

審査の結果の要旨

氏名 八代 悠歌

microRNA (miRNA)は、約 20 塩基程度の短い非コード RNA であり、Argonaute (Ago)タンパク質などと相互作用することで RNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれる RNA-タンパク質複合体を形成し、配列特異的に mRNA の分解や翻訳の抑制を引き起こす。miRNA は時空間的にその発現プロファイルを変化させ、遺伝子発現を調節することで、様々な生命現象と密接に関わっている。そのため、miRNA 自身の発現もまた、転写段階のみならず、その成熟過程においても、厳密に調節される必要がある。

論文提出者は、miRNA 生合成に関わる因子として DHX9 に着目した。DHX9 は二本鎖 RNA 結合ドメインを持つ ATP 依存的な RNA ヘリケースであり、転写や翻訳を制御するほか、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 が具体的にどのような 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。

そこで提出者は、DHX9 が miRNA の発現にどのように作用するの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 の次世代シーケンズ解析をおこなった。その結果、DHX9 をノックダウンした際に、一部の miRNA の発現量が顕著に増加することを見出した。この結果は、DHX9 がこれらの miRNA の発現を抑制していることを示唆している。また、DHX9 の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 細胞において共通の現象として観察された。一方で、ヒトの細胞とマウスの細胞では、DHX9 のノックダウンにより共通して増加する miRNA は存在しないことが明らかとなった。DHX9 のノックダウンにより増加した miRNA は、哺乳動物における保存性が低く、ヒト細胞においては、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 のファミリーであった。これらの結果から、DHX9 が反復配列に由来する miRNA を含めた保存性の低い miRNA の発現を

抑制する可能性を見出した。

さらに提出者は、DHX9 のノックダウンによる miRNA の増加が、転写制御によるものであ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解析をおこなった。その結果、DHX9 のノックダウンにより miRNA の宿主 mRNA の定常状態量には変化が見られなかったことから、これら miRNA の発現は転写後の段階で、抑制されていることが示唆された。

次に提出者は、DHX9 の局在が主に核であることから、DHX9 が核内における miRNA のクロッピング過程を負に制御する可能性に着目した。miR-548 ファミリーの前駆体 pri-miRNA を試験管内で、Drosha/DGCR8 によってクロッピングする系を構築し、DHX9 と ATP を加えたところ、クロッピングが阻害されるという結果を得た。一方で、進化的に保存された miRNA のクロッピングは、ATP 非存在下では DHX9 により阻害されたが ATP 存在下では阻害されないという結果を得た。これらの結果から、DHX9 は細胞内において、miR-548 ファミリー前駆体のクロッピング過程を阻害することで、これらの miRNA の発現を制御することが示された。

加えて提出者は、DHX9 をノックダウンした細胞において Ago2 にロードされた miRNA の中に、miRNA としてアノテーションされていない低分子 RNA を探索した。その結果、HEK293T 細胞において顕著に増加する 17 か所の遺伝子座に由来するヘアピン様 RNA を見出した。このことは、DHX9 が、ヘアピン様構造を形成する RNA 部位から、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。

本研究により、DHX9 が MADE1 などの反復配列に由来する保存性の低い miRNA や、ヘアピン様構造を有する RNA から、miRNA が生成するのを防ぐ役割があることが示された。哺乳動物のゲノムは進化の過程で反復配列やトランスポゾンが増加することが知られているが、これらの配列が転写されるとしばしば生育や生存に好ましくない RNA が生じると考えられる。本研究の結果から、DHX9 はこのような異常な RNA の発現を転写後の過程で抑えることでゲノムの進化を促進させる役割が示唆された。本成果は RNA 分野のみならず、ゲノム生物学全体に大きな影響を及ぼすものである。

以上の研究は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。