に、poly(A)鎖をもつレポーター-mRNA に、PABP 阻害因子である精製 PAIP2 タンパク質を作用させた場合も、同程度に翻訳効率が低下した (図 4-3E)。過去の知見に一致して、PABP が機能を発揮できないこれらの条件では、eIF4E と eIF4A のクロスリンク効率がともに低下していた (図 4-3C-G)。以上の結果から、試験管内反応系と UV クロスリンクを組み合わせることによって、 m^7Gcap 構造 と poly(A)鎖に依存した翻訳開始複合体の形成を忠実に再現できることが確かめられた。

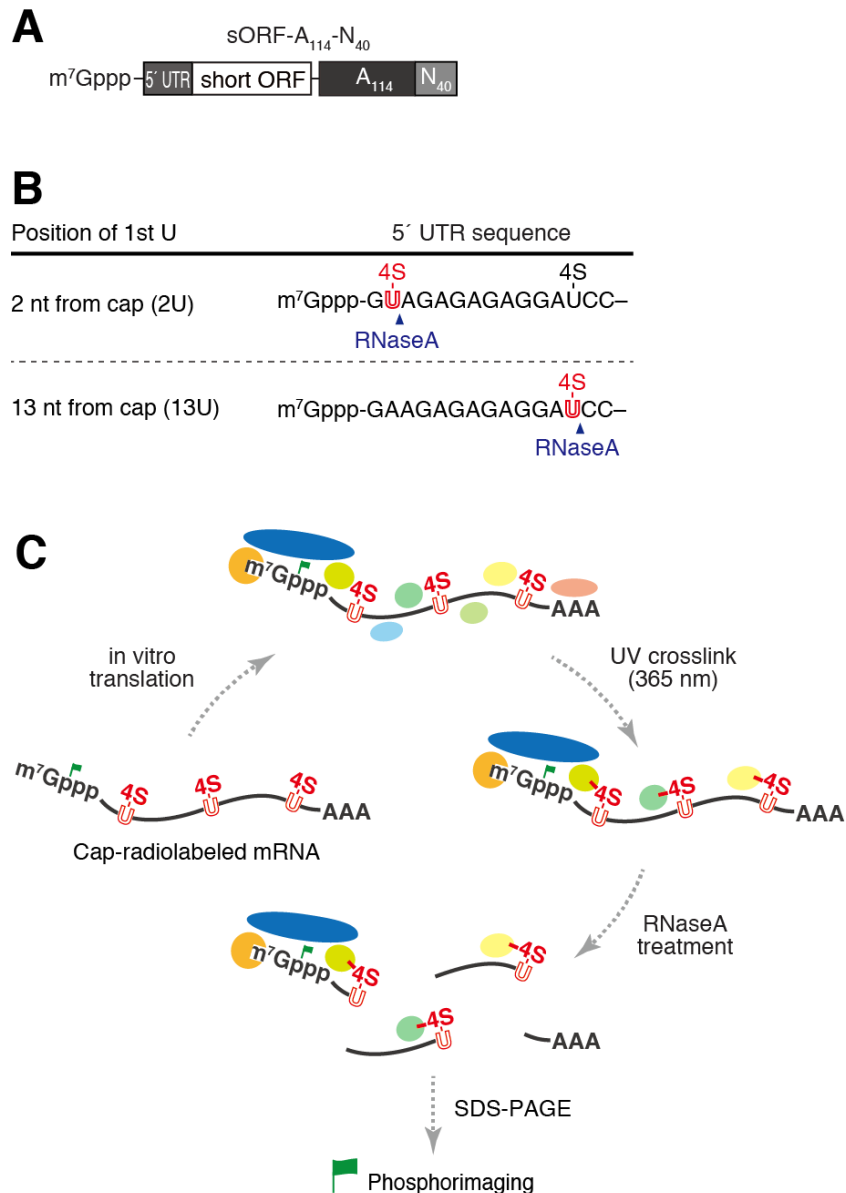


図 4-1. UV クロスリンクによる RNA-タンパク質相互作用の検出

(A) sORF-A₁₁₄-N₄₀ レポーター-mRNA の模式図。

(B) レポーター-mRNA の 5'UTR 配列。5'末端に最も近い 4-thio-U と RNaseA 切断部位をそれぞれ赤字と青字で示す。

(C) UV クロスリンク解析の模式図。4-thio-U (赤字)を取り込ませた mRNA の m⁷Gcap 構造を放射性標識し (緑の旗)、S2 細胞抽出液と混ぜ合わせた。365 nm の UV を照射して共有結合を形成させた後 (赤線)、RNaseA によって mRNA を断片化し、10% SDS-PAGE によってタンパク質を分離した。放射線を検出することで、クロスリンクされたタンパク質のみを特異的に検出することが出来る。実験系の開発は岩川弘宙博士による先行研究に基づいた。

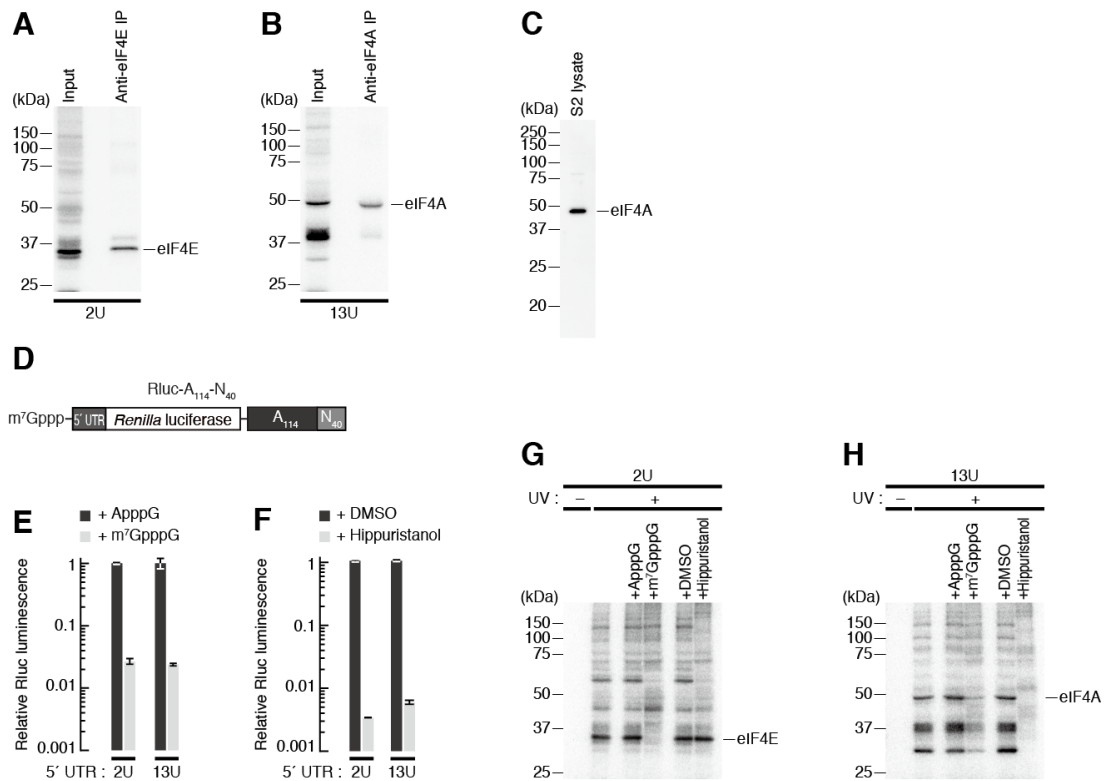


図 4-2. UV クロスリンクによる eIF4E と eIF4A の検出

(A) UV クロスリンクによる eIF4E の検出。4-thio-U を取り込ませた sORF-2U-A₁₁₄-N₄₀ の m⁷Gcap 構造に放射線標識を導入し、S2 細胞抽出液と混ぜ合わせた。UV を照射しクロスリンクさせた後、anti-eIF4E 抗体によって免疫沈降を行い、SDS-PAGE によって解析した。eIF4E は m⁷Gcap 構造から 2 塩基下の 4-thio-U へ効率的にクロスリンクされる。

(B) UV クロスリンクによる eIF4A の検出。4-thio-U を取り込ませた sORF-13U-A₁₁₄-N₄₀ の m⁷Gcap 構造に放射線標識を導入し、S2 細胞抽出液と混ぜ合わせた。UV を照射しクロスリンクさせた後、anti-eIF4A 抗体によって免疫沈降を行い、SDS-PAGE によって解析した。eIF4A は m⁷Gcap 構造から 13 塩基下の 4-thio-U へ効率的にクロスリンクされる。

(C) 作製した anti-eIF4A 抗体は、S2 細胞抽出液中の内在性 eIF4A を特異的に認識する。

(D) Rluc-A₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。

(E) Rluc-2U、13U-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳は m⁷GpppG によって阻害される。Rluc 測定値は ApppG 作用時の値に対してノーマライズしている。

(F) Rluc-2U、13U-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳はヒプリスタノールによって阻害される。Rluc 測定値は DMSO 作用時の値に対してノーマライズしている。

(G) eIF4E のクロスリンクは m⁷GpppG によって阻害される。ApppG やヒプリスタノールは eIF4E のクロスリンクに影響を与えない。

(H) eIF4A のクロスリンクは m⁷GpppG、およびヒプリスタノールによって阻害される。ApppG や DMSO は eIF4A のクロスリンクに影響を与えない。

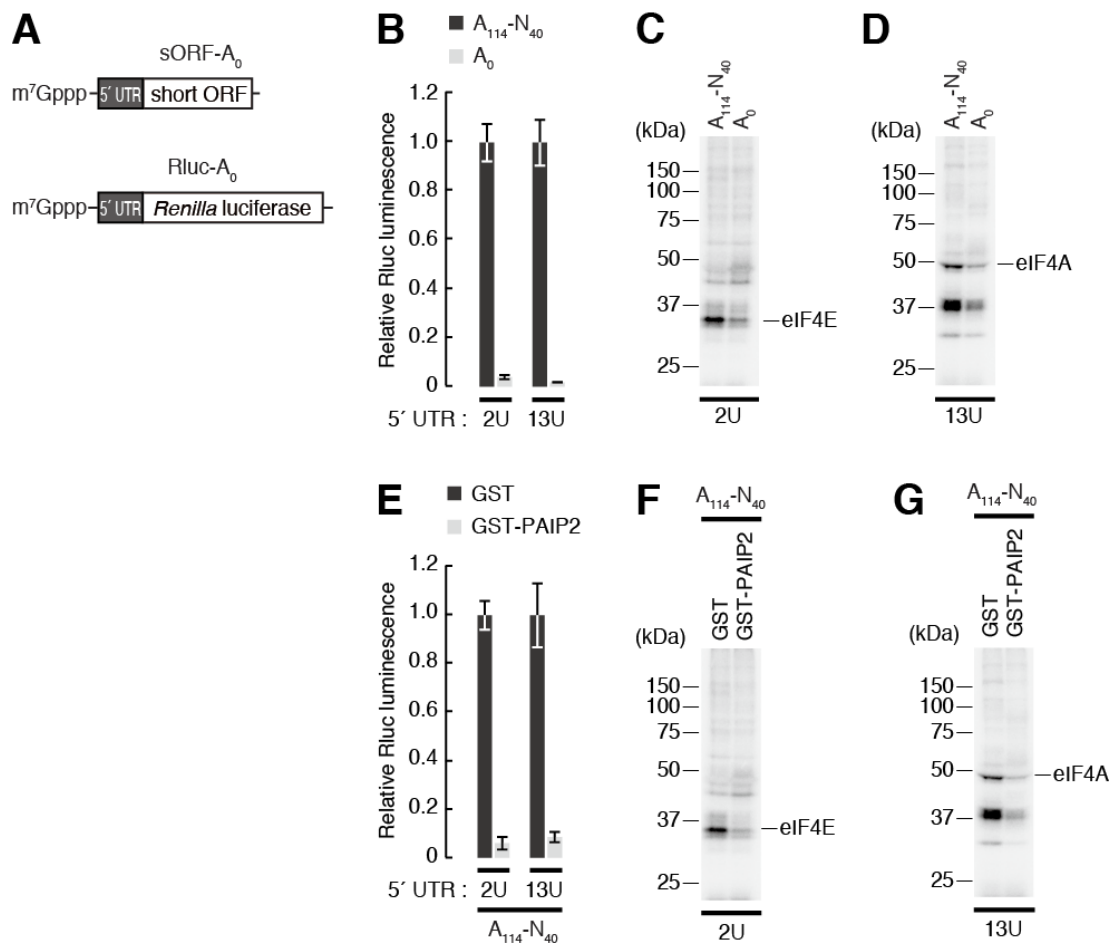


図 4-3. PABP は翻訳開始因子複合体の形成を促進する

(A) Rluc-A₀、sORF-A₀ レポーター mRNA の模式図。

(B) Rluc-2U- A₁₁₄-N₄₀、A₀ および Rluc-13U-A₁₁₄-N₄₀、A₀ の翻訳活性。Rluc 測定値は poly(A)鎖を持つものの値に対してノーマライズしている。poly(A)鎖は翻訳を活性化する。

(C) poly(A)鎖の有無における eIF4E のクロスリンク。poly(A)鎖がないと eIF4E のクロスリンク効率が低下する。

(D) poly(A)鎖の有無における eIF4A のクロスリンク。poly(A)鎖がないと eIF4A のクロスリンク効率が低下する。

(E) 10 μM GST、または GST-PAIP2 存在下における Rluc-2U、13U-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳活性。Rluc 測定値は GST 作用時の値に対してノーマライズしている。翻訳活性は GST-PAIP2 によって阻害される。

(F) PAIP2 作用時における eIF4E のクロスリンク。PAIP2 は eIF4E のクロスリンクを阻害する。

(G) PAIP2 作用時における eIF4A のクロスリンク。PAIP2 は eIF4A のクロスリンクを阻害する。

4-2. Ago1-RISC は eIF4A の解離を引き起こす

ショウジョウバエ Ago1-RISC は、eIF4G を人工的に 5'UTR へ係留することで活性化される eIF4E 非依存的な翻訳であっても、タンパク質合成を抑制することができる。一方で、アポトーシス誘導遺伝子である *reaper* 5'UTR を介した eIF4A 非依存的な翻訳は Ago1-RISC による翻訳抑制を受けない (Fukaya and Tomari, 2012)(II 章)。以上の結果から、Ago1-RISC が eIF4A の働きに依存した翻訳開始段階を阻害していることが示唆されている。

