

博士論文

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 *Caenorhabditis elegans* ROP-1/Y RNP)

岩手大学大学院 連合農学研究科
生物資源科学専攻 生物分子機能学連合講座
学籍番号 U3218003
千葉剛大

1. 要約	4
2. 研究の背景	6
2.1. Ro/Y RNPの発見	6
2.2. Y RNA	7
2.3. Roタンパク質	8
2.4. Ro/Y RNP	10
2.5. 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> におけるRoタンパク質とY RNA	11
2.6. 本研究の目的	13
3. 材料・方法	15
3.1. 線虫の継代	15
3.2. 線虫の液体培養と受精卵、L1 - L4幼虫、成虫の培養	15
3.3. 線虫ゲノムDNAの抽出	16
3.4. RNAの抽出	17
3.5. ノーザンハイブリダイゼーション	17
3.6. 線虫抽出物の調製	18
3.7. ウェスタンブロット	19
3.8. プライマーエクステンション	20
3.9. 組換えDNAポリメラーゼの発現と精製	21
3.10. 5'&3'-RACE	22
3.11. RNA-seq	24
3.12. sbRNAのクローニング	26
3.13. 組換えT7 RNAポリメラーゼの発現と精製	26
3.14. in vitro転写	27
3.15. 組換えROP-1の発現と精製	28
3.16. ゲルシフトアッセイ (EMSA)	28
4. 結果	30
4.1. CeY RNAとsbRNAの末端解析	30
4.1.1. プライマーエクステンションによるCeY RNAおよびsbRNAの5'末端の解析	30
4.1.2. 5'&3'-RACEによるCeY RNAおよびsbRNAの末端配列解析	31
4.1.3. RNA-seqによるCeY RNAおよびsbRNAの末端配列解析	33
4.1.4. RNAの合成とその長さの比較	35
4.2. CeY RNAとsbRNAのROP-1に対する結合の有無の検証	36
4.2.1. CeY RNAおよびsbRNAのROP-1に対する結合の比較	37

4.2.2. RNAの熱変性条件の検討	37
4.2.3. EMSAに用いる塩と酵母tRNAの検討	38
4.2.4. CeY RNAとCeN71、Cel2、Cel7、Cel7s RNAのROP-1に対する結合の比較	39
4.2.5. 変異Cel2 RNAの作製とROP-1に対する結合	40
4.2.6. 反応系に含まれるCel7 RNAの状態について	40
5. 考察	42
5.1. CeY RNAおよびsbRNAの末端配列解析	42
5.2. ROP-1に対するCeY RNAおよびsbRNAの結合の有無	44
5.3. ROP-1に対するCel7 RNAとCel7s RNAの結合	45
5.4. おわりに	46
6. 参考文献	48
7. 謝辞	56
8. 図表	57

1. 要約

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はバクテリアからヒトに至る広い生物種のゲノムにホモログが見つかっており、細胞にとって重要な機能を担っていると予想される。先行研究から、Ro/Y RNPは5S rRNAやU2 snRNAといったRNAの品質管理に関わることが示唆されている。また、Roタンパク質の欠損は紫外線や酸化といったストレスへの耐性を低下させることも明らかになっている。しかし、Ro/Y RNPの分子機能とその異常が引き起こす個体レベルの事象を繋げることはできていない。この問題を解決するためには、同一の生物材料を用いて分子機能と生理機能を解析する実験系を構築することが望ましい。

本研究では線虫 *Caenorhabditis elegans*を材料としたRo/Y RNPの機能解析の土台を構築するため、線虫に存在する1種類のY RNA (CeY RNA)と19種類のY RNAホモログ (CeN71-77、CeN133-135、Cel1-3、Cel5-7、Cel7s RNA)の末端配列解析からはじめ、これらのRNAが線虫Roタンパク質ホモログROP-1と複合体を形成しうるのかをin vitroで検証し、以下の結果を得た。

- 1) Cel7s RNAはCel7 RNAと比較して5'末端が15ヌクレオチド短い。
- 2) Cel2 RNAを除く、18種類の線虫Y RNAホモログはin vitroにおいてROP-1と結合する。
- 3) ROP-1に対するCel7 RNAおよびCel7s RNAの結合の強さはCeY RNAやCeN71 RNAと比較して弱い。

以上の結果は、これまで予想に留まっていた線虫Y RNAホモログとROP-1の結合について実験的な証拠を与え、線虫ROP-1/Y RNPを構成しうるY RNAのレパートリーを明らかにした。

線虫は遺伝子の機能と個体レベルの現象を結びつける上での良いモデル生物である。本研究で得たY RNAおよびROP-1に関する知見は、ROP-1/Y RNPが関与する個体の新たなストレス応答の仕組みを明らかにすること、未だ謎が多く残されている真核生物のRo/Y

RNPによるRNA品質管理のメカニズムの解明に貢献すること、また、その異常が引き起こす個体レベルの事象を理解することにつながるものと期待される。

2. 研究の背景

2.1. Ro/Y RNPの発見

生物は紫外線や外傷、細菌やウイルスといった様々なストレスを常に受けた状態にある。細胞はこれらのストレスによって生じた損傷の修復や異物を排除するためのメカニズムを備えており、細胞から個体レベルまでの恒常性を維持している。しかし、なんらかの原因によりそのメカニズムに不備が生じると個体に変化が現れることがある。免疫システムは、外部から侵入した細菌やウイルス、非生物的な微粒子を非自己として認識、排除するメカニズムである。自己免疫疾患は、なんらかの原因で免疫メカニズムに不備が生じた結果、自己が産み出す分子や細胞に対して免疫システムが働いてしまった状態であり、原因や根本的な治療法が確立されていない。自己免疫疾患として知られる症状は多数報告されているが、非自己として免疫システムから攻撃されている自己由来の分子（自己抗原）は複数の症状に対して共通している場合があることから、その種類は症状に対して少ない。自己抗原は主にタンパク質であるが、このタンパク質の多くは核酸に結合するものであり、タンパク質とRNAの複合体（RNP）が自己抗原として記載されている例も多い [1]。近年、ヒトの皮膚や口内、腸に存在する常在菌が持つタンパク質に対する抗体がヒトが持つオーソログに対しても交差反応を示すことがわかり、自己免疫疾患の引き金の1つとして注目されている [2]。

シェーングレン症候群や全身性エリテマトーデスといったヒト自己免疫疾患患者の血液中には、Roタンパク質に対する自己抗体が健常者と比較して上昇している [3, 4]。Roタンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降を行うと、100ヌクレオチド程度の長さのRNAが同定された [5-6]。Roタンパク質の細胞内局在が細胞質 (cytoplasm) にあったことから、このRNAはY RNAと名付けられた [3, 5, 6]。Roタンパク質およびY RNAはヒトから発見されて

以降、広い生物種のゲノムにホモログが見つかったが、未だその機能の全容は明らかになっていない [7]。

2.2. Y RNA

Y RNAは、約100ヌクレオチドの長さのncRNAである。ヒト *Homo sapiens*やマウス *Mus musculus*、アフリカツメガエル *Xenopus laevis*といった真核生物や200種類以上の真正細菌のゲノムにホモログが見つかったことから重要な機能を担っていると予想された [7, 8]。真核生物の場合、Y RNAはRNAポリメラーゼIIIによって転写される [6, 9, 10]。Y RNAの特徴は、5'末端と3'末端に保存性の高い配列を含むことであり、これらの配列は互いに相補的な配列を含み2つのステム構造と2つのループを形成する。このステムループ構造のうち、末端に近いものを下方ステム、L1ループ、遠いものを上方ステム、L2ループと呼ぶ [11-13] (図1)。

下方ステムは、Roタンパク質との結合領域であることがアフリカツメガエルY RNA (xY3)とRoタンパク質を用いた生化学的実験から明らかになっている[14]。Roタンパク質との結合に関わるY RNAの領域は、下方ステムとL1ループである。下方ステム構造は5'末端側にシトシン (C)残基がバルジアウトしており、これを欠損したY RNAはRoタンパク質との結合が失われる。バルジアウトする残基をシトシン (C)からグリシン (G)、またはウラシル (U)に変えたような変異Y RNAは、Roタンパク質と結合できるがその結合効率は減少する。バルジアウトしたヌクレオチドから末端側に4ヌクレオチド、L2ループ側3ヌクレオチドは、塩基対を維持した形で5'末端側と3'末端側のヌクレオチドを入れ替えた場合、Roタンパク質との結合が顕著に減少する。したがって、ステム構造のみでなくヌクレオチドそれ自体も重要である。L1ループを欠損させるとRoタンパク質との結合が失われるが、ループを形成するヌクレオチドを変えてもRoタンパク質との結合に変化は見られな

い。一方、上方ステムはL2ループから4ヌクレオチドまで、L2ループは全体を欠損させてもRoタンパク質との結合には変化が見られない。

上方ステムは下方ステム同様、保存性の高い残基から構成されている。特に、脊椎動物 Y RNAの上方ステムに存在するU-A、G-C塩基対は、DNA複製に関わることがヒトやアフリカツメガエルを用いた実験系から示唆されている [15, 16]。L2ループは、各Y RNAごとに多様性に富んでいる。ヒトY RNA (hY1、hY3、hY4、hY5)間のL2ループ置換実験から、L2ループはRoタンパク質以外のタンパク質やRNPとの相互作用に関わる。この相互作用には、特定のY RNAのL2ループが必要であることが示されている [17]。

Y RNAにはRoタンパク質以外にもタンパク質が結合することがY RNAを担体として用いたアフィニティー精製実験によって報告されている [18]。4種類あるヒトY RNAを用いたアフィニティー精製において、Roタンパク質とLaタンパク質はいずれのヒトY RNAを用いた場合でも検出された。Laタンパク質は、Y RNAを含むRNAポリメラーゼIIIの転写産物に結合する [19, 20]。一方、特定のヒトY RNAを担体を用いた場合のみ検出されるタンパク質もある。例えば、HNRNPK (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)はhY1 RNA、ELAVL1 (ELAV-like protein 1)はhY3 RNA、そして、PUF60 (Poly(U)-binding-splicing factor)はhY5 RNAを担体として用いた場合により多く検出された [18]。しかし、これらのタンパク質とY RNAの複合体がどのような機能を担っているのかについては未だ明らかになっていない。

近年、エキソソームのような小胞に包まれた形で体液 (血漿、唾液、精液など)に放出されるRNAの1つとしてY RNAが注目されている [21]。また、Y RNAの断片が細胞死や炎症の誘導に関わることも報告されている [22]。

2.3. Roタンパク質

Roタンパク質はY RNAとともに多様な生物種のゲノムにコードされている。Y RNAが1生物種のゲノムに複数コードされる場合があるのに対して、これまでに見つかっているRoタンパク質遺伝子は各生物種のゲノムに1コピーのみである。Roタンパク質のアミノ酸残基は生物種を超えてよく保存されている (図2)。放射線耐性菌 *Deinococcus radiodurans*において、Rsrが紫外線や熱、飢餓といったストレスに対して機能することが報告されている。Rsrを欠損した放射線耐性菌は紫外線に対する感受性が増加する [23]。また、放射線耐性菌は定常期に飢餓ストレスを受けるとヌクレアーゼ活性を持つPNPaseがrRNAを分解するが、この過程はRsrが存在することで促進される [24]。そして、熱ストレス下において、RNase PHとRNase IIとともに23S rRNAの効率的な成熟を促すことが報告されている [25]。この時、Y RNAを欠損させた変異株では、熱ストレスなしにRsrが23S rRNAの成熟化に関わることから、Y RNAがRoタンパク質の機能を制御していると考えられる。また、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*におけるRoタンパク質ホモログ Rsrは、Y RNA (YrIA、YrIB)、RNAリガーゼ (RtcB)とともにオペロンを組んでいる [26]。

真核生物においても、Roタンパク質を欠損した細胞は紫外線に対する感受性が増加する [27]。マウスES細胞では、紫外線や過酸化水素を加えることでRoタンパク質の局在が細胞質から核に移行する [27-28]。また、Y RNAを欠損した場合には、紫外線の照射なしにRoタンパク質の局在が核に移行する [29]。核にあるRoタンパク質がどのように機能するかは不明だがY RNAの有無によって局在が変化することは、バクテリアの場合と同様にRoタンパク質の機能がY RNAによって制御されていることを示す。

アフリカツメガエルRoタンパク質のX線結晶構造からRoタンパク質とRNAの結合についての知見が得られている [30-31]。Roタンパク質はリング型の構造をとり、大きく2つのドメイン (Heat repeats、vWFA)で構成される。Heat repeatsドメイン内に存在するヘリックス12は、真核生物Roタンパク質のみに保存されており、Y RNAと相互作用するアミノ酸残基が含まれる [30-31]。ヘリックス12を欠損することでRoタンパク質の局在がストレスの有無によらず核に移行する [28]ことから、ヘリックス12はRoタンパク質の核局在シグ

ナルを含み、Y RNAの結合によってこの領域が隠れることでRoタンパク質が細胞質に留まると想定されている。

免疫沈降によって得られたRoタンパク質から、Y RNA以外のRNAが同定されているが、その種類は生物種によって異なる。アフリカツメガエルの卵母細胞では複数の変異を含み、3'末端が数ヌクレオチド長い5S rRNAやpre-5S rRNA [32-33]が、マウスES細胞では複数の変異を含んだU2 snRNA [27]が同定されている。アフリカツメガエルRoタンパク質においては、Y RNAがRoタンパク質の側面に結合するのに対して、変異pre-5S rRNAがRoタンパク質の中央 (central cavity)に結合することが明らかになっている [30-31]。Y RNAと変異を含むpre-5S rRNAが相互作用するアミノ酸残基の一部は重複している。よって、Y RNAの役割の1つとして、Y RNAのRoタンパク質への結合の有無がRoタンパク質と変異を含むRNAの結合を制御していると予想されている [30]。また、Roタンパク質は変異pre-5S rRNAと結合する際、アミノ酸残基はRNAの糖リン酸骨格と相互作用していることも明らかになっている。よって、Roタンパク質の中央には、変異pre-5S rRNA以外にも構造的な特徴が一致するRNAであれば結合できると予想されている [31]。

2.4. Ro/Y RNP

真核生物において、Ro/Y RNPと相互作用する因子が報告されている。例えば、ヒトhY5 RNAについて、Roタンパク質とhY5 RNAの複合体がリボソームタンパク質L5と変異5S rRNAの複合体とが相互作用することが報告されている [17]。この時、hY5 RNAのループ構造が重要であり、hY5のループを他のhY RNAのループ構造に置き換えるとRo/Y RNPはL5-変異5S rRNAの複合体と相互作用しない。また、マウスES細胞からRoタンパク質を免疫沈降することで、Mov10と呼ばれるRNAヘリカーゼがRoタンパク質と共沈する。マウス mY1 RNAを欠損した細胞を用いて行なった場合、Mov10が共沈しないことから、マ

ウスRoタンパク質とMov10の相互作用にはmY1 RNAが重要であることが示されている [29]。

放射線耐性菌の場合、in vitroにおいてRsr-Y RNA-PNPaseからなる複合体 (RYPER)の報告されている [34]。この複合体ではY RNAがRoタンパク質とPNPaseをつなぐ形になっており、Y RNAの下方ステムがRoタンパク質、L2ループがPNPaseとの結合に必要である。Roタンパク質の中央には変異を含むRNAが結合できることから、細胞内ではRoタンパク質が捉えた変異RNAをPNPaseのヌクレアーゼ活性によって分解していると考えられている。

以上のことから、Roタンパク質に対するY RNAの結合の有無が、変異RNAとの結合や他のタンパク質、RNPとの相互作用の有無に影響することが予想される。しかし、Roタンパク質に結合するRNAの全容や結合したRNAがその後どのように処理されるのか、そしてRo/RNPと結合する他のタンパク質またはRNPは未だ明らかになっていない。

2.5. 線虫 *Caenorhabditis elegans*におけるRoタンパク質とY RNA

線虫 *Caenorhabditis elegans*は、代表的なモデル生物である。体長が約1mmであり、体が透明であることから顕微鏡で容易に体内のつくりを観察することができる。体細胞数が雌雄同体959個、雄1031個と少ないながら表皮、筋肉、神経、腸、生殖器といった動物に備わっている基本的な器官をもつ。細胞系譜及び全ゲノム配列がわかっていること、生活環が約3日と短く培養が容易であること、凍結保存が可能であること等、他の動物モデルにはない生物材料としての利点をもつ。受精卵から孵化した線虫はL1→L2→L3→L4→成虫と4回の脱皮を経て成長する。L1からL2に成長する際に飢餓や高温といったストレスに晒されると耐性幼虫 (dauer)へと移行する [35] (図3)。

線虫のY RNAは、Roタンパク質線虫ホモログROP-1の免疫沈降実験によって単離され、CeY RNAと名付けられた [36]。長い間、線虫Y RNAはCeY RNA1種類と考えられてい

たが、Dengらによるstem-bulge RNA (sbRNA) の単離 [37]、それに続くBoriaらによるコンピュータを用いたsbRNAホモログの解析 [38]により、19種類にまで増えた。Dengらは、線虫のRNomics解析により、新規のRNAファミリーsbRNAを同定した。sbRNAファミリーにはCeN71, 72, 73-1, 73-2, 74-1, 74-2, 75, 76, 77と名付けられた9種類のncRNAが含まれる [37]。いずれも5'末端および3'末端によく保存された配列をもち、それらがステム構造を組む。2010年、Boriaらは情報科学的手法を用いて、*C. elegans*に近縁の線虫類15種のゲノムから240個のsbRNAを同定した [38]。その際、sbRNAが脊椎動物のY RNAと非常によく似た特徴を示すことを明らかにし、これらが線虫における新規のY RNAホモログであることを提示した。脊椎動物のY RNAはDNA複製の開始に機能する [13, 39]。その機能にはY RNAの上方ステムに存在するU-A、G-C塩基対が重要である [15] (図1)。CeY RNAにこのU-A、G-C塩基対は存在しない。一方、sbRNAには該当するUG-CA塩基対が上方ステムに含まれている。BoriaらはsbRNAがY RNAホモログであることを示すと同時に、線虫ゲノムにさらに6種類の新規sbRNA遺伝子を同定し、これらをCel1, 2, 3, 5, 6, 7 RNAと名付けた [38]。Boriaらが予想したRNAのうちCel2とCel3 RNAは、Xiaoらによって実験的に発現が確認されているが、他の4種類については不明であった [40]。Cel7 RNAについては、その一部の配列をもったRNAが、ZemannらによりCe94 RNAとして報告されており、C/D snoRNAの1つと位置付けられている [41]。これらの他、Chenらのグループによりさらに3種類のsbRNA (CeN133, 134, 135) が報告されている [42]。そのうちの1つ (CeN134) はCeY2 RNAとして報告されている [8]。以上から、本研究を開始した時点で線虫 Y RNAホモログは19種類であり、そのうち18種類はsbRNAの特徴を示すが、残り1種類であるCeY RNAはsbRNAと区別された。

筆者は修士論文研究において、線虫Y RNAホモログとして報告されていたsbRNAの発現パターンを明らかにした [43]。Roタンパク質を欠損した細胞においては、細胞内のY RNA存在量が減少する [27, 44, 45]。線虫 N2 (野生株)と2種類の*rop-1*変異株 MQ470 *rop-1* (*pk93*)とRB2032 *rop-1* (*ok2690*) (図4A-4C)から抽出したRNAに含まれるY RNAホモログ

の存在量を比較すると、CeY RNA、CeN71 - 77, 133 - 135, Cel1, 3 RNAの存在量が*rop-1*変異株において減少していた [43]。一方、Cel2 RNAの存在量は、野生株と*rop-1*変異株の間で差が見られなかった。そして、Cel7 RNAは長さの異なる産物が検出され、短い産物がROP-1の有無によって存在量に変化するのに対して、長い産物はCel2 RNAと同様にROP-1の有無によって存在量に変化が見られなかった。

また、線虫の各発生段階 (受精卵、L1 - L4幼虫、成虫)におけるY RNAホモログの発現パターンを明らかにした [43]。線虫Y RNAホモログの発現パターンは4つに分類でき、1) 線虫が成長するにしたがい存在量が増加するRNA (CeN71, CeN73, CeN74-1, CeN74-2, CeN75, CeN76, CeN77, CeN134, CeN135, Cel3, Cel7 RNA)、2) 減少するRNA (Cel1)、3) 特定の発生時期に発現が上昇しているRNA (CeN133, Cel2)、4) 受精卵で高い存在量を示すもののL1期で減少し、その後成長するにしたがって再び存在量が増加するRNA (CeY, CeN72)、である。Y RNAの存在量は組織によって異なる [45]。Y RNAホモログの発現パターンが異なることはこれらのRNAが共通した特徴を持ちつつも異なる機能に関わることを示唆する。線虫Y RNAホモログは、他の生物種で見ついているY RNAに比べ、種類が多く予想される二次構造からY RNAのループ構造も多様である。Ro/Y RNPの機能においてY RNAの種類が豊富であることは品質管理の対象となりうる変異RNAやそれを含むRNP、そして、品質管理の対象を実際に処理するであろうヌクレアーゼやヘリカーゼといったタンパク質因子が複数存在することが予想される。

2.6. 本研究の目的

線虫Y RNAホモログとしてCeY RNAおよび19種のsbRNAが報告されていた。これは他の生物種で見ついているY RNAが1-4種であることを考えると非常に多い。Y RNAのループ構造がRo/Y RNPによるRNAの品質管理に関わることから、線虫におけるROP-1/Y RNPが品質管理の対象とするRNAは多岐に渡ることが予想される。sbRNAのうちROP-1

との結合が明らかであるものは、CeN72 RNAとCel3 RNAの2種類であり、Cel2 RNAについては、CeN72 RNAやCel3 RNAと比べROP-1との結合が弱いことが示唆されている。残る16種のsbRNAについてROP-1との結合を示す実験的証拠はない。また、一部のsbRNAについて配列情報が実験的に明らかになっていないことから、細胞内に存在するRNAが報告されているものと同様であるか確かめる必要がある。ROP-1/Y RNPの機能を解析する上でROP-1とY RNAの結合の有無を明らかにすることは必須である。本研究は、1) 細胞内に存在する線虫Y RNAホモログの配列を実験的に明らかにすること、2) ROP-1と線虫Y RNAホモログの結合を確かめることで、ROP-1に結合するY RNAのレパートリーを明らかにすること、を目的とする。

3. 材料・方法

3.1. 線虫の継代

本研究には、線虫 *Caenorhabditis elegans* Bristol N2 (野生株) および MQ470 *rop-1* (*pk93*) と RB2032 *rop-1* (*ok2690*) を使用した。MQ470 と RB2032 は、野生株との戻し交雑を7回行い、無関係な変異の除去と遺伝的バックグラウンドの安定化を行った。これらの株の判別には、MQ470 と RB2032 において変異が導入された位置の前後配列に設定したプライマー (表1) を用いた。線虫の継代は、NGM 固形培地 (NaCl 3 g, Peptone 2.5 g, Agar 17 g, イオン交換水 975 mL を混合しオートクレーブした後、1 M potassium phosphate pH 6.0 25 mL, 1 M MgSO₄ 1 mL, 1 M CaCl₂ 1 mL, コレステロール/エタノール溶液 (5 mg/mL) 1 mL を添加) に大腸菌 *E. coli* OP50 株を塗り広げたものを用いて、20°C で培養した。

液体培養には、オートクレーブした S-basal (NaCl 5.85 g, 1 M potassium phosphate pH 6.0 50 mL, コレステロール/エタノール溶液 (5 mg/mL) 1 mL、イオン交換水で 1 L にメスアップ) 100 mL に 1 M MgSO₄ 0.3 mL、1 M CaCl₂ 0.3 mL、1 M クエン酸カリウム (クエン酸 無水 19.2 g をイオン交換水に溶かし、KOH で pH 6.0 に合わせてから、100 mL にメスアップ、オートクレーブして、室温で保存した。) 1 mL、100x trace metal (disodium EDTA 1.86 g, FeSO₄ · 7 H₂O 0.69 g, MnCl₂ · 4 H₂O 0.2 g, ZnSO₄ · 7 H₂O 0.29 g, CuSO₄ · 5 H₂O 0.025 g、イオン交換水で 1 L にメスアップした後、オートクレーブして、遮光して室温で保存した。) 1 mL、そして大腸菌 *E. coli* W3110 株を添加して、20°C で振盪培養 (125-130 /分) した。

3.2. 線虫の液体培養と受精卵、L1 - L4 幼虫、成虫の培養

各発生段階の線虫 (受精卵、L1 - L4 幼虫、成虫)の培養は、はじめに線虫 N2を液体培地を用いて、20°Cで6日間培養した。培養3日目から培養を終えるまでの間24時間毎に大腸菌W3110株を追加した。培養した線虫はアルカリ-ブリーチ法によって受精卵を分離した。分離した受精卵は、30%(w/v)スクロースに懸濁し、遠心 (8,400 xg, 4°C, 6分間)して、液面に浮いている受精卵を回収した。得られた受精卵は、大腸菌OP50株を塗布したNGM固形培地に置いて、20°Cで一定時間培養してから、孵化した線虫を回収した。L1幼虫を回収するときのみ、受精卵を大腸菌を塗布していないNGM固形培地で孵化させた線虫を回収した。各発達段階の線虫の回収時間は表2に示した。

3.3. 線虫ゲノムDNAの抽出

NGM固形培地で培養していた線虫をM9バッファー ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 5 g, 1 M MgSO_4 1 mLをイオン交換水と混合、1 Lにメスアップした後オートクレーブを行った。)を用いて、1.5 mLチューブに回収した。チューブに集めた線虫から大腸菌を除くため、遠心 (3,300 xg, 4°C, 30秒間)と上清の除去、新しいM9バッファーの追加を上清が透明になるまで繰り返し行った。チューブ内のサンプルと等量の中性フェノールを加え、室温で5分間ボルテックスした。サンプルを遠心 (12,100 xg, 室温, 5分間)して、水層を新しいチューブに回収した。回収した水層と等量のクロロホルムを加え、室温で5分間ボルテックスした。サンプルを遠心 (12,100 xg, 室温, 5分間)して、水層を新しいチューブに回収した。回収した水層の1/10量の3 M 酢酸ナトリウム pH 5.2と1.1倍量の2-プロパノールを加え、転倒混和してから、-30°Cに30分間置いた。遠心 (16,400 xg, 4°C, 10分間)後、上清を捨て冷75%(v/v)エタノールを1 mL加え、遠心 (16,400 xg, 4°C, 5分間)した。上清を捨て、凍結乾燥機を用いて、沈殿を乾燥させたのち、懸濁した。

DNAは、NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)を用いて吸光度 (A_{220 - 350})を測定して、品質を確かめた。

3.4. RNAの抽出

NGM固形培地で培養していた線虫をM9バッファーを用いて、1.5 mLチューブに回収した。チューブに集めた線虫から大腸菌を除くため、遠心 (3,300 xg, 4°C, 30秒間)と上清の除去、新しいM9バッファーの追加を上清が透明になるまで繰り返し行った。チューブ内のサンプルが、0.5 mLになるまで上清を捨て、1 mLのTRIzol Reagent (ambion)を加え、室温で3分間ボルテックスした後、室温に5分間静置した。クロロホルムを0.2 mL加え、室温で15秒間ボルテックスした後、遠心 (16,400 xg, 4°C, 15分間)して水層を新しい1.5 mLチューブに回収した。回収した水層の1/10量の3 M 酢酸ナトリウム pH 5.2と1.1倍量の2-プロパノールを加え、転倒混和してから、-30°Cに1時間置いた。遠心 (16,400 xg, 4°C, 10分間)後、上清を捨て、冷75%(v/v)エタノールを1 mL加え、遠心 (16,400 xg, 4°C, 5分間)した。上清を捨て、凍結乾燥機を用いて、沈殿を乾燥させたのち、懸濁した。

RNAは、NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)を用いて吸光度 (A_{220 - 350})を測定して、品質を確かめた。

3.5. ノーザンハイブリダイゼーション

7 M尿素12%ポリアクリルアミドゲル (尿素 4.2 g, 10x TBE 1 mL, 40% (w/v)アクリルアミド/ビス混合液(19:1) 3 mL, イオン交換水 2.5 mL, 10% (w/v) APS 0.1 mL, TEMED 4 µL)で泳動した。泳動するRNAは、等量のゲルローディングバッファー (95% ホルムアミド、18 mM EDTA、0.025%(w/v) SDS、0.025%(w/v) キシレンシアノール、0.025%(w/v) ブロモフェノールブルー)を混合し、95°Cで5分間インキュベートした。ナイロンメンブレン (Pall Corporation、Biodyne PLUS 0.45µm)に転写した。プローブは、DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Sigma-Aldrich)とTerminal Deoxynucleotidyl Transferase,

Recombinant (Promega)、DIG-ddUTP (Roche)を用いて3'末端を標識したオリゴDNA (表3)を用いた。ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer (Invitrogen)を用いて、37°Cで12 - 16時間ハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーション後、2x SSC/0.1% SDSを用いて、室温で10分間 (2回)、0.1x SSC/0.1% SDSを用いて、37°Cで30分間 (2回)洗浄した後、マレイン酸バッファー (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl, NaOHでpH 7.5に合わせてオートクレーブしてから室温保存した。)を加え、室温で5分間、振盪してから、1% (w/v)ブロッキング溶液 (マレイン酸バッファーでBlocking reagent (Roche)を溶かした)に室温、30分間振盪した。ラップを広げ、ブロッキング溶液で10,000倍希釈したAnti-Digoxigenin-AP Fab fragment (Roche)を滴下した所にメンブレンを置いて、室温で30分間静置した。洗浄バッファー (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl, 0.03% (v/v) Tween 20、NaOHでpH 7.5に合わせた。)で、室温、15分間 (2回)洗浄してから、検出バッファー (0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl、オートクレーブして室温で保存した。)を用いて室温、5分間振盪した。ラップ上に検出バッファーで50倍希釈したTropix®CDP-Star®Ready-to-Use (Applied Biosystems)を滴下し、メンブレンを置いて、室温5分間静置した。余分なバッファーを取り除いてから、メンブレンをラップで包み、ChemiDoc XRS+ システム (BIO-RAD)でシグナルを検出した。

3.6. 線虫抽出物の調製

NGMプレートで育てた線虫をM9 bufferで回収し、2 mLチューブへ移して上清を除いた。チューブに500 µLのNET-2 buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 0.05 mM DTT, 0.5 mM AEBSF)を加えて15mLチューブへ移した。15 mLチューブを氷中に固定し、超音波破碎機 (TOMY, UD-201)を用いて10秒間の破碎と50秒間の休止を10回繰り返した。破碎した線虫をチューブへ移し、遠心 (16,400 xg, 4°C, 1 h)した。上清を新しい2 mLチューブへ移した。回収した上清はBradford法でタンパク質量を測

定した。測定には、Protein Assay (Bio-Rad)をMilliQ水で5倍希釈し、フィルターでろ過して使用した。検量線の作成には、BSA (NEB)を用いた。総タンパク質量を測定後、-80°Cで保存した。

3.7. ウェスタンブロット

10%SDS-PAGEで、線虫抽出物および組換えROP-1タンパク質を泳動した。泳動終了後、ゲルは、1x transfer buffer (10 mM Tris, 100 mM グリシン, 10%(v/v)メタノール)中で振盪しておいた。PVDFメンブレン (Amersham Biosciences, hybondP)をメタノールに浸して、室温で1分間振盪した。イオン交換水に浸し、室温1分間振盪した。1x transfer bufferに浸し、15分間室温で振盪した。セミドライトランスファー装置 (BIO CRAFT, BE-300)に1x transfer bufferに浸したろ紙 (Watman)を6枚重ねておき、その上に、ゲル、メンブレンの順番に重ねて置き、最後に1x transfer bufferで浸したろ紙を6枚重ねて置いた。1 cm²/mA、90分間かけてゲルからメンブレンへタンパク質を転写した。転写終了後、メンブレンをTBS-T (20 mM Tris, 135 mM NaCl, 0.1%(v/v)Tween 20)で洗浄してから、ポンソーS溶液 (5% (w/v) 酢酸, 0.1 % (w/v) ポンソーS)でメンブレンを染色した。

メンブレンをブロッキング溶液 (スキムミルクをTBS-Tを用いて、5%(w/v)となるように調製した)に浸して、12 - 16時間、室温で振盪して置いた。

TBS-Tを用いてメンブレンを室温で5分間、2回洗浄した。TBS-Tで10,000倍希釈したAnti-ROP-1 antiserum (BioGate, 組換えROP-1を抗原として、ウサギに対して4回免疫して得られた抗血清)をパラフィルムに滴下、メンブレンを置いて室温で1時間振盪した。

TBS-Tを用いて、メンブレンを室温で15分間、2回洗浄した。TBS-Tで10,000倍希釈したECL Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody from donkey (Lot: 945156, GE healthcare)をパラフィルムに滴下、メンブレンを置いて室温で1時間振盪した。

TBS-Tを用いて、メンブレンを室温で15分間、2回洗浄した。シグナルの検出には SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Kit (Thermo Scientific)とChemiDoc XRS+ システム (BIO-RAD)を用いた。

3.8. プライマーエクステンション

プライマーとして用いるオリゴDNA (表3, 4)は、5'末端をT4 polynucleotide kinase (TaKaRa)を用いてTexas Red標識した。ラベルするオリゴDNA 1 nmolを50 μ Lとなるように必要な試薬類と混合して (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.8 U/ μ L polynucleotide kinase, 0.2 mM ATP γ S, 1 nmol オリゴDNA)、37°Cで2時間、80°Cで10分間インキュベートした。8 μ LのTexas Red C5 Bromoacetamide溶液 (4 nmol/ μ L)を加え、混合して37°Cで1時間インキュベートした。

Texas Red標識したオリゴDNAの精製にはSep-Pak C18 Cartridge (Waters)、以下カートリッジを用いた。シリンジを用いて、カートリッジ下側からの滴下速度が1 - 2滴/秒ずつの等速になる状態で試薬を通した。カートリッジに4 mLのAcetonitrile、次に4 mLのH₂Oを通した。Texas RedラベルしたオリゴDNA全量と50 mM Tri-ethylammonium Acetate (TEAA) 950 μ Lを混合して、カートリッジに通した後、4 mLの50 mM TEAAを通した。15% Acetonitrile (50 mM TEAAで希釈した。用事調製) 4 mLを通して、未反応のオリゴDNAをカートリッジから溶出した。35% Acetonitrile (50 mM TEAAで希釈した。用事調製) 3 mL (1 mLずつ3回に分けて行った)を通して、Texas Red標識したオリゴDNAをカートリッジから溶出した。真空遠心機で、Texas Red標識したオリゴDNA溶液を100 μ Lになるまで濃縮し、エタノール沈殿を行い沈殿を滅菌水に溶かした。

