

現在種々の生物種についての全ゲノム解読が終了し、ポストゲノムの時代を迎えている。そのなかで、非翻訳 RNA が昨今注目を浴びる存在となり、RNA による生体内での制御現象はホットな研究分野となっている。マイクロ RNA(マイクロ RNA)はおよそ 18~25 塩基程度の短い RNA であり、相補的な配列を持つメッセンジャーRNA(mRNA)と結合し、mRNA の翻訳を阻害することでタンパク質の発現を制御している。マイクロ RNA を介した発現制御の機構は動植物を問わず、多細胞生物に広く共通な機構であり非常に重要であると考えられる。また、環境に応答した非常にダイナミックな制御にも関わる事が予想されている。

従来 RNA に関する研究は生化学的手法を用いて発展してきた経緯がある。よって、多くの知見は静的なものであり、生物学的な意義と結びつける際に、ダイナミックな制御を解析し理解するには不十分であった。マイクロ RNA を介した生物現象の制御を理解するには、マイクロ RNA が生合成される場の解析、また運ばれてその相補的な mRNA の翻訳を阻害し発現を制御する場の解析、また生成される場から制御の場までの移行などを、理解する必要があると考えた。

そこで、論文提出者は植物における低分子 RNA の生合成過程と、生合成された低分子 RNA の動態を、生物体を破壊することなく、非破壊的にリアルタイムで追跡することで動的な情報を得ることをめざした。まず系の確立から研究を開始した。生体現象をリアルタイムで解析するに、論文提出者はマイクロ RNA の生成、制御機構に関係したタンパク質分子を蛍光タンパク質と融合した状態で発現させ、それを蛍光顕微鏡で観察する“イメージングシステム”の構築を行った。こうした系は動物や酵母などでは進んでいるが、植物では進んでいないのが実情であった。

植物のマイクロ RNA の生合成過程には Dicer-like 1 (DCL1)、HYPONASTIC LEAVES (HYL1)および SERRATE (SE)と呼ばれる 3つの因子が関わっていることが先行研究で明らかになっている。そこで、論文提出者は最初にその 3 因子の可視化を目標に、イメージングシステムの構築を行った。そのために適切な蛍光タンパク質の選択、自家蛍光等を排除するフィルターの選択、シグナルを拾うためのフィルターの選択、GATEWAY システムによる融合遺伝子の簡略化、N 端- または C-端に融合できる複数プラスミドの構築などに工夫を必要としたが、最終的に種々の可視化を可能にした二つの系、一つはリアルタイムで生体内においてタンパク質間の相互作用が検出できるイメージング手法である蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)、もう一つは蛍光タンパク質相補法(BiFC)を用いた解析系である。

確立したシステムを用いて、DCL1, HYL1, SE について解析を進め、それら 3つの因子が核内の顆粒状構造に局在していることを明らかとした。更に、FRET 法と BiFC 法を応用して、解析を加えた結果、これら 3 因子がその核内の顆粒状構造において三者一体の複合体を形成していることを明らかとした。

この構造体が実際にマイクロ RNA のプロセッシングに関与するのであれば、ここにマイクロ RNA 前駆体も存在するはずである。その共局在を確認するために RNA の可視化系を導入した。原理は MS2 フェージの外被タンパク質(CP)が、特定の RNA 配列と強固に結合する性質を利用するものである。この RNA 配列をマイクロ RNA 前駆体配列の 3' 端に結合させ、発現させたところ、同時に発現させた RFP 融合 CP が核内の顆粒状構造で蛍光を発する様子が観察された。その結果、マイクロ RNA 前駆体も核内の顆粒状構造に局在していることが確認され、本研究で確認された顆粒状構造の生物学的意義を確認することができた。前述の 3 因子とマイクロ RNA 前駆体の局在を同時に調べたところ、確かに同じ顆粒状構造に共局在していることが確認された。

総合すると、DCL1,HYL1 および SE がマイクロ RNA 前駆体の成熟化を行う複合体 (microprocessor) を形成していることが強く示唆された。報告は植物において初めて報告された。動植物を問わずイメージングの系を用いて、こうした複合体をリアルタイムで生体内において捕らえたこのような報告は無く、この知見は非常に新規なものである。

マイクロ RNA が実際に標的となる mRNA と結合し、切断もしくは翻訳抑制をかけるのは細胞質に存在するとされてきた RNA-induced silencing complex (RISC) とよばれる構造である。実はこの構造も主に生物を破碎して得られた抽出液等を用いて行われた生化学的な解析から浮かび上がったものである。この構造の実体をイメージングシステムを応用して、解析することを次におこなった。論文提出者は同時に、近年報告されてきた動物や酵母の研究によって mRNA の分解や蓄積など、mRNA の管理を行っている場(P-body)と RISC の関係についても興味をもち、双方の関係に関する研究を行った。

動物、酵母において、mRNA 分解に関わる脱キャップ酵素のサブユニット DCP1 および DCP2 が P-body の形成に関わっていることが示されていた。そこで植物における DCP1 および DCP2 ホモログの解析を行ったところ、それらが P-body を形成することが分かった。これをうけて、RISC を構成する ARGONAUTE 1 (AGO1) タンパク質の局在と P-body の関係を調べた。AGO1 は単独では核と細胞質に局在する様子が観察されたが、DCP1 との共発現では P-body に DCP1 と共に局在する様子が観察された。このことは、AGO1 が P-body と強く関わる形で細胞質内に RISC という活性をもった構造を構成することが強く示唆された。これまでに植物において RISC の局在を可視的に報告した例は無く、その意味でもこの解析結果は新規なものである。

従来、microprocessor によって生合成されたマイクロ RNA が RISC あるいは今回関連の示された P-body へとどのように運ばれるかは未知であった。論文提出者は、解析のなかで microprocessor 構成因子のうち SE と HYL1 は単独で発現させると核のみならず、細胞質にも存在するものもあることを見いだしていたが、さらに DCP1 と共発現をすると、核内の局在はなくなり、細胞質内のみ見いだされるようになり、しかも P-body と共局在することをみいだした。そこには RISC の因子 AGO1 も存在することから、SE と HYL1 が核内 microprocessor で成熟化したマイクロ RNA を、みずから細胞質の RISC へ受け渡している可能性を強く示唆した。この知見はきわめてユニークなものであり、今後のマイクロ RNA の機能発現にいたるまでの理解のために非常に重要な知見であると考えられる。

このように論文提出者は、植物におけるタンパク質分子の動向を可視化して追跡できるシステムを構築し、それを利用してマイクロ RNA の転写後動態に関する研究をおこなった。FRET 法や BiFC 法を用いて、複数分子の相互作用の可能性について検討し、多くの新たな知見を得ている。今後マイクロ RNA の機能発現に至る種々の段階について、従来の手法だけでは得られなかった新たな知見と、将来に向けての新たな視点を与える研究である。本研究は世界的に見ても独創的で先駆的な役割を果たす研究結果であり、今後この分野の進展への貢献が大きく期待されるものである。

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