そこで、Ago1-RISC がどの翻訳開始因子を標的として、翻訳抑制を引き起こすのかをより直接的に検証するため、UV クロスリンクの手法を用いて解析を行った。5'UTR にクロスリンク部位、3'UTR に *let-7* 標的配列、または比較として *let-7* 標的配列を含まないレポーター mRNA を設計した (図 4-1A、4-4A)。3'末端に40塩基の保護配列を付加して poly(A)鎖を内側に閉じ込めることで、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できる (Fukaya and Tomari, 2011)(図 4-4B、C)。4-thio-U を取り込ませたこれらのレポーター mRNA を用いて、eIF4E と eIF4A の UV クロスリンク効率が Ago1-RISC によってどのように変動するのか解析を行った。その結果、*let-7/let-7**二本鎖とその標的配列が存在する場合においてのみ、eIF4A のクロスリンクが阻害されていた (図 4-4E、F)。一方で、eIF4E のクロスリンクは miRNA による影響を受けなかった (図 4-4D、F)。FLAG-Ago1 を発現させない S2 細胞抽出液中では、内在性 Ago1 は既に内在の miRNA によって占拠されているため、*let-7/let-7**二本鎖存在下においても微かな翻訳抑制と eIF4A の解離しか見られなかった (図 4-5; *gfp[RNAi]*-FLAG-Ago1)。さらに、Ago1 ノックダウンによって抑制作用がより阻害されることから (図 4-5; *ago1[RNAi]*)、Ago1-RISC が配列特異的に eIF4A の解離と翻訳抑制を引き起こしていることが確かめられた。近年、Ago1-RISC による翻訳抑制は GW182 非依存的であることが示唆されている (Fukaya and Tomari, 2012; Wu et al., 2013)。そこで、GW182 をノックダウンした S2 細胞抽出液を調製し解析を行った (図 4-6A)。ノックダウンを行った細胞抽出液中では、poly(A)鎖の分解が著しく阻害されることから (図 4-6B)、GW182 がほぼ完全に除かれていることが確かめられた。一方で、Ago1-RISC による翻訳抑制 (図 4-6C)と eIF4A の解離 (図 4-6D-F)は GW182

非存在下においても引き起こされた。つまり、Ago1-RISC は GW182 非依存的に eIF4A の解離を引き起こしていると考えられる。

過去の研究から、miRNA による翻訳抑制に PABP が関与することが示唆されている (Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Fabian et al., 2011)。一方、ゼブラフィッシュ初期胚における *in vivo* 解析、および S2 細胞抽出液を用いた *in vitro* 解析から、miRNA の機能発揮に PABP が必須ではないことが示されている (Fukaya and Tomari, 2011; Mishima et al., 2012)(I 章)。そこで、Ago1-RISC による eIF4A の解離が PABP に依存するかを検証するため、そもそも poly(A)鎖を持たないレポーター mRNA を設計し、解析を行った (図 4-7A)。その結果、poly(A)鎖を持たない場合であっても Ago1-RISC は翻訳抑制と eIF4A の解離を引き起こした (図 4-7B-E)。このことから、Ago1-RISC は PABP 非依存的に eIF4A の解離を引き起こすことが示唆された。一方で、poly(A)鎖を持つレポーター mRNA に比べて抑制の程度が弱かったことから、miRNA の機能発揮に PABP が補助的な役割を担っている可能性も残されている。

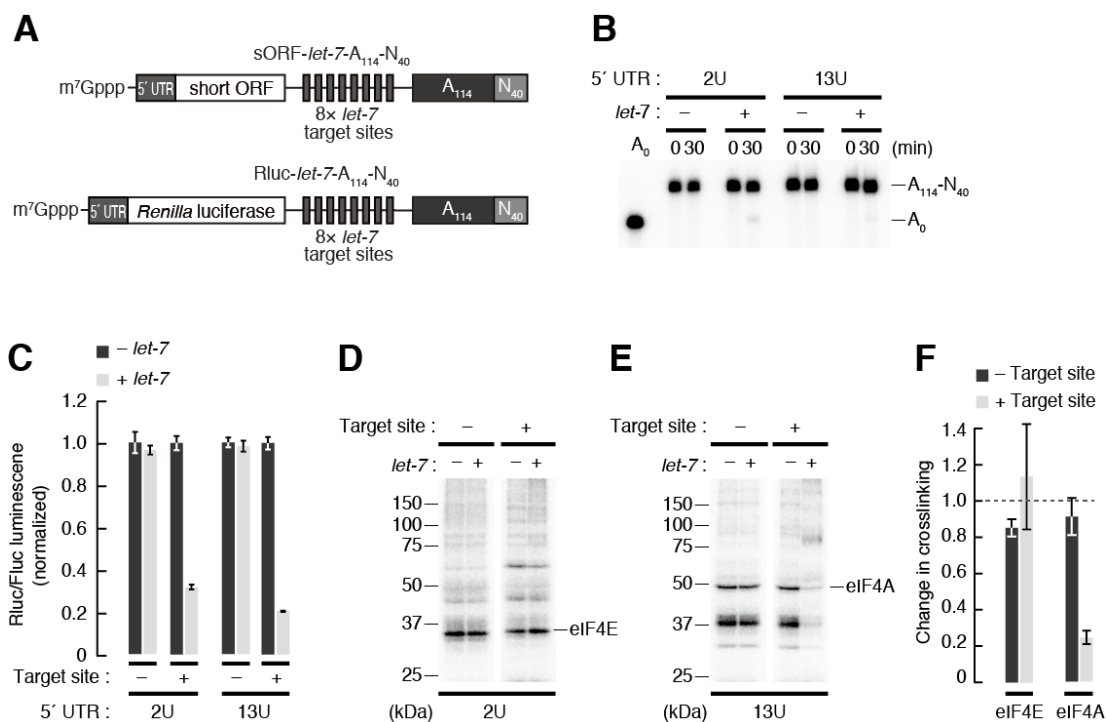


図 4-4. Ago1-RISC は eIF4A の解離を引き起こす

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

5' UTR の配列は図 4-1B に示すとおりである。

(B) Ago1-RISC 抑制下における sORF-2U、13U-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ の安定性。末端に保護配列を付加した poly(A) 鎖は分解を受けない。

(C) ルシフェラーゼ解析により Rluc-2U、13U-*A*₁₁₄-N₄₀ (- target site) または、Rluc-2U、13U-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ (+ target site) の翻訳活性を測定した。Rluc/Fluc 値は *let-7/let-7** 二本鎖を加えないときの値に対してノーマライズした。Ago1-RISC は *let-7* の標的配列をもつレポーター mRNA のみを特異的に抑制する。

(D) Ago1-RISC による翻訳抑制下での eIF4E クロスリンク。sORF-2U-*A*₁₁₄-N₄₀ (- target site)、または sORF-2U-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ (+ target site) を S2 細胞抽出液へ混ぜ合わせ、UV を照射してクロスリンクを行った。Ago1-RISC は eIF4E のクロスリンクに影響を与えない。

(E) Ago1-RISC による翻訳抑制下での eIF4A クロスリンク。sORF-13U-*A*₁₁₄-N₄₀ (- target site)、または sORF-13U-*let-7-A*₁₁₄-N₄₀ (+ target site) を S2 細胞抽出液へ混ぜ合わせ、UV を照射してクロスリンクを行った。Ago1-RISC は eIF4A のクロスリンクを阻害する。

(F) Ago1-RISC による eIF4E、eIF4A クロスリンク効率の変動。(D)、(E) のシグナルを定量し、*let-7/let-7** 二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

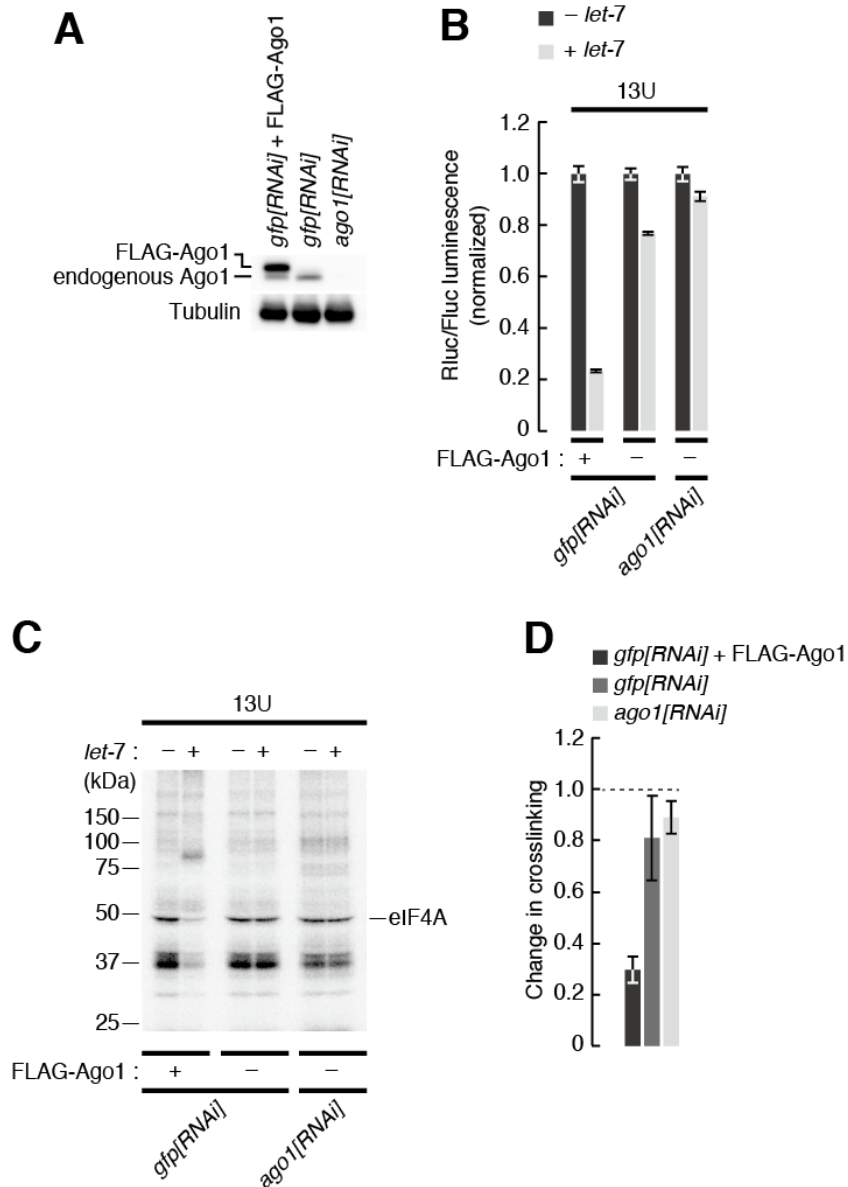


図 4-5. Ago1 は eIF4A の解離に必須である

(A) anti-Ago1 抗体によるウエスタンブロット解析。Ago1 タンパク質はノックダウンによって効率的に除かれている。

(B) Ago1-RISC による Rluc-13U-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。抑制効率は、外から加えた *let-7/let-7**二本鎖を取り込める Ago1 タンパク質の量に依存する。

(C) Ago1-RISC による翻訳抑制下での eIF4A クロスリンク。eIF4A の解離には Ago1 が必須である。

(D) Ago1-RISC による eIF4A クロスリンク効率の変動。(C)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

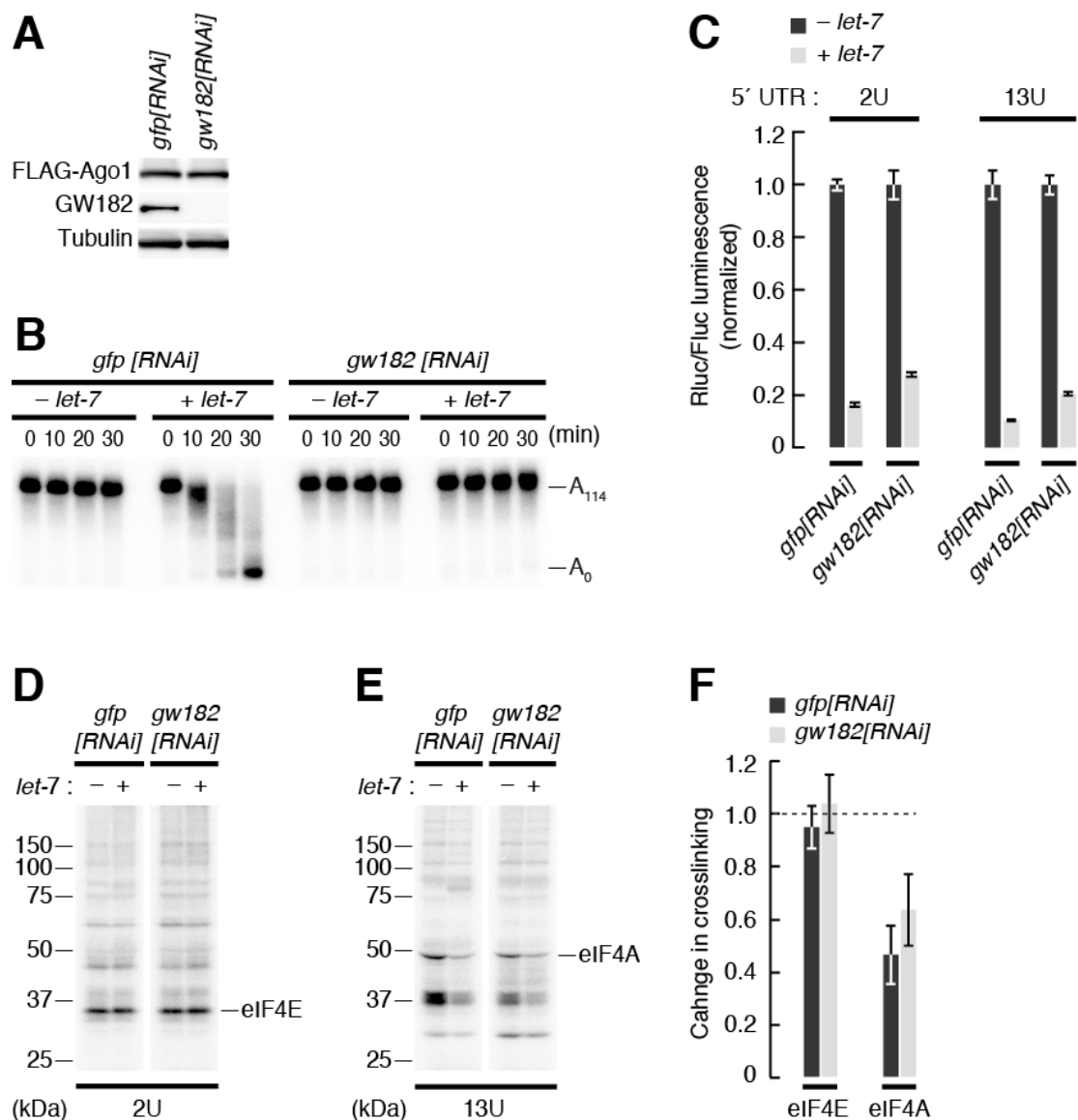


図 4-6. Ago1-RISC による eIF4A の解離は GW182 非依存的である

(A) anti-GW182 抗体によるウエスタンブロット解析。GW182 タンパク質はノックダウンによって効率的に除かれている。

(B) Ago1-RISC による poly(A) 鎖の分解には GW182 が必須である。

(C) Ago1-RISC による Rluc-2U、13U-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳抑制。Ago1-RISC による翻訳抑制は GW182 非依存的に進行する。

(D) GW182 ノックダウン下における eIF4E クロスリンク。GW182 の有無に関わらず、Ago1-RISC は eIF4E のクロスリンクに影響を与えない。

(E) GW182 ノックダウン下における eIF4A クロスリンク。GW182 非存在下でも Ago1-RISC は eIF4A のクロスリンクを阻害する。

(F) Ago1-RISC による eIF4E、eIF4A クロスリンク効率の変動。(D)、(E)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

