

ピリミジン合成酵素阻害による核内poly(A)⁺ RNA代謝
への影響解析

三宅俊太郎

目次

1. 要旨	2
2. 略語表	4
3. 序論	6
4. 材料と方法	10
5. 結果	13
6. 考察	37
7. 参考文献	42
8. 謝辞	47

1. 要旨

真核生物では、DNAの遺伝情報からpre-mRNAが転写され、5'末端のキャップ形成、スプライシングによるイントロン除去、3'末端の切断とポリアデニル化といった過程を経ることで成熟したmRNAとなる。その後、成熟したmRNAが選択的に核内から核膜孔を通過して細胞質へと輸送され、細胞質でのタンパク質翻訳の鋳型となる。一方、これらのプロセッシングを完了していないmRNAは核内に保持される。この機構は、遺伝子発現の効率を上げるだけでなく、正常にプロセッシングを受けたものだけを細胞質へと輸送するための品質管理機構も担っている。生物は外部からの刺激によってその遺伝子発現や代謝を変化させることが知られており、核内のmRNA代謝への影響が示唆されているが、多くのことが不明なままである。

当研究室ではこれまでに、mRNAプロセッシングが阻害されるとpoly(A)⁺ RNAが核内に蓄積される表現型を指標に、蛍光 in situ hybridization法 (RNA-FISH法) を用いた化合物の評価と探索を行う手法を確立している。本研究はこの探索法を用いて、ライブラリーに文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』より提供された、標準阻害剤キットを使用して阻害剤を評価し、mRNA代謝に影響を及ぼす細胞内シグナルの探索と分子機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

362種類の阻害剤をスクリーニングすることによりmRNA代謝へ影響を与えると考えられる阻害剤を8種類選別した。そのうちの一つとしてミトコンドリアの呼吸酵素複合体III (呼吸鎖複合体III) の阻害剤、Antimycin Aを見出した。呼吸鎖複合体は、ミトコンドリア内膜上でATPの生産を担っている。呼吸鎖複合体III以外に呼吸鎖複合体IやIVの阻害剤を検討したところ、poly(A)⁺ RNAの蓄積をもたらすのは呼吸鎖複合体IIIの阻害剤のみであることを明らかにした。呼吸鎖複合体IIIは、細胞内ピリミジン合成の律速段階酵素であるジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ (DHODH) と特異的に電子の授受をすることから、ピリミジン合成阻害との関連が示唆された。そこで、呼吸鎖複合体III阻害剤によって顕著なpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じる条件で細胞外からウリジンを添加したところ、poly(A)⁺ RNA核内蓄積は解消された。また、DHODHの特異的阻害剤によってもpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が観察されたことから、呼吸鎖複合体III阻害剤によるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積はピリミジン合成経路の律速酵素DHODHの機能阻害によるものであることを明らかにした。

ピリミジン合成酵素の阻害により考えられる細胞への影響として、核酸の減少によるDNAの複製やRNAの合成への影響が考えられた。そこで、こうしたストレスによって誘導される因子として、セリン・スレオニンキナーゼであるAtaxia Telangiectasia Mutated (ATM) の機能に着目した。ATMの特異的阻害剤をDHODH阻害剤と同時に添加すると、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積が解消したことから、ATMの活性化がpoly(A)⁺ RNA核内蓄積には必要であることを明らかにした。ATM

はDNA合成阻害剤によっても誘導をされるが、Topoisomerase II阻害剤のような既知のDNA二重鎖切断誘導剤では顕著なpoly(A)⁺ RNA核内蓄積は生じないこと、また、同じ核酸でもプリン合成経路の阻害剤ではpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が生じないことから、ピリミジン合成阻害に特異的な反応であることを明らかにした。

また、先行研究からDHODH阻害剤によって核小体にストレスが生じることが報告されている。そこで、顕著なpoly(A)⁺ RNA核内蓄積と核小体構成因子との関連について検討を行ったところ、DHODH阻害剤によって核小体因子の局在変化は観察されたが、蓄積するpoly(A)⁺ RNAとの直接的な関連は観察されなかった。

以上の結果より、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じる細胞内シグナルとして、呼吸鎖複合体IIIからピリミジン合成経路の律速酵素DHODHに至り、ATMを介する経路が存在することを示した。

2. 略語表

ADP : Adenosine diphosphate
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATP : Adenosine triphosphate
ATR : Ataxia telangiectasia mutated and rad3 related
BSA : Bovine serum albumin
CoQ : CoenzymeQ₁₀
Cyt C : Cytochrome C
DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole
DHO : Dihydroorotic acid
DHODH : Dihydroorotic acid dehydrogenase
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DNA : Deoxyribonucleic acid
DSB : Double Strand Break
DTT, Dithiothreitol
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS : Fetal bovine serum
FDA : Food and Drug Administration
GalNAc : N-Acetyl-D-galactosamine
GlcNAc : N-Acetyl-D-glucosamine
HRP : Horse Radish Peroxidase
irCLIP : infrared crosslinking immunoprecipitation
mRNA : messenger RNA
mRNP : mRNA-protein complex
NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide
NE : Nuclear extract
ORO : Orotic acid
PAGE : Poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS : Phosphate-buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF : Polyvinylidene Difluoride
RNA : Ribonucleic acid
RNA-FISH : RNA-fluorescence in situ hybridization
rRNA : ribosomal RNA

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium dodecyl sulfate 5

siRNA : small interfering RNA

snRNA : small nuclear RNA

SSC : Standard saline citrate

TBS : Tris-buffered saline

TCA cycle : Tricarboxylic acid cycle

TritonX100 : Octylphenol ethoxylate

tRNA : transfer RNA

Tween20 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate

UDP : Uridine diphosphate

3. 序論

3-1 mRNA成熟過程と共役機構

真核生物では、DNAの遺伝情報がRNAポリメラーゼIIによって前駆体mRNA (pre-mRNA) に転写される。次いで、pre-mRNAは5'キャップ形成、スプライシング、3'末端ポリアデニル化といったmRNA成熟過程を経ることで成熟型mRNAとなる。また転写されたpre-mRNAからタンパク質へと翻訳される過程には、mRNAの転写や成熟過程に加えて、核外輸送、翻訳などの段階があり、それぞれの段階に関わるタンパク質がmRNA上で連携してこれらを効率的に進めている [1-3]。

細胞は外界からの様々な刺激に応じて、細胞機能の最適化、増殖や分化の制御など種々の反応を示すことが知られている。この応答は、遺伝子発現にも影響を与える場合がある [4, 5]。また、核内でのmRNAの動的変化 (mRNA代謝) を起こすことも示唆されている。しかし、どのようなシグナル伝達経路が核内mRNA代謝を制御・調節しているかについて、多くのことが不明なままである。

mRNA代謝制御の研究において、低分子阻害剤は古くから有用な研究ツールとして用いられてきた。特にスプライシング阻害剤は、スプライシング異常がみられる癌を始めとする様々な疾患の治療薬として期待されたことから、これまでに多くの種類が見出された。またスプライシング阻害剤の発見によって、スプライシング異常の解析が進み、スプライシングの制御機構の理解に大きな影響を与えた [6-8]。このことを受け、当研究室ではこれまでにmRNAが持つ特徴的なpoly(A)⁺ RNAを指標にした化合物評価法を確立し、mRNA代謝を制御できる低分子化合物の探索を行ってきている [9, 10]。食品由来成分の探索においては、低分子のアピゲニンやルテオリンがスプライシング阻害機能を持つことを見出し、その分子機構を明らかにしている [11]。本研究では、文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』より提供された標準阻害剤キット [32]をライブラリーに用いて、スプライシングのみならず核内のmRNA代謝を制御する新たな阻害剤のスクリーニングを試みた。

3-2 ミトコンドリア機能と*de novo*ピリミジン合成経路

ミトコンドリアは二重の膜構造からなり、内膜上で呼吸鎖複合体と呼ばれる一連の複合体群により細胞内の多くのATP合成を行っている [12, 13]。呼吸鎖複合体I (NADH脱水素酵素複合体) は、TCAサイクルあるいは解糖系で生成されたNADHにより、ユビキノンを還元する反応を触媒する。呼吸鎖複合体II (コハク酸脱水素酵素) は、TCAサイクルの構成要素でもあるコハク酸からフマル酸への変換によりユビキノンを還元する反応を触媒する。呼吸鎖複合体III (シトクロム還元酵素) では呼吸鎖複合体IとIIで生成される還元型ユビキノンをシトクロムc (CytC) への電子伝達が行なわれる。呼吸鎖複合体IV (シトクロム酸化酵素) は、還元されたCytCを用いて酸素分子を水に還元する。これらは電子伝達系と呼ばれており、複合体間の電子の受け渡

しによって膜の内側から外側へと、膜電位に逆らって水素イオンが輸送される。その結果生じた水素イオン勾配による化学ポテンシャルが、呼吸鎖複合体V (ATP合成酵素) によるATP合成に利用される。またミトコンドリアは、エネルギー産生のほかにもアポトーシス誘導やカルシウム貯蔵など、多彩な機能を有している [14, 15]。さらにピリミジン合成の律速段階の反応も担っている [16-18]。

ピリミジンはプリンと共に、核酸を結合塩基の骨格によって二つに大別した呼称である。どちらも、細胞内での新規合成経路 (*de novo*経路) と細胞外からの取り込み経路 (*salvage*経路) とを持ち、各経路は細胞の状態に応じて非常に複雑に調整されている。ピリミジンの*de novo*合成経路はグルタミン、炭酸水素イオン、アスパラギン酸から塩基となる六員環を合成し、ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) に転移させるまでの6段階の反応で構成されている。このうち4段階目の反応を制御するミトコンドリア内膜上酵素ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ (DHODH) は、呼吸鎖複合体IIとIIIの間に位置しており (図1)、*de novo*合成経路における律速反応を触媒している。この反応はジヒドロオロト酸 (DHO) をオロト酸 (ORO) へ酸化する反応であり、2ステップの酸化還元反応を伴う。1つはフラビンモノリン酸(FMN)をFMNH₂に還元する反応で、もう1つはFMNH₂をFMNに酸化する際にcoenzyme Q (CoQ) をCoQH₂に変換する反応である。DHODHでの反応によって酸化されたCoQは、ミトコンドリア内膜上で呼吸鎖複合体IIIとの間で電子の受け渡しが行われる。このことから、DHODH及びミトコンドリア電子伝達系は、相互に影響し合うことが報告されている [16-18]。

DHODH阻害剤は、自己免疫疾患、がんやリウマチへの抑制効果が報告されているほか、マラリアや多種類のウイルス (フラビウイルスやエボラウイルス、そしてインフルエンザA,Bなど) に対して抗ウイルス活性を持つことが報告されている [19-23]。加えて昨今では、世界的に流行したSARS-CoV-2の治療薬としての効果も期待されており [24, 25]、DHODH阻害剤の細胞への効果を解明する意義は高まっている。現在までにアメリカ食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) の承認を得ているDHODH阻害剤はleflunomideとTeriflunomideの2種類であり、DHODH阻害剤の顕著な効果に対してまだ臨床利用できる薬剤は少ないのが現状である。このため、副作用や生体への効果について多方面からの解析が必要とされ、DHODH阻害剤が細胞に与える効果を解明することは、学術のみならず臨床応用に向けても大きな意義を持つ。

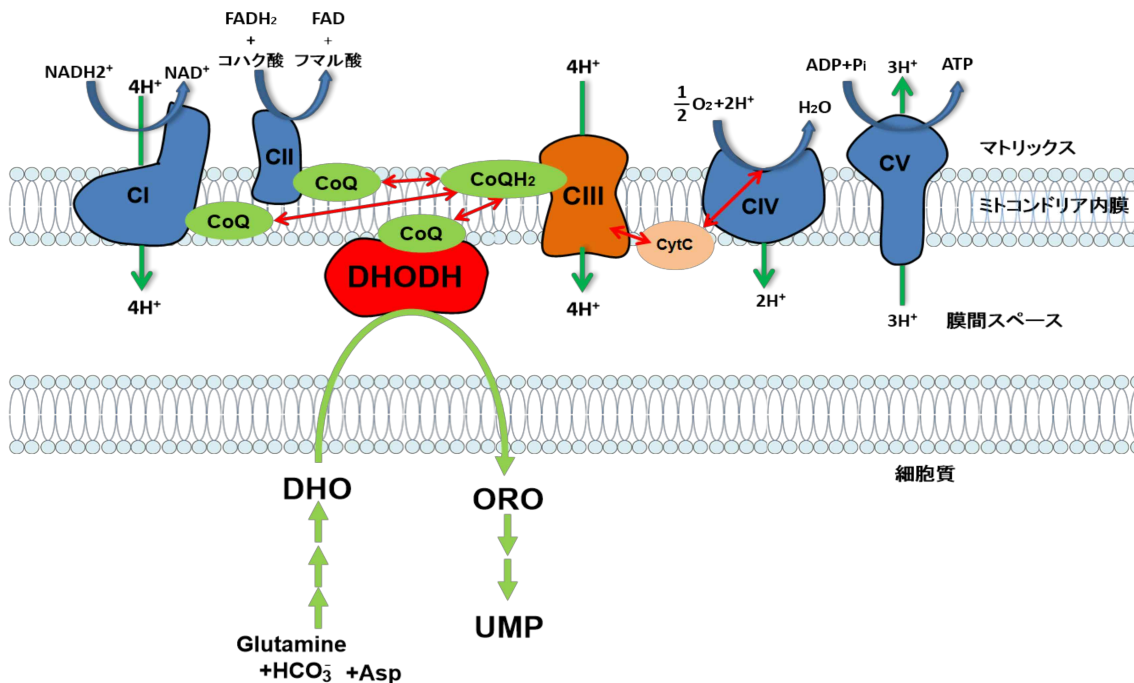


図1 ミトコンドリア内膜酵素群とDHODH反応の概略

赤い矢印は電子の動きを示し、黄緑の矢印はピリミジン新規合成経路を示す。ミトコンドリア内膜では呼吸鎖複合体I~IVまで電子の授受が行われ、プロトン (H⁺) の膜間スペースへの汲みだしと呼吸鎖複合体Vでの化学ポテンシャルを利用したATP合成が行われる。DHODHはDHOをOROに変換する反応を触媒し、最終的にCoQを介して呼吸鎖複合体IIIと電子の授受を行う。CI~V: 呼吸鎖複合体I~V、CoQ: Coenzyme Q、CytC: Cytochrome C、DHO: ジヒドロオロト酸、ORO: オロト酸。

3-3 ATMの機能について

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) は、稀な遺伝性疾患である毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia) における責任因子として名づけられたセリンスレオニンキナーゼである。1995年に発見され、これまで主にゲノムDNAの二重鎖切断ストレス (Double Strand Break(DSB)) の調節因子として研究されてきたほか、リボソームDNAの損傷に応答して核小体ストレス反応を促すことも明らかとなっている [26-28]。通常は二量体もしくは多量体として存在し、自己リン酸化により活性化することで単量体となって下流の数百におよぶ因子をリン酸化すると考えられている。また、DNAの損傷構造によらず酸化ストレスだけでも活性化することなど様々な細胞機能に関わっている [29, 30]。

DHODHとATMとの関連について、DHODH阻害剤によって細胞周期停止やp53を介したアポトーシスが生じること、そして核小体ストレス応答との関連が近年になって報告されるようになった [38-40]。これらの反応はATMの下流因子による代表的な応答であることから、DHODH阻害とATMを介した応答について関連が示唆されている。

