



Title	Sense-overlapping lncRNA as a decoy of translational repressor protein for dimorphic gene expression
Author(s)	Perez, Christelle Alexa Garcia
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85410
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (PEREZ CHRISTELLE ALEXA GARCIA)	
Title	Sense-overlapping lncRNA as a decoy of translational repressor protein for dimorphic gene expression (翻訳抑制タンパク質のデコイとしてのセンスオーバーラッピング長鎖非コードRNAによる二型遺伝子発現制御の研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Among the different types of long noncoding RNAs (lncRNAs), those that overlap with protein-coding genes in the sense direction are poorly studied due to the difficulties in distinguishing them from their overlapping coding genes despite the projection that they are the most abundant type of lncRNA. Recently, <i>DAPALR</i> or <i>Doublesex1-alpha-promoter-associated-long noncoding-RNA</i> was found overlapping the 5' UTR of the male-determining gene, <i>Doublesex1</i> (<i>Dsx1</i>), in <i>Daphnia magna</i>. <i>DAPALR</i> was identified as a potential regulator of <i>Dsx1</i> but its mechanism remains unknown. In this study, the goal is to perform functional analysis on the lncRNA <i>DAPALR</i> and its associating protein/s. This study aims to give light on the function and significant role of lncRNAs in gene regulation for various biological processes like sex determination, and also to pave a deeper understanding of the biogenesis and function of the poorly studied group of sense-overlapping lncRNAs.</p> <p>To investigate the role of <i>DAPALR</i> in <i>Dsx1</i> regulation, I expressed the full sequence of <i>DAPALR</i> in female and male eggs of the <i>Dsx1</i> reporter strain which codes for the mCherry gene in one of the alleles of <i>Dsx1</i>; hence the mCherry fluorescence recapitulates <i>Dsx1</i> expression. Phenotypic observation showed ubiquitous mCherry signals and qRT-PCR results revealed a significant increase in <i>Dsx1</i> expression. Furthermore, the same ubiquitous mCherry signal was also observed when the partial region of <i>DAPALR</i> that overlaps with <i>Dsx1</i> α 5' UTR was overexpressed in females. Hence, this region was regarded as the transactivation element of <i>DAPALR</i>.</p> <p>The proteins associating with this transactivation element were identified as Alan shepard (Shep) and CGUBP1. I focused on Shep and found an ortholog in <i>D. magna</i> with two RNA Recognition Motifs (RRMs) that are highly conserved among species and throughout evolution. The temporal expression profile of <i>Shep</i> showed that its expression is not sex-specific; indicating its role in both male and female. To characterize its function, I induced loss-of-function by RNAi and mutagenesis by CRISPR/Cas9. <i>Shep</i>-silenced male and female embryos showed increased mCherry signals. But, based on qRT-PCR results, the expression level of <i>Dsx1</i> did not increase as the <i>Dsx1</i> protein. <i>Shep</i> mutants also displayed high mCherry signals in the whole body even in non-sex-specific tissues, while the <i>Dsx1</i> expression levels remained the same between mutant and control. Moreover, overexpression of the <i>Shep</i> mRNA in males reduced the mcherry signals but the <i>Dsx1</i> expression level remained unaffected. These results established that <i>Shep</i> represses <i>Dsx1</i> at the post-transcriptional level.