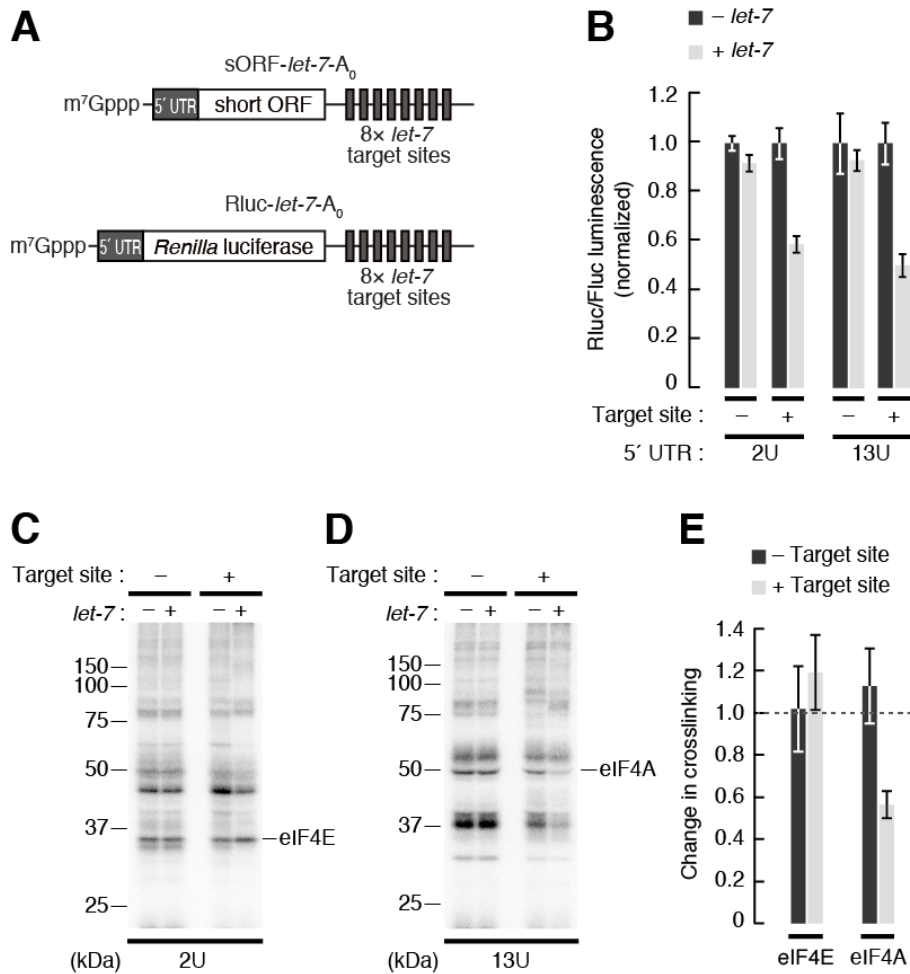


図 4-7. Ago1-RISC による eIF4A の解離は PABP 非依存的である

(A) sORF-*let-7-A₀*、Rluc-*let-7-A₀*レポーターmRNA の模式図。5'UTR の配列は図 4-1B に示すとおりである。

(B) ルシフェラーゼ解析により Rluc-2U、13U-A₀ (- target site)または、Rluc-2U、13U-*let-7-A₀* (+ target site)の翻訳活性を測定した。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た。Ago1-RISC は poly(A)鎖を持たないレポーターmRNA も抑制する。

(C) poly(A)鎖を持たないレポーターmRNA への eIF4E クロスリンク。sORF-2U-A₀ (- target site)、または sORF-2U-*let-7-A₀* (+ target site)を用いて解析を行った。poly(A)鎖の有無にかかわらず Ago1-RISC は eIF4E に影響を与えない。

(D) poly(A)鎖を持たないレポーターmRNA への eIF4A クロスリンク。sORF-13U-A₀ (- target site)、または sORF-13U-*let-7-A₀* (+ target site)を用いて解析を行った。poly(A)鎖の有無にかかわらず Ago1-RISC は eIF4A の解離を引き起こすことができる。

(F) Ago1-RISC による eIF4E、eIF4A クロスリンク効率の変動。(C)、(D)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

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

Ago1-RISC が eIF4E には影響を与えずに、eIF4A の解離を特異的に引き起こしていることを考えると、過剰量の eIF4A を加えることで、翻訳抑制が拮抗的に阻害されることが予測される。そこで、His-tag 付き eIF4E、eIF4A タンパク質を精製し (図 4-8A、B)、それらを細胞抽出液中へ加えた条件下で解析をおこなった。eIF4E を過剰量加えたとき (図 4-8C)、翻訳効率そのものが低下する様子がみられた (図 4-8D)。この結果は、他の翻訳開始因子と複合体を形成しない単体の eIF4E が、m⁷Gcap 構造に結合したことによるものと考えられる。一方で、eIF4A を過剰に加えることで翻訳効率が上昇したことから (図 4-8F、G)、細胞抽出液中では eIF4A が律速段階になっていたと考えられる。重要なことに、eIF4A を過剰に加えた場合においてのみ、Ago1-RISC による翻訳抑制が解除された (図 4-8E、H)。eIF4A は Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解には影響を与えないことから (図 4-8I)、その作用は翻訳抑制特異的であることが確かめられた。

次に、これらの条件下において UV クロスリンクを行った。その結果、細胞抽出液中へ加える精製タンパク質の量に応じて、内在性 eIF4E、eIF4A が His-tag 付きのものに置換される様子が観察された (図 4-9A、G)。興味深いことに、過剰量の eIF4A 存在下では Ago1-RISC による eIF4A の解離が阻害されていた (図 4-9E–H)。一方、過剰量の eIF4E は Ago1-RISC による eIF4A の解離には影響を与えなかった (図 4-9A–D)。以上の結果から、eIF4A の解離が Ago1-RISC による翻訳抑制に機能的に重要であることが示唆された。

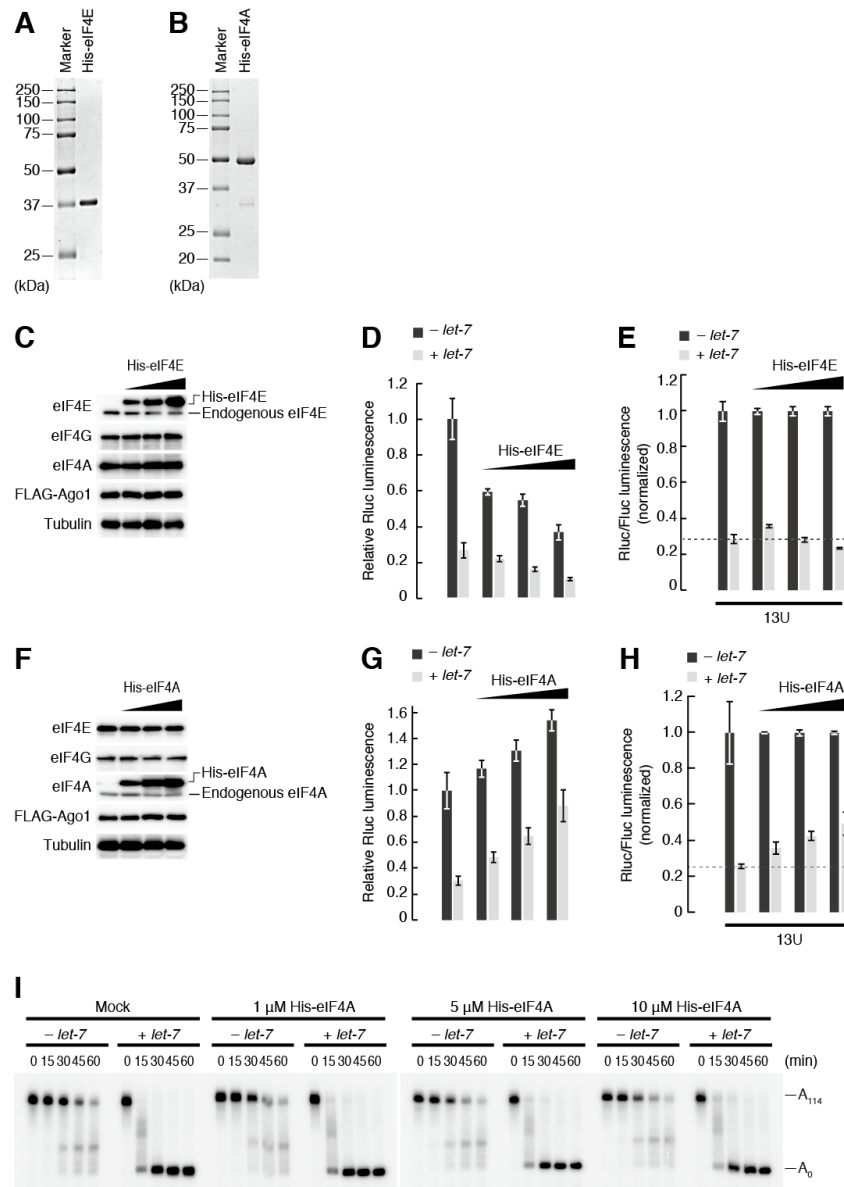


図 4-8. 過剰量の eIF4A は Ago1-RISC による翻訳抑制を阻害する

(A,B) 精製 eIF4E、eIF4A タンパク質の CBB 染色。

(C) His-eIF4E 存在下におけるウエスタンブロットング解析。

(D) 1、5、10 μ M His-eIF4E 存在下における Rluc-13U-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳活性。過剰量の eIF4E はそもそもの翻訳活性を下げるが、Ago1-RISC による翻訳抑制には影響を与えない。ノーマライズした値は(E)に示す。

(E) Rluc-13U-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ に対する Ago1-RISC の翻訳抑制。過剰量の eIF4E は Ago1-RISC による翻訳抑制には影響を与えない。

(F) His-eIF4A 存在下におけるウエスタンブロットング解析。

(G) 1、5、10 μ M His-eIF4A 存在下における Rluc-13U-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳活性。過剰量の eIF4A はそもそもの翻訳活性を促進するとともに、Ago1-RISC による翻訳抑制を一部解除した。ノーマライズした値は(H)に示す。

(H) Rluc-13U-*let-7*-A₁₁₄-N₄₀ に対する Ago1-RISC の翻訳抑制。過剰量の eIF4A は Ago1-RISC による翻訳抑制を一部解除した。

(I) Ago1-RISC による poly(A)鎖の分解は eIF4A による影響を受けない。

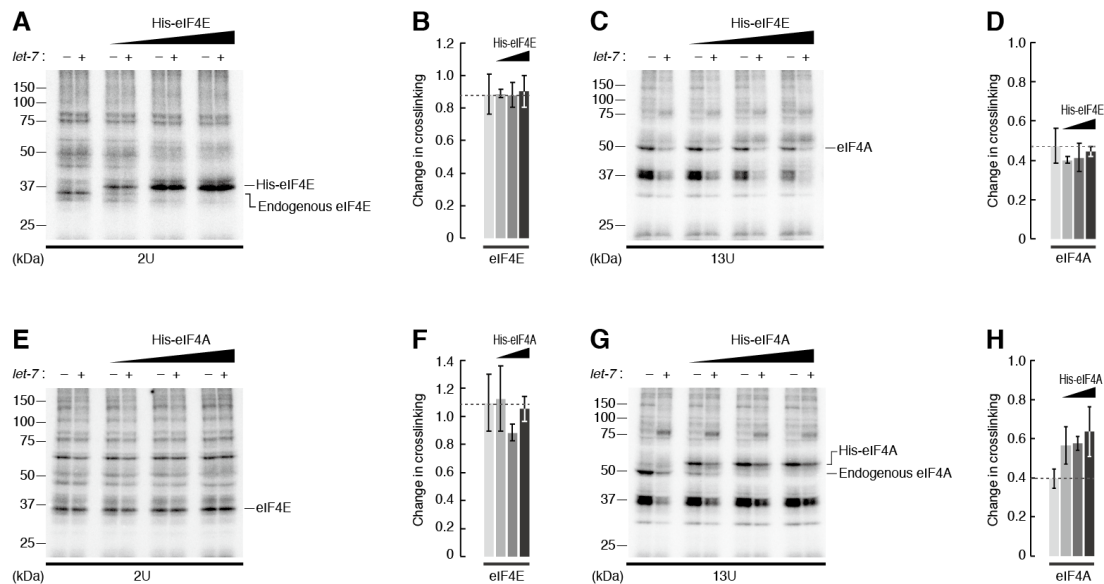


図 4-9. 過剰量の eIF4A は Ago1-RISC による eIF4A の解離に拮抗する

(A) 1、5、10 μ M His-eIF4E 存在下における eIF4E のクロスリンク。過剰量の eIF4E を加えることで、eIF4E のクロスリンク効率が上昇する。

(B) Ago1-RISC による eIF4E クロスリンク効率の変動。(A)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

(C) 1、5、10 μ M His-eIF4E 存在下における eIF4A のクロスリンク。過剰量の eIF4E は Ago1-RISC による eIF4A の解離に影響を与えない。

(D) Ago1-RISC による eIF4A クロスリンク効率の変動。(C)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

(E) 1、5、10 μ M His-eIF4A 存在下における eIF4E のクロスリンク。過剰量の eIF4A は eIF4E のクロスリンクには影響を与えない。

(F) Ago1-RISC による eIF4E クロスリンク効率の変動。(E)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

(G) 1、5、10 μ M His-eIF4A 存在下における eIF4A のクロスリンク。過剰量の eIF4A は Ago1-RISC による eIF4A の解離に拮抗する。

(H) Ago1-RISC による eIF4A クロスリンク効率の変動。(G)のシグナルを定量し、*let-7/let-7**二本鎖を加えていないときの値に対する相対値を求めた。

4-4. GW182 は eIF4E、eIF4A の解離を引き起こす

今回の解析によって、Ago1-RISC が GW182 非依存的に eIF4A の解離を引き起こしていることが明らかとなった。一方、GW182 を直接 mRNA 上に係留することで、Ago1 非依存的に翻訳抑制が引き起こされることが報告されている (Behm-Ansmant et al., 2006; Fukaya and Tomari, 2012)(II 章)。GW182 は翻訳開始段階を阻害していると考えられているが (Fukaya and Tomari, 2012)、どのようにリボソームの呼び込みを妨げているかは不明である。そこで、BoxB 配列を介して λ N-GW182 を直接レポーター mRNA に作用させて一連の解析を行った (図 4-10A、B)。過去の結果と一致して (Fukaya and Tomari, 2011; Fukaya and Tomari, 2012)、GW182 は poly(A)鎖の分解とは独立して翻訳抑制を引き起こした (図 4-10C、D)。興味深いことに、このとき GW182 は eIF4E と eIF4A を同時に標的 mRNA 上から解離させていた (図 4-10E-G)。内在に存在する Ago1 を細胞抽出液中からほぼ完全に除去しても GW182 による翻訳抑制 (図 4-11A、B)、および eIF4E と eIF4A の解離が起こることから (図 4-11C-E)、GW182 は Ago1 非依存的に翻訳開始因子複合体の形成を阻害していることが示唆された。

近年の RNA-immunoprecipitation 解析から、GW182 が poly(A)鎖の分解とは独立に、標的 mRNA 上から PABP を解離させることが示された (Moretti et al., 2012; Zekri et al., 2013)。PABP が翻訳開始因子複合体を安定化していることを考えると (図 4-3)、GW182 が PABP の解離を介して、eIF4E と eIF4A の解離を引き起こしている可能性が考えられる。このことを検証するため、poly(A)鎖を持たないレポーター mRNA を設計し (図 4-12A)、UV クロスリンクによる解析を行った。その結果、そもそも標的 mRNA 上に PABP が結合していない場合であっても、GW182 は eIF4E と eIF4A の解離と、翻訳抑制を引き起こしていた (図 4-12B-E)。もちろん、PABP が GW182 による翻訳抑制に補助的な役割を担っている可能性も残されているが、今回の解析結果は GW182 が PABP 非依存的に翻訳開始因子複合体の形成を阻害できることを示している。

