

## 論文の内容の要旨

**論文題目**            **Analysis of plant microRNA biogenesis**  
                              **(植物の microRNA 生合成経路の解析)**

**氏名**                **栗原 志夫**

### 本研究の背景

MicroRNA (miRNA) は内在性の 18-25 nt 長の RNA であり、広く動物と植物両方の真核生物に存在する。miRNA は、その配列に相補的な配列を持つ標的 mRNA を分解もしくは標的 mRNA からの翻訳を阻害することによって、器官の発生や分化の調節に重要な役割を果たすと考えられている。

動物の miRNA 生合成はかなり明らかになってきている。まず、ステムループ構造をもつ miRNA 一次転写産物 (pri-miRNA) は核内において RNase III 様酵素 Drosha によって切断された後、二次前駆体 (pre-miRNA) として核外に輸送される。pre-miRNA は細胞質において別の RNase III 様酵素 Dicer によって miRNA/miRNA\* duplex へ切断され、成熟型の miRNA が産出される。成熟型 miRNA は、エンドヌクレアーゼ複合体 RISC (RNA-induced silencing complex) に取り込まれ、標的 mRNA を負に制御する。一方、植物では Dicer-like1 (DCL1)、HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)、HUA ENHANCER 1 (HEN1) が miRNA 生合成に関与することがわかっている。しかしながら、その詳細は前駆体の検出が困難であることから、未知の部分が多かった。

多くの植物ウイルスは、宿主側の防御機構である RNA サイレncing から逃れるた

めに、サプレッサーをコードしていることがわかっている。近年、いくつかのウイルス感染植物および RNA サイレンシングサプレッサーの形質転換植物において miRNA の蓄積異常と形態異常が報告されている。これは、miRNA 経路と RNA サイレンシング経路は一部を共有しているためと考えられる。

## 本研究の目的

タバコモザイクウイルス (TMV) に感染したモデル植物シロイヌナズナはさまざまな形態異常を示す。いくつかの miRNA の蓄積を TMV が感染した植物と健全植物とで比較した。その結果、ほとんどの miRNA の蓄積は TMV の感染に伴い増加することがわかった。このメカニズムを調べるためには、現象に関与する TMV 側と植物側の因子の同定および植物における miRNA 生合成経路の解明が必要である。そこで、植物の miRNA 生合成経路の解明および TMV 感染植物における miRNA 蓄積異常のメカニズムの解明を本研究の目的とした。

## miR163 生合成の解析

植物の pre-miRNA は 70-350 nt 長であると予測される。シロイヌナズナにおいて miR163 自体は検出が容易であるので、前駆体も検出可能と予想された。陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、抽出した RNA からおよそ 1,000 nt 以下の RNA (LMW RNA+) を分画し、miR163 前駆体の検出を試みた。ノーザン解析および前駆体のクローニングの結果から、miR163 生合成は pri-miR163 → long pre-miR163 → short pre-miR163 remnant, miR163 の三段階の経路であることがわかった。

これまでに、核タンパク質である DCL1 が miRNA 生合成に関与することがわかってきた。しかし、DCL1 が miRNA 生合成経路のどの切断に関与しているのかは不明であった。そこで、変異体 *dcl1-7* での miR163 生合成を野生型と比較した。ノーザン解析の結果、pri-miR163 の蓄積の増加が見られた一方で、short pre-miR163、miR163 の蓄積は減少していた。また、もうひとつの変異体 *dcl1-9* において各前駆体をクローニングし、切断部位の同定を行ったところ、第一、第二切断部位が間違った位置にずれていることがわかった。以上の解析から、miR163 生合成における前駆体の第一、第二切断は、DCL1

によって行われることが示唆された。miR163 生合成は三段階の切断によるが、miR163 以外の miRNA の生合成は二段階の切断によると考えられる。このことをふまえると、一般的に miRNA 生合成におけるすべての切断過程を DCL1 が行っていると考えられた。

