塩見　春彦　　慶應義塾大学医学部分子生物学教室

研究テーマ

脆弱X症候群発症におけるRNAサイレンシング経路の関与

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

脆弱 X 症候群は、高頻度に精神遅滞を伴う遺伝性疾患であり、病理学的には神経樹状突起スパインの形態異常が観察される。この疾患の原因はRNA 結合タンパク質FMRP(Fragile X mental retardation protein)をコードする*FMR1* 遺伝子の発現抑制である。FMRP は、樹状突起スパインでグループ 1 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の下流で特定の mRNA の翻訳を抑制しており、FMRPの欠如によるこの翻訳抑制の欠如が脆弱 X 症候群発症に関与するとする仮説("mGluR 仮説")が提唱されている[1]。
FMRPは少なくとも2種類のRNA結合モチーフ、KHドメインとRGGボックス、を持つRNA結合タンパク質であり、試験管内の実験から、mRNAの翻訳を抑制することが示された。FMRPの生化学的性状と脆弱X症候群の神経病理から、FMRPの神経系における制御機構とその欠失による効果を理解するためには、FMRPの標的遺伝子を同定することが不可欠である。FMRPは脳で発現しているmRNAの内、400から600種類のmRNAと結合し、これらの中にはFMR1自身のmRNAも含まれる。しかし、FMRPはどのような機構によりその標的mRNAの翻訳や安定性を制御しているのかに関しては、未だ、充分には理解されていない。また、FMRP の標的mRNAのうちどの mRNA が疾患の症状に直接関わるのかについてもまだ明らかでない。さらに、脆弱X症候群患者の症状には極めて大きなばらつき(行動や神経学的所見まで)が見られるが、これに関してもmGluR 説のみで説明できるのであろうか？ FMRP による翻訳制御機構として、RNA silencingを介したものが挙げられる。RNA silencing は、RNAi に代表されるような、小分子 RNAとArgonauteタンパク質が中核となる作動複合体(RISC)を介した遺伝子発現抑制現象である。FMRP のショウジョウバエ相同体dFMR1/dFXRは、Argonauteタンパク質の一つAGO2 と複合体を形成することから、脆弱 X 症候群と RNAiとの関連性が注目された[2]。しかし、外来の2本鎖RNAまたはsiRNAによるRNAi 機構には FMRP は必須ではない。また、ショウジョウバエの場合、miRNAは別のArgonauteタンパク質であるAGO1とRISCを形成するが、dFMR1はAGO1とは複合体を形成しないようである。

2. 方法

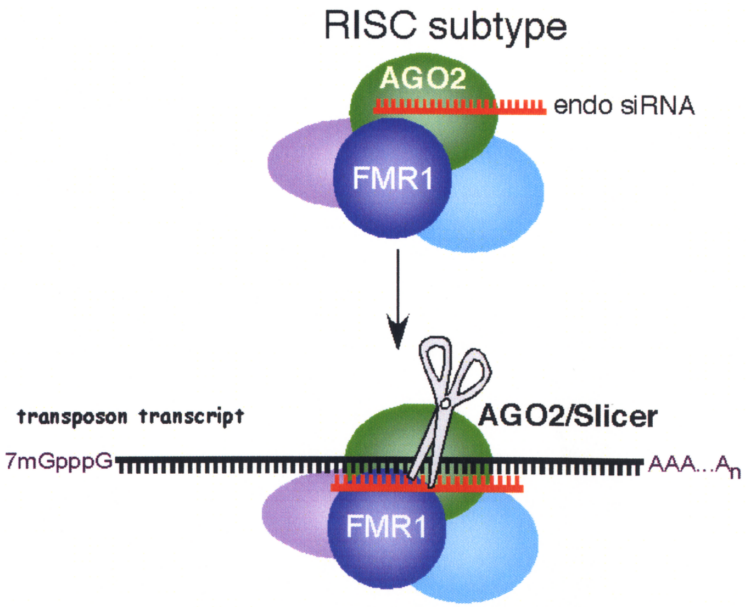
FMRPのRNA silencingへの関与を検討するため、FMRP のショウジョウバエ相同体 dFMR1をモデルとして用いた。dFMR1が形成する複合体にはAGO2が存在する。そこで、AGO2に直接結合している内在性小分子RNAを同定することにより、dFMR1-AGO2複合体が関与するRNA silencing経路を理解する手がかりが得られると予想した。このため、AGO2に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、この抗体を用いて体細胞由来の培養細胞(S2)からAGO2を精製した。その後、この免疫精製したAGO2と強固に結合する小分子RNA(20塩基長程度)の存在を末端RI標識により確認した。この小分子RNAをゲルから抽出し、クローニングした後、Roche GS20 system (454 sequencing technology)にて配列決定をおこなった。