3-4 本論文の目的と構成

本論文は、RNA代謝を制御する新たな阻害剤や細胞内シグナル経路を見出すことを目的に研究を行った。まず、文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』より提供された標準阻害剤キットをライブラリーに用いて、核内 mRNA代謝を制御する阻害剤をスクリーニングした。次いでスクリーニングによって見つかった呼吸鎖複合体III阻害剤であるAntimycin Aが、既知の核内構造体とは異なる領域にpoly(A)⁺ RNAを蓄積させることを見出し、この現象のメカニズムの解明を試みた。続いて呼吸鎖複合体IIIがDHODHと相互に影響を及ぼし合うという先行研究を元に、DHODH阻害剤によってもAntimycin Aと同様のpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が生じること、さらに*salvage*経路によってもピリミジンは合成されることから細胞外からウリジンを添加したところ、poly(A)⁺ RNA核内蓄積が解消することを明らかにした。また、プリン合成阻害剤ではpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が生じないことから、細胞内核酸の枯渇ではなくピリミジンの減少あるいは枯渇に対して特異的にpoly(A)⁺ RNA代謝が変化することを見出した。DHODH阻害剤に関する先行研究を元に、RNA代謝に関連する知見として、DNA複製の阻害や核小体へのストレスがpoly(A)⁺ RNAに与える影響について検討を行った。これらのストレスによって誘導されるセリンスレオニンキナーゼATMがpoly(A)⁺ RNA核内蓄積に必要であることを見出した。本結果により、当初目的としていた新たなRNA代謝反応を発見した。このことは、RNA研究における学術的な意義のみならず、DHODH阻害剤という薬剤の臨床への応用にむけた知見としても期待される。

4. 材料と方法

4-1細胞培養

U2OS, HeLa, MCF7細胞は、非働化処理 (56 °C, 30分) したFetal Bovin Serum (FBS) を6 %添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) で37 °C、5 % CO₂条件で培養した。

4-2抗体

使用した抗体は以下の通りである：抗SRRM2マウスモノクローナル抗体 (S4045) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (SC35に対する抗体として供給されたが、この抗体は最近SRRM2を認識することが判明した [31] のでSRRM2と表記)、抗ATMウサギモノクローナル抗体 (2873) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、抗phospho-ATMマウスモノクローナル抗体 (Ser1981) (4526) (Cell Signaling Technology)、抗Chk2 マウスモノクローナル抗体 (3440) (Cell Signaling Technology)、抗phospho-Chk2 ウサギモノクローナル抗体 (2661) (Cell Signaling Technology)、抗actin ウサギポリクローナル抗体 (A2066) (Sigma-Aldrich)、抗coilin マウスモノクローナル抗体 (C1862) (Sigma-Aldrich)、抗 γ H2AXマウスモノクローナル抗体 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)、抗DDX21マウスモノクローナル抗体 (sc-376953) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、抗nucleolinマウスモノクローナル抗体 (Dr. Shigehiro Yoshimuraより提供)、抗TCOF1 マウスモノクローナル抗体 (sc-374536) (Santa Cruz Biotechnology)。

4-3 阻害剤

スクリーニングに用いた阻害剤ライブラリー (362種) は文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』より提供された標準阻害剤キット [32] を用いた。その他に使用した阻害剤は以下の通りである：Antimycin A (2247-10) (BioVision, Brugg, Switzerland)、Brequinar (B5707) (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) Atovaquone (AK544285) (Ark Pharm, Inc, Libertyville, IL, USA)、Teriflunomide (163451-81-8) (Tokyo Chemical Industry)、Methotrexate (139-13571) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、6-Mercaptopurine (M0063) (Tokyo Chemical Industry)、CP466722 (25417) (Cayman Chemical, MI, USA)、Etoposide (055-08431) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、Rotenone (AK115691) (Ark Pharm, Inc)、NaN₃ (195-11092) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)。

4-4 siRNA

標的mRNAのKnockdown (K.D.) にはIntegrated DNA TechnologiesからsiRNA

を購入した。トランスフェクションはLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用し、製造元指定のプロトコールで使用した。使用したsiRNAの配列は以下の通りである:

TCOF1; (5'-
rGrGrArCrUrUrGrCrCrArUrCrArArGrCrArUrGrArArArGAA-3', 5'-
rUrUrCrUrUrUrCrArUrGrCrUrUrGrArUrGrGrCrArArGrUrCrCrGrC-3')

4-5 RNA Fluorescence in situ hybridization (RNA-FISH)

12 well plate上にカバーガラスを乗せ、その上に細胞 (4×10^4 cells/mL) を播種後24時間培養した。細胞を阻害剤とともに指定の時間培養し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の10 %ホルムアルデヒドで20分間固定した後、0.1 % Triton X-100/PBSで10分間透過処理を行った。細胞はPBSで10分間×3回洗浄して界面活性剤を除去し、2×標準クエン酸ナトリウム (SSC) で5分間×1回洗浄してバッファーの内容を入れ替え、ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer (Ambion, Austin, TX) で42 °C、1時間プレハイブリダイゼーションを行い、10 pmol Alexa Fluor 594-ラベルされたoligo-dT₄₅プローブ (Molecular Probes, Eugene, OR) と一晩インキュベートした。その後、細胞を2×SSC、0.5×SSC、0.1×SSCで42 °Cにて各10分間洗浄した。核は4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) で可視化した。蛍光画像は、OLYMPUS DP70カメラ (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を備えたZeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いてランダムに捕捉した。共焦点顕微鏡画像は、FLUOVIEW FV10i顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて取得した。核と細胞内の全poly(A)⁺ RNAシグナルの比率は、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて算出した。

4-6 免疫蛍光染色

細胞の培養、阻害剤の添加等は、0.1 % Triton X-100/PBSで10分間透過処理するところまで上記RNA-FISHに記載の方法で行った。次に、細胞を6 %ウシ血清アルブミン (BSA)/PBSで室温、1時間ブロッキングした。その後、カバーガラス上の細胞を2 % BSAを含むPBS中で一次抗体とインキュベートし、続いてAlexa Fluor 488で標識した二次抗体とインキュベートした。二次抗体を反応させた後、細胞をPBS中4 %ホルムアルデヒドで10分間固定した。次に、PBSで10分間3回洗浄して界面活性剤を除去し、2×SSCで5分間1回洗浄してバッファーの内容を入れ替え、ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer (Ambion, Austin, TX) で42 °C、1時間プレハイブリダイゼーションを行い、10 pmol Alexa Fluor 594-ラベルされたoligo-dT₄₅プローブ (Molecular Probes, Eugene, OR) と一晩インキュベートした。翌日、細胞を2×SSC、0.5×SSC、0.1×SSCで42 °Cにて各10分間洗浄した。核はDAPIで可視化した。蛍光画像は、上記RNA-FISHに記載の方法で取得した。

4-7 lncRNA蛍光染色

細胞の培養、阻害剤の添加等は、0.1 % Triton X-100/PBSで10分間透過処理するところまで上記RNA-FISHに記載の方法で行った。固定した細胞をULTRAhyb-Oligo Hybridization Bufferで55 °C、1時間プレハイブリダイゼーションした後、2.8 µg/mL lncRNA probeと一晩インキュベートした。その後、細胞を50 %ホルムアミド/SSC with 0.1 % tween 20で55 °C、30分間2回、NTET buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 0.1 % tween 20) で37 °C、15分間2回、2×SSC with 0.1 % tween 20で55°C、30分間、0.1×SSC with 0.1 % tween 20で55 °C、30分間1回、PBSで室温1回、洗浄した。次いで、カバーガラス上の細胞を6 % BSA/PBSで室温、1時間ブロッキングした。さらに、2 % BSA/PBSを含む抗DIG1抗体とインキュベートし、続いてAlexa Fluor 594で標識した二次抗体とインキュベートした。二次抗体のインキュベーション後、細胞を4 %ホルムアルデヒド/PBSで10分間固定した。その後、PBSで10分間1回、2×SSCで5分間2回洗浄し、バッファーの内容を入れ替え、ULTRAhyb-Oligo Hybridization Bufferで42 °C、1時間プレハイブリダイゼーションした。次いで、10 pmolのAlexa Fluor 488標識したoligo-dT₄₅プローブと一晩インキュベートした。インキュベーション後、細胞を2×SSC、0.5×SSC、0.1×SSCで42 °Cにて各5分間洗浄し、核をDAPIで可視化した。共焦点顕微鏡画像は、FLUOVIEW FV10i 顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて取得した。

4-8 Western Blotting

培養細胞を回収し、PBSで洗浄後、Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix) を用いて超音波破碎を行った。全細胞抽出物をSDS-PAGEで分離し、BioRad Trans-Blot (BioRad, Hercules, CA) を用いてFluoroTrans Polyvinylidene Fluoride または Polyvinylidene Difluoride (PVDF) Transfer Membranes (Pall, Ann Arbor, MI) にブロットした。その後、PVDFメンブレンを5 %ウシ胎児血清/0.1 % Tween20含有トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で室温下1時間ブロッキングし、一次抗体と4°Cで一晩連続回転しながら反応させた。メンブレンを0.1 % Tween 20を含むTBSで10分ずつ3回洗浄し、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体と室温で3時間連続回転しながらインキュベートした。ブロットした膜を 0.1 % Tween 20 を含む TBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、化学発光試薬 (Millipore, Darmstadt, Germany) と反応させ、画像分析装置 LAS 4000 mini (GE Healthcare, Chicago, IL) で検出した。

5. 結果

低分子阻害剤スクリーニング

先行研究により、当研究室ではRNA-FISH法を活用した核内mRNA代謝阻害剤のスクリーニング法を確立しており [9]、mRNA代謝に変化を生じさせる化合物を細胞に添加すると、poly(A)⁺ RNAの局在の変化として観測・測定できる。この手法により、既知の阻害剤の中から、mRNA代謝に影響する阻害剤やシグナルの探索を試みた。なお、阻害剤ライブラリー (362種) は文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』より提供された標準阻害剤キット [32] を用いた。細胞にサンプルをそれぞれ2 μMの濃度で添加して24時間培養後、細胞を固定してRNA-FISH法によりpoly(A)⁺ RNAを検出した。その後サンプルを顕微鏡下で蛍光シグナルを撮影し、画像データをもとに細胞の核と細胞全体との蛍光強度を数値化することで核内に蓄積したpoly(A)⁺ RNAの量を定量した。Negative controlには溶媒として用いたDMSOを使用し、Positive controlにはmRNAの核内蓄積を生じさせることが報告されている薬剤Gex1aを終濃度30 ng/mlで用いた。最終的に阻害剤ライブラリーから顕著なpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積をおこした阻害剤を8種類選別した (図2A, B)。

これまでに見つかっているmRNA代謝阻害剤の多くは、スプライシング阻害剤であったことから、8種類の阻害剤についてスプライシングとの関連を検証した。スプライシングが阻害されたmRNAは、核スペックルと呼ばれる核内構造体に蓄積することが知られている。そこで、スペックル構成タンパク質であるSRRM2と蓄積したpoly(A)⁺ RNAとの共染色を行った。8種類中7種類の阻害剤では蓄積したpoly(A)⁺ RNAはSRRM2と局在が一致した。このことから、これらの阻害剤によるスプライシング阻害との関連が示唆されたのに対し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IIIの特異的阻害剤Antimycin Aを添加したサンプルではpoly(A)⁺ RNAと核スペックルとの局在が一致しなかった (図3)。したがって、Antimycin A添加時のpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は、スプライシングの阻害とは別の要因により引き起こされた可能性が示唆された。

そこで核スペックルと異なる領域にpoly(A)⁺ RNAを蓄積させたAntimycin Aについてさらなる解析を行った。まずAntimycin Aによるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が生じる条件を検討するため、細胞の種類 (U2OS, MCF7, HeLa) や添加濃度 (0.125~2 μM)、添加時間 (12~36 h) を変えて、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積の様子を観察した。するといずれの細胞でもpoly(A)⁺ RNA核内蓄積は観察された。また、0.5 μM以上の濃度で36 h細胞を培養すると安定してpoly(A)⁺ RNA蓄積が生じることを確認した (図4A-C)。次いで、ミトコンドリア電子伝達系と核内のpoly(A)⁺ RNA蓄積との関連を調べるため、他の呼吸鎖複合体に対する阻害剤を細胞に添加し、同様のpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が生じるか検討した。呼吸鎖複合体Iの阻害剤としてRotenone、呼吸

鎖複合体IVの阻害剤としてアジ化物であるNaN₃を用いて同様のRNA-FISHによる観察を行ったところ、意外なことにいずれの阻害剤によってもpoly(A)⁺ RNA核内蓄積は観察されなかった (図5A, B)。一方、呼吸鎖複合体IIIの阻害剤でAntimycin Aと構造および呼吸鎖複合体IIIの阻害部位が異なる阻害剤Atovaquone [33] ではAntimycin Aと同様のpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が観察され、また蓄積部位はスペックルとは一致しなかった (図6A-C)。

呼吸鎖複合体IIIの阻害によって特異的に生じるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積現象は、これまでに報告がなく、そのメカニズムも明らかでない。したがって阻害剤を用いたスクリーニングによって、核内のmRNA代謝を制御する新たな細胞内シグナル経路が存在することを明らかにした。そこで呼吸鎖複合体IIIの阻害から核内mRNA代謝変動までのシグナル経路について、さらに解析を進めることとした。

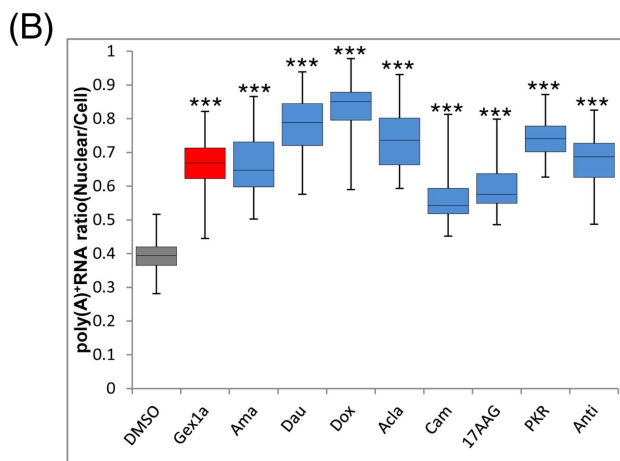
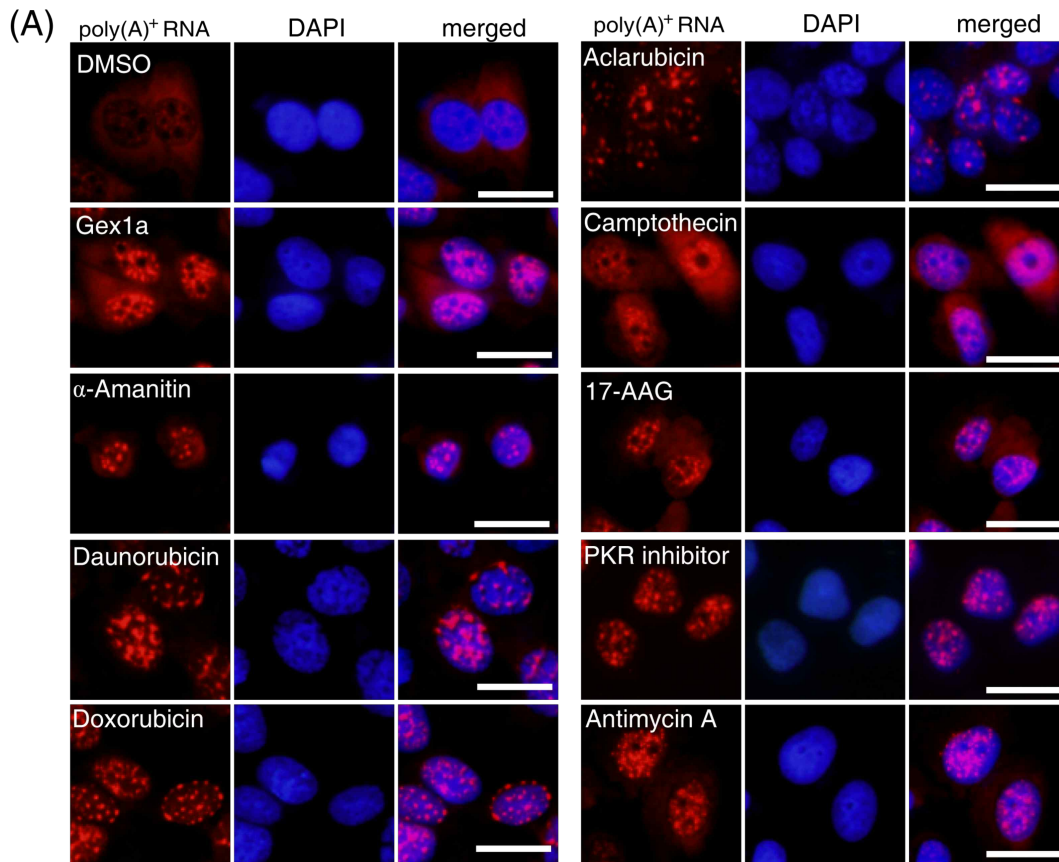


