

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 637 号	氏名	井上 真紀
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆志	
	副査氏名	藤木 稔	
	副査氏名	松尾 哲孝	
論文題目 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2 (チロシン tRNA 前駆体から生じる tRNA 断片は PKM2 を介した p53 依存的神経細胞死に関与する)			
論文掲載雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨 近年、transfer RNA (tRNA) 由来の断片が一部のヒト疾患の病因に関わることが示された。CLP1 は tRNA 前駆体の成熟化を担う RNA キナーゼであり、その欠損マウスではチロシン tRNA 前駆体から生じる 5' 側のエクソン断片 (5' Tyr-tRF) が蓄積し、p53 の活性化による進行性の神経変性疾患が起きることが報告されている。しかしながら、tRNA 断片が神経変性を起こす病態分子機構は不明であった。本研究は、培養細胞およびゼブラフィッシュを用いてこの分子機構の一端を明らかにしたものである。 まず、ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y に 5' Tyr-tRF を含む様々な tRNA 断片を導入したところ細胞の生存には直接影響を及ぼさなかったものの、レチノイン酸処理により神経細胞へ分化誘導すると 5' Tyr-tRF のみが神経細胞死を惹起した。この時、p53 遺伝子をノックアウトさせた SH-SY5Y では 5' Tyr-tRF による毒性は示されなかったことから、5' Tyr-tRF 導入による神経細胞死は p53 を介したものであることが示された。 一方、in vivo における 5' Tyr-tRF の影響を調べるため、ゼブラフィッシュ胚に tRNA 断片をマイクロインジェクションしたところ、ゼブラフィッシュには小頭と側弯が認められ、脊髄における運動神経細胞が減少した。この時、p53 モルフォリノアンチセンスオリゴを 5' Tyr-tRF と共にゼブラフィッシュ胚にインジェクションし p53 の発現を抑えると、5' Tyr-tRF により減少した神経細胞数は正常に戻ったことから、ゼブラフィッシュの神経細胞死も p53 依存的であることが示された。 さらに、5' Tyr-tRF と結合するタンパク質を DARTS 法とプロテオーム解析を駆使して探索し、PKM2 を同定した。PKM2 mRNA の導入により、5' Tyr-tRF により誘導されるゼブラフィッシュの神経細胞死は抑制された。また、プルダウンアッセイ法で 5' Tyr-tRF が PKM2 に直接結合することも示された。最近、核内に存在する PKM2 が p53 と直接相互作用することが報告され、本研究結果から 5' Tyr-tRF が p53 に対する PKM2 の干渉を阻害することにより、p53 が過剰に活性化して神経細胞死をおこす可能性が示唆された。 本研究により、RNA 代謝異常による神経変性疾患の発症機構の一端が解明された。これは、神経変性疾患の治療戦略につながる重要な知見である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値すると判断した。			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第637号	氏名	井上 真紀
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆志 	
	副査氏名	藤木 稔 	
	副査氏名	松尾 哲孝 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、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"> 1. チロシンtRNAの成熟化にCLP1が関わっているが、他のアミノ酸のtRNA成熟化の制御機構はどうなっているか。 2. CLP1によるtRNAのリン酸化は、tRNAの成熟化にいかに関与するのか。 3. チロシンには2つのコドンが存在するが、それぞれのコドンを認識するtRNAの構造（配列）に違いはあるのか。また、それぞれのtRNAには、CLP1との反応性の違いはあるのか。 4. 5' Tyr-tFRは既に分化した樹立細胞株に影響を与えるのか。 5. 実験対照群のtRFとして5' Arg-tRFを用いたのはなぜか。リーダー配列を含まない5' Tyr-tFRとどのような構造的違いがあるのか。 6. 神経細胞分化誘導の指標に神経軸索の伸長で比較していたが、何かマーカー遺伝子を用いる必要はないのか。 7. 5' Tyr-tFRを導入したゼブラフィッシュに側彎が認められたが、ヒトやマウスでも同様の表現型がみられるのか。また、ゼブラフィッシュの側彎は神経細胞死に起因するものと考えられるか。 8. p53ノックアウト細胞の神経細胞への分化誘導能は、野生型細胞と比較して同じであるのか。 9. p53モルフォリノアンチセンスオリゴによるゼブラフィッシュのp53ノックダウン効率は何の程度か。 10. p53はユビキタスに発現するにもかかわらず、p53の活性化により誘導される細胞死が神経細胞に限局するのはなぜか。 11. PKMと5' Tyr-tFRの結合にはtFRのリーダー配列は必要不可欠なのか。 12. 5' Tyr-tFRの結合部位は、PKM1とPKM2の選択的スプライシングの部分か。 13. PKM2の活性化の制御機構を説明しなさい。 14. 5' Tyr-tFRによりPKM2とp53の結合が阻害されることを確認したか。 15. PKM2 mRNAが特異的に5' Tyr-tFRによる神経細胞死 (Cell death) を抑制したが、5' Tyr-tFR蓄積、p53活性化による小頭症・側彎 (Anomaly) 及び神経変性 (Degeneration) は病態カテゴリーとして直結する事象と考えられるか。 16. 神経変性におけるmacrophageや microgliaなどによる炎症の関与、分化中の細胞以外、野生型・成熟細胞において酸化ストレスに応答する病態機序を説明しなさい。 <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 井上 真紀

