審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　　名　　林 桓

tRNA は遺伝子発現の翻訳において、mRNA 上の遺伝暗号を解読し、対応するアミノ酸を導入するアダプター分子として働く。tRNA は DNA から転写されたのち、様々な化学修飾を受けて成熟し、その本来の機能を発揮する。特にアンチコドンとその 3'隣接部位(37 位)には多様な修飾が存在し、アミノアシル tRNA 合成酵素による認識、正確なコドン認識、転座反応などにおいて、重要な役割を担っている。

本論文では、ヒトミトコンドリアにおける tRNA の 37 位に存在する N^6-threonylcarbamoyladenosine (t^6A)修飾の生合成機構を解き明かし、この修飾の生理学的な機能や、環境中のメタボライトによる調節、更には疾患との関連性について探究している。

序論ではまず、tRNA 修飾と遺伝暗号解読についての概論を述べ、研究対象である t^6A37 修飾の構造と機能、生合成についての先行研究を要約し、さらに、哺乳動物ミトコンドリアの遺伝暗号系とミトコンドリア tRNA に関する知見を解説し、最後に本研究の目的を述べている。

結果の第 1 章では、ミトコンドリア tRNA に t^6A37 修飾を導入する二つの候補遺伝子、YRDC と OSGEPL1 の細胞内局在について詳細に解析し、これらの酵素は N 末端にミトコンドリア移行シグナル(MTS)を持つこと、YRDC の一部が実際にミトコンドリア画分に局在すること、OSGEPL1 はそのほとんどがミトコンドリア局在であることを見出した。さらに、これらの酵素の MTS を欠失するとその局在が失われることを示している。

第二章では、CRISPR/Cas9 システムを用い、*OSGEPL1* をノックアウトした HEK293T 細胞株を作成した。この細胞から５種類のミトコンドリア tRNA を単離し、RNA の高感度質量分析法(RNA-MS)によって解析したところ、すべての tRNA において t^6A37 修飾が欠失していることを見出した。さらに、*OSGEPL1* KO 株について様々な解析を行い、ガラクトース培地での生育が悪いこと、ミトコンドリアタンパク質合成能が低下していること、呼吸鎖複合体の活性が低下していること、$tRNA^{Lys}$ のアミノアシル化効率が低下していることなどを見出し、t^6A37 修飾の欠損がミトコンドリアタンパク質合成系に悪影響を及ぼしている

ことを示した。

第三章では、YRDC と OSGEPL1 の組換えタンパク質を用い、bicarbonate, L-Thr, ATP を基質に、ミトコンドリア tRNA 上に t^6A37 修飾の試験管内再構成に成功した。また、速度論的な解析から、bicarbonate の Km 値が約 30 mM と非常に高く、bicarbonate 濃度が t^6A37 修飾の律速になっていることを示した。この結果を受けて、ミトコンドリア tRNA には、環境中の CO_2 や bicarbonate 濃度を感知して、t^6A37 修飾率を変化させるしくみがあると考えた。そこで、HEK293T 細胞を bicarbonate を含まない培地を用い、空気中で培養したところ、興味深いことに、2 種類のミトコンドリア tRNA の t^6A37 修飾率が顕著に低下する結果を得た。この結果は、ミトコンドリアのタンパク質合成が、環境中のメタボライト濃度を感知し、tRNA 修飾率を変化させることで制御される新規の調節機構であることを意味している。

第四章では、呼吸鎖異常症などミトコンドリア病関連疾患で報告のあるミトコンドリア tRNA 遺伝子上の点変異について解析し、複数の点変異が OSGEPL1 の認識を妨げることで t^6A37 修飾率を低下させることを見出した。特に、$tRNA^{Thr}$ に存在する A15923G 変異に関しては、実際に患者由来の繊維芽細胞と筋芽細胞において、t^6A37 修飾の欠損を観測した。したがって、ミトコンドリア tRNA 遺伝子の病的変異は t^6A37 修飾の欠損を引き起こし、ミトコンドリアタンパク質合成能の異常、さらにはミトコンドリア機能異常の原因となることが証明された。

最終章においては、まず「結論」として本論文の成果を簡潔にまとめ、次に「展望」として今後の研究の課題と展望を示している。

以上のように、申請者は、本論文を通してヒトミトコンドリア tRNA に存在する t^6A37 修飾の生合成機構を明らかにし、この修飾が担う生理学的な機能を探究した。また、ミトコンドリア tRNA 遺伝子の病的変異が t^6A37 修飾を欠損させ、ミトコンドリア機能異常に起因する疾患の原因となることを証明した。さらには、ミトコンドリア t^6A37 の修飾率が環境中の bicarbonate 濃度によって変化する知見は、tRNA 修飾に関する全く新しい概念を提供し、この分野の発展に大きく貢献した。

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。