CeY RNAおよびsbRNAをクローニングしたプラスミドを鋳型として、Texas Red標識したオリゴDNAとThermo sequence DNA Polymerase、基質として、dNTP+ddATP、dNTP+ddCTP、dNTP+ddGTP、dNTP+ddTTP、を用いてDNAマーカを作製した。反応

は、サーマルサイクラーを用いて、95°C - 5分間、<95°C - 30秒間、55°C - 30秒間、72°C - 1分間> x50サイクル、行った。反応後、Blue Dextran Dye (10 µg/µL Blue Dextran, 5 mM EDTA, 80%ホルムアミド) 2.5 µLを加え、凍結乾燥機に15分間かけてサンプルを濃縮した。

線虫から抽出したRNA 5 µLと1 µM Texas Red標識オリゴDNA 1 µLを混合して、サーマルサイクラーを用いて90°Cで5分間インキュベートした後、30分間かけて30°Cまで冷やした。PrimeScript RTase (TaKaRa)と必要な試薬類 6 µLを加え (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM each dNTP, 0.25 U/µL RNase inhibitor, 1.5 U/µL PrimeScript RTase / 12 µL)、42°Cで1時間、90°Cで10分間インキュベーションした。インキュベーションが終わったサンプルは、直ちに氷上に移し、Blue Dextran Dye (10 µg/µL Blue Dextran, 5 mM EDTA, 80%ホルムアミド) 3 µLを加えた。

ゲル溶液は、10x TBE (Tris 108 g, ホウ酸 55 g, 0.5 M EDTA pH 8.0 40 mLを超純水に溶かして、1 Lまでメスアップ、オートクレーブした。) 36 mLと、Urea mix (アクリルアミドモノマー 8.6 g, メチレンビスアクリルアミド 0.5 g, 尿素 126.2 gにMilliQ水を264 mLまで加えて、完全に溶けるまで混合した。) 264 mLをフィルター (CORNING, 150mL フィルターシステム, 0.22µm 13.6cm² セルロースアセテート, 滅菌済み)に通し、混合しておいたものを4°Cで保存していた。ゲルを作製する際には、ゲル溶液 30 mLに10%(w/v) APS 150 µL、TEMED 20 µLを加え、固めた。泳動には、0.6x TBEを用いた。

3.9. 組換えDNAポリメラーゼの発現と精製

大腸菌の培養および目的タンパク質の発現系は先行研究のプロトコル [46]を参照した。

大腸菌ラムノースオペロン由来のプロモーター (P_{rhaB})と改変taq DNAポリメラーゼ遺伝子 [47]をクローニングしたプラスミドを大腸菌BL21star (DE3)に導入した。プラスミドを導入した大腸菌は、ZYM5052 (目的タンパク質の発現誘導のために、0.2% ラムノースを

加えた。0.1 mg/mL Ampicillin)を用いて37°Cで24時間培養した。集菌後、破碎バッファー (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 300 mM NaCl, 20 U DNase I)を加え、大腸菌を超音波破碎した。遠心(8,400 xg, 4°C, 30分間)し、可溶性画分にDNase I 20 Uを加え、75°Cで30分間可溶性画分をインキュベートした。遠心 (8,400 xg, 4°C, 30分間)し、上清をフィルター (MERCK、MILLEX GV Filter Unit 0.22 µm PVDF 33 mm)に通してから、TALON metal affinity resin (Clontech)を充填したカラムに通して、バッファー (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 300 mM NaCl)でカラム内を洗浄してから、溶出バッファー (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 300 mM NaCl, 150 mM イミダゾール)を用いて、タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質の濃縮とバッファー交換にはAmicon Ultra-15 3K Centrifugal Filter Devices (Millipore)を用いて、交換バッファー (53.3 mM potassium phosphate pH 7.5, 267 mM KCl, 267µM EDTA, 13.3 mM DTT)でバッファーを交換した。バッファー交換を終えた溶液に80% (w/v)グリセロールを終濃度50% (w/v)、Nonidet P-40とTween 20をそれぞれ終濃度0.8%(v/v)となるように加えた。組換えタンパク質は、ブラッドフォード法で総タンパク質量を測定した。測定には、Protein Assay (Bio-Rad)をMilliQ水で5倍希釈し、フィルターでろ過して使用した。検量線の作成には、BSA (NEB)を用いた。総タンパク質量を測定後、-80°Cで保存した。

EHTaqを用いたPCR (1x Ampliqon Ammonium Buffer, 0.2 mM each dNTP, 0.2 µM each primer, 6.2 ng/µL EHTaq DNA polymerase)は、伸長速度を1 kb/30秒間として行った。

3.10. 5'&3'-RACE

5'&3'-RACEに用いるcDNAライブラリの調製には先行研究のプロトコル [48]を参照した。N2の全RNA、受精卵由来RNA、成虫由来RNAを7 M Urea 12%ポリアクリルアミドゲルで泳動して、60 - 165 ヌクレオチドの長さのRNAをゲルから切り出した。切り出したゲルは、イエローチップを用いて、2 mLチューブの中で破碎した。破碎したゲルの体積に対

して2倍量のアクリルアミドゲル溶出バッファー (0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム4水和物, 1 mM EDTA pH 8.0)を加え、37°Cで12 - 16時間、振盪した。上清からRNAをエタノール沈殿によって濃縮した。濃縮したRNAはRppH (NEB)と10X NEBuffer 2 (100 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT)を用いて37°Cで1時間において、RNAの5'末端に存在する三リン酸を一リン酸に変換した。

使用したアダプターやオリゴDNAは、表5に示した。3'末端アダプター (RA3、5'末端をリン酸化、3'末端をアミノ基で保護してある)は、RNAへ付加する前にT4 RNA ligase 1 (NEB)を用いて、5'末端をアデニル化した (50 mM tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20% PEG8000, 1 mM ATP, 0.15 U T4 RNA ligase 1, 1 nmol RA3/ 100 µL)。RppHで処理した低分子RNA画分250 ng (11 µLとなるように調製した。)とアデニル化した10 µM RA3を95°Cに5分間インキュベーションした後、直ちに氷上に置いた。T4 RNA ligase 2, truncated (NEB)とバッファーを加え (50 mM tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 12.5% PEG8000, 1 U RNase inhibitor, 0.5 U T4 RNA ligase 2, truncated, 250 ng RppH処理済低分子RNA画分 / 20 µL)、18°Cに設定したサーマルサイクラーに12 - 16時間置いた。逆転写プライマー (RT-primer, 10 µM) 1 µLを加え、65°Cに20分間、25°Cに10分間置いた。

5'末端アダプター (RA5, 10 µM)を95°Cに5分間インキュベーションした後、直ちに氷上に置いた。RA3を付加したRNAサンプル 21 µLに、RA5 (10 µM) 1µL、10x T4 RNA ligase reaction buffer (NEB) 1 µL、RNase inhibitor 40 U/µL (TaKaRa) 0.5 µL、10 mM ATP 2 µL、T4 RNA ligase 1 (NEB, 10 U/µL) 1 µL、H₂O 3.5 µLを加え、18°Cに設定したサーマルサイクラーに12 - 16時間、置いた。

5'末端へのアダプター付加反応を終えたRNAサンプルに、10 mM each dNTP mix (NEB) 2 µL、100 mM DTT 3 µL、5x SuperScript III First Strand Buffer (invitrogen) 9 µL、SuperScript III Reverse Transcriptase (invitrogen) 1µLを加え、50°Cに1時間、75°Cに15分間置いた。

cDNAライブラリを鋳型として、Tks Gflex DNA polymerase (TaKaRa)を用いてPCRを行った。PCRに使用したプライマーは、目的のcDNA配列に対して設計したものとアダプター配列に設定したものをを用いた。得られたPCR産物を制限酵素 (EcoR I/Pst Iまたは、BamH I/Pst I)により切断し、同様の制限酵素で消化したpUC19プラスミドにクローニングした。末端配列をクローニングしたプラスミドは、大腸菌Mach-1株に形質転換して、LB固形培地に37°Cで12 - 16時間培養してコロニーを得た。精製したEHTaq DNA polymeaseとクローニング領域の前後に設定したプライマーを用いてコロニーPCRを行い、得られたPCR産物のDNA配列をABI3500 systemを用いて確認した。

3.11. RNA-seq

cDNAライブラリの調製にはTruseq small RNA Library prep kit (illumina)のマニュアルを参照した。RNAを抽出する線虫は、特定の発生段階に同調させるような操作は行わず、異なる発生段階の線虫が混在していた。N2、MQ470およびRB2032から抽出した全RNAを7 M Urea 12%ポリアクリルアミドゲルで泳動して、60 - 165ヌクレオチドの長さのRNAをゲルから切り出した。切り出したゲルは、イエローチップを用いて、2 mLチューブの中で破碎した。破碎したゲルの体積に対して2倍量のアクリルアミドゲル溶出バッファー (0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム4水和物, 1 mM pH 8.0)を加え、37°Cで12 - 16時間、振盪した。上清からRNAをエタノール沈殿によって濃縮した。濃縮したRNAはRppHを用いて5'末端に存在する三リン酸を一リン酸に変換した。RppH処理に用いるバッファーは、10x NEB Thermopol buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100)と10x NEBuffer 2 (100 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT)の2種を用い、それぞれについてcDNAライブラリを調製してRNA-seqを行なった。

3'末端アダプター (RA3、5'末端をリン酸化、3'末端をアミノ基で保護してある)は、RNAへ付加する前にT4 RNA ligase 1を用いて、5'末端をアデニル化した。氷上で、5'末端をア

デニル化したRA3 10 pmolとRppH処理を行った低分子RNA画分 250 ngを6 μ Lになるよう調製、70°Cに温めておいたサーマルサイクラーで2分間インキュベーションした。サンプルを直ちに氷上に移し、HML Ligation buffer (illumina, Truseq small RNA Library prep kit) 2 μ L、RNase inhibitor 40 U/ μ L (TaKaRa) 1 μ L、T4 RNA ligase 2, truncated 20 U/ μ L (NEB) 1 μ Lを加え、ゆっくり混合した。あらかじめ28°Cに温めておいたサーマルサイクラーに1時間置いて、RNAの3'末端にアダプターを付加させた。Stop Solution (illumina, Truseq small RNA Library prep kit) 1 μ Lを加え、28°Cに15分間置いて反応を止めた。

サンプル数 (N) x 1.1 μ Lの5'末端アダプター (RA5) を70°Cに温めておいたサーマルサイクラーで2分間インキュベーションし、直ちに氷上に移した。N x 1.1 μ Lの10 mM ATPとN x 1.1 μ LのT4 RNA ligase 1 (NEB)をRA5に加え混合した。RA5/ATP/T4 RNA ligase 1混合溶液 3 μ Lを、RA3を付加したRNAサンプルに加え、ゆっくり混合し、28°Cに温めておいたサーマルサイクラーに1時間置いた。

3'末端と5'末端にアダプターを付加したRNAサンプル 6 μ LとRT-primer (illumina, Truseq small RNA Library prep kit) 1 μ L、5x primerScript buffer (TaKaRa) 4 μ L、10 mM each dNTP mix (NEB) 1 μ L、RNase inhibitor 40 U/ μ L (NEB) 0.5 μ L、PrimeScript Reverse Transcriptase 200 U/ μ L (TaKaRa) 0.5 μ L、RNase-free water 7 μ Lを混合して、42°Cに温めておいたサーマルサイクラーに置いて、42°Cに1時間、70°Cに15分間置いた。逆転写産物を鋳型として、Tsk Gflex DNA polymerase (TaKaRa)とアダプター配列と相補的な配列を含むindex primer (illumina, Truseq small RNA Library prep kit)を用いて、PCRを行った。使用したindex primerの配列は、表6に示した。

次世代シーケンサー (illumina、Miseq)を用いて、増幅したDNAを解析した。次世代シーケンサーを用いた解析は、千葉工業大学 河合剛太教授に協力していただいた。出力されたリードの中から、Nucleotide-Nucleotide BLAST 2.7.1+によって、表3にある配列を元にCeY RNAおよびsbRNAの配列を抽出した。

3.12. sbRNAのクローニング

本研究室で、クローニングされていたCeYおよびsbRNA (CeN71, CeN72, CeN73-1, CeN74-1, CeN75, CeN76, CeN77, CeN133, CeN134, CeN135, Cel1, Cel2, Cel3, Cel7)のクローンについては、それらを鋳型とし、表7に示したプライマーでPCRを行い、得られた産物をギブソンアセンブリにより結合させクローンを得た [49]。

CeN73-2、Cel5、Cel6 RNA遺伝子は、線虫のゲノムDNAを鋳型として表7に示したプライマー (ins)を用いて増幅したDNA断片とベクタープラスミドとプライマー (vec)を用いて増幅したDNA断片をギブソンアセンブリにより結合させクローンを得た。

CeN74-2 RNA遺伝子は、線虫のゲノムDNAを鋳型として8に示したプライマー (CeN74-2-1st)を用いてPCRを行なった後、得られたDNA断片を鋳型に2nd PCRを行なった。得られた2ndPCR産物は、制限酵素処理してpUC19プラスミドに導入した。

得られたクローンは、ABI3500 systemを用いてDNA配列を確認した。

3.13. 組換えT7 RNAポリメラーゼの発現と精製

T5プロモーターの下流にバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ遺伝子をクローニングしたpQE80Lプラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入した。大腸菌の培養にはZYM5052 (20 µg/mL chloramphenicol)を用い、37°Cで24時間培養した。集菌後、破碎バッファー (50 mM sodium phosphate pH7.0, 300 mM NaCl, 0.08%(w/v)デオキシコール酸, 100 µg/mL AEBSF)を加え、大腸菌を超音波破碎した。可溶性画分をTALON metal affinity resin (Clontech)を充填したカラムに通して、洗浄バッファー (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール)でカラム内を洗浄してから、溶出バッファー (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 300 mM NaCl, 150 mM イミダゾール)を用いて、タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質の濃縮とバッファー交換にはAmicon Ultra-15 3K

Centrifugal Filter Devices (Millipore)を用いて、交換バッファー (53.3 mM potassium phosphate pH 7.5, 266.7 mM NaCl, 0.3 mM EDTA, 26.6 mM DTT, 0.5%(w/v)アジ化ナトリウム)でバッファーを交換した。バッファー交換を終えた溶液に80% (w/v)グリセロールを終濃度50% (w/v)となるように加えた。組換えタンパク質は、ブラッドフォード法で総タンパク質量を測定した。測定には、Protein Assay (Bio-Rad)をMilliQ水で5倍希釈し、フィルターでろ過して使用した。検量線の作成には、BSA (NEB)を用いた。総タンパク質量を測定後、-30°Cで保存した。

3.14. in vitro転写

CeY RNAおよびsbRNAをクローニングしたプラスミドを鋳型に、KOD-Plus-Neo (TOYOBO)を用いてPCRを行った。プライマーは表8に示した。得られたPCR産物は、中性フェノール抽出とエタノール沈殿により濃縮した後、12%ポリアクリルアミドゲル(10x TBE 1 mL, 30% (w/v)アクリルアミド/ビス混合液(29:1) 4 mL, イオン交換水 5 mL, 10% (w/v) APS 0.1 mL, TEMED 4 μ L)に泳動して、目的のDNAを切り出した。切り出したゲルは、イエローチップを用いて、2 mLチューブの中で破碎した。破碎したゲルの体積に対して2倍量のアクリルアミドゲル溶出バッファー (0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム4水和物, 1 mM EDTA pH 8.0)を加え、37°Cで12 - 16時間、振盪した。上清からDNAをエタノール沈殿によって濃縮した。

in vitro転写は、精製したT7 RNA polymerase (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM spermidine, 3.75 mM each NTP, 5.5 ng/ μ L T7 RNA polymerase, 10 ng/ μ L 鋳型DNA)または、MEGAscript T7 Transcription Kit (Invitrogen)を用いて行った。反応は、37°Cで12 - 16時間行った。合成したRNAは、7M 尿素 12%ポリアクリルアミドゲルで泳動してゲルから切り出して溶出、エタノール沈殿により濃縮した。

RNAは、NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)を用いて吸光度 (A220 - 350)を測定し、ノーザンハイブリダイゼーションにより細胞内に存在するRNAの長さと比較した。

3.15. 組換えROP-1の発現と精製

T7プロモーターの下流にintein/chitin binding domain (NEB, IMPACT Kit)と *rop-1* cDNAクローン (yk1424g08)を導入プラスミドを大腸菌BL21-CodonPlus (DE3) RIPLに導入した。大腸菌の培養にはZYM5052 (0.1 mg/mL ampicillin, 10 µg/mL trimethoprim, 5 µg/mL tetracycline, 20 µg/mL chloramphenicol, 5 µg/mL streptomycin)を用い、OD₆₀₀ = 0.5になるまでは37°Cで培養を行い、それ以降は培養温度を8°Cに移行して、OD₆₀₀ = 2.0になるまで培養を継続した。集菌後、カラムバッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.5 M NaCl)を加えて大腸菌を破砕した。可溶性画分をChitin resin (NEB)を充填したカラムに通して、カラムバッファーでカラム内を洗浄してから、切断バッファー (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM DTT)を通してから、カラムを4°Cで72時間静置した。72時間後、切断バッファーをカラムに通して、タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質の濃縮とバッファー交換にはAmicon Ultra-15 10K Centrifugal Filter Devices (Millipore)を用いて、交換バッファー (66.7 mM Tris-HCl pH 8.0, 267 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 0.3 mM EDTA, 2.7 mM DTT)でバッファーを交換した。バッファー交換を終えた溶液に80% (w/v)グリセロールを終濃度50% (w/v)となるように加えた。組換えタンパク質は、ブラッドフォード法で総タンパク質量を測定した。測定には、Protein Assay (Bio-Rad)をMilliQ水で5倍希釈し、フィルターでろ過して使用した。検量線の作成には、BSA (NEB)を用いた。総タンパク質量を測定後、使用量に合わせて分注、液体窒素で凍結させ、-80°Cで保存した。

3.16. ゲルシフトアッセイ (EMSA)

RNAはバッファー (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5%(v/v)グリセロール)に懸濁して、サーマルサイクラーを用いて、95°Cに5分間置いた後、一時間かけて20°Cまで温度を下げていった。

RNAとROP-1を混合して(5 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5%(v/v)グリセロール, 3 mM MgCl₂, 25 ng/μL 酵母tRNA, 0.01%(v/v) Nonidet P-40)、20°Cに設定したサーマルサイクラーに30分間置いてから、8%ポリアクリルアミドゲルを用いて4°Cで100 V (定電圧)、80分間泳動した。セミドライトランスファー装置 (BIO CRAFT, BE-300)を用いてナイロンメンブレン (Pall Corporation, Biodyne PLUS 0.45μm) に4°Cで70 mA (定電流)、60分間RNAを転写した。RNAの検出には、DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Sigma-Aldrich)とTerminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant (Promega)、そしてDIG-dUTP (Roche)とdCTP (TaKaRa)を用いて3'末端を標識したオリゴDNA (表3)を用いた。CeN76 RNAとCeN77 RNAのみEMSA用のオリゴDNAを設計した。

4. 結果

4.1. CeY RNAとsbRNAの末端解析

CeY RNAとsbRNAの配列は、複数のグループから報告されている。CeY RNAとCeN71-77、Cel2、そして、Cel3 RNAについてはcDNA配列が得られている [37, 40]。一方、CeN133-135 RNA、Cel1、Cel5、Cel6 RNAは、既知のY RNAやsbRNAに保存された配列や、それぞれの遺伝子のプロモーター配列を参考に、情報科学的な手法を用いて同定されたものである。したがって、実際のRNAレベルでの配列、特に末端の配列は不明である [8, 38]。Y RNAのような100ヌクレオチド程度の長さのRNAは、miRNAやsiRNAのような小分子RNAよりも複雑な高次構造を組んで、機能することが予想される。その構造を検討する上でRNAの末端配列を把握することは非常に重要である。また、Cel7 RNAについては2つの研究グループからそれぞれ長さの異なる配列が報告され、短いものはCe94と名付けられていた [38, 41]。Cel7 RNAに長さの異なる2つの産物が存在することは、本研究室において得られていたノーザンハイブリダイゼーションの結果と一致していた [43] (図5, 6)。しかし、Ce94 RNAについて、先行研究で報告されている配列はRoタンパク質との結合に必要な下方ステムを構成するヌクレオチドが欠損していた [41]。これに対し、本研究室で検出したCel7 RNAの短い産物はその存在量がROP-1の有無に影響を受ける [43] (図5) ことから、細胞中ではROP-1と結合すると予想し、そのために必要とされる下方ステムは維持されていると考えていた。以上のことから、Cel7 RNAの末端配列を実験的に決定する必要があると判断した。末端解析の手法は、プライマーエクステンション、RACE、RNA-seqを用いた。

4.1.1. プライマーエクステンションによるCeY RNAおよびsbRNAの5'末端の解析

線虫 N2から抽出したRNAに含まれるCeY RNAおよびsbRNAの5'末端配列の解析を試みた。逆転写反応を行う際に用いるオリゴDNAプライマーは、ノーザンハイブリダイゼーションで各RNAを検出する際に用いたものを使用した (表3)。CeN76 RNA、CeN133 RNA、Ce2 RNA、Cel3 RNA、Cel7 RNAは、プライマーの末端から予想される5'末端までの距離が近くなると考え、この実験用にプライマーの設計を行った (表4)。

逆転写産物が検出できたRNAは、解析を試みた16種類のうち9種類 (CeY RNA、CeN71、CeN72、CeN73-1、CeN74-2、CeN75、CeN135、Cel1、Cel3 RNA)であった (図7, 白三角)。CeY RNAの5'末端は、Van HornらがROP-1の免疫沈降実験で得たCeY RNAと同様のものではあった [36]。CeN71、CeN72 RNAの5'末端は、Dengらの報告と同様であった [37]。CeN75、CeN135、Cel3 RNAについても、Boriaらの報告と同様であった [38]。Cel1 RNAは、Boriaらが予想した配列より4ヌクレオチド短い5'末端が検出された。CeN73-1 RNAは、CeN73-2 RNAと相同性が高く、CeN74-2 RNAはCeN74-1およびCel6 RNAと相同性が高い。これらのRNAに対して特異的なオリゴDNAプライマーを設計するのはこんなんであったため、CeN73-1 RNAとCeN74-2 RNAは逆転写産物が確認できたが、いずれのRNAの末端を検出したのか判別できなかった。

逆転写産物が検出できなかったのは、CeN74-1、CeN76、CeN77、CeN133、CeN134、Cel2、Cel7 RNAの7種類であった。Cel2 RNAの解析については、Cel2 RNAの存在量が受精卵で多いことを考え、受精卵のみを集め抽出したRNAを用いて解析を試みたが、逆転写産物は検出できなかった (図7, Cel2 RNA 受精卵)。

4.1.2. 5'&3'-RACEによるCeY RNAおよびsbRNAの末端配列解析

5'&3'-RACEによってRNAの末端配列を解析するために、RNAの両末端へのアダプター配列の付加と逆転写反応における条件検討を行った。解析対象のCeY RNAとsbRNAは、RNAポリメラーゼIIIによって転写されることがRNA遺伝子上流に存在するモチーフから

予想され [6, 9, 10]、5'末端は三リン酸の形になっているものと考えられる。5'末端に三リン酸が存在する場合、T4 RNA ligase 1によるアダプター配列の付加が進行しない。そのため、アダプター配列を付加する前に、RNAをRppHで処理することで、RNAの5'末端を三リン酸から一リン酸に変換した (図8)。

アダプター配列 (RA5/RA3)は、RNAへ付加させる前に熱変性させ、二次構造の形成を防いだ。熱変性の条件は、参考文献に記載されているもの (60°C、30秒間)とより強い条件 (95°C、5分間)の2つについて検討した。RppH処理によって、RNAの5'末端の三リン酸が一リン酸へ変換されているのかを確認するために、in vitro転写反応にGMPを混合することで、5'末端が一リン酸の形になっているRNAを用意した。条件検討の結果、アダプターの熱変性条件については、2つの条件の間で差は見られなかった (図9)。また、RppH処理の影響については、RppH処理の有無によってRNAの5'末端に付加するアダプター (RA5)付加の効率に差が見られた (図9、レーン2, 3、レーン4, 5、レーン8, 9、レーン10, 11)。

RACEの解析には、線虫 N2の複数の発生段階 (受精卵、L1-L4幼虫、成虫)が混合した状態、受精卵のみ、成虫のみの3種類の状態を準備してそれぞれからRNAを抽出した。抽出したRNAの低分子RNA画分 (60-165ヌクレオチド)を精製して、これを元にcDNAライブラリを調製した。CeY、CeN72、CeN73-1、CeN74-2、Cel1、Cel2、Cel3は、5'-RACEを行う際に、5'アダプターのみをRNAに付加して、各RNAに特的なプライマーを用いて逆転写を行い、その産物をプラスミドにクローニングして配列を解析した。解析したクローン数は表9に示した。得られた5'末端および3'末端の位置とその割合を図10に示した。

5'-RACEを行った結果、CeY RNAについてはVan Hornらの報告や、筆者が行ったプライマーエクステンションと同様の5'末端配列が得られた [36]。

CeN71、CeN75 RNAはDengらと同じ末端が得られ、CeN134 RNAについては、Perreaultらと同じ5'末端の配列が得られた [8, 37]。

CeN72、CeN73-1、CeN74-1、CeN77は、Dengらの報告に比べ ± 1 ヌクレオチドの差が見られた。CeN74-2は、Dengらの報告に比べ2ヌクレオチド短い5'末端配列が得られた。

CeN76は、Dengらの報告に比べ1ヌクレオチド短いものと6ヌクレオチド短いものが得られた [37]。CeN133は、Boriaらの予想より4ヌクレオチド短い末端が得られた。CeN135は、Boriaらの予想より6ヌクレオチド短い末端が得られた。Cel1は、Boriaらの予想より2ヌクレオチド短い末端が得られた [38]。Cel3は、Xiaoらが出たクローンより3ヌクレオチド長い末端が多数を占めた [40]。Cel7は、Boriaらが出た末端と、15-16ヌクレオチド短い末端が得られた [38]。ここで得られた短いCel7は、Zemannらが出たCe94として報告したものに比べ10-11ヌクレオチド長かった [41]。ノーザンハイブリダイゼーションからCel7 RNAには長さの異なる2つの転写産物が存在していることから5'末端の長さが2つの転写産物の差異であることが示唆された。

3'末端については、RNAポリメラーゼIIIによって転写される産物は転写終結シグナルでもあるポリU配列が末端として得られることを予想していた。3'-RACEの解析結果は、予想されたように各RNA遺伝子の下流に存在するポリU配列のいずれかに収束した。

4.1.3. RNA-seqによるCeY RNAおよびsbRNAの末端配列解析

Truseq small RNA preparation kit (illumina)を用いて、線虫 N2、MQ470 *rop-1* (*pk93*)、RB2032 *rop-1* (*ok2690*)から抽出した全RNAからcDNAライブラリを調製した。cDNAライブラリの調製に用いたRNAはアダプター配列を付加する前に、RppHで処理した。RppH処理を行う際に、2種類の反応バッファー (10x NEB Thermopol buffer、以下Thermopol bufferまたは、10x NEBuffer 2以下NEBuffer)を用いた。いずれのバッファーを用いてもRNAの5'末端に存在する三リン酸を一リン酸へ変換するが、Thermopol bufferを用いた場合のみ、5'末端のキャップ構造を一リン酸へ変換する反応も行われる。RNAポリメラーゼIIIの転写産物には、ヒトU6 snRNAのように5'末端にキャップ構造 (γ -モノメチルグアニン)をもつRNAが報告されている [50]。CeY RNAやsbRNAにおいても、ヒトU6 snRNAのように5'末端にキャップ構造を持っていた場合、Thermopol bufferとNEBufferを用いて調製

したcDNAライブラリから得られるCeY RNAおよびsbRNAのリード数に差が見られると考えた。

RNA-seqによって出力された総リード数は、Thermopol bufferを用いたサンプルについては、4,201,229リード (N2)、4,757,324リード (MQ470)、4,165,534リード (RB2032)、NEBufferを用いたサンプルについては、10,392,665リード (N2)、8,479,728リード (MQ470)、3,206,249リード (RB2032)であった。Nucleotide-Nucleotide BLAST 2.7.1+を用いることで、出力されたリードから、CeY RNAおよびsbRNAを抽出した (表10, 11)。RppH処理の際に用いたバッファの差によって、リード数に影響が見られたのはCeN71 RNAとCel1 RNAであった。いずれもThermopol bufferを用いた場合、NEBufferと比較してCeN71 RNAは4.8倍、Cel1 RNAは14倍のリードが得られた。CeY RNAおよびCel2 RNAとCel7 RNAを除くsbRNAの存在量は、ROP-1の有無によって減少することがわかっている [43] (図5)。RNA-seqによって得られたCeY RNAおよびsbRNAのリード数においてもROP-1の有無によって大きな差異があった。RNA-seqによって得られた各RNAの5'末端配列の出現頻度は、筆者が行った5'-RACEにおいて得られた結果と同様であった。3'末端の配列については、3'-RACEと同様に長さの異なるポリU配列が得られた。一方で、5'末端と3'末端の両方で、先行研究で報告されていた末端から20ヌクレオチド以上短い末端配列も得られた。以上の様な末端配列の出現頻度は、Cel7 RNAを除き、野生株と*rop-1*変異株との間で変わらなかった。Cel7 RNAの5'末端配列の出現頻度は野生株と*rop-1*変異株で差があった (図10S)。野生株においては、Boriaらが予想した5'末端と、Boriaらの予想より15ヌクレオチド短い5'末端の2種類が得られた。一方、*rop-1*変異株においては、Boriaらが予想した5'末端の出現頻度がそれ以外の末端の出現頻度より高い傾向が見られた。この傾向は、ノーザンハイブリダイゼーションによってCel7 RNAを検出した結果と一致する [43] (図5)。3'末端の出現頻度は、野生株と*rop-1*変異株の間に大きな差異は見出せなかった。本研究で得られた5'末端が15ヌクレオチド短いCel7 RNAは、Ce94 RNAに比べ5'末端が11ヌクレオチド長かった。本研究で得られた短いCel7 RNAをCe94と区別するため

に、Cel7s RNAと名付けた。そして、Cel7 RNAとCel7s RNAの差異は5'末端の長さによるものであることが明らかになった。

ZemannらはCeN71、CeN72、CeN74-1、CeN74-2 RNAの4種について、Dengらの報告と比較して非常に短い配列を報告していた [37-41]。しかし、本研究の解析ではこれらの配列は得られなかった。また、Cel5 RNAについてはいずれの方法でも配列が得られなかった。

4.1.4. RNAの合成とその長さの比較

末端配列の解析によって得られた結果をもとにCeY RNAおよびsbRNAをT7 RNAポリメラーゼを用いてin vitroで合成した。T7 RNAポリメラーゼによる合成効率を上昇させるために、CeN71、74-1、Cel6、Cel7はGヌクレオチドを2つ、CeN72、73-1、73-2、75、77、133、134、Cel3、Cel5、Cel7sはGヌクレオチドを3つRNAの5'末端配列に付け加えた。また、CeN75 RNAについては3'末端の位置が筆者が行った末端解析と先行研究で得られていた配列との間で18ヌクレオチドの差があったので3'末端の長さが異なる2種類のCeN75 RNA (先行研究にあったものをCeN75、筆者が得た配列をCeN75sとした)を合成した。Cel5 RNAは末端解析の過程で配列情報が得られなかったため、もっとも相同性の高いCeN134 RNAの配列を参考に、これと同様の位置から転写が開始すると予想して5'末端を設定した。3'末端については、先行研究で予想されていたもの [38]に合わせた。

合成したRNAは、ノーザンハイブリダイゼーションを行うことでin vivoに存在するRNAと長さを比較した。線虫全RNAに含まれるCeN75 RNAの長さは、3'末端が先行研究で報告されていたものより18ヌクレオチド短いCeN75s RNAと同様であった。他のRNAについても合成したRNAと細胞内に存在するRNAの長さには大きな差異がないこと確認した (図11)。

Cel7 RNAとCel7s RNAの長さの差が5'末端の長さの違いによるものであることを検証するために、Cel7 RNAの5'末端領域 25ヌクレオチドに結合するプローブ(Cel7-oligo、表3)を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った(図12)。設計したプローブは、Cel7 RNAに対しては、25ヌクレオチド結合するのに対して、Cel7s RNAの5'末端領域に対しては10ヌクレオチドのみ結合する(図12A, 白三角)。プローブがCel7s RNAに対して結合できる長さが短いことから、メンブレンを洗浄する段階でプローブがRNAから剥離して、Cel7 RNAのみが検出できると考えた。結果、同じ長さのRNAのみが検出された(図12B, 右のパネル)。このRNAは、2種の*rop-1*変異株 MQ470とRB2032それぞれから抽出した全RNAにおいてもN2と同様に検出できたことから、Cel7 RNAであると判断した。

4.2. CeY RNAとsbRNAのROP-1に対する結合の有無の検証

線虫sbRNAは、Y RNAの保存された配列と二次構造をもつことから線虫のY RNAホモログである[38]。Y RNAは、ヒトやマウスといった脊椎動物からバクテリアに至るまでの多様な生物種のゲノムでホモログが見つかっている。各生物種で見つかっているY RNAは1-4種である。一方、線虫Y RNAホモログとして報告されているRNAは、CeY RNAと19種のsbRNAの合計20種類であり、他の生物種と比較して非常に多い。そして、CeY RNAとsbRNAの予測二次構造からY RNAのL2ループに相当するループ領域の構造は多様である(図1, 13)。sbRNAがY RNAの一員であり、RNAの品質管理に機能するのであれば、Roタンパク質と結合することが予想される。実際、CeN72 RNAとCel3 RNAについては、これらがROP-1と結合することがXiaoらによって示されている。一方で、Cel2 RNAはこれら2種類のsbRNAに比べるとROP-1に対する結合能が非常に弱いことも示されている[40]。sbRNAとROP-1の結合の有無を検証するため、ゲルシフトアッセイ(Electro Mobility Shift Assay: EMSA)を行うことにした。

