







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第649号	氏名	藤浪弘行
審査委員会委員	主査氏名	石野 敏理	
	副査氏名	久保田 敏昭	
	副査氏名	廣中 秀一	
論文題目			
<p>CLP1 acts as the main RNA kinase in mice (マウスにおいて CLP1 が主な RNA キナーゼである)</p>			
論文掲載雑誌名			
<p>Biochemical and Biophysical Research Communications</p>			
論文要旨			
<p>生体において機能する RNA は転写されたのちさまざまな修飾をうけて機能的な RNA へと成熟する。加えて、mRNA, tRNA, rRNA に加え、機能性 small RNA の代謝機構は種々のストレス環境に応答して高度に調節されており、遺伝子発現、タンパク質の生合成調節に寄与していることが明らかになってきた。さらに近年、RNA 代謝調節機構の破綻が神経変性疾患や癌などの疾患との関与を示す知見が蓄積しつつあり、RNA 代謝調節機構の分子機序の解明は病態生理学的にも注目を集めている。</p> <p>CLP1 は、RNA の 5' 末端をリン酸化する酵素として哺乳類でははじめて報告され、ヒトで主として tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ酵素複合体の構成タンパク質の1つとして tRNA のプロセシングに重要な役割を担っている。また、同タンパク質は mRNA の 3' 末端を切断しポリアデニル化に関与する酵素複合体の構成タンパク質として1つとして機能していることが報告されている。一方で、核小体局在タンパク質 NOL9 は rRNA の成熟に不可欠なタンパク質である。これら2つのタンパク質は、いずれも RNA の 5' 末端をリン酸化する RNA キナーゼであることが報告されているが、不明な点が多い。加えて、siRNA の作用に不可欠な 5' 末端のリン酸化反応を担う分子として CLP1 と NOL9 が候補と考えられてきたが、直接的に証明した報告はなかった。</p> <p>野生型およびキナーゼ活性欠失体 CLP1 ノックインマウスから単離したマウス胚線維芽細胞 (それぞれ MEF<sup>wt/wt</sup> および MEF<sup>kl/kl</sup>)、およびマウス組織を用い、in vitro kinase assay により内因性の NOL9 の RNA キナーゼ活性を評価したところ、NOL9 の RNA キナーゼ活性は認めなかった。さらに、MEF および無細胞系を用い発現・精製したマウス NOL9 を用いた kinase assay においても RNA キナーゼの活性は確認できなかった。siRNA の作用には、そのリン酸化が不可欠であるが、キナーゼ活性欠失体 CLP1 ノックインマウスから単離したマウス胚線維芽細胞では GAPDH siRNA の作用は減弱するが、そこに NOL9 過剰発現しても siRNA のノックダウン効率が改善されることはなかった。</p> <p>本研究により、これまで RNA キナーゼとして CLP1 と NOL9 が機能していることが報告されていたが、NOL9 にはその活性がないこと、またマウス細胞において RNA 5' 末端のリン酸化を主として担っているのは CLP1 であり、NOL9 ではないことが明らかになった。</p> <p>この結果は、今後の RNA キナーゼの生体での解析に重要な情報をもたらすことが期待されることから、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

