

氏名 (本籍)	村山 洋 (東京都)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	甲第 54 号
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当
学位論文題名	原生動物 <i>Tetrahymena pyriformis</i> リボゾーム RNA 遺伝子の構造に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤谷 英男 (副査) 教授 古泉 巖 教授 松下 博治 理博 東中川 徹 (三菱化成生命化学研究所, 部長)

### 論文内容の要旨

原生動物繊毛虫類 *Tetrahymena* は、生殖核として機能する小核及び栄養核として機能する大核の 2 種類の核を持つ単細胞真核生物である。接合時に小核が分化して大核が形成され、同時に DNA が増え約 20 倍にもなる。*Tetrahymena* リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) は、小核のゲノム中に 1 コピーのみ組み込まれている。rDNA は小核が大核に分化する際に切り出され 2 つの rDNA が対称につながり、全体が回文構造であるような線状 DNA (約 20 kb) として大核中に存在する。大核中の rDNA は 10,000~20,000 コピーにまで増幅し、その量は全 DNA に対し 2% と多い。大核の周縁部に存在する遊離核小体はこの rDNA によって形成されている。真核生物の染色体の末端 (テロメア) に共通して存在すると考えられているテロメア繰り返し塩基配列が、*Tetrahymena* rDNA の末端にも認められる (*Tetrahymena* rDNA では CCCC AA の配列がテロメアにおいて繰り返されている)。

このように *Tetrahymena* rDNA は非常に特徴的な構造 (回文構造) をもち、さらに小核の分化に伴う DNA の再編成あるいは増幅、テロメア繰り返し配列の存在など興味深い特徴を持っている遺伝子である。

一方、真核細胞における遺伝子発現調節に関する研究では、クロマチンの構造と機能の関係は重要な 1 つの視点である。*Tetrahymena* rDNA は他の遺伝子と比べ非常に量が多く、さらにゲノムから遊離して核小体を形成している。従って、*Tetrahymena* 核小体は機能が既知の単一遺伝子 (rDNA) クロマチンとして、遺伝子発現調節のクロマチンレベルでの研究において非常に有利な実験系である。我々のグループではこの *Tetrahymena* の利点を生かし、上記の視点に立って研究を進めている。使用している細胞は、*Tetrahymena pyriformis* GL 株 (無小核系) であり、核小体の単離法 (東中川ら) および rDNA クローンを用いた *in vitro* 転写系 (Niles ら、松浦ら) が確立されている。

この一連の研究をさらに進めて行く上で、遺伝子の本体である DNA の塩基配列を知ることは、最も基礎的かつ重要なことである。その上、前述のように *Tetrahymena* rDNA は非常に特殊な構造を持つ一方で真核生物に共通した構造をもつという 2 面性があり、これらの構造が持つ生物学的な意味を研究する上で塩基配列を決定することは有意義なことである。そこで本論文では *T. pyriformis* GL 株 rDNA の全塩基配列を決定することを試みた。その結果得られた塩基配列についてその性状を多面的に解析し、さらに近縁種

である *T. thermophila* B 株 rDNA の塩基配列と比較検討した。

*T. pyriformis* GL 株 rDNA の転写産物のうち 26 SrRNA は分子のほぼ中央で切断されていて、この現象は hidden break と呼ばれ、変性条件下での電気泳動による分析で明らかにされている。この hidden break が起こる部位を今回決定した塩基配列上に予想した。この予想された部位において考えられる構造を検索し、昆虫に認められている hidden break 部位の構造と比較検討した。

1. 本論文において今回決定した塩基配列は、回文構造の中央から約 200 塩基離れた Kpn I 部位から末端 (テロメア) までの 9707 塩基である。塩基配列の決定は次のように行った。

- ① *T. pyriformis* GL 株 rDNA クローン (pTpr 4, pTprKT) から適当な rDNA 断片を切り出し、pUC 19 をベクターとしてサブローニングした。
- ② uni-directional deletion 法を用いてサブクローンから種々の長さの欠失クローンを作製した。
- ③ ジデオキシ法により各欠失クローンの塩基配列を決め、読んだ塩基配列をつなぎ合わせて全体の rDNA の塩基配列とした。

2. 今回決定した *T. pyriformis* GL 株 rDNA の塩基配列を *T. thermophila* B 株との比較も含めて解析した結果、以下のような知見を得た。

