

論文の内容の要旨

植物の RNA 分解複合体 exosome を構成する RRP44/DIS3 の解析 Analysis of Plant RRP44/DIS3, a component of the RNA Exosome

熊倉直祐

Naoyoshi Kumakura

【背景と目的】

ゲノムから転写された RNA は細胞内で様々な修飾やプロセッシングをうけ、役割を終えた RNA は最終的に分解される。真核生物はこの RNA の分解を担う 2 つの主要な経路を持つ。一つは 5'→3' 方向への RNA 分解経路、もう一つが 3'→5' RNA 分解経路である。この 3'→5' RNA 分解経路を担うのが exosome である。exosome は真核生物において広く保存され生存に必須である。exosome は計 9 つのタンパク質からなるリング状の構造と、RNA 分解活性を担う RRP44/DIS3 から成り立っている。exosome は核内において rRNA、snoRNA など機能性 RNA のプロセッシングを行い、細胞質においては mRNA の分解を行う。モデル植物シロイヌナズナにおいても exosome のリング状構造を形成する 9 つの因子が同定され、胚形成や細胞表層の油層の調節などで重要な役割を持つ。しかしながら、酵母やヒトにおいて RNA 分解活性を直接担う exosome の重要な因子である RRP44/DIS3 については植物では未だ同定されていない。植物には二つ (AtRRP44A、AtRRP44B/SOV) の RRP44/DIS3 ホモログが知られている。本研究では分子生物学的、細胞生物学的手法を用いてこれらの因子の同定を目的とした。さらに、本研究で exosome 因子であることが明らかになった AtRRP44A の植物における役割を、*in vitro* 酵素活性実験とトランスクリプトーム解析を用いて明らかにした。

【結果】

結果 1. RRP44/DIS3 ホモログ候補としての AtRRP44 と AtRRP44/SOV の解析

1-1 モデル植物シロイヌナズナにおける RRP44/DIS3 の探索

酵母の RRP44/DIS3 遺伝子のホモログをシロイヌナズナにおいて探索した。その結果シロイヌナズナには RRP44/DIS3 に特徴的なドメインが保存された二つの遺伝子が見つかった。RRP44/DIS3 に類似性が高い順に AtRRP44A、AtRRP44B/SOV とし、変異体の解析を試みた。AtRRP44A の独立した三ラインの T-DNA 挿入変異体を解析した結果、ホモ接合体を得ることができず、配偶体形成不全の表現型を示す事がわかった。一方で、AtRRP44B/SOV の変異体には明確な表現型が見られなかった。

1-2 AtRRP44A のノックダウン植物の確立

AtRRP44A の変異体は致死の表現型を示した。そこでノックダウン変異体の作成を試みた。AtRRP44A のノックダウンには RNAi 法の一種である artificial microRNA を用いた。この方法は siRNA と比較して、off-target 効果の可能性を下げ、効果的に標的遺伝子のみをノックダウンすることができる。ノックダウンによる致死性の表現型を回避するために、葉肉細胞でのみ活性を持つ CAB3 プロモーターを用いて amiRNA を発現させた。その結果、葉で AtRRP44A の mRNA が野生型の 5% ~10% まで低下し、正常に生育するノックダウン変異体の作出に成功した。

1-3 AtRRP44A は 5.8S rRNA のプロセッシングに関与する

出芽酵母 (*S. cerevisiae*) やヒトにおいて、exosome は rRNA のプロセッシングに関与する。そこで AtRRP44A および AtRRP44B/SOV が rRNA のプロセッシングに関わるか否かを解析した。ノザン解析を行ったところ AtRRP44A ノックダウン (*rrp44aKD*) 変異体においてのみ 5.8S rRNA の合成中間体の蓄積の上昇がみられた。この結果より AtRRP44A は rRNA のプロセッシングに必要であることが明らかになった。また同様の結果がシロイヌナズナの exosome 因子である AtRRP4 および AtRRP41 ノックダウン植物からも得られた。

