

## 別紙 2

### 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 栗原 志夫

MicroRNA (miRNA) は内在性の 18-25 nt 長の RNA であり、広く動物と植物に存在する。miRNA は、その配列に相補的な配列を持つ標的 mRNA を分解もしくはそこ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ものとして注目を集めている。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。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すると、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、現象に關与する 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。

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を明らかとした。

植物では Dicer-like1 (DCL1)、HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)、HUA ENHANCER 1 (HEN1) が miRNA 生合成に關与することがわかってきた。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。DCL1 が miRNA 生合成経路のどの切断に關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。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を示した。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。

つぎに *hyl1-2* 変異植物における miR163 生合成を調べたところ、pri-miR163 上の第一切断部位が、間違った位置にずれてしまうことがわかった。この差異は *dcl1-9* 変異体で検出された事実と類似していた。そこで DCL1 と HYL1 の相互作用の可能性を考えた。*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。これらの結果は、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と考えるとつじつまが合う。

さらに、miR163 以外の miRNA 生合成への HYL1 の関与を調べ、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を明らかとした。

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。また miRNA の蓄積がタバモウイルス TMV の感染に伴い増加する事実の原因を知るための解析を行った。TMV がコードする 126K 複製酵素が RNA サイレンシングサブレッサー活性をもつ。この複製酵素が miRNA 経路に影響を及ぼすことが予測された。そこで、*N. benthamiana* の葉での一過的発現系による解析手法を用いて複製酵素と pri-miRNA を共発現しても、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ることを見いだした。miRNA 前駆体のプロセッシングには影響を与えないが、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。

以上のように、本研究は、植物の miRNA 生合成において、DCL1 によって切断が行われること、さらに HYL1 の機能が必要であることを明らかとした。さらに、DCL1-HYL1 複合体が形成されることが切断の効率と正確さを規定する上で重要であることが世界ではじめて明らかとなった。また植物ウイルスの感染によって、形態異常を引き起こすことと関連があるとされる miRNA の蓄積異常は、ウイルスの複製酵素による miRNA/miRNA\* duplex の安定性増大が関係することが、さらに明らかとなった。このように、RNA サイレンシング機構の詳細を解明する中で、世界に先駆けて得られた結果を得ている。

したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。