

論文の内容の要旨

Genetic and molecular analysis of microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナにおけるマイクロ RNA 経路の遺伝学的及び分子生物学的解析)

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

田上 優子

[背景と目的]

生命における重要な RNA 分子としてメッセンジャーRNA、トランスファーRNA そしてリボソーム RNA 等が古くから知られていた。これらは DNA の遺伝情報の橋渡しやタンパク質の翻訳に重要な機能を持つ。一方、近年 20 塩基程度の小分子 RNA が遺伝子発現制御において鍵となることがわかってきた。主に遺伝子の発現制御を行う RNA サイレncing と呼ばれるこの機構は広く真核生物に保存され、トランスポゾンやウイルスなど外来の核酸の抑制や内在性の遺伝子発現制御を行う。

こうした遺伝子制御機構の一つにマイクロ RNA (miRNA) 経路がある。内在性の遺伝子 (*MIR gene*) から転写・切断を受け生成した miRNA が別の遺伝子の発現制御を行う機構である。植物では特に、標的遺伝子となるもので発生や分化に関わるとされる転写因子が多く、miRNA 経路の正常な制御は非常に重要である。

これまでにモデル植物シロイヌナズナを用いた miRNA の生成過程の研究が行われてきた (図 1)。転写によってできた miRNA 前駆体 (pri-miRNA) は内部に二本鎖構造を持つ。この部分において RNase III タンパク質 DICER-LIKE1 (DCL1) が二段階の切断を行うことにより miRNA/miRNA* 二本鎖が生成される。DCL1 に結合し活性を補助すると考えられているタンパク質に HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) がある。HYL1 は二本鎖 RNA 結合ドメインを持ち、相同タンパク質は広く動植物に保存されている。HYL1 を欠損した変異体植物では miRNA の

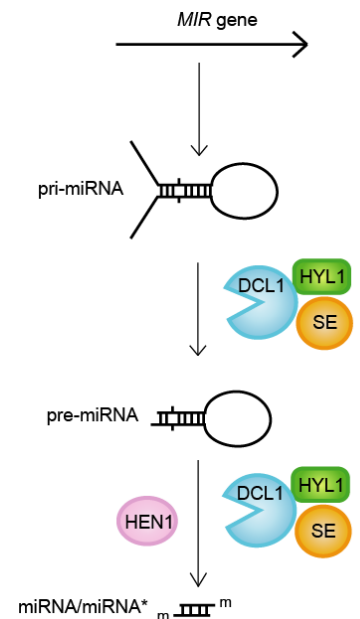


図 1 miRNA 生成過程

蓄積が減少し、葉が細く、その縁が上向きにカールするといった特徴的な表現型を示す。本研究では miRNA 経路に関与する因子のさらなる理解を得るため、*hyl1* 変異体に別の変異を導入し表現型が復帰する変異体、*hyl1* サプレッサーを得て解析を行った。

[結果と考察]

(1) *hyl1* サプレッサーのスクリーニングと新規 *dcl1-13* 変異の発見

hyl1-2 種子を EMS 変異原処理し、約 38,000 個の M2 芽生えから表現型が野生型様に復帰した 22 個体をスクリーニングした。そのうち 1 個体について解析を進めたところ、*hyl1* 抑圧変異の原因は優性であることがわかった。さらにマップベースクロニング法によって原因遺伝子は 1 番染色体の上腕端 440 kb 以内に存在することを見出した。この領域には HYL1 に結合して miRNA の生成を担う DCL1 が存在することから、DCL1 コード領域周辺のゲノム配列を確認した結果、*DCL1* 遺伝子の 1183 番目のグアニンがアデニンに置換していた。この変異を持つ *DCL1* 遺伝子を *hyl1* 変異体に形質転換すると表現型が野生型様に復帰したことから、*hyl1* サプレッサーの原因であることが証明された。この新規 *dcl1-13* 変異は DCL1 の RNA ヘリカーゼドメインにおける 395 番目のグルタミン酸からリシンへとアミノ酸置換 (E395K) を引き起こすと思われる (図 2)。得られた *hyl1* サプレッサーはいずれもこの変異を有していた。DCL1 のヘリカーゼドメインはこれまで機能がほとんど未知であったが、本研究からその重要性が示唆された。さらに興味深いことに本研究により、全生

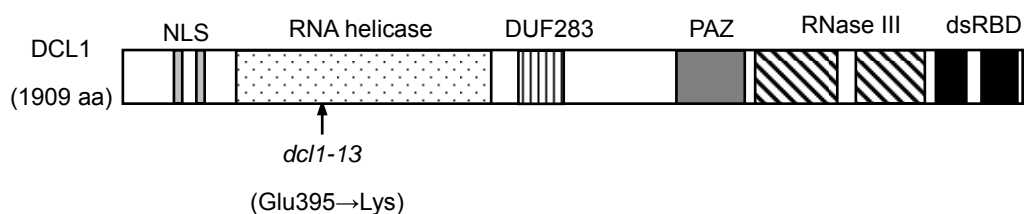


図 2 *dcl1-13* 変異は DCL1 のヘリカーゼドメインにおけるミスセンス変異を引き起こす物の *Lycium* シンボル 具において、初めに述べた変異の存在が示された。

