

論文内容の要旨

申請者氏名 上野 大心

遺伝子発現の調節において、RNA の安定性は様々な生物種において重要な役割を担っている。RNA の分解機構は、ポリ A 鎖の短縮に依存する分解機構と、エンドヌクレアーゼ等による RNA 内部配列の切断に依存する分解機構に大別することができる。この中でポリ A 鎖の短縮に依存する分解機構に関しては、これまで酵母等において詳細な解析が行われてきたが、RNA 内部配列の切断に依存する分解機構に関しては、microRNA を除き、動植物、酵母を含め不明な点が数多く存在している。これまで、RNA 切断部位を検出する手法は複数報告されていたが、ポリ A 鎖付き RNA を濃縮しているため、検出される切断部位が RNA の 3' 末端側に偏るなど正確な切断部位の検出に至っておらず、各切断部位の切断のされやすさを正確に数値化することができなかった。

そこで第一章では、従来の網羅的な切断部位解析法の問題点を改善した Truncated RNA end sequencing (TREseq) 法をシロイヌナズナにおいて確立した。TREseq 法は、rRNA 除去法とランダムプライマーを用いることで、ポリ A 鎖付き RNA を濃縮せずに網羅的に RNA 切断部位を検出できる。実際に、検出された切断部位の RNA 内における分布をみるとポリ A 鎖付き RNA を濃縮した場合と比較し、3' 末端側への偏りは大幅に軽減されていた。加えて、TREseq 法を用いた解析においては、従来手法では認められなかった切断のされやすさと RNA 半減期に負の関係性が初めて認められ、これまでの手法と比べより正確に RNA 切断部位と切断率を評価できることを示している。

続く第二章では、TREseq 法を用いて取得したシロイヌナズナやショウジョウバエ、出芽酵母などの網羅的な切断部位情報を使用し、解析を行ったところ、切断率が高いほど切断部位周辺の G 塩基比率は高い傾向がシロイヌナズナで認められ、類似する傾向が酵母やショウジョウバエでも認められた。また、RNA 上の翻訳状態（リボソームの存在位置、存在量）に着目したところ、翻訳過程は各切断部位の切断率に正の影響を与える一方で、切断部位の位置決定には大きく関与しないことが示された。

これまでの解析から配列等の複数の要因が切断率に関与することが予想されたため、第三章では切断率に関わると想定される複数要因（特徴）について、シロイヌナズナを対象に LASSO 回帰を用いた特徴選択を行った。その結果、切断率には切断部位周辺の G 塩基比率に加え、RNA 上に存在するリボソーム存在量が大きく関与することが示唆された。実際に、レポーター遺伝子内の切断部位周辺の塩基に置換することで切断率が大幅に減少することや、5' UTR 配列の置換によりリボソームのリクルート効率（リボソーム存在量）を向上させることで各切断部位の切断率が上昇することから、植物細胞内において、これらの特徴は RNA 切断に大きく関与していると考えられた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 上野 大心

RNAの安定性は遺伝子量を調節する重要な機構の一つとして知られている。RNAの分解機構は、ポリA鎖の短縮に依存する分解機構とエンドヌクレアーゼ等によるRNA内部配列の切断に依存する分解機構に大別でき、これまでポリA鎖の短縮に依存する分解機構に着目した研究が酵母等を中心に盛んに行われてきた。一方で、RNAの内部配列の切断に依存する分解機構については、複数の網羅的なRNA切断部位の同定法を用いて解析が行われてきたが、手法上の問題により正確なRNA切断部位情報や切断のされやすさ(切断率)に関する情報を取得できず、その詳細は明らかではなかった。申請者は、従来の網羅的な切断部位解析法を改良し網羅的に切断部位情報を取得後、植物RNA切断機構に関与する要因(特徴)について解析を行い、以下に示す知見を得た。

これまで、複数の先行研究でRNA切断部位を網羅的に検出する手法が報告されてきたが、ポリA鎖付きRNAを濃縮していたため切断部位の検出効率に偏りが生じ、切断のされやすさとRNA半減期には関係性が認められなかった。今回、申請者が確立したTruncated RNA end sequencing (TREseq)法は、ランダムプライマーを用いてライブラリーを作製することで、切断部位の検出効率の偏りを大幅に改善し、遺伝子単位の切断率と半減期との間に負の関係性が初めて認められた。この結果は、ポリA鎖の短縮に依存する分解機構に加え、エンドヌクレアーゼ等による内部配列の切断機構に依存する分解機構についてもRNA安定性に大きく関与することを示している。

また、TREseq法を用いて取得した切断部位情報を使用し、切断部位周辺の配列特徴を調べると、切断率が高いほど切断部位周辺のG塩基比率は高い傾向がシロイヌナズナで認められ、類似する傾向が酵母やショウジョウバエなど幅広い生物種でも存在していた。加えて、RNA上の翻訳状態(リボソームの存在位置、存在量)に着目したところ、翻訳過程は各切断部位の切断率に正の影響を与える一方で、切断部位の位置決定には大きく関与しないことが示された。

これまでの解析から、切断率には切断部位周辺の配列や翻訳過程など複数の要因が関与することが予想されたため、切断率に関わると想定される複数要因(特徴)について、シロイヌナズナを対象にLASSO回帰を用いた特徴選択を行った。その結果、切断率には切断部位周辺のG塩基比率に加え、RNA上に存在するリボソーム存在量が大きく関与することが示唆された。実際に、*in vivo*の実験系でも切断部位周辺の配列やRNA上の翻訳状態を変えることで切断率は大きく変動することから、LASSO回帰により選択された特徴が植物細胞内でRNA切断に大きく関与していることを示している。

以上のように、本論文は植物RNA切断機構の解明の一助となるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】