

論文審査の結果の要旨

核小体 RNA 分解に関わるヒト TRAMP 様複合体に関する研究

Study on the Human TRAMP-like Complex Involved in
the Nucleolar RNA Degradation

論文提出者 須藤 遥 (Sudo, Haruka)

RNAエキソソームは、細胞内RNAの機能発現に必要な代謝反応において重要な役割を果たす3' -5' エキソヌクレアーゼ複合体である。エキソソームは、9個のコアサブユニットと触媒サブユニットから構成され、様々な補助因子と協調してRNAの分解やプロセシングに機能する。なかでも、核特異的な触媒サブユニットであるRRP6は、RNAヘリカーゼMTR4と共にリボソームRNA (rRNA)の形成に関与することが知られている。また酵母MTR4 (Mtr4)は、ポリ(A)ポリメラーゼTrf4/5およびRNA結合タンパク質Air1/2と共にTRAMP複合体を形成し、エキソソームによるRNA分解を補助することが報告されているが、ヒトにおいても同様の複合体の存在が予想された。本研究は、酵母TRAMP複合体サブユニットのヒトオルソログを探索し、ノックダウン法および共免疫沈降法を用いた解析により、ヒトTRAMP様複合体の存在およびその性質を明らかにし、さらにRNA代謝における機能を解明することを目的としたものである。

まず、申請者は、酵母 Trf4/5 および Air1/2 に対応するヒトオルソログ

をデータベースより検索し、PAPD5 および ZCCHC7 をそれぞれ見出した。これらの細胞内局在を蛍光抗体法により調べたところ、PAPD5 は核小体を含む核全体、ZCCHC7 は核小体に局在することが分かった。

次に、申請者は、PAPD5 および ZCCHC7 が MTR4 およびエキソソームと相互作用するかを検討するために、各因子を過剰発現させた細胞を用い、共免疫沈降実験を行った。その結果、PAPD5 および ZCCHC7 は MTR4 と共に TRAMP 様の複合体を形成し、エキソソームとも相互作用することが示唆された。また、内在性の各因子を免疫沈降した場合においても同様の結果が得られた。次に申請者は、ノックダウン法を用いて TRAMP 様複合体とエキソソームの分子間相互作用の性質について詳細な検討を行った。その結果、MTR4 をノックダウンした場合には、TRAMP 様タンパク質とエキソソームとの相互作用は維持されていたが、RRP6 をノックダウンした場合には、TRAMP 様複合体とエキソソームの相互作用および TRAMP 様タンパク質間の相互作用が失われた。このことから、ヒト TRAMP 様複合体の形成には、RRP6 が重要な役割を果たすことが示唆された。また、PAPD5 および ZCCHC7 のノックダウン解析から、両タンパク質は MTR4 およびエキソソームとの相互作用において相互依存的に機能することが示唆された。

さらに申請者は、ZCCHC7 が核小体に局在することから、ヒト TRAMP 様複合体の核小体における役割に着目し、rRNA 前駆体の成熟過程における機能をノーザンブロットィングにより解析した。その結果、RRP6 をノックダウンした場合と同様に、TRAMP 様タンパク質をそれぞれノックダウンすることにより、rRNA 前駆体のプロセッシング過程で生じる 5' ETS 領域 RNA 断片の蓄積が見られた。さらに、アクチノマイシン D 処理により、核小体ストレス誘導下における TRAMP 様タンパク質の機能を調べた。その結果、アクチノマイシン D 処理は、TRAMP 様タンパク質のノックダウンによる 5' ETS

rRNA 前駆体断片の蓄積傾向を著しく増加させた。特に、ZCCHC7 および PAPD5 に関して、その傾向がより顕著に見られた。このことから、TRAMP 様複合体は 5' ETS rRNA 前駆体断片を基質として認識し、エキソソームによる分解へと導くことが示唆された。

以上の研究から、本論文では、酵母 Trf4/5 および Air1/2 のヒトオルソログとして PAPD5 および ZCCHC7 をそれぞれ同定し、これらが MTR4 と共に TRAMP 様複合体を形成することを報告した。さらに、これらの因子が核小体における rRNA 前駆体由来 RNA 断片の分解に寄与する可能性を示した。また本論文は、酵母 TRAMP 複合体では報告されていない、RRP6 を中心としたヒト特有の新たな複合体形成メカニズムについて言及するなど、新規性に富むものである。したがって、本論文は博士（薬科学）の学位に十分値するものと認める。

平成 29 年 2 月 28 日

主査 明治薬科大学 教授

長 浜 正 巳 印

副査 明治薬科大学 教授

小笠原 裕 樹 印

副査 明治薬科大学 教授

紺 谷 圏 二 印