

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 伊藤 理

本研究は、真核生物における **rRNA** の転写後修飾を担う遺伝子の同定、及びその機能の解明を目的とし、本研究を通じて得られた知見に基づき、真核生物がリボソーム生合成をどのように制御しているかを探究したものである。

リボソームの生合成（アセンブリ）は **rRNA** の転写と協調して進行し、その過程で **rRNA** プロセッシング、リボソームタンパク質との会合などが生じる。真核生物ではさらに、核小体から細胞質へと局在を移行させながら進行する。そのため、アセンブリには様々な制御因子（アセンブリ因子）が関与している。出芽酵母においてもアセンブリ因子の数は 200 以上と考えられているが、その正確な機能が判明していないものも多い。リボソーム生合成の中でも、**rRNA** の成熟は複雑である。出芽酵母の場合、40S 小サブユニットの 18S **rRNA** は大サブユニットの **rRNA** と共にスペーサー領域を介してポリシストロニックにコードされている。これらがまず 35S **rRNA** 前駆体 (**pre-rRNA**) として転写され、成熟 **rRNA** へとプロセスされる。この過程で様々な転写後修飾が導入されるが、これらはリボソームの機能部位に集中していることから、生合成や翻訳への寄与が示唆されていた。出芽酵母における未報告の **rRNA** 修飾として、 N^4 -acetylcytidine (**ac⁴C**) と呼ばれるアセチル化修飾が存在する。この修飾は真核生物に保存されていると考えられ、18S **rRNA** の 3'末端近傍に位置することが所属研究室の先行研究により見出されていた。しかしその機能や生合成については解明されていなかったため、提出者は、まず **ac⁴C** 修飾酵素の機能解析を行い、続いて **rRNA** アセチル化修飾が細胞内で果たす機能や生理学的な意義の探究を行った。

序論にて、提出者は RNA の質量分析法を用いて、出芽酵母の 18S **rRNA** の 1773 位に **ac⁴C** が形成されていることを確認した。この位置は 3'末端のステムループ構造、Helix 45 のステム内部に相当する。さらにヒト細胞由来の 18S **rRNA** でも同様の位置に修飾が確認されたことから、重要性が示唆された。

本論第 1 章で、提出者は **ac⁴C** 修飾酵素、Rra1p (**rRNA** cytidine acetyltransferase) の *in vitro* における機能解析を行った。このタンパク質は、大腸菌 tRNA^{Met} の **ac⁴C** 修飾酵素 TmcA の出芽酵母オーソログであり、過去の知見から機能未知のアセンブリ因子の一つとして考えられていた。本章の修飾

再構成実験の結果、Rra1p が rRNA アセチル化酵素として機能することが証明された。一般にタンパク質アセチル化酵素の基質はアセチル基のドナーとしてのアセチル CoA のみで十分なのに対し、Rra1p は修飾形成に ATP も必要とすることも判明した。Rra1p は、ATP 加水分解エネルギーを利用する RNA ヘリケースドメインを有する。そのため ATP はアセチル化の際、被修飾部位のステム構造を協調的にほどくのに利用される可能性が考えられた。

第 2 章で、提出者は Rra1p 及び ac⁴C の *in vivo* における機能解析を行った。RRA1 は必須遺伝子であるため、温度感受性株を利用して細胞内の Rra1p を枯渇させたところ、18S rRNA の消失、及び 40S 小サブユニットの減少が観察され、新規 18S rRNA の生合成阻害が示唆された。そこで rRNA 前駆体を観察したところ、18S rRNA の前駆体の一つ 23S pre-rRNA の蓄積、及び 18S rRNA の直前の前駆体 20S pre-rRNA の減少が見られた。この結果は、rRNA プロセシング最初期に起こる、スペーサー領域内の A0 部位での切断が生じていないことを表す。即ち、Rra1p は A0 切断に必要なアセンブリ因子であることが示唆された。さらに、蓄積した 23S pre-rRNA を単離精製して修飾を解析したところ、ac⁴C が形成されていないことが判明した。従って、Rra1p による ac⁴C 修飾形成自体が A0 切断に必須であり、ac⁴C を持たない 23S pre-rRNA は 18S rRNA へとプロセスされないことが示唆された。

第 3 章で、提出者は ac⁴C の持つ生理学的な意義について考察した。rRNA 前駆体のアセチル化は核内で行われると考えられるが、出芽酵母の場合、核内で利用されるアセチル CoA は、合成酵素 Acs2p によってのみ供給される。これを温度感受性株にて機能欠損させ、核内のアセチル CoA を急激に枯渇させたところ、誘導後短時間で 23S pre-rRNA の蓄積、及び 20S pre-rRNA の減少、という rRNA プロセシングの擾乱が観察された。この結果から、核内アセチル CoA の濃度によって rRNA プロセシングが制御されていることが示唆された。

本研究において、真核生物の 18S rRNA における ac⁴C1773 修飾は Rra1p によって形成され、18S rRNA のプロセシングに必須な rRNA 修飾であると結論でき、細胞内のエネルギー状態を感知してリボソーム制御する役割を持つことが示唆された。これまでに報告されてきた真核生物の rRNA 転写後修飾は、単独で欠損させてもリボソームの機能や生合成等の表現型への影響が現れないものや、必要なのは修飾自体ではなく、寧ろ修飾酵素であることが示唆されるものであった。従って、本研究で見出した知見は、単独の rRNA 修飾がリボソーム生合成を制御していることを示した、初めての例であると考えられる。

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。