4.2.1. CeY RNAおよびsbRNAのROP-1に対する結合の比較

RNAとROP-1を結合させる条件については、アフリカツメガエル Y RNAとRoタンパク質の実験系 [14, 30]を参考に、非特異的競合阻害物質として酵母tRNA、チューブに核酸が吸着するのを防ぐためにNonidet P-40を加えた。RNAとROP-1を結合させる温度は、線虫の生育温度である20°Cに設定した。また、CeY RNAおよびsbRNAはROP-1と混合する前に、95°Cで5分間、熱変性させた後氷上に移して急冷した。

ポジティブコントロールとして、すでにROP-1との結合が明らかになっているCeY RNAとネガティブコントロールとしてCeY RNAの5'末端10ヌクレオチドを欠損したRNA (truncated CeY RNA)を用いた (図14A)。CeY RNAとROP-1を混合した場合、シフトしたバンドが検出できたことから、この反応条件でCeY RNAとROP-1の複合体が形成されていると判断した (図14B, 左のパネル 白三角)。一方、truncated CeY RNAを用いた場合、ROP-1を加えてもシフトしたバンドがわずかであることから (図14B, 右のパネル 白三角)、形成されている複合体は少なく、CeY RNAの5'末端10ヌクレオチドがROP-1との結合に貢献することが示された。同様の条件で、sbRNAについてROP-1との結合の有無を検証した (図15)。Cel2 RNAを除くsbRNAはCeY RNAと同様にROP-1を23.4 nM加えた時点で、シフトしたバンドが検出できた (図15, 白三角)。Cel7 RNAについては、46.9 nMのROP-1を加えた時点で、シフトしたバンドが2本検出できた (図15, Cel7 *1-2)。Cel2 RNAは、ROP-1を93.6 nMまで加えても検出されるシグナルのパターンは変わらなかった (図15, Cel2 黒三角)。

この実験系によって、Cel2 RNAとそれ以外のsbRNAはROP-1との結合の強さに差があることが示唆された。

4.2.2. RNAの熱変性条件の検討

最初に設定した条件では、ROP-1と結合していないRNAのシグナルが異なる位置に複数検出された。これは異なる高次構造を組んだRNAが混在しているためであると考えられる。RNAとタンパク質の結合を論じるために解離定数を算出する場合、RNAとタンパク質間の結合と解離が見かけ上平衡に達している状態で行う必要がある [51]。しかし、反応系に複数の高次構造をとったRNAが存在しているような条件では平衡状態を安定して測定できないと考え、RNAの高次構造を一定にする条件を検討した。

先のEMSAに用いたRNAは、95°Cで5分間熱変性し、その後、氷上において急冷した。このRNAの処理方法を変えることで、一定の高次構造を形成したRNAのみを調製することができないか検討した。RNAを95°Cで5分間熱変性した後、急冷したものと一時間かけて20°Cまでゆっくり温度を下げたもの、2種類の方法を試した。また、RNAの高次構造の形成には、温度だけでなくMg²⁺が影響を与える [52]。最初に設定した条件には、RNAを熱変性させる際に、3 mM MgCl₂を加えていたが、これを除いた場合についても検討した。実験の結果、MgCl₂を除いた状態で、熱変性後、1時間かけて温度を下げていく処理を行ったRNAを用いた場合、それ以外の処理をしたものと比較するとフリーのRNAは一本のバンドに収束するような結果が得られた (図16, 黒三角)。ここまでの検討で、RNAを熱変性させる条件は、「MgCl₂非存在下において変性後1時間かけて20°Cに下げる」という条件を用いることにした。

4.2.3. EMSAに用いる塩と酵母tRNAの検討

次に、EMSAに用いる塩とその濃度について検討した。細胞内には、Na⁺よりK⁺がより多く存在する。主に細胞質に局在することが知られているY RNAとRoタンパク質の結合を検証する実験系に加える塩をNaClからKClに変えることで、どの程度影響があるのか確かめることにした。0.15 nM CeY RNAと1 nM ROP-1を混合した場合に終濃度100 mM NaClまたは100 mM KClを用いてEMSAを行った。NaClを用いた場合、20°Cで2時間イン

キュベーションした時点で、シフトしたバンドが検出できた。一方、KClを用いた場合、20°Cで1時間インキュベーションした時点で、シフトしたバンドが検出できた (図17, 白三角)。

EMSAの反応系に加える塩をNaClからKClに変えた時、ROP-1とRNAの非特異的結合が強くなっていないことを確かめた。ROP-1と4種類のY RNAホモログ (CeY、CeN71、Cel7、Cel7s RNA)のいずれかを含む反応系において、非特異的競合阻害剤として加える酵母tRNAを25 ng/μLから250 ng/μLまで変化させてEMSAを行った (図18)。K⁺存在下でROP-1とRNAの非特異的結合が増加したのであれば、反応系に加える酵母tRNAを増やすことで、シフトするバンドの強度が減少すると予想した。反応系に加える酵母tRNAの濃度を0-250 ng/μLを増加させてもシフトしたバンドの強度に変化はなかった (図18, 白三角)。この結果から、K⁺存在下でROP-1とRNAの非特異的結合が増加していないと判断した。

4.2.4. CeY RNAとCeN71、Cel2、Cel7、Cel7s RNAのROP-1に対する結合の比較

新たに設定したRNAの熱変性条件 (95°Cで熱変性させた後、1時間かけて20°Cまで冷却)と反応系にKClを加え、CeY RNAとtruncated CeY RNA、CeN71 RNA、Cel2 RNA、Cel7、Cel7s RNAとROP-1のEMSAを行った (図19)。その結果、CeY RNAとCeN71、Cel7、Cel7s RNAは、15 nM ROP-1と混合した時点で複合体を形成した (図19, 白矢印)。一方、truncated CeY RNAとCel2 RNAは、15 nM ROP-1の時点ではROP-1を加えていないものと差が見られなかった。Cel2 RNAがROP-1を加えても複合体を形成しにくくという結果は、先行研究と一致する [40]。

Cel7 RNAとCel7s RNAについては、15 nM ROP-1を加えた時点で両者ともシフトしたバンドが確認できた。加えるROP-1の量を増やすことでシフトしたバンドも濃くなっていった (図19, Cel7 RNAとCel7s RNA 白矢印)。しかし、CeY RNAやCeN71 RNAの場合と

は異なり、シフトしたRNAのバンドとフリーのRNAのバンドの間にスメアが検出された (図19, Cel7 RNAとCel7s RNA *1)。また、Cel7 RNAとROP-1のEMSAではフリーのRNAが2本検出できた (図19, Cel7 RNA 黒矢印)。

4.2.5. 変異Cel2 RNAの作製とROP-1に対する結合

Cel2 RNAの特徴として2つ上げられる。1つ目は予測二次構造の下方ステムの3'末端側にCeY RNAや他のsbRNAには見られないシトシン (C)残基のバルジアウトが存在すること (図20A, 左のパネル 矢印)。2つ目は、5'末端側に他のsbRNAには見られないヌクレオチドがあり、L1ループの一部と塩基対を形成しうることである (図20A, 左のパネル 黒破線枠)。これらのうち、3'末端側に形成されうるシトシン残基のバルジアウトがROP-1との結合に影響を与えるのか確かめるため、バルジアウトすると予想したシトシン残基を欠損させた変異Cel2 RNA (Cel2 RNA-del, 図20A 右のパネル)を作製し、ROP-1との結合を確認した (図20B-20C)。RNAの調製と反応系は、図15および図19で示したEMSAと同じ方法で行った。いずれの条件においてもシフトしたバンドは検出できず、フリーのRNAのパターンに変化はなかった (図20B-20C, 黒三角)。

4.2.6. 反応系に含まれるCel7 RNAの状態について

CeY RNAやtruncated CeY RNA、CeN71、Cel2 RNAはEMSAを行った場合、フリーのRNAは1本のバンドとして検出できた (図19 黒三角)。一方、フリーのCel7 RNAは常に二本のバンドとして検出できた (図19, Cel7 RNA 矢印)。フリーのCel7 RNAが二本のバンドとして検出できた理由として2つ考えられる。1つ目は、Cel7 RNAが安定に取りうる高次構造が2種類あり、ネイティブゲルでそれらを分離した場合に、RNAの長さに差がなくとも形成している高次構造の違いによって二本の異なるバンドとして検出される。2つ目は、RNAの一部が切断され異なる長さのRNAが検出された、というものである。これら

を検証するため、Cel7 RNAとCel7s RNAを図19で示したEMSAと同じ条件で調製し、0-8時間、20°Cでインキュベーションし、ネイティブゲルと、変性ゲルを用いて電気泳動にかけた。RNAの高次構造の違いがネイティブゲルに泳動した際のバンドのパターンに影響を与えているのであれば、変性ゲルを用いて同じRNAを電気泳動にかけた場合、同じ位置にバンドが検出できると予想した。ネイティブゲルでCel7 RNAを泳動した場合、20°Cでインキュベーションしている間に、バンドがCel7s RNAと同程度の位置までシフトした(図21A, 矢印 *1-2)。Cel7s RNAは、バンドはシフトしなかった。しかし、8時間インキュベーションすると、0-2時間インキュベーションした場合と比べ、バンドの強度が減少した(図21A, 矢印 *3)。変性ゲルで分離した場合、8時間インキュベーションした時点でCel7 RNAとCel7s RNAが同じバンドパターンとして検出できた(図21B, 矢印 *1-3)。これらの結果から、Cel7 RNAは、反応中に一部が切断されていることが明らかになった。Cel7 RNAがどのように分解しているのかを観察するために、Cel7 RNAの5'末端から25ヌクレオチド(Cel7-oigo_25nt, 図22A 黒三角)または40ヌクレオチド(Cel7-oigo_40nt, 図22A, 白三角)に相補的な配列をプローブとして検出した。5'末端から25ヌクレオチドをプローブに用いた場合、インキュベーションの時間が長くなるにつれ、Cel7 RNAが検出できなくなった(図22B)。一方、5'末端から40ヌクレオチドをプローブに用いた場合、Cel7 RNAがCel7s RNAと同程度の長さに切断されている様子が検出できた(図22C, 矢印)。また、8時間インキュベーションした時点で、Cel7 RNAはCel7s RNAより多くのバンドが検出できた(図22C, レーン4とレーン8 *1)。ROP-1とともにインキュベーションした場合でも、RNAが切断されているのか確認した。図19で示したEMSAと同じ条件でRNAの調製およびROP-1との混合を行い、変性ゲルで分離した(図23)。CeY RNA、truncated CeY RNA、CeN71、Cel2、Cel7、そして、Cel7s RNAのいずれでも、切断されているRNAはわずかであり、0-60 nMの間でROP-1の量を変化させてもバンドパターンに変化はなかった(図23, 矢印)。

5. 考察

5.1. CeY RNAおよびsbRNAの末端配列解析

本研究においてCeY RNAおよび新たに同定したCel7s RNAを含む19種類のsbRNAの末端配列をプライマーエクステンション、RACE、RNA-seqによって解析した。これにより、これまで予想配列のみが報告されていたCeN133、CeN134、CeN135、Cel1、Cel6、Cel7、Cel7s RNAの末端配列を明らかにした。RNA-seqにおけるCeN71 RNAとCel1 RNAのリード数は、RppH処理の条件によって差が見られた (表10, 11)。いずれのRNAにおいてもThermopol bufferを用いることで、NEBufferを用いた場合と比較してより多くのリードが得られた。NEBufferはRNAの5'末端に存在する三リン酸を一リン酸に変換する。一方、Thermopol bufferは三リン酸に加え、キャップ構造も一リン酸へ変換する。よって、この結果はCeN71 RNAとCel1 RNAの5'末端に、キャップ構造が存在することを示唆している。

筆者が行なった解析によって得られたこれらのRNAの5'末端配列は報告されていた予想配列と比較して、1-5ヌクレオチド短い産物が最も多く検出された。この傾向はいずれの方法でも同様であった。また、いずれのRNAにおいても5'末端はプリン (AまたはG)であった。CeY RNAおよびsbRNAは、RNAポリメラーゼIIIによって転写されることがRNA遺伝子上流に存在するプロモーターモチーフ (TATA Box、PSE)から予想される [38, 53] (図24A- 24C)。この転写様式で転写されるRNAは転写開始点 (+1)がプリンであるとき最も効率よく転写されることが報告されている [54, 55]。ヒトにおいては、転写因子Oct-1/Pou2f1がRNAポリメラーゼIIIによる転写に関わることが知られ、Oct-1が認識する配列はDSE (Distal sequence element)と名付けられている [56-58]。例として、ヒトU6 snRNAは、TATA BoxやPSEに加え、RNA遺伝子の転写開始点から約200ヌクレオチド上流にDSEが見られる。しかし、CeY RNAおよびsbRNAの上流200ヌクレオチドにはDSEは見つからない [53]。筆者は各RNA遺伝子上流500ヌクレオチドまでの配列を精査したが

DSEに類似した配列を見つけることはできなかった。一方、3'末端配列は複数箇所に検出され、それらはゲノム上に4-8ヌクレオチド存在するポリチミン (T)配列とその上流であった (図10)。RNAポリメラーゼIIIによって転写される遺伝子の下流に存在するポリT配列は、転写集結シグナルとして機能する [59]。また、RNAの3'末端に見られるポリウラシル (U)配列にはLaタンパク質が結合することでRNAを安定化し、RNAが細胞質に送られた後、ポリU配列はプロセッシングを受けると予想される [19, 20]。これらの知見から、筆者が検出したCeY RNAおよびsbRNAの3'末端配列は転写直後と3'末端配列がプロセッシングを受けた後の状態を反映したものであると考えられる。なお、解析の過程で得られた末端配列の中には低頻度かつ複数箇所に検出されるものがあった。これらは相当する短いRNAがノーザンハイブリダイゼーションで検出されなかったことから、実験過程で切断されたものであると判断した。

Cel5 RNAはいずれの方法においても末端配列が得られなかった。Cel5 RNAはCeN134 RNAと相同性が高く、それぞれに対して特異的なプローブを設計することが困難であった。このことから、ノーザンハイブリダイゼーションによってCeN134 RNAを検出する際には、Cel5 RNAも同時に検出していると考えている [43] (図5, 6)。CeN134 RNAおよびCel5 RNAを検出する際には、他のsbRNAに比べより多い全RNAを必要とした。したがって、細胞内に存在するCeN134 RNAとCel5 RNAは他のsbRNAより少なく、Cel5 RNAの末端配列が得られなかった理由もこのためであると考えられる。興味深いことに、線虫に対して緑膿菌 *Pseudomonas. aeruginosa*に暴露させるとCeN134 RNAとCel5 RNAの断片(21-26ヌクレオチド)がコントロール (大腸菌 OP50株)と比較して、~ 32倍増加することが報告されている [60]。しかし、RACEやRNA-seqに用いたcDNAライブラリは、60-165ヌクレオチドの長さのRNAを対象としていたため、Mooreらが単離したCeN134 RNAもしくはCel5 RNA由来の短いRNA断片は検出されなかった。

5.2. ROP-1に対するCeY RNAおよびsbRNAの結合の有無

CeY RNAおよび19種類のsbRNAについてEMSAを行い、Cel2 RNAを除くRNAがin vitroでROP-1と結合することを明らかにした (図14, 15)。RNAをROP-1と混合する前に熱変性と冷却の操作をMg²⁺存在下で行った場合、フリーのRNAが異なる位置に複数検出できた (図14, 15、図16 レーン1-6)。一方、Mg²⁺非存在下で熱変性と冷却を行った後に、Mg²⁺を加えた場合、フリーのRNAは同じ位置に収束する形で検出できた (図16 レーン7-9, 図17-20)。Mg²⁺はRNAの高次構造を安定化させる [52]。フリーのRNAが異なる位置に複数検出できたことは、複数の高次構造をとったRNAがMg²⁺によって安定化されたため、または、RNAの一部が反応中に切断を受けていると考えられる。

Cel2 RNAは、検討したいずれの条件においても、CeY RNAや他のsbRNAの場合に検出されたシフトしたバンドは検出されなかった (図15、図19)。これは先行研究の報告と一致する [40]。したがって、Cel2 RNAはY RNAに類似した構造を持ちつつもROP-1との結合が他のsbRNAと比較して弱いことが示唆される。下方ステムに形成されうる2箇所のバルジアウトについては3'末端側の残基を1つ除くことで、下方ステムの構造を他のY RNAホモログに近づけた変異Cel2 RNAを作製し、ROP-1との結合を評価した (図20A 右のパネル, 図20B-20C)。しかし、変異を加えたCel2 RNAはROP-1と結合しなかった。5'末端側に存在するCel2 RNAに特徴的な配列はL1ループの一部と塩基対を形成しうる (図20A, 左のパネル 黒破線枠)。アフリカツメガエルにおけるxY3 RNAとRoタンパク質の結合の知見から、xY3 RNAのL1ループ領域を欠損するとRoタンパク質に対するが著しく減少する [14] (図1)。線虫の場合、このL1ループを構成すると考えられる残基は、CeY RNAが4ヌクレオチド、Cel2 RNAを除くsbRNAが6ヌクレオチドである (図13)。しかし、Cel2 RNAにおけるL1ループは5'末端側の残基と一部塩基対を形成でき、Cel2 RNAとROP-1の結合効率に影響を与えることが考えられる (図20A 左のパネル)。

Y RNAが複数存在する場合、Roタンパク質に結合するY RNAの種類は、Ro/Y RNPの機能を考える上で重要である。ヒトRo/Y RNPが、リボソームタンパク質L5/変異5S rRNA複合体と相互作用する際、hY5 RNAのL2ループが重要である [17]。また、マウスRoタンパク質は結合するY RNAの種類によって、Ro/Y RNPと相互作用する因子が異なる [29]。線虫Y RNAホモログの種類は、他の生物種と比べて多く、L2ループの予想構造も多様である (図13)。EMSAによって、CeY RNAおよび17種類のsbRNAがROP-1と結合することが明らかになったことで、線虫ROP-1/Y RNPと相互作用できる因子の種類は他の生物種Ro/Y RNPより多様である可能性がある。

5.3. ROP-1に対するCel7 RNAとCel7s RNAの結合

Cel7 RNAとCel7s RNAは、ROP-1と混合することで、フリーのRNAとシフトしたバンドの間にスメアが検出できた (図19, Cel7s RNA *1)。スメアが検出できた理由として2つの可能性が考えられる。1つは、反応系内でRNAが切断を受け、生じた長さの異なるRNAを検出している可能性である。RNAとROP-1を混合、インキュベーションしている間に元のサイズより短いRNAが生じていた (図23)。もう1つの可能性は、一度形成されたRNAとROP-1の複合体が電気泳動の過程で解離している状態を検出している可能性である。この場合、スメアが検出されなかったCeY RNAやCeN71 RNAと比較して、RNAとROP-1の結合が弱いことを示唆している。Cel7 RNAは、ROP-1と混合することでシフトしたバンドが、Cel7s RNAの場合と同程度検出できた (図19, Cel7 RNA レーン2-4 白三角)。しかし、本研究で設定した実験条件では、反応系内で一部のRNAが切断されていた (図21-23)。そのため、Cel7 RNAとROP-1の混合によって検出されたシフトしたバンドは、切断を受けたCel7 RNAとROP-1の結合を検出している可能性がある。Cel7 RNAについては、RNAの5'末端側に結合するプローブを設計することで、Cel7 RNAの5'末端側が切断を受け、Cel7s RNAと同程度の長さにバンドが検出できた (図21B *1)。Cel7 RNAの5'末端から25

ヌクレオチドに結合するプローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行うと反応時間が長くなるほど、検出されるRNAは減少した (図22B レーン1-4)。この結果から、Cel7 RNAの5'末端から25ヌクレオチドの範囲に切断を受けやすい箇所があることが示唆された。in vitroにおいては、ROP-1の有無や量の増減によってCel7 RNAの切断が促進される傾向は見られなかった (図21B レーン1, 2、レーン5, 6、図23 Cel7, Cel7s)。

Cel7 RNA遺伝子上流500ヌクレオチドまでの配列にはBoriaらが報告した位置以外に転写モチーフは見つけれなかった [39]。Cel7s RNAはCel7 RNAがプロセッシングを受けたものと考えられる。また、Cel7 RNAはROP-1の有無によって細胞内の存在量が変化しない [43]。Cel7 RNAの5'末端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Cel7 RNAの存在量に関わる可能性がある。また、放射線耐性菌においてRoタンパク質ホモログRsrが23S rRNAのプロセッシングを促進することが報告されている [25]。rop-1変異株においては、ROP-1によって促進されていたCel7s RNAへのプロセッシングが滞った結果、Cel7 RNAが蓄積している可能性がある (図25)。

5.4. おわりに

本研究は新たに同定したCel7s RNAを含む19種類の線虫Y RNAホモログの配列を実験的に解析した。そして、線虫Roタンパク質ホモログROP-1と、線虫Y RNAホモログの結合を確かめることで、ROP-1に結合するY RNAのレパートリーを明らかにした。Y RNAレパートリーを明らかにすることは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がこれらの研究はRo/Y RNPの機能とそれが生物個体に与える影響を繋げることが困難である。この理由は、用いられている材料が培養細胞のような単一の細胞であるためである。この問題を解決するためには、分子レベルの解析と個体レベルの解析を同一の生物モデルを用いて行うことが望ましく、線虫はこのような解析に適している。本研究におい

て得られた結果はこれから線虫を用いてRo/Y RNPの機能解析を行う上で基礎となるものである。

6. 参考文献

1. Williams SG, Wolin SL. The Autoantigen Repertoire and the Microbial RNP World. *Trends Mol Med*. 2021 May;27(5):422-435. doi: 10.1016/j.molmed.2021.02.003. Epub 2021 Mar 12. PMID: 33722441.
2. Greiling TM, Dehner C, Chen X, Hughes K, Iñiguez AJ, Boccitto M, Ruiz DZ, Renfroe SC, Vieira SM, Ruff WE, Sim S, Kriegel C, Glanternik J, Chen X, Girardi M, Degnan P, Costenbader KH, Goodman AL, Wolin SL, Kriegel MA. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. *Sci Transl Med*. 2018 Mar 28;10(434):eaan2306. doi: 10.1126/scitranslmed.aan2306. PMID: 29593104; PMCID: PMC5918293.
3. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB Jr. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythmatosus. *J Immunol*. 1969 Jan;102(1):117-122. PMID: 4179557.
4. Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*. 1975 May;55(5):1067-1073. doi: 10.1172/JCI108007. PMID: 804494; PMCID: PMC301853.
5. Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science*. 1981 Jan 23;211(4480):400-402. doi: 10.1126/science.6164096. PMID: 6164096.
6. Hendrick JP, Wolin SL, Rinke J, Lerner MR, Steitz JA. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1981 Dec;1(12):1138-1149. doi: 10.1128/mcb.1.12.1138. PMID: 6180298; PMCID: PMC369740.
7. Sim S, Wolin SL. Emerging roles for the Ro 60-kDa autoantigen in noncoding RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011 Sep-Oct;2(5):686-699. doi: 10.1002/wrna.85. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21823229; PMCID: PMC3154076.

8. Perreault J, Perreault JP, Boire G. Ro-associated Y RNAs in metazoans: evolution and diversification. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1678-1689. doi: 10.1093/molbev/msm084. Epub 2007 Apr 29. PMID: 17470436.
9. Wolin SL, Steitz JA. Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell.* 1983 Mar;32(3):735-744. doi: 10.1016/0092-8674(83)90059-4. PMID: 6187471.
10. Canella D, Praz V, Reina JH, Cousin P, Hernandez N. Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Res.* 2010 Jun;20(6):710-721. doi: 10.1101/gr.101337.109. Epub 2010 Apr 22. PMID: 20413673; PMCID: PMC2877568.
11. O'Brien CA, Margelot K, Wolin SL. *Xenopus* Ro ribonucleoproteins: members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7250-7254. doi: 10.1073/pnas.90.15.7250. PMID: 7688474; PMCID: PMC47114.
12. Teunissen et al., 2000 [10] Teunissen SW, Kruithof MJ, Farris AD, Harley JB, Venrooij WJ, Pruijn GJ. Conserved features of Y RNAs: a comparison of experimentally derived secondary structures. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15;28(2):610-619. doi: 10.1093/nar/28.2.610. PMID: 10606662; PMCID: PMC102524.
13. Kowalski MP, Krude T. Functional roles of non-coding Y RNAs. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Sep;66:20-29. doi: 10.1016/j.biocel.2015.07.003. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26159929; PMCID: PMC4726728.
14. Green CD, Long KS, Shi H, Wolin SL. Binding of the 60-kDa Ro autoantigen to Y RNAs: evidence for recognition in the major groove of a conserved helix. *RNA.* 1998 Jul;4(7):750-765. doi: 10.1017/s1355838298971667. PMID: 9671049; PMCID: PMC1369656.
15. Gardiner TJ, Christov CP, Langley AR, Krude T. A conserved motif of vertebrate Y RNAs essential for chromosomal DNA replication. *RNA.* 2009 Jul;15(7):1375-1385. doi: 10.1261/rna.1472009. Epub 2009 May 27. PMID: 19474146; PMCID: PMC2704080.

16. Collart C, Christov CP, Smith JC, Krude T. The midblastula transition defines the onset of Y RNA-dependent DNA replication in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*. 2011 Sep; 31(18):3857-3870. doi: 10.1128/MCB.05411-11. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21791613; PMCID: PMC3165727.
17. Hogg JR, Collins K. Human Y5 RNA specializes a Ro ribonucleoprotein for 5S ribosomal RNA quality control. *Genes Dev*. 2007 Dec 1;21(23):3067-3072. doi: 10.1101/gad.1603907. PMID: 18056422; PMCID: PMC2081973.
18. Köhn M, Ihling C, Sinz A, Krohn K, Hüttelmaier S. The Y3** ncRNA promotes the 3' end processing of histone mRNAs. *Genes Dev*. 2015 Oct 1;29(19):1998-2003. doi: 10.1101/gad.266486.115. PMID: 26443846; PMCID: PMC4604341.
19. Maraia RJ. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase III transcripts. *J Cell Biol*. 2001 May 14;153(4):F13-F17. doi: 10.1083/jcb.153.4.f13. PMID: 11352926; PMCID: PMC2192372.
20. Maraia RJ, Lamichhane TN. 3' processing of eukaryotic precursor tRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011 May-Jun;2(3):362-375. doi: 10.1002/wrna.64. PMID: 21572561; PMCID: PMC3092161.
21. Driedonks TAP, Nolte-t Hoen ENM. Circulating Y-RNAs in Extracellular Vesicles and Ribonucleoprotein Complexes; Implications for the Immune System. *Front Immunol*. 2019 Jan 15;9:3164. doi: 10.3389/fimmu.2018.03164. PMID: 30697216; PMCID: PMC6340977.
22. Hizir Z, Bottini S, Grandjean V, Trabucchi M, Repetto E. RNY (YRNA)-derived small RNAs regulate cell death and inflammation in monocytes/macrophages. *Cell Death Dis*. 2017 Jan 5;8(1):e2530. doi: 10.1038/cddis.2016.429. PMID: 28055017; PMCID: PMC5386355.
23. Chen X, Quinn AM, Wolin SL. Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev*. 2000 Apr 1;14(7):777-782. PMID: 10766734; PMCID: PMC316496.

24. Wurtmann EJ, Wolin SL. A role for a bacterial ortholog of the Ro autoantigen in starvation-induced rRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 2;107(9):4022-4027. doi: 10.1073/pnas.1000307107. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20160119; PMCID: PMC2840137.
25. Chen X, Wurtmann EJ, Van Batavia J, Zybaïlov B, Washburn MP, Wolin SL. An ortholog of the Ro autoantigen functions in 23S rRNA maturation in *D. radiodurans*. *Genes Dev*. 2007 Jun 1;21(11):1328-1339. doi: 10.1101/gad.1548207. Epub 2007 May 17. PMID: 17510283; PMCID: PMC1877746.
26. Kurasz JE, Hartman CE, Samuels DJ, Mohanty BK, Deleveaux A, Mrázek J, Karls AC. Genotoxic, Metabolic, and Oxidative Stresses Regulate the RNA Repair Operon of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. 2018 Nov 6;200(23):e00476-18. doi: 10.1128/JB.00476-18. PMID: 30201777; PMCID: PMC6222203.
27. Chen X, Smith JD, Shi H, Yang DD, Flavell RA, Wolin SL. The Ro autoantigen binds misfolded U2 small nuclear RNAs and assists mammalian cell survival after UV irradiation. *Curr Biol*. 2003 Dec 16;13(24):2206-2211. doi: 10.1016/j.cub.2003.11.028. PMID: 14680639.
28. Sim S, Weinberg DE, Fuchs G, Choi K, Chung J, Wolin SL. The subcellular distribution of an RNA quality control protein, the Ro autoantigen, is regulated by noncoding Y RNA binding. *Mol Biol Cell*. 2009 Mar;20(5):1555-1564. doi: 10.1091/mbc.e08-11-1094. Epub 2008 Dec 30. PMID: 19116308; PMCID: PMC2649258.
29. Leng Y, Sim S, Magidson V, Wolin SL. Noncoding Y RNAs regulate the levels, subcellular distribution and protein interactions of their Ro60 autoantigen partner. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jul 9;48(12):6919-6930. doi: 10.1093/nar/gkaa414. PMID: 32469055; PMCID: PMC7337961.
30. Stein AJ, Fuchs G, Fu C, Wolin SL, Reinisch KM. Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. *Cell*. 2005 May 20;121(4):529-539. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.009. PMID: 15907467; PMCID: PMC1769319.

31. Fuchs G, Stein AJ, Fu C, Reinisch KM, Wolin SL. Structural and biochemical basis for misfolded RNA recognition by the Ro autoantigen. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Nov; 13(11):1002-1009. doi: 10.1038/nsmb1156. Epub 2006 Oct 15. PMID: 17041599.
32. O'Brien CA, Wolin SL. A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev.* 1994 Dec 1;8(23):2891-2903. doi: 10.1101/gad.8.23.2891. PMID: 7995526.
33. Shi H, O'Brien CA, Van Horn DJ, Wolin SL. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA.* 1996 Aug;2(8):769-784. PMID: 8752087; PMCID: PMC1369414.
34. Chen X, Taylor DW, Fowler CC, Galan JE, Wang HW, Wolin SL. An RNA degradation machine sculpted by Ro autoantigen and noncoding RNA. *Cell.* 2013 Mar 28;153(1): 166-177. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.037. PMID: 23540697; PMCID: PMC3646564.
35. Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009. Introduction. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1
36. Van Horn DJ, Eisenberg D, O'Brien CA, Wolin SL. *Caenorhabditis elegans* embryos contain only one major species of Ro RNP. *RNA.* 1995 May;1(3):293-303. PMID: 7489501; PMCID: PMC1369082.
37. Deng W, Zhu X, Skogerbø G, Zhao Y, Fu Z, Wang Y, He H, Cai L, Sun H, Liu C, Li B, Bai B, Wang J, Jia D, Sun S, He H, Cui Y, Wang Y, Bu D, Chen R. Organization of the *Caenorhabditis elegans* small non-coding transcriptome: genomic features, biogenesis, and expression. *Genome Res.* 2006 Jan;16(1):20-29. doi: 10.1101/gr.4139206. Epub 2005 Dec 12. PMID: 16344563; PMCID: PMC1356125.
38. Boria I, Gruber AR, Tanzer A, Bernhart SH, Lorenz R, Mueller MM, Hofacker IL, Stadler PF. Nematode sbRNAs: homologs of vertebrate Y RNAs. *J Mol Evol.* 2010 Apr;70(4): 346-358. doi: 10.1007/s00239-010-9332-4. Epub 2010 Mar 27. PMID: 20349053.
39. Krude T, Christov CP, Hyrien O, Marheineke K. Y RNA functions at the initiation step of mammalian chromosomal DNA replication. *J Cell Sci.* 2009 Aug 15;122(Pt 16):2836-2845. doi: 10.1242/jcs.047563. PMID: 19657016.

40. Xiao T, Wang Y, Luo H, Liu L, Wei G, Chen X, Sun Y, Chen X, Skogerbø G, Chen R. A differential sequencing-based analysis of the *C. elegans* noncoding transcriptome. *RNA*. 2012 Apr;18(4):626-639. doi: 10.1261/rna.030965.111. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22345127; PMCID: PMC3312551.
41. Zemann A, op de Bekke A, Kiefmann M, Brosius J, Schmitz J. Evolution of small nucleolar RNAs in nematodes. *Nucleic Acids Res*. 2006 May 19;34(9):2676-2685. doi: 10.1093/nar/gkl359. PMID: 16714446; PMCID: PMC1464110.
42. Aftab MN, He H, Skogerbø G, Chen R. Microarray analysis of ncRNA expression patterns in *Caenorhabditis elegans* after RNAi against snoRNA associated proteins. *BMC Genomics*. 2008 Jun 11;9:278. doi: 10.1186/1471-2164-9-278. PMID: 18547420; PMCID: PMC2442092.
43. 千葉 剛大. 修士論文, 線虫Y RNAホモログの発現解析及びROP-1タンパク質との結合実験系の構築. 弘前大学大学院農学生命科学研究科. 2018
44. Labbé JC, Hekimi S, Rokeach LA. The levels of the RoRNP-associated Y RNA are dependent upon the presence of ROP-1, the *Caenorhabditis elegans* Ro60 protein. *Genetics*. 1999 Jan;151(1):143-150. PMID: 9872955; PMCID: PMC1460465.
45. Wolin SL, Belair C, Boccitto M, Chen X, Sim S, Taylor DW, Wang HW. Non-coding Y RNAs as tethers and gates: Insights from bacteria. *RNA Biol*. 2013 Oct;10(10):1602-1608. doi: 10.4161/rna.26166. Epub 2013 Aug 22. PMID: 24036917; PMCID: PMC3866240.
46. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41(1):207-234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016. PMID: 15915565.
47. Yamagami T, Ishino S, Kawarabayasi Y, Ishino Y. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Front Microbiol*. 2014 Sep 3;5:461. doi: 10.3389/fmicb.2014.00461. PMID: 25232352; PMCID: PMC4153296.

