

(論文内容の要旨)

真核生物の核にコードされる遺伝子の多くはイントロンによって分断化されている。イントロンはスプライシングによって、mRNA 前駆体からラリアット構造という特異的な構造をとって切り出される。スプライシングされた mRNA は細胞質へと輸送される一方、切り出されたイントロンはスプライシング因子等を結合したまま核内に留まる。イントロンは、スプライシング因子が取り除かれた後、ブランチ構造の解消（デブランチング反応）を経てモノヌクレオチドへと分解されると考えられている。このようなイントロンの代謝経路が正しく機能しない場合、スプライシング因子やモノヌクレオチドの再利用がうまく行われず、スプライシングや転写に影響が出ることが予想される。またヒトにおいてイントロンは mRNA 前駆体の 95%以上を占めていることから、核内でのイントロンの代謝は重要な過程であると考えられる。しかし、イントロンの代謝経路は、そこに関わる因子のいくつかが同定されているだけで、ほとんど解析されていない。

本研究は、核内におけるスプライシング後のイントロンの代謝経路を明らかにすることを目的とする。そのためにまず代謝途上のラリアットイントロン-タンパク質複合体を単離し、そこからイントロンの代謝に関わる因子を同定することを試みた。具体的には HeLa 核抽出液を用いた *in vitro* スプライシング反応系において、反応に用いる mRNA 前駆体に 2 種類のアフィニティータグを導入し、スプライシング反応産物からラリアットイントロン-タンパク質複合体を 2 段階のアフィニティー精製により単離する方法を開発した。

単離したイントロン-タンパク質複合体をグリセロール密度勾配遠心分離法でさらに分離したところ、大きさの異なる二つの複合体（IL 複合体と IS 複合体）に分離することができた。IL 複合体は U2, U5, U6 snRNP とスプライシング因子を含み、IS 複合体はそれらを含まなかった。IL 複合体中に存在するタンパク質の一つである TFIP11 タンパク質は、自身の N 末端に G-Patch ドメインを持つ。TFIP11 タンパク質はこの G-patch ドメインを介して、イントロンの代謝に関わる RNA ヘリカーゼの一つである hPrp43 タンパク質と相互作用した。さらに G-Patch ドメインを欠いた変異体 TFIP11 タンパク質は、ドミナントネガティブ活性を発揮し、*in vitro* スプライシング反応において IS 複合体の減少と IL 複合体の増加を招いた。また、二つのイントロン複合体に対して *in vitro* デブランチング反応を行ったところ、IS 複合体は IL 複合体に比べてデブランチング反応を受けやすかった。以上のことから、IL 複合体は IS 複合体の前駆体であり、TFIP11 タンパク質は hPrp43 タンパク質と共同して、IL 複合体から IS 複合体への遷移を司ること、そして IS 複合体はイントロンのデブランチング反応を経て分解されることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ヒトの場合、mRNA 初期転写物のうち実に 95 パーセント以上はスプライシングによりイントロンとして切り出される。切り出されたイントロンは核内に留まり、スプライシング因子が除かれた後、ラリアット構造が解消され(デブランチング)、分解されると考えられている。この過程が機能しない場合、ラリアット型イントロンがスプライシング因子を結合したまま核内に蓄積するので、スプライシング因子や、イントロン分解により再利用されるはずのヌクレオチドが、不足するなどの問題が起こると考えられる。また、イントロンの中には snoRNA や miRNA などの重要な非コード RNA 分子がコードされており、スプライシングやイントロンの代謝と共役して産生される可能性が高い。このようにイントロンの代謝機構は高等真核生物にとって重要な過程であるが、ほとんど解析されていない。

申請者は、既に開発されていた試験管内スプライシングからスプライシング後のイントロン複合体を精製し、その構成成分を探ることで、イントロン代謝の機構を明らかにしようと考えた。申請者は、mRNA 前駆体に 2 つのアフィニティータグを付け、2 段階のアフィニティー精製を行うことにより、イントロン複合体を高度に精製することに成功した。その結果、イントロン複合体は大小二つの形態 (IL および IS 複合体と命名) を取る事、IL は IS の前駆体であり IL から IS へと遷移してからイントロン分解が起こる事、IL にはラリアットイントロン RNA の他に U2、U5、U6 の 3 つの snRNA と様々なスプライシング因子が含まれる事などを明らかにした。申請者はさらに IL から IS への遷移を司る 2 つの因子の性状を明らかにした。

以上のように、これまで全く未知であった、ヒトにおけるイントロン代謝機構の一端が明らかになり、この研究がこの分野の発展に寄与したことは高く評価される。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。