図 2 各阻害剤の添加による核内poly(A)⁺ RNAの蓄積

(A), スクリーニングで見出した阻害剤のRNA-FISH染色結果。U2OS細胞に各阻害剤を2 μ Mで24 h添加した。ネガティブコントロールにはDMSO、ポジティブコントロールにはGex1A (30 ng/ml) を用いた。(B), 阻害剤添加によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積について、蛍光標識したoligodT₄₅プローブの蛍光強度をImage Jにより細胞全体と核内で測定し、細胞全体に対する核の比率として定量した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。Dau: Daunorubicin, Dox: Doxorubicin, Acla: Aclarubicin, Ama: α -Amanitin, Cam: Camptothecin, Anti: Antimycin A

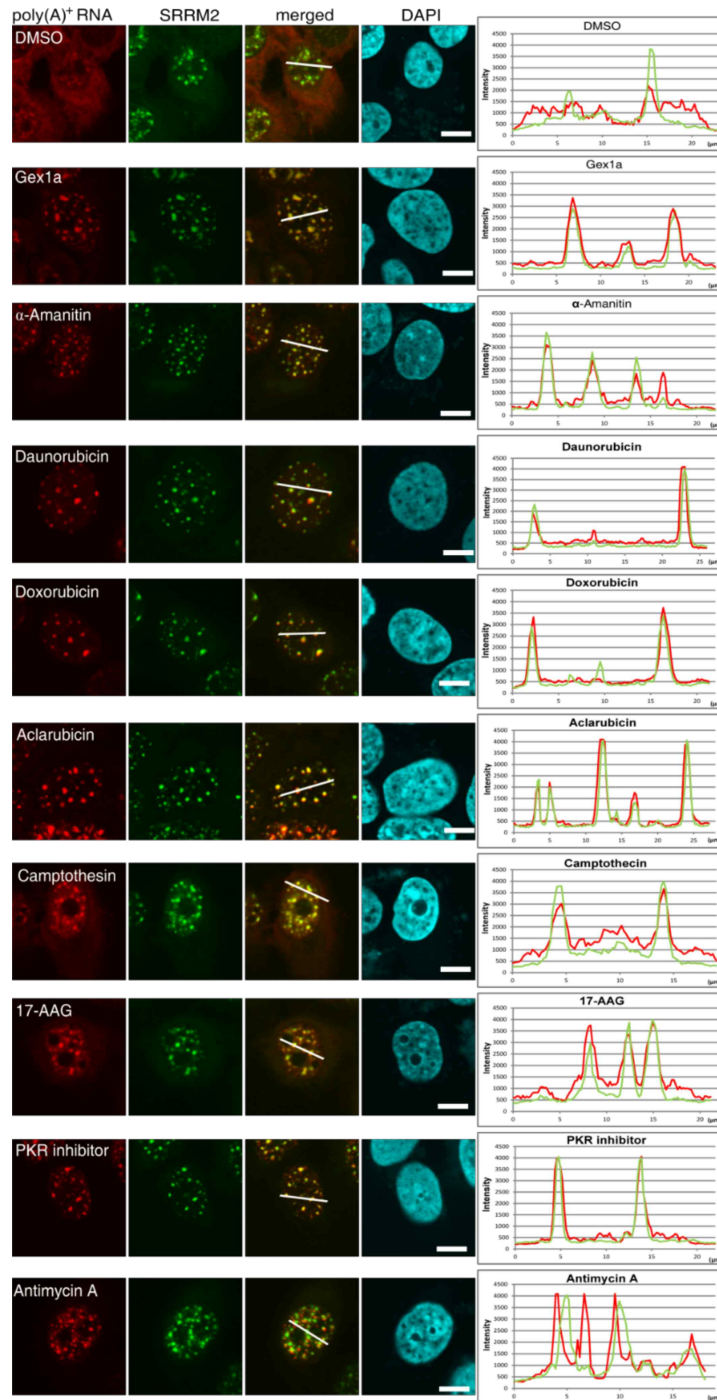


図3 Antimycin A添加により核内に蓄積するpoly(A)⁺ RNAは核スペックル構成因子のSRRM2と局在が一致しない

阻害剤の添加により核内に蓄積するpoly(A)⁺ RNAとスペックル構成因子SRRM2との局在をコンフォーカル顕微鏡により観察した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示した。各阻害剤の添加濃度は2 μM。スケールバーは10 μm。ラインプロットの縦軸は蛍光強度、横軸は細胞内距離を表す。ラインプロットの赤線はpoly(A)⁺ RNA、緑線はSRRM2の蛍光を示す。

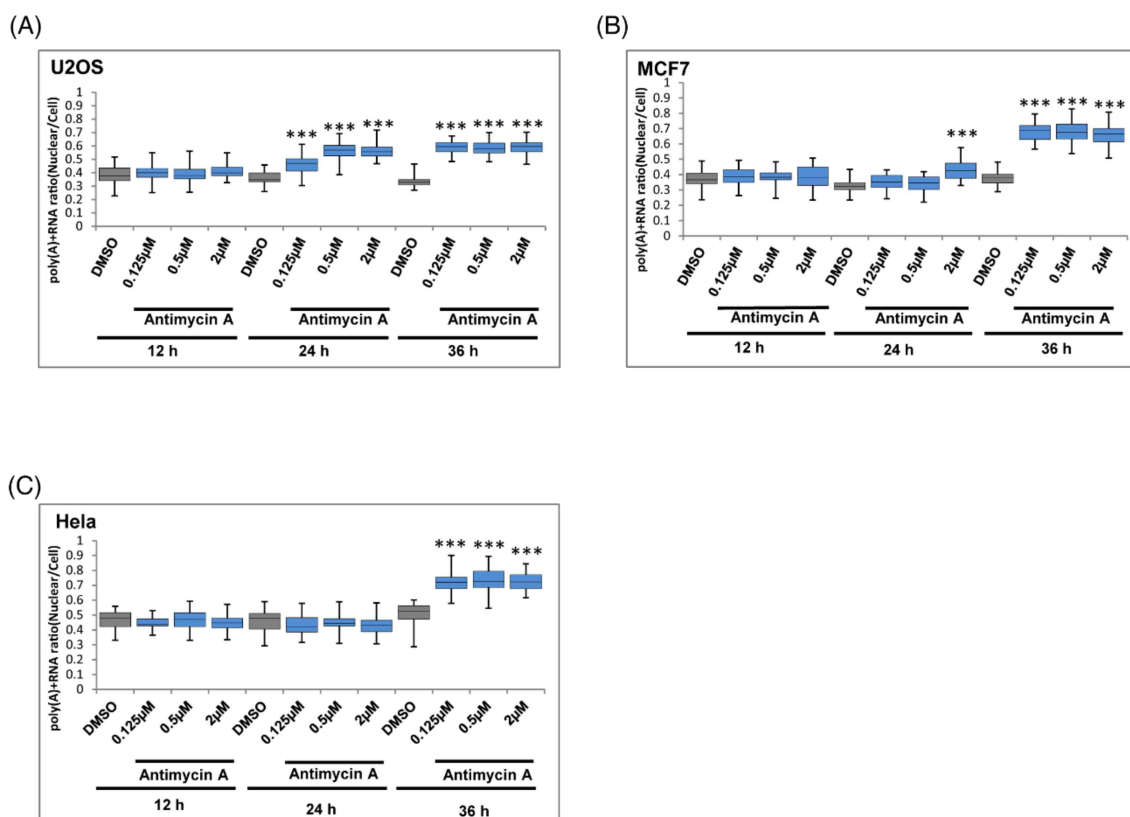


図4 Antimycin Aによる核内poly(A)⁺ RNA蓄積の細胞、濃度、時間依存性の検討

(A), U2OS細胞、(B), MCF7細胞、(C), HeLa細胞でのAntimycin A添加によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積について、蛍光標識したoligodT₄₅プローブの蛍光強度をImage Jにより細胞全体と核内で測定し、細胞全体に対する核の比率として定量した(n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。

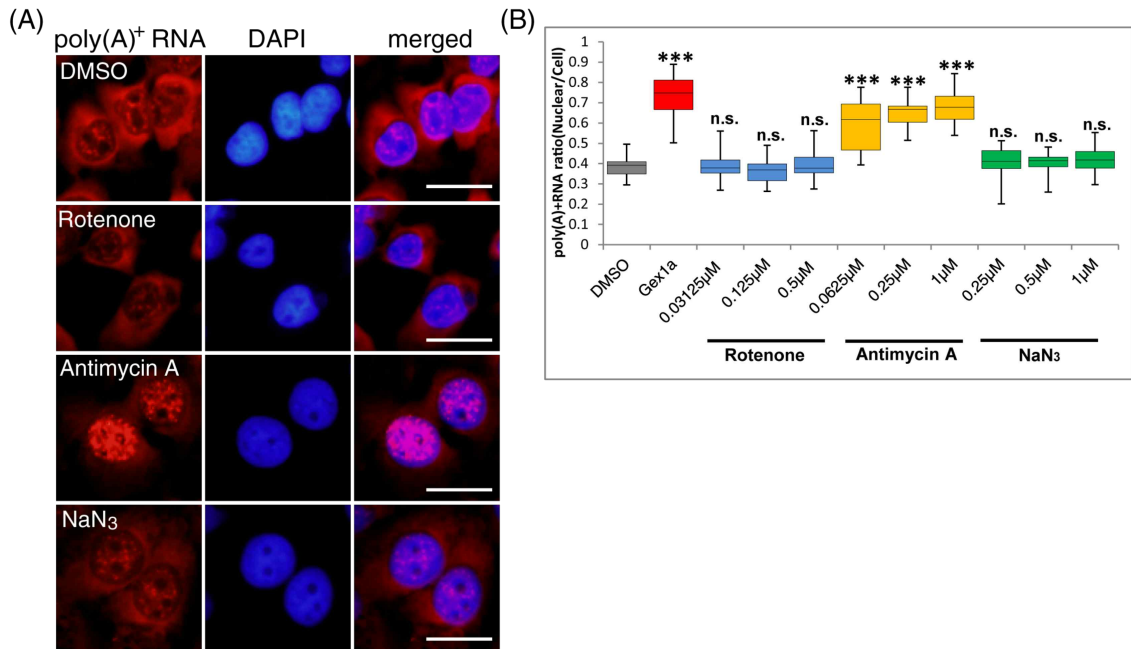


図5 ミトコンドリア呼吸鎖複合体の阻害剤のうち、呼吸鎖複合体IIIの阻害剤のみがpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を生じさせる

(A), ミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害剤をMCF7細胞に添加した際のRNA-FISH染色結果。Rotenoneは0.5 μM、Antimycin Aは0.25 μM、NaN₃ は1 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(B), (A)で得られたpoly(A)⁺ RNAの蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。

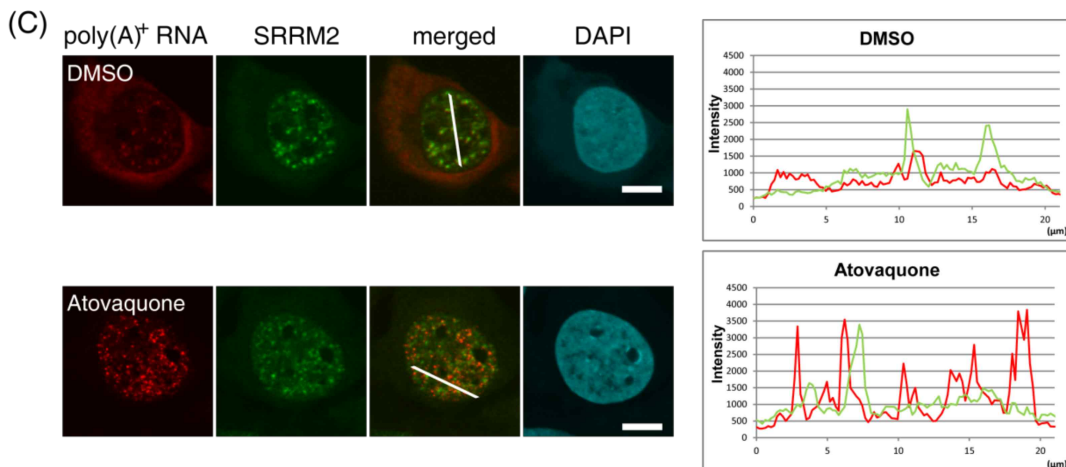
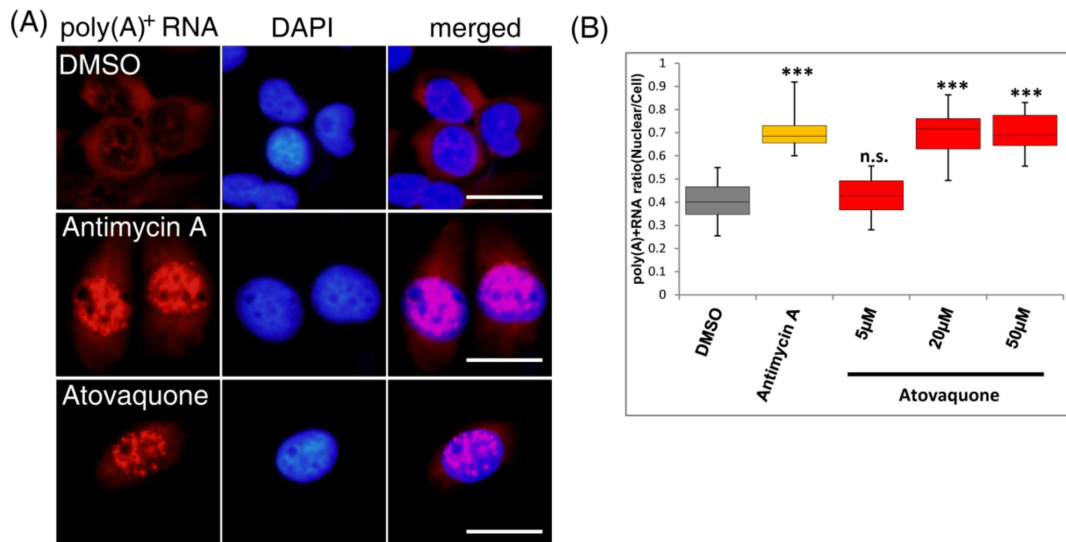


図6 Antimycin Aと異なる呼吸鎖複合体III阻害剤Atovaquoneによってもpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が観察される

(A), MCF7細胞にAntimycin A、Atovaquoneを添加した際のRNA-FISH染色結果。Antimycin Aは0.25 μM、Atovaquoneは20 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(B), (A)で得られたpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。(C), MCF7細胞でAtovaquoneにより核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAとスペックル構成因子SRRM2との局在をコンフォーカル顕微鏡により示した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示した。ラインプロット赤線はpoly(A)⁺ RNA、緑線はSRRM2の蛍光を示す。Atovaquoneの添加濃度は20 μM。スケールバーは10 μm。

