

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	平田 梨佳子
学位授与の日付	2022年5月31日	
論文名	シロイヌナズナ microRNA 生成の分子機構に関する研究	
論文審査委員	主査	小泉 望
	副査	青木 考
	副査	横井 修司
	副査	岩田 雄二

## 論文要旨

### 序論

microRNA (miRNA) は真核生物に見られるタンパク質をコードしない約 20-22 塩基の低分子 RNA であり、植物においては生物学的、非生物学的ストレスへの応答、分化、発達など多様な生命機能に重要な役割を果たす。RNA 切断酵素である Dicer-Like1 (DCL1) がステムループ構造を取った前駆体 (pri-miRNA) を切断すると、pre-miRNA が生じる。pre-miRNA は DCL1 によってさらに切断され miRNA が生成する。DCL1 による二段階の切断によって生成された miRNA は標的 mRNA に配列依存的に結合し、mRNA の分解や翻訳抑制を引き起こすことで遺伝子発現を制御する。

シロイヌナズナには 4 つの DCL オーソログが存在しており、DCL2、DCL3、DCL4 が二本鎖 RNA を基質として small interfering RNA (siRNA) を生成するのに対して、DCL1 だけが pri-miRNA を基質として miRNA を生成する。植物の pri-miRNA は塩基対を形成しないミスマッチをステムに持つ多様な二次構造を形成するが、DCL1 がこのような特徴的な構造を取った pri-miRNA を認識し、正確かつ効率的に miRNA を生成するメカニズムの詳細は明らかではない。そこで本研究では pri-miRNA が共通して持つ構造であるミスマッチに着目し、miRNA 生成における重要性と役割の解明を試みた (第一章)。また、このような特徴的な二次構造を持つ pri-miRNA を DCL1 が認識するメカニズムを明らかにするために、4 つの DCL オーソログのうち DCL1 のみにみられる領域と、ヘリカーゼドメインの機能解析を行った (第二章)。

miRNA の生成と機能には DCL1 に加え、二本鎖 RNA 結合タンパク質である HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1)、ジンクフィンガータンパク質である SERRATE (SE)、

miRNA と複合体を形成し遺伝子発現制御を担う ARGONAUTE1 (AGO1) など多数のタンパク質の関与が知られている。これらの miRNA 生成関連因子の機能欠損は植物の様々な生理機能に影響を与える。miRNA は多様なストレスへの応答を担うことが明らかにされているが、タンパク質の折り畳み異常に応答して起こる小胞体ストレスへの関与は全く明らかにされていない。そこで、これらの機能欠損変異体を用いて miRNA 関連因子と小胞体ストレス応答との関係性の解明を試みた (第三章)。

## 第一章 miRNA 生成における pri-miRNA ミスマッチの重要性と役割の解明

DCL1 は二段階の切断により pri-miRNA の特定の位置から miRNA を切り出す。一段階目の切断は pri-miRNA のステムの末端から 15-17 塩基程度離れた位置で起こる傾向にあることが知られているが、pri-miRNA の二次構造は多様であり、その他にも DCL1 による切断を規定する要素が存在すると考えられる。そこで、pri-miRNA が共通して持つ構造であるミスマッチに着目し重要性の解明を試みた。解析のモデルとして、上流側 (ループ側) と下流側 (ループから離れた側) に複数のミスマッチを持つ pri-miR167a を選定した。in vitro 転写により調製した pri-miR167a と、昆虫細胞/バキュロウイルス発現系により調製した精製 DCL1 を in vitro で反応させる切断反応を行ったところ、予想のサイズと一致する切断断片が得られた。