(2) *dcl1-13* 変異の生体内における影響 -HYL1 の有無による影響の違いについて-

dcl1-13 変異がどのように *hyl1* 変異を抑圧したのか知るために、*hyl1* サプレッサー (すなわち *hyl1-2 dcl1-13* 二重変異体) の表現型解析を詳細に行った。ヘテロ接合体とホモ接合体のサプレッサー (*hyl1-2 dcl1-13/DCL1* 及び *hyl1-2 dcl1-13/dcl1-13*) を比較したところ、ホモ接合体でより表現型が回復することがわかり、*dcl1-13* 変異による *hyl1* 表現型の抑圧は半優性であることが示唆された。サプレッサーにおける miRNA の蓄積量を調べたところ、やはり半優性に miRNA の蓄積量は増加した。さらに miRNA 前駆体の蓄積量と切断位置を調べ

た結果、*hyl1* サプレッサーでは miRNA の切断が促進され、さらに切断位置が正常に戻る
ことがわかった。

次にこれまでに報告されている他の *dcl1* 変異にも同じように *hyl1* サプレッサー効果があ
るかを調べた。同様にヘリカーゼドメインにミスセンス変異を持つ *dcl1-7* と *hyl1-2* の二重
変異体の作成を試みた。しかしこの二重変異体は致死であったため、*hyl1* サプレッサー効果
は *dcl1-13* 変異に特異的であることが示唆された。

さらに *dcl1-13* 変異の特徴を知るため、*hyl1* サプレッサーから *hyl1* 変異を除いた *dcl1-13*
変異体を作成し解析した。ここまでの結果から *dcl1-13* 変異は miRNA の生成を促進する効
果があると考えられるため、*dcl1-13* 変異体では野生型に比べ miRNA の蓄積量が増加すると
予想されたが、実際には逆に減少していた。つまり *dcl1-13* 変異は HYL1 が無いときには
miRNA の生成を促進するが、HYL1 があるときには逆に減少させる効果があることが示唆
された (図 3)。 *dcl1-13* 変異は miRNA の蓄積量が減少する *hyl1* 以外の変異体、*se* 及び *hst*
変異体の表現型を抑圧しなかったことから、その効果の HYL1 依存性が強く示唆された。

以上のことから、*dcl1-13* 変異は *hyl1* 変異体で不在となった HYL1 の機能を補い miRNA
の生成を促進し、その結果 *hyl1* の表現型が野生型様に復帰したと考えられる。つまり DCL1
のヘリカーゼドメインは HYL1 と機能的に関連があることが強く示唆された。また HYL1
の有無によって *dcl1-13* 変異は miRNA 生成に対して逆の効果があるという興味深い事実が
明らかとなった。

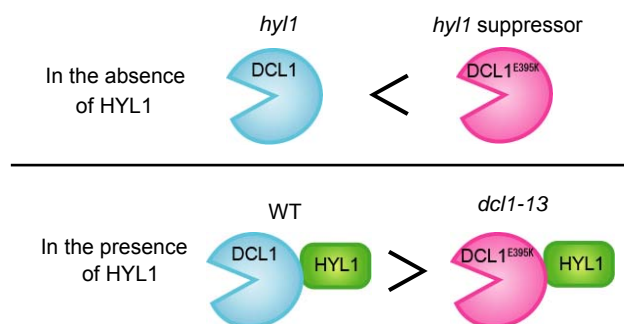


図 3 *dcl1-13* 変異の miRNA 生成に対する効果

(3) *dcl1-13* 変異による影響の分子基盤

次に、ここまでに示してきた *dcl1-13* 変異の影響について、その原因の分子メカニズムの
解明を試みた。まず細胞内局在を調べたところ、野生型 DCL1 は核質及び核内のドット状
構造に局在するのに対し、DCL1^{E395K} は核質のみに局在しドット状の局在は見られなかった。
さらに野生型 DCL1 では核小体へは局在しないのに対し、DCL1^{E395K} はその局在が観察され
た。

ヘリカーゼドメインの立体構造モデルから、395 番目のグルタミン酸はドメインの外側に
突き出すように位置すると予測されたため、この側鎖はなんらかの他の物質との相互作用

に関係しており、酸性のグルタミン酸から塩基性のリシンへと変化したことによってこの相互作用が変化したのではないかと推測された。

いくつかのヘリカーゼについて、*in vitro* で ATPase 活性、RNA 結合活性、unwinding 活性があることが示されている。そこで DCL1 のヘリカーゼドメイン (図 2, RNA helicase) を精製し、これらの活性の検出を試みたがいずれも検出できず、DCL1 の基質である miRNA 前駆体との結合能は二本鎖 RNA 結合ドメイン (図 2, dsRBD) にあることが確かめられた。

次に、共免疫沈降法によって DCL1 と HYL1 との結合能を調べたところ、DCL1^{E395K} は野生型と同程度の結合能を持つことが示された。またその結合は DCL1 の二本鎖 RNA 結合ドメイン (図 2, dsRBD) が担っていたため、*in vitro* での結合能に *dcl1-13* 変異が与える影響は小さいことが示唆された。しかしながら、BiFC 法によって生細胞内での HYL1 との結合能を調べたところ、DCL1^{E395K} は HYL1 との結合能が弱く、特に核内のドット状構造における結合が弱いことが示唆された。

以上の結果から *dcl1-13* 変異の影響を説明すると、HYL1 存在下で miRNA 生成が減少する理由として、*dcl1-13* 変異によって核内での局在が異常になることにより HYL1 との結合が弱まったため、と考えられる。しかしながら、HYL1 非存在下の miRNA 生成促進メカニズムは依然未解明である。最近ヒトの Dicer について、ヘリカーゼドメインによる自己活性阻害効果が報告された。このような阻害効果がシロイヌナズナ DCL1 にもあり、*dcl1-13* 変異によりその効果を取り除かれるのかもしれない。今後さらに、HYL1 による DCL1 活性化メカニズム、及び DCL1 のヘリカーゼドメインの役割についてより詳細な解明が期待される。