48. Chen YR, Zheng Y, Liu B, Zhong S, Giovannoni J, Fei Z. A cost-effective method for Illumina small RNA-Seq library preparation using T4 RNA ligase 1 adenylated adapters. *Plant Methods*. 2012 Sep 20;8(1):41. doi: 10.1186/1746-4811-8-41. PMID: 22995534; PMCID: PMC3462708.
49. Nakayama H, Shimamoto N. Modern and simple construction of plasmid: saving time and cost. *J Microbiol*. 2014 Nov;52(11):891-897. doi: 10.1007/s12275-014-4501-6. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25359266.
50. Singh R, Reddy R. Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8280-8283. doi: 10.1073/pnas.86.21.8280. PMID: 2813391; PMCID: PMC298264.
51. Jarmoskaite I, AlSadhan I, Vaidyanathan PP, Herschlag D. How to measure and evaluate binding affinities. *Elife*. 2020 Aug 6;9:e57264. doi: 10.7554/eLife.57264. PMID: 32758356; PMCID: PMC7452723.
52. Draper DE. A guide to ions and RNA structure. *RNA*. 2004 Mar;10(3):335-343. doi: 10.1261/rna.5205404. PMID: 14970378; PMCID: PMC1370927.
53. Li T, He H, Wang Y, Zheng H, Skogerbø G, Chen R. *In vivo* analysis of *Caenorhabditis elegans* noncoding RNA promoter motifs. *BMC Mol Biol*. 2008 Aug 5;9:71. doi: 10.1186/1471-2199-9-71. PMID: 18680611; PMCID: PMC2527325.
54. Zecherle GN, Whelen S, Hall BD. Purines are required at the 5' ends of newly initiated RNAs for optimal RNA polymerase III gene expression. *Mol Cell Biol*. 1996 Oct;16(10):5801-5810. doi: 10.1128/mcb.16.10.5801. PMID: 8816494; PMCID: PMC231581.
55. Gao Z, Harwig A, Berkhout B, Herrera-Carrillo E. Mutation of nucleotides around the +1 position of type 3 polymerase III promoters: The effect on transcriptional activity and start site usage. *Transcription*. 2017;8(5):275-287. doi: 10.1080/21541264.2017.1322170. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28598252; PMCID: PMC5703244.
56. Yoon JB, Murphy S, Bai L, Wang Z, Roeder RG. Proximal sequence element-binding transcription factor (PTF) is a multisubunit complex required for transcription of both

RNA polymerase II- and RNA polymerase III-dependent small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol.* 1995 Apr;15(4):2019-2027. doi: 10.1128/MCB.15.4.2019. PMID: 7891697; PMCID: PMC230429.

57. Zhao X, Pendergrast PS, Hernandez N. A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. *Mol Cell.* 2001 Mar; 7(3):539-549. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00201-5. PMID: 11463379.

58. Dieci G, Fiorino G, Castelnovo M, Teichmann M, Pagano A. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet.* 2007 Dec;23(12):614-622. doi: 10.1016/j.tig.2007.09.001. Epub 2007 Oct 30. PMID: 17977614.

59. Campbell FE Jr, Setzer DR. Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition. *Mol Cell Biol.* 1992 May;12(5):2260-2272. doi: 10.1128/mcb.12.5.2260. PMID: 1314952; PMCID: PMC364398.

60. Moore RS, Kaletsky R, Murphy CT. Piwi/PRG-1 Argonaute and TGF- β Mediate Transgenerational Learned Pathogenic Avoidance. *Cell.* 2019 Jun 13;177(7):1827-1841.e12. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.024. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31178117; PMCID: PMC7518193.

61. Chiba T, Kihara SY, Sato M, Xingkui K, Goto S, Suzumura T, Kawai G, Himeno H, Ushida C. Identification of a short form of a *Caenorhabditis elegans* Y RNA homolog Cel7 RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 11;557:104-109. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.03.143. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33862452.

本学位論文の一部を構成し、学位申請時の主論文

7. 謝辞

主指導教員の弘前大学 牛田千里教授からは、多大なご指導を賜りました。深く感謝いたします。また、副指導教員の弘前大学 姫野俵太教授、岩手大学 山下哲郎教授、並びに山形大学 豊増知伸教授からは、多くのご助言をいただきました。深く感謝いたします。同様に、弘前大学 栗田大輔准教授、武藤あきら先生、後藤史門さんからも、多くのご助言をいただきました。深く感謝いたします。千葉工業大学 河合剛太教授からは、次世代シーケンサーを用いたデータ取得の機会と解析方法に関するご助言をいただきました。深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、関わった皆様、ありがとうございました。

8. 図表

表1. オリゴDNAリスト (N2、MQ470、RB2032の判別)

配列名	配列 (5' - 3')
MQ470-F	CCTTGAGCATAGACAGCACG
MQ470-R	TTGAAGCTTCCGTACACCGAG
RB2032-F	AGAGATGGGTTGGTGTACGG
RB2032-R	TGCTCCTTTGATCAATATTGTGATCG

表2. 線虫 N2におけるL1-L4幼虫、成虫の培養時間

stage	経過時間
受精卵	---
L1幼虫	17時間26分
脱皮 (1回目)	23時間34分
L2幼虫	27時間42分
脱皮 (2回目)	31時間46分
L3幼虫	36時間27分
脱皮 (3回目)	41時間15分
L4幼虫	47時間24分
脱皮 (4回目)	53時間17分
成虫	65時間5分

同調させた線虫を各時間ごとにDAPI染色することで
発達段階を判断した。

回収する際には、経過時間 \pm 1時間で回収した。

表3. オリゴDNAリスト (ノーザンハイブリダイゼーション)

配列名	配列 (5' -> 3')
CeY-oligo	TGAGGTTGGAACCGAGGTTCTAAAGAAAACACACACACACACAC
CeN71-oligo	GTTAGTTCGTATGGGGTGGTTGAGAATT
CeN72-oligo	TAGAGGACGGTGAATGTGATCAGCGACGACAAGCACCCACAGGAT
CeN73-oligo	CGGGTTTGGCATCACAAGGACACCGGGC
CeN74-1-oligo	AAATCCCCGAAGGGAGAGAAATACGATAA
CeN74-2-oligo	AAATCCCCGAAGGGAGGCAAACCTTGATAA
CeN75-oligo	ATGGGGGGGCTTCTCAGATAACCCAC
CeN76-oligo	GGGAGGGGGGGTTTCAAAGGTAACCC
CeN76-oligo EMSA	GTTGGTGCCGATGGGAGGGGGGGTTTCAAAGGTAACCCACCGAC
CeN77-oligo	ATGGGGGGTTTTGAAAGATAACCCAT
CeN77-oligo EMSA	GTTGTTGTCAATGGGGGGTTTTGAAAGATAACCCATTGAC
CeN133-oligo	GGGTAGTTCTTTAAAAGAACAGAGAGAATTCAAT
CeN134-oligo	GCATTATTAACCACTGTGAAGCATTGTGAAGAGCATTGAATCGAGA
CeN135-oligo	TGGGGTGGTTTTCTTCAGATAACCCA
Cel1-oligo	AAGGGATGTCTATGGGGGGATTCAAATGACAATTTTGGTAA
Cel2-oligo	GAGGTGTCTGTGGGAGATGGATTCAAGAAATTGGATAACCC
Cel3-oligo	ATGAAGAACACGGAGAGATTAACATGAGCGGTACCAAACC
Cel5-oligo	GCATTATGAACCATTGTTAAGCATTGTGAAGAAGCATTGAATCGAGA
Cel6-oligo	AATCCCCGAAGGGAGGCAAACCTTGATAA
Cel7-oligo	AATGGGAAGTTCCCTGAAGTGGGAATAGGAATGATAACCT
Cel7-oligo-25nt	GGACCGATATATAATATTTTTGAAC
Cel7-oligo-40nt	TAACCTATTGGCGCCGGACCGATATATAATATTTTTGAAC
U6-oligo	CAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGTATTGTTCCAATTTTAGTATA

表4. オリゴDNAリスト (プライマーエクステンション)

配列名	配列 (5' -> 3')
CeN76-oligo2	AGGGGGGGTTTCAAAGGTAA
CeN133-oligo2	AAAAGAACAGAGAGAATTCAAT
Cel2-oligo2	AGATGGATTCAAGAAATTGGATAA
Cel3-oligo2	ATGAAGAACACGGAGAGATT
Cel7-oligo2	TGAAGTGGGAATAGGAATG

表5. オリゴDNAリスト (RACE)

配列名	配列 (5' -> 3')
3'アダプター (RA3)	TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
5'アダプター (RA5)	GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC
RT-primer	GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
RA5+PstI	CTGCAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC
RA3+PstI	CTGCAGCCTTGGCACCCGAGAATTCC
CeY-5'	GGATCCGGTTCCTAAAGAAAACACACACACACAC
CeY-3'	GGATCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTCTTTAGGAACC
CeN71-5'	GGATCCGTTAGTTCGTATGGGGTGGTTGAGAATT
CeN71-3'	GGATCCAATTCTCAACCACCCCATACGAACTAAC
CeN72-5'	GGATCCTAGAGGACGGTGAATGTGATCAGCGAC
CeN72-5'	GGATCCGTCGCTGATCACATTCACCGTCCTC
CeN73-5'	GGATCCCGGGTTTGGCATCACAAGGAC
CeN73-3'	GGATCCGTCCTTGTGATGCCAAACCCG
CeN74-1-5'	GGATCCAAATTCCCCGAAGGGAGAGAAATACGATAA
CeN74-1-3'	GGATCCCTTATCGTATTTCTCTCCCTTCGGGG
CeN74-2-5'	GGATCCAAATTCCCCGAAGGGAGGCAAACCTTGATAA
CeN74-2-3'	GGATCCCTTATCAAGTTTGCCTCCCTTCGGGAATTT
CeN75-5'	GGATCCATGGGGGGCTTCTCAGATAACCCAC
CeN75-3'	GGATCCGTGGGTTATCTGAGAAGCCCCC
CeN76-5'	GGATCCGGGAGGGGGGTTTCAAAGG
CeN76-3'	GGATCCCCTTTGAAACCCCCCTCCC
CeN77-5'	GGATCCATGGGGGGTTTTGAAAGATAACCCAT
CeN77-3'	GGATCCATGGGTTATCTTTCAAACCCCC
CeN133-5'	GGATCCGGGTAGTTCTTTAAAAGAACAGAGAGAATTCAAT
CeN133-3'	GGATCCATTGAATTCTCTCTGTTCTTTTAAAGAACTACCC
CeN134-5'	GGATCCGCATTATTAACCACTGTGAAGCATTGTGAAGAGC
CeN134-3'	GGATCCGCTCTTCACAATGCTTCACAGTGGTTAATAATGC

表5. オリゴDNAリスト (RACE)

配列名	配列 (5' -> 3')
CeN135-5'	GGATCCTGGGGTGGTTTCTTCAGATAACCCA
CeN135-3'	GGATCCTGGGTTATCTGAAGAAACCACCCC
Cel1-5'	GGATCCTGGGGGGATTCAAATGACAATTTTGGTAA
Cel1-3'	GGATCCTTACCAAATTGTCATTTGAATCCCCC
Cel2-5'	GGATCCGTCTGTGGGAGATGGATTCAAGAAATTGG
Cel2-3'	GGATCCCCAATTTCTTGAATCCATCTCCCACAGAC
Cel3-5'	GGATCCAGAGATTAACATGAGCGGTACCAAACC
Cel3-3'	GGATCCGGTTTGGTACCGCTCATGTTAATCTC
Cel7-5'	GGATCCAGTTCCCTGAAGTGGGAATAGGAATG
Cel7-3'	GGATCCCATTCTATTCCCACTTCAGGGAAC
pUC-vec-F	TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCC
pUC-vec-R	CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG

表6. オリゴDNAリスト (RNA-seq)

配列名	配列 (5' -> 3')
Index-primer N2(Thermopol)	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>CGATGTATCT</u> CGTATGCCGTCTTCTGCTTG
Index-primer MQ470(Thermopol)	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA <u>CTTAGGCATCT</u> CGTATGCCGTCTTCTGCTTG
Index-primer RB2032(thermopol)	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>ATCACGATCT</u> CGTATGCCGTCTTCTGCTTG
Index-primer N2(NEB2)	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>ACTTGAATCT</u> CGTATGCCGTCTTCTGCTTG
Index-primer MQ470(NEB2)	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA <u>CTAGCTTATCT</u> CGTATGCCGTCTTCTGCTTG
Index-primer RB2032(NEB2)	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC <u>GATCAGATCT</u> CGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Index-primerに含まれる6ヌクレオチドの識別配列は下線で示した。

表7. オリゴDNAリスト (CeY RNAおよびsbRNAクローンの作製)

配列名	配列 (5' -> 3')
CeYp-F	TCACTATAGGGCTCGGTCCGAGTTTCATG
CeYp-R	GACCGAGCCCTATAGTGAGTCGTAT
CeN71-vec-F	CTAACTTGACTACCGGAACTATAGTGTCACC
CeN71-vec-R	CTATAGTGAGTCGTATTAGGATCCCCGGGTACC
CeN71-ins-F	AAAGGATCCTAATACGACTCACTATA
CeN71-ins-R	TTCCGGTAGTCAAGTTAGTTC
CeN72-vec-F	ACAAATTTGACCGATGTTCTATAGTGTCACC
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN72-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTATCATCGGTCCGG
CeN72-ins-R	AACATCGGTCAAATTTGTG
CeN73-1-vec-F	ACCAACTTGACCGTTGTTCTATAGTG
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN73-1-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTACATCGGTCCGGAG
CeN73-1-ins-R	AACAACGGTCAAGTTGGT
CeN73-2-vec-F	CTATAGTGTCACCTAAATCTGCAGGCATGC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN73-2-ins-F	TTCTAATACGACTCACTATAGGGACATCGGTCCGGAGTTGATGG
CeN73-2-ins-R	AGATTTAGGTGACACTATAGAACAACGGTCAAGTTGGTGTGCG
CeN74-1-vec-F	TCAACTTGACCGTTGCGT
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN74-1-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATAGTCTCGGTCCGG
CeN74-1-ins-R	ACGCAACGGTCAAGTTG
CeN74-2-1st-F	CGACTCACTATAGTATCGGTCCGGCGTCAG
CeN74-2-1st-R	AGGTGACACTATAGAGCAACGGTCAAGTTGGTGC
CeN74-2-2nd-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATA
CeN74-2-2nd-R	AAACTGCAGATTTAGGTGACACTATA

表7. オリゴDNAリスト (CeY RNAおよびsbRNAクローンの作製)

配列名	配列 (5' -> 3')
CeN75-vec-F	CTATAGTGTCACCTAAATCTGCAGGCATGC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN75-ins-F	TTCTAATACGACTCACTATAGGGAATACGGTCCGGAGTCCGGTG
CeN75-ins-R	AGATTTAGGTGACACTATAGTTTAAAACTAAAATTTTCATCGGTCA AGTTGGTG
CeN76-vec-F	ACTTGACCGTTCCTGTTTCTATAGTGTCACC
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN76-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTAGACAGGCGTGGTC
CeN76-ins-R	AAACAGGAACGGTCAAGT
CeN77-vec-F	CAACAACCTTGACCGGCGCTATAGTGTCACC
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN77-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTAATTCGGTCCGGAG
CeN77-ins-R	CGCCGGTCAAGTTGTTG
CeN133-vec-F	CAACTTGATCGAAAAACATTTTATAGTGTCACC
CeN133-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGGATCCCCGGGTACC
CeN133-ins-F	ATCCTAATACGACTCACTATTATCGGTCCGAAG
CeN133-ins-R	AAATGTTTTTCGATCAAGTTGATG
CeN134-vec-F	CAACAACCTTGACCGAATT
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN134-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTAGTTCGGTCCG
CeN134-ins-R	AATTCGGTCAAGTTGTTGTT
CeN135-vec-F	CAACAACCTTGACTTCCTGCTATAGTGTCACC
CeN135-vec-R	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
CeN135-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATAGCATAGGTCCGGAG
CeN135-ins-R	CAGGAAGTCAAGTTGTTGCC

表7. オリゴDNAリスト (CeY RNAおよびsbRNAクローンの作製)

配列名	配列 (5' -> 3')
Cel1-vec-F	CATCCCTTGACCGGGGGTTATAGTGTCACC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
Cel1-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATAGACCACCGGTCCGGAG
Cel1-ins-R	ACCCCCGGTCAAGGGATG
Cel2-vec-F	CTTGACCGGGAAGGTTTTTATAGTGTCACC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
Cel2-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATAGGCCGTCCGGG
Cel2-ins-R	AAAACCTTCCCGGTCAAGG
Cel3-vec-F	ACCAACTTGACCGTTGTTTATAGTGTCACC
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
Cel3-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTACTTCGGTCCGGAGATTATG
Cel3-ins-R	AACAACGGTCAAGTTGGTG
Cel5-vec-F	CTATAGTGTCACCTAAATCTGCAGGCATGC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
Cel5-ins-F	TTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCGGTTCGGAGTTGATGAG T
Cel5-ins-R	AGATTTAGGTGACACTATAGAAAAAAATTCGGTCAAGTTGTTGTT GATGG
Cel6-vec-F	CTATAGTGTCACCTAAATCTGCAGGCATGC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
Cel6-ins-F	TTCTAATACGACTCACTATAGGGTATCGGTCCGGCGTCAG
Cel6-ins-R	AGATTTAGGTGACACTATAGTGTAAGTGTCAAGTTGATGCCGATG
Cel7/Cel7s-vec-F	CACCAACTTGACTGATATTTTTATAGTGTCACC
Common-vec-R2	CTATAGTGAGTCGTATTAGAATTCAGTGGCCGTCG
Cel7-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATAGTTCAAAAATATTATATATCGGTCC GGCGC
Cel7/Cel7s-ins-R	AAAATATCAGTCAAGTTGGTGCC

表7. オリゴDNAリスト (CeY RNAおよびsbRNAクローンの作製)

配列名	配列 (5' -> 3')
Cel7/Cel7s-vec-F	CACCAACTTGACTGATATTTTTATAGTGTCACC
Common-vec-R	TAATAGTGAGTCGTATTAGAATTCACTGGCCGTCG
Cel7s-ins-F	GAATTCTAATACGACTCACTATTATATCGGTCCGGCGC
Cel7/Cel7s-ins-R	AAAATATCAGTCAAGTTGGTGCC

表8. オリゴDNAリスト (in vitro転写)

配列名	配列 (5' -> 3')
pUC-vec-F	TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCC
CeY-R	GAGCGGTCAAAGTAGTTTC
CeN75-R	TTTAAAACTAAAATTTTCATCGG
CeN75 _s -R	CATCGGTCAAGTTGGTGT
CeN76-ins-R	AAACAGGAACGGTCAAGT
CeN135-ins-R	CAGGAAGTCAAGTTGTTGCC
Cel1-ins-R	ACCCCGGTCAAGGGATG
Cel2-ins-R	AAAAACCTTCCCGGTCAAGG
Cel2-del-ins-R	AAAAACCTTCCCGTCAAGGAGGTGTCTGTG
Cel5-R	AAAAAAAATTCGGTCAAGTTGTTGTTGATGG
Cel6-R	TGTAAGTGTCAAGTTGATGCCGATG

- CeY、CeN75、CeN76、CeN135、Cel1、Cel2、Cel5、Cel6を増幅する際は、T7プロモーター上流に設定した共通Forward Primerを用いた。

表8. オリゴDNAリスト (in vitro転写)

配列名	配列 (5' -> 3')
truncatedCeY-F	TAATACGACTCACTATAGGGGTTTCATGGTCTCCAATGTG
CeY-R	GAGCGGTCAAAGTAGTTTC
CeN71-F	AAAGGATCCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> AATTCCTGCGG
CeN71-ins-R	TTCCGGTAGTCAAGTTAGTTTC
CeN72-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> GATCATCGGTCCGG
CeN72-ins-R	AACATCGGTCAAATTTGTG
CeN73-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> GACATCGGTCCGGAG
CeN73-1-ins-R	AACAACGGTCAAGTTGGT
CeN74-1-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> TCTCGGTCCGG
CeN74-1-ins-R	ACGCAACGGTCAAGTTG
CeN74-2-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> TATCGGTCCGGCGTCAG
CeN74-2-R	AGCAACGGTCAAGTTGGTGC
CeN77-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> AATTCGGTCCGGAG
CeN77-ins-R	CGCCGGTCAAGTTGTTG
CeN133-F	AAAGGATCCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> GATCGGTCCGAAG
CeN133-ins-R	AAATGTTTTTCGATCAAGTTGATG
CeN134-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> GAGTTCGGTCCG
CeN134-ins-R	AATTCGGTCAAGTTGTTGTT
Cel3-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> ACTTTCGGTCCGGAGATTATG
Cel3-ins-R	AACAACGGTCAAGTTGGTGC
Cel7-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> TTCAAAAATATTATATATCGG
Cel7s-F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAG <u>GG</u> GATATCGGTCCGGCGC
Cel7/Cel7s-ins-R	AAAATATCAGTCAAGTTGGTGCC

- RNAの転写効率を上げるために付け加えたグアノシン残基を下線で示した。
- CeN73-1とCeN73-2を増幅するプライマーは同じものを用いた。
- Cel7とCel7sを増幅する際、Reverse Primerは同じものを用いた (Cel7/Cel7s-R)。

表9. 5'&3'-RACEにおいて得られたクローン数

	5'-RACE			3'-RACE		
	全RNA	受精卵	成虫	全RNA	受精卵	成虫
CeY	6	2	1	4	5	2
CeN71	2	—	—	2	—	—
CeN72	0	5	—	2	0	—
CeN73-1	1	1	—	2	—	—
CeN74-1	2	—	—	3	—	—
CeN74-2	4	2	—	2	—	—
CeN75	3	—	—	1	—	—
CeN76	2	—	—	5	—	—
CeN77	2	—	—	2	—	—
CeN133	2	—	—	4	—	—
CeN134	3	—	—	4	—	—
CeN135	5	—	—	4	—	—
Cel1	—	7	—	—	6	—
Cel2	—	6	—	—	4	—
Cel3	—	1	—	5	—	—
Cel7	9	—	0	0	3	3

RACEにおいて得られたクローン数を示した。RACEを行なったがクローンが得られなかったものは組み合わせは0、RACEを行なっていない組み合わせについては—で示した。

表10. 線虫 Y RNAホモログのリード数 (Thermopol Buffer使用)

	N2 (リード)	MQ470 (リード)	RB2032 (リード)
CeY	62	0	0
CeN71	12040	121	199
CeN72	311	3	4
CeN73-1	204	9	2
CeN73-2	5	0	0
CeN74-1	661	8	51
CeN74-2	340	2	11
CeN75	1	0	0
CeN76	656	7	20
CeN77	67	0	0
CeN133	20	2	0
CeN134	5	0	1
CeN135	2349	6	56
Cel1	1131	9	22
Cel2	0	2	0
Cel3	427	12	27
Cel5	0	0	0
Cel6	1633	10	38
Cel7	45	60	4

表11. 線虫 Y RNAホモログのリード数 (NEBuffer 2使用)

	N2 (リード)	MQ470 (リード)	RB2032 (リード)
CeY	50	0	1
CeN71	2509	3	5
CeN72	247	3	4
CeN73-1	113	4	7
CeN73-2	6	0	0
CeN74-1	470	25	5
CeN74-2	376	3	4
CeN75	2	0	0
CeN76	787	51	0
CeN77	117	0	1
CeN133	55	0	0
CeN134	5	1	2
CeN135	2198	1	0
Cel1	81	3	0
Cel2	0	1	1
Cel3	238	9	17
Cel5	0	0	0
Cel6	812	1	2
Cel7	59	93	11

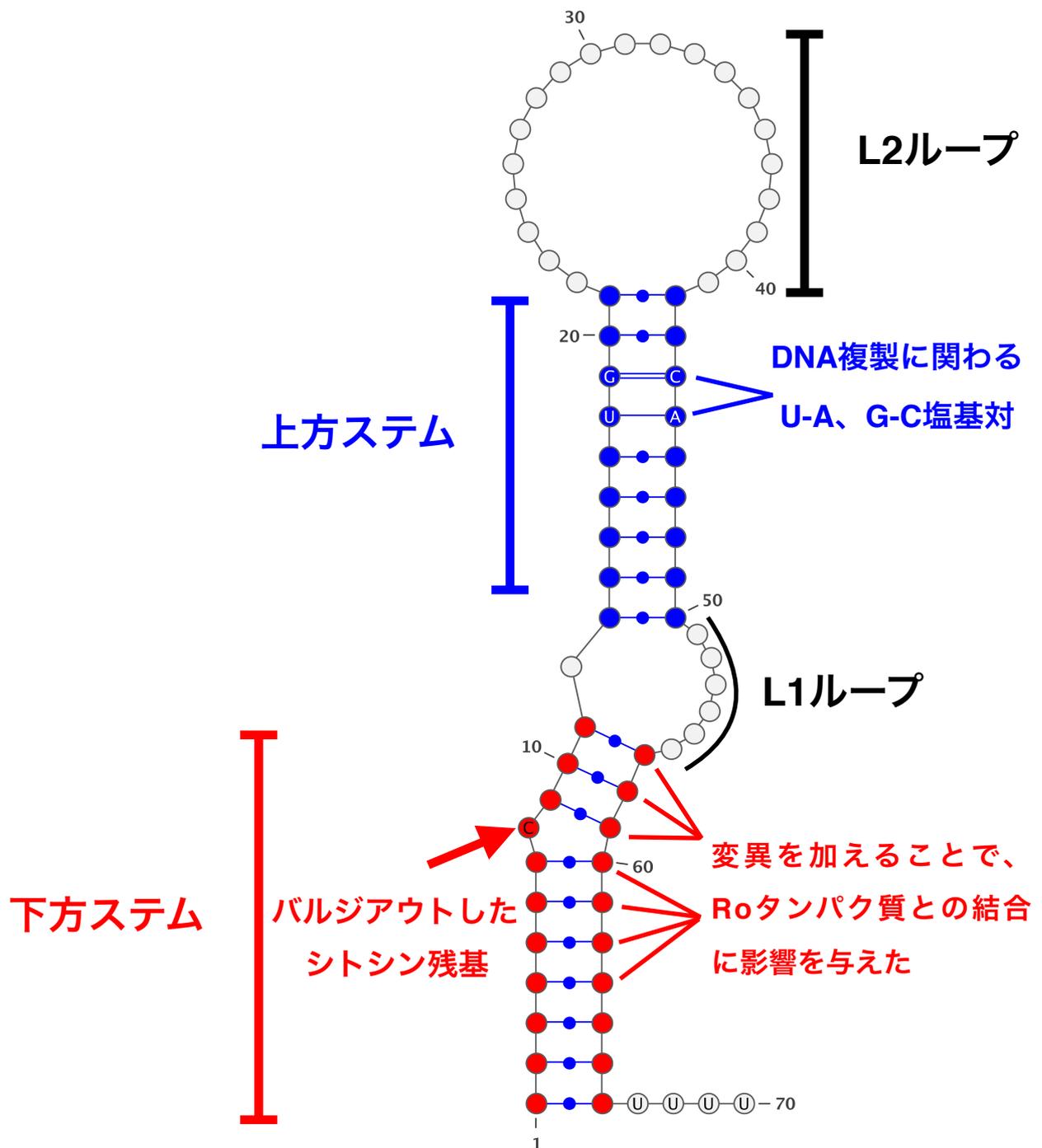


図1. Y RNAの予想される二次構造

Y RNAは、5'末端と3'末端に保存性の高い配列を含み、これらの配列は2つのステム構造(下方ステム:赤と上方ステム:青)を形成する。そして、内部には2つのループ構造(L1とL2)が形成される。ループ構造を構成する残基はステムに比べて保存性が低い。このうち、Roタンパク質との結合に影響するのは、下方ステムとL1ループである [11-14]。

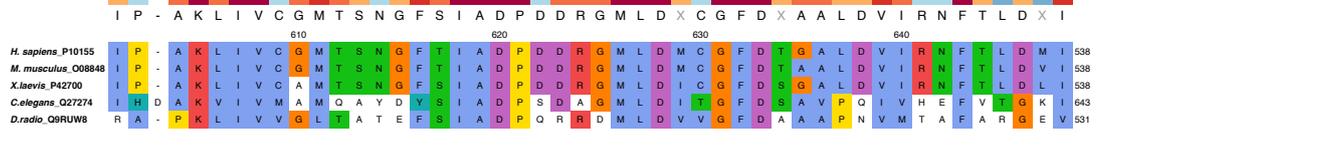
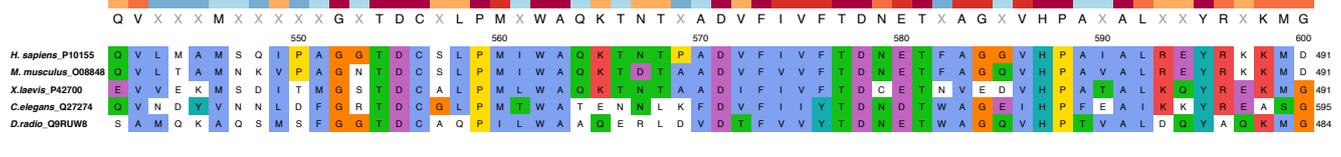
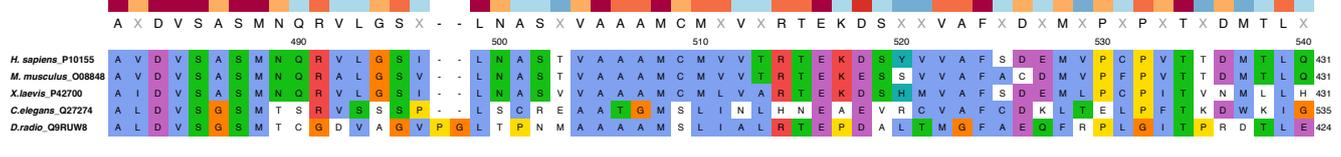
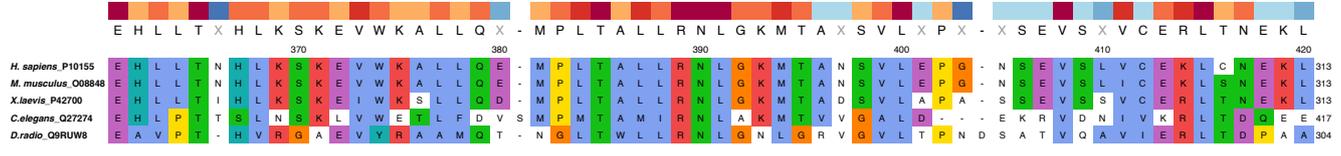
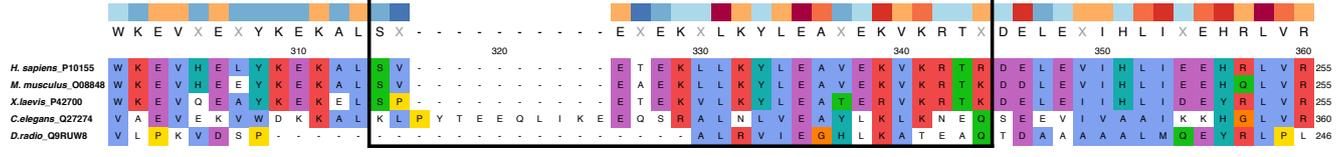
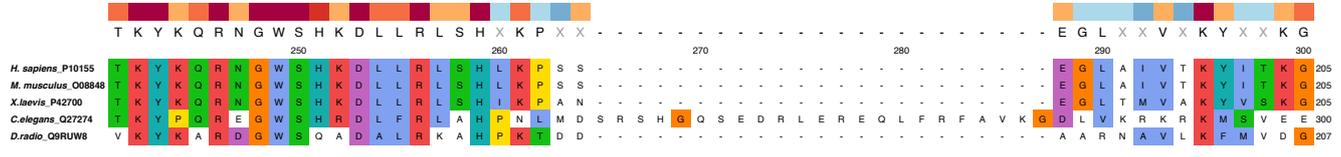
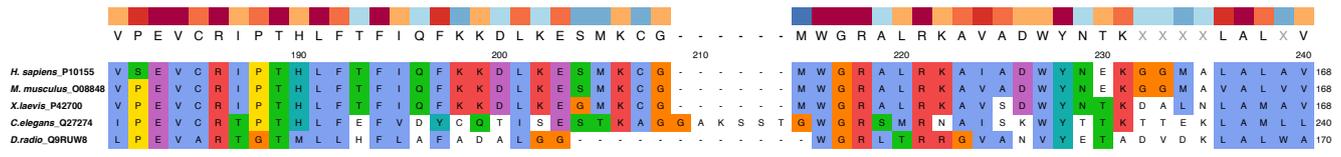
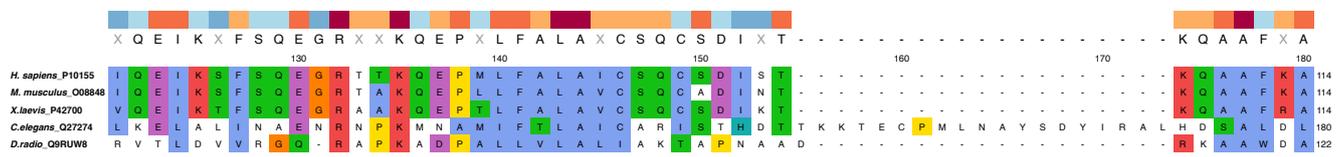
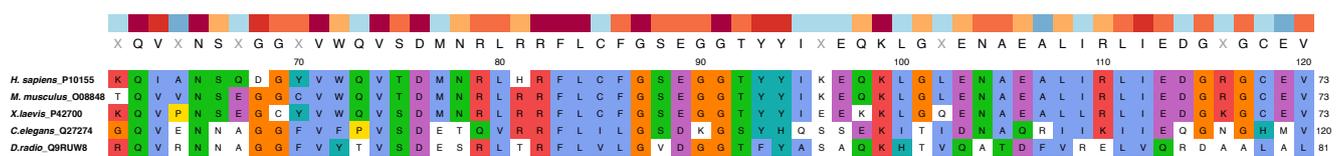
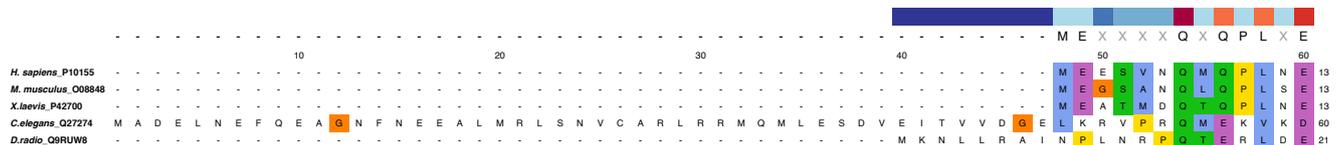
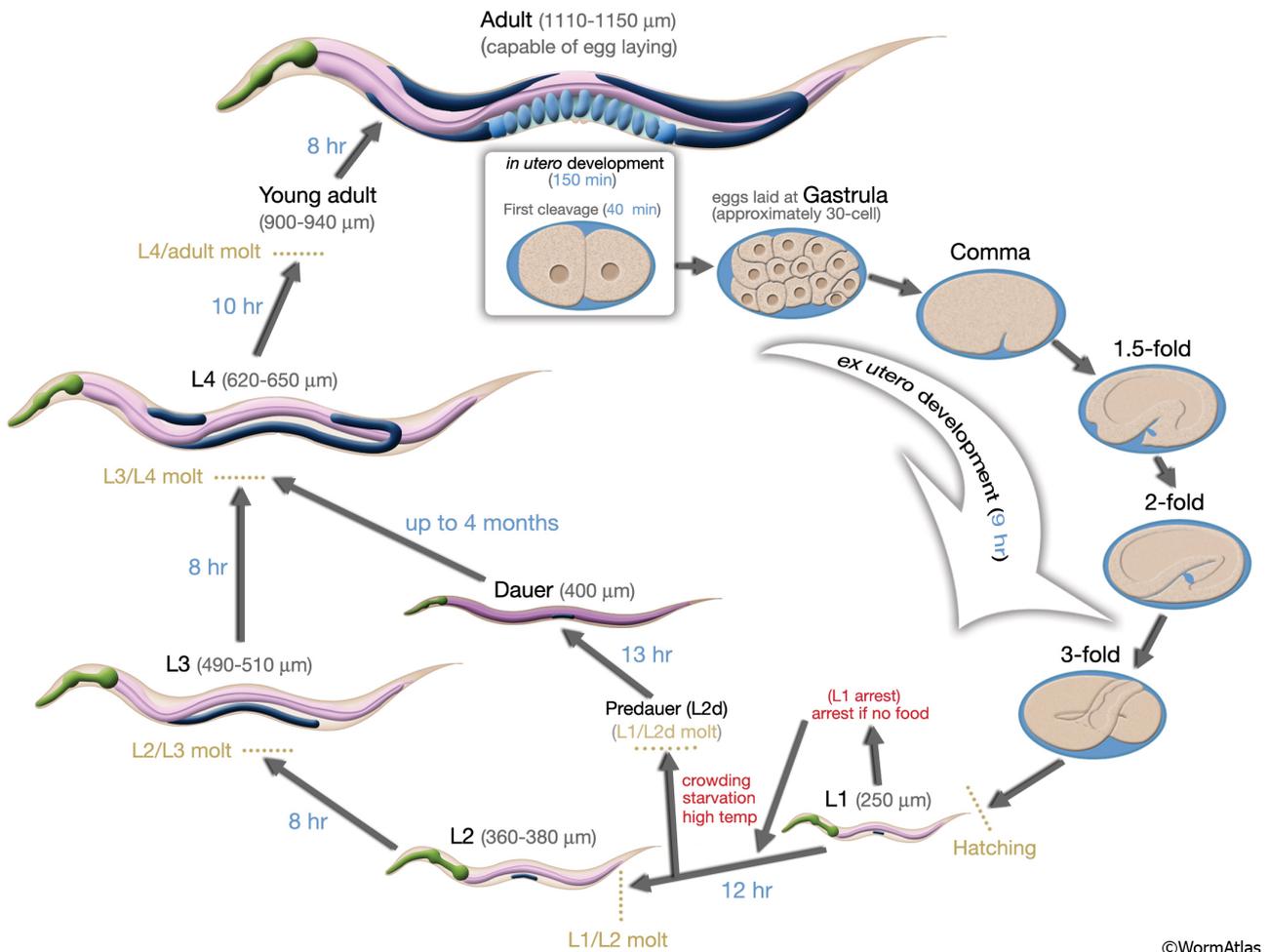