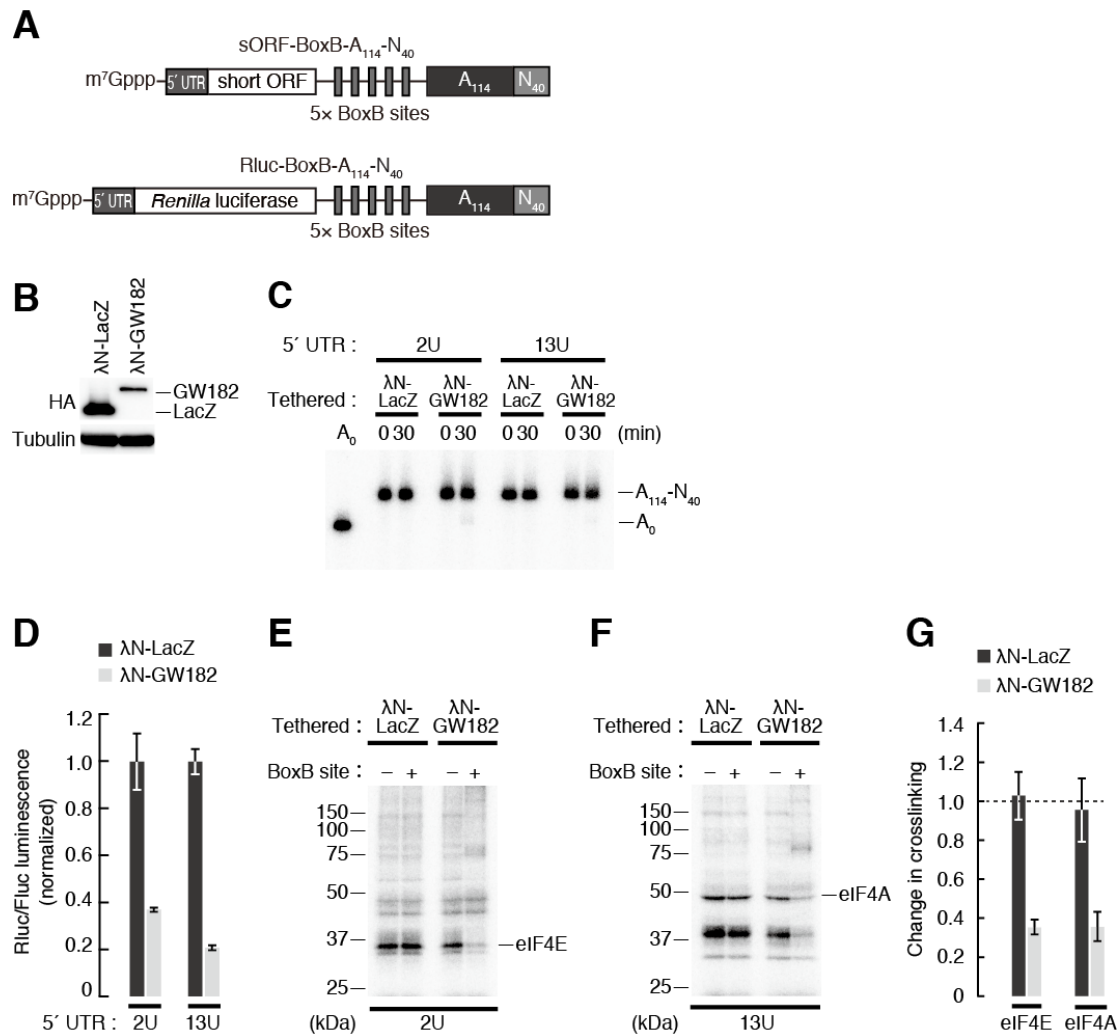


図 4-10. GW182 は eIF4E と eIF4A の解離を引き起こす

(A) sORF-BoxB-A₁₁₄-N₄₀、Rluc-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ レポーター mRNA の模式図。5' UTR の配列は図 4-1B に示すとおりである。

(B) 解析に用いた S2 細胞抽出液をウエスタンブロットングによって解析した。

(C) GW182 の制御下にある sORF-2U、13U-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ の安定性。末端に 40 塩基の保護配列を付加した poly(A) 鎖は分解を受けない。

(D) ルシフェラーゼ解析により Rluc-2U、13U-BoxB-A₁₁₄-N₄₀ の翻訳活性を測定した。Rluc/Fluc 値は LacZ を作用させたときの値に対してノーマライズした。GW182 は poly(A) 鎖の分解とは独立して翻訳抑制を引き起こす。

(E) GW182 による翻訳抑制下での eIF4E クロスリンク。sORF-2U-A₁₁₄-N₄₀ (- BoxB site)、または sORF-2U-let-7-A₁₁₄-N₄₀ (+ BoxB site) を用いて解析を行った。GW182 は eIF4E のクロスリンクを阻害する。

(F) GW182 による翻訳抑制下での eIF4A クロスリンク。sORF-13U-A₁₁₄-N₄₀ (- BoxB site)、または sORF-13U-let-7-A₁₁₄-N₄₀ (+ BoxB site) を用いて解析を行った。GW182 は eIF4A のクロスリンクを阻害する。

(G) GW182 による eIF4E、eIF4A クロスリンク効率の変動。(E)、(F) のシグナルを定量し、BoxB 配列を持たないレポーター mRNA の値に対する相対値を求めた。

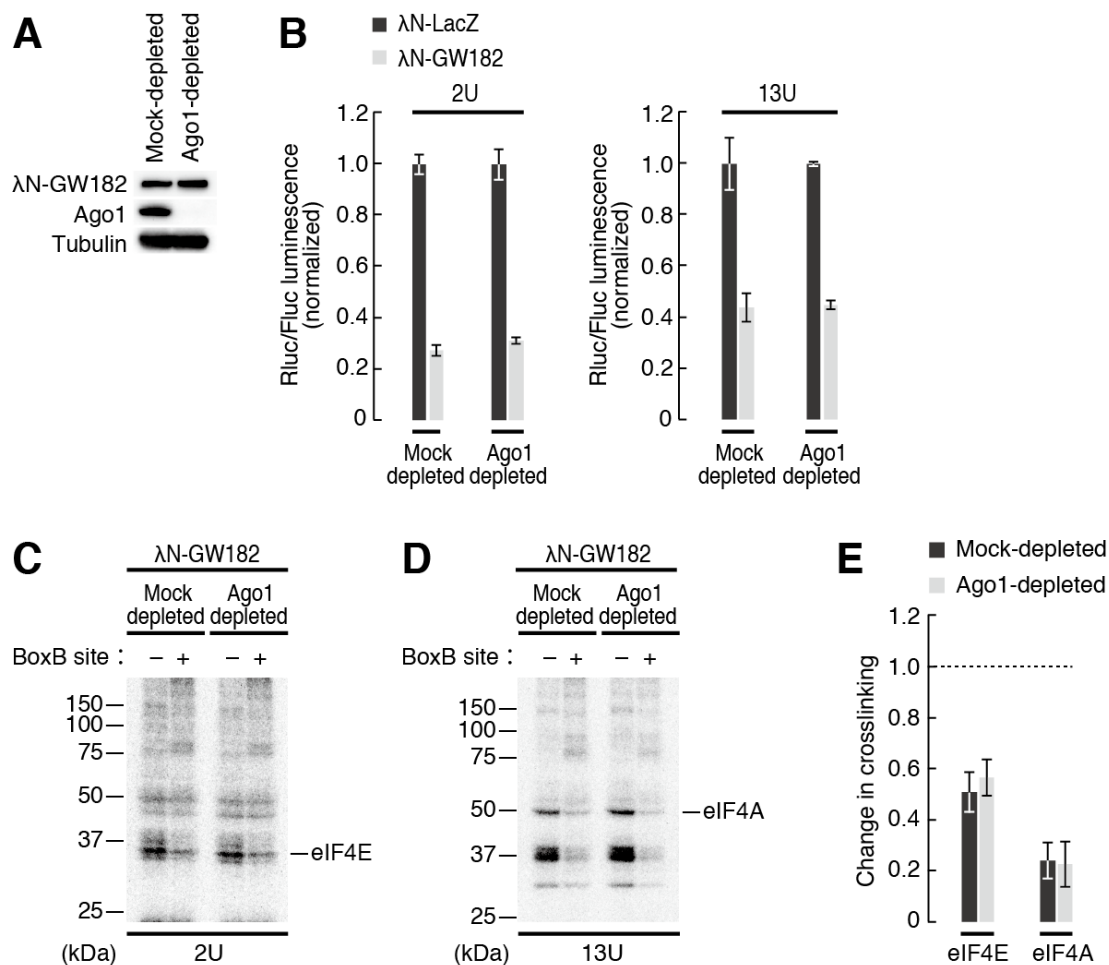


図 4-11. GW182 による eIF4E と eIF4A の解離は Ago1 非依存的である

(A) anti-Ago1 抗体によって、λN-GW182 を発現する S2 細胞抽出液中から内在性 Ago1 タンパク質を除去した。

(B) Ago1 非存在下での GW182 による翻訳抑制。

(C) Ago1 非存在下での eIF4E クロスリンク。GW182 は Ago1 非依存的に eIF4E のクロスリンクを阻害する。

(D) Ago1 非存在下での eIF4A クロスリンク。GW182 は Ago1 非依存的に eIF4A のクロスリンクを阻害する。

(E) GW182 による eIF4E、eIF4A クロスリンク効率の変動。(C)、(D) のシグナルを定量し、BoxB 配列を持たないレポーター mRNA の値に対する相対値を求めた。

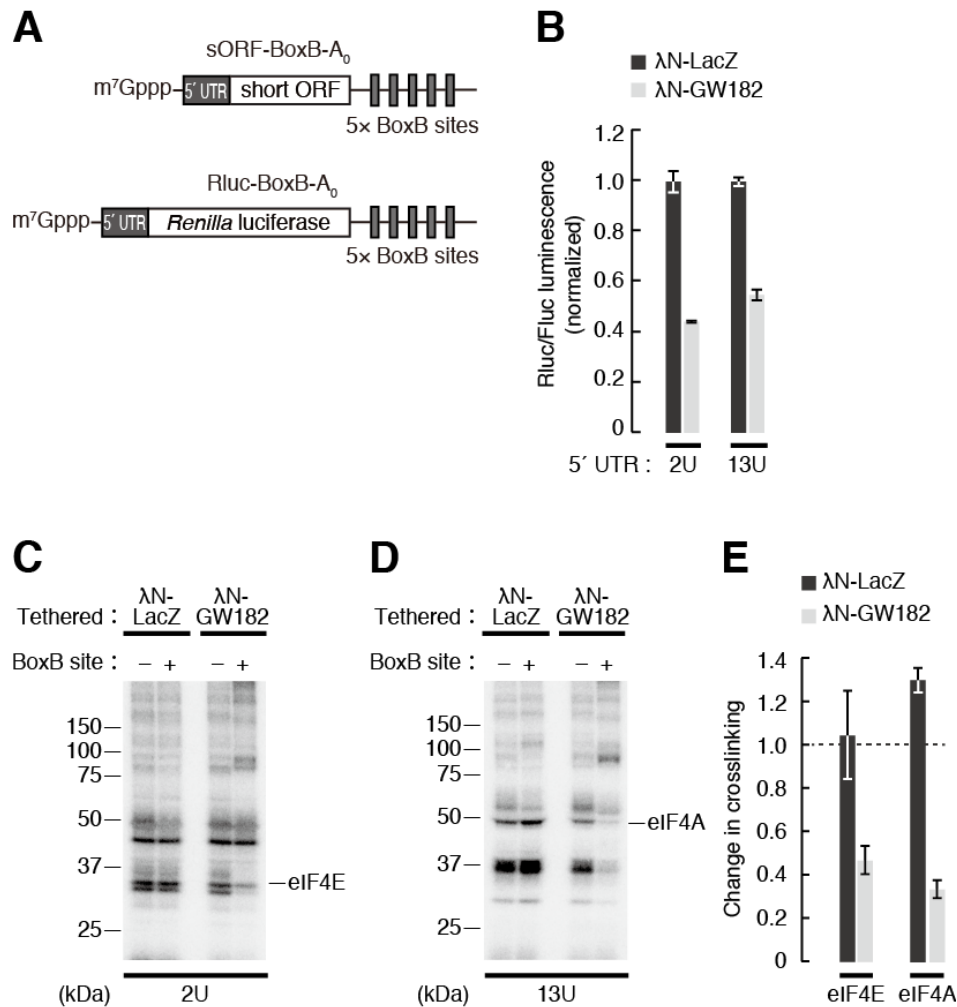


図 4-12. GW182 による eIF4E と eIF4A の解離は PABP 非依存的である

(A) sORF-BoxB-A₀、Rluc-BoxB-A₀ レポーター-mRNA の模式図。5' UTR の配列は図 4-1B に示すとおりである。

(B) ルシフェラーゼ解析により Rluc-2U、13U-BoxB-A₀ の翻訳活性を測定した。Rluc/Fluc 値は LacZ を作用させたときの値に対してノーマライズした。GW182 は poly(A)鎖の有無にかかわらず翻訳を抑制する。

(C) poly(A)鎖を持たないレポーター-mRNA への eIF4E クロスリンク。GW182 は poly(A)鎖の有無にかかわらず eIF4E のクロスリンクを阻害する。

(D) poly(A)鎖を持たないレポーター-mRNA への eIF4A クロスリンク。GW182 は poly(A)鎖の有無にかかわらず eIF4A のクロスリンクを阻害する。

(G) GW182 による eIF4E、eIF4A クロスリンク効率の変動。(C)、(D)のシグナルを定量し、BoxB 配列を持たないレポーター-mRNA の値に対する相対値を求めた。

4-5. 考察

本研究によって、Ago1-RISC は eIF4E による m⁷Gcap 構造の認識には影響を与えずに、RNA ヘリカーゼである eIF4A の解離を引き起こしていることが明らかとなった。一方 eIF4G に関しては、5'UTR を一塩基ずつスキヤニングして条件検討を行ったものの、UV クロスリンクによって検出することは不可能であった。しかし以前の解析から、eIF4G を直接 5'UTR に係留することで活性化される特殊な翻訳であっても、Ago1-RISC は翻訳抑制を引き起こすことが示されている (Fukaya and Tomari, 2012) (II 章)。このことから、Ago1-RISC は eIF4G が mRNA 上に呼び込まれるよりも下流において eIF4A の解離を引き起こしていることが考えられる。

eIF4A を解離させる分子機構としては、1) eIF4G-eIF4G 相互作用の阻害、2) eIF4A 自身の RNA 結合活性阻害、3) eIF4A の RNA 結合活性を促進するアクセサリタンパク質 (eIF4B、eIF4H) の阻害などが考えられるが、現時点ではその詳細は不明である。この点を明らかにするには、今後のさらなる解析が必要である。

