

論文の内容の要旨

論文題目 microRNA による遺伝子発現制御機構の解析
氏名 深谷 雄志

(1) 研究背景と目的

遺伝子発現の調節には転写レベルにおける制御に加えて、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、その配列に相補的なmRNAからのタンパク質合成を抑制する転写後制御因子である。近年、miRNAによる遺伝子発現制御が、発生や分化、形態形成といった多様な高次生命現象、および癌をはじめとする疾患に関与することが報告されており、その生物学的重要性が明らかになりつつある。一方で、miRNAが遺伝子発現を抑制する仕組みそのものの理解は遅れている。

miRNAはそれ自身が単独で働く訳ではなく、複数のタンパク質と複合体を形成して初めて機能を発揮する。このRNA-タンパク質複合体で中心的な役割を担うのが、Argonaute (Ago)と呼ばれるmiRNA結合タンパク質と、Ago結合タンパク質であるGW182である。miRNA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、翻訳そのものを抑制していると考えられている(図1)。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が、その詳細な分子機構は明らかになっていない。私は、miRNAの働きを試験管内で忠実に再現する新たな実験系を構築し、生化学的手法によってその分子機構を解き明かすことを目指した。

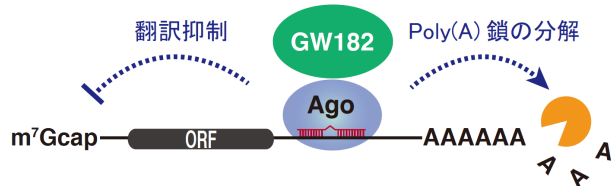


図1 microRNA は標的 mRNA の翻訳抑制と Poly(A) 鎖の分解を引き起こす

(2) 研究結果

① miRNAによるpoly(A)鎖の分解・翻訳抑制はPABP非依存的である

miRNA は標的 mRNA の翻訳抑制と poly(A)鎖の分解によって遺伝子発現を抑制している。これまでの研究から、miRNA の機能発揮には Ago 結合タンパク質であるGW182 が重要な役割を担っていることが示されている。近年、GW182 はそのC末端側領域を介して poly(A)鎖結合タンパク質であるPABP と直接結合していることが示さ

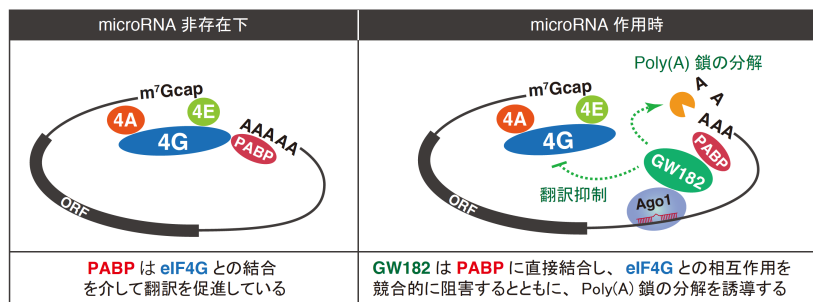


図2 microRNA 経路における GW182-PABP 相互作用モデル

れた (Fabian *et al. Mol Cell* 2009, Zekri *et al. MBC* 2009)。このことから、GW182 が PABP の機能を阻害することで翻訳抑制と 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 (図2)。しかし一方で、そもそも poly(A)鎖を持たない標的 mRNA であっても miRNA による翻訳抑制を受けることなど、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明確ではない。そこで私は、ショウジョウバエ培養細胞抽出液を用いた *in vitro* 実験系を新たに構築し、「翻訳抑制」と「poly(A)鎖の分解」の各経路を切り分けて、それぞれについて特異的かつ定量的な解析を行った。

その結果、GW182-PABP相互作用を特異的に阻害した条件でもmiRNAは翻訳抑制とpoly(A)鎖の分解を引き起こすことが明らかとなった (図3)。このことは、miRNA がGW182-PABP相互作用に依存しない未知の機構によって、標的mRNAからのタンパク質合成を阻害していることを示唆している。さらにGW182は、C末端のPABP結合領域とは独立に、N末端側にも複数の機能性ドメインを持っており、それらの協調的な働きによってはじめて効率的な「翻訳抑制」と「poly(A)鎖の分解」が引き起こされること分かった (Fukaya and Tomari, *EMBO J* 2011)。

