

別紙 2

論文審査の結果の要旨

論文提出者 熊倉直祐

本論文提出者は、真核生物で広く知られているリボソーム RNA のプロセッシングに関わる RNA 分解複合体 exosome の活性を担う因子 RRP44 (別名 DIS3) について、植物の系で初めての解析を行った。通常遺伝子 DNA 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たうえで機能し、役割を終えた RNA は最終的には分解される。こうしたなかで 3'→5' RNA 分解経路を担うのが exosome 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ことが酵母やヒトの先行研究で明らかとなっていた。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ことが知られていた。しかしながら、重要な因子である RRP44/DIS3 に相当する遺伝子が存在するのか、それほどのような機能をもつのか、これまで解析されていなかった。

熊倉氏はシロイヌナズナのゲノム情報中に類似性が高い順に *AtRRP44A*、*AtRRP44B/SOV* の二つの遺伝子を見いだした。シロイヌナズナをもちいるとさまざまな変異体が手に入れやすいのが普通だが、*AtRRP44A* の変異ホモ接合体は配偶体形成不全をおこし、致死の表現型を示すことがわかった。そこで彼はこのあとの解析を進めるために、組織特異的にノックダウンさせる方法を試みた。RNAi 法の一つである artificial microRNA (amiRNA) を、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* 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 (以下、*rrp44aKD* 変異体) の作出に成功した。この変異体ももちいて *AtRRP44A* の機能解析を以下行った。一方、*AtRRP44B/SOV* の変異体については T-DNA タグラインが得られた。こちらはホモ接合体でも成長過程で野生型と大きく異なる明確な表現型は見られなかった。

熊倉氏はこうした変異体を材料に用いて、*AtRRP44A* が実際にリボソーム RNA のプロセッシングに関与する事を示した。ほかにも snoRNA と MRP という非コード RNA のプロセッシングに関係すること、*AtRRP44B/SOV* が、AT5G11090 mRNA の蓄積を抑えている事などを明らかにした。*AtRRP44A* が exosome のコア因子と同様の標的基質を持つ事から機能的にも exosome の活性をになうサブユニットであることを示した。一方、植物に多く知られる RNA ウイルスの増殖への抑制効果は *AtRRP44A*、*AtRRP44B/SOV* いずれにも有意には認められなかった。

AtRRP44A 遺伝子は種をこえて分裂酵母の *rrp44* 変異株を相補することを明らかとし、ここからも exosome の活性を担うことが示された。*AtRRP44A* は PIN ドメインと RNB ドメイン領域をもち、

endoribonuclease 活性と exoribonuclease 活性を持つことが予測された。それをうけて置換変異体を作成することで RNB ドメイン内にある 489 番目のアスパラギン酸 (D489) がその活性中心であり、酵母の変異体の相補に重要なことを明らかにした。さらに *in vitro* で発現させた AtRRP44A が RNA exoribonuclease 活性を持つことを示しました。

さらに AtRRP44A の *in vivo* の標的 mRNA を探索する目的で、野生型植物と *rrp44aKD* 変異体について polyA(+)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 RNA 転写物の蓄積量が増加していることを見いだした。発現が上昇していた遺伝子群について 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おり、exosome 活性が概日リズムに関わる遺伝子の蓄積パターンを調節している可能性が初めて示された。

以上、まとめると熊倉氏の *AtRRP44A* 研究は、ホモ接合体が致死性という難関を、組織特異的なノックダウン変異株を得ることで乗り越えたことによって切り開かれた。そして *AtRRP44A* と *AtRRP44B* について解析をおこない、*AtRRP44A* が生育に必須で、リボソーム RNA のプロセッシングに関与すること、酵母 RRP44 と同等の機能、構造を持つこと、さらにいくつかの非コード RNA のプロセッシングや一部の mRNA の蓄積にも関与することを示した。そして葉の細胞においては概日リズムの関与する遺伝子 mRNA の周期的な上下変動を調節している新たな可能性を明らかとした。基本的な機能を明らかとするとともに、予想されていなかった特定の機能を持った一群の mRNA を標的とすることを世界に先駆けて明らかとしたものである。

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。