

氏 名	さ さ き ただまさ 佐々木 忠将
学 位 の 種 類	博士（生体情報）
学 位 記 番 号	第 1 号
学位授与の日付	平成17年3月24日
学位授与の要件	課程博士 本学学位規則第3条第2項該当 (システム自然科学研究科生体情報専攻)
学 位 論 文 題 目	葉緑体の RNA エディティング部位の網羅的同定と新しい <i>in vitro</i> RNA エディティング系を用いたシス配列の解析
論 文 審 査 委 員	(主査)教授 杉浦 昌弘 (副査)教授 森山 昭彦 (副査)教授 谷本 英一 (副査)教授 岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科)

論文内容の要旨

遺伝子が発現（機能）するためには、遺伝子（DNA）の情報がまず RNA に転写され、次いで、タンパク質へと翻訳されなければならない。そのため、ゲノム DNA の全塩基配列を決定することは遺伝子発現解析や機能解析を行う上で非常に重要である。しかし、DNA の情報が転写後の RNA の段階で変化する RNA スプライシングと RNA エディティングが知られている。RNA エディティングとは、ゲノム DNA の配列が転写後に RNA レベルで改変（エディティング：編集）する現象で、ウィルスからヒトまで広く見出されている。しかし、エディティングが起こる部位を予測することは現段階では不可能である。

本研究では、ゲノムサイズが小さく、遺伝子解析が進んでいる植物細胞中の葉緑体をモデルとして用い、RNA エディティング部位の網羅的な同定とエディティングの分子機構の解析手法の開発、並びにそれを用いてのエディティングに必須の RNA 上の配列の同定を目的とする。解析に用いたタバコの葉緑体ゲノムは 155,934 塩基対からなり、これまでに 114 種の遺伝子が見出されており、葉緑体形質転換法や各種 *in vitro* 遺伝子発現系が開発されており、

最もゲノム解析が進んでいる。既に 31 ヶ所のシチジン残基 (C) からウリジン残基 (U) へ変換する RNA エディティング部位がメッセンジャー RNA (mRNA) のタンパク質コード領域で同定されている。このうち 1 ヶ所はコドンの 3 番目で C から U への変換が起こるため、アミノ酸の変化を伴わないが、残りの 30 ヶ所では、種間で保存されているアミノ酸を獲得するため、機能的なタンパク質の生成に必要であろうと考えられている。

葉緑体ゲノムの正確な解読には網羅的な知見が不可欠であるので、本研究では、さらにエディティング部位の探索を行い、5 ヶ所の新たな部位を同定した。このうちのひとつの部位は、種間で保存されたアミノ酸から異なるアミノ酸へと変化することを明らかにした。このような例は初めての発見で、RNA エディティングの担う新しい役割を提唱した。

RNA エディティングの最も興味深い点は、特定の C だけがどのように正確にエディットされるのかという部位認識機構である。この認識機構の解明には、エディティングに必要な mRNA 上のシス配列を詳細に解析できる *in vitro* 系が不可欠である。先に当研究グループで開発されたタバコ葉緑体 *in vitro* RNA エディティング系はラジオアイソトープを用いる煩雑で長時間を要する系であった。そこで、ラジオアイソトープを用いない簡便かつ迅速なアッセイ法を開発し、さらに高活性な葉緑体抽出液の調製法を確立した。この改良 *in vitro* 系を用い、RNA エディティングに必須の配列を体系的に同定する第一歩として 19 ヶ所の NADH 脱水素酵素サブユニット遺伝子 (*ndh*) 群の mRNA における *in vitro* でのエディティング効率を測定した。次いで、*ndhB* mRNA サイト 2 と *ndhF* mRNA をモデルに RNA エディティングの部位認識機構の解析を行った。その結果、*ndhB* mRNA サイト 2 ではエディティング部位の上流 10 から 6 ヌクレオチドの 1 ヶ所、並びに *ndhF* mRNA では上流 40 から 36 ヌクレオチドおよび上流 15 から下流 6 ヌクレオチドの 2 ヶ所がエディティング反応に必要な配列であることを決定した。これらの結果とこれまでに報告されている知見から、葉緑体における RNA エディティングには少なくとも 3 種類の部位認識機構が存在するというモデルを提唱した。

これらの成果は、エディティング部位の予測法の開発や、他の生物での RNA エディティング機構の解明に寄与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

遺伝子が機能するにはゲノム DNA の塩基配列が RNA に転写されタンパク質に翻訳されなければならない。この際、転写後に RNA の配列の一部が変化する現象として RNA エディティングが知られているため、ゲノム情報の正確な理解のためにはエディティングを受け

る配列の網羅的知見が必須である。

本研究では、ゲノムサイズが小さく解析の容易な葉緑体ゲノムをモデルとしてRNAエディティングの研究を行った。タバコの葉緑体では既に31ヶ所のエディティング部位が同定されていたが、新たに5ヶ所の部位を同定し、タンパク質コード領域に於いてほぼ網羅的に同定を終えることができた。この成果を基に、エディティング部位の予測法の開発を試み、完成までに克服すべき問題点を提示した。ついで、RNAエディティングの分子機構を解明するための *in vitro* 反応系の改良を行い、放射性同位元素を用いない新たな分析法の開発に成功した。この手法は特別な施設を有しない研究室でも利用できるものである。この *in vitro* 系を用いて、2種のメッセンジャーRNAのエディティングの必須の配列を同定した。得られた結果はまだ定性的ではあるが、このデータをもとにエディティング機構の新しいモデルを提唱した。

本研究は、新しい手法の開発と新しいモデルを提唱し、独創性を発揮しようという努力が認められ、更に実験分子生物学から情報学的アプローチの試みにも立ち入り、生体情報という学際的分野の開拓も試行している。また、分子生物学全般にわたる幅広い学識も身に付けている。

従って申請者は、博士（生体情報）の学位を授与される資格があるものと認められる。