</p> <p>The <i>Shep</i> ortholog in <i>C. elegans</i>, Sup-26, is a translational repressor that binds to the <i>tra-2</i> and <i>Gli</i> element (TGE) of its target gene. The same consensus sequence is conserved in <i>Dsx1</i> α 5' UTR and <i>DAPALR</i>. I used a GFP reporter mRNA driven by <i>Dsx1</i> α 5' UTR either with and without the intact potential <i>Shep</i> binding site (TGE) to test its role. Translation efficiency is lower when the TGE element is intact and translation further decreased upon co-injection of the <i>Shep</i> mRNA. To confirm this, I experimented <i>in vitro</i> and results showed that only the reporter mRNA with intact TGE was repressed by <i>Shep</i>. FLAG pulldown also showed that <i>Shep</i> exclusively binds to the TGE. Lastly, I added the <i>DAPALR</i> full region and its core element with the TGE in the suppression experiment and results showed that both can enhance the translation activity in a dose-dependent manner even in the presence of <i>Shep</i>. <i>DAPALR</i> can cancel the suppression of <i>Shep</i> to <i>Dsx1</i> translation.</p> <p>I propose the noise-canceling mechanism as the function of the sense-overlapping lncRNA <i>DAPALR</i> and its RBP, <i>Shep</i>. <i>Dsx1</i> is transcriptionally silenced in female and non-sexually dimorphic tissues in males but stochasticity in gene expression may result in noisy transcription. Hence, <i>Shep</i> represses <i>Dsx1</i> translation and ensures no unintentional expression of <i>Dsx1</i>. <i>DAPALR</i> then acts as a decoy and titrates <i>Shep</i> away to unlock its suppression and activate <i>Dsx1</i> translation in sex-specific tissues in males. This <i>Shep</i>-dependent suppression and by lncRNA-activation of <i>Dsx1</i> exhibits one mechanism of how sexual dimorphic expression is accomplished.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (PEREZ CHRISTELLE ALEXA GARCIA)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	内山 進
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本論文は、生態系において重要な位置を占める動物プランクトンの1種であるオオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) を用いて、性決定遺伝子の発現を制御するノンコーディング RNA の機能に関する研究をまとめたものであり、緒言、総括を含む5章から構成される。</p> <p>緒言となる第1章では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。</p> <p>第2章では、DAPALR と命名したノンコーディング RNA の生体内における機能を明らかにするために、オオミジンコにおいて DAPALR を過剰発現させている。その結果オスにおいてもメスにおいても性決定におけるマスター遺伝子である Dsx1 遺伝子産物が増加することを示している。またこの DAPALR をトリミングすることにより、この遺伝子産物の増加に必要な RNA のコア領域を特定している。</p> <p>第3章では、Dsx1 遺伝子の発現誘導に必要な DAPALR のコア領域を用いて、オオミジンコのタンパク質抽出液から、DAPALR 結合タンパク質を同定している。その結果、Shep と CGUBP1 の2種の RNA 結合タンパク質が特異的に DAPALR に結合していることを示している。さらにこの Shep 遺伝子を CRISPR/Cas9 法により破壊することにより Dsx1 遺伝子産物量が増加することを示している。一方 Dsx1 遺伝子をコードする mRNA 量には変化がなかったことから、DAPALR は翻訳レベルで遺伝子発現を制御していることを示している。</p> <p>第4章では、<i>in vitro</i> の翻訳系を用いて、Shep の機能を明らかにしている。すなわち DAPALR のコア領域をもつ mRNA は Shep の存在下では、翻訳効率が低下すること、この翻訳低下は DAPALR のコア領域を破壊することにより回復することなどから、Shep は mRNA の DAPALR のコア領域に結合して、当該 mRNA の翻訳を抑制することを示している。またこの翻訳抑制された mRNA は DAPALR が発現することにより、その抑制が解除され翻訳が回復することを示している。</p> <p>第5章では、これら得られた知見を総括し、今後の展望について総括している。</p> <p>以上のように、本論文は機能が不明であったロングノンコーディング RNA について、その結合タンパク質の同定を機能解析を通じて遺伝子発現制御のメカニズムを明らかにしたものであり、ストキャスティックに転写される mRNA が翻訳されてしまうことを防ぐノイズキャンセルシステムとして機能していることを提案している。細胞や個体において、不要な遺伝子発現を抑制する技術は限られており、本論文の成果は単にロングノンコーディング RNA 新たな機能を解明しただけでなく、人為的に遺伝子発現を制御する上でも非常に重要であり、本論文の意義は大きい。</p> <p>よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			