

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 田上優子

近年 20 塩基程度の小分子 RNA が、真核生物での遺伝子発現制御において重要な役割を果たすことが明らかとなった。こうした小分子 RNA が関わり、遺伝子の負の制御を行う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。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 経路の正常な制御の理解は非常に重要である。

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。DCL1 や HYL1 といった遺伝子産物の詳細な機能を解析することは、真核生物の遺伝子発現制御の理解にとっても重要である。

本論文提出者はまず第一章で、miRNA 経路に関与する因子についての理解を深めるため、*hyll* 変異体に別の変異を導入し表現型が復帰するサプレッサー変異体を単離し、その解析を行った。*hyll-2* 種子に EMS 変異原処理を施し、約 38,000 個の M2 芽生えから表現型が野生型様に復帰した個体を複数得た。解析を進めたところ、*hyll* 抑圧変異の原因は優性であることがわかった。遺伝学的マッピングによって、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。するとその結果、DCL1 遺伝子中の 1183 番目のグアニンからアデニンへのアミノ酸置換をもたらす置換を見いだした。この変異を持つ DCL1 遺伝子を *hyll* 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、*hyll* サプレッサーの原因であることが証明された。この *dcl1-13* と名づけた新規変異は DCL1 の RNA ヘリカーゼドメイン中、395 番目のグルタミン酸からリシンへのアミノ酸置換 (E395K) を引き起こす。しかも得られた *hyll* サプレッサーはいずれもこの変異を有していた。本研究から DCL1 のヘリカーゼドメインの重要性がはじめて示唆された。と同時に DCL1-HYL1 の相互作用の重要性が改めて明らかとなった。全生物の Dicer タンパク質において初めて優性の変異体を得られた。

第二章では *dcl1-13* 変異による *hyll* 変異を抑圧する機構を知るために、*hyll* サプレッサー (*hyll-2 dcl1-13* 二重変異体) の表現型解析を詳細に行った。表現型についてヘテロ接合体

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*) とを比較すると、ホモ接合体でより野生型に近く、ヘテロ接合体ではその中間であることがわかり、*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。その表現型は、miRNA の蓄積量の復帰、miRNA 前駆体がプロセッシングを受ける度合いと切断位置の正確さと対応していた。miRNA の生成が、正常な形態形成に重要であることを裏付けるものとなった。さらに従来の *dcl1* 変異には *hyl1* サプレッサー効果がなく、*dcl1-13* 変異に特異的であることが示唆された。第一章でも示されたように今回の変異体以外に、サプレッサー変異は見いだされておらず、遺伝的にはこの変異は究極のものに近いと想像され、本研究でこうした変異体が見いだされたことは特筆に値する。

hyl1 変異を除き、変異として *dcl1-13* のみをもつ変異体を作成し解析した。この *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。*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。

dcl1-13 変異は *hyl1* 変異体で不在となった際に、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。DCL1 のヘリカーゼドメインは HYL1 との機能的な大きな関連性が強く示唆された。その機構についての考察を、第三章において解析を続けた。

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 では核小体への局在は確認できないのに対し、DCL1^{E395K} では確認された。

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、この側鎖が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と推測された。

大腸菌で発現した DCL1 のドメインタンパク質をもちいた生化学的な *in vitro* 解析では DCL1 の基質である miRNA 前駆体との結合能が二本鎖 RNA 結合ドメインにあることが確認できたが、ヘリカーゼドメインにはその差が見いだされなかった。共免疫沈降法によって 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。一方で 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。HYL1 との結合は DCL1 の二本鎖 RNA 結合ドメインが担っているので、*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。総合すると、HYL1 存在下で miRNA 生成が減少するのは、*dcl1-13* 変異によって核内での局在が異常になることで HYL1 との結合が弱まったため、と考えられる。一方で、ヘリカーゼドメインによる自己活性阻

害効果が *dcl1-13* 変異により取り除かれる可能性も示唆され、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の非常に興味ある知見を提供した。

以上、本論文における研究は遺伝子発現制御において非常に重要な miRNA の生成機構に関わる因子について真核生物全体のなかでも非常に重要な知見をあたえ、今後の研究にあらたな視野をあたえたと判断する。

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。