

論文内容の要旨

申請者氏名 近藤 武史

近年の大規模なトランスクリプトーム解析により、哺乳類の poly(A)転写産物の約 50%が、非常に短い ORF(short ORF, sORF; 100 アミノ酸以下)しか含んでいないことが明らかになっている。このような sORF のみを含む転写産物の多くは、タンパク質をコードしない機能性 RNA として働くと考えられているが、一方で短鎖ペプチドをコードしている可能性も指摘されており、その遺伝子産物が何であるかも含めて不明な点が多く残されている。

polished rice (pri) RNA は、当研究室において同定された 133 個のショウジョウバエ sORF 転写産物のうちの一つである。*in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行ったところ、*pri* RNA は胚発生中期以降において表皮や気管、前腸及び後腸などの上皮組織で特異的に検出され、胚発生において重要な役割を果たしていることが期待された。*pri* 転写領域を完全に欠失した null 変異系統は胚性致死であり、幼虫腹側表皮に見られる特徴的な構造である歯状突起や、背側表皮に形成される dorsal hair の欠失が観察された。一方、気管においては気管の機械的強度を支える taenidial fold と呼ばれるクチクラ構造に異常がみられることが明らかとなった。歯状突起および気管の taenidial fold の形成には頂端面に形成される特殊なアクチン繊維の束構造が必須であることが報告されているが、*pri* 変異体ではこれらアクチン繊維の束構造の形成が全く見られなかった。

pri RNA に存在する 10 個の sORF のうち、ORF1~5 は種間で高度に保存されており、非常に短いペプチドをコードしている可能性が考えられた。全長 cDNA 中の ORF1~5 のそれぞれに EGFP を融合させたコンストラクト(ORF1~5-EGFP)を作製し、ショウジョウバエ S2 細胞へ導入したところ、ORF1~4-EGFP では強い蛍光が見られ、ORF1~4 は培養細胞内で翻訳されることが示された。ORF1~4 のいずれかの強制発現により *pri* 変異体で見られる表現型(歯状突起の欠失)が完全に回復し、ORF1-4 のすべてにフレームシフトを導入した全長 cDNA の場合には表現型の回復が見られなかったことから、*pri* はポリシストロニックな mRNA として転写され、そこから翻訳される機能的に重複した複数の短鎖ペプチド (11 あるいは 32 aa) が、*pri* の遺伝子産物として機能することが明らかとなった。

これらの結果は、ゲノム上に存在する膨大な数の sORF 転写産物の生物学的な役割の一端を明らかにしたばかりでなく、これまで研究対象とされることの少なかった非常に短い ORF にコードされる短鎖ペプチドの重要性を強く示唆するものである。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 近藤 武史

モデル生物のゲノム配列が次々と解かれ、ゲノム機能の網羅的な解析が声高に叫ばれるようになってから久しい。しかしながら、トランスクリプトーム解析をはじめとする網羅的な解析は、sORF 遺伝子をはじめとする今まで知られていなかった新しいタイプの遺伝子の存在が多数存在することを明らかにしており、我々の知識は甚だ不完全なものであることを知らしめているようにも思える。本研究は、そのような我々の欠落した知識の一つを補完するものである。

本研究の成果は大きく二つに分けることができる。一つはショウジョウバエにおける新規の RNAi ベクターの開発とこれを応用した RNAi スクリーニングによる *polished rice* 遺伝子の同定である。RNAi ベクターそのものは既存の原理をショウジョウバエに応用したものであるが、イントロンの選定を含めた細かな改良を重ね、効率の良いベクターを開発したことは評価できる。また、機能不明な 6 個の sORF 遺伝子を対象に行ったパイロットスクリーニングにより実際に必須遺伝子である *polished rice* を見出し、その有用性を証明している。

研究の後半は、*polished rice* 遺伝子産物の同定とその生理機能の解析に費やされている。*polished rice* 遺伝子がポリシストロニックな mRNA として転写され、複数の短いペプチド (11 アミノ酸は真核生物の ORF としては最も短いものである) をコードしている特異な遺伝子であることを明らかにしたことは、従来の真核生物における遺伝子構造の概念に修正を迫るものであり、特筆に値する。また、変異体の表現型の解析から、*pri* 遺伝子が上皮細胞の細胞頂端に存在するアクチン束構造の形成を介して歯状突起やテニディアなどの各種細胞突起の形成に関与することを明らかにするなど、生理機能に関しても詳細な解析が行われており、結果として細胞生物学的にも非常に興味深い研究となっている。遺伝子産物そのものの生化学的活性に関しては不明であるものの、遺伝学的な解析からは上皮の分化を制御している転写因子である *Shavenbaby* との相互作用が強く示唆されており、*pri* 遺伝子の活性が周辺の細胞まで及ぶことから、細胞間シグナルと細胞分化に関する新しい制御機構の発見につながる可能性が期待される。

本研究は、初期のスクリーニングの段階から遺伝子の機能解析に至るまで、周囲の研究者との議論を重ねながら申請者自身が展開させたものであり、その研究遂行能力は高く評価される。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。