九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Functional Analysis of RNAi Pathway-Related Proteins in the Silkworm, Bombyx mori

祝, 力

https://hdl.handle.net/2324/1398423

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名　：　祝　力

論文題目　：　Functional Analysis of RNAi Pathway-Related Proteins in the Silkworm, *Bombyx mori*
（カイコにおける RNAi 経路関連タンパク質の機能解析）

区　　分　：　甲

論　文　内　容　の　要　旨

近年、RNA 干渉 (RNAi)と呼ばれる現象が多くの生物種で保存されていることが報告され、遺伝子機能解析に利用されている。この経路は二本鎖 RNA（dsRNA）によって活性化されるが、細胞内に取込まれた dsRNA は低分子の RNA へとプロセッシングされる。一方、細胞内にはこれらの外来性 RNA に加えて内在 RNA から産生される低分子 RNA 分子種が存在する。これらの RNA は、microRNAs (miRNAs) 、PIWI (P-element-induced wimpy testis)-interacting RNAs (piRNAs)、small interfering RNAs (siRNAs)に分類され、アルゴノートと呼ばれる一群のタンパク質によって認識、RISC（miRNA or siRNA induced silencing 複合体）に取込まれ、種々の遺伝子発現調節を行うことが知られているが、その詳細な機能は不明である。

miRNA や siRNA の生合成には、多くの RNA プロセッシング酵素やその相互作用因子が関与している。miRNA は、Drosha/Pasha 複合体による前駆体 RNA の切出し後、さらに Dicer1/Loqs 複合体によるプロセッシングを受けて生成される。一方、siRNA は、Dicer2 により長鎖 dsRNA より直接生成されるが、Dicer2 の相互作用因子である R2D2 が siRNA の siRISC へのリクルートに重要な役割を担っており、siRISC では Ago2 が標的 mRNA を分解する。miRNA も miRISC へリクルートされるが、miRISCs では Ago1 が miRNA に結合し、標的 mRNA の翻訳抑制を行う。

カイコにおいても RNAi 経路関連因子として BmAgo1 と BmAgo2 が報告されているが、個体における RNAi 誘導は困難な状況にあり、この問題を解決するためには RNAi 経路の全体像を理解する必要がある。本研究では、まず、カイコ siRISC の構成因子である BmTudor-sn と BmAgo2 に着目して研究を行った。BmTudor-sn は、BmAgo2 と直接相互作用する siRISC 因子であるにも関わらず、BmAgo2 機能阻害とは対照的に、その機能阻害は RNAi 効率には影響を及ぼさなかったことから、未知の機能を担っていることが示唆された。次いで、miRISC の構成因子である BmAgo1 に着目して研究を行ったところ、BmDcp2 と相互作用し P-body と呼ばれる細胞顆粒に局在することを見出した。加えて、BmAgo1 の mRNA への Tethering や miRNA reporter アッセイにより BmAgo1 が miRNA を介した翻訳抑制に必須であり、その mRNA の一部は P-body にルクルートされて分解を受けることが示唆された。また、522 番目及び 557 番目のフェニルアラニンのアラニン置換体が、翻訳抑制機能と P-body 局在能の両方を失うことから、これらの機能を密接に関連していることが明らかになった。さらに、BmTudor-sn、BmAgo1、BmAgo2 などの RISC 因子は熱ストレス誘導時にストレス顆粒に局在することを見出した。遺伝子ノックアウト実験の結果より、BmTia1 がストレス顆粒の形成には必須であり、BmAgo1 と BmAgo2 は顆粒形成に非必須であるが、BmTudor-sn の顆粒局在に必要であることを明らかにした。BmTudor-sn は、Tudor ドメインを介して BmAgo1、BmAgo2 と、SN2 ドメインを介して BmEif4e、BmTia1 と相互作用できることから、ストレス顆粒因子と RNAi 経路間の橋渡しを行っていると考えられる。最後に、BmAgo1 および BmAgo2 ノックダウン細胞のマイクロアレイ解析の結果より、同因子が、カイコ細胞に永続感染している macula-like ウイルスの発現を

抑制していることを見出した。

以上の結果より、カイコ RNAi 経路関連因子は、低分子 RNA を介した遺伝子発現抑制のみならず、P-body における RNA 品質管理、ストレス時の RNA 保護、また、RNA ウイルス防御など多様な細胞機能に関与していると考えられた。

1732 字