

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

分裂酵母の性分化を抑制する長鎖ノンコーディングRNA nc1669の
解析

Analysis of a non-coding RNA nc1669, which represses sexual
differentiation of fission yeast

申請者

大野 悠

Yu ONO

生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

2023年12月

1. 論文内容の要旨

遺伝子 DNA は RNA への転写を経て一般的にタンパク質へと翻訳されることで機能を発揮すると理解されてきた。しかし近年、タンパク質に翻訳されずに機能を発揮する RNA の存在が脚光を浴びている。このような RNA はノンコーディング RNA (ncRNA) と呼ばれ、その種類・機能は多岐に渡る。しかしながら、ncRNA の中でも比較的分子量が大きく (200 塩基長以上) 発現量が少量である長鎖 ncRNA は、機能の解明が充分なされてはいない。そこで申請者の所属研究室では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において新規の機能性長鎖 ncRNA を探索するスクリーニングが実施された。すなわち、*S. pombe* とその近縁種の間で、塩基配列および二次構造の保存性が高い領域 CSM (Conserved Secondary-structure Motif) を有する ncRNA が機能を有する可能性が高いと想定し、その条件を満たす ncRNA をインフォマティクス的手法により *S. pombe* データベースから抽出した。選び出された機能性 ncRNA の候補となる因子についてそれぞれノックアウト株を作製し、多様なストレス環境下における表現型の有無を判定した。その結果、*SPNCRNA.1669* (以下 *nc1669*) という長鎖 ncRNA が性分化を抑制する可能性が示唆された。申請者はその分子機構について解析を実施した。

まず申請者は、*nc1669* が性分化の抑制に寄与することを立証した。野生型の分裂酵母は富栄養条件下では増殖を繰り返すが、窒素源が枯渇すると接合・減数分裂・配偶子形成過程からなる性分化を行う。先のスクリーニングで、*nc1669* ノックアウト株は窒素源存在下であるにもかかわらず細胞が接合する「接合亢進」の表現型を示すことが判明した。ところが、*nc1669* には他の長鎖 ncRNA である *nc1670* と *tRNA Glu08* が重複して存在するため、*nc1669* ノックアウト株が示す接合亢進は、これら重複 ncRNA の欠失に起因する可能性を排除できていなかった。そこで、*nc1669* の配列から *nc1670* の配列を除去した部分配列を *nc1669* ノックアウト細胞内で異所的に発現させたところ、接合亢進の表現型が抑圧された。さらに、*tRNA Glu08* 配列のみを異所的に発現させても接合亢進の表現型が抑圧されなかった。以上の結果から、性分化を抑制する機能を有するのは *nc1669* であると結論づけた。

続いて申請者は、*nc1669* が性分化に関わる他の因子の発現を制御する可能性を検証した。分裂酵母では、窒素源飢餓に応答し、性分化の開始に必須である *ste11* 遺伝子の発現量が増加することが知られる。*nc1669* ノックアウト株では、窒素源存在下にもかかわらず *ste11* の発現量が野生型と比較して有意に増加した。また、野生型 *nc1669* の発現量は窒素源飢餓条件下では窒素源存在下の 1 割程度に減少した。これらより、窒素源存在下では *nc1669* は *ste11* の発現を抑制するが、窒素源飢餓条件下では *nc1669* の発現が低下することで *ste11* の発現量が上昇し、性分化が誘導されるという分子機構が考察された。

最後に、申請者は *nc1669* の CSM 領域が機能ドメインである可能性を検証した。当該スクリーニングでは、塩基配列と二次構造の進化的保存性の高い ncRNA を機能性 ncRNA の候補と想定したことから、*nc1669* が機能を発揮するには CSM 領域が必須であると考えられる。これを立証するために、CSM

領域の塩基配列をシャッフルすることで本来の二次構造を形成できないように改変した *nc1669* の変異体を作製したところ、この変異体では *ste11* の発現が上昇し、接合亢進を示した。以上から、*nc1669* の *ste11* 抑制機構には二次構造を作る CSM 領域の存在が必須であることを立証した。