図2. Roタンパク質のアミノ酸配列アライメント

ヒト (*H. sapiens_P10155*)、マウス (*M. musculus_O08848*)、アフリカツメガエル (*X. laevis_P42700*)、線虫 (*C. elegans_Q27274*)、放射線耐性菌 (*D. radio_Q9RUW8*)のRoタンパク質のアミノ酸配列をUniProt Knowledgebase (<https://www.uniprot.org/uniprot/>)から取得し、CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)を用いてアライメントした。A,C,I,L,M,F,W,Vを青、K,Rを赤、E,Dを紫、N,Q,S,Tを緑、Gをオレンジ、Pを黄、H,Yをシアンで示した。ギャップまたは保存性の低いアミノ酸を白で示した。コンセンサス配列をアライメントの上部に示した。保存性の高いアミノ酸は赤 (conservation, High)、低いアミノ酸は青 (conservation, Low)で示した。マウスRoタンパク質の局在に関わるとされるヘリックス12を黒枠で示した [28]。



©WormAtlas

図3. 線虫の生活環

線虫は、受精卵は体外に産卵されてから約17時間後に孵化する (L1幼虫)。孵化後、約12時間毎に脱皮を繰り返して、L2、L3、L4幼虫、成虫に発達する。L1幼虫から成虫に発達する過程で、生殖腺が成熟する。L4幼虫前期に精子形成が終わり、L4後期から卵形成に移行、以降は卵形成のみを行うようになる。[35] (図はwormatlasより引用, <https://www.wormatlas.org>)

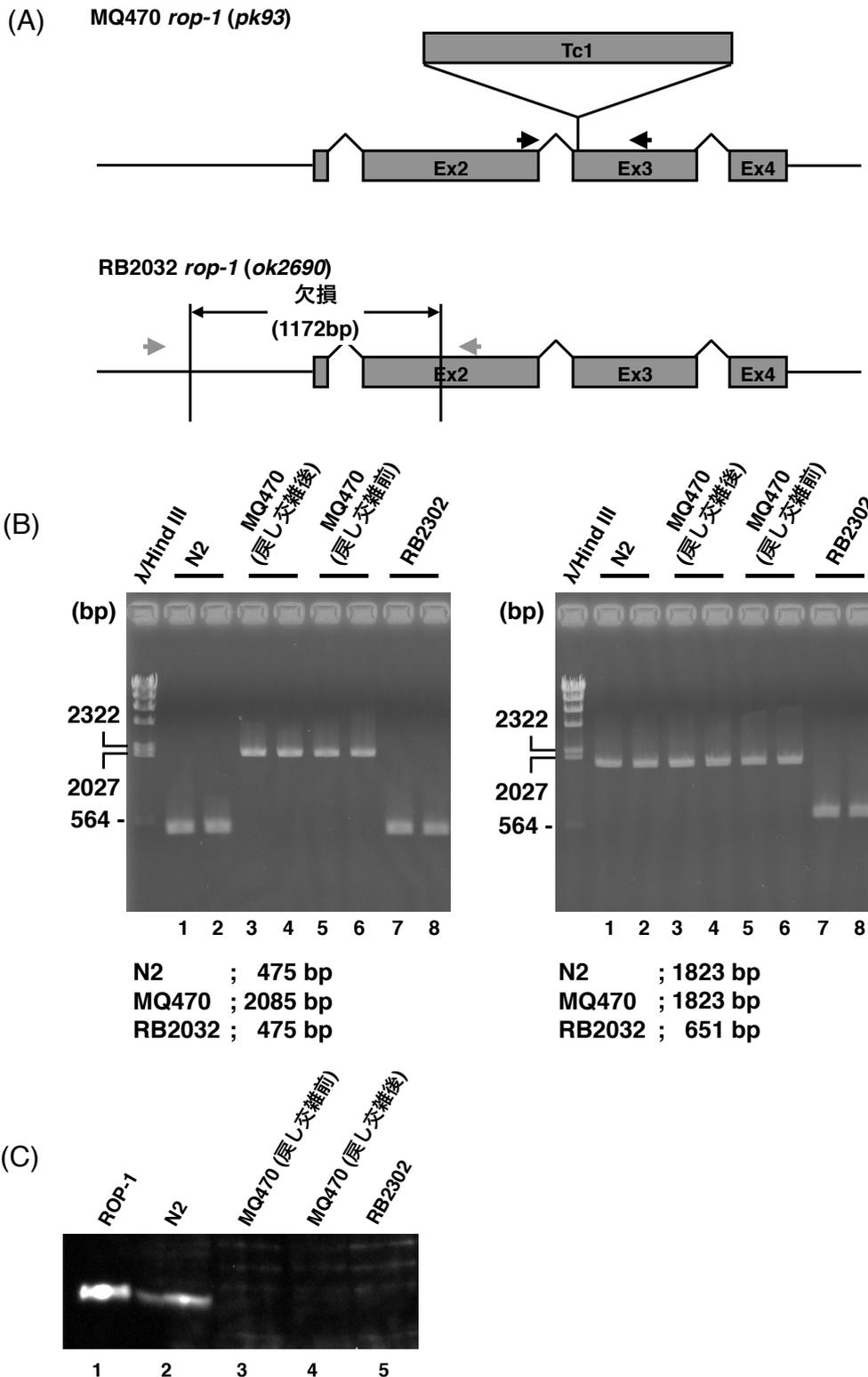


図4. 線虫 *rop-1* 変異株における ROP-1 の有無

(A) MQ470 は *rop-1* の 3 番目のエキソンに Tc1 トランスポゾンが挿入されている。RB2032 は 1 番目のエキソンの全長とその上流、2 番目のエキソンの一部が欠損している。(B) (A) に示した変異の有無は (A) の灰色矢印で示した位置に設定したプライマーを用いた PCR で確認した。(C) ROP-1 に対する血清を用いたウェスタンブロットting。血清の作成に用いた組換え ROP-1 (レーン1) と N2、MQ470 および RB2032 の抽出物 (レーン2-5)。

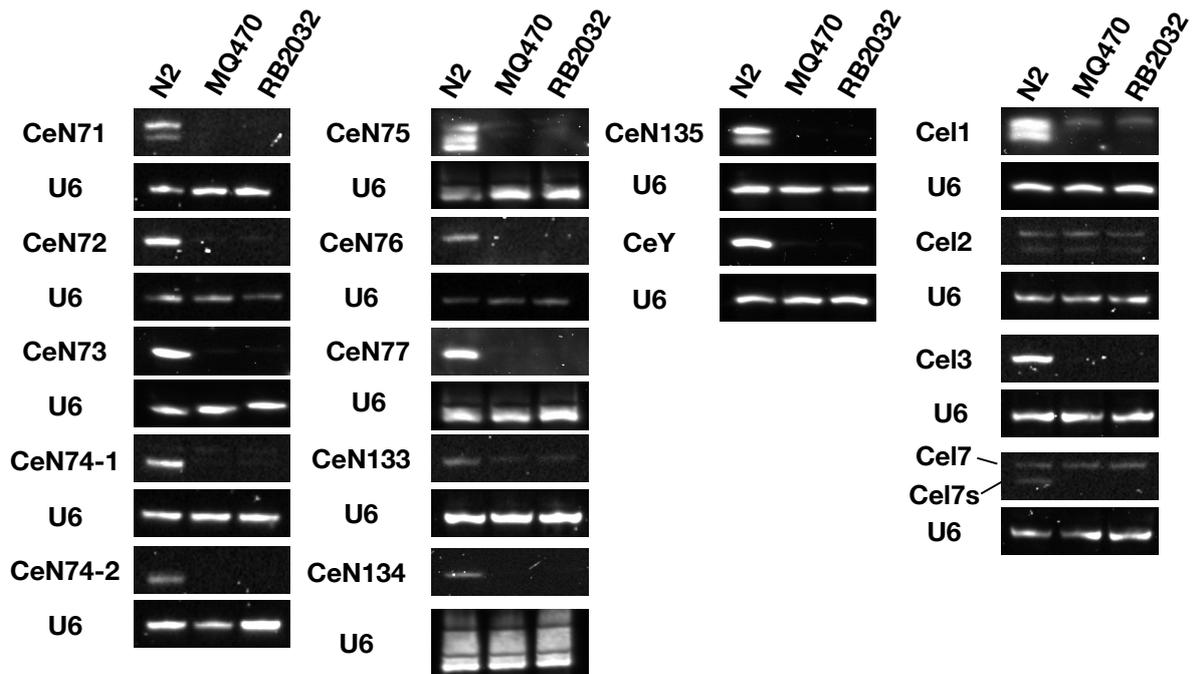


図5. N2、MQ470およびRB2032におけるCeY RNAとsbRNAの存在量

N2、MQ470およびRB2032から抽出した全RNAに含まれるCeY RNAおよびsbRNAの量をノーザンハイブリダイゼーションによって比較した。CeN73-1 RNAのプロープでCeN73-1 RNAと73-2 RNAを、CeN74-1 RNAのプロープでCeN74-1、74-2 RNA、Cel6 RNAを、CeN134 RNAのプロープでCeN134 RNAとCel5 RNAのようにY RNAホモログの間でも相同性の高いものについては1種類のプロープで複数を同時に検出している。目的のRNAの検出に用いた線虫RNA量は、1 μ g: CeN71、CeN72、CeN73、CeN74-1、CeN74-2、CeN76、CeN135、Cel1 RNA、5 μ g: CeN75、CeN77、CeN133、Cel2、Cel3、Cel7 RNA、10 μ g: CeN134 RNA。ローディングコントロールとして、U6 snRNAを検出した [43, 61]。

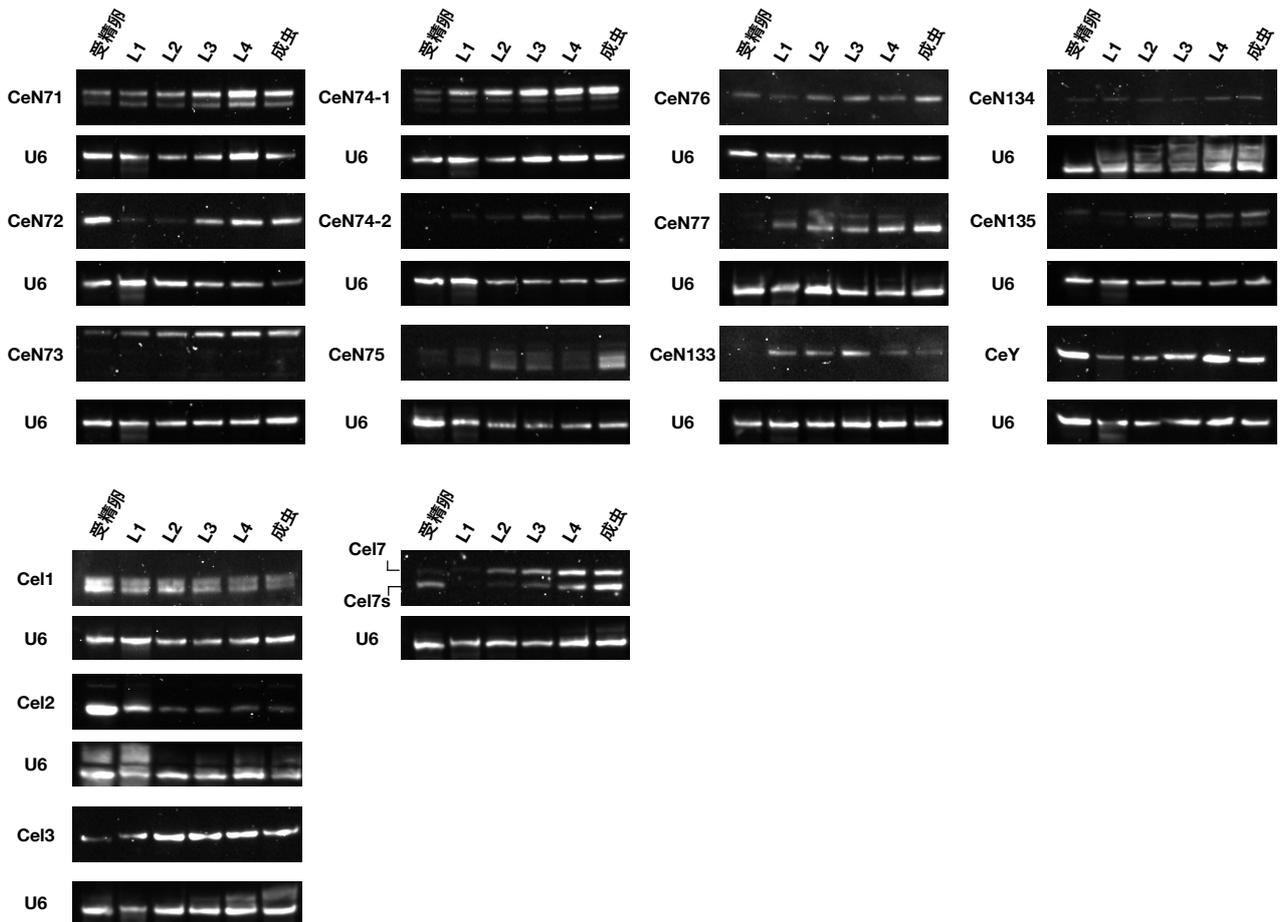


図6. N2の各発達段階におけるCeY RNAとsbRNAの発現パターン

各発達段階 (受精卵、L1-L4幼虫、成虫)のN2に含まれるCeY RNAとsbRNAを検出した。検出に使用したRNA量とオリゴDNAプローブは図5に示したノーザンハイブリダイゼーションと同様 [43, 61]。

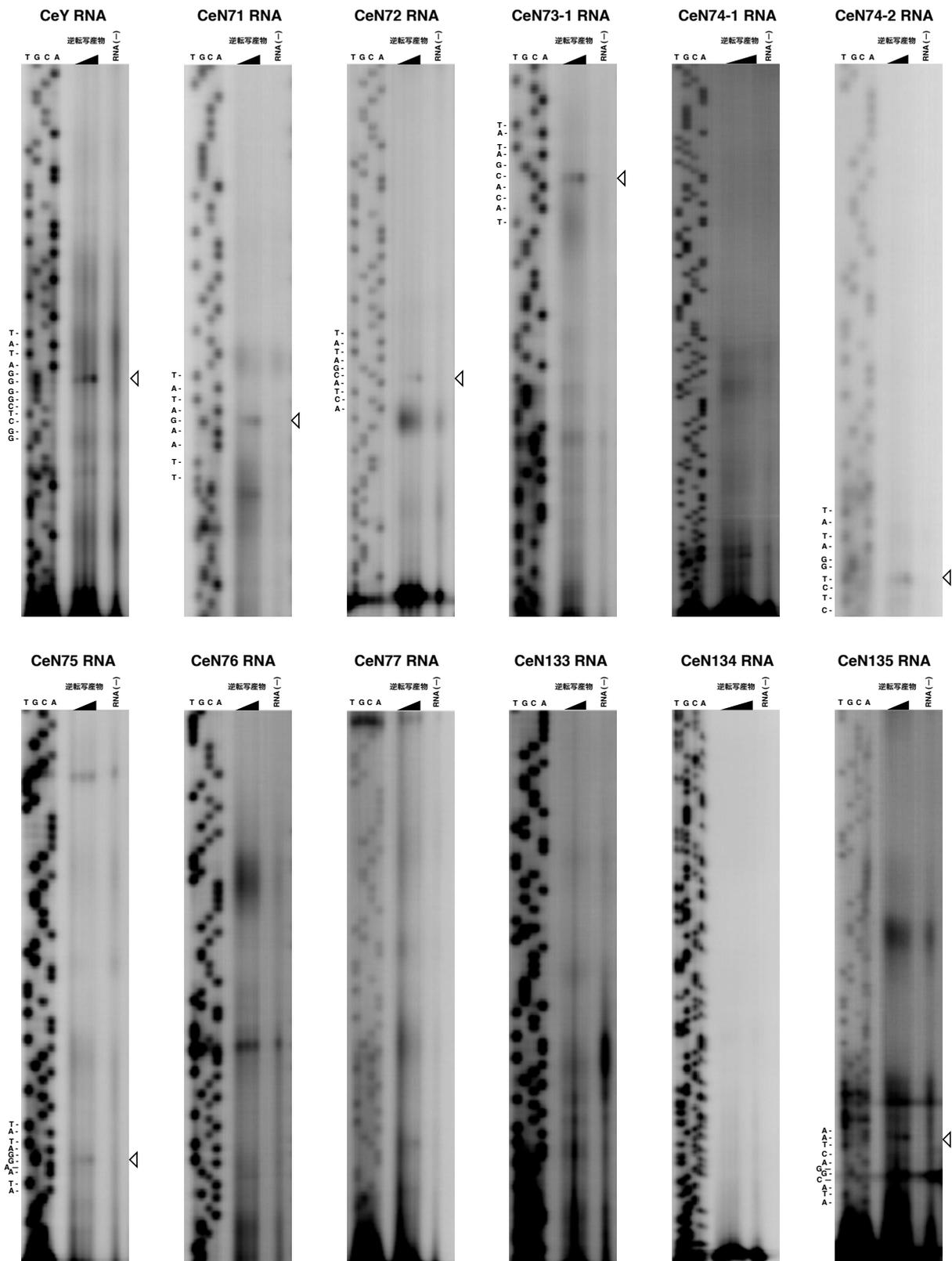


図7. プライマーエクステンションによるCeY RNAおよびsbRNAの5'末端解析
 プライマーエクステンションによってCeY RNAおよびsbRNAの5'末端を解析した。逆転写産物が検出できた位置を白三角で示した。逆転写に用いたRNA量は、1 μ g, 2 μ g, 4 μ g: CeY、CeN71、CeN72、CeN73-1、CeN74-2、CeN76、CeN135 RNA、2.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g: CeN75、CeN77、CeN133 RNA、2.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g: CeN134 RNA。

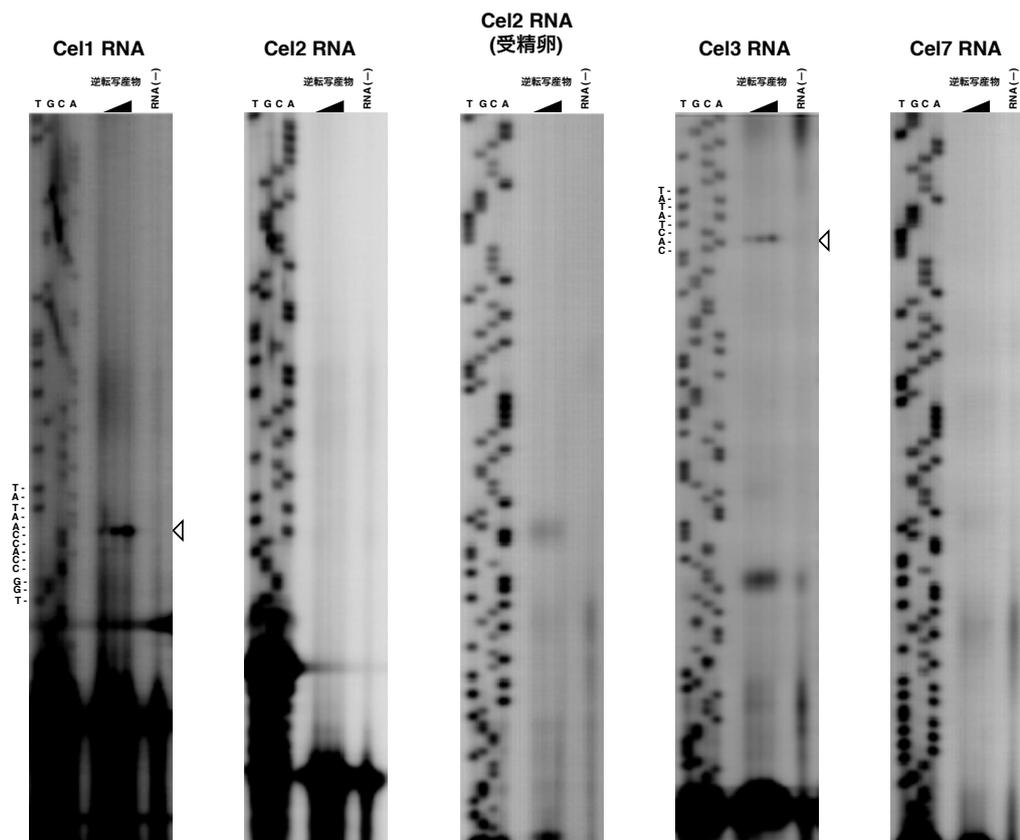


図7. プライマーエクステンションによるCeY RNAおよびsbRNAの5'末端解析 (続き)

プライマーエクステンションによってCeY RNAおよびsbRNAの5'末端を解析した。逆転写産物が検出できた位置を白三角で示した。逆転写に用いたRNA量は、2.5 μ g, 5 μ g, 9 μ g: Cel1、Cel2、Cel2 (受精卵)、Cel3、Cel7 RNA。

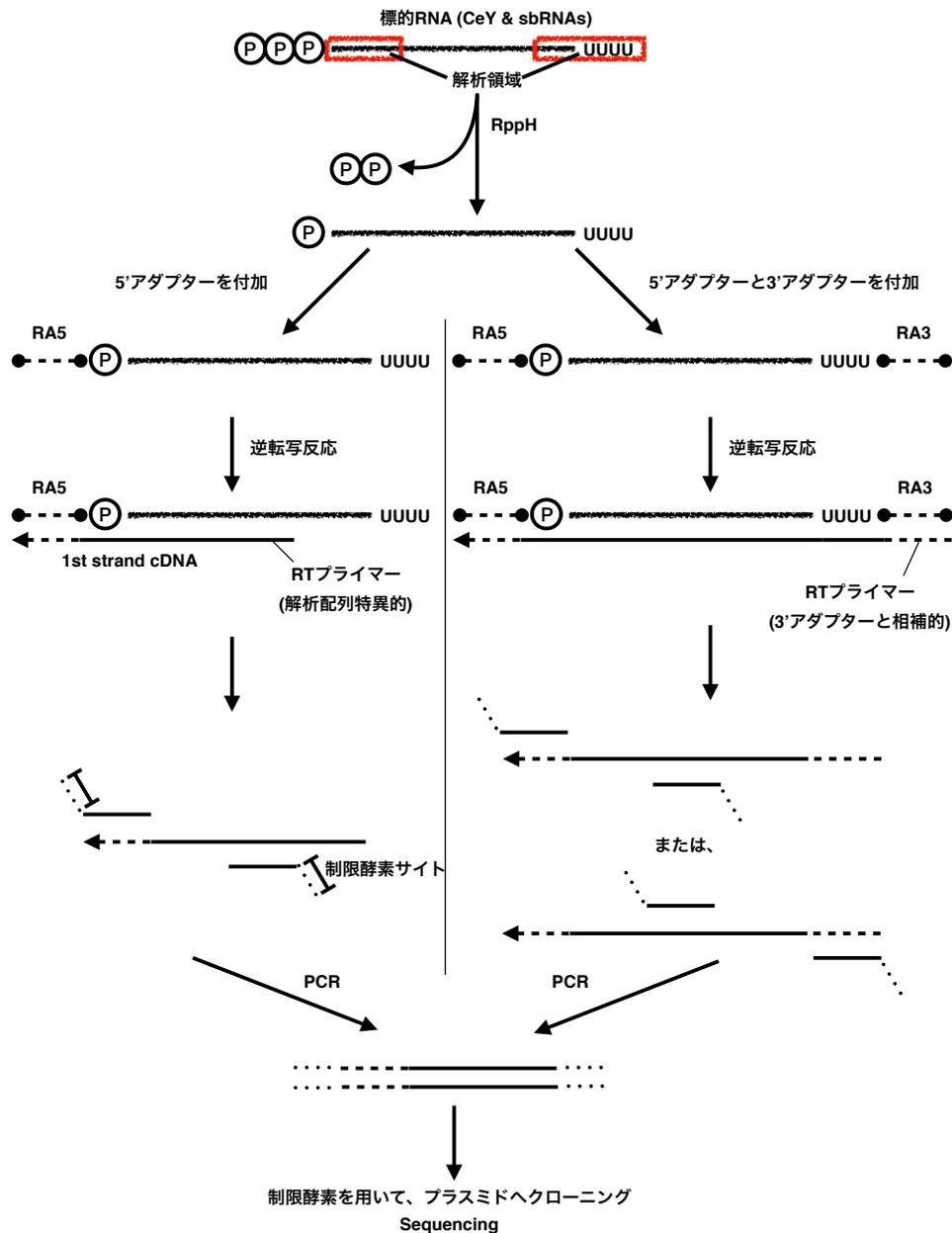


図8. RACEにおけるcDNAライブラリの作製とクローンの取得方法

線虫から抽出したRNAの5'末端のみまたは、5'末端と3'末端の両方に既知配列 (アダプター)を付加した。RNAの5'末端に三リン酸が存在している場合、アダプターが付加できないのであらかじめRppHを用いてRNAの5'末端を一リン酸の形に変換した。逆転写後、目的のRNAの末端領域をPCRで増幅して制限酵素 (PstIとEcoRI、またはBamHI)を用いてプラスミドに導入した。

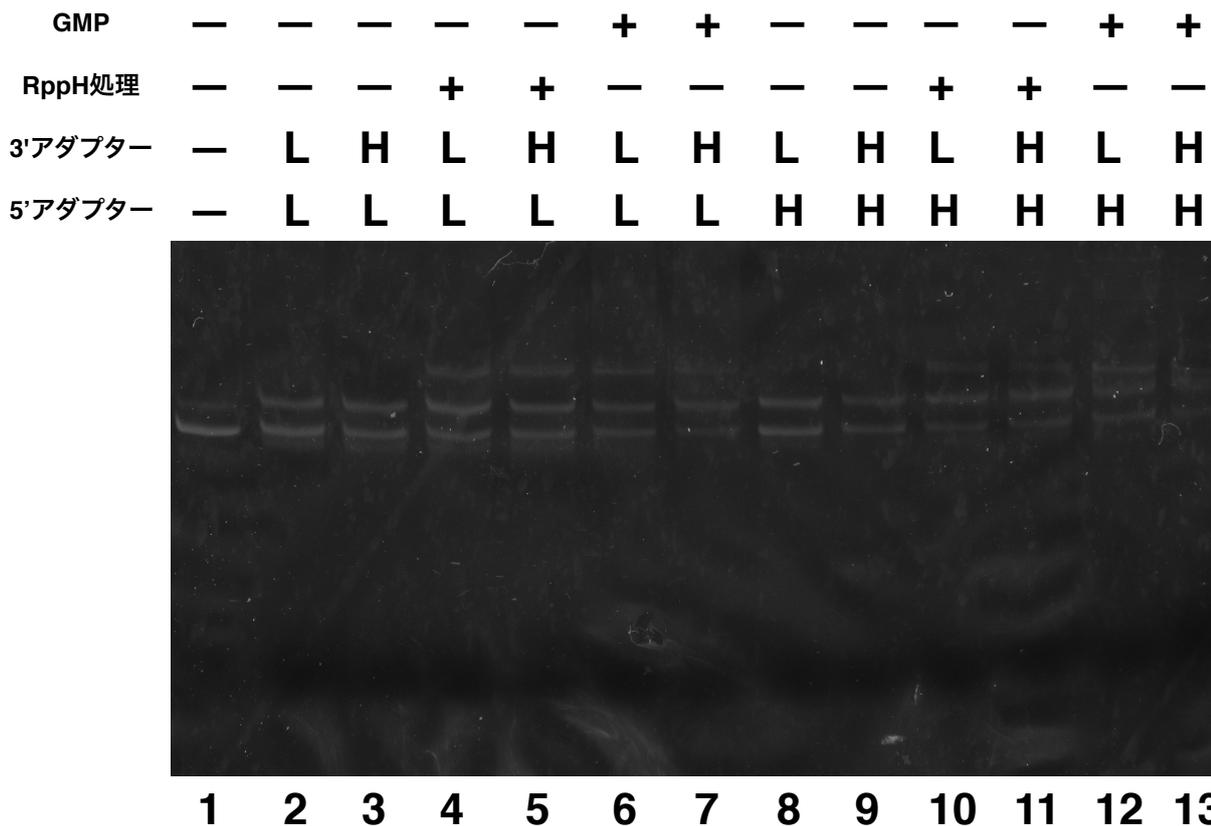


図9. RppHの影響とアダプター配列の付加効率

in vitroで合成したCeY RNA (レーン1)を用いて、RppHによるRNA5'末端の三リン酸から一リン酸への変換の有無と、アダプター配列の付加効率を確認した。RppH処理の有無によって末端のリン酸に変化があるのかを検証するため、GMPを加えて合成したCeY RNAを用意した (レーン6, 7、レーン12, 13)。GMPを加えて合成したCeY RNAの5'末端は一リン酸の形になっている。また、アダプターを熱変性させる条件についてもL: 65°C - 30秒間、H: 95°C - 5分間の2通り検討した。アダプターが付加しているのかは検出できたRNAのバンドサイズから判断した。CeY RNAのサイズを白三角、3'アダプターが付加した状態を灰色三角、3'アダプターと5'アダプターの両方が付加された状態のものを黒三角で示した。

