

氏 名	曾 根 正 光
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 140 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	新規核内ドメインを形成するノンコーディング RNA Gomafuの同定と その機能解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 松 崎 文 雄 教 授 井 上 丹 教 授 石 川 冬 木

論 文 内 容 の 要 旨

近年の網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、哺乳類のゲノムにおいてこれまで考えられていたよりも遥かに広範囲の領域が転写されており、その転写産物の多くがmRNA様の構造を取りながら、タンパク質の読み枠を持たないノンコーディングRNA (mRNA-like ncRNA) であると考えられている。しかし、それらのRNAが生体内においてどのような機能を果たしているかについてはほとんど未解明である。

申請者は、マウスの網膜において、細胞タイプ特異的な発現をする遺伝子をスクリーニングする過程で、転写産物が核に局在するユニークな遺伝子を同定した。この遺伝子は成体においては、網膜の神経節細胞やアマクリン細胞、海馬のCA1ニューロンなど特定のニューロンに発現が見られ、主に最終分裂後に発現を開始する。その転写産物は、スプライシングを受け、ポリAテールも備えたmRNA様の構造を持つが全長8.7kbにわたって有意な読み枠を持たないmRNA-like ncRNAであった。そして、一般的なmRNAとは異なって核に局在し、蛍光*in situ* hybridizationにより細胞内局在を詳しく調べると、その転写産物は多数のドット状シグナルとして検出された。このような特徴的な発現パターンからこの遺伝子をGomafuと名付けた。

次に、Gomafu RNAの局在する領域が核内のどのような構造と対応するのかを調べるため、既知の核内ドメインとの二重染色を行ったが、Gomafuは核小体、核スペckル、PMLボディ、カハールボディなど主要な核内ドメインとは共局在しなかった。また、核に局在することが知られているXistやmEvf-1といったmRNA-like ncRNAとの二重*in situ* hybridizationを行ったが局在が一致するものはなく、Gomafu RNAは新規の核内ドメインを形成しているものと考えられた。また、Gomafu RNAは界面活性剤、DNase、塩によって染色体と核内の可溶性分画を除いた後に残る核マトリックスという分画に存在したが、一般的な核マトリックス成分であるMatrin3とはほとんど共局在せず、独自のドメインを形成していた。

さらに、Gomafu RNAの核局在のメカニズムを調べるため、まず、核と細胞質の間をシャトリングしている可能性についてヘテロカリオンアッセイにより検証した。その結果、Gomafu RNAが転写後、細胞質には搬出されず、核に保持されたままであることが明らかとなった。次に、Gomafuが核局在するためのシスエレメントを同定するため、培養細胞にGomafu遺伝子断片を強制発現させ、その局在を調べた。しかしながら、タンパク質におけるNLSのような明確なシグナル配列は同定できず、Gomafuの核局在シグナルはその全長に渡って冗長的にコードされていることが示唆された。

Gomafuの機能を解析するため、Gomafu遺伝子を完全に欠損したノックアウトマウスを作製した。しかしGomafuノックアウトマウスは成体まで生育可能で、生殖能力も持っていた。成体の脳をサンプルとした標準組織染色やマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行ったが、ノックアウトマウスと野生型個体の間で顕著な差は見られなかった。よって、Gomafuは通常の生育環境下では必ずしも必須ではないと考えられた。

以上、ノンコーディングRNA Gomafuは転写に伴い、スプライシングやポリAの付加といったmRNAと同様のプロセッシングを受けるのにも関わらず、核外に搬出されることがなく、核において新規のドメインを形成している。これは、mRNA

前駆体のスプライシングと核外搬出が共役しているという知見を考え合わせると非常に興味深い。また、ニワトリに相同遺伝子が存在することから、高等脊椎動物で保存された機能を核内で担っている可能性が考えられる。現在のところ、Gomafuが機能分子であることを強く示唆する結果は得られていないが、今後の詳細な解析により、膨大なmRNA-like ncRNAの機能の一端が明らかにされるかもしれない。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の中樞神経系において細胞層の特異性がどのように決定されるのかは発生生物学における大きな謎の一つである。申請者は、それぞれの細胞層を構成する細胞タイプを区別するためのマーカーが豊富である網膜をモデル系として、single cell PCRという新しい手法を取り入れることでこの問題を解き明かそうとした。そして、層形成初期の網膜において神経節細胞と光受容細胞という2種類の細胞で異なって発現する遺伝子を11個同定した。それらの遺伝子はいずれも神経節細胞あるいは光受容細胞のマーカー遺伝子としては知られておらず、新規の細胞タイプ特異的遺伝子を同定するという目的を達成した点は評価される。層形成に関わると考えられる遺伝子を見出すことはできなかったが、上記のスクリーニングにおいて彼は以下に示す非常にユニークな性質を持つ遺伝子Gomafuを同定した。

- (1) Gomafu RNAはスプライシングなどのプロセッシングを受け、成熟したmRNAと同様の構造を取りながらも細胞質に搬出されることなく核に留まるノンコーディングRNAである。一般的に、mRNAの転写、スプライシング、核外輸送は共役しており、特にスプライシング反応によって核外輸送因子がリクルートされることによりmRNAの細胞質への搬出が促進されることが知られる。そのため、核局在するGomafu RNAの存在は非常に例外的であり、そのメカニズムを解明することはRNA輸送の研究に大きな進展をもたらすものと考えられる。
- (2) Gomafu RNAは核において多数の粒子状のドメインを形成し、それは現在知られているいずれの核内ドメインとも重ならないことがなかった。申請者が用いたRNAの検出方法は酵素反応を用いる一般的な染色法よりも解像度が高く、Gomafu RNAの細胞内局在についての解析は信頼性が高いと言える。多数の核タンパク質や核内ノンコーディングRNAとの関係について二重染色により詳細に調べ、説得力のあるデータに依ってGomafu RNAからなる核内ドメインの新規性について明らかにした点は評価に値する。
- (3) Gomafu RNAは神経系組織において特定のニューロンに発現し、転写因子やDNA修復因子等が集積する核マトリックスに存在する。細胞タイプや細胞の分化段階によって異なるタンパク質が核マトリックスの構成成分となっていることが知られている。しかし、そこに含まれるRNAの性質についてはタンパク質ほど解析が進んでおらず、Gomafu RNAは細胞タイプ特異的なmRNA-likeノンコーディングRNAとして同定された初めての例である。

また、申請者はGomafu遺伝子を完全欠損したノックアウトマウスを作製し、標準組織染色やマイクロアレイ解析により、この遺伝子が組織形成や遺伝子発現に機能を果たす可能性について検証した。未だ顕著な差異は見出せていないものの、機能の推測が困難なGomafuの解析手段としては道理にかなっており、得られたデータの信頼性も高い。

以上のように、申請者は非常に興味深い局在を示すノンコーディングRNA Gomafuを同定し、詳細な解析によりその新規性を明らかにした。これまでのところその研究は記述的な段階に留まっているものの、今後のGomafuの解析が数多く存在するmRNA-likeノンコーディングRNAの役割について新たな視座を提供する可能性がある。よって本論文は、博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成20年1月22日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。