2. 論文審査結果

2023 年 7 月 12 日に開催された公聴会において、論文の内容に関する口頭発表およびその内容についての議論がおこなわれた。その概要を以下に示す。

- 1) 本研究の基盤となった *in silico* スクリーニングでは、塩基配列と二次構造の進化的保存性を考慮したが、塩基配列と二次構造以外にスクリーニングで使用可能な指標はあるのかについて議論がなされた。申請者は、タンパク質と相互作用する ncRNA を *in silico* でスクリーニングし、候補を選定した後に *in vivo* で機能の有無を検証する案を提示した。
- 2) *nc1669* ノックアウト株は、既知の *pat1-114* 変異体のように一倍体減数分裂の表現型を示すか、また、接合以降の性分化過程の進行状況について質疑がなされた。申請者は、*nc1669* ノックアウト株の細胞は一倍体減数分裂を示さないこと、接合亢進を示した細胞の中には減数分裂まで進行する細胞が存在することを観察していると回答した。
- 3) *nc1669* ノックアウト株では、窒素源存在下であるにもかかわらず接合した細胞の割合は 10%以下であることから、*nc1669* の *ste11* を抑制する機能は分裂酵母の生存戦略として重要性が低い可能性が指摘された。申請者は、*ste11* の発現はさまざまな経路によって制御されており、*nc1669* はその経路のひとつとして補助的なものである可能性について言及した。
- 4) 本研究の基盤となった *in silico* スクリーニングをヒトなどの哺乳類でおこなった場合、今回同様に候補因子の検出効率が低くなる可能性の有無について議論がなされた。RNAz は特定の生物種の RNA をターゲットにしたアルゴリズムではないため、その可能性があるとして申請者は説明した。また、他の生物種においても機能性 ncRNA のスクリーニングを行う際は、近縁種間において塩基配列と二次構造を比較する方法が最も有効な手段のひとつであると説明した。
- 5) *nc1669* が *ste11* の発現を抑制する際に、中間に *rse1* を介すると考えた根拠について質疑がなされた。申請者は、*nc1669* は *rse1* 同様 *ste11* の発現をシスに抑制することが示唆されたことから、この考えに至ったが、この仮説を実証するためにはさらなる実験が欠かせないと説明した。
- 6) *nc1669* ノックアウト株の一例として用いた *nc1669Δ* 株では、*nc1669* の 5' 末端側の領域を欠失しているが、3' 側に位置する CSM 領域を含む部分的な *nc1669* 配列が残存している。この欠失させた 5' 領域がどのような機能を有するか議論がなされた。当該欠失株において *nc1669* の 3' 側の残存部分は野生型と比較して 3 倍以上の高発現を示すものの、*ste11* 発現抑制効果を発揮しなかった結果に基づき、5' 末端側の領域は *nc1669* を *ste11* の遺伝子座へと誘導するために

必要な領域である可能性など、その機能が議論された。

- 7) CSM を有すると判定された 71 遺伝子のうち、アンチセンス RNA である 57 遺伝子への対応について質疑がなされた。申請者は、アンチセンス RNA のノックアウトはその相補鎖の遺伝子も同時にノックアウトされる問題を含むため、本研究の基盤となった *in vivo* スクリーニングではこれらのノックアウト株は作製されなかったと回答した。
- 8) CSM を有するとして抽出された遺伝子間 RNA の 14 遺伝子には、今回の *nc1669* のように他の ncRNA が重複して存在するものが見られるなかで、特に *nc1669* に着目した理由について質疑がなされた。申請者は、*in vivo* スクリーニングにおいて調べた範囲内でもっとも明確な表現型を示したノックアウト株が *nc1669* であったことを説明した。
- 9) 他の ncRNA 配列を重複して含む ncRNA について、その機能を解析する手法について質疑がなされた。申請者は、目的 ncRNA の CSM 領域に変異を導入することで二次構造を無効化すれば、目的 ncRNA の機能を効果的に解析できる可能性があるかと回答した。

以上の口頭発表および質疑応答により、申請者に当該分野に対する十分な学識と考察力があることが確認された。予備審査時に指摘された事項に対しては適切な修正がなされていること、また、論文の内容に剽窃等がないことも確認された。

本研究は、長鎖 ncRNA である *nc1669* が、性分化のマスターレギュレーター *stell1* の発現を抑制することにより性分化を阻止する、RNA レベルでの新たな分子機構を提案するものである。また、塩基配列と二次構造の進化的保存性に注目した *in silico* スクリーニングの有効性を実証するものであり、本研究は当該研究分野の発展に貢献すると考えられ、博士（理学）の学位論文としてふさわしいと判断した。

2023 年 10 月

審査員

主査	早稲田大学	教授	博士（理学）	東京大学	佐藤政充
副査	早稲田大学	教授	博士（医学）	慶應義塾大学	合田亘人
副査	早稲田大学	教授	博士（工学）	東京大学	常田聡
副査	早稲田大学	教授	博士（理学）	東京工業大学	浜田道昭