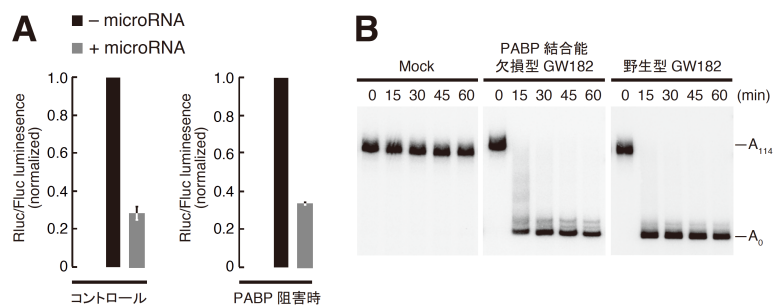


図3 miRNAによる翻訳抑制・Poly(A)鎖の分解はPABP非依存的に進行する

(A) PABP非依存的なmiRNAによる翻訳抑制
(B) GW182はPABP非依存的にPoly(A)鎖の分解を引き起こす

② miRNAは異なる複数の機構を介し遺伝子発現を抑制する

近年の研究により、GW182はpoly(A)鎖分解酵素であるCCR4-NOT複合体と直接結合することが示された (Fabian *et al. NSMB* 2011, Chekulaeva *et al. NSMB* 2011, Braun *et al. Mol Cell* 2011)。つまり、GW182はPABP非依存的に標的 mRNA 上へとpoly(A)鎖分解酵素を積極的に呼び込んでいることが明らかとなった。一方、翻訳抑制に関しては、GW182の関与が信じられているものの、翻訳のどの段階をどのように阻害するかを含め、これまでに相反する実験結果が報告されており、統一的な見解には至っていない。その原因として、poly(A)鎖の分解された mRNA は翻訳の効率も必然的に低下し、逆に、翻訳の抑制された mRNA は poly(A)

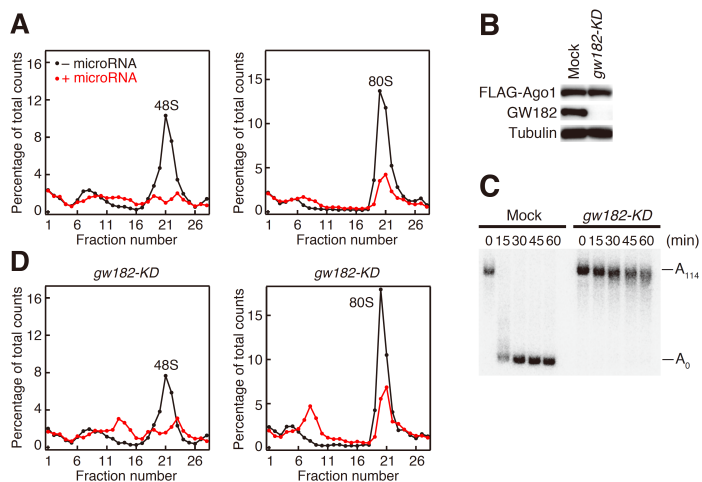


図4 GW182非依存的な翻訳開始段階の阻害

(A) miRNAは48S, 80Sリボソームの形成を阻害する (B) GW182特異的なノックダウン
(C) GW182はmiRNAによるPoly(A)鎖の分解に必須である
(D) GW182非存在下においても、miRNAは翻訳開始段階を阻害する

鎖の分解が促進される, ということに, “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ということが挙げられる。従来の解析手法では miRNA のこれらの作用をひとまとめに観察していたため, 実験結果の因果関係を明らかにすることが困難であった。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実験系を用いて, “純粋な”翻訳抑制の分子機構を明らかにすることを目指した。

その結果, miRNA は poly(A)鎖の分解とは独立して, 標的 mRNA 上での 80S リボソームおよび 48S 開始複合体の形成を阻害していることが分かった (図 4A)。つまり miRNA は, 標的 mRNA 上にリボソームが呼び込まれる翻訳開始段階を阻害していることが明らかとなった。また, GW182 は miRNA による poly(A)鎖の分解には必須であったものの, 驚くべきことに翻訳開始段階の阻害は GW182 非依存的に起こることが明らかとなった (図 4B-D)。その一方で, GW182 自身も翻訳開始段階を阻害する活性を持つことから, miRNA による標的遺伝子の発現抑制には、

- 1) GW182 依存的な poly(A)鎖の分解、
- 2) GW182 依存的な翻訳開始段階の阻害、
- 3) GW182 非依存的な翻訳開始段階の阻害の少なくとも 3 つの経路が寄与していることが示唆された (図 5) (Fukaya and Tomari, *Mol Cell* 2012)。

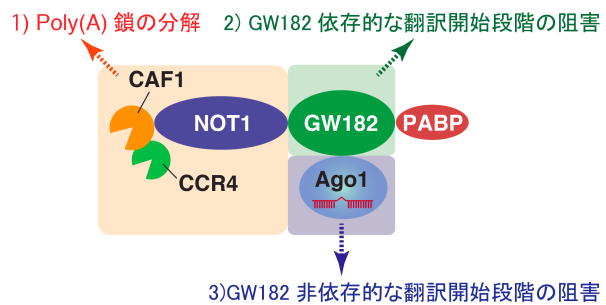


図5 microRNA 複数の経路を介して標的遺伝子発現を阻害する

③ miRNA は翻訳開始因子複合体の形成を阻害する

通常の翻訳開始段階ではまず, mRNA の 5′ 末端にある m⁷Gcap 構造が翻訳開始因子である 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 eIF4G は RNA ヘリカーゼである eIF4A を 5′ UTR に作用させる。また, eIF4G は eIF3 と相互作用することでリボソームを mRNA 上へと呼び込む働きを持つ (図 6)。miRNA がどの翻訳開始因子を標的とするのか明らかにするため, 特定の翻訳開始因子を介さずに翻訳を活性化させる特殊な 5′ UTR 配列を持つ標的 mRNA を設計し, miRNA による翻訳抑制への感受性を調べた。

