

審査の結果の要旨

氏名 野間章子

本研究は、RNA 転写後プロセッシングの中でも、RNA の機能発現に重要である RNA 修飾の未だ不明な機能と生合成遺伝子や生合成機構を解明することを目的とし、出芽酵母における RNA 修飾遺伝子を網羅的に探索、同定したものである。

まず、本論第 1 章では、本研究の特徴である、高速液体クロマトグラフィー・質量分析法 (LC/MS) による機器分析とゲノム情報を活用した逆遺伝学的な新規手法 (リボヌクレオーム解析) についてその手法の確立と検証実験を行っている。さらにゲノム情報の利用による候補遺伝子の絞り込みを行い、出芽酵母全 ORF 約 6300 のうち、出芽酵母と同じ RNA 修飾を有する分裂酵母と相同性のある遺伝子を選出すると、3,482 遺伝子に絞り込まれた。このうち、遺伝子破壊株の入手可能な非必須遺伝子であり、さらにデータベース上の出芽酵母 ORF 機能分類を参照して機能が未知な分類を選出すると、351 に絞り込まれた。これを最初の解析対象とし、探索を行った結果、12 の新規修飾遺伝子の同定に成功している。

第 2 章では 2-メチルグアノシン(m^2G)修飾遺伝子の同定と機能解析を行っている。単独のタンパク質では試験管内での反応系再構成ができなかったことから考えても、タンパク質の活性を指標として RNA 修飾遺伝子を同定する手法では同定できないものについても本研究での解析により同定できるということを証明している。

第 3 章ではワイプトシン(yW)修飾遺伝子の同定と機能解析を行っている。4 つの新規修飾遺伝子を同定し、TYW (tRNA yW synthesizing protein) 1,2,3,4 と命名した。さらに各遺伝子破壊株における中間体はそれぞれ、 $m^1G(yW-211)$ 、yW-187、yW-86、yW-72 であることを明らかにしている。また、TYW2,3,4 の組換えタンパク質を用い、S-adenosyl methionine (Ado-Met) を基質として、試験管内で yW 生合成反応系を構築した結果、TYW2 は yW-187 → yW-86、TYW3 は yW-86 → yW-72、TYW4 は yW-72 → (yW-58) → yW の反応をそれぞれ触媒すると判明した。これにより今まで不明であった yW の複雑な反応経路の大半を解明している。

TYW1 とそのホモログには、保存性の高い鉄-硫黄クラスター結合モチーフが存在した。そこで、出芽酵母において鉄-硫黄クラスター生成に必須の NFS1 タンパク質の発現制御株において発現を抑制した場合、yW 修飾の減少が確認できた。また鉄-硫黄クラスター結合モチーフに変異を入れると、yW 修飾が欠失した。このことから、yW 修飾の形成は、鉄-硫黄クラスターの生成とその TYW1 への結合が必須であることが分かった。

TYW2-4 の植物ホモログは N 末から TYW3、TYW4 の C 末ドメイン、TYW2 の順番に連結された構造を有する 1 つの長い融合タンパク質になっていることが判明した。これはつまり、TYW2,3,4 が tRNA とマルチコンプレックスを形成し、連続した反応を触媒することで、yW-187 から yW への生合成を協調的に進行させていることを示唆している。

第4章では5-メトキシカルボニルメチル2-チオウリジン(mcm⁵s²U)修飾遺伝子の同定と機能解析を行っている。5位の修飾に関する遺伝子を1つ、2位のチオ化に関する遺伝子を5つ同定し、チオ化遺伝子群をTUT(tRNA uridine thiolation protein)1,2,3,4,5と命名した。これらTUT遺伝子は、大腸菌チアミンの合成系に関わる遺伝子群のホモログであり、この反応系と、TUT遺伝子群を並べ替えてみると、出芽酵母では2位のチオ化に使われる硫黄が、ユビキチン経路と類似した機構で伝達されていくことが示唆され、大腸菌では、これとは異なった経路で硫黄が伝達されることが報告されていることから、同一構造の修飾塩基でも、生物種によって異なる経路を通して形成されていることが示唆されている。

第5章では3-メチルシチジン(m³C)の生合成遺伝子を同定し、機能解析を行っている。

本研究において12もの新規修飾遺伝子を同定でき、生合成経路の解明もできたことから、本研究で用いているリボヌクレオーム解析の有効性が示された。以上のようなRNA修飾遺伝子群の網羅的探索は、修飾遺伝子の同定にとどまらず、生合成機構や生体内で起こる化学反応への理解や生物間での違い、他の代謝系との関わりなど様々な生命現象の理解につながることを期待できる。さらに同定された修飾遺伝子には、ヒトホモログが存在することから、今後これらに関しても解析を行っていくことで、ヒトのRNA修飾異常に起因する疾患や高次生命現象とのかかわりが明らかになることが期待できる。なお、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。