## 最終試験

## の結果の要旨

## 学力の確認

審査区分 課・論	第649号	氏名	藤浪弘行
審査委員会委員	主査氏名	石崎 敏理	
	副査氏名	久保田 敏昭	
	副査氏名	廣中 秀一	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. マウスの購入、入手法が記載されていない。Clp1<sup>K/K</sup>マウスは教室に常時飼育されているのか。</li> <li>2. 本研究にマウスを使用した理由は、DiscussionにおいてマウスとヒトのNOL9の相似性が59%で低いと書いてある。マウスを実験に使用したのが適当であったのか疑問に思われる。ヒトの細胞の実験結果が出ているか、あるいは報告があるか。</li> <li>3. Introductionの「Zebrafish with a null mutation of the nol9 gene」の意味を説明せよ。</li> <li>4. Mutated mNOL9(S329A-NOL9)は遺伝子導入してキナーゼ活性を落としたと説明されたが、RNAkinase活性のことか。</li> <li>5. Zebrafish with a null mutation of the nol9 gene でhypoplasia of pancreas liver and intestine and show defective hematopoiesis が観察されるの原因はどのように考えられるか？あるいは報告があるのか。</li> <li>6. 前立腺癌でCLIP1の研究を進めているが、将来治療に結びつく可能性としてどのような展望が考えられるか。</li> <li>7. これまでのNOL9の報告として、他の生物ではNOL9がリン酸化されたという報告はあるのか。あるならば、どのような報告か。</li> <li>8. Fig. 4AでClp1 deadマウスではGAPDH siRNAではバンドが出ているが、これはNOL9が関係ないならば他にどのようなものが関連していると思われるか。</li> <li>9. CLP1があると前立腺癌の増殖が見られた。この場合にp53の発現が増えているのか？またp53は不活化しているのか。細胞株でのCLP1の発現量は。</li> <li>10. NOL9・CLP1の細胞内局在とsiRNAのリン酸化は細胞内のどこで行われているのか</li> <li>11. NOL9のtissue distributionから想定される生体での機能はどのようなものがあげられるのか。</li> <li>12. Fig1A: CLP1<sup>K/K</sup>ではRNAキナーゼ活性はどのようななるのか</li> <li>13. 過剰発現したNOL9は活性があることを確認したのか。またIP産物に活性があることはどのように担保したのか</li> <li>14. CLP1<sup>K/K</sup>細胞でもGAPDH siRNAが機能しているようであるが、CLP1, NOL9以外の候補が存在を示唆するデータなのか</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 藤浪 弘行

## 論 文 題 目

CLP1 acts as the main RNA kinase in mice

(マウスにおいて CLP1 が主な RNA キナーゼである)

## 要 旨

## 緒言

CLP1 は mRNA 3' 末端を切断しポリアデニル化に関わる酵素複合体の構成タンパク質として、また tRNA 前駆体のスプライシング機構に関与する tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ (TSEN) 複合体の構成タンパク質として重要な役割を果たすことが知られている。一方で NOL9 は細胞の核小体に局在し、リボソーム RNA の成熟に重要な役割を果たす。CLP1、NOL9 はいずれも RNA の 5' 末端を直接リン酸化できる RNA キナーゼであると報告されている。また、mRNA の破壊によって遺伝子発現を抑制する機構である RNA 干渉に関与する siRNA は、二本鎖 siRNA の 5' 末端リン酸化がその機能に必要不可欠であり、これまで CLP1 と NOL9 がそれを担う分子であると予想されていた。しかし、それを直接示した報告は存在しなかった。本研究で、マウス NOL9 には RNA キナーゼ活性がなく、RNA 干渉における RNA キナーゼ活性は主に CLP1 が担っていることを明らかにした。

## 研究対象及び方法

マウス胚線維芽細胞 (MEFs) (野生型及び CLP1 のキナーゼ活性を喪失したノックインマウス (*Clp1*<sup>K/A</sup>)) とそれらの組織 (野生型、*Clp1*<sup>K/A</sup>) を用いて、*in vitro* kinase assay により内在性マウス NOL9 の RNA キナーゼ活性を評価した。また MEFs 及び無細胞タンパク質発現系を用いてマウス NOL9 組換えタンパク質を作製し、マウス NOL9 の RNA キナーゼ活性を評価した。さらに、NOL9 の siRNA 経路に及ぼす影響を検討するため、MEFs (野生型、*Clp1*<sup>K/A</sup>) の NOL9 過剰発現株を用いて GAPDH mRNA を標的とした siRNA のノックダウン効率を評価した。

## 結果

本研究で行ったいずれの *in vitro* kinase assay においても、マウス NOL9 の明らかな RNA キナー

ゼ活性は認められなかった。また GAPDH siRNA のノックダウン効率は *Clp1*<sup>K/K</sup> MEFs では減少したが、NOL9 過剰発現の影響は受けず、CLP1 の RNA キナーゼ活性が主に siRNA 経路に関わることが示唆された。

### 考察とまとめ

マウス NOL9 の RNA キナーゼ活性を検討するため、内在性タンパク質及び組換えタンパク質を用いて *in vitro* kinase assay を行なったが、既報とは異なり NOL9 には RNA キナーゼ活性がないことを見出した。また我々は本研究により、マウス細胞において、siRNA 経路の RNA 5' 末端リン酸化に作用するのは主に CLP1 であり、NOL9 は関与しないことを示した。今後、NOL9 のキナーゼ活性に関わるとされるドメインを変異させたキナーゼ活性喪失ノックインマウスを作成することで、NOL9 の生体内での機能をより詳細に解析できる可能性がある。