### DCL1 と HYL1 の相互作用

DCL1 以外に miRNA 生合成に関与すると考えられる因子として二本鎖 RNA(dsRNA) 結合モチーフを持つ HYL1 が知られている。*hyl1-2* 変異植物における miR163 生合成を調べたところ、ノーザン解析において pri-miR163 の蓄積の増加や新たなバンドが検出された。この新たなバンドの正体は、pri-miR163 上の第一切断部位が、間違った位置にずれてしまった前駆体であることがわかった。この差異は *dcl1-9* 変異体で検出された第一切断部位と類似していた。さらに *Nicotiana benthamiana* の葉での一過的発現系による免疫沈降法を用いた実験から、DCL1 と HYL1 が複合体を形成することが明らかとなった。しかし、HYL1 とカルボキシル末端の dsRNA 結合ドメインを欠いた *dcl1-9* 変異タンパク質は相互作用できないことがわかった。これらの結果から、HYL1 と DCL1 が相互作用することによって pri-miR163 上の正確な切断部位が決定され、効率的に切断が起こることが示唆された。

さらに、miR163 以外の miRNA 生合成への HYL1 の関与を調べた。前駆体が検出可能な miR164b と miR166a のふたつの miRNA 生合成に注目した。ノーザン解析から野生型植物と比較して *hyl1-2* および *dcl1-9* 変異体において pri-miR164b、pri-miR166a の蓄積増加と pre-miR164b、pre-miR166a の蓄積減少が検出された。この結果から、一般的に HYL1 は、DCL1 による pri-miRNA の効率的な切断のために必要であることがわかった。また、miR163 以外の miRNA 生合成においても DCL1 が pri-miRNA pre-miRNA の切断を行っていることが示せた。

### トバモウイルス複製酵素が miRNA 生合成に与える影響

ほとんどの miRNA の蓄積はトバモウイルス TMV の感染に伴い増加することがわかった。TMV がコードするタンパク質のなかで、126K 複製酵素が RNA サイレンシング サプレッサー活性をもつことが報告されていたので、複製酵素が miRNA 経路への影響

を及ぼすことが予測された。そこで、複製酵素が miRNA 生合成経路および miRNA の機能に及ぼす影響を調べるために *N. benthamiana* の葉での一過的発現系による解析手法を用いた。まず、複製酵素と pri-miRNA を共発現したところ、pri-miRNA のみを発現させたコントロールと比較して pri-miRNA、pre-miRNA、miRNA の蓄積には差はみられなかった。しかし、生合成経路のとき miRNA とともに切り出され、すぐに分解されてしまうはずの miRNA\* の蓄積が異常に増加していた。さらに、標的 mRNA と pri-miRNA を共発現すると、標的 mRNA は miRNA によって抑制されたが、複製酵素を共発現させることによって、miRNA の抑制機能は解除された。以上の結果から、複製酵素は miRNA/miRNA\* duplex を安定化し、miRNA が RISC 複合体に取り込まれ機能を果たすのを抑えていることが示唆された。

## 本研究の総括

動物の miRNA 生合成において第一切断は Dicer ではなく Drosha によって行われる。本研究において、植物における第一切断は Dicer ホモログである DCL1 によって行われることがわかった。この発見は miRNA 生合成について研究する上で、大変意義のあることである。

これまでに RNase III 様酵素と複合体を形成する dsRNA 結合タンパク質が報告されてきた。本研究では、dsRNA 結合タンパク質である HYL1 が DCL1 と相互作用することで pri-miRNA 上の正確な切断部位が決定され、効率的に切断が起こることを明らかにした。この知見は、RNase III 様酵素と dsRNA 結合タンパク質の相互作用の役割の解明に向けて植物のみならず重要なものと考えられる。

TMV がコードする RNA サイレンシングサプレッサーである複製酵素は、miRNA 前駆体のプロセッシングには影響を与えないが、miRNA/miRNA\* duplex を安定化し miRNA が RISC に取り込まれ機能を果たすのを抑制すると考えられた。しかしながら、miRNA/miRNA\* duplex から成熟型 miRNA の RISC への取り込み過程には、未知の部分が多く、複製酵素の作用の解明にはさらなる研究が必要である。