(A) CeY RNA

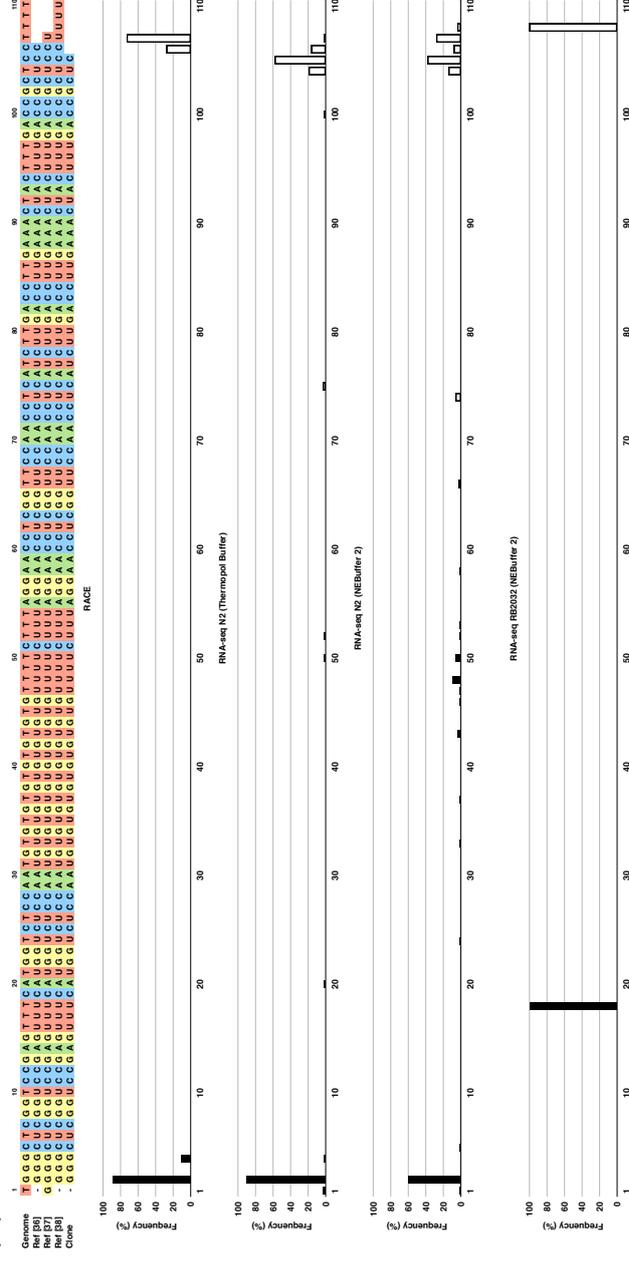
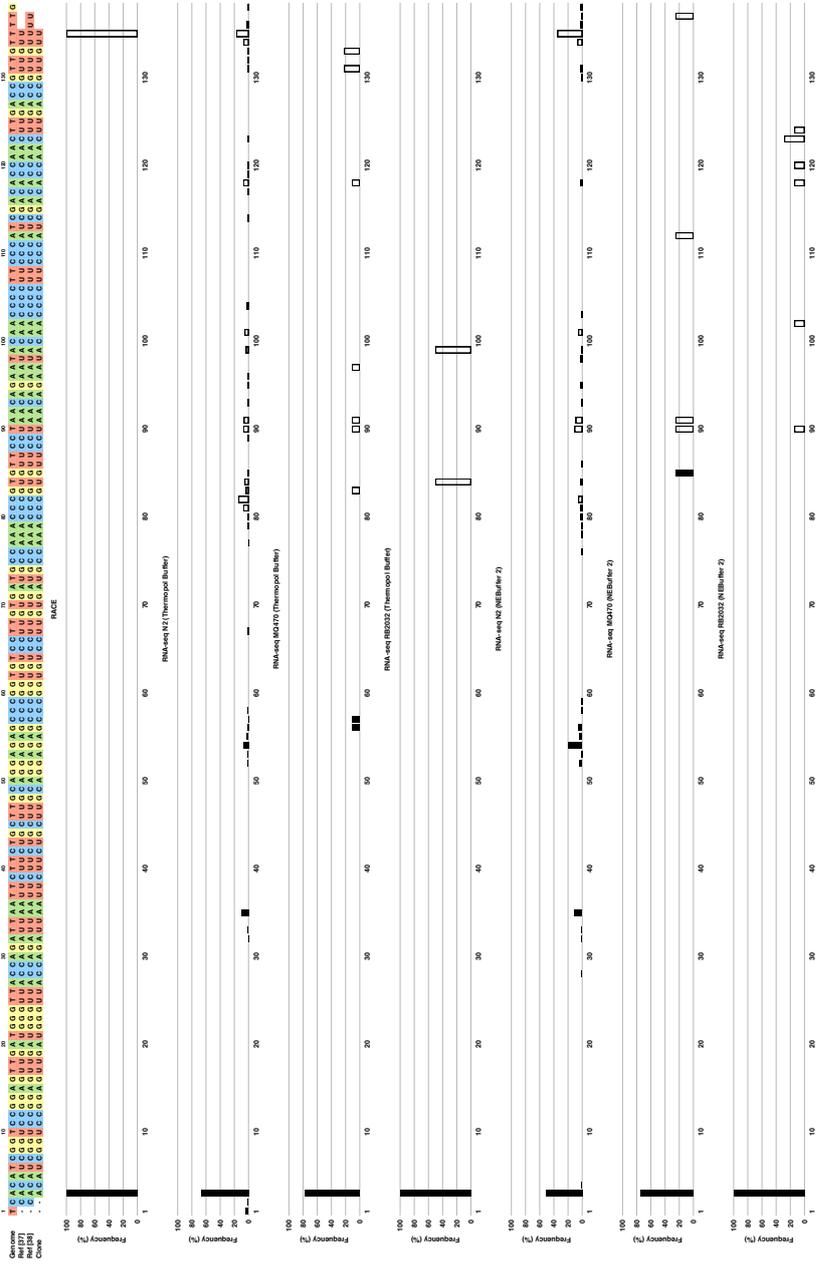


図10. RACEとRNA-seqによって得られたCeY RNAおよびsbRNAの5'末端と3'末端の位置とその出現頻度 (A-P, R, S) 最上段にCeY およびsbRNA遺伝子のゲノム配列、その下に先行研究で報告されている配列 (Ref [参考文献番号])とin vitroで合成したRNAの配列 (Clone)を示した [8, 36-38, 40, 41]。RACEおよびRNA-seqで得られた5'末端と3'末端の位置をグラフで示した。横軸は最上段の配列と対応している。縦軸は各RNAのリード数 (表9-11)に対してその位置が末端であった頻度を示した。5'末端を黒色、3'末端を白色で示した [61]。

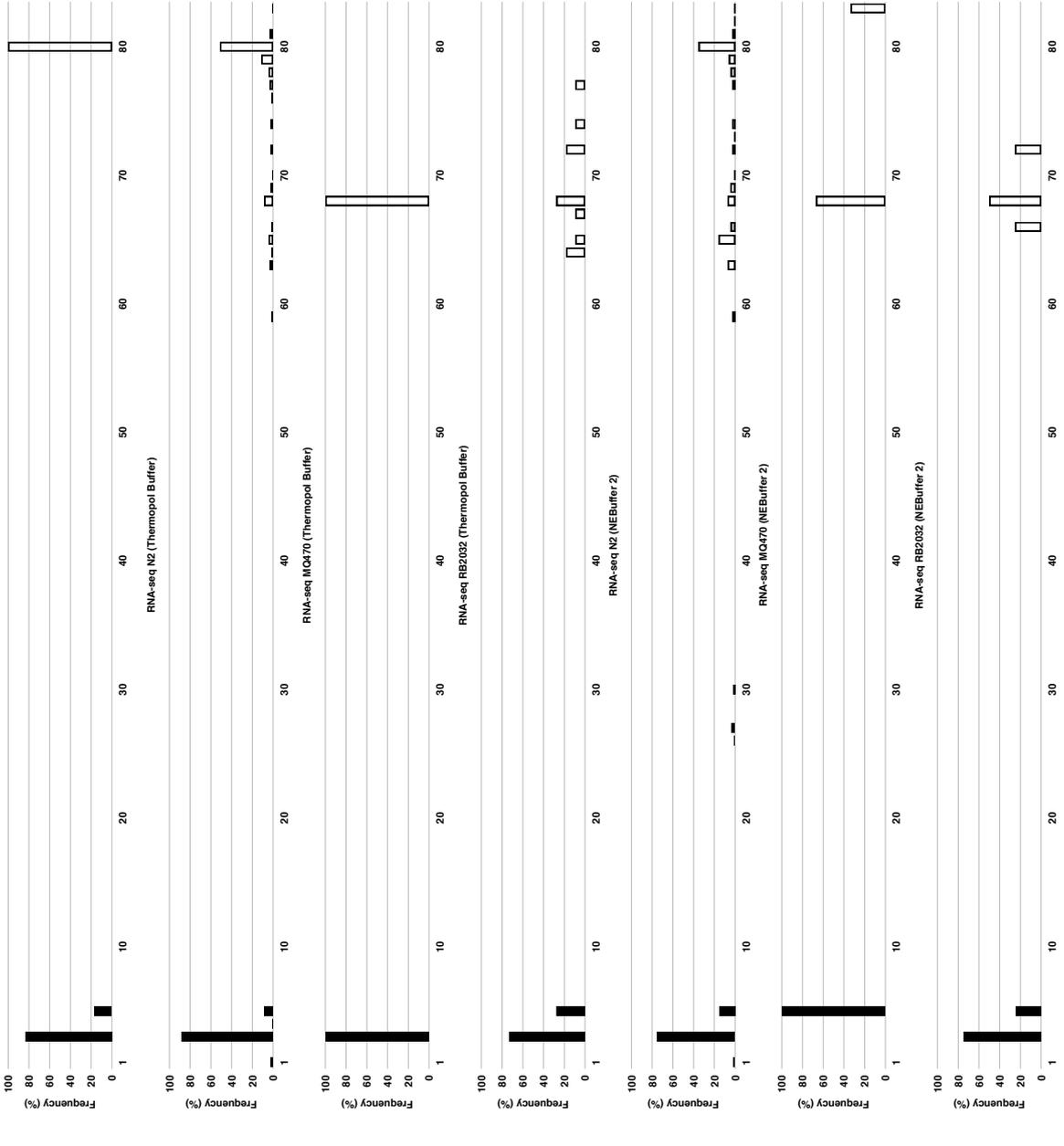
(Q) Cel5 RNAはRACEとRNA-seqでは末端配列が得られなかった。in vitroで合成したCel5 RNAは、Cel5 RNAともっとも相同性の高いCeN134 RNAと同様の位置から転写が開始すると予想して5'末端を設定した。3'末端については、先行研究で予想されていたものに合わせた [38]。

(D) CeN73-1 RNA



(G) Cen74-2 RNA

Genome **A T G T A T C G G T C C G G C G T C A G T G G G G T T A T C A A G T T T G C C T C C C C T T C G G G A A T T T C G A T C G G C A C C A C C A C C G T T G G T T T**
 Ref [37] **- - - G U A U C G G U C C C G C G U C A G U G G G U U A U C A A G U U U G C C U C C C U C C U C G G A A U U U C U C A U C G G C A C C A C C G U U G C U**
 Ref [41] **- - - G U A U C G G U C C C G C G U C A G U G G G U U A U C A A G U U U G C C U C C C U C C U C G G A A U U U C U C A U C G G C A C C A C C G U U G C U**
 Ref [38] **- - - G U A U C G G U C C C G C G U C A G U G G G U U A U C A A G U U U G C C U C C C U C C U C G G A A U U U C U C A U C G G C A C C A C C G U U G C U**
 Clone **- - - G U A U C G G U C C C G C G U C A G U G G G U U A U C A A G U U U G C C U C C C U C C U C G G A A U U U C U C A U C G G C A C C A C C G U U G C U**



(H) CeN75 RNA

1
 Genome CAA T A C G G T C C G G A G T C G G T G G G T T A T C T G A G A A G C C C C C C C A T C G A C A C C A A C T T G A C C G A T G A A A T T T T A G T T T T A A A
 Ref [37] - A A U A C G G U C C C G G A G U C G U G G G U U A U S U G A G A A G C C C C C C A U C G A C A C C A A C U U G A C C S A U G A A A U U U U A G U U U U A A A
 Ref [38] C A A U A C G G U C C C G G A G U C G U G G G U U A U C U G A G A A G C C C C C C A U C G A C A C C A A C U U G A C C S A U G A A A U U U U A G U U U U A A A
 Clone - A A U A C G G U C C C G G A G U C G U G G G U U A U C U G A G A A G C C C C C C A U C G A C A C C A A C U U G A C C S A U G



(J) CeN77 RNA

1
 Genome C A A T T C G G T C C G G A G T C A A T G G G T T A T C T T T C A A A A C C C C C C A T T G A C A A C A C T T G A C C C G G C G T T T T T T
 Ref [37] C A A U U C G G U C C G G A G U C A A U G G G U U A U C U U U C A A A C C C C C C A U U G A C A C A C U U G A C C C G G C G U U U U U U U
 Ref [38] C A A U U C G G U C C G G A G U C A A U G G G U U A U C U U U C A A A C C C C C C A U U G A C A C A C U U G A C C C G G C G U U U U U U U
 Clone - A A U U C G G U C C G G A G U C A A U G G G U U A U C U U U C A A A C C C C C C A U U G A C A C A C U U G A C C C G G C G

RACE



RNA-seq N2 (Thermopol Buffer)



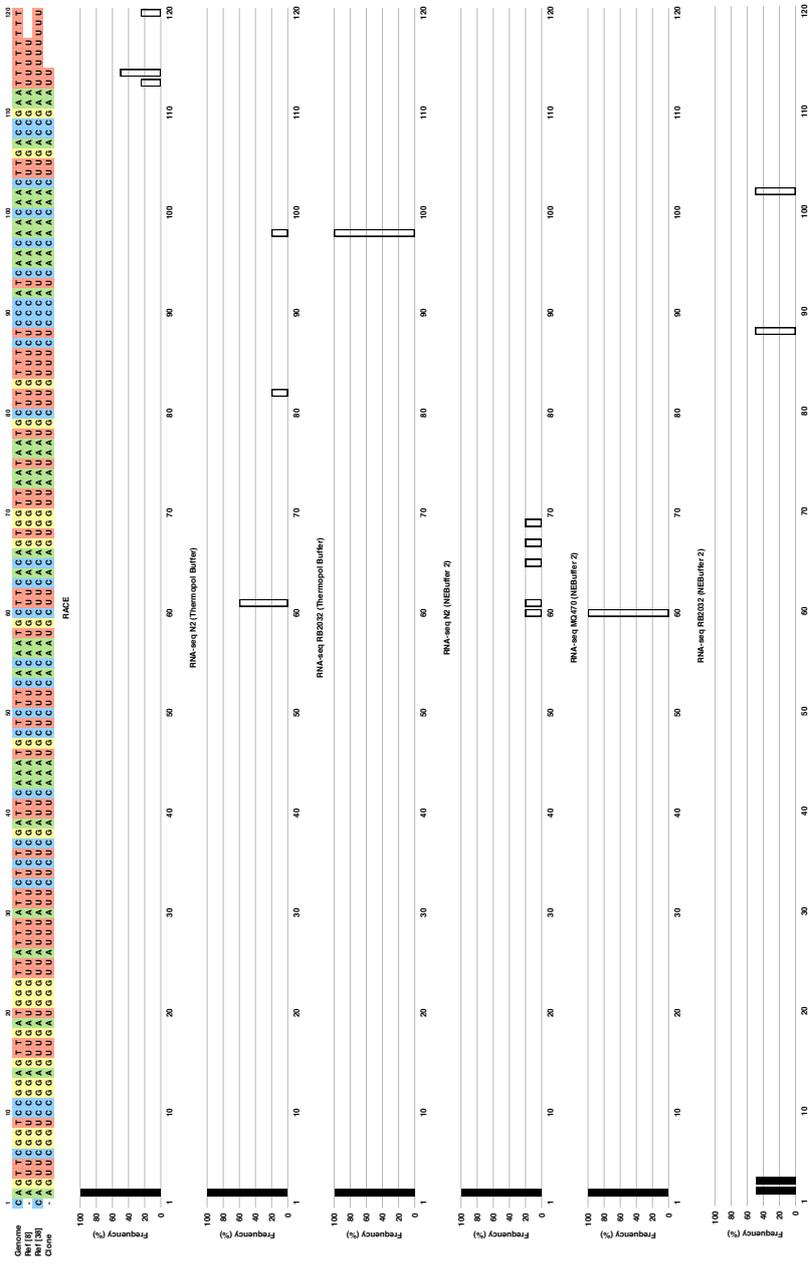
RNA-seq N2 (NEBuffer 2)



RNA-seq RB2032 (NEBuffer 2)



(L) CeN134 RNA



(R) Cel6 RNA

Genome
 Ref [8]
 Clone

1
 G T A T G T A T C G G G T C G G G C G T C A G T G G G T T A T C A A G T T T G C C T C C C T T C G G G G A T T C C C A T C G G C A T C A A C T T G A C A G T T A C A T T T T G A
 20
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 30
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 40
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 50
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 60
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 70
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 80
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 90
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U
 100
 G U A U C G G U C C G G C G G C A G U G G G U U A U C A A G U U U C C U C C C U U C G G G A A U U U C C C A U C G G C A U C A A C U U G A C A G U U A C A U U U U

RNA-seq N2 (Thermopop Buffer)



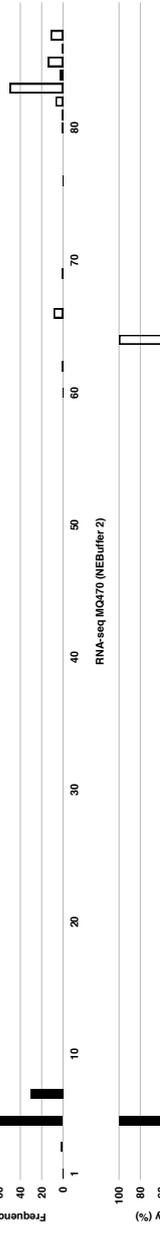
RNA-seq MQ470 (Thermopop Buffer)



RNA-seq RB2032 (Thermopop Buffer)



RNA-seq N2 (NEBuffer 2)



RNA-seq MQ470 (NEBuffer 2)



RNA-seq RB2032 (NEBuffer 2)



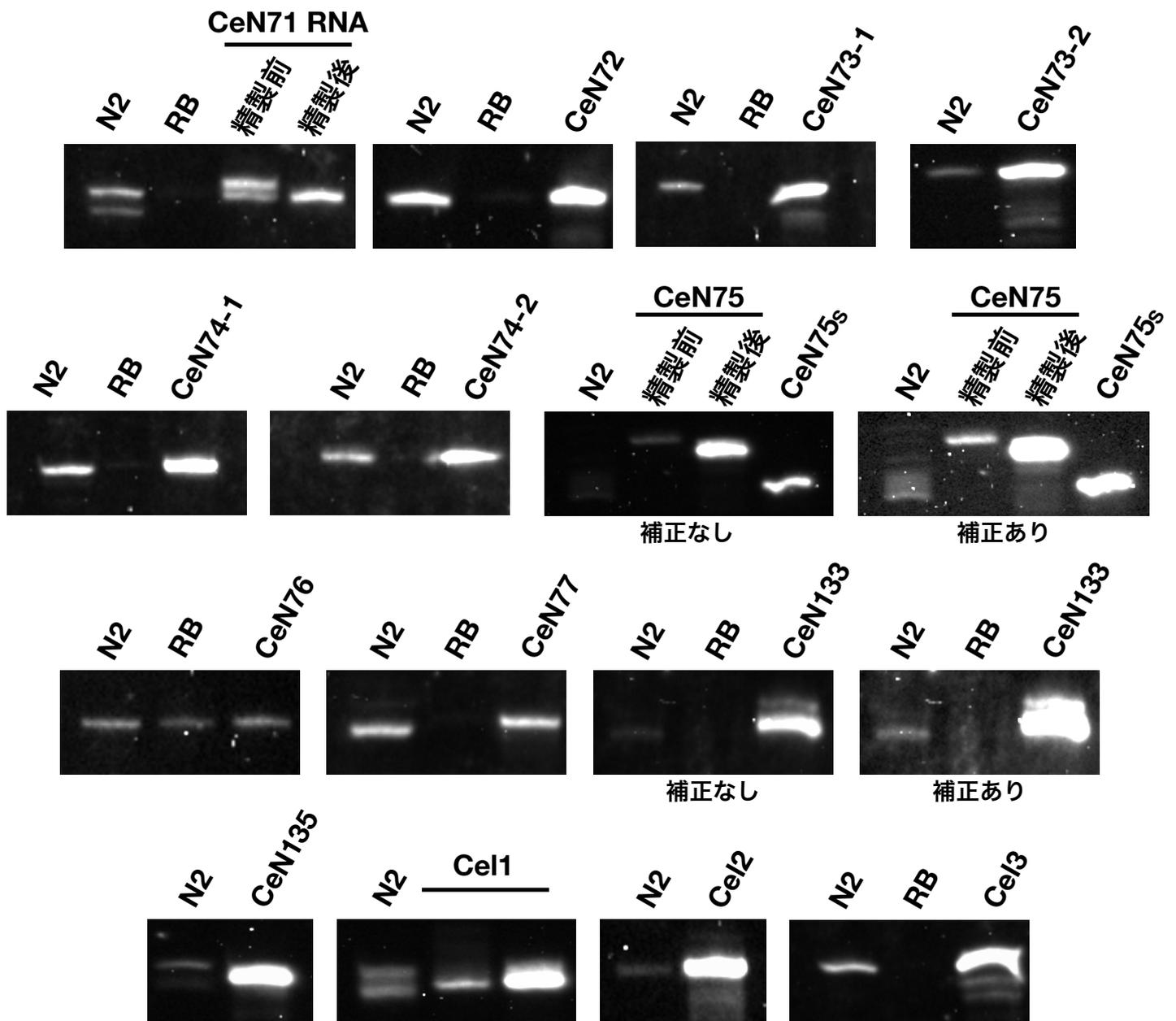


図11. *in vitro*で合成したRNAと細胞内に存在するRNAの比較

末端解析で得られた結果をもとにCeY RNAおよびsbRNAを合成した。ノーザンハイブリダイゼーションによって線虫から抽出した全RNAに含まれるRNAと長さを比較した。CeN75 RNAとCeN135 RNAについては、検出できたシグナル強度が低かったため、補正した画像も示した。比較に用いた線虫全RNAの量は、図5で示したものと同様。検出に用いたオリゴDNAは表3に示した。

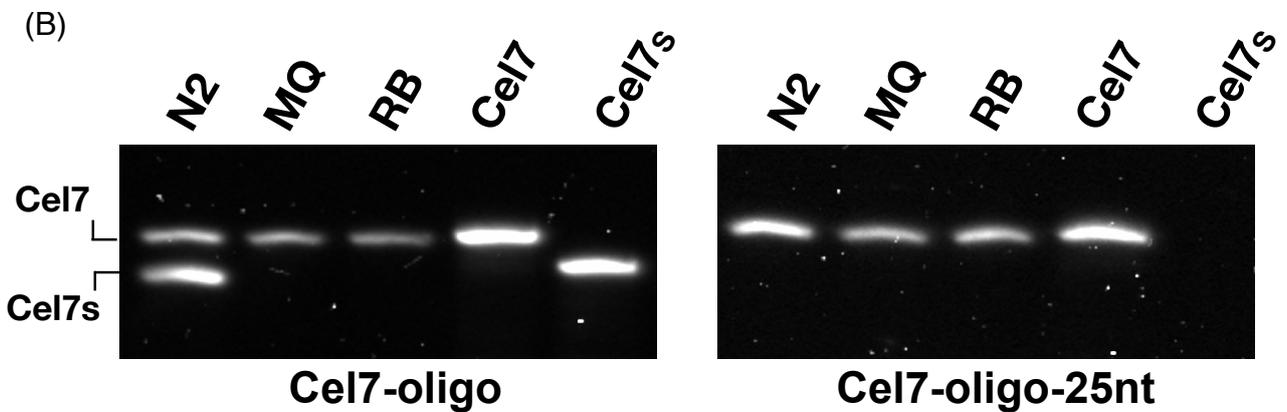
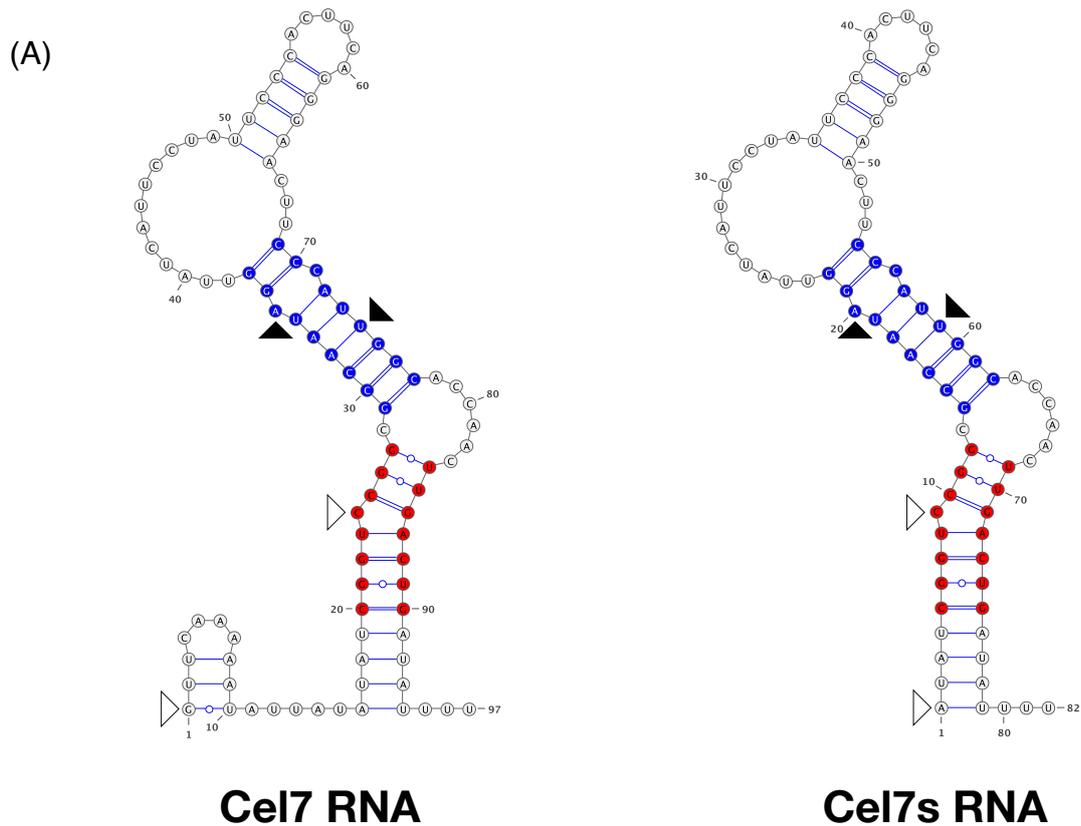


図12. Cel7 RNAとCel7s RNAの比較

(A) Cel7 RNA (左)とCel7s RNA (右)予想される二次構造。

(B)ノーザンハイブリダイゼーションによって、N2、MQ470 (MQ)およびRB2032 (RB)から抽出した全RNAに含まれるCel7RNAおよびCel7s RNAと合成したRNAの長さを比較した。Cel7 RNAのループ構造に対して設計したプローブ Cel7-oligo (A, 黒三角)とCel7 RNAの5'末端から25ヌクレオチドに対して設計したプローブ Cel7-oligo-25nt (A, 白三角)を用いて検出した [61]。

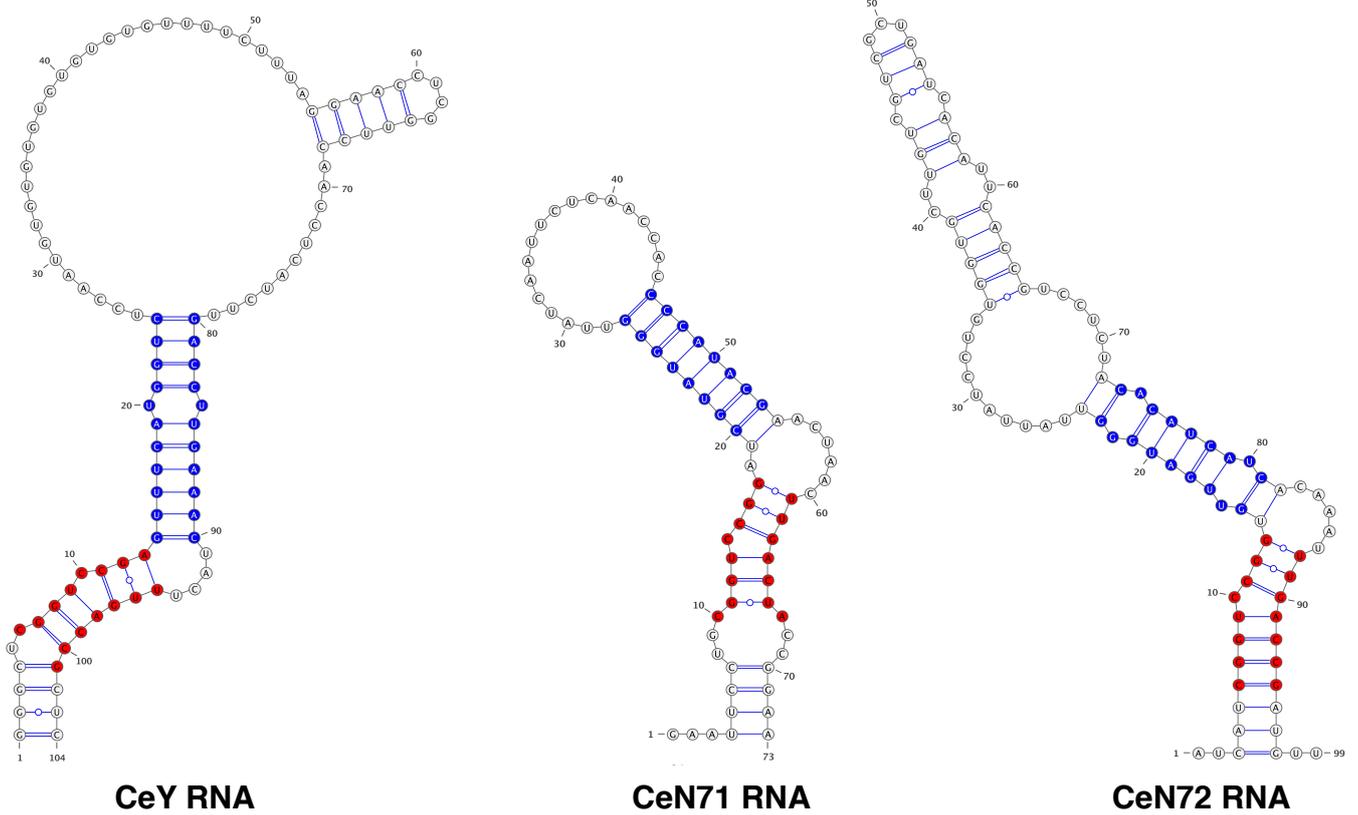
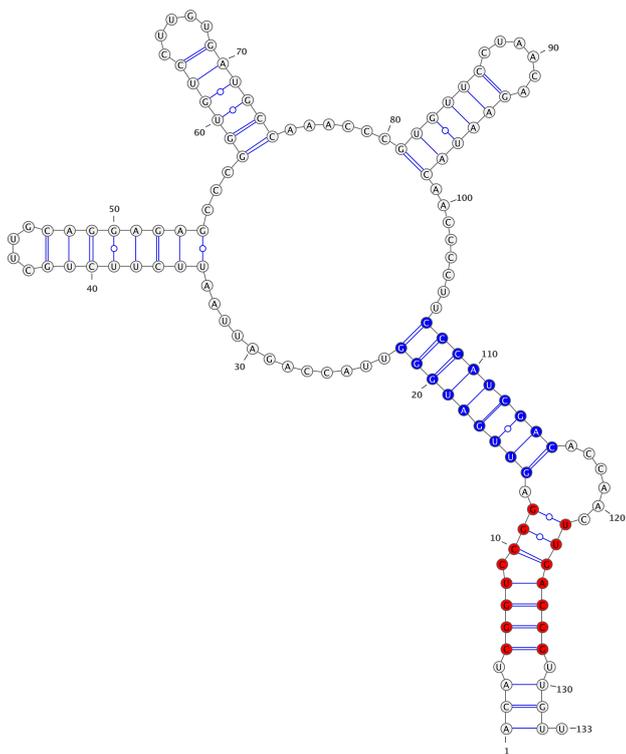
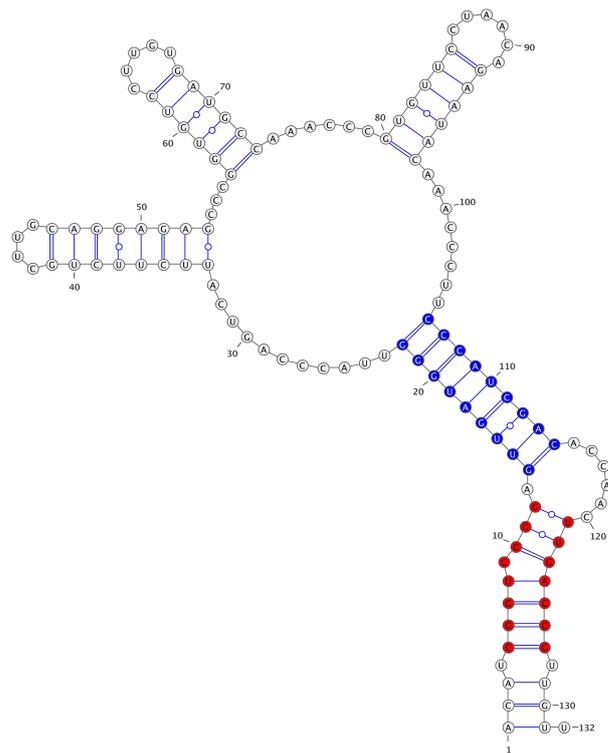


図13. CeY RNAおよびsbRNAの予測二次構造

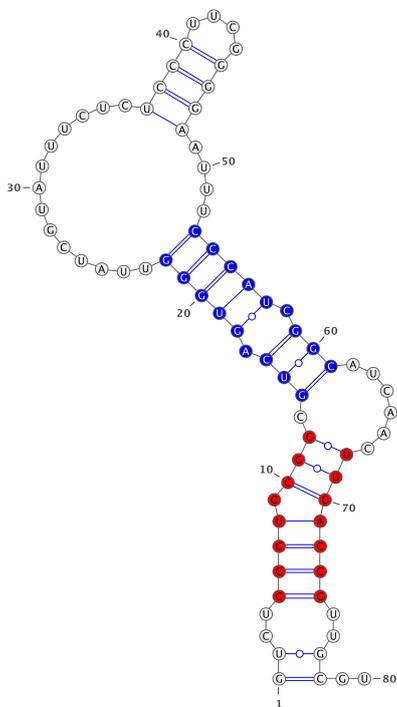
末端解析から決定したRNA配列 (図10A-10S、Clone)をもとに予想される二次構造を示した。下方ステムおよび上方ステムの二次構造は、先行研究を参考にした [38]。L2ループは、二次構造予測ソフトRNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)の結果を参考にした。下方ステムを赤、上方ステムを青で示した。



