

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	三宅俊太郎
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>真核生物では、DNA から転写された pre-mRNA は核内において 5'末端キャップ形成やスプライシングによるイントロン除去、また 3'末端の切断とポリアデニル化による修飾を受けて mRNA へと成熟し、細胞質へと輸送される。一方で、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。このような機構は遺伝子発現の効率を上げるだけでなく、正常なプロセッシングを受けた mRNA だけを細胞質へと輸送するための品質管理機構としても機能している。生物は環境変化によって遺伝子発現や代謝を変化させており、様々な刺激やストレスが核内 mRNA 代謝へも影響を及ぼすであろうことが示唆されてきたが、その詳細は不明なままであった。</p> <p>著者の所属分野では、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という表現型を指標に、種々の化合物の mRNA 代謝プロセスにおける機能評価を行う手法を確立していた。本論文では、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を化合物ライブラリーとして使用して、様々な刺激やストレスが mRNA 代謝に影響を及ぼす可能性を調べると共に、その分子機構を明らかにすることを試みた。</p> <p>362 種類の化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、既知のスプライシング阻害とは異なると考えられる機構で核内 poly(A)⁺ RNA 蓄積を引き起こす化合物として、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の阻害剤 Antimycin A を見出した。核内 poly(A)⁺ RNA の蓄積はミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤としては複合体 III の阻害剤でのみ観察され、複合体 I や IV の阻害剤では観察されなかった。呼吸鎖複合体 III は、細胞内ピリミジン合成の律速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が poly(A)⁺ RNA の核内蓄積を引き起こす可能性が示唆されたため、DHODH の特異的阻害剤を添加したところ、予想通り核内 poly(A)⁺ RNA 蓄積が観察された。これらの阻害剤による poly(A)⁺ RNA 蓄積は培地中へのウリジン添加によって解消されたこと、および、プリン生合成酵素の阻害剤の添加では poly(A)⁺ RNA 蓄積は起こらなかったことから、ピリミジンの枯渇が核内 poly(A)⁺ RNA 蓄積の原因であることが強く示唆された。核酸プールの減少は DNA 複製や RNA 合成に影響を及ぼすため、このようなストレスの制御に関わるセリン・スレオニンキナーゼ Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) の関与を考え、ATM の特異的阻害剤を DHODH 阻害剤と共に添加したところ、poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が解消された。しかしながら、ATM の活性化を引き起こすことが知られている topoisomerase II 阻害剤の添加のみでは顕著な poly(A)⁺ RNA 核内蓄積は生じなかった。</p> <p>以上、本論文では核内 poly(A)⁺ RNA 代謝にミトコンドリア呼吸鎖複合体 III を起点としたピリミジン合成経路の律速酵素 DHODH が関与していること、また、ピリミジン枯渇による核内 poly(A)⁺ RNA 蓄積には ATM を介したシグナル伝達経路が関与していることを示した。新規な poly(A)⁺ RNA 代謝経路を見出した点で重要な論文である。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、核内に mRNA 蓄積を引き起こす化合物の探索に端を発し、これまでに知られていなかった細胞内シグナル伝達を介した mRNA 代謝制御経路を見出すと共に、その作用機序の解析を通して新たな mRNA 代謝制御機構の解明を試みたものである。

まず、著者の所属分野において既に開発されていた RNA-FISH 法を利用して 362 種類のガン研究関連阻害剤をスクリーニングした結果、8 種類の化合物が核内に poly(A)+ RNA を蓄積させることを見出した。これら化合物により蓄積する poly(A)+ RNA の局在を観察したところ、7 種類については核スペckルに局在しており通常のスプライシング阻害が起こっていることが推察されたが、残る 1 種類の Antimycin A を添加した際には核スペckルとは共局在せず、近接する核内領域に poly(A)+ RNA が蓄積することを見出した。Antimycin A はミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の阻害剤であり、これまで RNA 代謝に関わることが知られていなかった化合物である。呼吸鎖複合体 III は細胞内 *de novo* ピリミジン合成の律速酵素 DHODH と特異的に電子の授受を行うことから、著者は細胞内の核酸プールに着目し、核酸生合成経路上に存在する酵素の阻害剤を使用して poly(A)+ RNA 蓄積との関連性を調べたところ、細胞内のピリミジンの枯渇時のみ特異的に poly(A)+ RNA 蓄積が生じることが明らかとなった。すなわち、呼吸鎖複合体 III 阻害剤や DHODH 阻害剤によって引き起こされる poly(A)+ RNA 蓄積は、培地中へのウリジン添加によって完全に解消されること、また、プリン生合成経路上の阻害剤では poly(A)+ RNA 蓄積が起こらないことを見出した。また、このピリミジン枯渇による poly(A)+ RNA 蓄積には、細胞内において DNA 損傷や核酸プール減少時に活性化するセリン・スレオニンキナーゼである ATM が必須な因子として関与していることを見出した。さらに、ATM の阻害だけでは poly(A)+ RNA 蓄積は起こらないこと、DNA 損傷と poly(A)+ RNA 蓄積とは直接的な関連性がなく、本研究で見出された核内 poly(A)+ RNA 代謝はこれまでに知られていない経路で制御されている可能性があることを示した。以上の結果は、核酸代謝やミトコンドリア機能が核内 mRNA 代謝制御と密接に関連していることを示した点、および、その制御に ATM を介したシグナル伝達が関与していることを明らかにした点において特筆に値する。また、本発見は本スクリーニング系が核内 mRNA 代謝研究において広く活用できることを示した点においても意義深いものである。

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 代謝を中心とした分子生物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 26 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