

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	山中 靖貴
論文題目	CHERPによる選択的mRNAスプライシング制御		
(論文内容の要旨)			
<p>高等真核生物の遺伝子発現過程においては、遺伝情報はゲノム DNA から未成熟な mRNA 前駆体 (premature-mRNA: pre-mRNA) へと転写された後、5' キャッピング、スプライシング、および 3' ポリアデニル化によるプロセッシングを受けて成熟 mRNA へと伝達される。成熟 mRNA は核膜を通過し細胞質に輸送され、タンパク質生合成の鋳型となる。スプライシングは mRNA プロセッシング過程の一つで、イントロンを除去してエキソン同士を繋ぎ合わせる反応であり、構成的あるいは選択的スプライシングに分類される。</p> <p>Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) は、小胞体や核周辺部において 1,4,5-trisphosphate receptor と共局在し、細胞内カルシウムシグナル伝達において役割を担うタンパク質として同定された。一方で、CHERP は核内にも局在することや、スプライソソームと相互作用する可能性も一部において報告されており、その役割には不明な点が多く残されている。</p> <p>本研究では、まず U2OS 細胞を用いて CHERP が核内にも局在していることを明らかとすると共に、ノックダウンにより CHERP の発現量を低下させた際にポリ (A)⁺ RNA が核内に蓄積することを示した。また、FLAG タグを導入した CHERP を発現させた HEK293 細胞の核抽出液を用いて免疫沈降-質量分析およびウェスタンブロット解析を行い、CHERP が U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) や U2 snRNP 関連タンパク質といったスプライシングに関わるタンパク質と相互作用することを明らかとした。</p> <p>さらに、CHERP ノックダウン細胞と対照細胞から全 mRNA 画分および細胞質 mRNA 画分を調製してそれぞれ RNA シークエンス解析を行うことで、CHERP がカセットエキソン型、選択的 5' スプライス部位選択型、選択的 3' スプライス部位選択型、相互排他的エキソン型、およびイントロン保持型といった様々な選択的スプライシングに影響を及ぼすことを明らかにした。これらの代表的な 5 種類の選択的スプライシングの中で最も高頻度に観察されたイントロン保持型の標的 pre-mRNA のイントロンの性質を参照イントロンと比較したところ、スプライシングの生じやすさを表す指標である 5' および 3' スプライス部位のスコアが低いこと、GC 含量が高いこと、またイントロンの長さが短いといった特徴を見出した。同様の解析を、イベント数として最も多く検出されたカセットエキソン型スプライシングについても実施したところ、その標的イントロンでは 3' スプライス部位のスコアが低いという先述したイントロン保持型と共通する特徴が見られた一方で、5' スプライス部位のスコアは参照イントロンと変わらないこと、ブランチポイント部位のスコアが低いこと、GC 含量が低いこと、またイントロンの長さが長いなど、イントロン保持型とは異なった特徴も見出された。このため、CHERP は選択的スプライシングの型によって異なる制御機構を有していることが示唆された。また CHERP ノックダウン細胞の細胞質において mRNA 発現量が減少していた遺伝子の gene ontology 解析を行ったところ、細胞周期や細胞分裂に関わる機能を有する遺伝子が多く含まれていた。</p> <p>以上、本論文において著者は CHERP が核内において選択的スプライシングの制御に関わることを明らかとすると共に、その制御様式について考察を加えた。また、CHERP が細胞機能に重要な役割を果たす可能性を示した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

高等真核生物の遺伝子発現過程においては、一つの遺伝子から複数の転写産物が生成されるという選択的スプライシングが頻繁に観察される。選択的スプライシングは、生物機能が多岐になるについて多く観察される仕組みであるとされていることから、そのメカニズムの解明は高等生物の遺伝子発現制御や細胞機能を理解する上で非常に重要である。しかしながら、その分子機構については不明な点が多く残されている。

Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) は、もともと小胞体や核周辺部において1,4,5-trisphosphate receptorと共局在するタンパク質として同定された。しかしながら核局在シグナルを有しており、またRNA結合タンパク質の特徴の1つであるarginine/serine dipeptide repeat elementをも保持していることから、核内にも局在し、スプライソソームと相互作用してmRNA成熟過程に関わるとされ、実際にそれを支持する結果が一部の論文においても報告されていたが、その機能解析は進んでこなかった。

そこで本研究では、CHERPのmRNA代謝調節機能の解明を試みた。まず、CHERPが核内にも局在すること、またCHERPをノックダウンさせた際にポリ(A)⁺RNAが核内に蓄積することをU2OS細胞を用いて示した。次に、CHERPがU2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)やU2 snRNP関連タンパク質といったスプライソソームを構成するタンパク質と相互作用することを免疫沈降-質量分析等によって示した。以上のことから、CHERPがmRNAスプライシングに関与する可能性が強くと示唆された。続いて、ノックダウンによりCHERPの発現量を低下させた細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行うことで、CHERPが代表的な5種類の選択的スプライシング過程に大きな影響を与えていることを示した。中でも、高頻度あるいは高イベント数として観察されたイントロン保持型とカセットエキソン型について解析を進めることで、CHERPが制御するイントロン配列の特徴を明らかにした。また、細胞質mRNAのトランスクリプトーム解析を行うことで、CHERPが細胞周期や細胞分裂に関わる複数の遺伝子の発現を制御している可能性を示した。このように、本論文では培養細胞を用いて細胞生物学的解析を行うことで、高等真核生物における選択的スプライシング制御やその細胞機能への影響を理解する上で重要な知見を提供した。

以上のように、本論文では生命科学に関する高度で幅広い学識、生命科学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されている。また、本論文は論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、令和4年6月3日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日