

| | |
|----------|---|
| 氏名・本籍 | 岡本 茉佑美 (佐賀県) |
| 学位の種類 | 博士 (生命システム科学) |
| 学位記番号 | 博甲 第25号 |
| 学位授与の日付 | 平成27年3月20日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 (課程博士) |
| 学位論文題目 | タンパク質キナーゼ Aurora-B の新規基質である SAKI の機能解析研究 |
| 学位論文審査委員 | 主査 教授 達家 雅明 副査 教授 嶋本 文雄 教授 小西 博昭 教授 肖 業貴 |

学位論文の要旨

細胞分裂 (染色体分配と細胞質分離) に必須のタンパク質キナーゼである Aurora-B は、細胞分裂の過程で染色体上に乗車したり降車したりすることが知られている。このようなタンパク質を「染色体パッセンジャー」と呼び、幾つか知られるパッセンジャーの中で、Aurora-B はその中核に位置する。すなわち、Aurora-B は細胞分裂の司令塔のような役割を担っている。Aurora-B がリン酸化するタンパク質の解析から、100-kDa の分子量を持つ新規因子が基質として見つかっており、SAKI (Substrate of AIM-1/Aurora kinase B) と命名されていた。この新規基質 SAKI は細胞核の中の核小体に局在し、核酸のメチル化 (シトシンの 5 位メチル基転移: m5C) 酵素活性を持つことがわかっていたが、その役割については全く不明であった。そこで本研究では、SAKI の機能について解析することを目的とした。

第 1 章では、緒言として背景と目的を記載する。

第 2 章では、SAKI の発現解析について調べた結果を述べる。Aurora-B はがん関連分子であり、ヒトがん組織において高発現が観察されていた。そこで、SAKI についても同様のがん関連分子として機能していることを疑った。そこで、①ヒトの正常組織におけるタンパク質発現、②各種ヒトがん細胞株におけるタンパク質発現、③各種ヒトがん組織におけるタンパク質発現、④ヒト正常細胞とがん細胞における SAKI の遺伝子量、などについて調べた。その結果、大腸がんや口腔がんをはじめ種々のヒトがんにおいて SAKI タンパク質は高い発現を示し、また、遺伝子増幅が起こっていることを見つけた。

第 3 章では、SAKI の細胞増殖における役割について明らかにした。SAKI がヒトがん細胞において遺伝子増幅を伴って高発現していたこと、また、英国の研究グループが本研究とは全く独立して SAKI を細胞増殖制御の中核をなす核内がん遺伝子産物 Myc の下流因子 (MISU: Myc-induced SUN-domain-containing protein) として報告したことなどから、SAKI はがん細

胞の増殖に関連する因子であることが疑われた。そこで、SAKI のノックダウンを子宮頸部がん HeLa 細胞で試した。その結果、SAKI を高発現した場合においても、また、ノックダウンして発現をほとんど無くした場合においても、HeLa 細胞での増殖能や軟寒天培地中での増殖で見たがん細胞性の増殖（造腫瘍能と関連するような細胞増殖能）は変更されなかった。すなわち、SAKI はがん細胞増殖関連因子では無いことが示唆された。

第 4 章では、SAKI の細胞ストレス応答における役割について解析した。第 2 章と第 3 章の解析結果で SAKI は増殖関連因子では無いにもかかわらず、がん細胞において遺伝子増幅を伴い高発現していたことから、次に、SAKI ががん細胞の生体内における生存に重要な因子では無いかと考えた。そこで、種々のストレス（熱や放射線、種々の抗がん剤など）での SAKI ノックダウン細胞における感受性を調べた。しかし、大きく感受性を変更させる因子は見つけることが出来なかった。一方、SAKI の酵母版（オルソログ）として Trm4 が知られていたが、酵母の解析結果での報告によると、Trm4 (tRNA (m5C)-methyltransferase 4) は別のメチル化酵素である Trm8 (tRNA (m7G)-methyltransferase 8) と同時に機能して tRNA の品質管理にかかわっているらしい。そこで、Trm8 のヒト版である METTL1 (methyltransferase like 1) と SAKI のふたつについて共高発現、あるいはダブル・ノックダウンした HeLa 細胞を作成し種々のストレスでの感受性を調べたところ、現在でも広く使われている抗がん剤であるフルオロウラシル (5-FU) に対して特異的に感受性の変更されることがわかった。