次に、miRNA が生成する領域のすぐ下流側に隣接するミスマッチを閉じた変異型 pri-miR167a (CL1) を調製し、切断反応を行った。その結果、二段階目の切断効率が低下したことから、このミスマッチが DCL1 による切断効率に重要であることが分かった。次に、下流側の全てのミスマッチを閉じた変異型 pri-miR167a (CL2) の切断反応を行ったところ切断パターンが変化した。切断断片の塩基配列解析を行ったところ、本来の切断位置に加え、下流側に約 10-12 塩基ずれた位置の切断がみられた。このことから、下流側のミスマッチは DCL1 による切断の正確性に寄与することが分かった。さらに、上流側に存在するミスマッチを閉じた変異型 pri-miR167a (CU) の切断反応を行ったところ、CL2 と異なる切断パターンの変化がみられた。切断断片の塩基配列解析を行ったところ、本来の切断位置に加え、上流側に約 9-11 塩基ずれた位置の切断が見られた。さらに、CU に特異的に見られる断片の塩基配列解析から、DCL1 による二段階の切断の方向性が通常の下流側→上流側から上流側→下流側に変化したことが分かった。このことから上流側のミスマッチは DCL1 による切断の方向性を規定することで切断の正確性を担うことが明らかになった。以上の結果は、他の前駆体 (pri-miR164a、pri-miR399a) においても同様にみられた。

ミスマッチの役割が植物体においても同様に果たされるかを明らかにするために、変異型 pri-miR167a を過剰発現するシロイヌナズナを作出し、定量 RT-PCR により miR167a、miR167a から下流側に 11 塩基ずれた低分子 RNA である sRNA (-11)、上流側に 9 塩基ずれた低分子 RNA である sRNA (+9) の定量を行った。その結果、in vitro と同様に、CL2 からは下流側に、CU からは上流側にずれた低分子 RNA の生成量の増加が認められた。以上の結果から、pri-miRNA ステムの miRNA が生成する領域に隣接

するミスマッチは DCL1 による切断効率を担うこと、下流のミスマッチは切断の正確性を担うことが明らかになった。さらに、上流側のミスマッチは切断の方向性の規定においても重要であることが分かった。

## 第二章 DCL1 の N 末端領域とヘリカーゼドメインの機能解析

シロイヌナズナの 4 つの DCL オーソログのうち、DCL1 だけが pri-miRNA を基質とし miRNA を生成する。この基質特異性を生み出すメカニズムを明らかにすることで、複雑な二次構造をとった pri-miRNA を DCL1 が正確かつ効率的に認識、切断する機構の解明を試みた。はじめに、4 つの DCL のうち DCL1 特異的に見られる 240 アミノ酸程度の N 末端機能未知領域に着目した。N 末端領域を除いた精製 DCL1 $\Delta$ N を調製し切断反応を行ったところ、生成する miRNA 量が DCL1 全長による切断と比較して大幅に減少した。一方、DCL1 による一段階目の切断で生じる pre-miRNA に対する切断効率は DCL1 全長と DCL1 $\Delta$ N の間で変化がみられなかった。さらにゲルシフトアッセイにより、N 末端領域は pri-miRNA への親和性を示すが、pre-miRNA には示さないことがわかった。このことから、N 末端領域は DCL1 による pri-miRNA の認識に重要であることが明らかになった。

DCL1 の動物ホモログである Dicer はヘリカーゼドメインが前駆体のループを認識することで切断位置の決定を担う。また、一般にヘリカーゼには核酸上の転移や二本鎖核酸をほどく役割があり、植物 DCL1 においても pri-miRNA に何らかの作用を示すと考えられる。そこで、ヘリカーゼドメインを除いた精製 DCL1 $\Delta$ Helicase を調製し、pri-miRNA に対する切断反応を行ったところ、DCL1 全長による切断と比較して miRNA 生成量が大幅に減少した。一般にヘリカーゼには ATP 依存性がみられるため、ATP の有無による切断への影響を調べた。その結果、DCL1 による複数回の切断を受ける pri-miRNA と二本鎖 RNA を基質とした場合、DCL1 全長では ATP がないと miRNA 生成量が減少したが DCL1 $\Delta$ Helicase では ATP の有無による変化は見られなかった。一方、DCL1 による切断が一回である pre-miRNA を基質とした場合、DCL1 全長においても DCL1 $\Delta$ Helicase においても ATP の有無による miRNA 生成量の変化がみられなかった。このことから、ヘリカーゼドメインには ATP 依存的な RNA 上の転移活性があると示唆された。