- ① 既報の配列と一致しない部位が認められた。その原因としては、細胞のバッチの違いなどが考えられるが、現在のところ明確な原因は明らかではない。
- ② *T. thermophila* B 株との比較について次のようなことが認められた。
  - a) rDNA 各領域の G-C 含量を比較すると、非転写スペーサー領域、転写スペーサー領域、成熟 rRNA コード領域の順に G-C 含量が高くなっていて、この傾向が 2 種の *Tetrahymena* に共通していた。しかし、それ以外の生物種の場合を見ると必ずしも同じ傾向はみられなかった。
  - b) *T. thermophila* B 株 rDNA との相同性は転写領域において非常に高く、特に成熟 rRNA コード領域は 95% 以上であった。非転写スペーサー領域は、これに比べ極めて相同性が低く (50% 以下)、このことは非転写スペーサーの進化における保存力が低いことを示す 1 つの例と考えられる。
  - c) 転写開始点近傍の G-C 含量の変化を見ると、転写開始点を含む部分の G-C 含量が相対的に低くなっていて、これを挟んで G-C 含量の比較的高い部分が存在した。この傾向は 2 種の *Tetrahymena* に共通しているだけでなく、他の生物種にも認められ、転写開始のメカニズムと G-C 含量の分布の変化との間に関係のあることが示唆された。
  - d) 26 SrRNA コード領域の比較より、*T. pyriformis* GL 株の方に大きな欠失が認められた。この部分は *T. thermophila* B 株にみられる介在配列 (IVS) に相当し、*T. pyriformis* GL 株において完全に欠失した部分であることが確認された。
- ③ 非転写スペーサーについて次のようなことが認められた。
  - a) 5' 非転写スペーサー領域の反復配列 (タイプ I, II, III) については、Niles らが報告していて、今回決定した塩基配列においても同様な結果が確認された。
  - b) 3' 非転写スペーサー領域については、*T. thermophila* 及び *Glaucoma chattoni* において Challoner らが報告しているタイプ IV, V 反復配列が *T. pyriformis* GL 株にも存在することを確認した。

- c) タイプVの1つの特徴として、各反復配列の長さが120～130塩基あり、それぞれの種において保存部分と変異部分が存在することが認められた。またこの特徴が3種の織毛虫を通じて共通していることから、上記のような特徴がタイプV反復配列の機能に重要であることが示唆された。
- d) タイプVについて2種の *Tetrahymena* の間に3つの共通配列が認められ、そのうち1つには *Tetrahymena* の中で、非常に強く保存されていると思われる塩基配列 T G A A T G が認められた。さらに3種の織毛虫のタイプV反復配列に共通な塩基配列 C C A C T T が認められた。これら共通配列がタイプV反復配列の機能に対して、重要な働きをしている可能性も考えられる。
- e) タイプV反復配列のさらに3'側下流には長さ約160塩基のタイプVI反復配列が *T. pyriformis* GL株に認められた。この反復配列は *T. thermophila* あるいは *Glaucoma* では認められていない配列であり、今回新たに確認した反復配列である。タイプVI反復配列において stem-loop 構造を検索した結果、Tクラスターに隣接した構造が存在し、転写調節においてRNAポリメラーゼIの転写終点を越えた進行を停止させるためにタイプVI反復配列が機能している可能性が示唆された。
- f) トポイソメラーゼIの結合部位を今回決定した塩基配列の全領域において検索したところ、その分布が転写開始点付近に局在していることが確かめられた。転写領域においては、外部転写領域の転写開始点付近に1カ所存在するのみで、その他のトポイソメラーゼIの結合部位は、全て非転写スペース領域に存在していた。このことは、トポイソメラーゼIの機能が転写調節に強く関係していることを示唆する例と考えられる。
- ④ hidden break 部位を Eckert ら及び東中川の報告を基に、今回決定した塩基配列の上に予想した。予想された部位において考えられるRNAの2次構造を検索した結果、昆虫で見出されている構造と非常に似た構造が1つ確認された。

## 論文審査の結果の要旨

近年、原生動物に関する分子生物学が発展し、種々の原生動物の持つ特殊性あるいは、真核生物に共通な特徴が明らかにされつつある。特に病原性鞭毛虫類 *Trypanosoma* や織毛虫類の *Tetrahymena*, *Paramecium* 等に関する研究は、多くの研究者の注目を集めている。

