

氏名	千葉 剛大
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 806 号
学位授与年月日	令和 3 年 9 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	線虫 ROP-1/Y RNA 複合体を構成する Y RNA レパートリーの解析 (Analysis of Y RNA repertoires that constitute <i>Caenorhabditis elegans</i> ROP-1/Y RNP)
学位審査委員	主査 弘前大学教授 牛田 千里 副査 弘前大学教授 姫野 俵太 副査 岩手大学教授 山下 哲郎 副査 山形大学教授 豊増 知伸

論文の内容の要旨

Ro/Y RNP は Ro タンパク質と Y RNA の複合体であり、ヒト自己免疫疾患における自己抗体の標的として同定された。Ro タンパク質と Y RNA はヒトからバクテリアに至る広い生物種のゲノムにホモログが見つかっている。Y RNA は一生物種のゲノムに 1~4 種類見つかっているのに対して、Ro タンパク質はいずれの生物種においても 1 種類しか見つかっていない。Y RNA はいずれも 5' 末端と 3' 末端に保存性の高い塩基を持ち、それらがシトシン塩基のバルジアウトを含むステム構造を形成する。Ro/Y RNP は、低分子 RNA の品質管理に機能することが報告されているが、品質管理の対象となっている低分子 RNA の全容やそれらの認識、および品質管理のメカニズムは未だ明らかになっていない。興味深いことに、ヒトやマウスのように複数の Y RNA を持つ生物種においては、Ro タンパク質と結合する Y RNA の種類によって Ro/Y RNP と相互作用する低分子 RNA やタンパク質因子が変化することが報告されている。

線虫 *Caenorhabditis elegans* においては、1 種類の Ro タンパク質ホモログ ROP-1 と 1 種類の Y RNA (CeY) が報告されていた。CeY RNA の発見から 10 年後、sbRNA として分類されていた 18 種類の RNA が、Y RNA 間で保存されている塩基を末端に持ち、Y RNA と類似した二次構造を形成しうることから、線虫 Y RNA ホモログに追加された。sbRNA の報告によって、線虫における Y RNA の種類は他の生物種に比べ非常に多く、これらがどのような機能を担っているのか興味深い点であった。

18 種類の sbRNA のうち、7 種類の sbRNA (CeN133-135, Cel1, 5, 6, 7) については、RNA 遺伝子上流に存在するプロモーターモチーフから転写されることが予想されているのみであったため、転写の開始と終結位置によっては、予想とは異なる末端配列とそれに伴う二次構造を形成しうるものであった。また、ROP-1 との結合の有無を検証した例は 3 種類 (CeN72, Cel2, Cel3) のみであり、15 種類の RNA については、予測される二次構造から ROP-1 と結合

することが予想されているのみであった。本研究は、sbRNA の末端配列を明らかにすることで sbRNA の二次構造を把握することにした。そして、sbRNA が二次構造から予想されるように ROP-1 と結合するのかがゲルシフトアッセイにより評価した。

<材料と方法>

RNA の末端配列は、Primer extension、RACE、そして、RNA-seq といった三通りの方法を用いて解析した。その後、明らかになった末端配列をもとに合成した RNA と大腸菌から得た組換え ROP-1 を混合、電気泳動にかけることでフリーの RNA と ROP-1 とともに複合体を形成した RNA を分離・検出した。

<結果>

末端解析の結果、いずれの sbRNA についても ROP-1 との結合に必要とされるシトシン塩基のバルジアウトを含むステム構造を形成しうるものであった。また、この解析の過程で sbRNA の一つとして報告されていた Cel7 RNA には、5' 末端の長さが 15 ヌクレオチド短い産物が存在することを明らかにし、Cel7s RNA と名付けた。

ゲルシフトアッセイによって sbRNA と ROP-1 の結合を評価した結果、新たに同定した Cel7S RNA と実験的に検証されてなかった 15 種類の sbRNA が二次構造から予想されたように ROP-1 と結合することを明らかにした。また、Cel7 RNA および Cel7s RNA の ROP-1 に対する結合が CeY RNA の場合と比較して、弱いことを示唆する結果を得た。また、Cel7 RNA がインキュベーションしている間に、5' 末端側が切断を受け、Cel7s RNA と同程度の長さになることを示した。

<結論と考察>

本研究は、予想にとどまっていた sbRNA について細胞内に存在することを明らかにし、それらの末端配列が先行研究において予想されていたものと同様であり、ROP-1 との結合に必要な二次構造を形成しうることを示した。そして、それらの sbRNA がその構造から予想されたように ROP-1 と結合することを明らかにした。ここで明らかにしたように Ro に結合する Y RNA レパートリーは Ro/Y RNP の機能を明らかにする上で極めて重要なものである。Ro/Y RNP に関する研究はヒトやマウス、アフリカツメガエルを材料として行われている。しかし、いずれも培養細胞や卵母細胞といった単一の細胞を材料としており、個体レベルの機能解析が不足している。線虫は分子レベルと個体レベルの解析を行うのに適したモデル生物である。本研究において得られた知見は今後 Ro/Y RNP の機能解析を分子と個体の両面から行う上で基礎となるものである。