ピリミジン合成阻害剤によるpoly(A)⁺RNA核内蓄積の検討

呼吸鎖複合体IIIに関する特異的な機能として、ピリミジン合成の律速段階酵素であるDHODHが呼吸鎖複合体IIIにCoenzymeQ₁₀ (CoQ) を介して電子の授受を行っていることに着目した (図1)。DHODHの機能はミトコンドリア電子伝達系に依存し、またDHODHの阻害が電子伝達系に影響を与えることも報告されている [16-18]。そこで、DHODHの特異的阻害剤であるBrequinar [34] を添加した細胞について、RNA-FISH法によるpoly(A)⁺ RNAの観察と核内蓄積の測定を行った。Antimycin Aの効果を検討した際に最もpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が顕著だったMCF7細胞にBrequinarを添加したところ、Antimycin Aを添加した場合よりも顕著なpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が観察された (図7A, B)。Brequinarによるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は、Antimycin Aの場合と同様、U2OSやHela細胞においても同様に観察された (図7C, D)。また、蓄積するpoly(A)⁺ RNAの核内局在について、スペックル (SRRM2) との共染色を行い、コンフォーカル顕微鏡による局在観察を行ったところ、呼吸鎖複合体III阻害剤添加時と同様スペックルとの局在は一致しなかった (図7E)。同様の結果は、Brequinarと異なるDHODH阻害剤Teriflunomideの添加によっても観察された (図8A-C)。

呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によって核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAが核内のどの領域に蓄積するか調べるため、スペックル以外の既知の核内構造体との共局在を解析した。核内構造体の中でもパラスペックルは、スペックルの近傍に相分離によって局在することが知られていること [35]、さらに本実験で観察されるpoly(A)⁺ RNAはスペックル近傍に局在が観察されることから、検討の必要のある構造体と考えられた。加えてRNAプロセッシングに関与すると報告されている核内構造体、cajal体 [36] との共局在についても解析した。その結果、DHODH阻害剤によって蓄積するpoly(A)⁺ RNAの場合も、Antimycin Aを添加した場合と同様に、パラスペックルならびにcajal体との共局在は見られなかった (図9A, B)。

以上の結果から、DHODH阻害剤によって生じるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は呼吸鎖複合体III阻害剤によって生じるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積と同様の挙動であることが示唆された。またDHODH阻害剤によって生じる蓄積の程度が高かったことから、ピリミジン合成経路の方が呼吸鎖複合体IIIよりもpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積に対し、中心的な役割を持つことが示唆された。すなわち、*de novo*ピリミジン合成経路は核内のpoly(A)⁺ RNA代謝に大きく関与している可能性が示唆された。

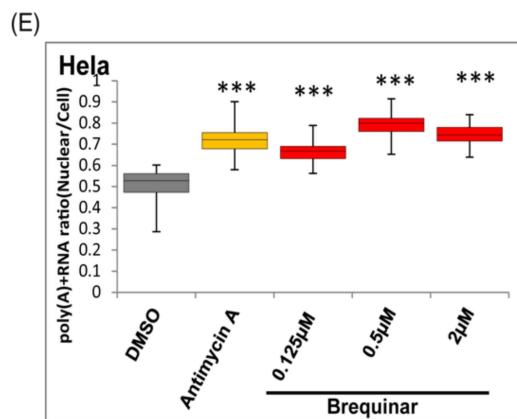
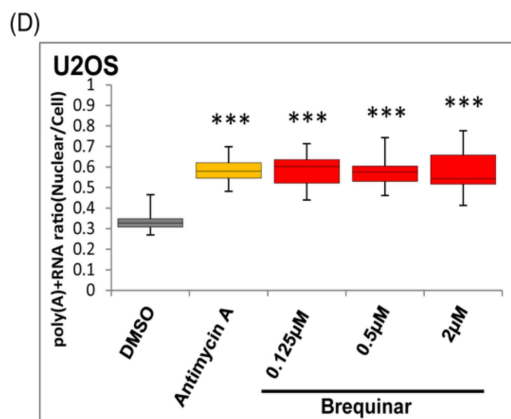
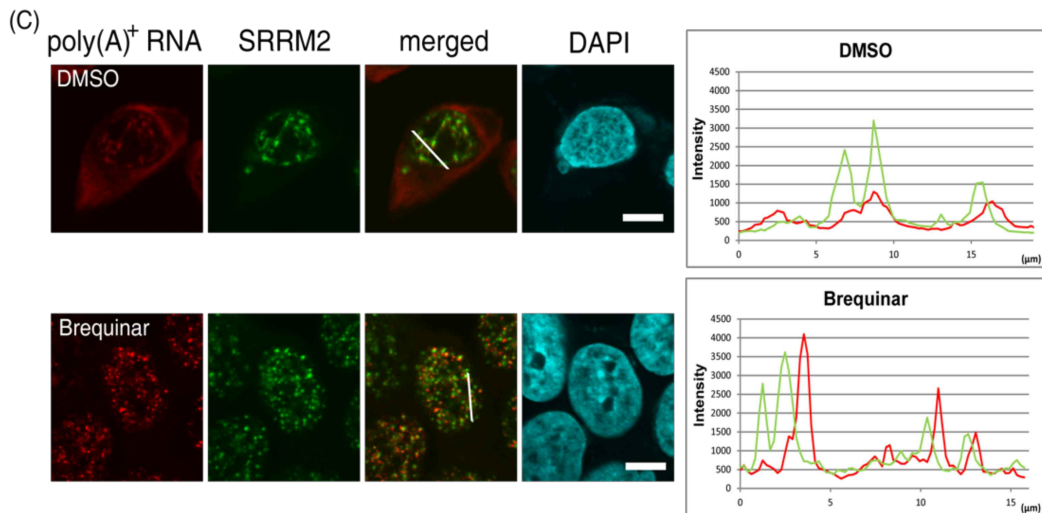
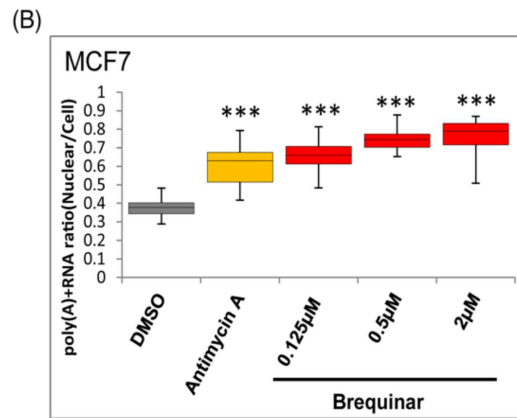
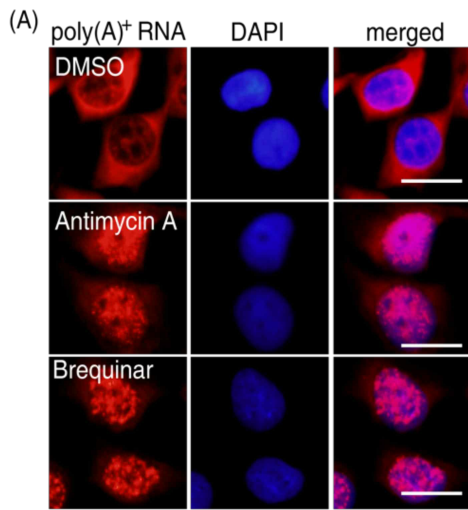


図7 DHODH阻害剤Brequinarは複数の細胞種においてAntimycin Aと同様のpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を引き起こす

(A) 呼吸鎖複合体III阻害剤、DHODH阻害剤をMCF7細胞に添加した際のRNA-FISH染色結果。Antimycin Aは0.25 μ M、Brequinarは0.5 μ Mをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μ m。(B), (A)で得られたpoly(A)⁺ RNAの蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。Antimycin Aの添加濃度は0.25 μ M。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnnettの検定を用いて実施した。*** $p < 0.001$ 。(C), MCF7細胞でDHODH阻害剤により核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAとスペックル構成因子SRRM2との局在をコンフォーカル顕微鏡により観察した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示した。ラインプロット赤線はpoly(A)⁺ RNA、緑線はSRRM2の蛍光を示す。Brequinarの添加濃度は0.5 μ M。スケールバーは10 μ m。(D), (E), RNA-FISHにより各阻害剤を添加した。U2OS (D)、Hela (E) 細胞でのpoly(A)⁺ RNAの蛍光強度を核/細胞全体の比で数値化した (n = 40)。Antimycin Aの添加濃度は0.25 μ M。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnnettの検定を用いて実施した。*** $p < 0.001$ 。

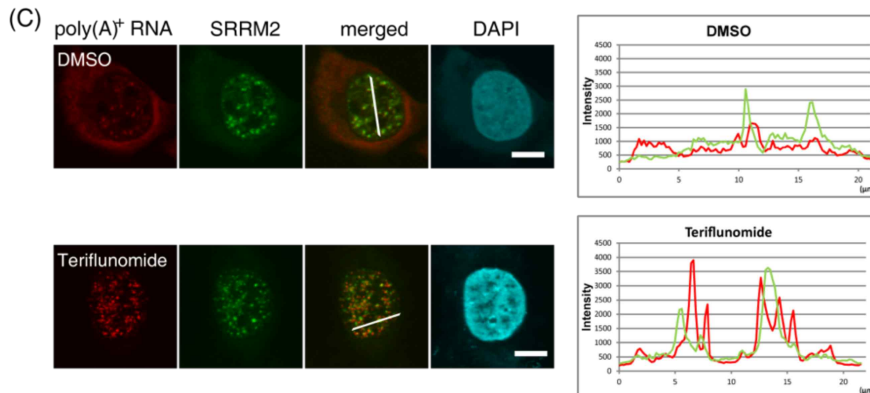
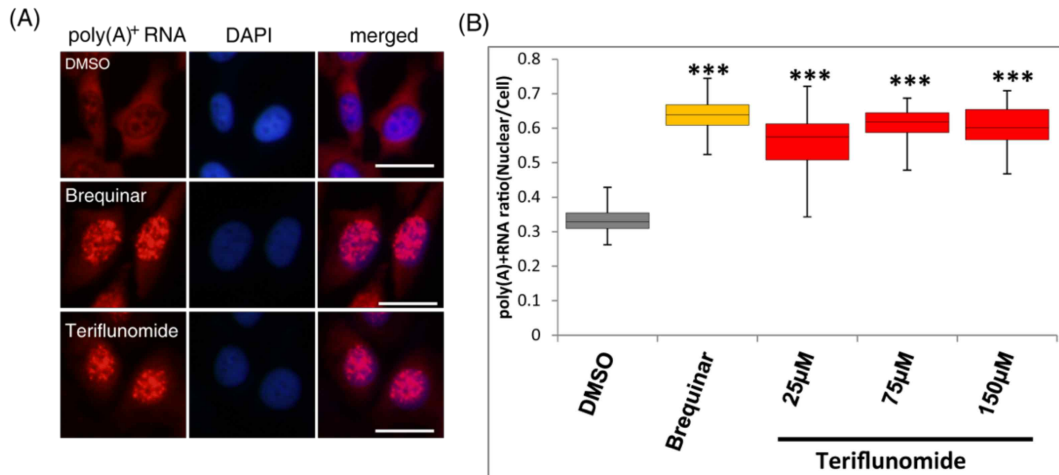


図8 Brequinarとは異なるDHODH阻害剤Teriflunomideによってもpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は観察される

(A), MCF7細胞にBrequinarまたはTeriflunomideを添加した際のRNA-FISH染色結果。Brequinarは0.5 μM、Teriflunomideは75 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。 (B), (A)で得られたpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。 (C), MCF7細胞でTeriflunomideにより核内に蓄積するpoly(A)⁺ RNAとスペックル構成因子SRRM2との局在をコンフォーカル顕微鏡により観察した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示した。ラインプロット赤線はpoly(A)⁺ RNA、緑線はSRRM2の蛍光を示す。Teriflunomideの添加濃度は75 μM。スケールバーは10 μm。

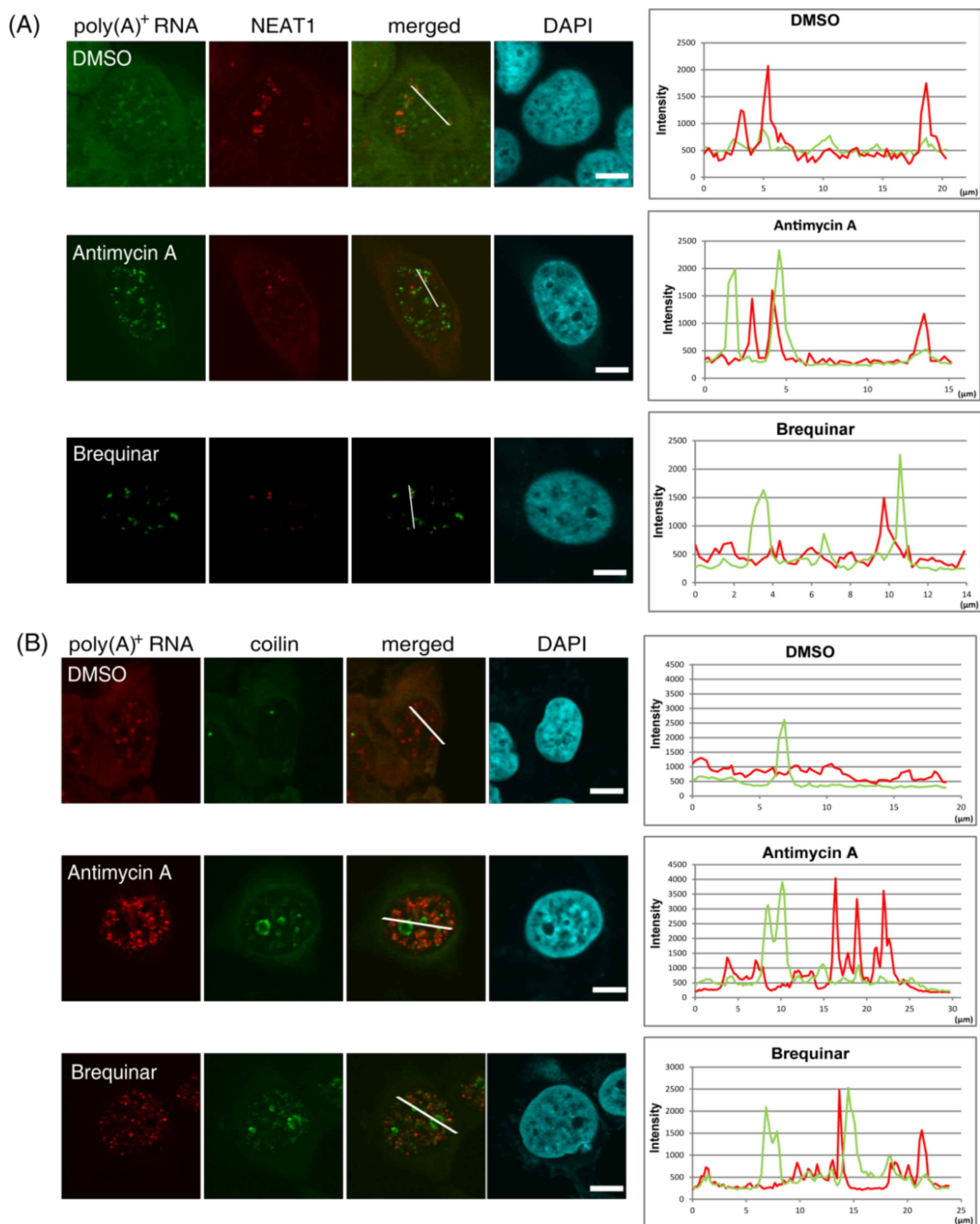


図9 呼吸鎖複合体III阻害剤、DHODH阻害剤により核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAはパラスペックルやcajal体構成因子と共局在しない

(A), 各阻害剤により核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAとパラスペックル構成因子、lncRNAのNEAT1との局在をコンフォーカル顕微鏡により観察した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示す。ラインプロット赤線はNEAT1、緑線はpoly(A)⁺ RNAの蛍光を示す。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは10 μm。(B), 各阻害剤により核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAとcajal体構成因子coilinとの局在をコンフォーカル顕微鏡により観察した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示す。ラインプロット赤線はpoly(A)⁺ RNA、緑線はcoilinの蛍光を示す。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは10 μm。

