

論文審査の結果の要旨

氏名 ベタンクール メディナ フアン ギジェルモ

本論文は、ほ乳類における非コード RNA が働くメカニズムを、タンパク質との相互作用に着目し解析を行ったものである。非コード RNA のほとんどは、それ単独ではたらくわけではなく、多くのタンパク質によるプロセッシングを受ける生合成過程を経た後、RNA 結合タンパク質やその補助因子などとエフェクター複合体を形成して初めて機能する。これまで、非コード RNA とタンパク質の相互作用については、ショウジョウバエをモデルに良く解析されてきており、飛躍的解析が進んだ一方で、ショウジョウバエでの知見がどの程度の普遍性をもって適応されるのかは不明であった。本論文では、これまで技術的に困難であったほ乳類における非コード RNA とタンパク質の相互作用を、種々の生化学的手法を駆使して解析し、これまでショウジョウバエでの知見をもとに考えられてきた固定観念を覆す結果を含め、重要な研究成果を得るに至った。

本論文は 5 章から構成されており、第 1 章ではほ乳類における非コード RNA についてのこれまでの知見をまとめた序章である。第 2 章では小分子 RNA のエフェクター複合体(RISC)の形成過程における RNaseIII 酵素 Dicer の役割について、また、第 2 章では典型的な長鎖非コード RNA の Xist とポリコーム複合体 PRC2 との結合について、それぞれ行われた実験結果および考察が記述されている。第 4 章は小分子 RNA、長鎖非コード RNA を含めて実験結果と考察を総括した総合討論である。

小分子 RNA のエフェクター複合体である RISC は、Argonaute と呼ばれるコ

アタンパク質を含む。ショウジョウバエにおける過去の知見から、代表的な小分子 RNA である siRNA は、直接 Argonaute に取り込まれるわけではなく、Dicer およびそのパートナータンパク質である R2D2 からなるヘテロダイマーにまず結合することが重要であることが示されていた。また、Dicer-2/R2D2 ヘテロダイマーは siRNA 二本鎖の両末端の熱力学的安定性の違いに基づき、決まった向きで siRNA 二本鎖に結合し、RISC 形成の「非対称性」、つまり、siRNA 二本鎖のうちのどちらの鎖が最終的に RISC に残るかを決定していることが示されてきた。よって、RISC 形成において Dicer は、Argonaute への siRNA の取り込みと、その非対称性の認識に必須の役割を果たすと考えられてきた。本論文の第 2 章では、Dicer ノックアウトマウスから樹立された MEF 細胞を用い、種々のレポーターアッセイや *in vitro* での RISC 形成および活性測定を行った結果、ショウジョウバエの場合とは異なり、ほ乳類においては、Dicer の有無にかかわらず siRNA や miRNA 二本鎖は非対称的に Argonaute に取り込まれ、RISC を正しく形成するということが明らかとなった。この RISC 形成に Dicer が必須ではないという結果は、結果はショウジョウバエの miRNA 経路やゼブラフィッシュの小分子 RNA の経路にも保存された普遍的なものであることも分かった。これは、これまでショウジョウバエでの結果を基に考えられてきた画一的なモデルを覆す重要な発見である。

第 3 章においては、ポリコーム複合体である PRC2 に結合しクロマチン状態を制御するとされる Xist や HOTAIR などの長鎖非コード RNA が、PRC2 に含まれる複数のタンパク質のうちどの因子とどのような特異性を持って結合するのかに焦点を当てて解析が行われた。この問題については、これまで相矛盾する報告がなされており、混乱を極めていたが、本論文では、様々な発現系を駆使することにより PRC2 の構成タンパク質をすべてリコンビナントとして発現

精製し、これまで行われてきたゲルシフトアッセイだけではなく、UV クロスリンクやフィルターバインディングなどより直接的で信頼性の高い手法を用いることによって、それら因子の RNA 結合能を定量的に解析した。その結果、PRC2 に含まれる 5 つのコアタンパク質のうち、Ezh2 と Suz12 という二つが RNA 結合活性を示すこと、また、その結合様式の特異性は極めて低いものであることが明らかとなった。この結果は、長鎖非コード RNA と PRC2 の特異的な結合が重要とされてきたこれまでのモデルを再考する必要性を促すものである。

以上の通り、本論文は、対象とするそれぞれの非コード RNA とタンパク質との相互作用を詳細に解析しただけではなく、長鎖非コード RNA のタンパク質相互作用と小分子 RNA のタンパク質相互作用の様式は本質的に異なるという点を浮き彫りにしたという点においても、今後の本分野の発展に大きな示唆を与えるものである。したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1,982 字