

## 審査の結果の要旨

氏名 姜 秉一

本研究は、マスマスプロトメトリーを用いた miRNA の直接的解析法および絶対定量法を確立し、当手法を通してマウス脳内における miRNA の定量的発現プロファイリングを行ったものである。さらに、マスマスプロトメトリーを用いて新規 tRNA 修飾を同定し、その構造と生合成について研究を行った。

miRNA は低分子 non-coding RNA の一種であり、細胞の増殖や分化など様々な生命現象に関与する調節因子であることが知られている。miRNA は Argonaute(Ago)タンパク質などと共に RNA induced silencing complex (RISC)と呼ばれる複合体を形成し、mRNA の 3' 非翻訳領域に相補的に結合し、翻訳抑制および mRNA の間接的分解を引き起こすことで遺伝子発現制御を行う。ヒトには約 2,600 種類の miRNA が存在し、全タンパク質遺伝子の約 7 割が miRNA によって発現制御を受けていると考えられている。miRNA の発現プロファイルは細胞の分化と密接な関係があり、組織特異的、時期特異的に変動する。また、様々な疾患で miRNA の発現プロファイルが変化するという報告がある。したがって、miRNA の発現量を定量的に計測する技術の開発は、様々な生命現象の理解につながるだけでなく、疾患の診断や治療などにも大きく貢献することが期待される。一般的な miRNA の解析法としては、大規模シーケンス解析、リアルタイム PCR、また、マイクロアレイなどがある。これら手法は簡便で広く用いられているが、いずれも間接的な手法であり、アダプターDNA の連結効率の違い、PCR 増幅によるバイアス、蛍光標識効率の差などにより、操作の各段階において多くのバイアスが生じることが知られ、これらの手法による miRNA の発現プロファイルは必ずしも精確でないことが指摘されている。このような知見から、論文提出者は本論文において、当研究室で確立した RNA の高感度質量分析法(RNA-MS)を駆使し、miRNA の直接的な定量的プロファイリング技術の開発を行った。

本論第 1 章では、キャピラリーLC/nanoESI-MS を用いた miRNA の高感度測定系を確立し、微量な miRNA を標識することなく、直接的に解析することに成功した。さらに、本手法を用いて、マウス脳由来 miRNA の発現プロファイルを取得し、個々の miRNA を帰属することに成功した。その結果、他の手法では検出が困難である類似配列を持つ miRNA の分離や、データベースには登録されていない miRNA のバリエーション (5'末端、3'末端に塩基の付加や短縮に由来する) を多数見出した。

第 2 章では、個々の miRNA を絶対定量するための手法を確立した。マスマスペクトルから得られる各 miRNA のピーク強度は、各 miRNA の存在量と関連があるが、配列の違いに

よるイオン化効率の違いや、同時にイオン化する分子の影響によるイオン化抑制の問題があるため、内部標準を用いた絶対定量系の確立が不可欠である。まず、計測対象とする miRNA に対し、安定同位体標識された miRNA (SIL-miRNA) を作成し、高純度に精製した。マウス脳由来の miRNA 画分に、既知濃度の SIL-miRNA を内部標準として混合し、測定を行った。得られたマスペクトルのピーク強度比から、内在 miRNA の存在量を算出した。本手法を用いてマウス脳における個々の miRNA を絶対定量することに成功した。また、本手法を用いることで、同一組織、細胞内における miRNA ごとの存在量を直接比較することが初めて可能となった。次に、1~48 週齢までのマウスの脳を用い、発育や加齢に伴う miRNA の発現変動を解析した。その結果、加齢と共に脳特異的な miR-9 の定常状態量が大きく減少することが観測された。しかし、バリエーションごとに分析すると、鎖長の長いバリエーションの定常状態量は減少した反面、鎖長の最も短いバリエーションの定常状態量は変動しないことが判明した。この現象は、出生後に Ago1 よりも Ago2 が相対的に優勢になることで説明できる。

第 3 章では、第 2 章において発見されたバリエーション特異的な発現変動に基づき、miRNA の 3'末端トリミング因子の探索を行った。Drosophila において、Ago1 と結合し、Ago1 に結合した miRNA の 3'末端をトリミングする因子として Nibbler が同定されている。Nibbler のマウスホモログを用い、マウス脳内 miRNA の 3'末端トリミング因子としての検証を行ったが、Ago2 とは結合せず、細胞内で過剰発現しても miR-9 の 3'末端トリミングは行われなかった。

第 4 章では、新規 tRNA 修飾である 2-methylthio cyclic N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenosine (ms<sup>2</sup>ct<sup>6</sup>A) の同定を行った。t<sup>6</sup>A は tRNA の 37 位において広く保存されている修飾塩基であり、タンパク合成において ANN コドンの認識に重要な役割を演じている。当研究室の先行研究で、t<sup>6</sup>A はさまざまな生物種において、脱水環化したサイクリック t<sup>6</sup>A (ct<sup>6</sup>A) と呼ばれる構造を形成していることを明らかにしている。枯草菌である *Bacillus subtilis* および原生動物である *Trypanosoma brucei* の tRNA<sup>Lys</sup> において、t<sup>6</sup>A 誘導体のひとつである 2-methylthio N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenosine (ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A) が同定されているが、これらの生物には t<sup>6</sup>A を環化させる修飾酵素 (TcdA) が存在することがわかっていた。以上の事実から、論文提出者はこれらの生物に ms<sup>2</sup>ct<sup>6</sup>A が存在する可能性を提唱した。実際に、*B. subtilis* および *T. brucei* から抽出した tRNA 画分に、ms<sup>2</sup>ct<sup>6</sup>A があることを示し、化学合成した標品と比較することで、その構造を確定した。また、遺伝学的な解析から、ms<sup>2</sup>ct<sup>6</sup>A の生合成酵素の同定を行った。

以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。