細胞内ピリミジンの枯渇がpoly(A)⁺ RNA核内蓄積を生じさせる

これまでの結果から、ピリミジンの減少あるいは枯渇がpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を引き起こした要因であることが示唆された。ピリミジンはDHODHの関与する*de novo*合成経路だけでなく、salvage経路によっても賄うことができることから、細胞外からピリミジンの一種であるウリジンを添加することによって、DHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が解消されるかについて検討した。ウリジンを培地に添加し、呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODHの阻害剤添加によるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積の変化を比較したところ、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積は解消された (図10A, B)。このことから、細胞内ピリミジンの減少あるいは枯渇がpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を引き起こすことが示唆された。

細胞内の核酸にはピリミジン経路から合成されるチミン、シトシン、ウラシルの他にプリン経路から合成されるアデニン、グアニンがある。そこで、核酸の減少が種類を問わずpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を生じさせるかについて、もう一方の核酸合成経路であるプリン合成経路の阻害によってpoly(A)⁺ RNA代謝に影響があるかについて、RNA-FISHによって検討した。6-Mercaptopurineは代謝拮抗薬としてプリンの合成を阻害し、Methotrexateは代表的な葉酸代謝阻害剤としてプリンやチミン合成を阻害することが知られている [37-39]。そこで、6-MercaptopurineやMethotrexateを添加して同様の解析を行ったところ、いずれの添加によってもpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は観察されなかった (図11A-D)。

以上の結果から、これまでに観察した種々の呼吸鎖複合体IIIとDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は、細胞内のピリミジン減少あるいは枯渇に特異的な反応であることが示唆された。

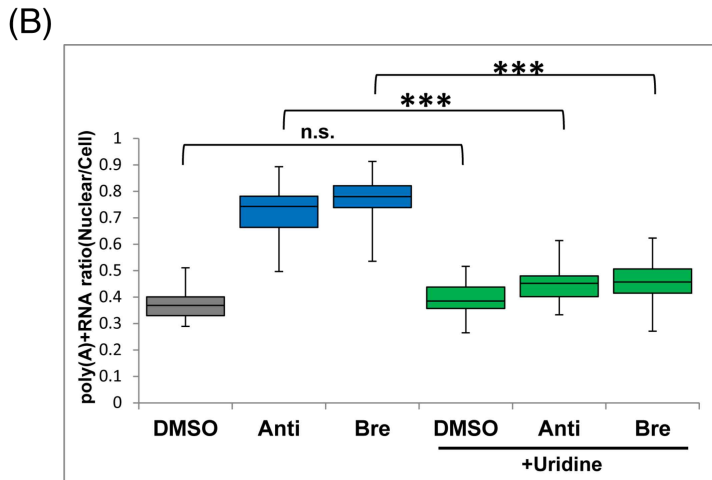
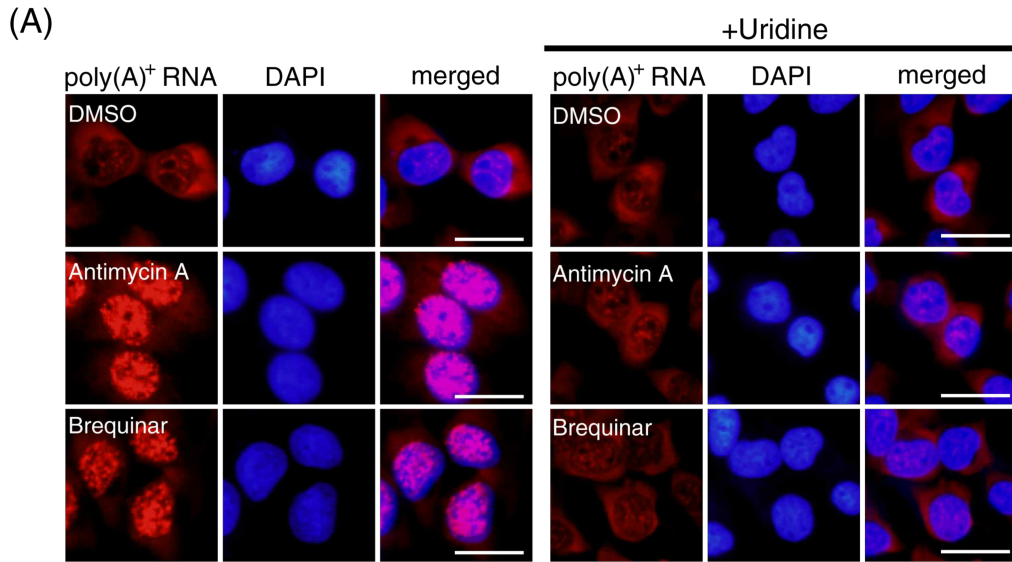


図10 ウリジンの添加によって呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が解消される

(A), 培地へのウリジン (2 mM) の添加によって、呼吸鎖複合体III阻害剤あるいはDHODH阻害剤の添加によってMCF7細胞に生じたpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積の変化をRNA-FISH法により観察した。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(B), (A)で得られたpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。

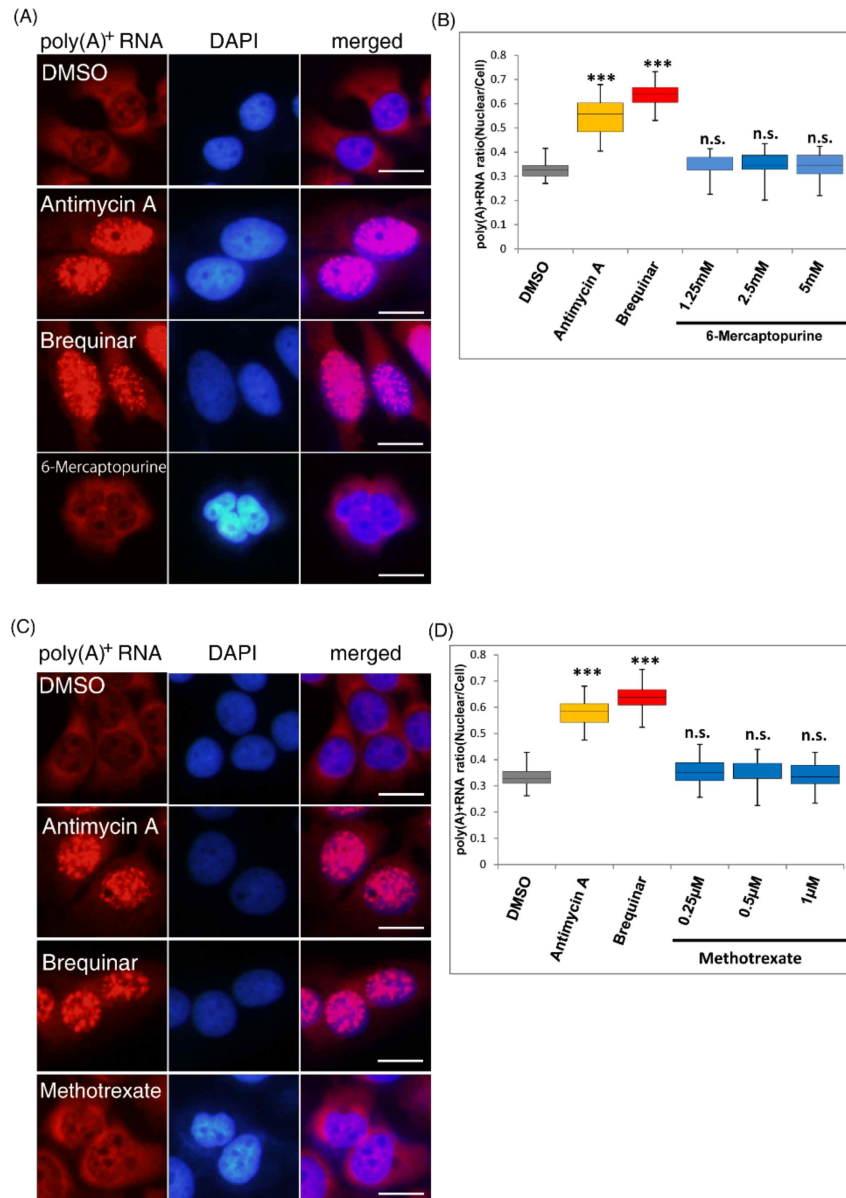


図11 プリン合成阻害剤ではpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は生じない

(A), MCF7細胞に6-Mercaptopurineを添加した際のRNA-FISH染色結果。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μM、6-Mercaptopurineは5 mMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(B), (A)で得られたpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnnettの検定を用いて実施した。***p < 0.001。(C), MCF7細胞にMethotrexateを添加した際のRNA-FISH染色結果。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μM、Methotrexateは1 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(D), (C)で得られたpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnnettの検定を用いて実施した。***p < 0.001。

poly(A)⁺ RNAの核内蓄積にはATMの活性化が必要である。

ピリミジンが減少あるいは枯渇すると、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積につながることを示唆された。このメカニズムを解明するために、ピリミジンの減少が細胞に与える影響について検討を行った。先行研究から、ピリミジン合成阻害剤によってDNA複製阻害やRNA合成阻害が生じ、DNA二重鎖切断 (Double Strand Break (DSB)) や核小体ストレスが生じることが報告されている [40-43]。そこで、上記の応答の際に誘導される共通の因子として、ATMに着目した。ATMはDNA二重鎖切断等によって自己リン酸化され活性化するセリン・スレオニンキナーゼで、下流の数百に及ぶターゲットをリン酸化することで細胞周期停止やアポトーシスの誘導等様々なシグナルを伝えるマスターレギュレーターであることが知られている [26-28]。実際にDHODH阻害剤であるBrequinarによってATMが活性化され、下流の免疫応答因子の転写が生じることや、ATMの下流因子であるp53はDHODH阻害剤によって活性化することが報告されている [44, 45]。そこで、Antimycin AやBrequinar処理によって生じるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積がATMの特異的阻害剤であるCP466722 [46] によって解消されるかについて検討した。その結果、Antimycin AやBrequinarと同時にCP466722を添加すると、核内にpoly(A)⁺ RNA蓄積は生じなかった (図12A, B)。このとき、ATMの活性化が阻害されていることは、ATMの自己リン酸化の阻害とATMの主要なリン酸化ターゲットであるCheckpoint kinase 2 (Chk2) のリン酸化の阻害としてWestern blottingにより確認した (図12C)。なお、ATMを活性化するpositive controlにはtopoisomeraseII阻害剤であるEtoposide [47, 48] を用いた。

以上の結果から、ピリミジンの減少あるいは枯渇によるpoly(A)⁺ RNA 核内蓄積はATMを介していることが示唆された。ただし、ATMを活性化させるEtoposideの添加によってpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じなかったことを考慮すると(図13A)、ATMの活性化はpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積において必要条件ではあるが、それだけで十分ではないことが示唆された。

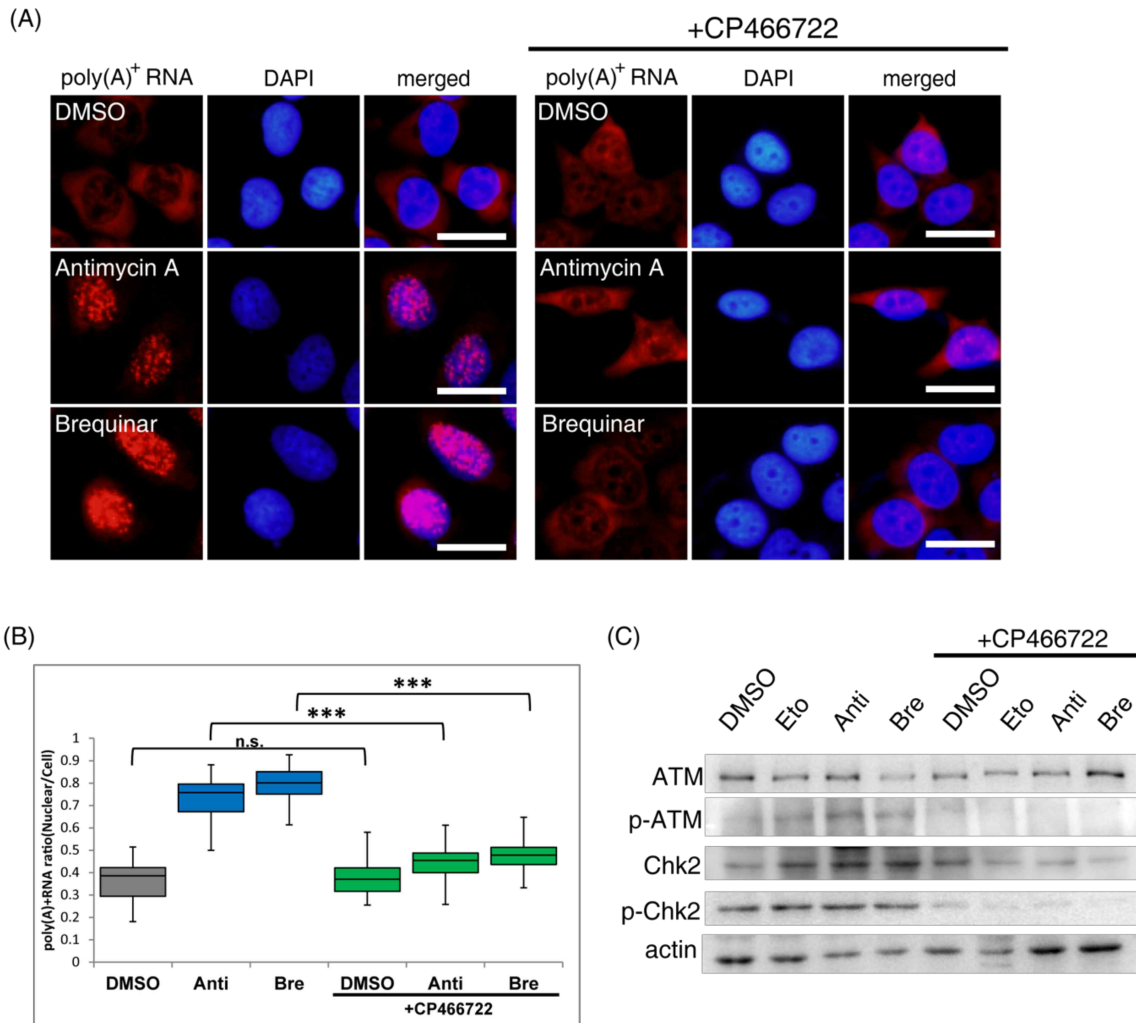


図12 呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積はATM阻害剤によって解消する

(A), MCF7細胞に各阻害剤を添加した際のpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積がATM特異的阻害剤CP466722によって変化するかについてRNA-FISH法により染色した。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μMを10 μMのCP466722と同時に36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(B), (A)のpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析(ANOVA)後、Tukeyの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。(C), CP466722によるATMの阻害効果をATMの自己リン酸化体及びATMの下流ターゲットChk2のリン酸化体の発現をイムノブロットすることにより確認した。ATM活性化のポジティブコントロールにはDNA topoisomerase II阻害剤のEtoposideを用いた。各阻害剤の添加濃度はAntimycin A : 0.25 μM、Brequinar : 0.5 μM、Etoposide : 5 μM、CP466722 : 10 μMであり、36時間経過した時点でのサンプルを染色した。Eto : Etoposide、Anti : Antimycin A、Bre : Brequinar。

呼吸鎖複合体III阻害ならびにDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積と核小体ストレスとの関連の検討

呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるATMの活性化が確認されたため、核内poly(A)⁺ RNA蓄積との関連を明らかにすることを目的として、ATMの活性化によって生じる他の細胞内応答との関連を調べることにした。これまでにDNA損傷や核小体ストレスにATMの活性化が関わっていることが示されている [26-28]。そこで呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤がDNA損傷や核小体ストレスに与える影響について解析した。まずDNA損傷を調べるため、代表的な損傷マーカーである γ H2AX [49] を観察した。Antimycin AまたはBrequinarを添加した細胞では、核内poly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じた細胞の約30%に γ H2AXが観察された。一方、DSBを誘導するEtoposideを添加した細胞では、サンプル内のほぼ全ての細胞で γ H2AXの活性化が観察されたにもかかわらず、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積は観察されなかった(図13A-C)。この結果から、DNA損傷と核内poly(A)⁺ RNA蓄積は直接関連せず、DHODH阻害によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積には、ATMの活性化だけでは不十分であることが示唆された。

次いで核小体へのストレスについて検討を行った。核小体は、主にリボソーム形成やrRNA転写が行われる膜を持たない核内構造体であり、DHODH阻害剤によって核小体ストレスが生じることが複数報告されている [40-43]。特にzebrafishの神経細胞やメラノーマ細胞での検討においては、核小体に局在するRNAヘリカーゼDDX21がDHODH阻害剤の添加によって核小体から核質に局在を変え、その結果mRNAと結合することが報告されている [50]。これら知見を踏まえ、呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によりpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じる条件下で、核小体構成因子であるDDX21やnucleolinの局在が変化するかを免疫染色により検討した。すると、Antimycin AやBrequinarによるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積が生じている細胞で、DDX21やnucleolinが核小体から核質へと局在の変化する様子が確認された。さらに、この局在変化はATM阻害剤であるCP466722により解消された (図14A, B)。そこで、局在の変化したDDX21やnucleolinとpoly(A)⁺ RNAが局在一致するかどうかをコンフォーカル顕微鏡により観察したところ、局在は一致しなかった (図15A, B)。このことから、呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によって核小体ストレスが生じ、DDX21やnucleolinの局在は核質へと変化するが、これらがpoly(A)⁺ RNAに結合して核内蓄積を生じさせる原因ではないことが明らかとなった。

次いで、核小体ストレスとATMの活性化という二つの条件に当てはまる因子として、TCOF1が予想された。TCOF1は、核小体ストレスに際してATMによりリン酸化され、下流因子のNBS1などをリン酸化することによりRNA polymerase Iなどの働きを抑制する。この働きにより、TCOF1は核小体ストレス応答の起点となることが知られている。また、TCOF1は核小体ストレスに際してnucleolar capと呼ばれる膜

を持たない構造体を核小体辺縁部に形成させる役割を持つことが報告されており、ATMを介した核小体ストレス制御において大きな役割を持つ [51-53]。そこでAntimycin AやBrequinarを添加した細胞でTCOF1を免疫染色すると、nucleolar cap様の構造体への局在変化を観察した (図16A)。そこで、細胞にTCOF1のsiRNAを導入することでTCOF1のタンパク質発現を低下させた細胞にBrequinarを添加したときに、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積が変化するかを検討した。するとTCOF1の有無に関わらず顕著なpoly(A)⁺ RNA核内蓄積は観察された(図16B)。このため、DHODH阻害によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積はTCOF1の有無によらない応答であることが示唆された。

核小体ストレスと核内poly(A)⁺ RNA代謝については、核小体ストレスを引き起こすRNA polymerase Iの阻害剤Actinomycin Dによって核スペckル近傍にpoly(A)⁺ RNAが局在することが報告されている [54]。実際にActinomycin D処理によってpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が観察された (図16C)。しかしながらActinomycin Dによるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積のメカニズムはまだ解明されていない。ただし核小体は、細胞内で最も活発に転写が行われている場所であることから、ピリミジンの減少あるいは枯渇によるストレスセンサーとして核小体が機能している可能性は十分にありえる。このように、DHODH阻害によって生じる核小体ストレスとpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が関係している可能性は高いと考えられるので、今後さらなる解析を行い明らかにする必要があると考えられた (図17)。

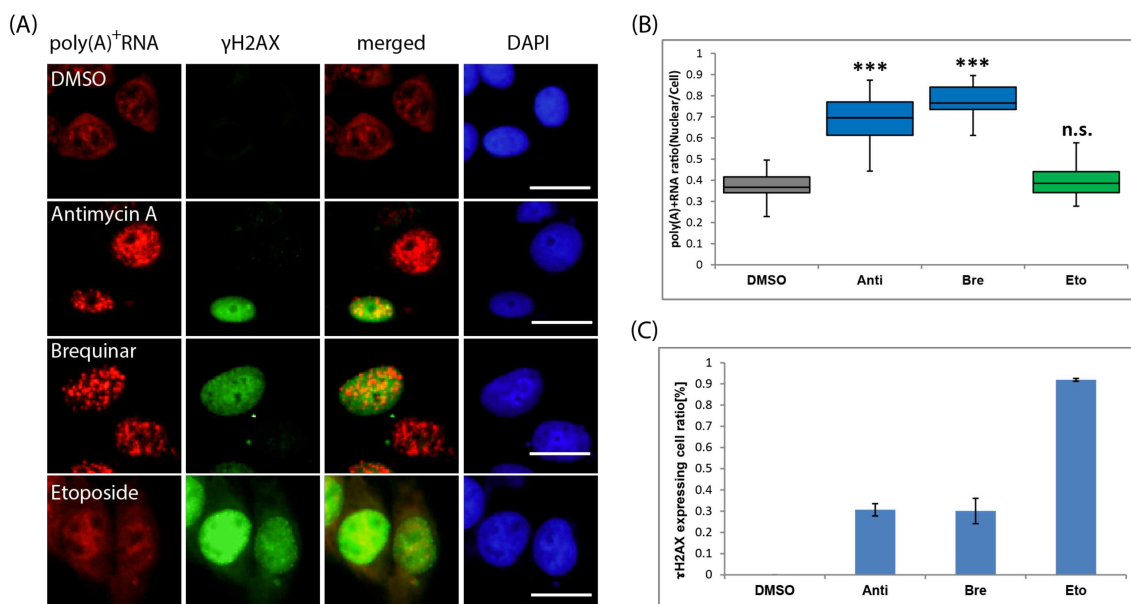


図13 DNA二重鎖損傷はpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積と相関しない

(A), MCF7細胞に各阻害剤を添加したときのγH2AXを免疫染色し、poly(A)⁺ RNAをRNA-FISH法により染色した。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μM、Etoposideは5 μMをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μm。(B), (A)のpoly(A)⁺ RNA蛍光強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。(C), (A)で得られたγH2AX発現細胞の比率をカウントした (n = 300)。各値は3つの独立した実験の平均±標準偏差である。Eto : Etoposide、Anti : Antimycin A、Bre : Brequinar。

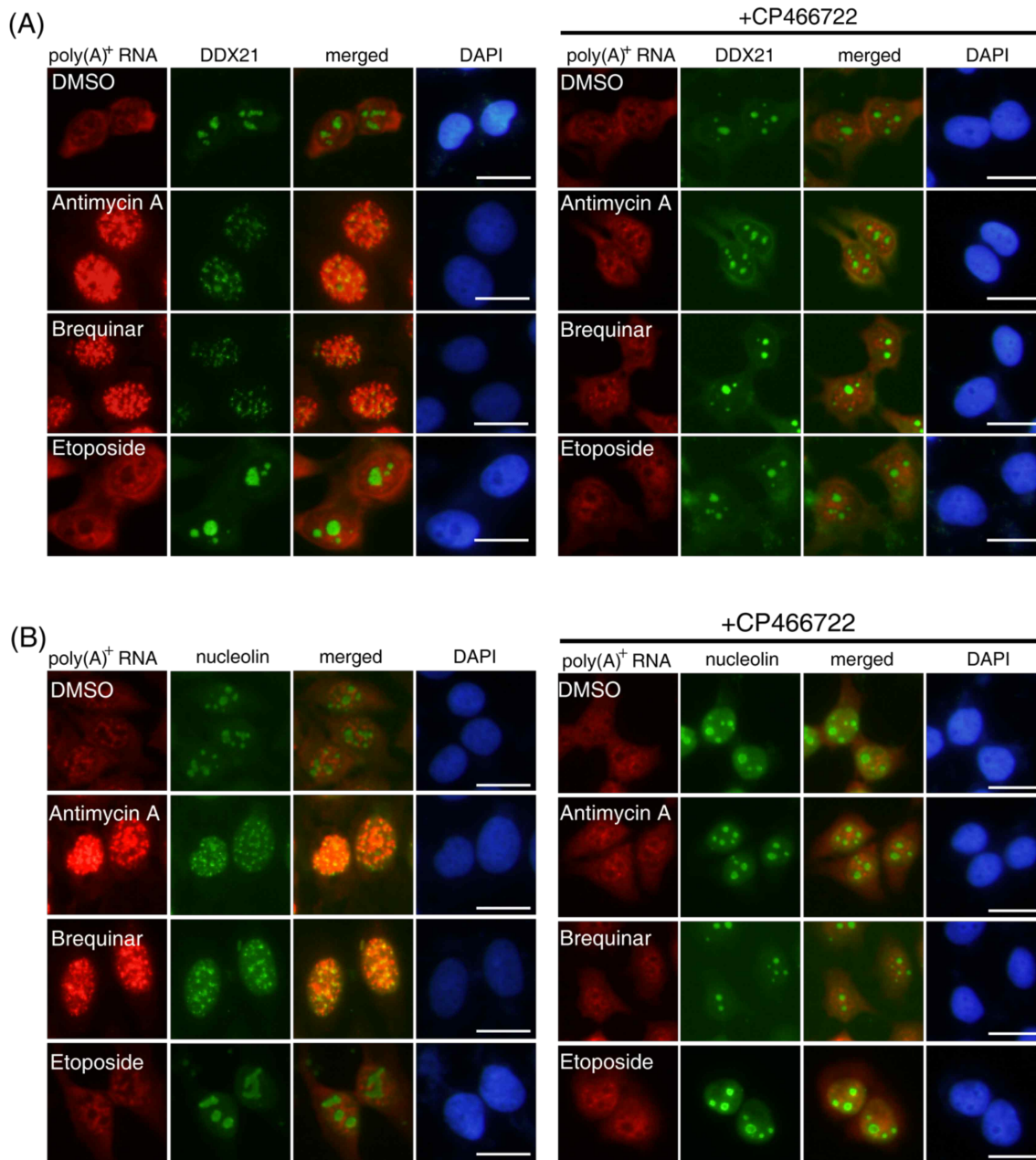


図14 呼吸鎖複合体IIIやDHODH阻害剤の添加により核小体構成因子の局在が変化する

呼吸鎖複合体III阻害剤およびDHODH阻害剤によりpoly(A)⁺ RNAが核内に蓄積する細胞で核小体構成因子DDX21 (A) とnucleolin (B) の局在が変化するかについて免疫染色とRNA-FISHにより観察した。またATM特異的阻害剤CP466722により各因子の局在が変化するか検討した。各阻害剤の添加濃度はAntimycin A : 0.25 μM、Brequinar : 0.5 μM、Etoposide : 5 μM、CP466722 : 10 μM。スケールバーは50 μm。

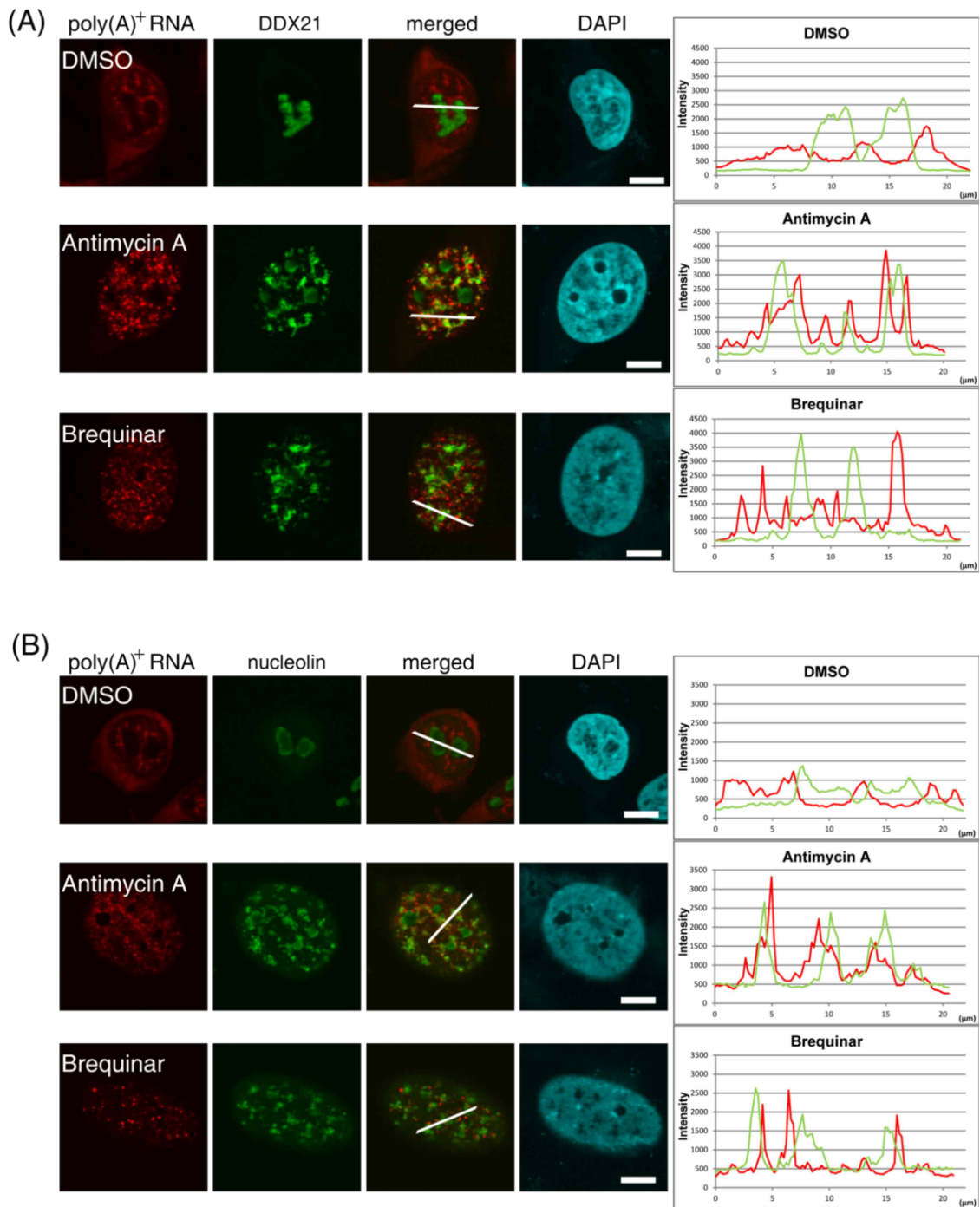


図15 阻害剤により局在が変化した核小体構成因子は、核内に蓄積したpoly(A)⁺ RNAの局在とは一致しない

呼吸鎖複合体III阻害剤およびDHODH阻害剤により核内蓄積するpoly(A)⁺ RNAと核小体構成因子DDX21 (A)、nucleolin (B)との局在をコンフォーカル顕微鏡により観察した。左図の白線上の蛍光強度を右図のラインプロットにより示す。ラインプロット赤線はpoly(A)⁺ RNA、緑線はDDX21 (A)、およびnucleolin (B)の蛍光を示す。Antimycin Aは0.25 μM、Brequinarは0.5 μMを36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは10 μm。