## 第三章 miRNA 関連因子と小胞体ストレスとの関係性の解明

小胞体ストレス応答は小胞体ストレスセンサーである Inositol-requiring enzyme1 (IRE1) により惹起され、植物の正常な発達やストレス応答において重要な役割を果たす。小胞体ストレス応答と miRNA による遺伝子発現制御の関連を調べるため、シロイヌナズナの miRNA 関連因子の変異体 (*hyl1-2*, *se-3*, *ago1-46*) と IRE1 変異体 (*ire1ab*) を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (Tm) を含む培地に播種した。*se-3* や *ago1-46* は生育に影響がみられなかった一方、*hyl1-2* は *ire1ab* と同様に大部分が枯死した。小胞体ストレスによって転写が誘導される複数の遺伝子の発現を定量 RT-PCR に

より解析したところ、*hyl1-2* における発現量は野生型株と変わらなかった。このことから、*hyl1-2* 特異的に蓄積が減少する miRNA の存在が小胞体ストレスへの感受性に影響を与えることが示唆された。また、HYL1 は核内で miRNA 生成に寄与するが、細胞質においても機能することが近年報告されており、細胞質局在の HYL1 が小胞体ストレスに何らかの働きを担う可能性も考えられた。

## 結論

本研究では、第一に pri-miRNA ステムのミスマッチが DCL1 による切断効率と正確性に重要な役割を担うことを明らかにした。第二に、DCL1 の機能解析により、DCL1 特異的に存在する N 末端領域が pri-miRNA の認識に重要であること、ヘリカーゼドメインが ATP 依存的な RNA 上の転移を担うことを明らかにした。以上のことから、二次構造多様性に富む pri-miRNA を DCL1 が認識し、正確かつ効率的に切断するメカニズムの解明に貢献する大きな知見を得た。また、これまで全く知られていなかった、miRNA 生成関連因子 HYL1 と小胞体ストレス応答の関係性を示唆する知見を得た。

## 審査結果の要旨

microRNA (miRNA) はタンパク質をコードしない低分子 RNA であり、標的とするメッセンジャー RNA に塩基配列依存的に結合することで遺伝子発現を負に制御する。植物においては生物学的、非生物学的ストレスへの応答や正常な分化、発生など多様な生理機能に重要な役割を果たす。そのため、正確かつ効率的な miRNA 生成は植物の恒常性維持に重要であり生成と機能の分子メカニズムに関する研究が進められてきた。また、近年は miRNA による遺伝子発現制御機構の育種への応用が期待されており、イネなどの作物における収量増加やバイオマス増産に繋がる基礎的知見も得られている。

植物において miRNA は前駆体である pri-miRNA を Dicer-Like1 (DCL1) と呼ばれるヌクレアーゼが二段階で切断することにより生成する。pri-miRNA はステムループ構造をとっており、ステムには塩基対を形成しないミスマッチが含まれる。植物には機能を持った miRNA が数百種知られており、それぞれに対する pri-miRNA はステムの長さやループの形状が様々に異なる多様な二次構造をとる。このため、DCL1 が pri-miRNA をどのように認識することで正確な切断位置を決定し、効率的な miRNA 生成を実現するかは不明であった。また、シロイヌナズナには四つの DCL オーソログが存在するが、pri-miRNA を認識して miRNA 生成を行うものは DCL1 のみである。その他は二本鎖 RNA を認識して small interfering RNA を生成するが、この基質特異性を生み出すメカニズムも不明であった。