新たに同定した Cel7S RNA はその発現の特徴から特に注目して解析を行なった。Cel7 RNA 遺伝子上流配列を精査したが、プロモーターモチーフは一つのみであった。したがって、Cel7s RNA は、Cel7 RNA が転写された後、5' 末端がプロセッシングを受けた結果生じたものであると考えられる。細胞内における Cel7 RNA の存在量は線虫の発達にしたがって増加する傾向にある。一方、Cel7s RNA の存在量は幼虫期から成虫にかけて増加する傾向にあり、特に成虫と受精卵においてはその存在量が Cel7 RNA を越える。この傾向は、Cel7 RNA が生殖細胞で発現し、5' 末端がプロセッシングを受けて生じた Cel7s RNA が卵母細胞または、精子を介して受精卵内に持ち込まれていると考えられる。ROP-1 が存在しない場合、Cel7 RNA の存在量は減少する。Cel7s RNA の存在量は ROP-1 の有無によって変化は見られないことから、細胞内における Cel7 RNA と Cel7s RNA は異なる方法で安定性を保っていると考えられる。

えられる。Cel7s RNA において、欠損していた 15 ヌクレオチドは小さいステムループ構造を形成しうることから、この構造が ROP-1 非存在下における Cel7 RNA の安定性に寄与していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

生体には様々な RNA が存在する。その合成と分解のバランス、品質管理は細胞にとって重要な課題であり巧妙に制御されている。Ro/Y RNP は低分子 RNA の品質管理に携わる。発見から 40 年以上が経つが、品質管理の対象となる RNA 種の全体像や作用メカニズムには謎が多い。興味深いことに Ro タンパク質の有無は細胞や個体のストレス耐性に大きく影響するが、その仕組みは全くの不明である。

本研究では、線虫をモデルに Ro/Y RNP の分子機能と生理機能およびそれらの関係を解明することを目的として、19 種類の線虫 Y RNA ホモログに関する解析を行った。その結果、1) 19 種類と報告されていた Y RNA ホモログが実際には 20 種類であること、2) 新たに発見した 20 種類目の Y RNA ホモログは Cel7 RNA の 5'-末端が 15 nt 欠損したもの (Cel7s RNA) であること、3) Cel7 RNA もしくは Cel7s RNA は Ro タンパク質の線虫ホモログ ROP-1 と結合するが、その結合は CeY RNA と ROP-1 との結合に比べると弱いこと、4) Cel7 RNA を *in vitro* で特定の条件におくと Cel7s RNA と同程度の長さに切断されたものが産生されること、5) Cel7 RNA および Cel7s RNA 以外の 18 種類の Y RNA ホモログのうち、Cel2 RNA を除く 17 種類は *in vitro* で ROP-1 に結合することを明らかにした。これらの結果は以下の三つのことを示唆する。一つ目は、20 種類の線虫 Y RNA ホモログのうち、Cel2 RNA、Cel7 RNA、Cel7s RNA を除いた少なくとも 17 種類が、ROP-1 と複合体を形成して低分子 RNA の品質管理を行うことである。Ro/Y RNP による低分子 RNA の品質管理には Ro タンパク質が必須である。ROP-1 と結合する 17 種類の Y RNA は線虫においても低分子 RNA の品質管理に働く可能性が高い。興味深いことに、線虫では Y RNA の種類が他の生物種に比べて格段に多い。ROP-1/Y RNP による品質管理の対象が線虫では特に多いのかもしれない。あるいは、ROP-1/Y RNP による品質管理のメカニズムやその生理的意義に、他生物種では見られない多様性があることも考えられる。本研究の結果から得られた二つ目の示唆は、Cel2 RNA が他の Y RNA ホモログと違って低分子 RNA の品質管理に機能しないことである。哺乳動物の Y RNA は Ro タンパク質の関与なしに DNA の複製開始に働く。Cel2 RNA はこの機能に特化した線虫 Y RNA ホモログなのかもしれない。三つ目は Cel7 RNA と Cel7s RNA についてである。Cel7s RNA は Cel7 RNA が切断されてできること、その切断には ROP-1 が貢献することが示唆された。

以上のように、本研究では 20 種類の線虫 Y RNA ホモログに関する解析結果を踏まえて、それぞれの機能や生成に関する新たな示唆が提示された。

以上より、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Takehiro Chiba, Shin-ya Kihara, Manami Sato, Kou Xingkui, Simon Goto, Takuma Suzumura, Gota Kawai, Hyouta Himeno, Chisato Ushida. 2021. Identification of a short form of a *Caenorhabditis elegans* Y RNA homolog Cel7 RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 557: 104-109.