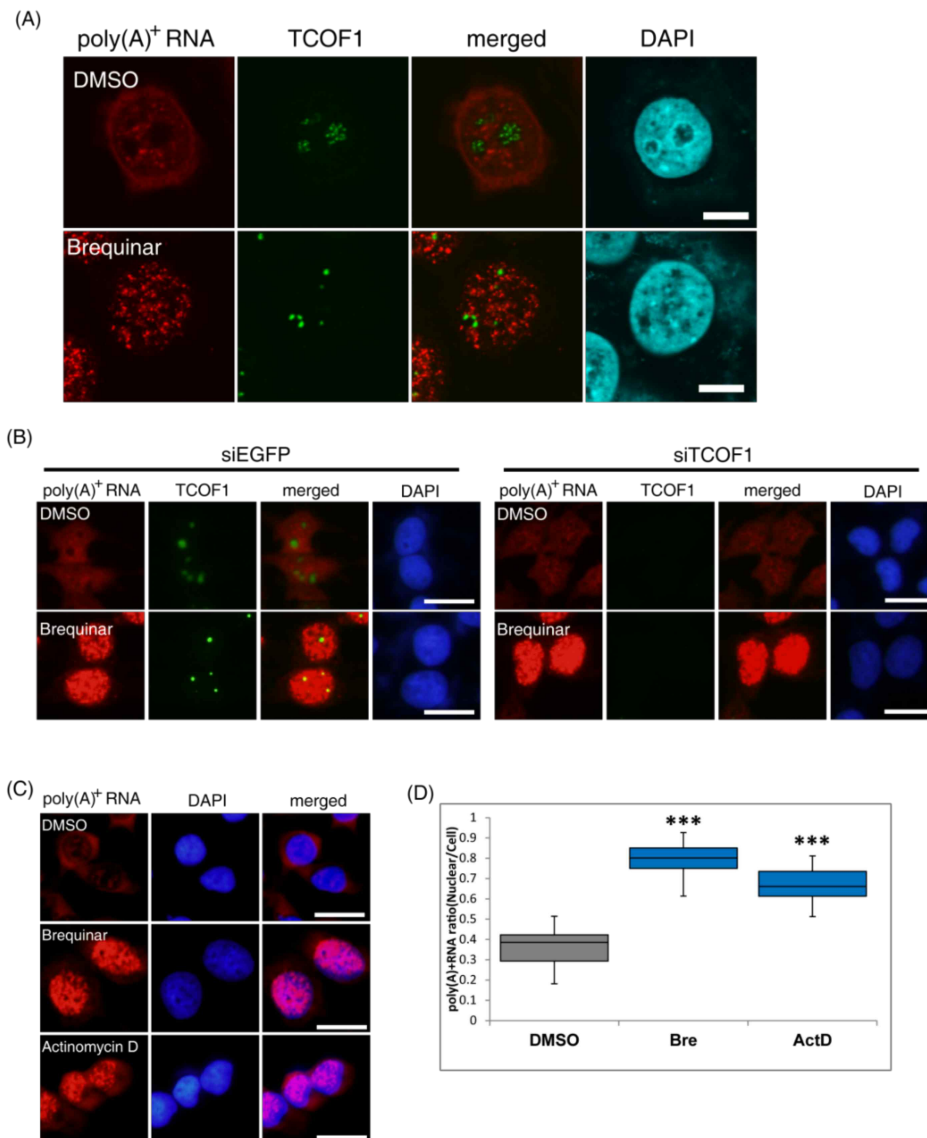


図16 TCOF1はDHODH阻害剤により局在が変化するが、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積とは関係なかった。

(A), DHODH阻害剤によりTCOF1の局在が変化するかについてコンフォーカル顕微鏡により観察した。0.5 μ MのBrequinarを36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは10 μ m。(B), Brequinarによるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積がTCOF1をsiRNAによりK.D.したときに変化するかRNA-FISH法により染色した。スケールバーは50 μ m。(C), Actinomycin Dによってpoly(A)⁺ RNAが変化するかについてRNA-FISH法により検討した。Actinomycin Dは2 ng/ml、Brequinarは0.5 μ Mをそれぞれ36時間添加した際の結果を示す。スケールバーは50 μ m。(D), (C)で得られたpoly(A)⁺ RNA蛍光の強度を核/細胞全体の比として数値化した (n = 40)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Dunnettの検定を用いて実施した。****p* < 0.001。Bre: Brequinar、ActD: Actinomycin D。

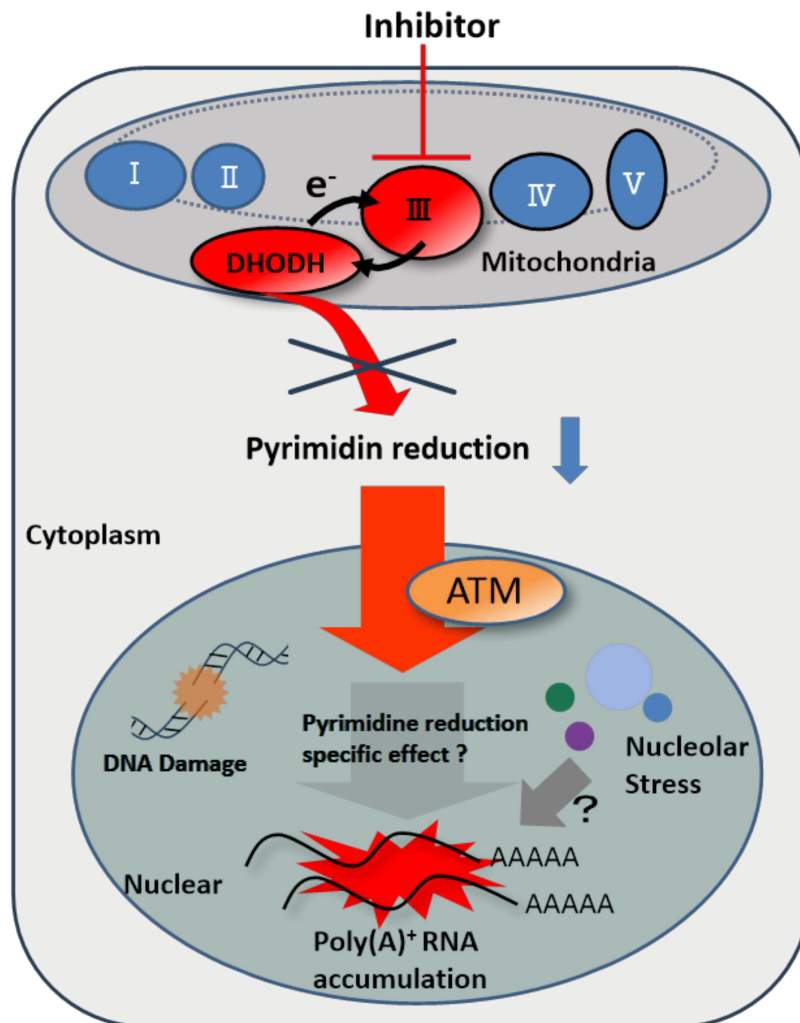


図17 研究結果の概略図

本研究結果の概略図を示す。阻害剤スクリーニングにより見つかったミトコンドリア呼吸鎖複合体IIIの阻害剤が、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積を生じるまでの経路を明らかにした。呼吸鎖複合体IIIの阻害によって、DHODHが阻害され細胞内ピリミジンの減少・枯渇が生じる。これによりATMの活性化を伴い、ピリミジン減少に特異的なシグナルによってpoly(A)⁺ RNAが核内に蓄積する応答が生じる。ピリミジンの減少・枯渇によってはDNA損傷や核小体ストレスも引き起こされるが、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積との関連はさらなる解析が必要である。

6. 考察

本研究課題のmRNA代謝研究における意義

mRNAは前駆体mRNAとして転写され、プロセッシングを経て成熟mRNAとなる。一方プロセッシングを完了できなかった前駆体mRNAは核内に滞留し、その後、エキソソームなどのヌクレアーゼによって分解される。このため核内のmRNA代謝は複雑かつ精密に制御されている。一方で細胞外から核内のmRNA代謝を制御できるかについてはほとんど不明なままである。細胞外から核内のmRNA代謝を制御するためには、そのシグナルを細胞内に伝達する必要がある。そこで本研究は、阻害剤を用いて細胞内シグナル経路を遮断すれば核内mRNA代謝の変化として捉えることができると考え、阻害剤を用いたスクリーニングにより核内mRNA代謝を制御する細胞内シグナル経路を見出すことを試みた。スクリーニングの結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体III阻害剤がpoly(A)⁺ RNAを核内に蓄積することを発見した。次いで、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の中でも核内poly(A)⁺ RNA代謝に影響をするのは呼吸鎖複合体III阻害剤のみであったことから、作用機序の解析を続けて行った。

呼吸鎖複合体IIIに特異的な点として、ピリミジン合成の律速段階酵素、DHODHと電子の授受があることに着目し、DHODH阻害剤によっても呼吸鎖複合体III阻害剤と同様にpoly(A)⁺ RNA代謝が顕著に変化することを新たに明らかにした。また、この反応にはATMの活性化と、ピリミジンの減少あるいは枯渇に特異的なシグナルが必要であることを明らかにした。残念ながらピリミジンの減少あるいは枯渇に特異的なシグナルについては完全には解明できなかったため、より詳細な作用機序の解明に向けて今後もさらなる解析が必要である。

一方で、当初の目的とした核内mRNA代謝を制御するシグナル経路を見出すことには成功した。今回のスクリーニングは、362種類の阻害剤という比較的限られた数のライブラリーから開始した。このため、本研究で使用した阻害剤の中には当初のライブラリーに含まれていない化合物も複数存在した。このことから、今後より広範なライブラリーを用いてスクリーニングを行うことによって、新たな阻害剤やシグナル経路の発見に繋がることが期待される。本研究で使用した手法は、比較的簡便に利用できるうえに新たな代謝経路の発見に繋がる結果を示すことができたと考えられるので、スクリーニング系のハイスループット化を含めた更なる発展を期待している。

ピリミジン合成経路阻害と関連する細胞内シグナル経路について

呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNA核内蓄積は、外部からのピリミジン添加によって解消した。また同じ核酸でもプリン合成阻害剤である6-Mercaptopurineや葉酸代謝阻害剤であるMethotrexateではpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積は生じなかった。このことは、細胞内核酸量の減少がpoly(A)⁺ RNA代謝に影響するという単純な仕組みではなく、ピリミジンの減少あるいは枯渇に特異的な応答が

存在し、poly(A)⁺ RNA核内蓄積を引き起こすことを示唆している。ピリミジンの減少あるいは枯渇によって制御され得る細胞内応答として、DNA損傷や核小体ストレス応答との関連を検討してきたが、これらの応答との関連を示すことはできなかった。ピリミジンによって修飾される経路はこれらの他にもいくつかある。代表的な経路の一つは、UDP結合糖鎖によるタンパク質の糖鎖修飾反応である。UDP結合糖鎖は、UDP-GlcNAcやUDP-GalNAc、UDP-glucoseなどが知られており、タンパク質への糖鎖修飾に際して、UDP結合体を中間体とする付加反応が様々な部位に対して行われることが明らかとなっている [55-57]。タンパク質の糖鎖付加修飾は、細胞機能を制御するために必要不可欠な転写後修飾の一つと考えられており、例えばUDP-GlcNAcはRNAポリメラーゼIIを修飾することで、mRNA転写反応を制御することが報告されている [58]。また、DHODH阻害剤によってUDP結合中間体による糖鎖修飾が抑制されることも報告されていることから [59]、ピリミジン合成阻害に伴う上記糖鎖修飾とpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積との関連は、今後検討の余地がある。

他にも核内mRNA代謝に関連して、mRNAスプライシングにおいて必須の機能を持つsmall nuclear RNA (snRNA)はウリジンリッチなU1~U6因子が知られており、転写量も多いことから、ピリミジン合成阻害に対してより大きな影響を受けることは十分に考えられる。snRNAに限らず、こうしたピリミジンリッチなDNAあるいはRNA配列を持つ分子による影響も検討が必要と思われる。

poly(A)⁺ RNAの核内蓄積にATMが与える影響について

DHODH阻害剤によって、細胞の中ではDNA二重鎖切断や核小体ストレスが生じることが先行研究で報告されていることを踏まえ、本研究では両反応に共通した主要応答因子の一つATMに着目した。DHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積応答にはATMの活性化が必要であると仮説を立て、DHODH阻害剤とATMの特異的阻害剤を併用することによってその必要性を明らかにしてきた。その中で、顕著にDNA損傷を生じてATMを活性化する阻害剤Etoposideを使用した場合には、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じなかったことから、ATMの活性化はpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じさせるために十分ではなく、ATMの活性化以外にも別の要因が必要であることが示唆された。さらにEtoposideの添加によって核小体ストレスが生じないこと、DHODH阻害剤によって核小体構成因子の核質への局在変化が生じることを踏まえ、核小体構成因子の核質への移動がpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積に影響している可能性を考えた。実際に先行研究において、DHODH阻害剤によって核小体構成因子であるRNAヘリカーゼ、DDX21は核小体から核質へと局在が変化し、mRNAと結合することがirCLIPによる解析で明らかとなっている [50]。本研究でも、DHODH阻害剤や呼吸鎖複合体III阻害剤によってDDX21が核質へ局在が変化する様子を免疫染色により確認した。しかし、コンフォーカル顕微鏡で観察する限り、蓄積したpoly(A)⁺

RNAとDDX21との共局在は見受けられなかった。この他にも、核小体の代表的な構成因子nucleolinも核質へと局在が変化することが観察されたことから、未同定の核小体構成因子が核質に移動してpoly(A)⁺ RNAと結合した結果、未知の核内構造体への蓄積となった可能性が考えられる。未同定因子と蓄積場所の関連について、今後明らかにしていく必要がある。

また、ATMによって活性化され、かつ核小体でのストレス応答に関与する因子としてTCOF1について検討を行った。TCOF1はRNAポリメラーゼIと協調して核小体でのrRNAの転写反応に機能する因子であり、DNA切断などのストレス応答の際にATMによってリン酸化されて、核小体キャップの形成などに機能することが判明している [51-53]。TCOF1自体が核小体ストレスによって核質へと局在を変えるわけではないが、呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じる環境ではATMの活性化と核小体ストレスが生じていることから、TCOF1の挙動についても検討の必要性があると考えられた。しかしTCOF1をsiRNAによりK.D.した実験から、TCOF1の有無によってpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積の形成には影響を及ぼさないことが示唆された。ただし、TCOF1と協調して働くRNAポリメラーゼIに関しても、その阻害剤Actinomycin Dの添加によってpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を生じることが以前に報告されている [54]。本研究でもActinomycin Dの添加によってpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積を観察したが、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。このことからRNAポリメラーゼIによるrRNAの転写が阻害されると、核小体ストレスが生じ、poly(A)⁺ RNAの核内蓄積に影響することが示唆された。したがって、RNAポリメラーゼIの阻害によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積と、呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積には、共通のメカニズムが潜んでいる可能性がある。RNAポリメラーゼIの阻害によって生じる細胞内シグナルを解析して、呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によるシグナルとの共通部分を抽出できれば、未知の核内構造体にpoly(A)⁺ RNAが蓄積するメカニズムを明らかにできるのではないかと期待される。

核内蓄積したpoly(A)⁺ RNAのプロセシング状態に関する考察

細胞内ピリミジンの減少あるいは枯渇条件下で核内に蓄積するpoly(A)⁺ RNAについて、核スペckルやパラスペckル、cajal体などの既知の核内構造体とは局在が一致しなかった。蓄積したpoly(A)⁺ RNAの局在位置は核スペckル近縁に位置することから、poly(A)⁺ RNAの状態は、スプライシングが行われる前の転写物で核スペckルへと運ばれる途中である可能性（この場合、スプライシング前の転写産物が多く存在すると考えられる）、スペckルでのスプライシングが完了した後に核外輸送される前の転写物である可能性（この場合、スプライシングを終えた転写物が多く存在すると考えられる）が主として考えられる。さらにスプライシングが完了しているならば核外