第 5 章では、tRNA の品質管理としての SAKI と METTL1 の役割について考察する。酵母では、Trm4 と Trm8 による tRNA の修飾は熱ストレスでの tRNA の構造変化を抑制し、この効果が不十分な場合、不良 tRNA として分解されることが知られる (rapid tRNA decay (RTD) pathway)。本研究におけるヒトでの結果では、この経路は保存されていなかったが、tRNA が熱ストレス以上に変性してしまうような状況、すなわち、tRNA のフルオロウラシル化が生じた場合、RTD が働いていると考察される。

第 6 章では、本研究の総括を述べる。

本研究より、SAKI はヒトがんにおいて遺伝子量の増加を伴い高発現しているにも関わらず、増殖関連分子でないことが明らかとなった。さらに、SAKI は他の tRNA メチル化酵素 METTL1 と共に、ヒトがん細胞の 5-FU 感受性の変更に参加していることが分かった。また、SAKI の解析を通じて、酵母に存在する tRNA の品質管理システムがヒトにも存在すること、更に、そういった仕組みががん細胞の生体内生存において重要であることを見つけた。汎用抗がん剤の感受性変更因子であったことから、ヒトがんにおける抗がん剤効果の予測、更に、分子標的化することによる新規の抗がん増感剤の開発などが本研究の成果としてあげることが出来る。

審査の結果の要旨

SAKI (Substrate of AIM-1/Aurora kinase B) は Aurora-B の新規基質として見つかったが、核小体に局在し、シトシンの 5 位メチル基 (m5C) 転移酵素活性を持つこと以外に、その核酸代謝における具体的な役割や生理機能については不明であった。本研究では、SAKI が、がん関連タンパク質キナーゼ Aurora-B の基質であることに注目して生理機能解析をおこない、SAKI もまた、ヒトがんで遺伝子増幅を伴って高発現するがん関連タンパク質であること、更に、tRNA をメチル化制御することによってがん細胞の抗がん剤耐性の獲得に深く関係していることを突き止めた。

第 1 章では、緒言として SAKI が見つかった背景と研究の目的を記載する。

第 2 章では、SAKI の発現解析について調べた結果を述べる。すなわち、①ヒト各種正常組織でのタンパク質発現、②種々のヒトがん細胞株でのタンパク質発現、③種々のヒトがん組織におけるタンパク質発現、④それらの SAKI ゲノム遺伝子量などについて調べ、大腸がんや口腔がんをはじめ多くのヒトがんにおいて SAKI タンパク質は高い発現を示し、また、遺伝子増幅が起こっていることを見つけた。

第 3 章では、SAKI の細胞増殖における役割について明らかにした。SAKI がヒトがん細胞において遺伝子増幅を伴って高発現していたことから、SAKI ががん細胞の増殖に関連することが疑われたが、SAKI 発現を small hairpin RNA (shRNA) によって抑制したヒト子宮頸部癌由来がん細胞 (HeLa 細胞) における軟寒天培地中での増殖で見たがん細胞性の増殖能 (造腫瘍能) は変更されなかった。すなわち、SAKI はがん細胞増殖関連因子では無いことが示された。

第 4 章では、SAKI の細胞ストレス応答における役割について明らかにした。種々のストレス (熱や紫外線、エックス線、パクリタキセル、その他の抗がん剤など) での SAKI ノックダウン細胞における感受性を調べる中で、m5C 転移酵素活性を持つ SAKI と、グアニンの 7 位メチル基 (m7G) 転移酵素活性を持つ METTL1 (methyltransferase like 1) の両方を shRNA によって発現抑制した HeLa 細胞において汎用抗がん剤フルオロウラシル (5-FU) に対して特異的に感受性が変更されることを見つけた。

第 5 章では、tRNA の品質管理としての SAKI と METTL1 の役割について明らかにした。m5C と m7G の修飾を欠いた tRNA は、5-FU 処理された細胞内で非常に不安定になることを突き止めた。

第 6 章では、本研究の総括を述べる。

本研究で、SAKI が、tRNA を介するような今まで知られていなかった薬剤耐性機構により汎用抗がん剤 5-FU に耐性をもたらしている因子であることが明らかとなったことから、ヒトがんにおける抗がん剤効果の予測、更に、画期的な新規抗がん増感剤の開発に繋がると期待される。よって審査員一同が協議の結果、本論文は博士 (生命システム科学) の学位に値するものと認められる。