Ago1-RISC による翻訳抑制は GW182 非依存的であることが過去に示されているが (Fukaya and Tomari, 2012; Wu et al., 2013)、今回の解析から eIF4A の解離も同じく GW182 非依存的であることが明らかとなった (図 4-6)。一方で、GW182 を直接 mRNA 上に係留することで、Ago1 非依存的に eIF4E と eIF4A の解離が引き起こされることが分かった (図 4-11)。GW182 は NOT1 との直接相互作用を介して、CCR4-NOT 複合体を標的 mRNA 上へと積極的に呼び込んでいる (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011)。興味深いことに、CCR4-NOT 複合体は、poly(A)鎖を分解する活性とは独立して、翻訳抑制を引き起こすことが報告されている (Cooke et al., 2010; Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011)。このことから、CCR4-NOT 複合体が GW182 依存的な翻訳抑制に関与する可能性が考えられている (Hafner et al., 2011)。実際に NOT1 ノックダウンや、NOT1 との相互作用を阻害する変異を GW182 へ導入することで、翻訳抑制が一部解除されることが報告されている (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Huntzinger et al., 2013; Zekri et al., 2013)。さらにごく最近、ヒト培養細胞において、CCR4-NOT 複合体と eIF4AII の相互作用が明らかになるなど (Meijer et al., 2013)、CCR4-NOT 複合体を介した翻訳抑制が盛んに

議論されている。現時点では、CCR4-NOT 複合体と eIF4AII の相互作用が果たす機能的意義や、他の生物種における保存性については明らかとなっていないが、以上の結果は CCR4-NOT 複合体が GW182 依存的な翻訳抑制に寄与する可能性を示唆している。しかし、CCR4-NOT 複合体は数 MDa におよぶ巨大複合体であり、どの構成因子が翻訳抑制活性を担っているかについては現時点では明らかとなっていない。少なくとも以前の解析から、poly(A)鎖分解活性サブユニットである CAF1 は翻訳抑制に必須ではないことが示唆されている (Fukaya and Tomari, 2012)(II 章)。一方 Ago1-RISC は、CCR4-NOT 複合体を呼び寄せることが出来ない GW182 ノックダウン下においても eIF4A の解離を引き起こすことから (図 4-6)、これらの因子を介さずに翻訳抑制を行っていると考えられる。この考えに一致して、GW182 と NOT1 のノックダウンを同時に行っても Ago1-RISC による翻訳抑制が阻害されないことが示されている (Fukaya and Tomari, 2012)(II 章)。翻訳開始因子複合体の形成を阻害する真のエフェクター因子を同定するためには、今後の更なる解析が必要である。

実験手法

プラスミドの作製

pUC57-Rluc-2U-A₁₁₄, pUC57-Rluc-2U-BoxB-A₁₁₄, pUC57-Rluc-2U-*let-7*-A₁₁₄, pUC57-sORF-2U-A₁₁₄, pUC57-sORF-2U-BoxB-A₁₁₄ and pUC57-sORF-2U-*let-7*-A₁₁₄

DNA 断片 (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGT AGA GAG AGG ATC CAT GGG GGG G-3') と (5'-CCC CCC CAT GGA TCC TCT CTC TAC TAT AGT GAG TCG TAT TAG AGC TCC CCC C-3') をアニーリングし、pUC57-Rluc-A₁₁₄, pUC57-Rluc-BoxB-A₁₁₄, pUC57-Rluc-*let-7*-A₁₁₄, pUC57-sORF-A₁₁₄, pUC57-sORF-BoxB-A₁₁₄, pUC57-sORF-*let-7*-A₁₁₄ (Fukaya and Tomari, 2011; Fukaya and Tomari, 2012) の *SacI*、*NcoI* 切断部位間に挿入した。

pUC57-Rluc-13U-A₁₁₄, pUC57-Rluc-13U-BoxB-A₁₁₄, pUC57-Rluc-13U-*let-7*-A₁₁₄, pUC57-sORF-13U-A₁₁₄, pUC57-sORF-13U-BoxB-A₁₁₄ and pUC57-sORF-13U-*let-7*-A₁₁₄

DNA 断片 (5'-GGG GGG AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA AGA GAG AGG ATC CAT GGG GGG G-3') と (5'-CCC CCC CAT GGA TCC TCT CTC TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAG AGC TCC CCC C-3') をアニーリングし、pUC57-Rluc-A₁₁₄, pUC57-Rluc-BoxB-A₁₁₄, pUC57-Rluc-*let-7*-A₁₁₄, pUC57-sORF-A₁₁₄, pUC57-sORF-BoxB-A₁₁₄, pUC57-sORF-*let-7*-A₁₁₄ (Fukaya and Tomari, 2011; Fukaya and Tomari, 2012) の *SacI*、*NcoI* 切断部位間に挿入した。

pCold I-eIF4E

全長の *eIF4E* タンパク質コード領域は、S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'-GCT CGG TAC CCA GCT GAT GCA GAG CGA CTT TCA CAG -3') と (5'-ATT CGG ATC CCT CGA CTA CAA AGT GTA GAT CGA TT -3') によって増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) によって *XhoI* で処理した pCold I (Takara Bio) 中へクローニングした。

pColdI-eIF4A

全長の *eIF4A* タンパク質コード領域は、S2 細胞 cDNA を鋳型としてプライマー (5'- GCT CGG TAC CCA GCT GAT GGA TGA CCG AAA TGA GAT -3') と (5'- ATT CGG ATC CCT CGA TTA AAT CAA ATC GGC AAT AT -3') によって増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) によって XhoI で処理した pCold I (Takara Bio) 中へクローニングした。

標的 mRNA の調製

標的 mRNA の 3' 末端が A₀ の場合は PstI、A₁₁₄-N₄₀ の場合は HindIII でプラスミドを処理し、それぞれを鋳型として T7-Scribe Standard RNA IVT Kit (Cellscript) によって転写反応を行った。ルシフェラーゼ解析に用いる mRNA は、ScriptCap m⁷G Capping System (Cellscript) によって 5' 末端に m⁷Gcap 構造を付加した。UV クロスリンク用のレポーター mRNA は、UTP の代わりに 4-thio-UTP (Jena Bioscience) を用いて転写反応を行い、ScriptCap m⁷G Capping System (Cellscript) と [α-³²P] GTP によって、放射性標識をもつ m⁷Gcap 構造を 5' 末端に付加した。放射性標識した mRNA 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 回洗った。細胞ペレットに対して等量の (10 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM KOAc, 1.5 mM Mg(OAc)₂, 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

10 ml の S2 細胞 (1x 10⁶ cells/ml) に対して、20 μg の二本鎖 RNA を添加した。24 時間後、X-tremeGENE HP (Roche) によって pAFW-Ago1 (Kawamata et al., 2009) を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。二本鎖 RNA の調製は (Fukaya and Tomari, 2012) に従った。

UV クロスリンク

5 μ l の細胞抽出液に対して、3 μ l の 40x reaction mix、1 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、~ 5 nM の放射性標識された標的 mRNA を 1 μ l 加え、さらに 25 °Cで 30 分間静置した。UV₃₆₅ Lamp (UVP)によって氷上で紫外光を15分間照射し、クロスリンク反応を誘導した。1 μ g の RNaseA (Nakarai)を加え、37°Cで 60 分間反応させた後、タンパク質を 10% SDS-PAGE によって分離した。放射線を PhosphorImager (FLA-7000; Fujifilm Life Science)によって検出し、画像を取得した。

タンパク質精製

His-eIF4E と His-eIF4A は、大腸菌株 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 時間培養した後、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 μ g/ml Pefabloc, 20 μ g/ml Pepstatin, 5 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml Leupeptin, 1x protease inhibitor cocktail [Roche], 5% glycerol)中にペレットを懸濁し、ソニケーションによって細胞を破碎後、4°C、1x 10⁴ g で 20 分遠心を行った。上清を回収し、His-tarp FF crude (GE Healthcare Bioscience)と Mono Q columns (GE Healthcare Biosciences)によってタンパク質を精製した。得られた精製タンパク質は PD-10 (GE Healthcare Bioscience)によって (1x lysis buffer, 30% glycerol, 1 mM DTT)中へと置換した。

抗体作製

全長の精製ショウジョウバエ eIF4A タンパク質を抗原として、ウサギポリクロナール anti-eIF4A 抗体を作製した (MBL)。

ウエスタンブロッティング

anti-FLAG 抗体 (1:5000; Sigma)、anti-HA 抗体 (1:5000; Covance)、anti-Ago1 抗体 (1:1000; (Miyoshi et al., 2005))、anti-GW182 抗体 (1:1000; (Miyoshi et al., 2009))、anti-eIF4E 抗体 (1:5000; (Nakamura et al., 2004))、anti-eIF4G 抗体 (1:5000)、anti-eIF4A 抗体 (1:5000)、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。

免疫沈降

あらかじめ anti-eIF4E 抗体、または anti-eIF4A 抗体と1時間反応させた dynabeads proteinG beads (Invitrogen)をクロスリンク反応液と混ぜ合わせ、4°C で2時間静置した。その後、ビーズを(1x lysis buffer, 400 mM NaCl, 400 mM KCl, 0.1 % Triton X-100)で3回洗い、1x lysis buffer で1回リンスした。サンプルは 10 % SDS-PAGE に泳動して解析した。

総合考察

5-1. 複数の抑制経路を介した転写後制御機構

本研究によって miRNA が GW182 依存的、非依存的な複数の異なる抑制経路を介して緻密に遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。では、このように複数の経路を介して働く転写後制御機構は、miRNA に限られた特殊な現象なのであろうか。このことを考えるため、代表的な例として *nanos*、*oskar* 遺伝子の発現制御について概説する。ショウジョウバエ初期胚の発生過程では、これらの遺伝子発現パターンは転写後段階で厳密に制御されている (図 5-1)。

nanos mRNA は母親から受精卵へと受け渡されるが、その発現は初期胚後軸にのみ限定されている (Wang and Lehmann, 1991)。この制御に必須なのが Smaug と呼ばれる RNA 結合タンパク質である (Smibert et al., 1996; Dahanukar et al., 1999; Smibert et al., 1999)。Smaug は *nanos* 3'UTR に存在する Smaug recognition element (SRE) と呼ばれるステムループ構造を認識し (Aviv et al., 2003; Green et al., 2003)、初期胚後軸以外でのタンパク質合成を阻害している。Smaug は miRNA と同様に、CCR4-NOT 複合体を介して poly(A)鎖の分解を引き起こすとともに (Semotok et al., 2005)、それとは独立して翻訳そのものを阻害している (Jeske et al., 2006; Jeske et al., 2011)。Smaug は eIF4E 結合タンパク質である CUP と複合体を形成することから (Nelson et al., 2004a)、CUP による eIF4E の機能阻害によって翻訳抑制を引き起こしていると考えられている。一方で、eIF4E 結合能を欠損した CUP であっても翻訳抑制を引き起こすことから (Igreja and Izaurralde, 2011)、eIF4E との相互作用に依存しない翻訳抑制経路の存在も示唆されている。興味深いことに、CUP を内在に発現していない S2 細胞抽出液を用いて解析を行ったところ (図 5-2A、B)、Smaug はそれ単独で poly(A)鎖の分解と (図 5-2C)、それとは独立した翻訳抑制を引き起こしていた (図 5-2D)。このことから Smaug は CUP 依存的、非依存的な複数の異なる経路を介して *nanos* 遺伝子の発現を緻密に制御していると考えられる。

初期胚後軸における *nanos* 遺伝子の発現は、Smaug による遺伝子発現抑制の局所的な解除によって制御されている。このとき、Oskar タンパク質 が Smaug の

RNA 結合能を阻害することで、*nanos* mRNA の脱抑制を引き起こしている (Dahanukar et al., 1999; Zaessinger et al., 2006)。Oksar による局所的な脱抑制を可能にするためには、*oskar* 遺伝子自身の発現も初期胚後軸に限定される必要がある (Ephrussi et al., 1991; Ephrussi and Lehmann, 1992; Smith et al., 1992)。*oskar* mRNA も *nanos* mRNA 同様、その発現が転写後段階で厳密に制御されている。この制御を担うのが Bruno と呼ばれる RNA 結合タンパク質である (Kim-Ha et al., 1995)。Bruno は *oskar* mRNA の Bruno response element (BRE) と呼ばれる配列を特異的に認識して、タンパク質合成を阻害している (Kim-Ha et al., 1995; Gunkel et al., 1998)。Bruno も Smaug と同じく、CUP との複合体形成を介して翻訳抑制を引き起こすことが知られている (Wilhelm et al., 2003; Nakamura et al., 2004)。一方で、CUP が存在しない条件下でも Bruno は翻訳抑制を引き起こすことができる (Chekulaeva et al., 2006)。さらに、*oskar* mRNA は翻訳段階だけではなく、poly(A)鎖の長さや mRNA の安定性レベルでの制御を受けていると考えられている (Chang et al., 1999; Juge et al., 2002; Castagnetti and Ephrussi, 2003)。興味深いことに、Bruno は 80S リボソーム近傍に新たな巨大 RNP 複合体を形成し、*oskar* mRNA を凝集させることが報告されている (Chekulaeva et al., 2006)。

このように miRNA に限らず、Smaug や Bruno といった RNA 結合タンパク質も複数の抑制経路を介して遺伝子発現を抑制している。また Bruno による巨大 RNP 複合体の形成は、miRNA による pseudo-polysome の形成と非常によく似ている (Thermann and Hentze, 2007; Moretti et al., 2010; Fukaya and Tomari, 2012; Moretti et al., 2012)。では、なぜ標的 mRNA の発現を制御するために、複数の抑制経路が存在しているのだろうか。ひとつの可能性として、パートナータンパク質との結合を制御することで、これらの因子が複数の抑制経路を使い分けていることが考えられる。興味深いことに近年、Akt-kinase を介した Ago タンパク質の磷酸化が GW182 との相互作用を制御することが報告された (Horman et al., 2013)。同様に GW182 も、自身の磷酸化によって結合パートナーとの相互作用が制御されていることが知られている (Huang et al., 2013)。さらに、細胞周期によって GW182 の発現量が大きく変動することや (Olejniczak et al., 2013)、血清除去などのストレスに応じて Ago タンパク質が GW182 を含まない別のエフェクター複合

体を形成することも報告されている (Wu et al., 2013)。このように、GW182 の有無を制御することで、細胞が積極的に複数の抑制経路を使い分けている可能性が考えられる。本研究からも、E3 Ubiquitin ligase である Hyd によって、GW182 の安定性が制御されていることが明らかとなった (Su et al., 2011; Fukaya and Tomari, 2012) (II 章)。今回はじめて、miRNA を介した複数の異なる抑制機構の存在が明らかとなったが、実際にそれらの働きが生体内でどのように制御されているかを解き明かすためには、今後の更なる解析が必要である。

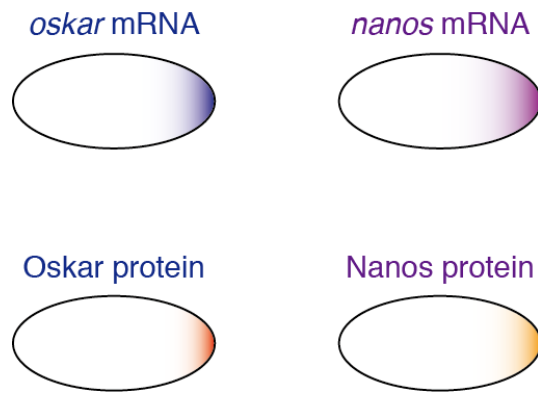


図 5-1. *oskar*、*nanos* 遺伝子は posterior pole にのみ発現する
oskar、*nanos* mRNAは母親から引き継がれ、初期胚posterior poleにのみ局所的に蓄積される。この制御には、mRNAの輸送だけではなく、他の部位におけるタンパク質合成を積極的に阻害することが必須である。