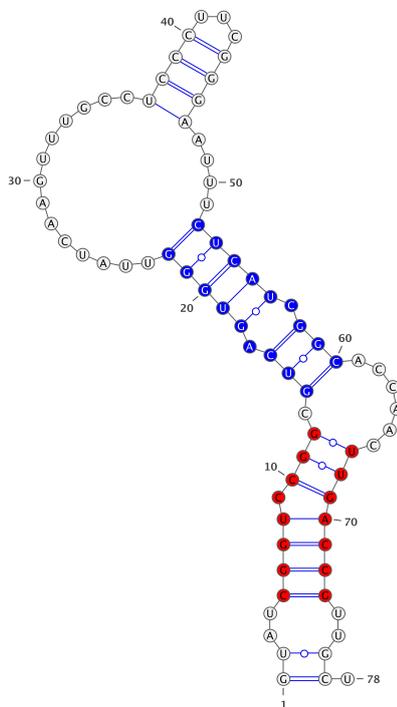
CeN73-1 RNA



CeN73-2 RNA

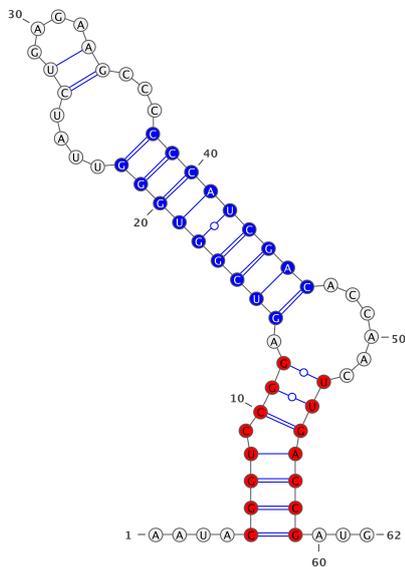


CeN74-1 RNA

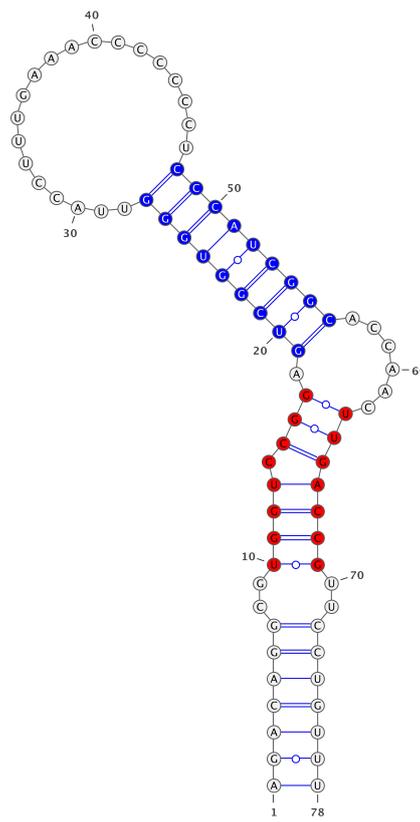


CeN74-2 RNA

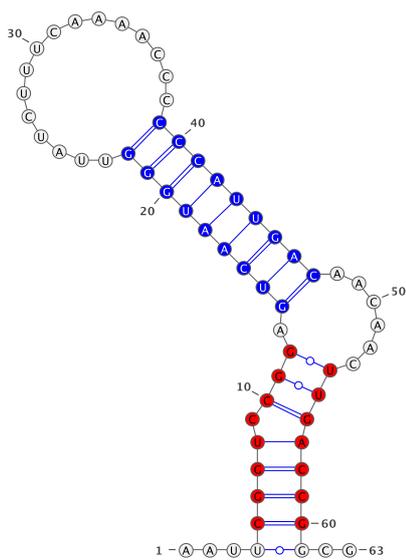
図13. CeY RNAおよびsbRNAの予測二次構造 (続き)



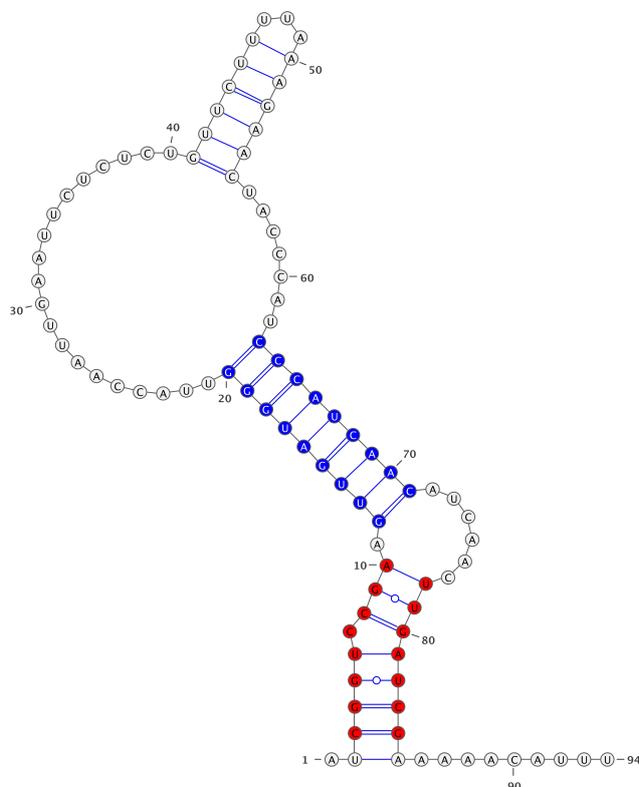
CeN75 RNA



CeN76 RNA



CeN77 RNA



CeN133 RNA

図13. CeY RNAおよびsbRNAの予測二次構造 (続き)

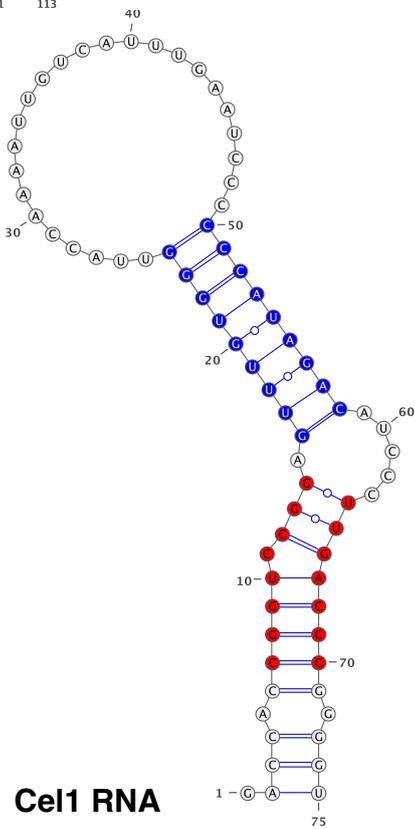
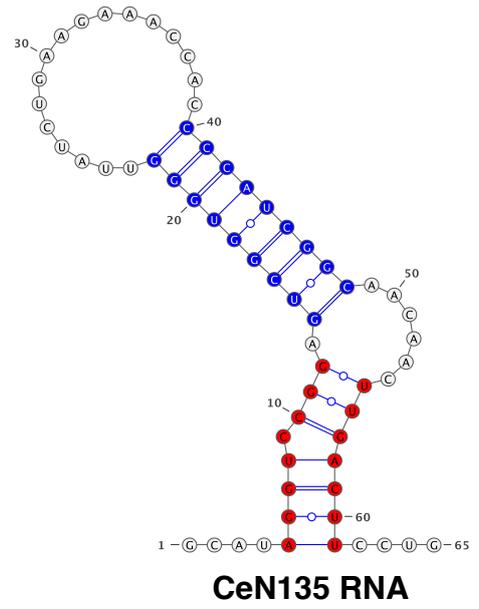
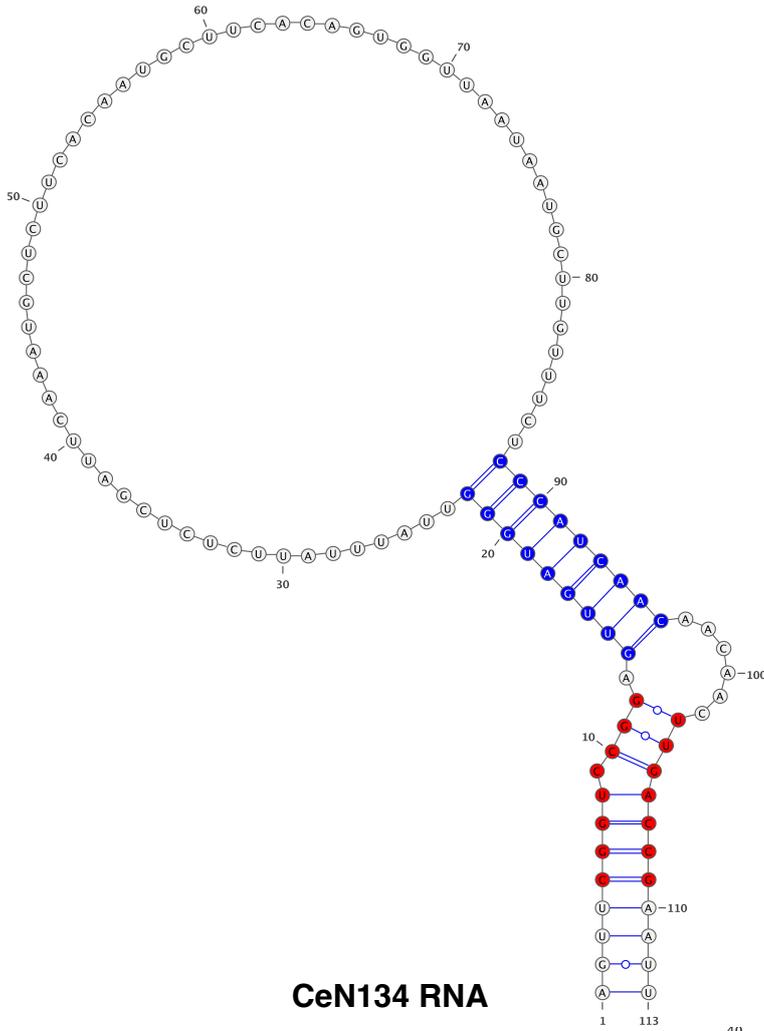
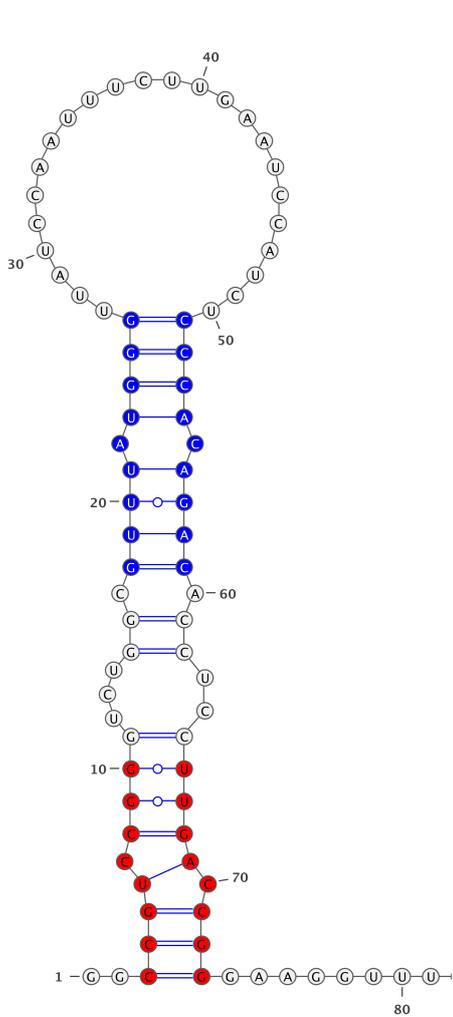
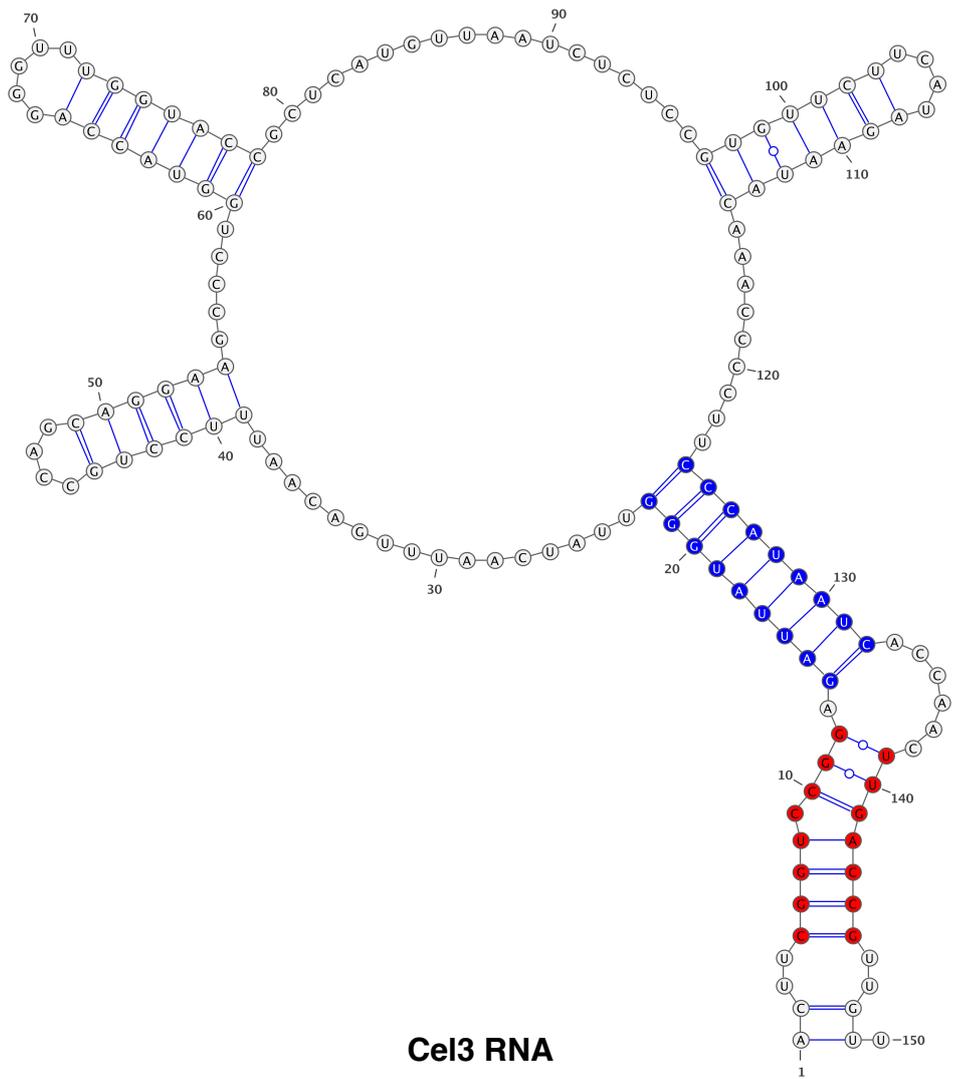


図13. CeY RNAおよびsbRNAの予測二次構造 (続き)

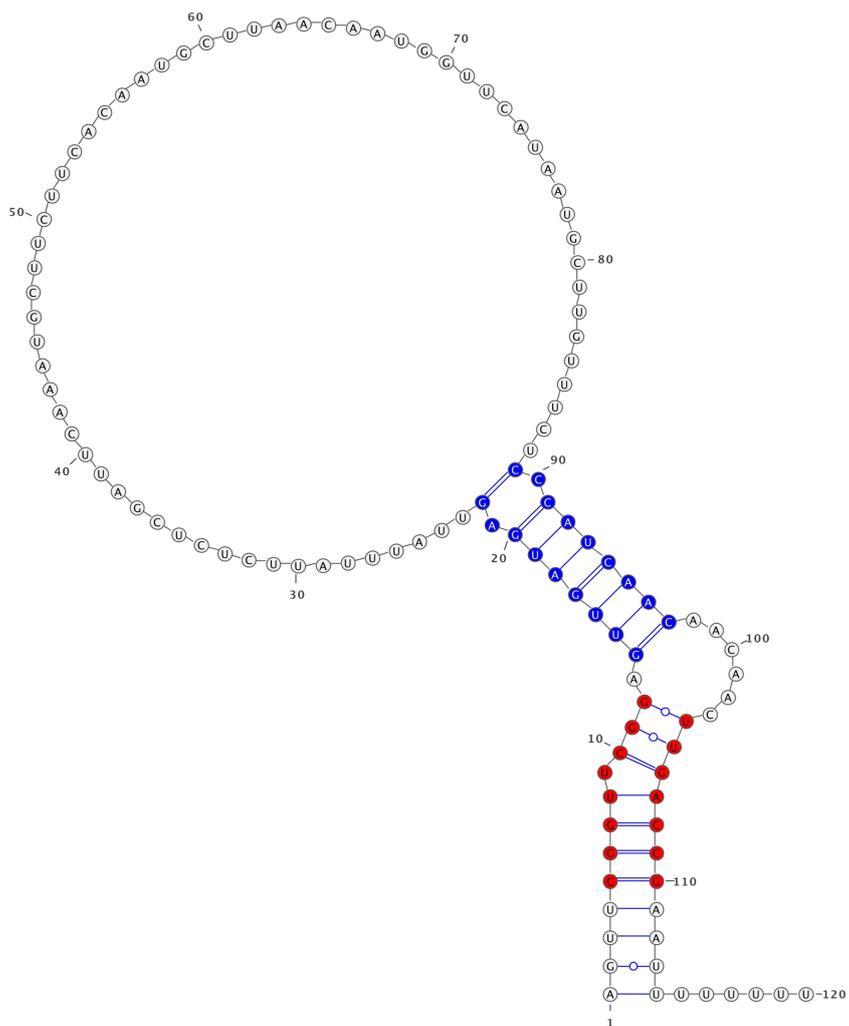


Cel2 RNA

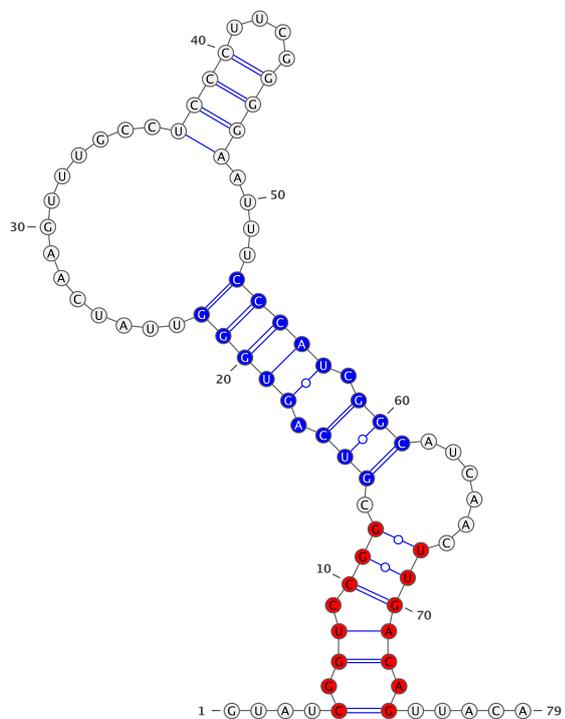


Cel3 RNA

図13. CeY RNAおよびsbRNAの予測二次構造 (続き)



CeI5 RNA



CeI6 RNA

図13. CeY RNAおよびsbRNAの予測二次構造 (続き)

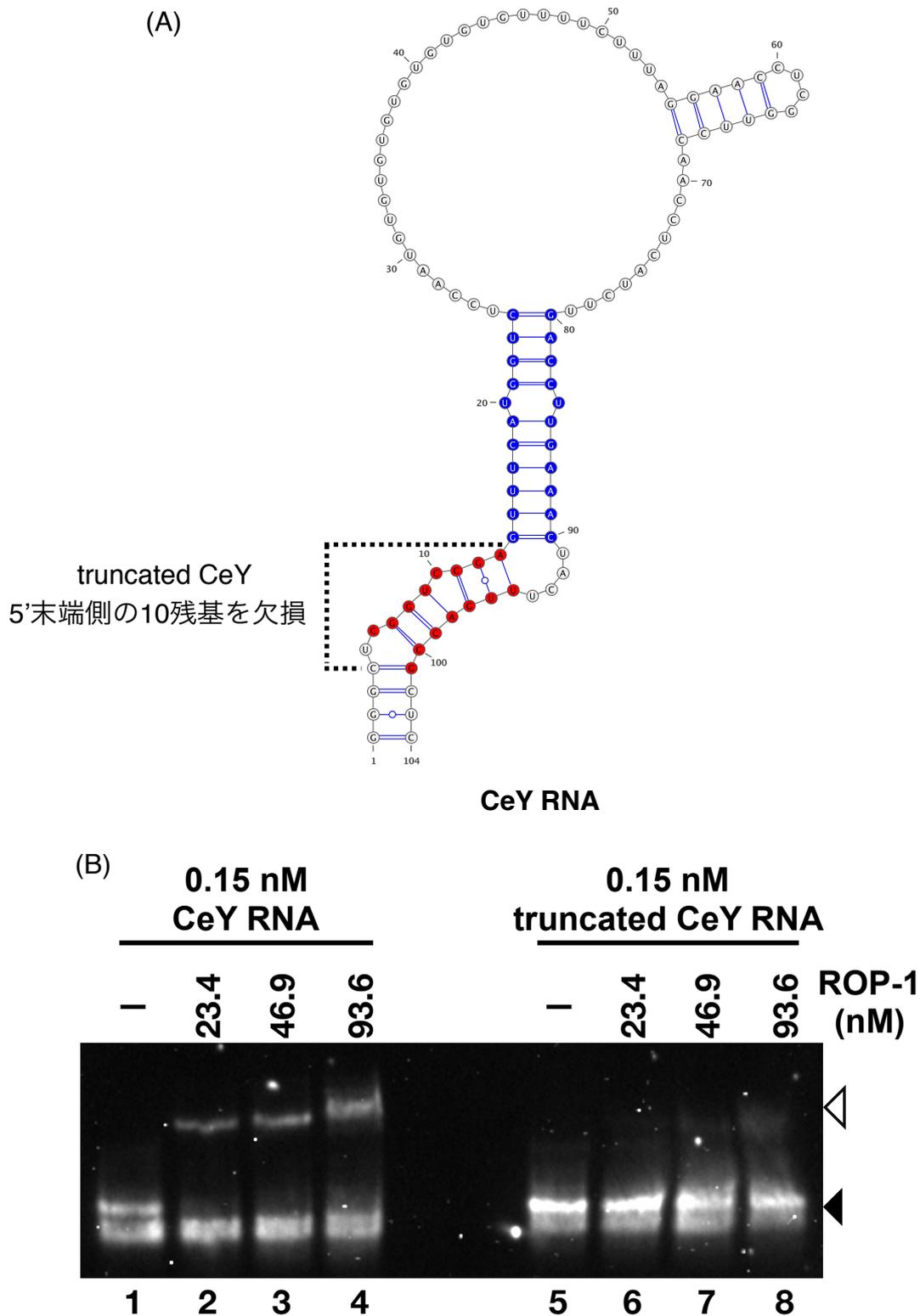


図14. CeY RNAとtruncated CeY RNAのROP-1に対する結合の比較

(A)CeY RNAの予測二次構造とtruncated CeY RNAを作製するために欠損させた領域。

(B)0.15 nM RNAと23.4-93.6 nM ROP-1を混合して20°Cで30分間インキュベーションした。RNAはノーザンハイブリダイゼーションによって検出した。RNAのみ (レーン1, 5)のシグナルを黒三角、ROP-1を加え (レーン2-4, レーン6-8)、シフトして見えたシグナルを白三角で示した。

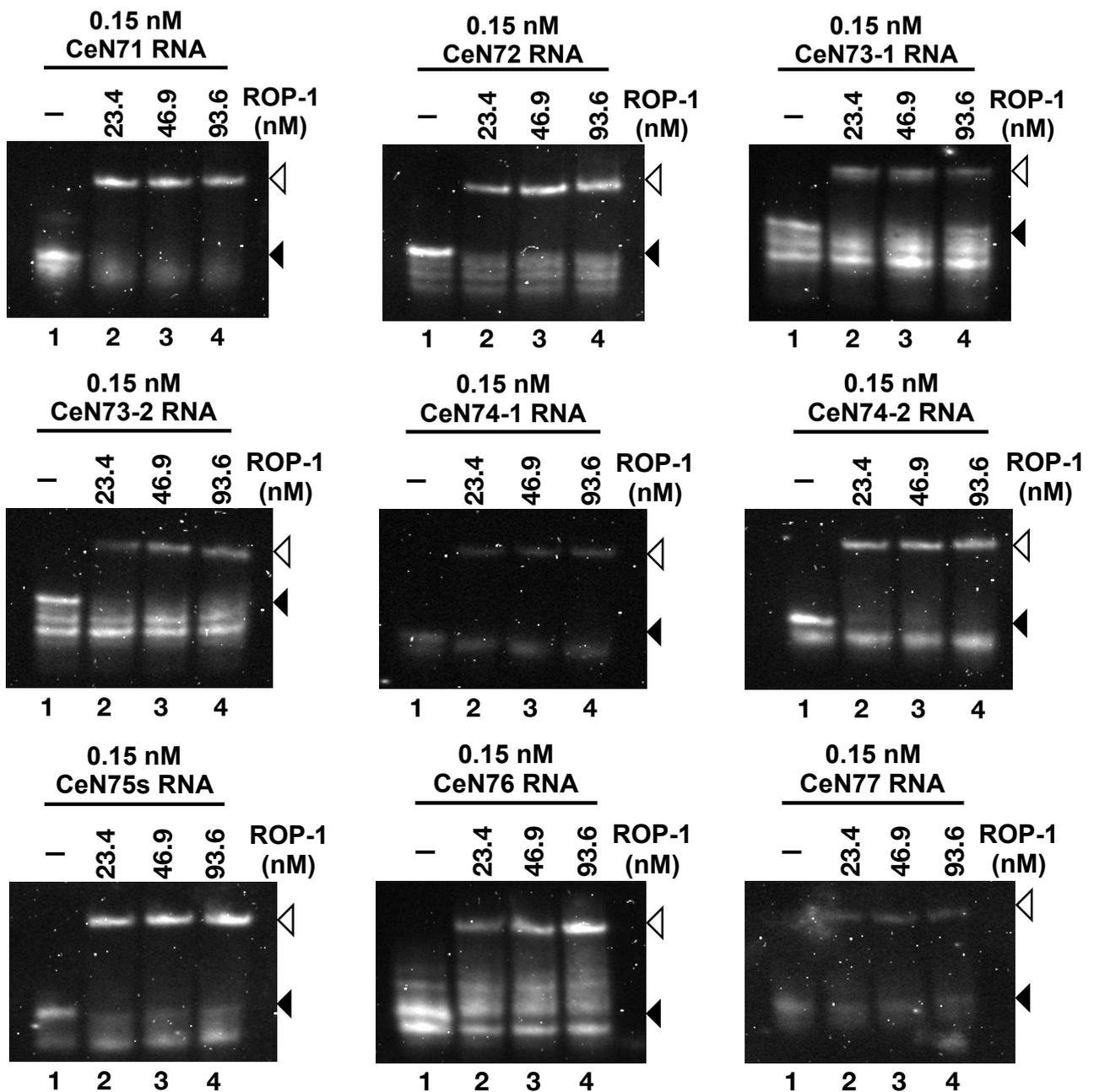


図15. sbRNAとROP-1の結合の有無

0.15 nM RNAと23.4-93.6 nM ROP-1を混合して20°Cで30分間インキュベーションした。RNAはノーザンハイブリダイゼーションによって検出した。RNAのみ (レーン1, 5)のシグナルを黒三角、ROP-1を加え (レーン2-4, 6-8)、シフトして見えたシグナルを白三角で示した。

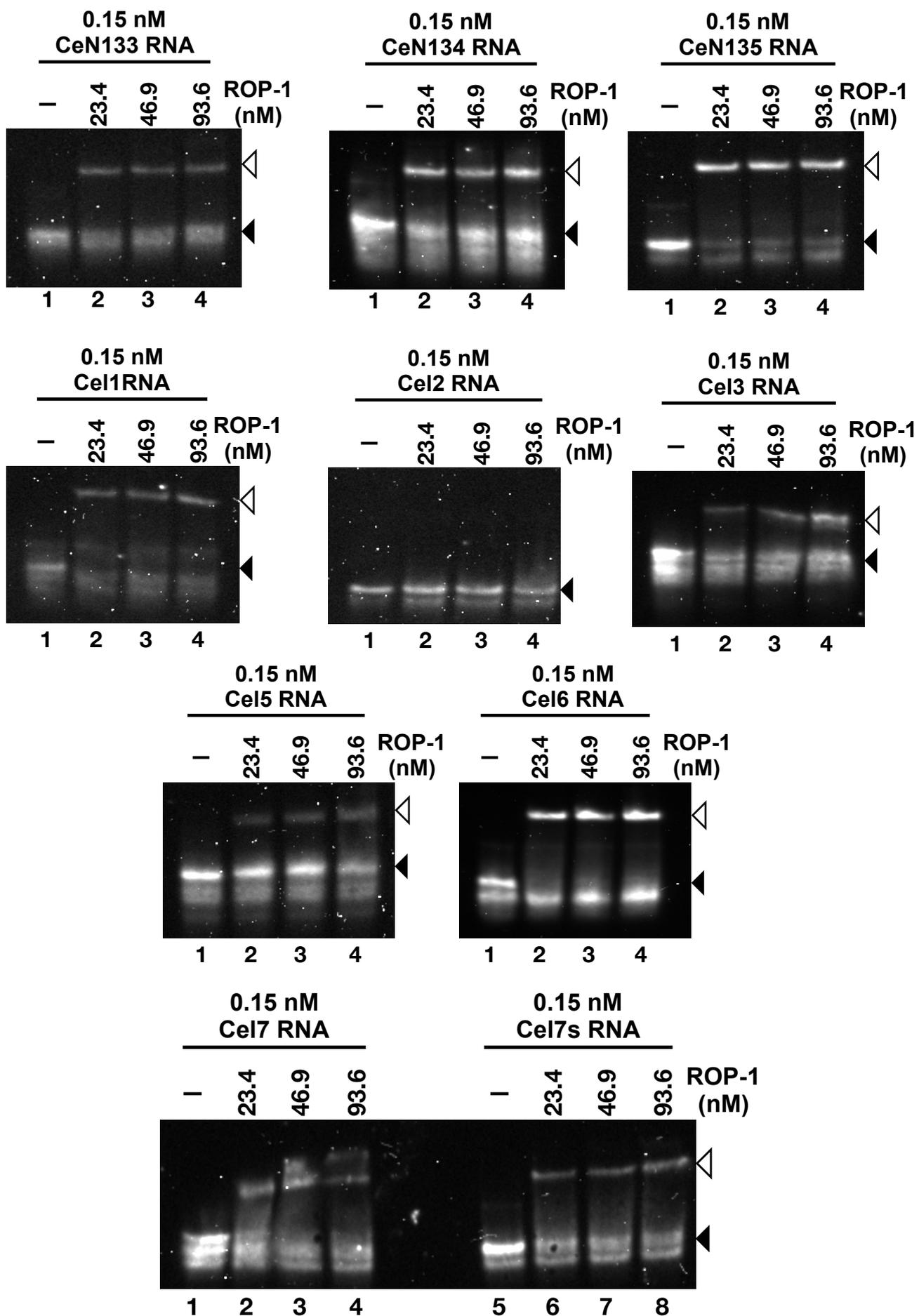


図15. sbRNAとROP-1の結合の有無 (続き)

0.15 nM CeY RNA

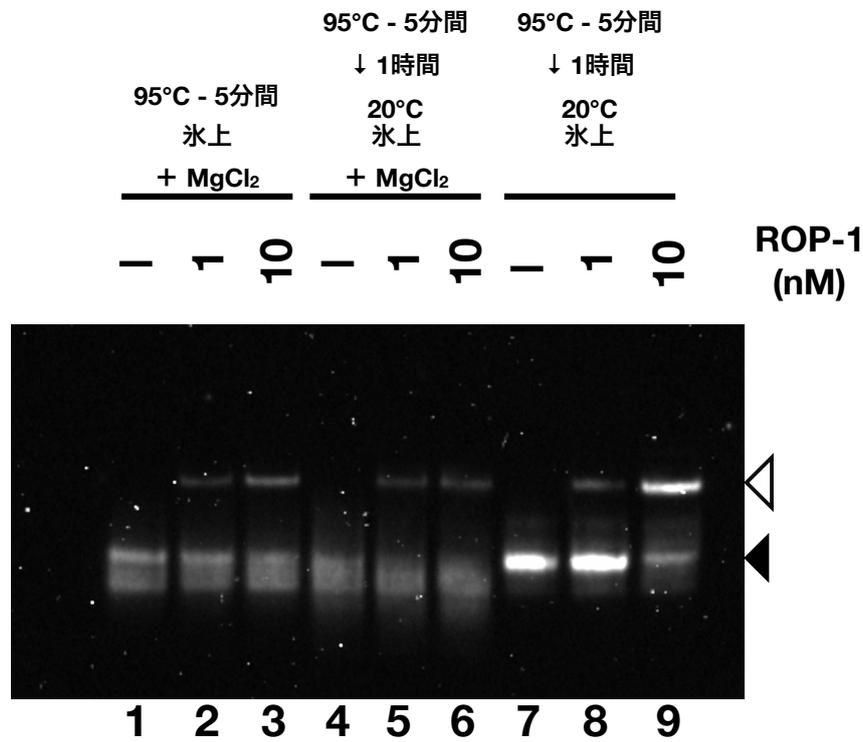


図16. RNAの熱変性条件の検討

RNAをROP-1と混合する前に、3 mM MgCl₂存在下において95°Cで5分間インキュベーションし、氷上においた (レーン1-3)。3 mM MgCl₂存在下において95°Cで5分間インキュベーションした後、1時間かけて20°Cまで冷やした (レーン4-6)。MgCl₂非存在下において95°Cで5分間インキュベーションした後、1時間かけて20°Cまで冷やした (レーン7-9)。いずれの場合も、ROP-1と混合する際に3 mM MgCl₂加えた。RNAのみ (レーン1,4,7)のシグナルを黒三角、ROP-1を加え (レーン2, 3、レーン5, 6、レーン8, 9)、シフトして見えたシグナルを白三角で示した。

