

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	藤原 奈央子
論文題目	MPP6によるヒト核内エキソソーム複合体の活性および基質特異性の制御機構		
(論文内容の要旨)			
<p>ゲノム情報の正確な発現において、適切な RNA 分解は不可欠である。RNA エキソソーム (以降、エキソソーム) は真核生物において主要な 3'-5'エキソリボヌクレアーゼ活性を担う複合体であり、RNA 代謝の幅広い局面を制御している。エキソソームは、コアと呼ばれるヌクレアーゼ活性を持たないリング状の基本構造に、ヌクレアーゼや補因子が複数種結合することで多様な基質 RNA に対応していると考えられており、ヒト核内においては、RRP6 と DIS3 がヌクレアーゼとしてコアに直接結合している。また、核特異的な補因子である RNA ヘリカーゼ MTR4 は、現在までに同定された複数のエキソソーム補因子複合体に共通して含まれており、核内でのエキソソームによる基質分解に必須の因子である。In vitro における複合体の再構成解析から、RRP6 および核特異的な補因子の一つである MPP6 は、それぞれコアと MTR4 に同時に結合することで MTR4-コア間の相互作用を支持し、MTR4 感受性の基質分解を活性化することが示されている。一方で、実際の細胞内における MTR4-コア間の相互作用の重要性についての知見は現在のところ非常に乏しい。また、補因子 MPP6 の細胞内におけるエキソソーム機能への関与についても、古くにヒトの rRNA プロセッシング異常や酵母の遺伝学的相互作用を指標とした研究で示唆されたのみにとどまり、その作用機序や MPP6 が分解に寄与する基質 RNA の範囲についての詳細は不明であった。</p> <p>本論文では、ヒト核内エキソソームの RNA 分解における MPP6 の役割を明らかにすべく研究を実施した。すなわち、エキソソームに付随するヌクレアーゼや補因子を単独あるいは同時にノックダウンし、基質 RNA 分解や MTR4-コア間相互作用への影響を観察することで、エキソソーム複体内における各因子の機能および因子間の相互作用を評価した。その結果、MPP6 は MTR4 に感受性を持つ poly(A)+ RNA 基質の、RRP6 ならびに DIS3 による分解の双方を促進することを明らかにした。また、MPP6 はヒト核内においても MTR4 とコアの結合を支持し、その結合様式はこれまでに in vitro 解析で明らかにされた結合様式とよく一致していることを確認した。一方、RRP6 による MTR4 のコアへのリクルート量が維持されている状態でも、MTR4 感受性 poly(A)+ RNA 基質の分解は MPP6 ノックダウンで阻害されることから、MPP6 と RRP6 それぞれが支持する MTR4-コア間相互作用の間に機能的な差異があることが示唆された。これは比較的単純な基質を扱ってきたこれまでの in vitro 解析では捉えられてこなかった現象で、ヒト細胞を用いて多様な基質への影響を評価することにより初めて見出された成果である。さらに、MPP6 が標的とする基質の範囲とその特徴を把握することを目的として次世代シーケンシング解析を行い、各エキソソーム構成因子に対する感受性に基づいて基質を分類した。その結果、エキソソームによって分解される基質のうち、MPP6 が分解を促進する基質群は、難抽出性を示すことや特定のエキソソーム補因子複合体への高い感受性を示すこと、また短い転写ユニットに由来するといった特徴が観察された。つまり MPP6 は、エキソソームによる RNA 分解活性全体に関与するのではなく、エキソソーム複合体が取りうる複数の形態のうちの 1 つを構成する因子として、限られた基質サブセットの分解に機能することが示唆された。近年の構造解析の結果から、MTR4 への結合において MPP6 と競合する補因子の存在が示唆されていることを考慮すると、本解析結果は MPP6 がコアと結合する MTR4 補因子複合体の種類を規定することにより、ヒト核内においてエキソソームの基質特異性を制御するという新しいモデルを提示するものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ヒト核内の RNA エキソソーム複合体(エキソソーム)の活性制御において補因子である MPP6 がどのように機能しているかを、エキソソーム構成タンパク質同士の相互作用解析および RNA 分解基質解析という点から解明しようとしたものである。エキソソームは真核生物において RNA 代謝の幅広い局面を制御している複合体であり、中心のコア構造およびそれに付随するヌクレアーゼ、さらに細胞内コンパートメントに特異的な補因子で構成されている。本論文で注目した MPP6 については、エキソソーム複合体内におけるコア・ヌクレアーゼ複合体と RNA ヘリカーゼ MTR4 との相互作用に重要であることが近年の *in vitro* での再構成実験で示されていたものの、実際のヒト細胞を使用した研究例は極めて限られていたため、その細胞内機能の詳細は不明瞭であった。本研究では、まずヒト培養細胞を用いて核内における poly(A)+ RNA 基質に対するエキソソームの分解活性を評価するレポーター系を確立し、次に本系を用いて MPP6 が核内基質 RNA のエキソソームによる適切な分解に重要な役割を有していることを示した。次に、補因子である MTR4 がエキソソーム複合体に結合するための経路として、MPP6 を介した経路と RRP6 を介した経路の 2 種類が存在するとされていることに着目し、両経路間における MTR4 リクルート量や RNA 基質分解の差異を比較検討した。その結果、RRP6 を介して複合体に MTR4 が十分な量リクルートされていても、MPP6 を介した MTR4 の複合体への結合がなければ、poly(A)+ RNA 基質の分解は至適には行われなことを示した。その際、MPP6 は MTR4 をエキソソーム複合体内の適切な場所に配置させることで至適な基質分解に機能している可能性を見出した。これは限定された RNA 基質を取り扱う *in vitro* での解析では捉えられなかった事象であり、種々の基質や他の因子が存在する細胞内環境において基質分解を評価することで初めて明らかにできた分子機構である。

さらに本論文では、核内 poly(A)+ RNA 基質を対象にしたトランスクリプトーム解析を実施し、MPP6 が標的とする RNA 基質について調査を行った。なお、この際エキソソーム阻害時に RNA 基質が強固な凝集体を形成することから難抽出性が疑われたため、RNA 調製法や cDNA ライブラリー調製法に様々な工夫を加えた結果、従来よりも広範囲にわたるエキソソームの基質同定と解析を可能とすることに成功した。この新たな手法を用いて MPP6 の標的とする基質 RNA を同定したところ、核内エキソソームの基質 RNA の一部が特に影響を受けていることが明らかとなった。MPP6 が標的とする基質 RNA についての網羅的解析はこれまでヒト細胞において例がなく、補因子 MPP6 が核内エキソソームの基質 RNA 分解において特異的な基質サブセットを標的として機能していることを明らかとした点で重要である。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、RNA 代謝研究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おり、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。更に、令和 5 年 1 月 31 日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