



入した miRNA 前駆体 pre-mir-92a-1 を HEK293T 細胞で一過的に発現させてプルダウンし、共沈降するタンパク質の解析を行ったところ、DHX9 (RHA; RNA helicase A) が特異的に結合していることを見出した。この結果は、DHX9 が miRNA 前駆体と相互作用することにより、miRNA の成熟を制御する可能性を示唆するものであった。DHX9 は、DEAH ファミリーに属する ATP 依存的な RNA ヘリケースであり、ヘリケースドメインに加えて 2 つの二本鎖 RNA 結合ドメインを持つ。転写や翻訳の制御に関与するほか、ヒトでは Alu 配列を主な標的とし、環状 RNA の生成や、異常なスプライシングを抑制することが報告されている。また、DHX9 は Ago や Dicer などの RISC のコンポーネントと相互作用することが報告されており、miRNA の成熟過程への寄与が示唆されていたが、DHX9 がどのような miRNA を標的とし、miRNA の成熟過程においてどのような役割を果たすのかは未解明であった。そこで本研究では、DHX9 をノックダウンした細胞において、miRNA を次世代シーケンスにより解析することにより、DHX9 の miRNA 成熟過程における機能を明らかにすることを目的とした。

## 本論

### 第一章 DHX9 ノックダウン細胞における miRNA の解析

はじめに、DHX9 が miRNA の成熟過程にどのように作用しているかを網羅的に調べるために、DHX9 をノックダウンした細胞において、Ago2 と結合した miRNA の次世代シーケンスをおこなった。その結果、予想と反して、前駆体 pre-miRNA が DHX9 と共沈降した miRNA の発現には変化がみられなかったが、DHX9 のノックダウンにより多数の miRNA の発現量が変動することを見出した。特に、DHX9 のノックダウンにより一部の miRNA の発現量が顕著に増加することが判明した。これは、DHX9 がこれらの miRNA の発現を負に制御していることを示唆する結果である。また、DHX9 ノックダウンによる miRNA の発現量の増加は、ヒト由来の培養細胞である HEK293T と HeLa およびマウス由来の NIH3T3 細胞において共通して観察された。一方で、ヒト由来の細胞とマウス由来の細胞において、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA 種を比較すると、HEK および HeLa 細胞と NIH3T3 細胞において多数の miRNA が共通して発現していたにも関わらず、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA のほとんどは、ヒト由来の細胞またはマウス由来の細胞にのみ発現している miRNA であった。そこで、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA の保存性を調べると、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA は、哺乳動物間における保存性が低い傾向があること明らかになった。興味深いことに、ヒト細胞においては、DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA の約半数近くが霊長類特異的な反復配列である MADE1 に由来する miR-548 のファミリーであることが判明した。これらの結果は、DHX9 が、保存性の低い miRNA、特にヒト細胞では MADE1 に由来する miRNA を主要な標的とし、これらの miRNA の発現を抑制する機能をもつことを示唆している。

## 第二章 DHX9 ノックダウン細胞における mRNA の次世代シーケンス解析

DHX9 は RNA ポリメラーゼ II と相互作用することにより、転写制御に関与することが知られている。そこで、DHX9 のノックダウンによる miRNA の増加が、miRNA 遺伝子の転写量の増加に起因するかを調べるために、DHX9 をノックダウンした細胞において、mRNA の次世代シーケンスをおこなった。多くの miRNA 遺伝子は、RNA ポリメラーゼ II によって転写される遺伝子領域内のイントロンにコードされているため、同一転写物のエキソン部分にコードされた遺伝子（宿主遺伝子）の発現量を解析することにより、miRNA 遺伝子の転写量変化を評価した。その結果、DHX9 のノックダウンにより発現量が増加した miRNA の宿主遺伝子のほとんどが、DHX9 のノックダウンにより有意な発現量変動を示さないことが明らかになった。このことから、DHX9 が、これらの miRNA の発現を転写後の成熟過程において抑制していることが示唆された。

また、DHX9 が miRNA の発現抑制を介して、遺伝子の発現調節に関与するかを調べるために、miRNA のターゲット mRNA の発現量変動を解析した。その結果、DHX9 をノックダウンすると、DHX9 の標的となる miRNA のターゲット mRNA の発現量が減少傾向を示すことが判明した。このことは、DHX9 が miRNA の発現制御を介して、遺伝子の発現調節を行うことを示唆している。

## 第三章 DHX9 存在下における pri-miRNA の試験管内プロセッシング反応の解析

次に、DHX9 の細胞内における局在が主に核内であることから、DHX9 が、核内における miRNA のプロセッシング過程を負に制御する可能性に着目し、DHX9 が Drosha/DGCR8 による pri-miRNA のプロセッシングを阻害するかを試験管内において検証した。

