

博士論文要約 (Summary)

2018年4月入学

連合農学研究科 生物資源科学 専攻

氏名 千葉 剛大

タイトル	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
<p>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それぞれの遺伝子のホモログはヒトから細菌に至る様々な生物種ゲノムに見つかっている。ほとんど場合、Y RNAは1~4種類、Roタンパク質は1種類である。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、それらがシトシン残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と考えられているが、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。</p> <p>線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> 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ホモログ (CeY RNA)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ヌクレオチドを末端に持ち、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。</p> <p>18種類のsbRNAのうち、7種類のsbRNA (CeN133-135, Cel1, 5, 6, 7)については末端配列が決定されておらず、予想と異なる構造を形成する可能性があった。また、CeN72 RNA、Cel2 RNA、Cel3 RNAを除いた15種類のsbRNAについては、これらがROP-1と結合するという実験的証拠は全くなかった。そこで本研究では、sbRNAの末端配列を決定し、その配列に基づいてそれぞれのRNAを合成し、in vitroでROP-1との結合の有無を解析した。その結果、Cel7 RNAはコンピューターで予想された配列をもつものに加えて5'末端が15ヌクレオチド短くなったもの (Cel7s RNA) が存在することを見出した。さらには、Cel7 RNA、</p>	

※注1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注2 公表できない「やむを得ない事由」(特許、知的財産等に係る部分)は記載しないでください。

※注3 全体で4頁~5頁程度を目処にしてください。

Cel7s RNAのいずれも他のsbRNAやCeY RNAに比べるとROP-1への結合が弱いことが示唆された。

<材料と方法>

RNAの末端配列は、プライマーエクステンション、5'-RACEおよび3'-RACE、RNA-seqの三通りの方法を用いて解析した。明らかになった末端配列をもとにそれぞれのRNAをin vitroで合成し、組換えROP-1を用いてゲルシフトアッセイを行った。

<結果>

末端解析の結果、いずれのsbRNAについてもROP-1との結合に必要なシトシン残基のバルジアウトを含むステム構造を形成する可能性があらためて示された。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が判明し、これを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の5'末端はインキュベーションの間に切断を受け、Cel7s RNAと同程度の長さのRNAになることを示した。

<結論と考察>

本研究は、情報科学的手法により同定されたsbRNAについて、これらが実際に発現していることを示すとともに、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一致すること、その結果、ROP-1との結合に必要な二次構造を形成しうることを、そして、それらが実際にROP-1と結合することを明らかにした。Roに結合するY RNAレパートリーを正確に把握することはRo/Y RNPの分子機能および生理機能を明らかにする上で極めて重要である。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。線虫は着目する遺伝子産物について、分子レベルと個体レベル両方の解析を行い、両者の関係を明らかにすること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の基礎となる。

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遺伝子の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。細胞内のCel7 RNAの存在量は線虫の成長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に持ち込まれていることを示唆する。ROP-1が存在しない場合、Cel7s RNAの存在量は減少する。これはCeY RNAや他生物種のY RNAと同様に、Cel7s RNAがROP-1の結合により安定性を保持するためと考えられる。一方、Cel7 RNAの存在量はROP-1の有無によって変化しない。おそらくCel7 RNAはCel7s RNAとは異なる

る方法で細胞内での安定性を保っているのだろう。Cel7 RNAの5'末端にある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。