*Tetrahymena* は大小、2種類の核を持つ単細胞真核生物である。小核の一つが接合の過程において大核に分化し、このときにDNAの再編成と増幅が認められる。*Tetrahymena* リボソームRNA遺伝子は、大核において10,000～20,000コピーにまで増幅された約20kbの線状DNAとして存在し、核小体を構成する。この線状DNAは、大核が形成される際、2つのリボソーム遺伝子が逆向きにつながってできたもので、DNA全体が回文構造になっている。従ってDNAの再編成あるいは増幅の研究のモデルとして *Tetrahymena* リボソームRNA遺伝子は多くの研究室で用いられている。

真核生物における遺伝子発現の調節の研究においては、クロマチンの構造と機能の関係は1つの重要な問題である。*Tetrahymena* リボソームRNA遺伝子は機能が既知の単一遺伝子クロマチンと考えられる核小体として、高純度の単離が可能であり、現在これを用いてクロマチンレベルの研究が進められている。

上述した研究における基礎的な情報として、遺伝子の塩基配列を決定することは非常に重要である。本論文では、*Tetrahymena pyriformis* GL株（無小核系）のリボソームRNA遺伝子の全塩基配列のうち90

%以上の 9,707 塩基の塩基配列を決定し、その性状を多角的に解析して、以下の解析結果を得ている。

1. 塩基配列を決定したのは、リボゾーム RNA 遺伝子（回文構造）の中心付近から末端までの領域である。
2. 近縁種の *Tetrahymena thermophila* B株のリボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列との比較より以下に示すことが認められた。
  - ① *Tetrahymena* においては、成熟リボゾーム RNA コード領域に比べスペーサー領域の GC 含量が低い傾向がみられた。
  - ② 成熟リボゾーム RNA 遺伝子コード領域の塩基配列は、2種の *Tetrahymena* の間で高い相同性が認められたのに対し、非転写スペーサー領域では両者の相同性が極めて低かった。
  - ③ 転写開始点近傍には相対的に GC 量が低くなっている部分が認められ、同様なことが、*Tetrahymena* のみならず他の生物種にも共通した特徴として認められた。このことから、GC 含量に基づく DNA の構造と転写開始のメカニズムとの関係が示唆された。
  - ④ 26S リボゾーム RNA コード領域では、*T. thermophila* に見られる介在配列に相当する塩基配列が *T. pyriformis* では完全に欠損していた。
3. 2種の *Tetrahymena* および *Glaucoma chattoni* の3種の織毛虫で比較した結果より、非転写スペーサー領域に共通な特徴を持つ5種類の反復配列が認められた。このことは、原生動物（少なくとも織毛虫類）においてリボゾーム RNA 遺伝子の発現調節に共通なメカニズムの存在を示唆する結果と考えられる。さらに、*T. pyriformis* の5'側非転写スペーサー領域に、*T. thermophila* や *G. chattoni* では見られない反復配列が、新たに確認された。2次構造を検索した結果より、この新しい反復配列が RNA ポリメラーゼ I による転写の終結に関与することが示唆された。
4. DNA の高次構造の変化に関与するトポイソメラーゼ I の結合部位を検索した結果、非転写スペーサー領域に局在し、成熟リボゾーム RNA コード領域には存在しなかった。この結果は、トポイソメラーゼ I が、転写調節に強く関与していることを示唆している。
5. 26S リボゾーム RNA のほぼ中央に存在する hidden break 部位の2次構造を予測した結果、昆虫で見いだされている構造に類似した構造が認められ、hidden break が未知の機能を担っていることが示唆された。

本論文では、このように、1つの遺伝子の機能部分の全塩基配列を決定したうえで、さらにその前後の大部分の構造も解明し、その結果を非常に詳細に分析し、いくつかの興味ある新発見をしている。獣医学領域においても、1990年代には遺伝子レベルでの研究が基礎・臨床分野で重要かつ必須のものとなる趨勢にあるが、本論文のような本格的遺伝子解析を行った学位論文は、我国の獣医学界においては従来なかったと思われる。すなわち本論文は今後の基礎獣医学への先駆的かつ高レベルな業績として高く評価され、獣医学博士の学位を授与するに十分なものであると判断される。