

審査の結果の要旨

氏名 Jagat Krishna Chhipi Shrestha

真核生物の遺伝子発現においては、DNA から転写された直後の mRNA (pre-mRNA) に含まれるイントロン配列を除去して成熟した mRNA へとプロセッシングする、スプライシングと呼ばれる過程が存在する。この過程に誤りが生じると、異常なタンパク質合成につながることから、それを抑制するための様々な mRNA 品質管理機構が存在している。さらにスプライシングは、正しい mRNA の生成とその翻訳に必須であるばかりでなく、スプライシングパターンの変化による遺伝子発現の多様性の獲得やスプライシング異常に起因する疾患にも関与する。正常にスプライシングされなかった pre-mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) をはじめとする複数の機構によってその翻訳が抑制されている。しかしながら実際には、NMD から逃れて翻訳されてしまう異常 mRNA の存在が知られるなど、mRNA 品質管理機構が細胞内でどの程度厳密に働いているのかはまだよくわかっていない。そこで本研究ではイントロンの翻訳から生まれる異常タンパク質を細胞がどのように感知し、適応するのかを明らかにすることを目的とした。論文は背景と研究目的を述べた第 1 章、結果を述べた第 2 章から第 5 章、および総合討論と展望を述べた第 6 章からなる。

第 1 章では真核生物のセントラルドグマにおいて重要な働きをするスプライシングの制御機構、タンパク質の翻訳の開始、伸長、終結機構、異常なスプライシングによる異常タンパク質生成を防ぐ品質管理機構を概説するとともに、本研究で用いるユニークな研究ツールであるスプライソスタチン A (SSA) の発見とその作用機構解明の経緯を記述し、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章では微生物由来の特異的スプライシング阻害剤 SSA を用いてスプライシングを抑制した際にヒト細胞内に蓄積する pre-mRNA が、どの程度翻訳されるかを最新技術であるリボソームプロファイリングによって網羅的に解析した結果を述べている。SSA によるスプライシング阻害の結果、すでに報告されている CDKN1B 遺伝子の第 1 イントロンをはじめ、1,000 以上のイントロン配列が翻訳されていることが明らかになった。このことから、多くの pre-mRNA が核外へ漏出し、NMD による分解機構からも逃れて翻訳されることが示された。

第 3 章では SSA によるスプライシング阻害が翻訳全般を強く抑制するという予想外

の発見について述べている。第2章の解析では、mRNA量を示すRNA-seqのデータと翻訳中のmRNAを示すリボソームプロファイリングのデータを照合することによってそれぞれの転写物の翻訳効率が算出される。その結果、SSA処理ヒト細胞ではmRNA量の低下に比較してより強く翻訳が抑制されることが明らかになった。個々の遺伝子で比較すると、リボソーム遺伝子群を含む一群のmRNAの翻訳が特に強く抑制されていることがわかった。このことから、リボソームタンパク質の特異的な翻訳阻害が細胞全体の翻訳阻害につながることを示唆された。

第4章ではさらにリボソームタンパク質mRNAの翻訳が特異的に抑制される分子機構について検討している。リボソームmRNAの翻訳にはプロテインキナーゼであるmTORが関与することが知られている。そこでmTORの活性を調べたところ、スプライシングを阻害した細胞では、そのキナーゼ活性が強く阻害されていることがわかった。また、スプライシング阻害剤で翻訳が抑制されるmRNAにはmTOR依存的な翻訳に関わる5'-TOP UTRを含むものが濃縮されていたことから、スプライシング阻害による翻訳抑制にはmTORの活性低下が関与することが示された。

第5章ではスプライシング阻害とmTOR活性との関連について検討している。一般に細胞毒性を有する変性タンパク質が蓄積するとストレス応答性MAPKの1つであるJNKが活性化してmTORC1複合体を解離させる結果、mTOR活性が低下することが知られている。SSA処理によってイントロンを含むpre-mRNAが翻訳されるとJNKが活性化されること、またJNKをノックダウンするとSSAによるmTOR阻害が解除されることが明らかになった。さらに特定の遺伝子のイントロン配列の過剰発現によって、SSA処理によらずJNKが活性化してmTOR活性が抑制されることもわかった。以上の結果は、イントロン配列の翻訳がストレス応答を誘起してmTORの活性を抑制し、リボソームタンパク質の発現低下につながることを示唆している。

第6章ではこれまでの結果を総合してスプライシングと翻訳の新たな関係について議論している。すなわち、細胞にはスプライシング異常によって生じる異常タンパク質を感知し、翻訳を抑制して異常タンパク質のさらなる生成を防ぐフィードバック機構が存在すると考察している。また、スプライシング阻害剤によるmTOR活性の抑制がスプライシング阻害剤による強力な抗がん活性につながっている可能性も指摘している。

以上、本研究はpre-mRNAの翻訳とそれに応答した新たな翻訳制御機構の一端を明らかにしたものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。