

氏 名 (本 籍)	さ の まさ ゆき 佐 野 将 之 (山 梨 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3096 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	Development of an effective system for the expression of ribozymes with the cytoplasmic localization and high stability (細胞質に局在し高い安定性を示すリボザイム発現系の開発)
主 査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 農学博士 小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男

論 文 の 内 容 の 要 旨

リボザイムは、RNA鎖を部位特異的に切断できる能力を持つことから、特定遺伝子の発現抑制剤として癌やエイズなどの治療に有効であると考えられている。細胞内でリボザイムを有利に働かせるために転写量、安定性、細胞内局在、活性の4点を充分に考慮し、適切な発現系を用いることが重要である。当研究室ではリボザイム発現系としてRNAポリメラーゼⅢ系のtRNAプロモーターを利用している。この転写系では、プロモーター領域がtRNA配列の内部に存在するため、リボザイムは上流にtRNA配列が付加した形で転写される。我々はリボザイム発現系を構築する際、3'側のプロセッシングを避けるため、一部改変したtRNAの下流に人工的なリンカーを介してリボザイムを繋いでいる。このリンカー部分の配列およびその長さは転写産物の高次構造に影響を与え、この構造の違いにより細胞内でのリボザイムの局在性ならびに安定性が大きく変化する。リボザイムを細胞内で効果的に働かせるためには、最適なリンカー配列を利用し、安定性、局在性に優れたリボザイム発現系を構築する必要がある。

本研究ではまず最初に、tRNA付加型リボザイム(tRNAリボザイム)の細胞内局在を制御することを目的とし、tRNAリボザイムの細胞内局在機構の解析および細胞質への局在に必要な構造的特徴の解析を行った。リボザイムの標的であるmRNAは核内ではスプライソームやRNA結合タンパク質が多く付着しており、リボザイムが十分に機能できない可能性があるため、リボザイムの細胞質への局在はリボザイム活性を上昇させる重要な要因であると考えられている。当研究室で設計されたtRNAリボザイム転写物のtRNA部分がクローバーリーフ構造を保持しているものはヒトの細胞において細胞質に局在する。一方、この構造を人為的に崩したtRNAリボザイムは核内に蓄積する。このことからtRNAリボザイムの細胞質への輸送はtRNAの輸送経路を利用している可能性が考えられる。しかし近年、Exportin-t(Xpo-t)と呼ばれるtRNAの核外輸送受容体が同定され、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験ではtRNAリボザイムに類似した5'および3'に延長配列を持つ未成熟tRNAはXpo-tにより細胞質に輸送されることが報告された。

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞核への顕微注入の実験によりtRNAリボザイムはtRNAの核外輸送受容体であるXpo-tにより細胞質に輸送されないことを確かめた。しかし、HeLa細胞内でtRNAリボザイムは3'のプロセッシングを受けない状態で効率良く細胞質に輸送されることを確かめ、さらにプルダウンアッセイを用い

た実験から HeLa 細胞では tRNA リボザイムは Xpo-t と特異的に結合することを確認した。これらの結果から、アフリカツメガエル卵母細胞とヒト細胞では別の tRNA 輸送機構が存在することを示唆するに至った。

次に、tRNA とリボザイム配列を繋ぐリンカーをランダム化した tRNA リボザイムを用いたセレクションを行い、核および細胞質に局在する tRNA リボザイムの 2 次構造をコンピュータ予測により確かめた。その結果、細胞質に局在する tRNA リボザイムのみがクローバーリーフ構造を保持していた。

さらに本研究では、ランダムなリンカーの配列を含むリボザイム発現ベクターを用い細胞内で安定な tRNA リボザイムのセレクションを行った。リンカーの配列は tRNA リボザイムの細胞内での安定性に大きな影響を与えることが当研究室により確認されているが、最適なリンカー配列はまだ分かっていない。実際に、ランダムリボザイムのプールを培養細胞に導入し、細胞を転写阻害剤であるアクチノマイシン D で処理することで安定性に優れた tRNA リボザイムを得ることができた。その後、選択された tRNA リボザイムのランダム部位の配列を調べ、特異性があることを確認した。セレクションによって得られたいくつかの tRNA リボザイムの安定性ならびに活性は、以前当研究室で最適に設計された tRNA リボザイムと比べ、同等またはそれ以上であることが確かめられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究により得られた結果は、さらなる高効率リボザイム発現系を開発するためだけでなく、tRNA リボザイムの細胞内作用機序を解析するためにも非常に重要であると考えられる。そのため、tRNA リボザイムの細胞内局在機構の解析および細胞質への局在に必要な構造的特徴を解析し、さらに tRNA リボザイムは Xpo-t と特異的に結合することが確認された。さらに、核および細胞質に局在する tRNA リボザイムの 2 次構造をコンピュータ予測し、ランダムリボザイムのプールを培養細胞に導入して安定性に優れた tRNA リボザイムを得た。リボザイムの細胞内局在、その分子メカニズム、コンピュータシミュレーション、そして高効率リボザイムの選択方法の開発が世界で初めて示された。

以上のように、本研究はリボザイム作用の分子メカニズムの解明だけでなく、高効率リボザイムの発現系を開発し、応用性に富んだ独創的な研究でインパクトは大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。