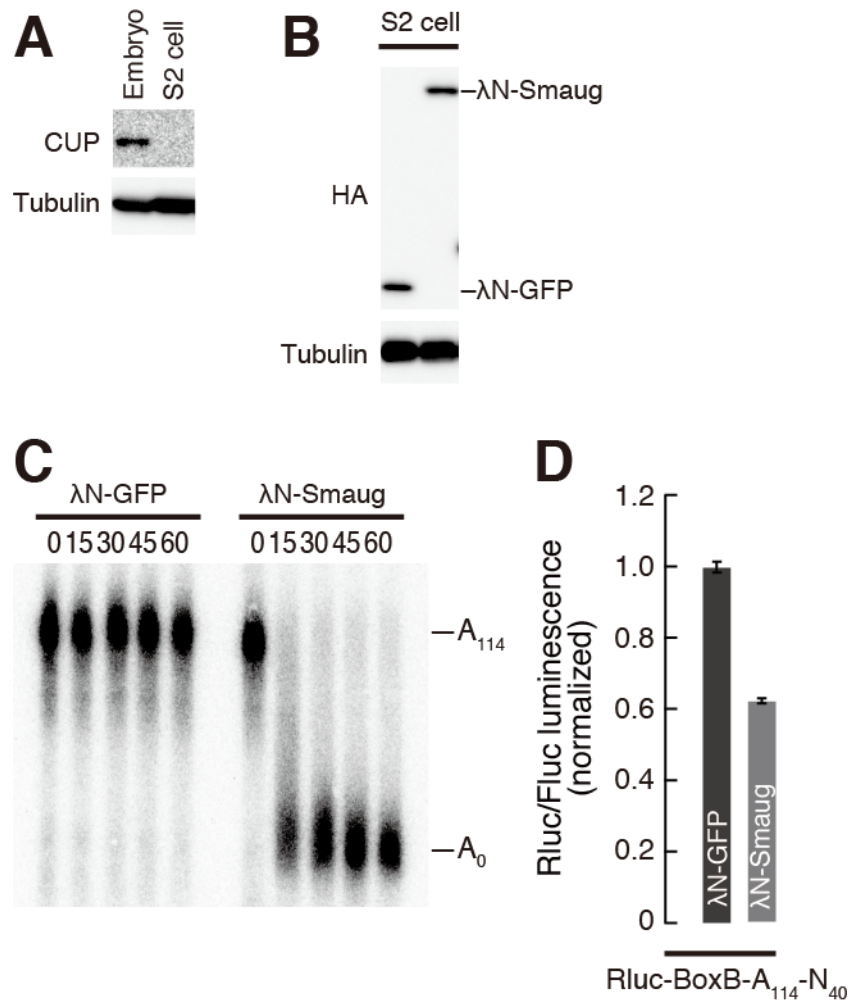


図 5-2. Smaug は CUP 非依存的に翻訳抑制と poly(A)鎖の分解を誘導する

(A) S2 細胞は内在に CUP を発現していない。

(B) λN-Smaug を発現する S2 細胞抽出液。

(C) Smaug は CUP 非依存的に poly(A)鎖の分解を引き起こす

(D) Smaug は CUP 非依存的に純粋な翻訳抑制を引き起こす。

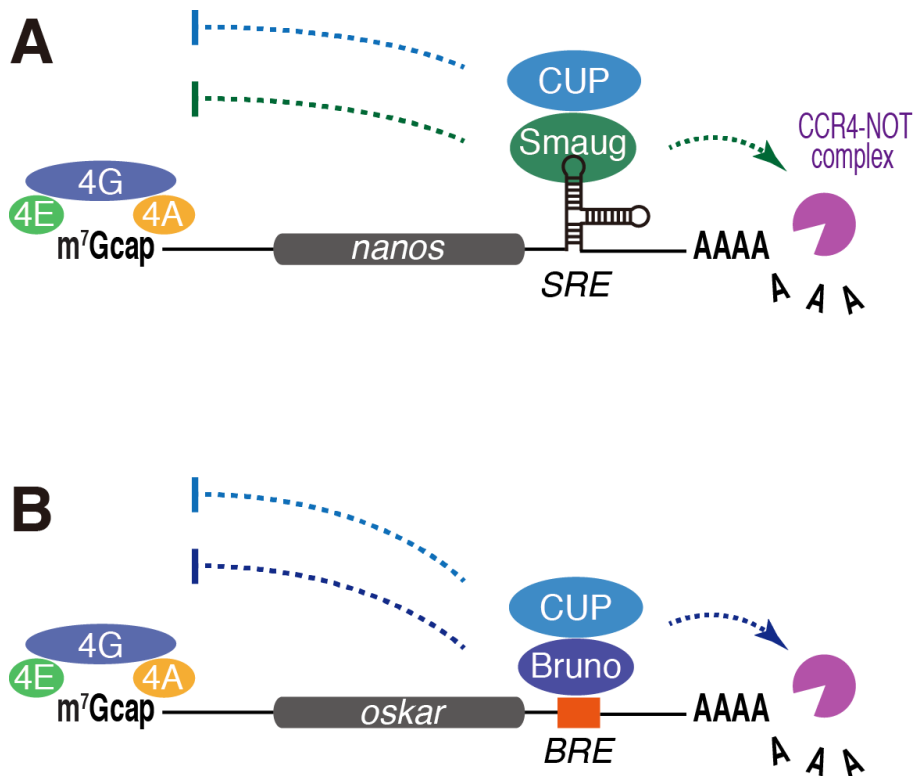


図 5-3. Smaug、Bruno による転写後発現制御

(A) Smaug は CUP と複合体を形成する。CUP は eIF4E 依存的、非依存的に翻訳を抑制する。さらに Smaug は、CUP 非依存的に翻訳抑制と poly(A)鎖の分解を誘導することができる。

(B) Bruno は CUP と複合体を形成し、翻訳抑制を引き起こす。また Bruno は、CUP 非依存的に翻訳抑制を引き起こすことができる。一方で、*oskar* mRNA の poly(A)鎖を制御する詳細な分子機構は明らかとなっていない。

5-2. 植物と動物の miRNA 経路

miRNA を介した遺伝子発現抑制は、動物から植物にまで広く保存されている。動物の miRNA は、標的 mRNA の 3'UTR に複数箇所存在する部分相補的な標的配列を認識し、翻訳抑制と poly(A)鎖の分解を引き起こす (図 5-4A)。標的配列との高い相補性によって、Ago タンパク質自身が切断反応を引き起こす miR-196 と *HoxB8* mRNA の例も報告されているが (Yekta et al., 2004)、このような miRNA を介した切断反応は、動物では例外的な現象であると考えられている。

一方で、植物の miRNA は一般的に標的配列に対する相補性が高く、Ago タンパク質自身が標的 mRNA を切断することによって遺伝子発現を抑制していると考えられている (Jones-Rhoades et al., 2006)。しかし近年の遺伝学的な解析から、植物 miRNA が標的 mRNA の切断反応とは独立に、タンパク質合成の阻害を引き起こすことが示された (Brodersen et al., 2008)。このとき、植物 miRNA は動物とは異なり、poly(A)鎖の分解を全く引き起こさずに、翻訳そのものを阻害している (Iwakawa and Tomari, 2013)。では何がこのような違いを生み出すのであろうか。動物では、miRNA が poly(A)鎖の分解を引き起こすためには、Ago 結合タンパク質である GW182 が必須である (Behm-Ansmant et al., 2006)。GW182 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、ヒトに及ぶまで動物種間で広く保存されており、CCR4-NOT 複合体との相互作用を介して poly(A)鎖の分解を誘導している (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011; Kuzuoglu-Ozturk et al., 2012; Mishima et al., 2012)。対照的に、植物には GW182 ホモログが存在せず、結果として poly(A)鎖分解酵素を標的 mRNA 上に呼び寄せることができないと考えられている。言い換えれば、植物 miRNA はショウジョウバエ Ago1-RISC 同様、poly(A)鎖の分解や GW182 非依存的に翻訳抑制を引き起こすことができる (Iwakawa and Tomari, 2013)。つまり、GW182 に依存しない翻訳抑制は、動植物間で保存された機構である可能性が考えられる。本研究から、ショウジョウバエ Ago1-RISC が eIF4A の解離を引き起こすことによって翻訳を阻害していることが示されたが、同様の分子機構が植物で保存されているかは現時点では分かっていない。

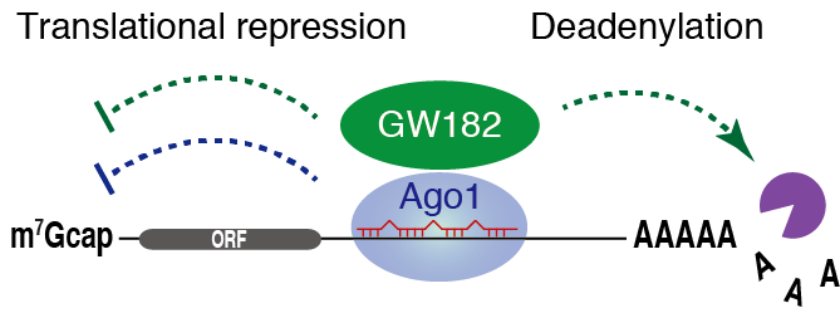
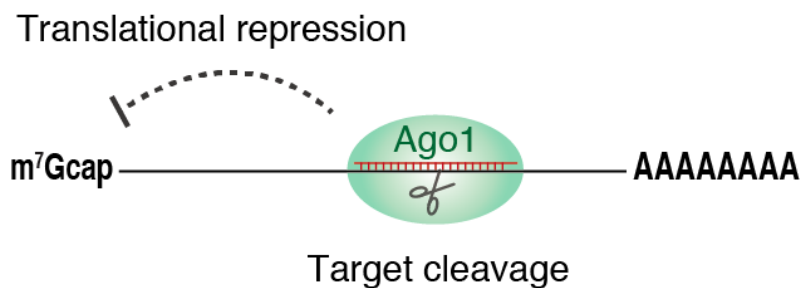
A**B**

図 5-4. 植物 miRNA は切断非依存的な翻訳抑制を引き起こす

(A) 動物 miRNA は poly(A)鎖の分解と翻訳抑制を引き起こす。poly(A)鎖の分解は GW182 依存的であるのに対し、翻訳抑制は GW182 依存的、および非依存的に進行する。

(B) 植物 miRNA は標的 mRNA の切断と翻訳抑制を引き起こす。動物とは異なり、植物 miRNA は poly(A)鎖の分解を引き起こさない。

5-3. GW タンパク質 を介した遺伝子発現制御

Ago タンパク質の 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 の N 末端にあるグリシン-トリプトファン (GW)リピートを認識して結合していると考えられている (Till et al., 2007; Schirle and MacRae, 2012)。実際、GW リピートに変異をもつ GW182 は、Ago タンパク質と相互作用できない (Takimoto et al., 2009; Chekulaeva et al., 2010)。GW182 以外にも、分裂酵母やシロイヌナズナにおいて、GW リピートを介して Ago タンパク質と結合する他の因子が知られている。分裂酵母の siRNA は、核内でヒストン H3 の 9 番目リジン残基にメチル基を導入することによって、転写段階で遺伝子発現を抑制している (Verdel et al., 2004)。このとき、Ago タンパク質は Tas3 と呼ばれる Ago 結合タンパク質と複合体を形成して機能を発揮する (Verdel et al., 2004)。Tas3 は GW182 同様、N 末端領域の GW リピートを介して Ago タンパク質と結合しており、この相互作用が siRNA による核内制御に必須である (Partridge et al., 2007)([図 5-5](#))。同様に、シロイヌナズナ Ago4 は24塩基の siRNA を介して、核内で DNA をメチル化することによって、転写段階で遺伝子発現を抑制している (Zilberman et al., 2003; Chan et al., 2004; Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2004)。Ago4 タンパク質は RNA polymerase IVb 構成サブユニットである NRPE1 や、転写伸長因子である SPT5 と GW リピートを介して結合しており、これらの相互作用が核内での機能発揮に重要な役割を果たしている (Li et al., 2006; El-Shami et al., 2007; Bies-Etheve et al., 2009)([図 5-6](#))。近年の *in silico* 解析から、この他にも、GW リピートを介してシロイヌナズナ Ago タンパク質と結合する因子が予測されている (Karlowski et al., 2010)。実際、Zn-finger タンパク質である NERD や、RNA ヘリカーゼである SDE3 が、GW リピートを介して Ago タンパク質へと結合し、植物における小分子 RNA の機能発揮に寄与することが明らかとなっている (Garcia et al., 2012; Pontier et al., 2012)。このように Ago タンパク質のトリプトファン結合ポケットは、他の制御因子を呼び込むための足場となっている。さらに、GW リピートを介した Ago タンパク質との相互作用は、ウイルスなどの外来因子による制御の場としても機能している。植物病原体である Turnip crinckle virus がコードする P38 は、GW リピートを介してシロイヌナズナ Ago タンパク質と結合し、その機能を抑制すること

で、植物が本来持つウイルス抵抗性を阻害している (Azevedo et al., 2010)。ヒトにおいても、プリオンタンパク質が GW リピートを介して Ago タンパク質と結合し、その局在を制御することが示唆されている (Gibbings et al., 2012)。一方、ショウジョウバエでは、GW182 の他に GW リピートをもつ因子はこれまで報告されていない。興味深いことに近年、シロイヌナズナにおいて SUO と呼ばれる GW リピートタンパク質が、miRNA による切断非依存的な翻訳抑制に寄与することが報告された (Yang et al., 2012)。つまり植物 miRNA の機能発揮には、GW182 とは異なる他の GW リピートタンパク質が寄与する可能性が示唆されている。本研究からも、ショウジョウバエ Ago1-RISC による GW182 非依存的な翻訳抑制に、GW182 とは別の GW リピートタンパク質が関与することが示唆されている (Fukaya and Tomari, 2012)(II 章)。しかし、シロイヌナズナ SUO は動物には保存されておらず、単なる相同性によって新たな因子を同定することは難しい。そこで、ショウジョウバエにおける網羅的なスクリーニング解析から見つかった新規因子候補を (Zhou et al., 2008)、GW リピートを予測するアルゴリズム(Zielezinski and Karlowski, 2011)によって解析したところ、その中から新たに GW リピートを含むものが見つかった (図 5-7)。現時点では、miRNA 経路におけるこれらの因子の役割は不明であるが、興味深いことに Hrp48 は *oskar* mRNA の翻訳抑制に寄与すること報告されている (Yano et al., 2004)。

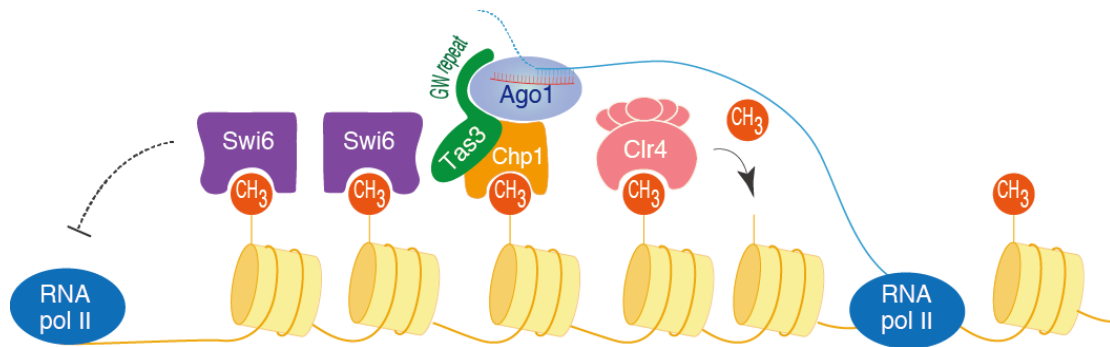


図 5-5. 分裂酵母 RNAi 経路の模式図

siRNA を取り込んだ Ago1 は核内で新生転写産物を認識し、GW タンパク質である Tas3 や Chp1 と複合体を形成する。Clr4 がヒストン H3 の 9 番目リジン残基をメチル化し、Swi6 が H3K9me3 を認識することで、転写活性が抑制されたクロマチン状態となる。