本研究では pri-miRNA に共通して存在するミスマッチに着目し、miRNA 生成における重要性の検証と役割の解明を目的とした。また、DCL1 特異的に存在する N 末端の機能未知領域や動物ホモログで重要性が明らかにされたヘリカーゼドメインに着目し、機能解析を行った。

第一章では、ミスマッチを閉じた変異型 pri-miRNA をデザインし miRNA 生成に与える影響を評価した。精製 DCL1 タンパク質を用いた *in vitro* での解析より、正確かつ効率的な miRNA 生成におけるミスマッチの重要性を明らかにした。miRNA/miRNA\*領域に隣接するミスマッチを閉じると DCL1 による二段階目の切断効率が低下した。また、miRNA/miRNA\*領域より下流に存在するミスマッチを閉じると切断が下流側にずれた位置で起こった。さらに、上流に存在するミスマッチを閉じると切断が上流側にずれるだけでなく、切断の方向性が変化した。また、ミスマッチを閉じた pri-miRNA を過剰発現するシロイヌナズナ変異体を作成し、その解析により *in vitro* で見られたミスマッチを閉じた効果が *in vivo* でも見られることを示した。これらの結果から、miRNA/miRNA\*に隣接するミスマッチは切断の効率、下流側と上流側のミスマッチは切断の正確性、特に上流側のミスマッチは切断の方向性の決定に重要であることを明らかにした。

第二章では、DCL1 に特異的に存在する N 末端領域に着目した。N 末端領域を除いた精製 DCL1 $\Delta$ N を調製し、miRNA 生成に与える影響を評価したところ、pri-miRNA の切断効率は大きく減少したが、pri-miRNA の一段階目の切断で生成する pre-miRNA や二本鎖 RNA に対する切断には変化がなかった。このことから、N 末端領域が pri-miRNA の認識に重要であることが明らかとなった。また、精製 DCL3 を調製し、pri-miRNA 及び pre-miRNA に対する切断活性を評価した。その結果、pri-miRNA の決まった位置から miRNA を生成する DCL1 とは異なり、DCL3 は pri-miRNA の不特定の位置から低分子 RNA を生成した。しかし、DCL1 の N 末端領域を付加した精製 DCL3 は DCL3 全長と同様の活性を示したことから、N 末端領域は切断位置の決定には関与しないことが示された。さらに、DCL1 の動物ホモログで基質認識における重要性が明らかにされているヘリカーゼドメインを除いた精製 DCL1 $\Delta$ Hel を調製し基質認識に与える影響を評価した。その結果、ヘリカーゼドメインは pri-miRNA の認識に重要であり、ATP 依存的な RNA 上の転移活性を示すことが明らかとなった。

第三章では、miRNA 関連タンパク質をコードする遺伝子に変異を持つシロイヌナズナを、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを用いて処理し、小胞体ストレスに対する miRNA 経路の関与を評価した。その結果、DCL1 と協調して働く HYL1 の変異体 (*hyl1*) がツニカマイシンに感受性を示した。しかし、小胞体ストレスによって発現が誘導される代表的な遺伝子の発現量は野生型シロイヌナズナと *hyl1* の間で変化がなかったことから、*hyl1* 特異的に蓄積が変化する miRNA が小胞体ストレスに機能する可能性が示唆された。

本研究では pri-miRNA のステムに存在するミスマッチが植物の miRNA 生成に重要な役割を果たすことを明らかにし、それぞれのミスマッチが DCL1 による切断効率や正確性に重要な役割を担うことを明らかにした。また、DCL1 特異的に存在する N 末端機能未知領域及びヘリカーゼドメインが pri-miRNA の認識に重要であることを明らかにした。さらに、これまで関係性が不明であった小胞体ストレスと miRNA 関連タンパク質の関係性を示唆する洞察を得た。これらの成果は、分子生物学、植物生理学ならびに応用生命科学の発展、展開に貢献するものであると考えられる。従って本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。