

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	Zhang Xiaojuan
論文題目	Functional analyses of Arabidopsis Cleavage Factor I (シロイヌナズナ Cleavage Factor I の機能解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、三つの研究を含む五章で構成される。研究内容は、mRNA 前駆体が成熟した mRNA になる過程で受ける 3'UTR 部位の切断機構について報告している。</p> <p>第一章では、真核生物で mRNA 3'UTR の長さの多様性が、転写産物の安定や局在を介して、遺伝子発現を制御することを記述された。そして Cleavage Factor I タンパク質複合体 (CFI) が、その他の mRNA 制御因子とともに 3'UTR の長さの決定に重要な役割を担うことが示された。シロイヌナズナとヒトを比較すると、AtCFI 25a と AtCFI 25b がヒト CFI 25、AtCFI 59 がヒト CFI 59、AtCFI 68 がヒト CFI 68 に対応する。</p> <p>第二章では、双子葉植物のモデル植物シロイヌナズナの CFI を用い、植物における CFI 構成因子の相互作用解析を行なった。まず、シロイヌナズナ CFI 構成因子の候補遺伝子を単離した。つぎに、<i>in vitro</i> で、免疫沈降・pull-down 解析、alpha screen 解析を実施し、<i>in planta</i> で、BiFC・シロイヌナズナ培養細胞局在解析、TAP-LCMS を用いた相互作用因子同定解析を実施した。その結果、AtCFI 25a は AtCFI 25a、AtCFI 59、AtCFI 68 と相互作用することが示された。また AtCFI 25b が AtCFI 68 と相互作用することから、ヒト CFI で示されている(CFI 25)-(CFI 25)-(CFI 68)-(CFI 68)を基本とする四量体型 CFI が、シロイヌナズナに存在することが示唆され、ヒトより多様な様式で存在する可能性が示された。さらに TAP-LCMS で AtFIP1 や AtCSN1 等が同定された。</p> <p>第三章では、CFI の必須構成因子であり mRNA 結合部位を有する AtCFI 25 の機能解析を行なった。シロイヌナズナにおいてアミノ酸レベルで相同性がある 2 因子 AtCFI 25a と AtCFI 25b をコードする遺伝子機能欠損変異体を各々複数アレル単離して解析した。その結果、<i>atcfi 25a</i> が矮小化をはじめ多面的な形態形成異常を示す一方、<i>atcfi 25b</i> には顕著な形質異常がみられなかった。さらに、AtCFI 25a 機能の分子機構を解明すべく <i>atcfi 25a</i> を用いて種々の遺伝子について 3'-RACE 解析を行なった結果、<i>atcfi 25a</i> において多くの遺伝子の 3'UTR 長の多様性が失われることが判明した。</p> <p>第四章では、CFI の構成因子であり、相互に相同性がある AtCFI 59 と AtCFI 68 の機能解析を行なった。AtCFI 59 と AtCFI 25b をコードする遺伝子の機能欠損変異体を各々複数アレル単離して解析した結果、<i>atcfi 59</i>、<i>atcfi 68</i> ともに、単一の変異の場合には顕著な形質異常がみられないが、<i>atcfi 59 atcfi 68</i> 二重変異体は、<i>atcfi 25a</i> と同様、矮小化などの多面的な形態形成異常を示すことが判明した。このことから、AtCFI 59 と AtCFI 68 は重複する機能を有することが判明した。また、3'-RACE 解析を行なった結果、<i>atcfi 59 atcfi 68</i> 二重変異体において多くの遺伝子の 3'UTR 長の多様性が失われることが判明した。</p> <p>第五章では、3'UTR 切断部位決定に重要な <i>cis</i> エlementを欠く植物において、CFI が 3'UTR の長さの決定に果たす役割がヒトよりも大きいことが提唱された。また、環境情報伝達因子である AtCSN と AtCFI とが結合することを踏まえて、環境応答において mRNA の 3'UTR 長を制御する分子機構の生物学的意味について議論している。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

mRNA 前駆体は成熟する過程で 3'UTR 部位が適切に切断され、ポリアデニル化を受ける。この切断部位は一意的に決定されず、その多様性に関わる分子機構を理解するための研究は遅れていた。その主たる理由は、3'UTR の効率的な解析技術の難しさと、その生理的な理解につながるモデル設定の難しさ故である。

本研究では、動物と植物の 3'UTR の切断部位配列の差異に着目して、これまでに詳細な機能がわからなかった Cleavage Factor I タンパク質複合体 (CFI) の機能を解析した点が注目にあたる。特に植物を材料に用いて、個体レベルで分子生物学的解析を行なった結果、既存の CFI 機能の理解を著しく深めたことが評価に値する。

mRNA 前駆体の 3'UTR 部位の切断部位の決定には、ヒトとマウスの先行研究より *cis* エレメント (AAUAAA) の配列が重要であり、それを認識する CPSF タンパク質複合体が主たる役割を果たすとされ、CFI は *cis* エレメントが保存されていない遺伝子転写産物において機能すると提案されてきた。今回、植物では遺伝子の 3'UTR に *cis* エレメントがほぼ保存されていないことに着目して、CFI がより重要な機能を果たしているという仮説を立てて、モデル植物のシロイヌナズナを用いて CFI 機能を分子生物学的に解析している点が特徴的である。

ヒトとマウスの CFI 機能の解析から、CFI は mRNA 前駆体の 3'UTR 部位の切断部位を *distal* に選択させる機能を持ち、長い 3'UTR を産生するのに重要だと考えられていた。しかし本研究の植物を用いた解析から、CFI の機能は単に 3'UTR の長短を一方向に決めることでは無く、多くの遺伝子から転写される mRNA 前駆体における 3'UTR の長さの多様性を維持するのに不可欠であることが発見された。これまでに CFI 25 に関しては、マウスでヘテロノックアウト、ヒトで *non sense* 変異しか同定できておらず、今回報告された *AtCFI 25a* と *ATCFI 25b* の単一および二重変異体は、初めて作製された CFI 25 機能欠損変異体であり、その解析は当該分野の理解に大きく貢献した。特に多面的な形態形成異常と多くの形態形成関与遺伝子の 3'UTR 長の異常が相関性をもっていることは、発展的な共同研究分野を拓く契機となっている。今後の研究として提案された、環境応答や形態形成における 3'UTR 長の選択性を、遺伝子発現制御の観点はユニークである。

本研究で得られたこれら成果は、動物・植物に共通する普遍性の高い 3'UTR 制御機構の理解に大きく貢献した。作製された研究材料とそれらを活用した今後の研究戦略は、mRNA プロセシング機構の新たな研究分野を拓く可能性を含んでいる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 3 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降