1-4 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV はそれぞれ異なる RNA を標的とする

AtRRP44A と AtRRP44B の変異体/SOV について、数種類の RNA の蓄積を定量した。核内でプロセッシングされる snoRNA と MRP の蓄積量が AtRRP44A では上昇し、AtRRP44B/SOV では変化しなかった。一方で、AT5G11090 mRNA の蓄積は AtRRP44B でのみ上昇し、AtRRP44A では変化しなかった。以上の結果より、AtRRP44A と AtRRP44B はそれぞれ異なる RNA の蓄積に影響を与えることが明らかとなった。

1-5 植物の exosome 因子、AtRRP44A、AtRRP44B/SOV はウイルスゲノム RNA の蓄積量に影響を与えない

RNA exosome はほ乳類のウイルス RNA を分解する。植物においても、RNA exosome がウイルスのゲノム RNA を分解するか否かを検証するため、exosome 因子、AtRRP44A、AtRRP44B/SOV の変異体にゲノムとして RNA を持つ植物ウイルス (キュウリモザイクウイルスおよびカブクリンクルウイルス) を接種し、その増殖量を測定した。その結果、いずれのウイルスの増殖量は、野生型植物と *rrp41*, *rrp44a*, *rrp44b* 変異体との間で差が見られなかった。以上の結果より、exosome 因子の AtRRP41、

AtRRP44A、AtRRP44B/SOV はいずれもキュウリモザイクウイルスとカブクリンクルウイルスの蓄積に影響を与えていないことが示唆された。

1-6 AtRRP44A は exosome 因子であり、AtRRP44B/SOV は exosome 因子ではない

上記の結果から、AtRRP44A と exosome は標的 RNA が rRNA、snoRNA、MRP RNA で全て一致しており、変異体の表現型も同一であった。一方で、AtRRP44B/SOV は exosome とは異なる RNA を標的としていた。以上の結果より、AtRRP44A が exosome 因子であることが強く示唆された。

結果 2. AtRRP44A の in vitro 酵素活性実験およびトランスクリプトーム解析

2-1 AtRRP44A は in vitro で RNA 分解活性を持つ

植物の RRP44/DIS3 ホモログであることが明らかになった AtRRP44A はそれぞれ endoribonuclease 活性と exoribonuclease 活性を持つことが予測される PIN ドメインと RNB ドメインを持つ。これらの活性を確かめるために AtRRP44A のリコンビナントタンパク質を作成し、*in vitro* で RNA 分解活性を確認した。その結果、AtRRP44A は exoribonuclease 活性を持つことが明らかとなった。さらに exoribonuclease の活性中心を調べ、RNB ドメイン内にある 489 番目のアスパラギン酸 (D489) が exoribonuclease 活性の活性中心であることを明らかにした。

2-2 AtRRP44A は細胞内の約 0.7%の遺伝子を制御する

次に、AtRRP44A の *in vivo* の標的 mRNA の探索のために、*rrp44aKD* 変異体を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、AtRRP44A のノックダウンによって、全ゲノム中の約 0.7%の遺伝子の RNA 転写物の蓄積量が変化していた。発現が上昇していた遺伝子群を対象に GO 解析を行ったところ、概日リズムと光合成に関わる遺伝子が顕著に多く含まれていた。概日リズムに関わる遺伝子の蓄積パターンを解析したところ、夜にピークを迎える遺伝子が増加し、朝にピークを迎える遺伝子が減少していた。

【結論と展望】

本研究では植物における RRP44/DIS3 ホモログと推測された AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の 2 つの候補のうち、AtRRP44A が exosome 因子であることを初めて示した。さらに、*in vitro* において、AtRRP44A が exonuclease 活性を持ち、その活性中心が D489 であることも明らかにした。AtRRP44A ノックダウン植物のトランスクリプトーム解析によって、AtRRP44A は *in vivo* において、全体の約 0.7% の mRNA の蓄積を制御することが示された。興味深いことに、AtRRP44A ノックダウン植物で蓄積が上昇した遺伝子群には概日リズムに関わる遺伝子が顕著に多く含まれていた。さらに AtRRP44A 植物における概日リズム遺伝子の発現パターンは夜間の特徴を示した。これらの結果は、AtRRP44A が、夜間にピークを迎える概日リズム因子の RNA 転写物の分解を通して、植物の概日リズムを制御することを示唆している。従って本研究の今後の主要な課題は、AtRRP44A ノックダウン変異体での概日リズムの乱れの検出と、AtRRP44A の直接の標的 RNA の探索である。