

# 論文審査の結果の要旨

氏名 櫻井 雅之

A-to-I RNA エディティングとは、mRNA 前駆体等の二本鎖領域におけるアデノシン(A)が二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ(ADAR)によりイノシン(I)へと塩基修飾される機構であり、線虫からヒトまでの後生動物にみられる RNA プロセッシング機構の一つである。その機能としては mRNA のアミノ酸変化・選択的スプライシング・細胞内局在・分解や、タンパク質リン酸化・miRNA/siRNA 機構抑制等の遺伝子発現制御機構が知られており、高次生命現象を担う要因の一つとして考えられている。しかしこれまでに同定されたエディティング部位は偶然発見されたごく少数のものに限られていた。

本研究では、最も多様な遺伝子発現制御機構を有するヒトの mRNA における新規 A-to-I RNA エディティング部位の網羅的同定を目的とし、これを可能とする技術の開発及び候補部位データベースの構築を行い、新規部位を探索した。本論文は3章から構成されている。

第1章では、新規 I 部位同定技術について述べている。従来の I 部位検出法としては、RNA (cDNA として増幅) とゲノムで相当する領域の配列を比較する方法が用いられていた。I は cDNA 増幅過程でグアノシン(G)へと反映されるため、エディティング部位ではゲノム上の相当塩基が A であるにも関わらず、cDNA 上では G または A/G の混在として検出される。しかしこの手法では、I に由来する G の混在と、反応時のエラー・ノイズや一塩基多型(SNP)など I 以外に由来する G の混在との判別が不可能である。また、同一組織由来の RNA とゲノムが必要であるため、微量な試料の解析は難しい。本章ではこれらの問題を解決する新規 I 部位同定技術: ICE (Inosine Chemical Erasing) 法を開発した。この手法では、RNA 鎖中の I 特異的に化学修飾を施すことで、逆転写による cDNA の伸長をこの I 特異的に停止させる。最終的にこの伸長停止に起因するシグナルの消失を検出することで、I の存在を証明する。この手法により、従来は不可能であった I の存在証明及びノイズとの判別が可能となり、さらに試料としてはごく微量の RNA のみで検証可能となった。現在までに ICE 法と代替可能な手法は存在せず、最も簡便で高感度な手法である。

第2章では、ゲノム・EST データベースを利用した RNA エディティング候補部位データベースの構築について述べている。EST をアライメントした際、塩基が混在する部位はこれまで cSNP(cDNA 間の一塩基多型)として処理されていた。本章ではこの中に

RNA エディティング部位が含まれていると考えた。ゲノム配列が A のみであり、EST 配列では A/G 混在もしくは G である部位を抽出し、RNA エディティング候補部位として 7 万箇所程抽出した。この第一次候補部位群からさらにノイズの除去及び優先項目による絞込みを行った後、186 候補部位(186 遺伝子)を選出した。RNA エディティング候補部位の絞込みに関しては、株式会社メイズとの共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものである。

第 3 章では RNA エディティング候補部位の ICE 法によるスクリーニングと、同定された新規 RNA エディティング部位について述べている。ICE 法により候補部位を検証した結果、ヒト男性の脳において 31 遺伝子、候補部位周辺も含めて 226 箇所の新規 RNA エディティング部位が同定された。そのほとんどが 3'非翻訳領域に位置しており、多くの場合、部分的なエディティングが 200 塩基程度の領域内に複数箇所存在する。同領域が mRNA 前駆体中で二本鎖を形成する際の相補鎖はイントロンの場合が多く、同様にエディティングが起きている可能性が高い。以上の知見から、これらのエディティング部位が選択的スプライシング・核外輸送阻害・選択的分解機構との関わりを持つ可能性が考えられる。また、組織特異的なエディティングを示す部位の存在が確認され、遺伝子発現制御機構の組織特異性への寄与が考えられた。

以上のように本論文では、新規イノシン部位同定技術の開発と RNA エディティング候補部位データベースの構築により、新規 RNA エディティング部位を同定することに成功している。本論文で開発された新規イノシン検出技術は、RNA エディティング研究の発展に大きく貢献するものである。また、本手法と提示された候補部位の解析から、ヒト mRNA における RNA エディティング部位の網羅的な同定が十分に可能である。さらに新規に同定されたエディティング部位に関する知見から、新たな遺伝子発現制御機構の存在が示唆されており、RNA が関与する遺伝情報制御機構を理解する上で意義のある研究成果である。

なお、以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって博士（生命科学）の学位を授与できると認める。