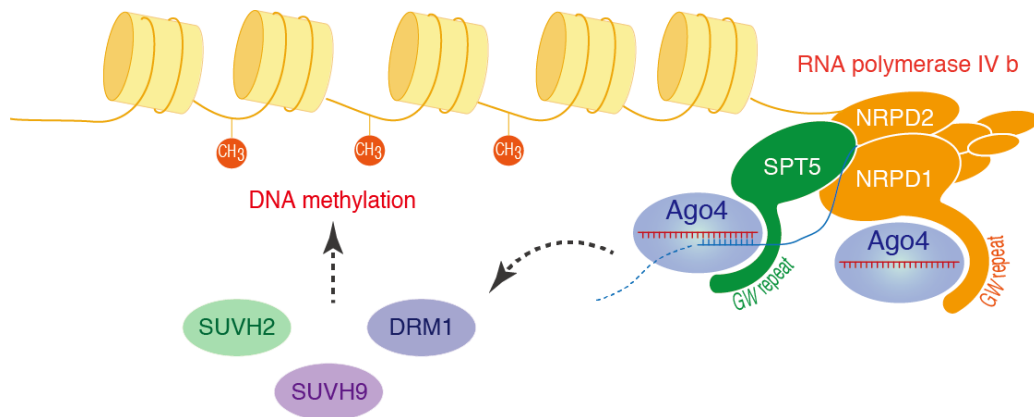


図 5-6. シロイヌナズナ Ago4 経路の模式図

24 塩基の siRNA を取り込んだ Ago4 は核内で、GW タンパク質である NRPD1 や SPT5 と結合し、新生転写産物を認識することで DNA のメチル化を引き起こす。

Hrp36

MAEQNDSNGNYDDGEEITEPEQLRKLFIGGLDYRTTDDGLKAHFEEKWGNIVDVVVMKDPKTKRSRGGFITYSQS
YMIDNAQNRPHKIDGRVVEPKRAVPRQIDSPNAGATVKKLFGVGLRDDHDEECLREYFKDFGQIVSVNIVSDK
DTGKKRGFAFIEFDDYDPVDKILQKTHSIKNTLDVKKAIKQMDRQGGGGGGRRGGPRAGGRGGQDGRGQGGG
GWWGQNRQNGGGNWWGAGGGGGFGNSGGNFGGGQGGGGSGWNQQGGSGGGPWNNQGGGNGWNGGG
GGGYGGGNSNGSWWGNGGGGGGGGGFGNEYQQSYGGGPQRNSNFGNRRPAPYSQGGGGGGFNKGNQGGG
QGFAGNNYNTGGGGQGGNMGGGNRRY

Hrp38

MGGHDNWNNGQNEEQDDFPQDSITEPEHMRKLFIGGLDYRTTDENLKAHFEEKWGNIVDVVVMKDPRTKRSRGGF
GFITYSHSSMIDEAQKSRPHKIDGRVVEPKRAVPRQIDSPNAGATVKKLFGVGLKDDHDEEQSIRDYFQHFGNIVD
INIVIDKETGKKRGFAFVEFDDYDPVDKVVLLQKQHLNKGKMDVVKKALPKQNDQQGGGGGGRRGGPGRAGGNRG
NMGGGNYGNQNGGGNWNNGGNWGNRRGGNDNWNNSFGGGGGGGGGYGGGNSWGNPNPDNNGNG
GGNFGGGGNWNNGGDFGGYQQNYGGGPQRGGGNFNRRMQPYQGGGGGFKAGGGNQGNYGGNNQGFN
NGGNRRY

Hrp48

MEEDERGLKLVGGLSWETTQENLSRYFCRFGDIIDCVVMKNNESGRSRGGFVTFADPTNVNHLQNGPHTLD
GRTIDPKPCNPRTLQPKKGGGYKVFGLGLPSNVTETDLRTFFNRYGKVTENVIMYDQEKKSRGGFGLSFEES
SVEHVTNERYINLNGKQVEIKKAEPDGSQQNSNNSVGGAYGKLGNECSHWGPHHAPINMMQQQNGQMGG
PPLNMPGAPNMMPGYQGGTSPQQQYGYNSGPGSYQGGWAPPGPQGGPPQWSNYAGPQQTQGGYGGYD
MYNSTSTGAPSGPSGGGSWNSWNMPPNSAGPTGAPGAGATATDMYSRAQAWATGGPSTTGPVGGMPRTGP
GNSASKSGSEYDGGYGGSYDYDYSNYVKQEGASNYGAGPRSAYGNDSSQPPYATSQAV

GW182 (1-592)

MREALFSQDGGWCQHVNQDTNWEVPSSPEPANKDAPGPPMVKPSINNGTDLWESNLRNGGQPAQQVVKPS
WGHTPSSNLGGTWGEDDDGADSSSVWTGGAVSNAGSGAAVGNQAGVNVGPGGVVSSGGPQWGGQVVG
LGSTGGNGSSNITGSSGVATGSSGNSSNAGNGWGDPREIRPLGVGGSMDIRNVEHRGGNGSGATSSDPRDIRM
IDPRDPIRGDPRGISGRLNGTSEMWHHPQMSHNQLQGINKMVGQSVATASTSVGTSGSGIGPGGPGPSTVSGN
IPTQWGPAPVSVGVSGPKDMSKQISGWEESPQQRRSIPNYDDGTSLWQQTRVPAASGHWKDMTDSIGRS
SHLMRGQSQTGGIGIAGVGNNSVPVGANPSNPISVVGPQARIPSVGGVQHKPDGGAMVHSGNVGGRNNVAA
VTTWGGDDTHSVNVGAPSSGSVSSNNWVDDKSNSTLAQNSWSDPAPVGSWGNKQSKPPNSASSGWSTAAG
VVDGVDLGSEWNTHGGIIGKSQQQKLAGLNVGMVNVINAEIHKQSKQYRILVENGFKKEDVERALVIANMNIEEAA
DMLRANSSLS

図 5-7. ショウジョウバエ新規 GW タンパク質の同定

hnRNP タンパク質である Hrp36、Hrp38、Hrp48 は複数の GW リポートを持つ。現時点では、小分子 RNA 経路におけるこれらの役割は明らかになっていない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始親身にご指導を頂いた泊幸秀教授に心から感謝致します。5年間の研究生活は、必ずしも楽しいことばかりではありませんでしたが、人間として、研究者として成長するための数多くのきっかけを与えて頂きました。2014年の春からはバークレーに移りますが、新天地で良い仕事をするのが泊さんへの恩返しであると思っています。これまで学んだことを糧に、新たな研究分野へと挑戦してきたいと思います。

研究室のメンバーにも心から感謝します。科学と真摯に向き合い、切磋琢磨できる先輩、後輩、同期に恵まれたことを、本当に幸運であったと思います。実験の補助をして頂いた三富さん、清川さん、加藤さん、田代さん、秘書の丸山さん、武田さんにもこの場を借りて感謝致します。皆さんの献身的な仕事に助けて頂いた場面が数多くありました。

また、本研究の遂行にあたって、ご協力頂いた以下の皆様に感謝致します。

Marina Chekulaeva 博士 (The Berlin Institute for Medical Systems Biology)
pAC.5.1- λ N-HA-LacZ、GW182、Fluc-BoxB

Elisa Izaurralde 博士 (Max Planck Institute)
GW182 Δ C(1-592)発現プラスミド

Claudia Temme 博士、Elmar Wahle 博士 (Martin Luther University)
anti-CAF1 抗体、anti-CCR4 抗体、anti-NOT1 抗体

中村輝博士 (熊本大学)
anti-eIF4E 抗体、anti-eIF4G 抗体

Matthias Hentze 博士 (EMBL)
anti-PABP 抗体

塩見美喜子博士 (東京大学)、塩見春彦博士 (慶応大学)
anti-Ago1 抗体、anti-GW182 抗体

Jerry Pelletier 博士 (McGill University)、田中淳一博士 (琉球大学)
hippuristanol

最後に、いつも温かく見守ってくれた家族に心から感謝します。

引用文献

- Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57, 49-57.
- Ambros, V., and Horvitz, H. R. (1987). The *lin-14* locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes Dev* 1, 398-414.
- Arasu, P., Wightman, B., and Ruvkun, G. (1991). Temporal regulation of *lin-14* by the antagonistic action of two other heterochronic genes, *lin-4* and *lin-28*. *Genes Dev* 5, 1825-1833.
- Aviv, T., Lin, Z., Lau, S., Rendl, L. M., Sicheri, F., and Smibert, C. A. (2003). The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nat Struct Biol* 10, 614-621.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T., and Voinnet, O. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24, 904-915.
- Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22, 2773-2785.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bazzini, A. A., Lee, M. T., and Giraldez, A. J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233-237.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-1898.
- Beilharz, T. H., Humphreys, D. T., Clancy, J. L., Thermann, R., Martin, D. I., Hentze, M. W., and Preiss, T. (2009). microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One* 4, e6783.
- Bethune, J., Artus-Revel, C. G., and Filipowicz, W. (2012). Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep* 13, 716-723.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Betancur, J. G., and Tomari, Y. (2012). Dicer is dispensable for asymmetric RISC loading in mammals. *RNA* 18, 24-30.
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124.
- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., and

- Lagrange, T. (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep* 10, 649-654.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* 17, 170-180.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Bordeleau, M. E., Mori, A., Oberer, M., Lindqvist, L., Chard, L. S., Higa, T., Belsham, G. J., Wagner, G., Tanaka, J., and Pelletier, J. (2006). Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* 2, 213-220.
- Borman, A. M., Michel, Y. M., and Kean, K. M. (2000). Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* 28, 4068-4075.
- Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* 44, 120-133.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
- Castagnetti, S., and Ephrussi, A. (2003). Orb and a long poly(A) tail are required for efficient oskar translation at the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 130, 835-843.
- Chan, S. W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L. K., Carrington, J. C., and Jacobsen, S. E. (2004). RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303, 1336.
- Chang, J. S., Tan, L., and Schedl, P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, Orb, is required for Oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol* 215, 91-106.
- Chekulaeva, M., Filipowicz, W., and Parker, R. (2009). Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA* 15, 794-803.
- Chekulaeva, M., Hentze, M. W., and Ephrussi, A. (2006). Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* 124, 521-533.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J. T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1218-1226.
- Chekulaeva, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2010). The GW/WG repeats of *Drosophila* GW182 function as effector motifs for miRNA-mediated

- repression. *Nucleic Acids Res* 38, 6673-6683.
- Chen, C. Y., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A. B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1160-1166.
- Chendrimada, T. P., Finn, K. J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R. I., Liebhaber, S. A., Pasquinelli, A. E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823-828.
- Cooke, A., Prigge, A., and Wickens, M. (2010). Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem* 285, 28506-28513.
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., and Brennecke, J. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453, 798-802.
- Dahanukar, A., Walker, J. A., and Wharton, R. P. (1999). Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. *Mol Cell* 4, 209-218.
- De Gregorio, E., Preiss, T., and Hentze, M. W. (1999). Translation driven by an eIF4G core domain in vivo. *EMBO J* 18, 4865-4874.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., and Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Ding, X. C., and Grosshans, H. (2009). Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* 28, 213-222.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237-240.
- Duncan, K. E., Strein, C., and Hentze, M. W. (2009). The SXL-UNR corepressor complex uses a PABP-mediated mechanism to inhibit ribosome recruitment to *msl-2* mRNA. *Mol Cell* 36, 571-582.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elkayam, E., Kuhn, C. D., Tocilj, A., Haase, A. D., Greene, E. M., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150, 100-110.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M. A., Jacobsen, S. E., Cooke, R., and Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21, 2539-2544.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., and Lehmann, R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant *nanos*. *Cell* 66, 37-50.
- Ephrussi, A., and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by *oskar*. *Nature* 358, 387-392.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27, 3970-3981.

- Eulalio, A., Helms, S., Fritsch, C., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009a). A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* *15*, 1067-1077.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 346-353.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009b). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* *15*, 21-32.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S. F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* *21*, 2558-2570.
- Eulalio, A., Triteschler, F., Buttner, R., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., and Truffault, V. (2009c). The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res* *37*, 2974-2983.
- Eystathiou, T., Chan, E. K., Tenenbaum, S. A., Keene, J. D., Griffith, K., and Fritzier, M. J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* *13*, 1338-1351.
- Eystathiou, T., Jakymiw, A., Chan, E. K., Seraphin, B., Cougot, N., and Fritzier, M. J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* *9*, 1171-1173.
- Fabian, M. R., Cieplak, M. K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T. F., and Sonenberg, N. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1211-1217.
- Fabian, M. R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J. T., Svitkin, Y. V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J. A., Chen, C. Y., Shyu, A. B., Yates, J. R. r., Hannon, G. J., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., and Sonenberg, N. (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* *35*, 868-880.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Forstemann, K., Horwich, M. D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P. D. (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct Argonaute complexes after production by Dicer-1. *Cell* *130*, 287-297.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V. V., Denli, A. M., Bratu, D. P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W. E., and Zamore, P. D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* *3*, e236.
- Frank, F., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* *465*, 818-822.

