

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Location of 2'-O-Methyl Nucleotides in 26S rRNA and Methylation Guide snoRNAs in
Caenorhabditis elegans

(*Caenorhabditis elegans* 26S rRNA の 2'-O-メチルヌクレオチドの同定とメチル化に
関わる snoRNA 配列)

氏名 比嘉 三代美 (比嘉)

リボソーム RNA (rRNA) は、転写後に多数のヌクレオチドが修飾を受ける。特に 2'-O-メチルヌクレオチドは細菌からヒトまで広く認められ、rRNA の良く保存され機能的にも重要な領域に存在するが、その機能は分かっていない。多数の rRNA の塩基配列が報告されているが、メチル化ヌクレオチドを系統的に調べた研究は極めて少ない。近年 rRNA の修飾される位置が、核小体に存在する Small Nucleolar RNA (snoRNA) によって決められている事が報告された。この RNA は rRNA の 2'-O-メチルヌクレオチドの近傍に相補的な配列と、box C、C'、D、D' と呼ばれる特徴的な配列を持っている。本研究では、迅速にメチル化ヌクレオチドを同定する方法を開発し、RNA 機能研究に適した実験動物 *Caenorhabditis elegans* の 26S rRNA のメチル化ヌクレオチドを同定した。同時にこのメチル化




に関わる snoRNA 配列の検索を行った。

【方法】 *C. elegans* N2 を液体培養し、全 RNA を抽出した。この RNA を鋳型に 5'-Texas red 標識プライマーを用いて dNTP を各々 1、0.4、0.04 mM として 42℃ 1 時間の逆転写反応を行い、蛍光自動シーケンサーによって解析した。プライマーは 26S rRNA 配列の約 100 塩基毎に設定した。また、boxC/D snoRNA の特徴を手がかりにメチル化に関わる snoRNA 配列を *C. elegans* 全ゲノム配列中に検索した。

【結果と考察】近年、低濃度の dNTP を基質とする逆転写反応が、2'-O-メチルヌクレオチド特異的に停止する事を利用して、ラジオオートグラフィーによる同定法が報告された。これを改変して DNA シーケンサーを用いて同定を試み、より迅速に正確な結果を得る事が出来た。この方法によって *C. elegans* 26S rRNA 上に 38 個の 2'-O-メチルヌクレオチドを同

定した。そのうち、ヒトと酵母の相同ヌクレオチドもメチル化されているものが14個、ヒトまたは酵母のどちらか一方がメチル化されているものが14個、*C. elegans* 特有なものが10個だった。メチル化はドメインIVとVに集中していた。ドメインVにはリボソームの重要な機能であるペプチド結合形成活性がある。最近発表された細菌リボソームの結晶解析像と考え合わせて、メチル基は直接反応に関係するのではなく、反応に与るヌクレオチドの位置関係の微調整を行っていると思われる。同定されたヌクレオチドのメチル化に関わる boxC/D snoRNA を検索したところ、18個の snoRNA と考えられる配列を見出した。この配列が実際にRNAとして発現している事を確認する必要があるが、この配列を利用した RNAi 実験などによってRNAのメチル化の機能的意義の解析を進めていきたい。

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏名	比嘉三代美
		平成 14 年 11 月 28 日		
論文審査委員	主査教授	荻谷 研一		
	副査教授	陣野 吉廣		
	副査教授	松崎 吉訓		
(論文題目)				
Location of 2'-O-methyl nucleotides in 26S rRNA and methylation guide snoRNA in <i>Caenorhabditis elegans</i>				
(論文審査結果の要旨)				
<p>研究に至る背景と目的, 研究内容, 研究成果の意義, 学術的水準について検討し, 以下のような審査結果を得た。</p>				
<p>1. 研究の背景と目的</p> <p>リボソームRNA (rRNA) は数多くの2'-O-メチルヌクレオチド, プソイドウリジル酸などの修飾塩基を含んでいる。非常に多くの生物種のrRNAの塩基配列が決定されているにもかかわらず, 修飾ヌクレオチドの位置を決めた報告は極めて少ない。またこの修飾の機能的な意義も分かっていない。</p> <p>最近, 低分子核小体RNA (snoRNA) がタンパク質をコードしている遺伝子のイントロン中にコードされていることが発見され, 続いてこれがrRNAの修飾にかかわっていることが明らかになった。</p> <p>著者等は <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>) を修飾ヌクレオチドの機能を研究する最適なモデル生物と考え, 先ずその26S rRNAに含まれる2'-O-メチルヌクレオチドとその修飾にかかわるsnoRNAの同定を試みた。</p>				
<p>2. 研究内容</p> <p>先ず2'-O-メチルヌクレオチドの位置決定法を改良し, 初めてDNAシーケンサーによる解析に成功した。これを用いて <i>C. elegans</i> 26S rRNAの全長に亘って検索し38箇所の2'-O-メチルヌクレオチドを同定した。これを既に報告のある酵母およびヒトのそれと比較して, 14箇所でこれらの生物のあいだで保存されていることを示した。またメチルヌクレオチドはrRNAのドメインVと呼ばれる部分およびドメインIVの後3分1に集中</p>				

- 備考 1 用紙の規格は, A4とし縦にして左横書とすること。
 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
 3 *印は記入しないこと。

していたが、ドメインVはリボソーム大亜粒子の機能であるペプチド結合形成の中心となる部分であることから、メチル化の機能的な重要性を示唆している。

続いて、*C. elegans* ゲノム全配列を対象に、snoRNA の持つ配列上の特徴を指標として検索を行って、18 個の snoRNA 遺伝子と考えられる配列を見出した。

3. 研究成果の意義と学術水準

本研究は古くからその存在が知られながら研究が進んでいない rRNA 中の修飾ヌクレオチドの解析に比較的容易な方法を導入し、重要な実験動物の一つである *C. elegans* の 26S rRNA の 2'-O-メチルヌクレオチドの解析を行って、38 箇所のメチル化を検出したものである。

また検索方法を工夫し検出された部位のメチル化にかかわる可能性のある snoRNA を多く検出している。

ここで示された方法と得られた結果は今後の RNA 研究に大きく寄与し得るものであり、高い水準にある。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判定した。