3. 結果　研究成果

AGO2結合小分子RNAの配列を約77,000リード得ることができた。AGO2結合小分子RNAを内在性siRNA(endogenous siRNA/esiRNA)と呼ぶことにした。これらの約70％が各種トランスポゾン（TE）に由来していた。しかも、これらesiRNAは各TEに関してのセンス／アンチセンスの両鎖から由来していた。これはesiRNAの前駆体が2本鎖RNAであることを示唆する。実際、Dicer（Dicer-2)がesiRNAの産生には必須であることをRNAiノックダウン法およびdicer2変異体を用いて明らかにした。さらに、RNAiノックダウン法および変異体を用いて、AGO2とDicer-2の減少または欠失により各種TEの発現が亢進することが明らかになった。以上の結果から、AGO2は体細胞においてTEの発現をesiRNAを介して抑制していることが明らかになった[3]。AGO2がトランスポゾン（転移因子）の発現抑制に関与しているというこの発見は、FMRPが翻訳抑制以外の機構を介して脆弱 X 症候群発症に関与している可能性を示唆する。

4. 考察　まとめ

最近、ヒトを含む哺乳動物の神経前駆体細胞において、レトロトランスポゾンL1が活発に転移していることが示された。この転移により、（外見上同じように見える）神経細胞が実はL1の新しい挿入部位の違いにより、機能的に違う性状を獲得している（somatic mosaicism）可能性が示唆されている[4]。転移の頻度や遺伝子座は個体により違うため、この違いが脳神経系の個体差を生み出す仕組みの一つかもしれない。哺乳類におけるL1の発現抑制には、ショウジョウバエのトランスポゾンと同様、RNAiの分子経路が関与する。これらの結果から、以下のモデルが考えられる（図1）。つまり、神経前駆体細胞において、FMRPはRISCの構成因子として、AGO2によるL1等のトランスポゾンの発現抑制を支援している。FMRPの欠如により、トランスポゾンの発現、そして転移頻度が上昇し、（特定の）神経特異的遺伝子近傍への挿入頻度が上昇する。このモデルはmGluR 説と排他的なものではないが、患者に見られる症状の大きなばらつきを説明できるものかもしれない。しかしながら、現在のところ、脆弱 X 症候群とトランスポゾンとの関連についての報告はなく、今後の解析が待たれる。



[図の解説]

図1. RNA silencing 機構が関与する転移因子の抑制. AGO2は、転移因子に由来する内在性siRNA (endo-siRNA)と複合体(RISC)を形成し、endo-siRNAをガイド分子として標的転移因子mRNA を認識して切断を行う。この切断活性は一般にSlicer活性と呼ばれている。FMRP は シャペロンとして、RISCが標的mRNA を認識することを助ける。あるいは、FMRPまたはFMRP相互作用因子がendo-siRNA-RISCによる切断活性を修飾する。

5. 発表論文、参考文献

[発表論文]

1. Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, NT., Siomi MC. and **Siomi, H.** 2008. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. *Nature* **453:** 793-797.
2. Sekine, T., Yamaguchi, T., Hamano, K., **Siomi, H.**, Saez, L., Ishida, N. and Shimoda, M. 2008. Circadian phenotypes of *Drosophila* fragile X mutants in alternative genetic backgrounds. *Zoological Science* **25**: 561-571.
3. Otsuka, S., Sakamoto, Y., **Siomi, H.**, Itakura, M., Yamamoto, K., Matumoto, H., Sasaki, T., Kato, N., and Nanba, E. 2009. Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. *Brain Dev in press*
4. **Siomi, H.**, and Siomi, MC. 2008. Interactions between transposable elements and Argonautes have (probably) been shaping the *Drosophila* genome throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 181-187.
5. Siomi, MC., Nishida, KM., and **Siomi, H.** 2008. How to define targets for small guide RNAs in RNA silencing: a biochemical approach. *Methods in Enzymology* **449**: 345-355.
6. Siomi, MC., Saito, K., and **Siomi, H.** 2008. How selfish retrotransposons are silenced in *Drosophila* germline and somatic cells. *FEBS Lett.* 582: 2473-2478.
7. **Siomi, H.**, and Siomi, MC. 2009. On the road to reading the RNA interference code. *Nature* **457**: 396-404.

[参考文献]

1. Bear M. F. et al: *Trends Neurosci.* **27**, 370-377, 2004.
2. Ishizuka A. et al: *Genes Dev.* **16**, 2497-508, 2002.
3. Kawamura Y. et al: *Nature* **453**, 793-7, 2008.
4. Coufal et al: *Nature* **460**, 1127-1131. 2009.