

審査の結果の要旨

氏名 石神 宥真

本研究は、核内低分子 RNA である U snRNA に存在する 3 つの内部塩基メチル化の修飾酵素遺伝子の同定及び機能解析を行ったものであり、また本研究を通じて得られた知見に基づき、U snRNA の修飾とその pre-mRNA との相互作用への関与がスプライシングに与える影響を探求したものである。

これまでにゲノムが解読されたすべての真核生物はイントロンによって分断されたタンパクをコードする遺伝子を持っており、ほぼすべてのイントロンがスプライソソームと呼ばれる巨大でダイナミックなリボタンパク複合体によって二回のリン酸エステル転移反応により切り出される。スプライソソームを構成するのは U 核内低分子 RNA (U snRNA) と呼ばれる複数の RNA 成分と多数のタンパクであり、その中でも U snRNA は基質 pre-mRNA 認識能や触媒能として重要な役割を担っている。真核生物のほとんどのイントロンは "Major Spliceosome" あるいは U2 依存スプライソソームと呼ばれるスプライソソームによって切り出されるものであり、この複合体では U1, U2, U4, U5, U6 snRNA が RNA 成分として反応に関わっている。

RNA は転写された際には A, U, G, C 四種類のヌクレオチドによって構成されているが、転写後に化学的な修飾を受けることがある。転写後修飾は特に tRNA や rRNA、mRNA に導入されるものについて広く研究されており、正確な遺伝暗号翻訳やリボソーム生合成、mRNA の翻訳・分解などにおいて重要な役割を果たしている。U snRNA にも他の RNA 同様に多くの転写後修飾が存在するが、その中で役割が明らかになっているのは 5' キャップのトリメチル化によるリボタンパク複合体形成への寄与や U2 snRNA のシュードウリジンによるブランチ部位アデノシンの構造変化への寄与などごく一部のみであった。また、役割が不明であった転写後修飾のうち、U snRNA に存在する三つの内部塩基メチル化修飾である U6 snRNA の N⁶-メチルアデノシン修飾(m⁶A)・U2 snRNA の N⁶, 2'-O-ジメチルアデノシン修飾(m⁶Am)・U6 snRNA の N²-メチルグアノシン修飾(m²G)はその修飾酵素さえ同定されていなかった。m⁶A/m⁶Am は mRNA 上で分解・翻訳・スプライシングの制御に関わっていることが、m²G は rRNA・tRNA 上で構造変化や安定性に役割を果たしていることが示されていたが、いずれの修飾も U snRNA における意義は解明されていなかった。論文提出者である石神宥真君はこれら内部塩基メチル化修飾の生合成機構と生物学的機能の解明

を目標に据えている。

第一章ではヒトと分裂酵母において比較遺伝学を用いて修飾酵素遺伝子の候補を挙げ、それぞれの酵素について修飾酵素遺伝子欠損株から単離した U snRNA からメチル基の欠損を LC/MS-MS により確認し、修飾酵素のリコンビナントタンパクと基質 RNA を用いて修飾を再構成した。これにより、U6 snRNA m⁶A 修飾酵素 mtl16/METTL16 と U2 snRNA m⁶A/m⁶Am 修飾酵素 amu2/AMU2 を分裂酵母/ヒトそれぞれにおいて、U6 snRNA m²G 修飾酵素複合体 GMU2-TRMT112 をヒトにおいて新規に同定した。また、mtl16/METTL16 と amu2/AMU2 は他に修飾の存在しない *in vitro* 転写 RNA に修飾を導入でき、GMU2-TRMT112 は *in vitro* 転写 RNA よりも GMU2 ノックアウト株由来で他の修飾が存在する U6 snRNA において修飾効率が大幅に高いことを示した。

第二章ではそれぞれの修飾酵素ノックアウト株の表現型を調べることにより、修飾の機能に迫った。論文提出者は分裂酵母 U6 snRNA m⁶A 欠損株の RNA-Seq 解析を行うことで、4 番目のヌクレオチドにアデノシンを持つイントロンにおいて野生株と比べてイントロン保持や隠れたスプライス部位におけるスプライシングがより高い頻度で発生することを見出した。この結果により、この m⁶A は U6 snRNA と pre-mRNA の間の相互作用を助ける働きがあることを示した。さらに、U6 snRNA が相互作用しない 5'エキソン側の配列についても、3'端に AAG ヌクレオチドを持つ場合に m⁶A 欠損の影響を受けにくいという特徴が見られたことから、AAG 配列が U5 snRNA との相互作用を強化していることを示唆した。これらの結果から、U5 snRNA と 5'エキソンの間の相互作用が U6 snRNA とイントロンの間の相互作用と協調的にスプライソソームを安定化させスプライシングを促進するという新規機構を提唱した。

現在までに U snRNA 修飾を欠損させた細胞においてハイスループットシーケンシングによりスプライシングの変化を検出した知見は報告されておらず、また U5 snRNA と pre-mRNA の相互作用に pre-mRNA の配列が与える影響を明らかにした知見も報告されていないことから、提出者の結果は特筆すべき成果であると言える。

これらの成果は、スプライソソームにおける U snRNA の基質配列認識機構に対する新たな重要な視点を与えることで、生化学・分子生物学の進展に大きく貢献している。また、以上の研究成果は論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。