

氏名(本籍)	なか やま あや 中山 文(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2819号
学位授与年月日	平成14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	細胞内高機能型リボザイムの速度論的解析及び遺伝子機能阻害ツールとしての基礎研究
主査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
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 田 仲 可 昌
副査	筑波大学助教授 理学博士 田 中 俊 之

論文の内容の要旨

ハンマーヘッド型リボザイムは、今までに見つかったリボザイムの中でも小型であり、必須配列などの情報が比較的良くわかっている。以前の研究で Amontov らは、このハンマーヘッド型リボザイムをさらに小さく改変することにより二量体で野生型とほぼ同等の活性を持つダイマー型ミニザイム(マキシザイム)の構築に成功した。本研究ではマキシザイムおよびリボザイムを細胞内で効果的に機能させることを目的として基礎研究を行った。そのうちマキシザイムについては以下の二点について研究を行った。

細胞内で効果的に標的RNAを切断するために、tRNAプロモーターを用いてリボザイムを発現させた場合には、リボザイム配列にtRNAの配列が付加することが知られている。このことをふまえて、細胞内でマキシザイムを発現させる場合に必然的に付加するtRNA配列が、マキシザイムの基質特異性や、RNA切断触媒活性に影響があるかどうかを*in vitro*で比較検討した。その結果、*in vitro*でのマキシザイムによるRNAに切断活性にはtRNA^{val}配列の付加による二量体への障害はなく、基質認識にも影響がないことが証明された。従って、このマキシザイムは生体内でtRNA^{val}配列が付加された状態で発現した場合でも活性を持つことが十分期待でき、またマキシザイムの発現系としてRNAポリメラーゼⅢ系(特にtRNA配列を付加するような転写系)を用いることができる可能性が強く示唆された。

次にマキシザイムの反応系に界面活性剤であるCTAB(cetyltrimethylammonium bromide)を加えることによって、細胞内環境に近似の反応条件下でのマキシザイムの活性評価を行い、生体内でのマキシザイムの活性を予測することを目的とする実験を行った。

CTABなどの界面活性剤や細胞内から抽出されてきたhnRNP A1などのタンパク質は、相補的な核酸同士の結合速度も促進し同時に解離速度も促進する効果(すなわち二本鎖の交換を促進させる効果)を持つということが示唆されている。従って二量体を組むことで初めて触媒活性能力を保持するマキシザイムを細胞内で働かせる際には、そのような因子の効果が非常に重要な問題になると予想された。しかし実際に*in vitro*において実験を行った結果、マキシザイムとCTABの濃度比が適切である場合に顕著な触媒活性の促進効果が見られた。

こうしたタンパク質や同様の効果を持つ物質を添加した*in vitro*での反応系は、そうでない反応系に比べて、細胞内での反応をより忠実に再現している可能性が高い。そのような反応条件の中で高活性を保っているマキシザイムは、細胞内因子によって二量体形成とRNAの切断活性が阻害されないと考えられるので、マキシザイムは生

体内でも使える新しいリボザイムの形であることを示唆した一つの結果であると考えられる。

最後に実際に細胞内で機能するリボザイムが遺伝子の機能破壊を行う解析ツールとして利用できることを証明するために、以下のような実験を行った。

癌抑制遺伝子として同定されたBIN1のmRNAを切断するようリボザイムを構築し、BIN1の機能を阻害するツールとなるかどうかを調べることを目的として実験を行った。

本研究では、HeLa細胞にBIN1を標的としたリボザイム発現ベクターを導入してリボザイムを発現させ、BIN1のmRNAを減少させた。また、このBIN1 mRNAがノックダウンされた細胞ではUV照射によるアポトーシスの誘導が抑制されることを観察した。このことは、BIN1がUV照射におけるアポトーシスのシグナル伝達に関わることを示している。また今回の場合、リボザイムによるノックダウンはBIN1に発現を100%まで抑えなかったが、UVを当てた場合に細胞の表現型に差が見られたということから、細胞内の因子は細胞内から全て無くならなくても、つまり少しの量の減少でも生体内でのバランスが崩れて変化が起ってしまう可能性があることを示していると思われる。このように、リボザイムは細胞内での特定因子のノックダウンができることから、量的変化の影響を調べるには非常に良いツールであると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

リボザイムは制御のしやすさ、研究のしやすさから考えるとなるべく短く単純なほうが良いと多くの研究者は考えている。この考えのもとに作られた新しい形のリボザイムの一つに二量体で活性を示すマキシザイムがある。このモチーフは二本の異なるRNAを一つのモチーフで切断できるという、新規の特徴を持っていることが*in vitro*の条件において示されていた。本研究はこのマキシザイムおよびリボザイムが細胞内で効果的に機能できる可能性を追求する基礎研究であり、そのための様々な検討を行っている。第一に細胞内でのリボザイム発現系として優れていることが示されているtRNAプロモーターを用いた場合に付加する配列が、マキシザイムによる標的RNAを認識する能力及びRNA切断能力に基本的に影響を与えないことを明らかにした。このことにより細胞内で発現させてもマキシザイムは機能を保持したままであることが示唆された。第二に生体内タンパク質と類似した性質を持つと言われている陽イオン界面活性剤CTABをマキシザイム反応系に加えることで、*in vivo*を模倣した条件におけるマキシザイムの活性を比較している。この実験によりマキシザイムが核酸に影響を与える生体物質が存在する中でも切断を起こすことを示唆すると同時に、*in vitro*でのマキシザイムの活性をより向上させる条件を発見した。これらのことはリボザイムの新規モチーフであるマキシザイムが遺伝子治療などの細胞内応用研究に使用できることに関する重要な知見をもたらしたと考えられる。第三に実際に細胞を用いて、tRNAプロモーターによる発現系を用いてBIN1を標的としたリボザイムを発現させた実験を行っている。その結果としてリボザイムは細胞内でBIN1 mRNAの発現量を減少させ、それにより細胞の性質を変化させることが可能なことを示した。これらの研究はマキシザイムを含むリボザイムが細胞内遺伝子解析ツールとして有用であることを十分に示したものと考えられ、得られた成果は高く評価される。

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。