論 文 題 目

Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2
(チロシン tRNA 前駆体から生じる tRNA 断片は PKM2 を介した p53 依存的神経細胞死に関与する)

要 旨

【緒言】

- ・近年、transfer RNA (tRNA) 由来の断片が一部のヒト疾患の病因に関与することがわかってきた。
- ・CLP1 は tRNA 前駆体の成熟化を担う RNA キナーゼである。CLP1 キナーゼ活性欠損マウスではチロシン tRNA 前駆体から生じる 5' 側のエクソン断片 (5' Tyr-tRF) が蓄積し、p53 の活性化による進行性の神経変性疾患が起きることが報告されている。
- ・一方、ヒト CLP1 遺伝子変異 (p.R140H) による橋小脳低形成 10 型の患者線維芽細胞にはイソロイシン tRNA 前駆体に由来するイントロン部分が最も蓄積 (Ile-intron) すると報告された。
- ・CLP1 遺伝子変異患者の細胞を用いた実験では、チロシン tRNA 前駆体に由来する 5' 末端がリン酸化されていない 3' 側エクソン断片 (3' Tyr-tRF) が最も毒性が強いことが報告された。
- しかし、いずれの tRNA 断片においても神経変性を起こす病態分子機構は不明なままであった。
- ・そこで今回、我々はゼブラフィッシュを用いて tRNA 断片により発症する神経変性疾患の病態機構解明を試みた。

【研究方法および結果】

- tRNA 断片がヒト神経細胞に及ぼす影響を調べるため、ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y に 5' Tyr-tRF を含む様々な tRNA 断片を導入した。神経細胞への分化誘導時に 5' Tyr-tRF のみが神経細胞死を惹起した。p53 ノックアウト SH-SY5Y には 5' Tyr-tRF は毒性を示さなかった。
- 5' Tyr-tRF による in vivo での影響を調べるため、ゼブラフィッシュ胚に tRNA 断片をマイクロインジェクションした。5' Tyr-tRF をインジェクションされたゼブラフィッシュは小頭と側弯、脊髄における運動神経細胞の減少が認められた。
- ゼブラフィッシュにおいても 5' Tyr-tRF による神経変性が p53 依存的かを調べるため、p53 モルフォリノアンチセンスオリゴを 5' Tyr-tRF と共にゼブラフィッシュ胚にインジェクションした。モルフォリノによる p53 ノックダウンにより、5' Tyr-tRF による神経細胞の減少はレスキューされた。
- 5' Tyr-tRF による神経細胞死の分子機構解明のため、5' Tyr-tRF と結合するタンパク質を DARTS およびプロテオーム解析を用いて検索し、PKM を特定した。PKM には PKM1 と PKM2 というアイソフォームが存在するが、ゼブラフィッシュに 5' Tyr-tRF とそれぞれの PKM mRNA を同時にインジェクションすると PKM2 mRNA が特異的に 5' Tyr-tRF の神経細胞死を抑制した。また、プルダウンアッセイ法で 5' Tyr-tRF が PKM2 に直接結合することを確認した。

【考察および結語】

今回の研究では、マウスおよびヒト患者における CLP1 変異によって生成される tRNA 断片の機能を調べた。5' Tyr-tRF はヒト神経芽細胞腫細胞株に最も毒性が強く、ゼブラフィッシュに p53 を介した神経異常を引き起こした。また 5' Tyr-tRF の標的分子として PKM2 を特定した。PKM2 は解糖系で働くピルビン酸キナーゼであるが、一部は核内にも存在することがわかっている。最近、核 PKM2 が p53 と直接相互作用することが報告され、本研究からは 5' Tyr-tRF が p53 に対する PKM2 の干渉を阻害することにより、p53 が過剰に活性化して神経細胞死おこす可能性が示唆された。

5' Tyr-tRF の蓄積は CLP1 変異細胞だけでなく、酸化ストレスに応答した野生型細胞でも観察されるため、5' Tyr-tRF はアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの他の神経変性疾患の病因にも関与している可能性がある。5' Tyr-tRF は神経変性疾患の診断や予後予測のバイオマーカーになる可能性、さらには治療の標的分子になる可能性があると考えられた。