

論文審査の結果の要旨

がん制御タンパク質 PICT1 のリボソーム生合成における機能解析

Functional Analysis of the Cancer-Associated Protein PICT1 in
Ribosome Biogenesis

論文提出者 宮尾 宗太郎 (Miyao, Sotaro)

RNA エキソソームは、細胞内における多様な RNA 分解やプロセッシングを担う 3' -5' エキソヌクラーゼ複合体である。RNA エキソソームは、核小体では RNA ヘリカーゼ MTR4 と結合し、リボソーム生合成の過程で進行する rRNA 前駆体のプロセッシングに不可欠な役割を果たす。また、リボソーム生合成は、細胞増殖制御と密接に関係し、その異常はがん抑制因子 p53 を介した細胞増殖の抑制を引き起こす。この現象は核小体ストレス応答として知られているが、その分子機構には不明な点が多く残されている。近年、出芽酵母において Mtr4-エキソソームを 5.8S rRNA の前駆体にリクルートするアダプターとして、Nop53 の機能が明らかにされた。Nop53 のヒトにおける相同分子は、PICT1 という既知の核小体ストレス応答制御因子であり、がん研究分野において注目されてきた。そこで本研究では、ヒト細胞において、PICT1 と MTR4-エキソソームの相互作用について検討するとともに、リボソーム生合成における PICT1 の機能を明らかにする種々の解析を実施した。

申請者は、PICT1 と MTR4 および RNA エキソソームの相互作用を検証するために、各因子を過剰発現させた細胞を用い、共免疫沈降法による結合解析を実施した。その結果、ヒト細胞において、PICT1 が MTR4-エキソソームと複合体を形成していることが立証された。

次に、PICT1 のリボソームサブユニット形成における役割を明らかにするために、PICT1 をノックダウンした細胞を用い、ショ糖密度勾配遠心法による細胞質リボソームの解析を実施した。その結果、PICT1 は 60S リボソームの形成因子として機能していることが示された。さらに酵母 Nop53 が、5.8S rRNA の 3'末端形成における最終段階で、Mtr4-エキソソームをリクルートするアダプターとして機能していることに着目し、rRNA 前駆体のプロセシング過程における PICT1 の機能を検討した。rRNA 前駆体のスペーサー領域 (5'ETS および ITS2) に特異的なプローブを用いたノーザンブロット解析により、PICT1 のノックダウンは、MTR4 のノックダウンと同様に 5.8S rRNA の前駆体である 12S 中間体 RNA の蓄積を引き起こすことを観察した。また、PICT1 のノックダウンでは、12S 中間体よりもさらに上流に位置する 32S 中間体 RNA の蓄積も同時に観察された。また、酵母 Nop53 は、AIM(Arch-Interacting-Motif) と呼ばれるアミノ酸配列を介して Mtr4 と結合することが報告されている。そこで申請者は、PICT1 においても保存が見られる AIM 配列にアミノ酸置換を導入した変異体を作製し解析を行った。その結果、この変異体では MTR4-エキソソームとの結合能が大きく失われ、これを過剰発現させた細胞では、32S 中間体 RNA に変化は見られないものの、12S 中間体 RNA の蓄積が引き起こされた。最後に本研究では、MTR4-エキソソームが核小体ストレス応答の制御因子として機能するか検証を実施した。MTR4 およびエキソソーム触媒サブユニット (RRP6 および DIS3) をノックダウンした結果、MTR4 のノックダウンのみが、PICT1 と同

様に p53 の蓄積を引き起こすことが見出された。この結果より、核小体ストレス応答による p53 の活性化経路においては、前駆体 RNA のプロセシングそのものよりも、PICT1 と MTR4 の結合状態が重要な役割を果たしているのではないかと推測された。

以上の研究において、申請者は、がん制御因子 PICT1 が、AIM 配列を介する MTR4-エキソソームとの相互作用により、5.8S rRNA の最終形成およびリボソーム生合成において機能を果たすことを明確に示した。さらに申請者は、PICT1 がこの新たに見出された相互作用を介して、リボソーム生合成と細胞増殖の制御を機能的に結びつける可能性にも言及しており、新規性に富む研究として評価できる。したがって、本論文において示された成果は、博士（薬科学）の学位にふさわしいものと認める。

令和 5 年 3 月 2 日

主査 明治薬科大学 教授

森田 雄二 印

副査 明治薬科大学 教授

紀 嘉浩 印

副査 明治薬科大学 教授

鈴木 俊宏 印