- Fukaya, T., and Tomari, Y. (2011). PABP is not essential for microRNA-mediated translational repression and deadenylation *in vitro*. *EMBO J* *30*, 4998-5009.
- Fukaya, T., and Tomari, Y. (2012). MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in *Drosophila*. *Mol Cell* *48*, 825-836.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2006). Essential function *in vivo* for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat Immunol* *7*, 590-597.
- Garcia, D., Garcia, S., Pontier, D., Marchais, A., Renou, J. P., Lagrange, T., and Voinnet, O. (2012). Ago hook and RNA helicase motifs underpin dual roles for SDE3 in antiviral defense and silencing of nonconserved intergenic regions. *Mol Cell* *48*, 109-120.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L., Zapp, M. L., Weng, Z., and Zamore, P. D. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* *320*, 1077-1081.
- Gibbings, D., Leblanc, P., Jay, F., Pontier, D., Michel, F., Schwab, Y., Alais, S., Lagrange, T., and Voinnet, O. (2012). Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 517-24, S1.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* *68*, 913-963.
- Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J., and Schier, A. F. (2006). Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* *312*, 75-79.
- Gray, N. K., Coller, J. M., Dickson, K. S., and Wickens, M. (2000). Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation *in vivo*. *EMBO J* *19*, 4723-4733.
- Gray, N. K., and Hentze, M. W. (1994). Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J* *13*, 3882-3891.
- Green, J. B., Gardner, C. D., Wharton, R. P., and Aggarwal, A. K. (2003). RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Mol Cell* *11*, 1537-1548.
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235-240.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23-34.
- Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F. H., Olsen, L. C., and Ephrussi, A. (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of *oskar* mRNA. *Genes Dev* *12*, 1652-1664.
- Hafner, M., Ascano, M. J., and Tuschl, T. (2011). New insights in the mechanism of microRNA-mediated target repression. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1181-1182.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., and Kim, V. N. (2004). The

- Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016-3027.
- Hartig, J. V., Esslinger, S., Bottcher, R., Saito, K., and Forstemann, K. (2009). Endo-siRNAs depend on a new isoform of loquacious and target artificially introduced, high-copy sequences. *EMBO J* 28, 2932-2944.
- Hartig, J. V., and Forstemann, K. (2011). Loqs-PD and R2D2 define independent pathways for RISC generation in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 39, 3836-3851.
- Hernandez, G., Vazquez-Pianzola, P., Sierra, J. M., and Rivera-Pomar, R. (2004). Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* 10, 1783-1797.
- Horman, S. R., Janas, M. M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I. J., Sever, M. J., Morrissey, D. V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., Qi, H. H., Miraglia, L. J., Novina, C. D., and Orth, A. P. (2013). Akt-mediated phosphorylation of Argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of microRNA targets. *Mol Cell* 50, 356-367.
- Huang, K. L., Chadee, A. B., Chen, C. Y., Zhang, Y., and Shyu, A. B. (2013). Phosphorylation at intrinsically disordered regions of PAM2 motif-containing proteins modulates their interactions with PABPC1 and influences mRNA fate. *RNA* 19, 295-305.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16961-16966.
- Huntzinger, E., Braun, J. E., Heimstadt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J* 29, 4146-4160.
- Huntzinger, E., Kuzuoglu-Ozturk, D., Braun, J. E., Eulalio, A., Wohlbold, L., and Izaurralde, E. (2013). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res* 41, 978-994.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
- Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C., and Zamore, P. D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.
- Igreja, C., and Izaurralde, E. (2011). CUP promotes deadenylation and inhibits decapping of mRNA targets. *Genes Dev* 25, 1955-1967.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T., and Ishikawa, M. (2010). *In vitro* assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* 39, 282-291.
- Iwakawa, H. O., and Tomari, Y. (2013). Molecular Insights into microRNA-Mediated Translational Repression in Plants. *Mol Cell* 52, 591-601.
- Iwasaki, S., Kawamata, T., and Tomari, Y. (2009). *Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol*

- Cell 34, 58-67.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39, 292-299.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J., and Chan, E. K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.
- Janas, M. M., Wang, E., Love, T., Harris, A. S., Stevenson, K., Semmelmann, K., Shaffer, J. M., Chen, P. H., Doench, J. G., Yerramilli, S. V., Neuberg, D. S., Iliopoulos, D., Housman, D. E., Burge, C. B., and Novina, C. D. (2012). Reduced Expression of Ribosomal Proteins Relieves MicroRNA-Mediated Repression. *Mol Cell* 46, 171-186.
- Jeske, M., Meyer, S., Temme, C., Freudenreich, D., and Wahle, E. (2006). Rapid ATP-dependent deadenylation of nanos mRNA in a cell-free system from *Drosophila* embryos. *J Biol Chem* 281, 25124-25133.
- Jeske, M., Moritz, B., Anders, A., and Wahle, E. (2011). Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *EMBO J* 30, 90-103.
- Jiang, F., Ye, X., Liu, X., Fincher, L., McKearin, D., and Liu, Q. (2005). Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev* 19, 1674-1679.
- Jinek, M., and Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405-412.
- Jinek, M., Fabian, M. R., Coyle, S. M., Sonenberg, N., and Doudna, J. A. (2010). Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 238-240.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.
- Juge, F., Zaessinger, S., Temme, C., Wahle, E., and Simonelig, M. (2002). Control of poly(A) polymerase level is essential to cytoplasmic polyadenylation and early development in *Drosophila*. *EMBO J* 21, 6603-6613.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19, 104-113.
- Karlowski, W. M., Zielezinski, A., Carrere, J., Pontier, D., Lagrange, T., and Cooke, R. (2010). Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 38, 4231-4245.
- Kawamata, T., Seitz, H., and Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 16, 953-960.
- Kawamata, T., and Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem Sci* 35, 368-376.
- Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, T. N., Siomi, M. C., and Siomi, H. (2008). *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature* 453, 793-797.

- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y. V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001a). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21, 5200-5213.
- Khaleghpour, K., Svitkin, Y. V., Craig, A. W., DeMaria, C. T., Deo, R. C., Burley, S. K., and Sonenberg, N. (2001b). Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* 7, 205-216.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P. M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81, 403-412.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G. D., Kosik, K. S., Church, G. M., and Ruvkun, G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 360-365.
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kong, Y. W., Cannell, I. G., de Moor, C. H., Hill, K., Garside, P. G., Hamilton, T. L., Meijer, H. A., Dobbyn, H. C., Stoneley, M., Spriggs, K. A., Willis, A. E., and Bushell, M. (2008). The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8866-8871.
- Kozlov, G., Safaee, N., Rosenauer, A., and Gehring, K. (2010). Structural basis of binding of P-body-associated proteins GW182 and ataxin-2 by the Mille domain of poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 285, 13599-13606.
- Kuzuoglu-Ozturk, D., Huntzinger, E., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2012). The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic Acids Res* 40, 5651-5665.
- Kwak, P. B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19, 145-151.
- Lazzaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* 15, 1059-1066.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21,

4663-4670.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060.
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2004b). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* **117**, 69-81.
- Leuschner, P. J., Ameres, S. L., Kueng, S., and Martinez, J. (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* **7**, 314-320.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798.
- Lian, S. L., Li, S., Abadal, G. X., Pauley, B. A., Fritzier, M. J., and Chan, E. K. (2009). The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA* **15**, 804-813.
- Li, C. F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I. R., Bernatavichute, Y. V., Chan, S. W., Lagrange, T., Pikaard, C. S., and Jacobsen, S. E. (2006). An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **126**, 93-106.
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R. r., Parker, R., and Hannon, G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* **7**, 1261-1266.
- Liu, Q., Rand, T. A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H. E., Smith, D. P., and Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* **301**, 1921-1925.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98.
- Ma, J. B., Ye, K., and Patel, D. J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**, 318-322.
- Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**, 666-670.
- Maroney, P. A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T. W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1102-1107.
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J., and Duronio, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**, 843-854.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., and Sonenberg, N. (2007). microRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**, 1764-1767.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., and Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-620.

- Meijer, H. A., Kong, Y. W., Lu, W. T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S. W., Godfrey, J. D., Willis, A. E., and Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* *340*, 82-85.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P. Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2005). Identification of novel Argonaute-associated proteins. *Curr Biol* *15*, 2149-2155.
- Mishima, Y., Fukao, A., Kishimoto, T., Sakamoto, H., Fujiwara, T., and Inoue, K. (2012). Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 1104-1109.
- Mishima, Y., Giraldez, A. J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A. F., and Inoue, K. (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* *16*, 2135-2142.
- Miyoshi, K., Okada, T. N., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2009). Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *RNA* *15*, 1282-1291.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J. V., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2010a). Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*. *RNA* *16*, 506-515.
- Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* *19*, 2837-2848.
- Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2010b). A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 1024-1026.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., and Hentze, M. W. (2012). PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat Struct Mol Biol*
- Moretti, F., Thermann, R., and Hentze, M. W. (2010). Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA* *16*, 2493-2502.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V., and Sonenberg, N. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4G1 constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* *20*, 468-477.
- Murata, T., Nagaso, H., Kashiwabara, S., Baba, T., Okano, H., and Yokoyama, K. K. (2001). The *hiiragi* gene encodes a poly(A) polymerase, which controls the formation of the wing margin in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* *233*, 137-147.
- Murata, T., Ogura, K., Murakami, R., Okano, H., and Yokoyama, K. K. (1996). *hiiragi*, a gene essential for wing development in *Drosophila melanogaster*, affects the Notch cascade. *Genes Genet Syst* *71*, 247-254.
- Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Developmental cell* *6*, 69-78.

- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., and Patel, D. J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* *486*, 368-374.
- Nelson, M. R., Leidal, A. M., and Smibert, C. A. (2004a). *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J* *23*, 150-159.
- Nelson, P. T., Hatzigeorgiou, A. G., and Mourelatos, Z. (2004b). miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA* *10*, 387-394.
- Nissan, T., and Parker, R. (2008). Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA* *14*, 1480-1491.
- Nottrott, S., Simard, M. J., and Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 1108-1114.
- Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* *107*, 309-321.
- Okamura, K., Chung, W. J., Ruby, J. G., Guo, H., Bartel, D. P., and Lai, E. C. (2008). The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* *453*, 803-806.
- Olejniczak, S. H., La Rocca, G., Gruber, J. J., and Thompson, C. B. (2013). Long-lived microRNA-Argonaute complexes in quiescent cells can be activated to regulate mitogenic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 157-162.
- Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* *216*, 671-680.
- Omer, A. D., Janas, M. M., and Novina, C. D. (2009). The chicken or the egg: microRNA-mediated regulation of mRNA translation or mRNA stability. *Mol Cell* *35*, 739-740.
- Parker, J. S., Roe, S. M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J* *23*, 4727-4737.
- Parker, J. S., Roe, S. M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663-666.
- Partridge, J. F., DeBeauchamp, J. L., Kosinski, A. M., Ulrich, D. L., Hadler, M. J., and Noffsinger, V. J. (2007). Functional separation of the requirements for establishment and maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol Cell* *26*, 593-602.
- Pause, A., Methot, N., Svitkin, Y., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J* *13*, 1205-1215.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., and Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* *21*, 533-542.
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W., and Sontheimer, E. J.

- (2004). A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* *117*, 83-94.
- Piao, X., Zhang, X., Wu, L., and Belasco, J. G. (2010). CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol* *30*, 1486-1494.
- Pillai, R. S., Artus, C. G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* *10*, 1518-1525.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by *let-7* microRNA in human cells. *Science* *309*, 1573-1576.
- Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., Garcia, D., Lahmy, S., Azevedo, J., Alart, E., Laudie, M., Karlowski, W. M., Cooke, R., Colot, V., Voinnet, O., and Lagrange, T. (2012). NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Mol Cell* *48*, 121-132.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* *123*, 621-629.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* *11*, 1640-1647.
- Ruvkun, G., and Giusto, J. (1989). The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature* *338*, 313-319.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2005). Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1–Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* *3*, e235.
- Schirle, N. T., and MacRae, I. J. (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science* *336*, 1037-1040.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* *27*, 353-365.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E. G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* *243*, 215-225.
- Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B. D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D., and Smibert, C. A. (2005). Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early *Drosophila* embryo. *Curr Biol* *15*, 284-294.
- Sempere, L. F., Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A., Berger, E. M., and Ambros, V. (2002). The expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* *244*, 170-179.
- Smibert, C. A., Lie, Y. S., Shillinglaw, W., Henzel, W. J., and Macdonald, P. M. (1999). Smaug, a novel and conserved protein, contributes to repression of *nanos* mRNA translation *in vitro*. *RNA* *5*, 1535-1547.

- Smibert, C. A., Wilson, J. E., Kerr, K., and Macdonald, P. M. (1996). Smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* *10*, 2600-2609.
- Smith, J. L., Wilson, J. E., and Macdonald, P. M. (1992). Overexpression of *oskar* directs ectopic activation of nanos and presumptive pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* *70*, 849-859.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434-1437.
- Su, H., Meng, S., Lu, Y., Trombly, M. I., Chen, J., Lin, C., Turk, A., and Wang, X. (2011). Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Mol Cell* *43*, 97-109.
- Svitkin, Y. V., and Sonenberg, N. (2004). An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation *in vitro*. *Methods Mol Biol* *257*, 155-170.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* *99*, 123-132.
- Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* *15*, 1078-1089.
- Tam, O. H., Aravin, A. A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E. P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R. M., and Hannon, G. J. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* *453*, 534-538.
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., and Wahle, E. (2004). A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J* *23*, 2862-2871.
- Temme, C., Zhang, L., Kremmer, E., Ihling, C., Chartier, A., Sinz, A., Simonelig, M., and Wahle, E. (2010). Subunits of the *Drosophila* CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA* *16*, 1356-1370.
- Thermann, R., and Hentze, M. W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudopolysomes and inhibits translation initiation. *Nature* *447*, 875-878.
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M. W., and Ladurner, A. G. (2007). A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 897-903.
- Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D. S., Bennett, R., Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Theurkauf, W. E., and Zamore, P. D. (2004a). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*. *Cell* *116*, 831-841.
- Tomari, Y., Du, T., and Zamore, P. D. (2007). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* *130*, 299-308.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P. D. (2004b). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* *306*, 1377-1380.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., and Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *104*, 377-386.

- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I., and Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672-676.
- Wakiyama, M., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2000). Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* 10, 1147-1150.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). *let-7* microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 21, 1857-1862.
- Wang, B., Love, T. M., Call, M. E., Doench, J. G., and Novina, C. D. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* 22, 553-560.
- Wang, B., Yanez, A., and Novina, C. D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5343-5348.
- Wang, C., and Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* 66, 637-647.
- Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., and Ding, S. W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312, 452-454.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2008a). Structure of an Argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 456, 921-926.
- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2008b). Structure of the guide-strand-containing Argonaute silencing complex. *Nature* 456, 209-213.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M. A., Sakaki, Y., and Sasaki, H. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453, 539-543.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- Wilhelm, J. E., Hilton, M., Amos, Q., and Henzel, W. J. (2003). Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *J Cell Biol* 163, 1197-1204.
- Wu, E., Thivierge, C., Flamand, M., Mathonnet, G., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J., Fabian, M. R., Sonenberg, N., and Duchaine, T. F. (2010). Pervasive and cooperative deadenylation of 3'UTRs by embryonic microRNA families. *Mol Cell* 40, 558-570.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039.
- Wu, P. H., Isaji, M., and Carthew, R. W. (2013). Functionally diverse microRNA effector complexes are regulated by extracellular signaling. *Mol Cell* 52, 113-123.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., and Carrington, J. C. (2004). Genetic and

- functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2, E104.
- Yang, L., Wu, G., and Poethig, R. S. (2012). Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 315-320.
- Yano, T., Lopez de Quinto, S., Matsui, Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Ephrussi, A. (2004). Hrp48, a *Drosophila* hnRNPA/B homolog, binds and regulates translation of oskar mRNA. *Dev Cell* 6, 637-648.
- Ye, X., Huang, N., Liu, Y., Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q., and Zhang, H. (2011). Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol* 18, 650-657.
- Yekta, S., Shih, I. H., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science* 304, 594-596.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17, 17-23.
- Yuan, Y. R., Pei, Y., Ma, J. B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H. Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 19, 405-419.
- Zaessinger, S., Busseau, I., and Simonelig, M. (2006). Oskar allows *nanos* mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development* 133, 4573-4583.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zdanowicz, A., Thermann, R., Kowalska, J., Jemielity, J., Duncan, K., Preiss, T., Darzynkiewicz, E., and Hentze, M. W. (2009). *Drosophila* miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell* 35, 881-888.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* 29, 6220-6231.
- Zekri, L., Kuzuoglu-Ozturk, D., and Izaurralde, E. (2013). GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J* 32, 1052-1065.
- Zeng, Y., and Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32, 4776-4785.
- Zhou, R., Czech, B., Brennecke, J., Sachidanandam, R., Wohlschlegel, J. A., Perrimon, N., and Hannon, G. J. (2009). Processing of *Drosophila* endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. *RNA* 15, 1886-1895.
- Zhou, R., Hotta, I., Denli, A. M., Hong, P., Perrimon, N., and Hannon, G. J.

- (2008). Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. *Mol Cell* 32, 592-599.
- Zielezinski, A., and Karlowski, W. M. (2011). Agos--a universal web tool for GW Argonaute-binding domain prediction. *Bioinformatics* 27, 1318-1319.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S. E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L. K., Xie, Z., Carrington, J. C., and Jacobsen, S. E. (2004). Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* 14, 1214-1220.
- Zipprich, J. T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15, 781-793.