

論文の内容の要旨

論文題目「Novel functional small RNAs were selectively loaded onto
mammalian Ago1」

(新規機能的小分子RNAは哺乳類のAgo1に選択的に結合する

学位申請者 緒方 洵

キーワード: Ago1 小分子RNA RNA干渉 Epstein-Barr ウイルス

背景

近年、ゲノムのゴミと思われていた領域から発現する小分子RNAの解析が進み、発生や分化、がん、ウイルス感染など多くの生物学的プロセスにおいて重要な分子であることが明らかになりつつある。非翻訳RNAの一つであるmicroRNA(miRNA)はArgonaute(Ago)タンパク質を含むRNA induced silencing complex (RISC)に取り込まれ、相補的にターゲットメッセンジャーRNA(mRNA)に結合し、転写後発現抑制を行っている。無脊椎動物では、Agoのアイソフォーム特異的に異なる種類の小分子RNAが振り分けられていることが知られているが、哺乳類の場合は、アイソフォーム(Ago1-4)非特異的に、ランダムにsRNAが振り分けられると考えられている。しかしながら、4つのAgoは構造上異なった部分があり、それぞれのAgo特異的な結合メカニズムが存在する可能性は否定できない。われわれはヒトのB細胞に感染するEpstein-Barr Virus (EBV)陽性細胞においてEBV由来のmiRNAが全体の3分の1程の発現量を占めることに注目し、この特殊なコンディションにおいて小分子RNAのAgoタンパク質への結合に変化が起こっているのではないかと考えた。このように外来のmiRNAが発現する細胞におけるヒト由来のmiRNAの動態についての解析例は未だない。

目的

そこで本研究では、EBV感染細胞におけるAgoタンパク質を中心としたmiRNA及びその他の小分子RNAの動態を解析することを目的とする。

方法

EBV感染B細胞(ホジキン型B細胞リンフオーマ)由来の細胞株、L591を用いて、4種類のAgoタンパク質のうち哺乳類細胞で発現量の高いAgo1およびAgo2に対する特異的な抗体を用いて免疫沈降し、それぞれに結合する小分子RNAを次世代シーケンシングによって網羅的に解析する。

結果と考察

次世代シーケンシングの結果、ヒト及びEBV由来のmiRNAは、ともにAgo1, Ago2にランダムに結合しており、これまでの報告と一致する結果が得られた。しかしながら、miRNAとして登録されていない小分子RNAに着目すると、ある小分子RNA群がヒトのAgo1選択的に結合していた。我々はこれらのRNAに注目し、Agotaxis small RNA (ASR)と名付けて解析を進めた。

ゲノムマッピングの結果、ASRは複数の小分子RNAがマッピングされる領域に由来することが分かった。この結果は、ASRが前駆体のRNAからプロセシングされて産出されたことを示している。無脊椎動物で見られるAgo選択性や、ごく一部のmiRNAで見られるAgo選択性はそのプロセシング経路に依存していることが知られる。そこで、miRNAのプロセシングを行うRNA分解酵素であるDROSHA, DICERの発現を抑制しASRの発現を解析したが、発現量に影響はなかった。したがってASRは未知のプロセシングを経ていると考えられる。そこで更にプロセシングに関与する遺伝子をタンパク質分画法と質量分析を用いてスクリーニングしたが、分子の特定には至らなかった。また、ASRの配列を解析した結果、「UUGACU」モチーフを持つことが分かった。UUGACUはRo60の結合配列であることから、Ro60がAgo1への選択的結合に関与していると予想したが、相互作用を検出するとは出来なかった。Ago1選択的結合の機構を解明するためには、プロセシング酵素の同定が必須であると考えられる。

Crosslinking, ligation and sequencing of Hybrids (CLASH)法により、ASRはAGO1-RISCに取り込まれ、ターゲットmRNAに結合していることが示された。更にLuciferase Assayにより、ASRがMEF2B, FAM22などのターゲット遺伝子発現を抑制し、Ago1をノックダウンした細胞のトランスクリプトーム解析により、*in silico*でASRのターゲットと予想された遺伝子群の全般的な発現の上昇が認められ、ASRはグローバルな遺伝子発現抑制を行っていることが示された。以上より、ASRはAGO1-RISCに選択的に取り込まれ、mRNAの発現を抑制することが明らかとなった。つまり、Ago選択性はmiRNAとは異なっているが、RNA干渉をもたらすmiRNA様の機能的な小分子RNAであることが示された。

ASRがEBV感染特異的に誘導されるか否かを検討するために、EBV陰性のB細胞リンフォーマ由来の細胞株L1236を用いて同様にAGO1, AGO2に結合しているsRNAの網羅的解析を行ったところ、L591でAGO1選択的だったASRの大部分はL1236においてもAGO1に選択的に結合しており、EBV感染に関わらずASRが存在することが示された。しかし、L591とL1236では個々のASRの発現量は大きく異なり、EBV感染がASRの発現プロファイルに大きな影響を与えていると考えられた。そこで、EBV感染細胞であるAkata細胞株を用いて溶解感染期を誘導し、ASRの発現量を、定量的PCR法を用いて解析したところ、潜伏感染期と比較してASRの発現が劇的に上昇した。よって、ASRは溶解感染期において何らかの重要な機能を有していることが予想された。そこで、AGO1をノックダウンしASRの発現が減少した条件下で溶解感染期を誘導すると、より強く細胞死が誘導された。この結果は、ASRsは溶解感染期において細胞死を抑制することを示している。

結論

本研究により、Ago1選択的な新規の小分子RNA群、ASRsを同定することが出来た。ASRsはmiRNA様のRNA干渉をもたらす機能的な小分子RNAであり、EBV感染細胞の溶解感染期において、細胞死を抑制することが明らかとなった。