

審査の結果の要旨

氏名 松村 厚佑

現在までのがん研究は専らタンパク質をコードする遺伝子に着目して行われてきた。しかし、近年ゲノムの大部分からタンパク質をコードしていない長鎖の非コード RNA が転写されていることが明らかとなってきた。特に、長さが 200 塩基以上あるものは長鎖非コード RNA (long non-coding RNA ; lncRNA) と呼ばれている。lncRNA はタンパク質と同様に生体内で機能性分子として振る舞い、発生、分化、細胞増殖、細胞周期、炎症、細胞運動、といった生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかしながら、がんにおける機能解析が試みられた lncRNA は限られており、大腸がんにおける lncRNA の作用メカニズムやその役割は明らかになっていない。

本研究では、大腸がんで発現が亢進している新規がん lncRNA 遺伝子の探索を行い、**GSEC**(G-quadruplex forming sequence containing lncRNA) を同定した。さらに、大腸がん細胞における機能解析により **GSEC** が、がん化関連 lncRNA として機能するメカニズムを明らかにした。

まず、がん化関連 lncRNA の探索を行った。大腸がん検体の網羅的トランスクリプトーム解析を行った結果、大腸がんで発現が亢進している新規の lncRNA として **GSEC** を同定した。さらに、RNAi 実験により、**GSEC** の発現抑制により大腸がん細胞の運動能が低下することを見いだした。

lncRNA の多くはタンパク質との相互作用を介してその機能を発揮することが知られている。そこで、**GSEC** が大腸がん細胞の運動能を調節するメカニズムを明らかにするために、ビオチンラベルした **GSEC** をベイトに用いた pull-down 法により **GSEC** 結合タンパク質の探索を行い、**DHX36** を同定した。**DHX36** は DEAH-box RNA ヘリカーゼファミリーに属しており、DNA、RNA 中に存在する特殊な二次構造である G-quadruplex を解きほぐす活性を持っていることが知られている。**GSEC** の塩基配列解析の結果、**GSEC** は G-quadruplex 構造をもっており、G-quadruplex を介して **DHX36** と結合していることが明らかとなった。さらに、レポーターアッセイ、リコンビナントの **DHX36** を用いた in vitro G-quadruplex resolving assay により **GSEC** が **DHX36** の働きを抑えることを見いだした。また、**GSEC** は **DHX36** 依存的なメカニズムで細胞運動の亢進を引き起こしていることが示唆された。以上の結果から、**GSEC** は

細胞運動抑制能を持つ DHX36 の働きを抑制することで、大腸がん細胞の運動能を亢進している可能性が示された。

続いて、*GSEC* が大腸がん細胞の造腫瘍性に与える影響を検討したところ、*GSEC* の発現抑制により腫瘍の生着が抑制されることを見いだした。さらに、表現型が TGF- β シグナルを抑制した際の xenograft モデルの結果と極めて似通っていたため、*GSEC* が TGF- β の発現に与える影響を検討したところ、*GSEC* の発現抑制に伴い *TGFB2* の発現が低下することが明らかとなった。

TGFB2 の発現調節において *GSEC* は DHX36 が関わる機構とは別のメカニズムで働いていると考えられたため、新たに *GSEC* 結合タンパク質の探索を行ったところ、Protein X を同定した。さらに、Protein X の発現抑制によって、*TGFB2* の発現が低下することを見いだした。これらの結果から *GSEC* は Protein X と協調して *TGFB2* の発現を促進することで大腸がん細胞の造腫瘍性維持に働いている可能性が示唆された。

以上の結果より、*GSEC* は DHX36 の機能を抑制することで細胞運動能を亢進しており、一方で Protein X と共に *TGFB2* の発現を誘導することで造腫瘍性の獲得に寄与していることが明らかとなった。特に lncRNA が G-quadruplex ドメインを介してタンパク質の活性を抑制するという作用メカニズムは本研究が初めての報告である。従って、本論文における研究成果は新規性が高く、学術上の貢献が大きい。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。