輸送因子との相互作用はあるのか、といった蓄積領域でのpoly(A)⁺ RNAのプロセシングの進行状態や共役機構は機能しているのかといった内容について今後の解析が必要である。現在、DHODH阻害剤を添加した細胞の核内および細胞全体のRNAについて、次世代シーケンス解析によって分析を行っており、どのような機能・配列・状態のRNAが核内に蓄積しているかに焦点を当てて解析を進めつつある。細胞内ピリミジンの減少あるいは枯渇に応じてpoly(A)⁺ RNAが核内に蓄積する現象を説明する興味深い考えとして、mRNAを一時的にスプライシングの場である核スペckルから隔離・係留するストレス応答ではないかと仮説を立てて検証を進める準備をしている。

本研究成果の臨床的な応用可能性について

近年の研究で、DHODH阻害剤は抗免疫、抗ウイルス、抗がん、急性骨髄性白血病など複数の疾病への治療薬として注目されている [60-63]。実際、本研究で使用したBrequinarは急性骨髄性白血病の治療薬としてフェーズII治験が行われているほか、BAY2402234は白血病治療薬としてフェーズI治験、IMU-838は潰瘍性大腸炎の治療薬としてフェーズII治験の段階にある。しかし、ここ数十年で数多くのDHODH阻害剤が同定されたにもかかわらず、米国食品医薬品局 (FDA) から認可を受けているのはleflunomideとTeriflunomideの2種である。それぞれleflunomideはリウマチ、Teriflunomideは再発型の多発性硬化症の治療薬として主に使用されているが、適用できる疾患の拡大に向けた治験も行われている [64-67]。DHODH阻害剤が治療薬としての適用拡大に至らない理由として、深刻な副作用が一因である。解決策として、副作用を減らすために阻害剤の特異性を上げる化学的なアプローチのほか、DHODH阻害による細胞への影響を解析することが大きな意義を持つと考えられる。本研究は、これまでのDHODH阻害剤研究の主流となっている観点とは異なるアプローチで研究を行い、核内poly(A)⁺ RNAの蓄積という新たな現象を示した。このため学術的な面だけでなく、DHODH阻害剤の臨床応用に向けた面においても貢献できると考えている。

総括と今後の展望

本研究により、ミトコンドリア呼吸鎖複合体III阻害剤やDHODH阻害剤によって、核内の未知の領域に生じるpoly(A)⁺ RNAの蓄積が、細胞内ピリミジンの減少あるいは枯渇を引き金としてATMの働きを介して発生するまでのメカニズムの一端を明らかにした。先述のようにpoly(A)⁺ RNAの核内蓄積が生じた細胞のRNAについて次世代シーケンス解析を行っており、核内に蓄積するRNAの種類やそのプロセシング状態、特徴的な配列の有無などを解析している。核内に蓄積するRNAの内容が個別に判明すれば、RNAのプロセシング状態について、またどのようなRNA結合因子が結合しているかについても解析内容を拡大することができ、今回観察した現象の解明に

向けて着実な進展が期待できる。さらに、本研究で着目した現象は、RNA代謝に着目した阻害剤スクリーニングにより見出されたものであることから、今後の薬剤研究においても、RNA代謝に注目した新たな解析手法の開発の可能性を提示できるようになると考えている。

7. 参考文献

1. Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression cell. *Cell*. 2002;108(4):439–451.
2. Millevoi S, Vagner S. Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res*. 2009;38(9):2757–2774.
3. Bentley DL. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet*. 2014;15(3):163–175.
4. Xin P, Xu X, Deng C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106210.
5. Laserna, E.J., Valero, M.L., Sanz, L., et al. Proteomic analysis of phosphorylated nuclear proteins underscores novel roles for rapid actions of retinoic acid in the regulation of mRNA splicing and translation. *Mol Endocrinol*. 2009;23(11):1799-1814.
6. Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, et al. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA *Nat. Chem Biol*. 2007;3:576–583.
7. Hasegawa M, Miura T, Kuzuya K, et al. Identification of SAP155 as the Target of GEX1A (Herboxidienean) Antitumor Natural Product *ACS Chem. Biol*. 2011;6:229–233.
8. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers *Nat. Med*. 2018;24:497–504.
9. Fujiwara N, Yoshikawa M, Yamazaki T, et al. A screening method tuned for mrna processing factors in human cells by evaluation of the luciferase reporter activity and the subcellular distribution of bulk poly(A)⁺ RNA. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(7):1512–1516.
10. Fujita KI, Okamura M, Nishimoto S, et al. Establishment of a Monitoring System to Detect Inhibition of mRNA Processing *Biosci. Biotechnol Biochem*. 2012;76(6):1248–1251.
11. Kurata M, Fujiwara N, Fujita KI, et al. Food-derived compounds apigenin and luteolin modulate mrna splicing of introns with weak splice sites. *iScience*. 2019;22:336–352.
12. Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(2):141-161.
13. Bennett CF, Latorre-Muro P, Puigserver P. Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(12):817-835.
14. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 2008;41(1):11-

- 22.
15. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*. 2018;69:62-72.
 16. Evans RD, Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33035–33038.
 17. Alcázar-Fabra M, Navas P, Brea-Calvo G. Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochimica Biophys Acta Bioenerg* 2016;1857(8):1073–1078
 18. Zhou Y, Tao L, Zhou X, et al. DHODH and cancer: promising prospects to be explored. *Cancer Metab*. 2021;9(1):22.
 19. Yang CF, Gopula B, Liang JJ, et al. Novel AR-12 derivatives, P12-23 and P12-34, inhibit flavivirus replication by blocking host de novo pyrimidine biosynthesis. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):187.
 20. Luthra P, Naidoo J, Pietzsch AC, et al. Inhibiting pyrimidine biosynthesis impairs Ebola virus replication through depletion of nucleoside pools and activation of innate immune responses. *Antiviral Res*. 2018;158: 288–302.
 21. Knight AD, Hejmanowski QA, Dierksheide EJ, et al. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by the experimental immunosuppressive agent leflunomide Transplantation. 2001;71:170–174.
 22. Fu H, Zhang Z, Dai Y, et al. Brequinar inhibits enterovirus replication by targeting biosynthesis pathway of pyrimidines. *Am J Transl Res*. 2020;12(12):8247–8255.
 23. Park JG, Ávila-Pérez G, Nogales A, et al. Identification and characterization of novel compounds with broad-spectrum antiviral activity against influenza A and B Viruses *J Virol*. 2020;94(7):e02149–19.
 24. Luban J, Sattler AR, Mühlberger E. The DHODH inhibitor PTC299 arrests SARS-CoV-2 replication and suppresses induction of inflammatory cytokines. *Virus Res*. 2021;292:198246.
 25. Xiong R, Zhang L, Li S. Novel and potent inhibitors targeting DHODH are broad-spectrum antivirals against RNA viruses including newly-emerged coronavirus SARS-CoV-2. *Protein Cell*. 2020;11(10):723–739.
 26. Berger DN, Stanley FKT, Moore S, et al. ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1731):20160283.
 27. van Sluis M, McStay B. Nucleolar reorganization in response to rDNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;46:81-86.
 28. Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-

- dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8–9):889–900.
29. Tang S, Hou Y, Zhang H, Tu G, Yang L, Sun Y, Lang L, Tang X, Du YE, Zhou M, Yu T, Xu L, Wen S, Liu C, Liu M. Oxidized ATM promotes abnormal proliferation of breast CAFs through maintaining intracellular redox homeostasis and activating the PI3K-AKT, MEK-ERK, and Wnt- β -catenin signaling pathways. *Cell Cycle*. 2015;14(12):1908-1924.
 30. Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, et al. Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF- κ B Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol Cell*. 2018;71(5):745-760.e5.
 31. Ilik ĀA, Malszycki M, Lübke AK, et al. SON and SRRM2 are essential for nuclear speckle formation. *Elife*. 2020;9:e60579.
 32. 文部科学省新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』化学療法基盤支援活動URL: <http://scads.jfcr.or.jp/kit/kit.html>
 33. Lydia GH, John F. Flaherty Atovaquone: a review . *Ann Pharmacother*. 1993;27(12):1488–1494
 34. Bruneau JM, Yea CM, Spinella-Jaegle S, et al. Purification of human dihydroorotate dehydrogenase and its inhibition by A77 1726, the active metabolite of leflunomide. *Biochem J*. 1998;336(2):299–303.
 35. Fox AH, Nakagawa S, Hirose T, et al. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(2):124-135.
 36. Meier UT. RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biol*. 2017;14(6):693-700.
 37. Bardek I, Milavec-Puretić V, Lipozencić J. Azathioprine in dermatology. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2007;15(4):264-8.
 38. Dervieux T, Brenner TL, Hon YY, Zhou Y, Hancock ML, Sandlund JT, Rivera GK, Ribeiro RC, Boyett JM, Pui CH, Relling MV, Evans WE. De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurine alone or in combination with methotrexate in vivo. *Blood*. 2002;100(4):1240-1247.
 39. Robinson AD, Eich ML, Varambally S. Dysregulation of de novo nucleotide biosynthetic pathway enzymes in cancer and targeting opportunities. *Cancer Lett*. 2020;470:134-140.
 40. Deans MR, Morgens WD, Ökesli A, et al. Parallel shRNA and CRISPR-Cas9 screens enable antiviral drug target identification. *Nat Chem Biol*. 2016;12(5):361–366.
 41. Arnould S, Rodier G, Matar G, et al. Checkpoint kinase 1 inhibition sensitises transformed cells to dihydroorotate dehydrogenase inhibition. *Oncotarget*. 2017;8(56):95206–95222.
 42. Lafita-Navarro MC, Venkateswaran N, Kilgore JA, et al. Inhibition of the de novo

- pyrimidine biosynthesis pathway limits ribosomal RNA transcription causing nucleolar stress in glioblastoma cells. *PLoS Genet.* 2020;16(11):e1009117.
43. Hubackova S, Davidova E, Boukalova S, et al. Replication and ribosomal stress induced by targeting pyrimidine synthesis and cellular checkpoints suppress p53-deficient tumors. *Cell Death Dis.* 2020;11(2):110.
 44. Luthra P, Naidoo J, Pietzsch AC, et al. Inhibiting pyrimidine biosynthesis impairs Ebola virus replication through depletion of nucleoside pools and activation of innate immune responses. *Antiviral Res.* 2018;158: 288–302.
 45. Anastasia AK, Vladimir VR, Boris VC, et al. Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):12828–12833.
 46. Rainey MD, Charlton ME, Stanton RV, et al. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2008;68(18):7466–7474.
 47. Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, et al. Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle.* 2007;6(3):371-376.
 48. Zhang A, Lyu YL, Lin CP, et al. A protease pathway for the repair of topoisomerase II-DNA covalent complexes. *J Biol Chem.* 2006;281(47):35997–36003.
 49. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage Methods. *Mol Biol.* 2012;920:613–626.
 50. Santoriello C, Sporrij A, Yang S, et al. RNA helicase DDX21 mediates nucleotide stress responses in neural crest and melanoma cells. *Nat Cell Biol.* 2020;22(4):372–379.
 51. Grzanka M, Piekiełko-Witkowska A. The Role of TCOF1 Gene in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2482.
 52. Korsholm LM, Gál Z, Lin L, et al. Double-strand breaks in ribosomal RNA genes activate a distinct signaling and chromatin response to facilitate nucleolar restructuring and repair. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(15):8019–8035.
 53. Calo E, Gu B, Bowen ME, et al. Tissue-selective effects of nucleolar stress and rDNA damage in developmental disorders. *Nature.* 2018;554(7690):112–117.
 54. Inoue A, Tsugawa K, Tokunaga K, et al. S1-1 nuclear domains: characterization and dynamics as a function of transcriptional activity. *Biol Cell.* 2008;100(9):523–535.
 55. Chatham JC, Young ME, Zhang J. Role of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of proteins in diabetic cardiovascular complications. *Curr Opin*

- Pharmacol. 2021;57:1–12.
56. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*. 2012;22(6):736–756.
 57. Chen J, Yang S. Catalytic mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(3):945–955.
 58. Lewis BA, Burlingame AL, Myers SA. Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment in Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT). *J Biol Chem*. 2016;291(27):14056–14061.
 59. Echizenya S, Ishii Y, Kitazawa S, et al. Discovery of a new pyrimidine synthesis inhibitor eradicating glioblastoma-initiating cells. *Neuro Oncol*. 2020;22(2):229–239.
 60. Madak JT, Bankhead A 3rd, Cuthbertson CR, et al. Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacol Ther*. 2019;195:111–131.
 61. Zhou Y, Tao L, Zhou X, et al. DHODH and cancer: promising prospects to be explored. *Cancer Metab*. 2021;9(1):22.
 62. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, et al. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs*. 2014;74(6):659–674.
 63. Alamri RD, Elmeligy MA, Albalawi GA, et al. Leflunomide an immunomodulator with antineoplastic and antiviral potentials but drug-induced liver injury: a comprehensive review. *Int Immunopharmacol*. 2021;93:107398.
 64. Lolli ML, Sainas S, Pippione AC, et al. Use of human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) inhibitors in autoimmune diseases and new perspectives in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2018;13:86–105.
 65. Sainas S, Pippione AC, Lupino E, et al. Targeting myeloid differentiation using potent 2-hydroxypyrazolo [1,5- a]pyridine scaffold-based human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *J Med Chem*. 2018;61(14):6034–6055.
 66. Muehler A, Kohlhof H, Groeppel M, et al. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Vidofludimus calcium (IMU-838) After Single and Multiple Ascending Oral Doses in Healthy Male Subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2020;45(5):557-573.
 67. Wang X, Yang K, Wu Q, et al. Targeting pyrimidine synthesis accentuates molecular therapy response in glioblastoma stem cells. *Sci Transl Med*. 2019;11:1–15.

8. 謝辞

本研究にあたり、多くの方々にご協力を賜りました。まずは勝手ばかりで未熟な私を肯定し、日々ご指導くださいました、指導教官の近畿大学農学部教授 増田誠司博士に心からの御礼を申し上げます。本研究の機会を与えてくださり、申請に際し適切なお助言を賜りました、京都大学大学院生命科学研究科教授 片山高嶺博士に深く御礼申し上げます。京都大学大学院生命科学研究科特定准教授 阪中幹祥博士、同助教 加藤紀彦博士には、研究室での活動にあたって陰に陽に渡り手助けをしていただきました、深く感謝いたします。京都大学大学院生命科学研究科教授 永尾雅哉博士、准教授 神戸大朋博士には折に触れてご助言を賜り、見守っていただきました、厚く御礼申し上げます。京都大学大学院生命科学研究科助教 西野勝俊博士には解析にあたってご指導とご助言を賜りお世話になりました、深く御礼申し上げます。

本研究の実験を行うにあたり、様々な方にご助力いただきました。NEAT1の解析用プラスミドを提供いただきました大阪大学大学院生命機能研究科教授 廣瀬哲郎博士、抗nucleolin抗体をご提供いただきました京都大学大学院生命科学研究科准教授 吉村成弘博士、抗NEAT1プローブを作出していただきました藤原奈央子氏に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、日ごろからご協力と有意義な議論をしてくださいました、京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学の皆さま、そして生体情報応答学の皆さまに深く感謝いたします。研究室での様々な事務を行っていただきました、事務補佐員 清水久美子氏と嶋林かほる氏に厚く御礼申し上げます。研究室で出会った上記皆さまには研究へのご助力だけでなく、大学院での生活全般に渡って大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。

大学院に通い続けるために、研究活動以外でも多くの方々のご助力を賜りました。この5年間で出会ったすべての方々に感謝申し上げます。

最後に、多くの心配をかけてしまいましたが、研究活動を続けていくことを暖かく見守ってくださった家族に心より感謝申し上げます。

令和4年12月
三宅俊太郎

本論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Miyake S, Masuda S.

Inhibition of mitochondrial complex III or dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) triggers formation of poly(A)⁺ RNA foci adjacent to nuclear speckles following activation of ATM (ataxia telangiectasia mutated).

RNA Biol. 2022;19(1):1244-1255. doi: 10.1080/15476286.2022.2146919.