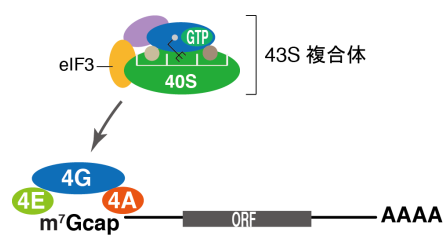


図6 翻訳開始段階の模式図

その結果, eIF4E による m⁷Gcap 構造の認識, および eIF4E-eIF4G 相互作用を必要としない特殊な標的 mRNA であっても翻訳抑制を受けることがわかった。このことは, eIF4E を介した eIF4G の呼び込みよりも下流の段階を miRNA が阻害していることを示唆している。一方, アポトーシス誘導遺伝子である reaper mRNA の 5′ UTR 配列を介した eIF4A 非依存的な翻訳は, miRNA による翻訳抑制をほぼ完全に免れた。以上の結果より, miRNA は eIF4A を標的として翻訳抑制を引き起こしていることが考えられた。

そこで UV クロスリンク法によって、miRNA 作用時における翻訳開始因子の挙動解析を行った。その結果、miRNA は eIF4E による m⁷Gcap 認識には影響を与えないのに対し、RNA ヘリケースである eIF4A の解離を特異的に引き起こしていた (図 7)。GW182 をノックダウンした場合でも eIF4A の解離が観察されたことから、miRNA は GW182 非依存的に eIF4A の解離を引き起こしていることが示唆された。興味深いことに、GW182 を直接標的 mRNA に作用させた場合には先ほどと異なり、eIF4E と eIF4A の両者がともに標的 mRNA 上から解離していた (図 8)。以上の結果から、miRNA は GW182 依存的、非依存的の異なる二つの機構を介して翻訳開始因子複合体の形成を阻害していることが考えられた (Fukaya and Tomari, 投稿準備中)。

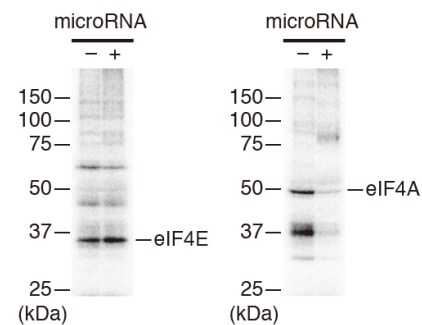


図7 microRNA は eIF4A の解離を引き起こす

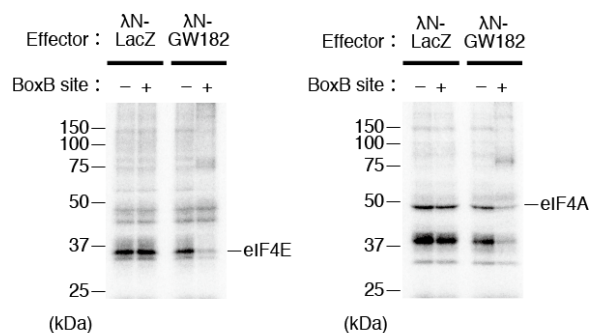


図 8 GW182 は eIF4E、eIF4A 両者のクロスリンクを阻害する

(3) 考察

miRNAが制御する多様な生命現象の存在が明らかとなる一方で、miRNAがどのように標的遺伝子の発現を阻害するのかという根本的な謎はこれまで未解明であった。その理解が遅れてきた最大の理由は、miRNA が複数のアウトプットを引き起こし、それらが互いに影響を及ぼし合うために、従来の研究手法では実験結果を正確に解釈することが困難であった点にある。本研究では、miRNAが引き起こす複数のアウトプットを切り分けて、各経路の分子機構を特異的かつ定量的に解析出来る実験系を独自に開発し、生化学的な解析を行った。その結果、これまで信じられてきた画一的な作用モデルを覆す、複雑で緻密なmiRNAの作用機構の実態が明らかとなった。その一方で、「GW182依存的、非依存的な抑制機構が生体内でどのように使い分けられているのか」や、「miRNAがどのように翻訳開始因子複合体の形成阻害を引き起こしているのか」といった重要な謎は残されている。miRNAの作用実態の解明には、今後の更なる解析が必要である。