0.15 nM CeY RNA
+
1 nM ROP-1

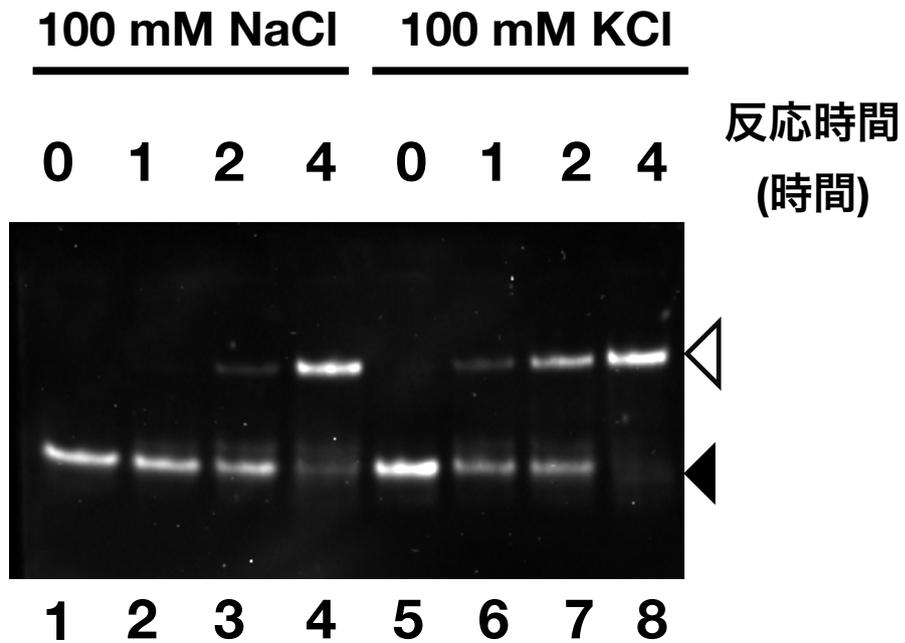


図17. EMSAに用いる塩条件の検討

EMSAを行う際に、100 mM NaCl (レーン1-4)または100 mM KCl (レーン5-8)を含むバッファーを用いた。RNAとROP-1を混合してから20°Cで0、1、2、4時間インキュベーションした。RNAのみ (レーン1, 5)のシグナルを黒三角、ROP-1を加え (レーン2-4、レーン6-8)、シフトして見えたシグナルを白三角で示した。

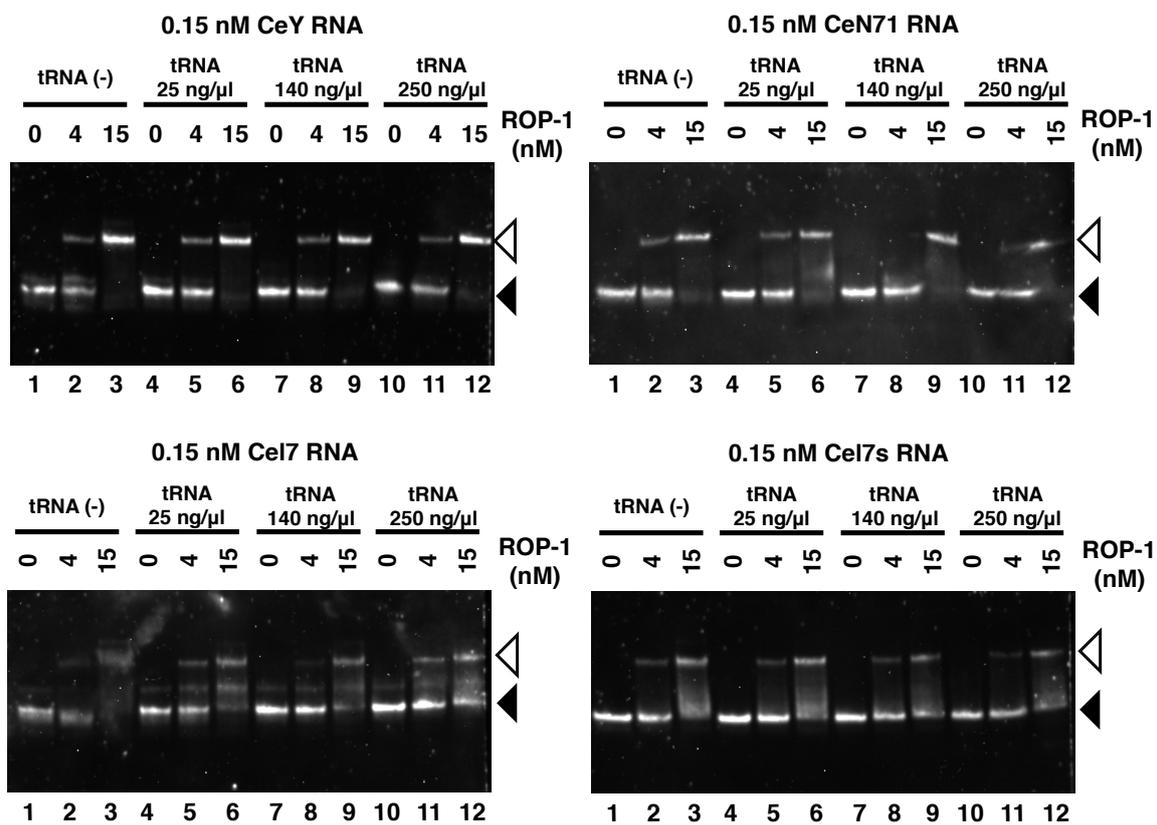


図18. ROP-1とRNAの非特異的な結合の有無

CeY、CeN71、Cel7、Cel7s RNAとROP-1のゲルシフトアッセに加え、*yeast* tRNAの濃度を0、25、140、250 ng/μLで検討した。RNAとROP-1は20°Cで30分間インキュベーションした。フリーのRNAを黒三角、ROP-1を加え（レーン2、3、レーン5、6、レーン8、9、レーン11、12）、シフトして見えたシグナルを白三角で示した。

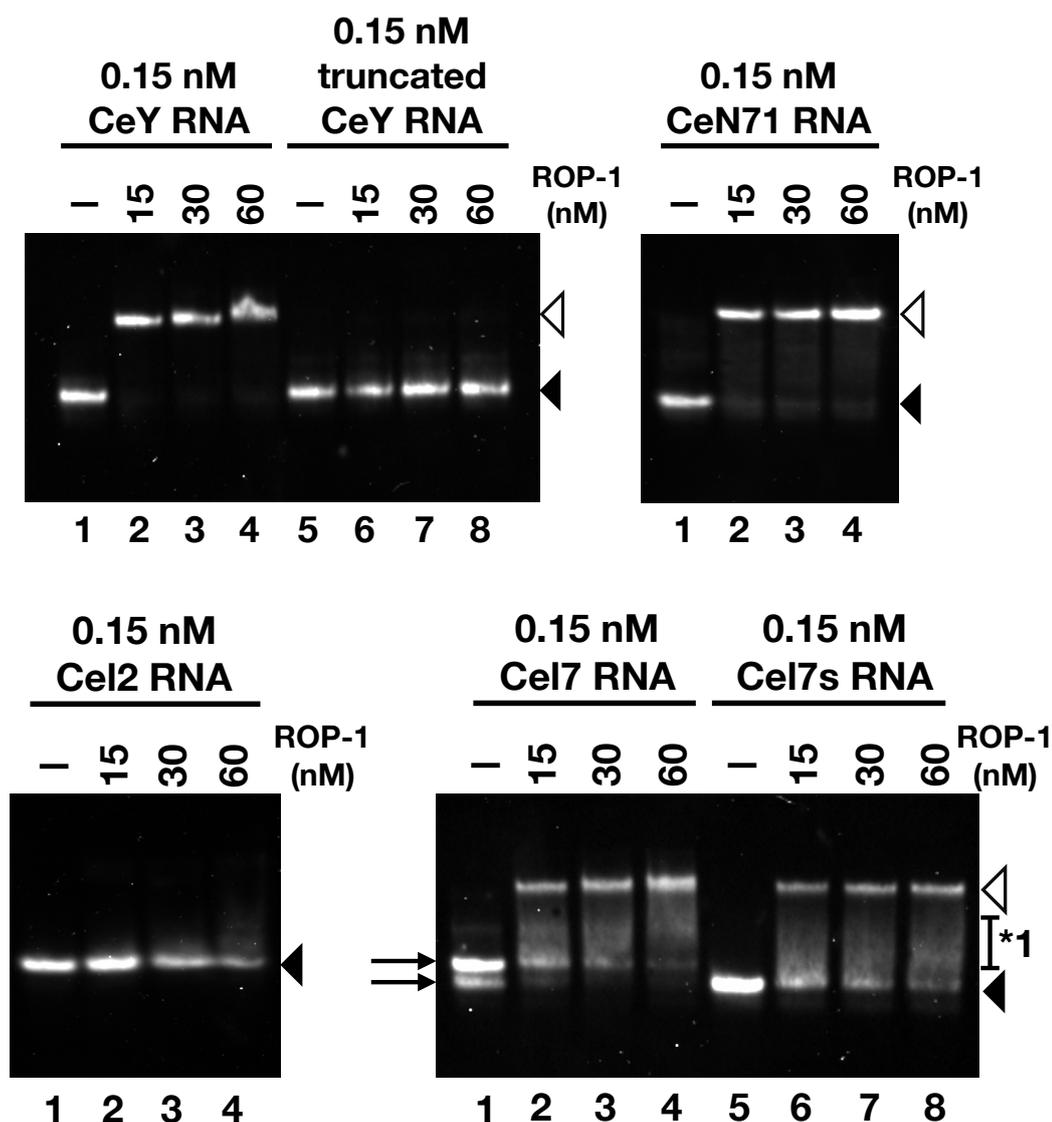


図19. CeY RNAとCeN71、Cel2、Cel7、Cel7s RNAのROP-1に対する結合の比較

0.15 nM CeY、CeN71、Cel7、Cel7s RNAと15-60 nM ROP-1を混合して20°Cで30分間インキュベーションした。RNAはROP-1と混合する前にMgCl₂非存在下で95°C、5分間インキュベーションした後1時間かけて20°Cまで冷やした。ROP-1と混合する際のバッファーには100 mM KCl、50 ng/μL yeast tRNAを加えた。RNAとROP-1は20°Cで30分間インキュベーションした。フリーのRNAを黒三角、ROP-1を加え (レーン2-4、レーン6-8)、シフトして見えたシグナルを白三角で示した [61]。

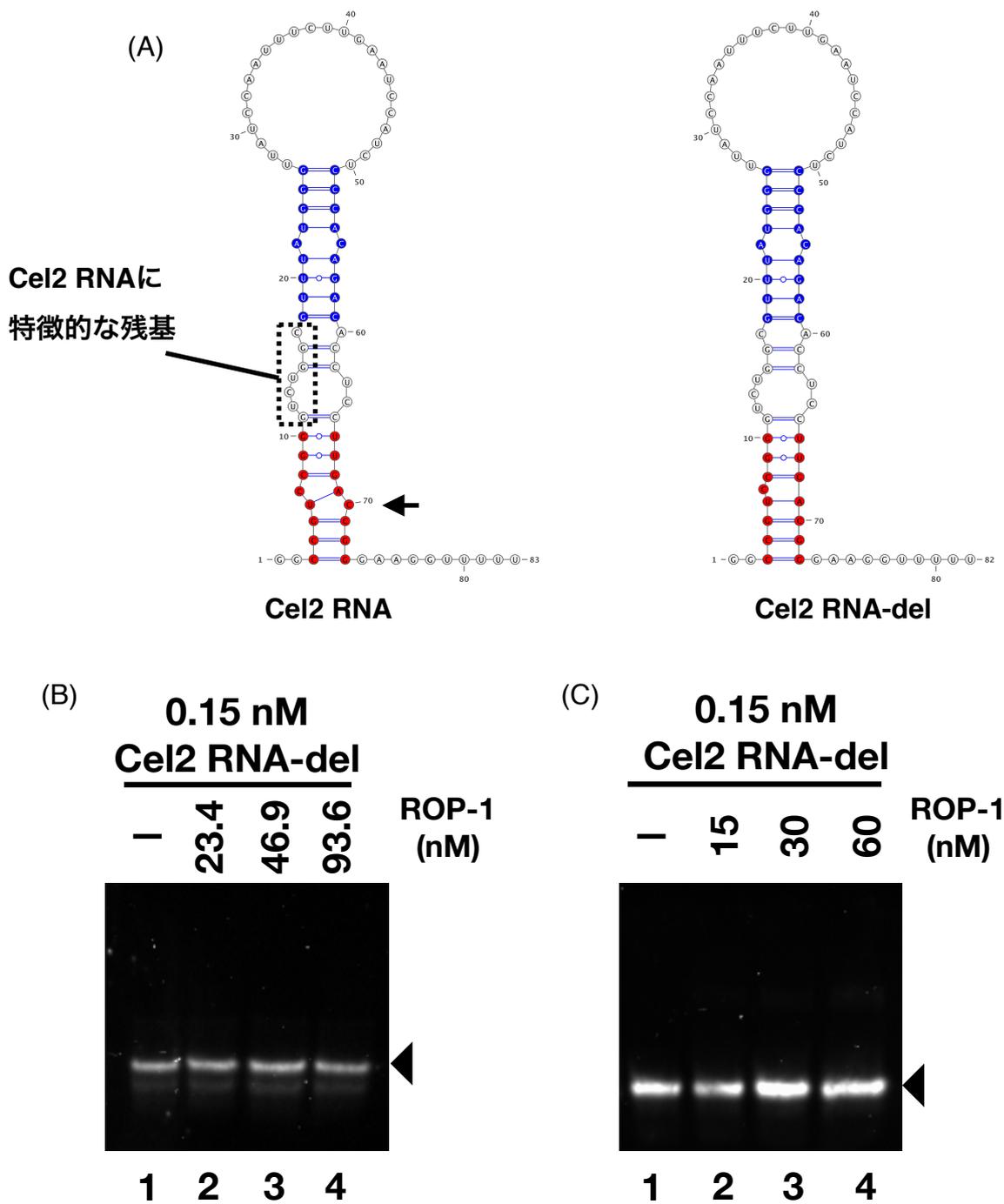


図20. 変異を加えたCel2 RNAのROP-1に対する結合の有無

(A) Cel2 RNA (左)から黒矢印で示したシトシン残基を欠損させて、Cel2 RNA-del (右)を作製した。黒破線枠で囲んだ部分はCel2 RNAに特徴的な残基。(B) 0.15 nM Cel2 RNA-delと23.4-93.6 nM ROP-1を混合して20°Cで30分間インキュベーションした (図14, 15と同条件)。RNAのみ (レーン1)、ROP-1と混合した (レーン2-4)、フリーのRNAを黒三角で示した。(C) 0.15 nM Cel2 RNA-delと15-60 nM ROP-1を混合して20°Cで30分間インキュベーションした (図19と同条件) RNAのみ (レーン1)、ROP-1と混合した (レーン2-4)、フリーのRNAを黒三角で示した。

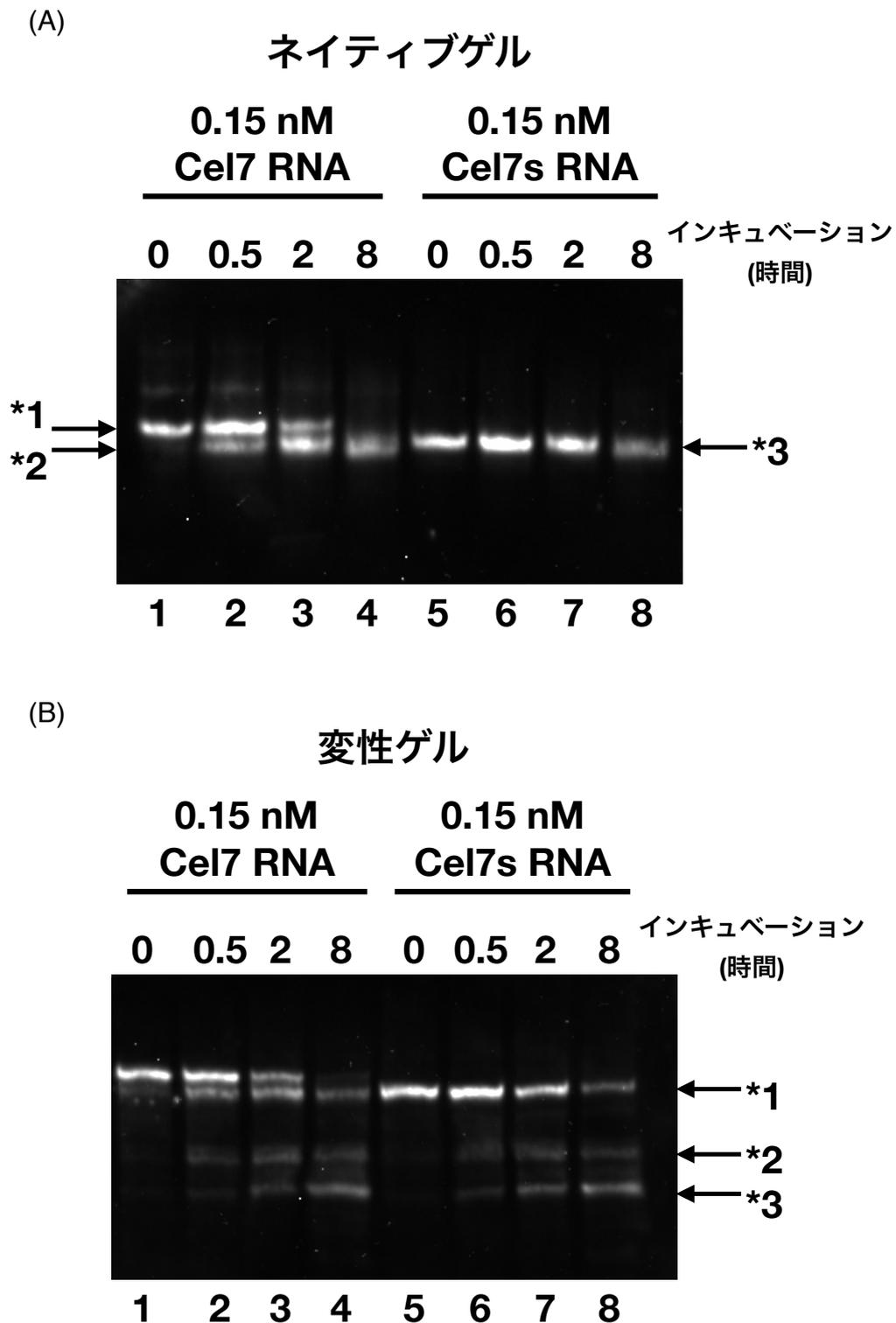


図21. Cel7、Cel7s RNAの分解の有無

Cel7 RNAまたは、Cel7s RNA 1.5 fmolを20°Cで0-8時間インキュベーションした。インキュベーションする際のバッファーは図16で示したEMSAと同様。インキュベーションを終えたRNAは、(A) ネイティブゲル (8%ポリアクリルアミドゲル, 5%グリセロール)または、(B) 変性ゲル (7 M 尿素12%ポリアクリルアミドゲル)を用いて電気泳動した。

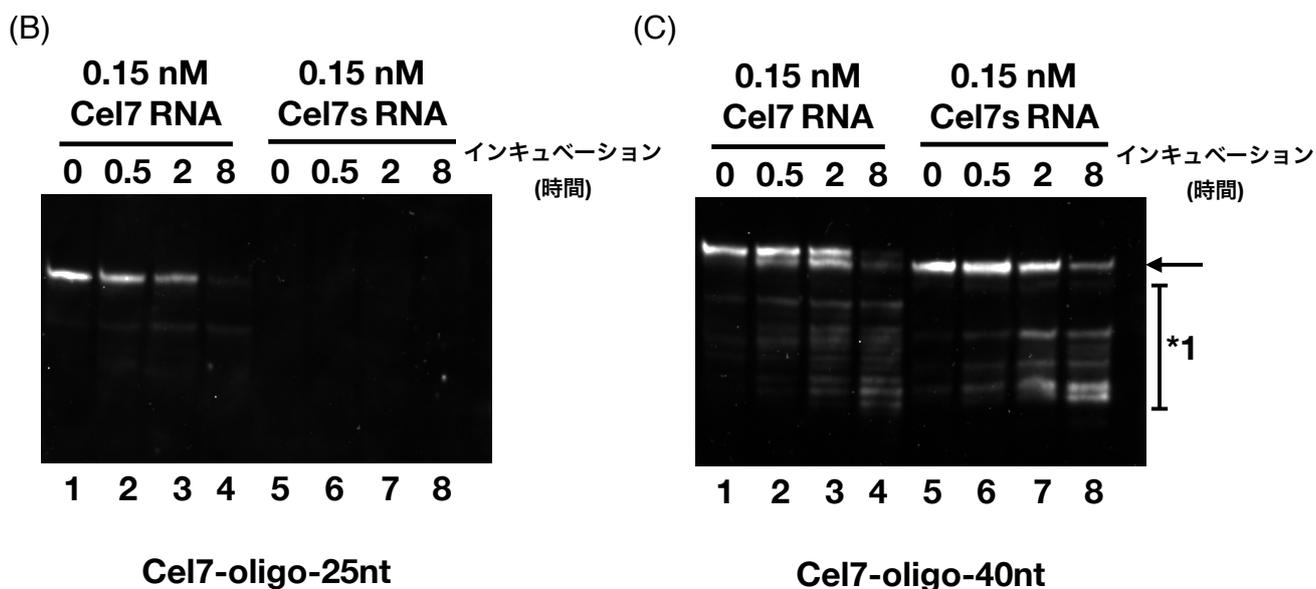
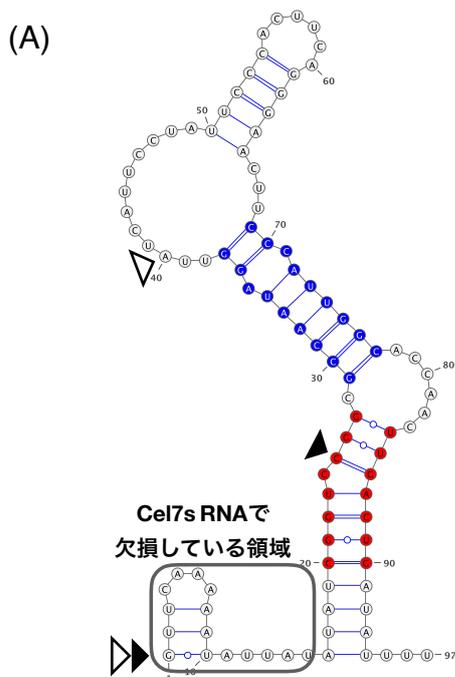


図22. in vitroにおけるCel7 RNAの分解過程

(A) Cel7 RNAの予測二次構造と設定した2種類のプローブCel7-oligo-25nt (黒三角)とCel7-oligo-40nt (白三角)の位置。(B、C) Cel7 RNA (レーン1-4)とCel7s RNA (レーン5-8) RNAを20°Cで0-8時間インキュベーションした。インキュベーションする際のバッファーは図16で示したEMSAと同様。インキュベーションを終えたRNAは、変性ゲル (7 M 尿素12%ポリアクリルアミドゲル)を用いて電気泳動した。

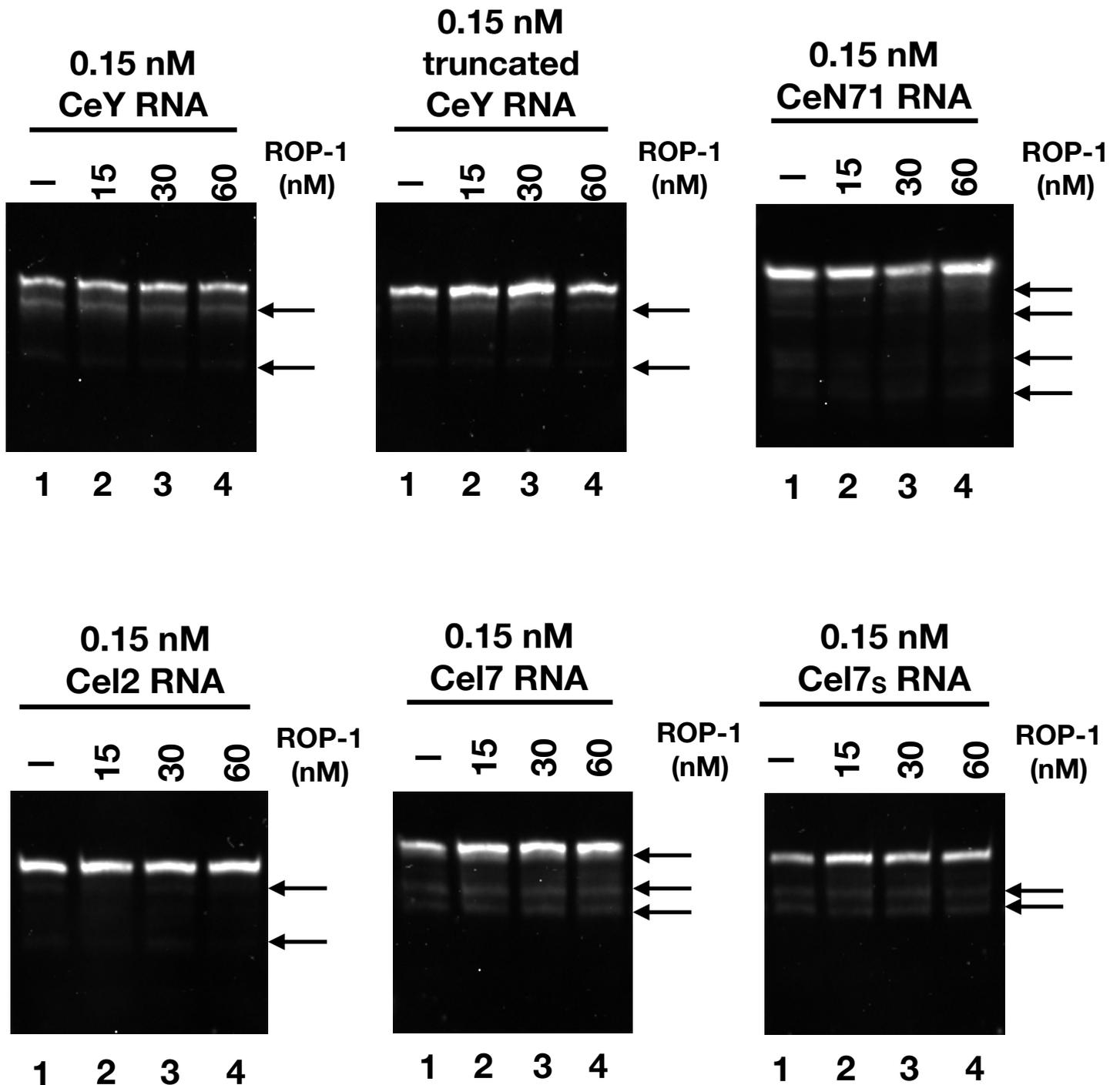


図23. EMSAにおけるRNAの分解の有無

図19で示したEMSAと同様の条件でRNAを熱変性、ROP-1と混合し、20°Cで30分間インキュベーションした。インキュベーション後、サンプルを変性ゲル(7 M 尿素12%ポリアクリルアミドゲル)を用いて電気泳動した。

(B)

	CeY	CeN71	CeN72	CeN73-1	CeN73-2	CeN74-1	CeN74-2	CeN75	CeN76	CeN77	CeN133	CeN134	CeN135	Cel1	Cel2	Cel3	Cel5	Cel6	Cel7
CeY		50	80	80	40	70	70	70	70	80	50	50	70	80	60	70	50	50	50
CeN71			70	40	40	70	70	60	60	60	30	60	70	70	60	70	60	60	70
CeN72				80	80	90	90	80	80	80	70	80	70	100	80	80	80	80	80
CeN73-1					80	90	90	60	60	80	60	60	70	80	80	60	60	80	60
CeN73-2						90	90	60	60	80	70	70	30	80	80	60	70	80	70
CeN74-1							100	70	70	90	80	80	60	90	90	70	80	90	80
CeN74-2								70	70	90	80	80	60	90	90	70	80	90	80
CeN75									90	70	60	60	40	80	60	90	60	80	60
CeN76										70	70	60	40	80	60	80	60	70	60
CeN77											80	70	30	80	80	70	70	90	70
CeN133												80	30	70	60	60	80	80	80
CeN134													30	80	70	60	100	70	90
CeN135														70	50	50	30	40	50
Cel1															80	80	80	80	80
Cel2																60	70	80	70
Cel3																	60	80	60
Cel5																		70	90
Cel6																			70
Cel7																			

(C)

	CeY	CeN71	CeN72	CeN73-1	CeN73-2	CeN74-1	CeN74-2	CeN75	CeN76	CeN77	CeN133	CeN134	CeN135	Cel1	Cel2	Cel3	Cel5	Cel6	Cel7
CeY		40	30	30	30	30	30	50	40	40	20	30	30	40	30	20	30	30	80
CeN71			50	60	40	70	80	60	70	60	50	40	50	100	90	60	40	80	30
CeN72				60	60	50	40	30	40	30	70	80	50	50	60	50	80	40	20
CeN73-1					60	60	70	50	50	20	50	40	60	60	70	60	40	70	30
CeN73-2						60	50	50	30	30	70	50	40	40	40	40	50	50	40
CeN74-1							90	40	50	50	50	40	40	70	60	40	40	90	40
CeN74-2								30	40	30	40	30	30	80	70	50	30	100	40
CeN75									50	50	50	40	30	60	40	40	40	30	30
CeN76										40	50	50	50	70	70	70	50	40	30
CeN77											30	40	30	60	50	40	40	30	50
CeN133												70	40	50	50	50	70	40	20
CeN134													40	40	50	60	100	30	20
CeN135														50	60	50	40	30	30
Cel1															90	60	40	80	30
Cel2																60	50	70	30
Cel3																	60	50	20
Cel5																		30	20
Cel6																			40
Cel7																			

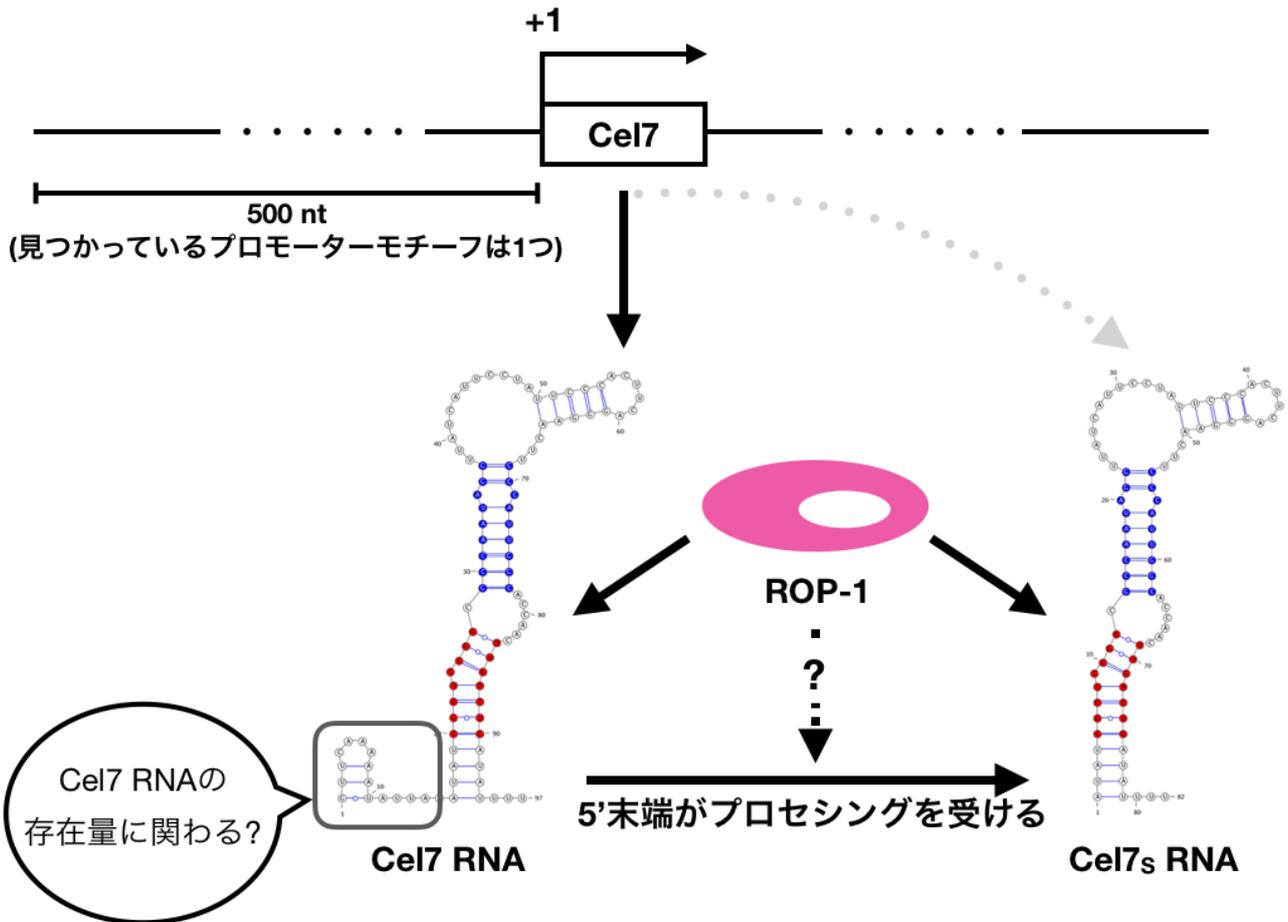


図25. Cel7s RNAの成熟過程とCel7 RNAの安定性の安定性

Cel7 RNA遺伝子上流にRNAポリメラーゼIIIのプロモーターモチーフが見つかることから、Cel7 RNAはRNAポリメラーゼIIIによって転写される。現在見つかるプロモーターモチーフは、1つのみであることからCel7s RNAは、Cel7 RNAの5'末端がプロセッシングを受けてできると考えられる。Cel7 RNAとCel7s RNAの存在量は、線虫の発達段階によって異なる。L1からL4幼虫期まではCel7 RNAの存在量がCel7s RNAより多いが、成虫と受精卵においてはCel7s RNAの存在量がCel7 RNAを越える。この傾向は、Cel7s RNAが精子もしくは卵母細胞を介して次世代へ持ち越されていることを示唆する。Cel7 RNAの5'末端は小さいステムループ構造を形成する。この構造がCel7 RNAの存在量がROP-1の有無に影響を受けないことと関係している可能性がある。