

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Lo Chor Wai

FR901464 は微生物の培養液から単離された低分子化合物であり、SV40 プロモータを介した転写の活性化、強い抗腫瘍活性、細胞周期停止作用など、様々な興味深い作用が動物細胞を用いた実験より明らかになっている。また、FR901464 処理細胞中では pre-mRNA が蓄積し、その pre-mRNA から異常なタンパク質が翻訳される。しかし、その標的分子や作用メカニズムは明らかになっていない。本論文は、比較的ゲノムサイズが小さく、遺伝学的操作が可能であり、また、45%の遺伝子にイントロンが含まれ、様々な細胞内メカニズムが出芽酵母に比べ高等真核生物に近い分裂酵母を用い、FR901464 の標的分子の探索、ならびにその作用メカニズムの解明を述べたものである。

(1) 分裂酵母に対する SSA の影響

実際の実験においては、FR901464 のメチルアセタール体である spliceostatin A (SSA) を用いた。SSA は FR901464 と同等の活性を持ち、FR901464 より安定である。分裂酵母の細胞増殖に対する SSA の効果を調べたところ、2.5  $\mu\text{g/ml}$  の SSA で増殖が阻害された。動物細胞同様に SSA 処理細胞中では、pre-mRNA の蓄積が観察された。また、イントロンを含んだ pre-mRNA からの翻訳を検出するシステムを構築し、システムを導入した細胞を SSA 処理したところ、pre-mRNA からの翻訳が観察された。以上のことから、分裂酵母においても動物細胞と同様のメカニズムが存在することが示唆された。そこで、分裂酵母細胞抽出液から SSA 標的タンパク質を同定することとした。

(2) SSA 標的タンパク質の同定

ビオチン化 SSA を、分裂酵母細胞抽出液に加え、ストレプトアビジンビーズを用い SSA 結合タンパク質を精製し、質量分析により同定したところ、スプライシング因子である Prp10p が SSA 結合タンパク質として同定された。次に確かに Prp10p が SSA 結合タンパク質であるかを確かめるために、GFP タグを付加した Prp10p を発現させ、SSA ならびにストレプトアビジンビーズを用いた沈降実験を行なったところ、GFP-Prp10p が沈降した。Prp10p は7つのタンパク質からなる SF3b 複合体の構成タンパク質であり、SF3b 複合体はスプライシング反応に必要なスプライソソームの構成因子である。そこで、SF3b 複合体の他の構成因子である Prp12p とも SSA が結合するかを確かめたところ、Prp10p と同様の結果が得られた。この結果から、SSA は SF3b 複合体と結合することが強く示唆された。

### (3) *prp* 変異株における pre-mRNA の蓄積ならびにその翻訳

現在までに、pre-mRNA のスプライシングに関わる *prp* 遺伝子が数多く単離されており、前述の *prp10*、*prp12* もその中に含まれる。そこで、*prp10*、*prp12* を含むいくつかの *prp* 変異株において pre-mRNA が蓄積するかを確かめたところ、非許容温度において SSA 処理細胞と同様に pre-mRNA が蓄積していた。さらに、これらの変異株中では pre-mRNA の翻訳も観察された。他の *prp* 変異株中、*prp1*、*prp2* においては *prp10*、*prp12* と同様の結果が得られたものの、*prp4*、*prp8* に関しては非許容温度での pre-mRNA の蓄積、ならびにその翻訳は認められなかった。これらの結果から、pre-mRNA が核内に蓄積すればその一部が細胞質に漏れだし翻訳されるという可能性は捨てきれないものの、Prp10p、Prp12p は Prp1p や Prp2p などとともに、pre-mRNA スプライシングのみならず、pre-mRNA の核内繫留にも機能していることが示唆された。

以上の結果から、FR901464 ならびに spliceostatin A は、スプライソソームの構成因子である Prp10p や Prp12p に結合することにより、その機能を阻害し、その結果 pre-mRNA の蓄積ならびに翻訳を引き起こしていることが強く示唆された。

本研究から得られた知見は、翻訳されるべき mRNA のみを翻訳するという、生物にとって必要不可欠な品質管理機構を理解する上で重要な情報を与えるものである。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。