MADE1 に由来する miRNA の前駆体である pri-mir-548d と、DHX9 のノックダウンによる有意な発現変動がみられなかった miR-16 の前駆体 pri-mir-16-1 をコントロールとして用い、Drosha/DGCR8 による切断反応をおこなったところ、pri-mir-16-1 は 100% 近く切断されたが、pri-mir-548d は 30% 程度しか切断されなかった。この結果は、pri-mir-548d の Drosha/DGCR8 によるプロセッシング効率が pri-mir-16-1 と比べてより低いことを意味する。さらに、DHX9 存在下において切断反応をおこなった結果、DHX9 タンパク質量依存的に pri-miRNA の切断率の低下が観察された。また、反応系に ATP を加えると、DHX9 による pri-mir-16-1 の切断阻害はほとんど観察されなくなったのに対し、pri-mir-548d の切断は ATP 存在下においても若干阻害された。これらの結果により、DHX9 が試験管内において pri-miRNA の Drosha/DGCR8 によるプロセッシングを阻害する活性を持つことが示された。DHX9 による pri-miRNA のプロセッシング阻害は、DHX9 が pri-miRNA と結合することにより Drosha/DGCR8 による切断を妨げた結果であると推察される。また、DHX9 は ATP 依存的な RNA ヘリケースであり、ATP 存在下では RNA との解離が促進されることが知られている。このために、ATP 存在下では DHX9 によるプロセッシングの阻害が緩和したと考えられる。しかしながら、MADE1 由来の miRNA 前駆体のプロセッシングは ATP 存在下においても観察された。これは、

MADE1 由来の miRNA 前駆体が、ATP 存在下においても DHX9 と強く結合するか、あるいは、Drosha/DGCR8 によるプロセシング効率が低いために、ATP 存在下であっても DHX9 による影響を受けやすいためであると推察される。

#### 第四章 RISC 中の miRNA 遺伝子に由来しない低分子 RNA の解析

これまでの結果から、DHX9 は霊長類特異的な反復配列である MADE1 由来の miRNA を含む、進化的により新しい miRNA 遺伝子の発現を、Drosha/DGCR8 によるプロセシングを阻害することにより抑制する可能性が示された。このことから、DHX9 が、こうした miRNA の発現を制御することにより遺伝子の発現調節に寄与するだけではなく、ゲノム配列中に偶発的に生じたヘアピン構造を形成しうる配列から、低分子 RNA が発生するのを防ぐ機能をもつのではないかと着想した。そこで、DHX9 をノックダウンした細胞における Ago2 と結合した miRNA の次世代シーケンスの結果を用い、miRNA 遺伝子としてアノテーションされていないヘアピン構造に由来する低分子 RNA の探索をおこない、さらに同定した低分子 RNA の DHX9 ノックダウンによる発現変動を解析した。HEK293T 細胞におけるデータを用いて miRNA 遺伝子としてアノテーションされていないヘアピン構造に由来する低分子 RNA を探索した結果、183 の遺伝子座に由来する低分子 RNA が、コントロールおよび DHX9 ノックダウンした細胞において共通して見つかった。また、これらの低分子 RNA のうち、一定量以上の発現量がみられた 28 の遺伝子座に着目すると、19 の遺伝子座に由来する低分子 RNA が DHX9 のノックダウンにより増加していることが明らかになった。この結果は、DHX9 が転写産物中に生じたランダムなヘアピン構造から、低分子 RNA が生成することを防ぐ機能をもつ可能性を示唆している。

#### 結論と今後の展望

本研究により、DHX9 をノックダウンすると、反復配列に由来する miRNA を含めた保存性の低い miRNA や、miRNA 遺伝子以外のヘアピンに由来する低分子 RNA の発現が転写後の段階で増加することを見出した。また、試験管内において DHX9 が pri-miRNA の Drosha/DGCR8 によるプロセシングを阻害する活性を持つことを見出した。以上の成果から、DHX9 が、生物種特異的な miRNA を標的として発現を抑制することにより、細胞の遺伝子発現制御に関与する可能性が明らかになった。また、DHX9 がトランスポゾンの挿入やゲノム配列の変異により生じたヘアピン構造から偶発的に miRNA が生じることを防ぐ機能を持つ可能性を明らかにした。しかしながら、DHX9 がどのようなメカニズムで、標的 miRNA の発現を特異的に抑制するのかを明らかにするためには、今後さらなる生化学的解析が必要である。また、DHX9 による発現抑制を受ける miRNA のターゲット遺伝子の解析を進めることにより、将来的に、DHX9 による miRNA を介した遺伝子発現調節機構の生理的機能を明らかにしていきたい。