

氏名	JASTIN EDRIAN COCUANGCO REVILLEZA		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10563 号		
学位授与年月	令和 4 年 9 月 22 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Regulation of <i>CLB</i> expression by the cytoplasmic deadenylase Ccr4 through their coding and 3' UTR regions (細胞質デアデニラーゼ Ccr4 によるコード領域と 3' 非翻訳領域を介した <i>CLB</i> 遺伝子の発現調節)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	川口 敦史
副査	筑波大学教授	博士（医学）	松坂 賢
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	宮腰 昌利
副査	筑波大学助教	博士（薬学）	船越 祐司

## 論文の内容の要旨

JASTIN EDRIAN COCUANGCO REVILLEZA 氏の博士学位論文は、細胞質デアデニラーゼ Ccr4 による *CLB* 遺伝子の発現調節機構を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

### (目的)

メッセンジャーRNA (mRNA) の安定性制御は、遺伝子発現の適切なコントロールに必須である。真核細胞の mRNA は、5' 末端にキャップ構造と 3' 末端にポリ A 鎖を持ち、これらのシスエレメントを介して、mRNA の安定性と翻訳量が制御されている。*Saccharomyces cerevisiae* の *CLB1-6* 遺伝子は、サイクリン B タンパク質をコードし、サイクリン依存性キナーゼ Cdc28 (ヒト CDK1 の酵母ホモログ) と共に細胞周期の進行に関与している。*CLB* 遺伝子は、*CLB1/2*、*CLB3/4*、*CLB5/6* からなり、それぞれ G2-M 期、S-G2 期、S 期で遺伝子産物が蓄積する。これらの *CLB* タンパク質量は、主に転写活性とタンパク質の安定性によって制御されていると考えられているが、mRNA の安定性制御による *CLB* 遺伝子の発現制御機構は明らかにされていない。Ccr4-Not 複合体は、複数種類の構成因子からなるタンパク質複合体であり、細胞質における主要なデアデニラーゼとして機能する。Ccr4 はヌクレアーゼ活性をもち、Ccr4-Not 複合体の活性中心サブユニットである。これまでに、Puf タンパク質を介して Ccr4 は標的 mRNA にリクルートされ、ポリ

A鎖の分解制御に関与することが明らかになっている。また、*LRG1* 遺伝子など一部の mRNA では、mRNA の安定性制御だけでなく、翻訳制御にも関与することが示唆されている。そこで、著者はデアデニラーゼである Ccr4 の欠損株を用いて、*CLB1-6* の mRNA 量とタンパク質量を評価し、Ccr4 による *CLB1-6* mRNA の安定性制御機構とその翻訳への影響を明らかにすることを目的としている。

### (対象と方法)

著者は Ccr4 欠損株を培養し、トータル RNA を抽出後、定量的 RT-PCR 法により各 *CLB* 遺伝子の mRNA 量を明らかにしている。タンパク質発現量は、HA タグを付加した各 *CLB* タンパク質を発現させ、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロット法により評価している。そのうち、*CLB6* 遺伝子については、コーディング配列と 3' UTR を 150 塩基ずつ部分欠失したプラスミドを構築し、その mRNA の安定性を同様に評価している。また、細胞周期の影響を評価するため、 $\alpha$  因子を添加することで G1 期に、Hydroxyurea を添加することで S 期に同調させ、次いでリリースすることで、各細胞周期での *CLB* 遺伝子の転写量を評価している。

### (結果)

著者は野生型と比較して、Ccr4 欠損株では *CLB1-6* 遺伝子の mRNA 量が有意に増加することを明らかにしている。特に、*CLB6* 遺伝子では、*Ccr4* 遺伝子を欠損することで半減期が延長して mRNA 量が増加すること、及び mRNA 量だけでなく、タンパク質発現量も顕著に増加することを明らかにしている。さらに、*CLB6* mRNA 内の Ccr4 を介した安定性制御に関わるシス配列を同定するため、mRNA の部分欠損体を構築しており、コーディング配列と 3' 非翻訳領域 (3' UTR) の両方に Ccr4 依存的に mRNA を不安定化する配列があることを見出している。また、Ccr4 の mRNA へのリクルートを制御する RNA 結合タンパク質である *Puf1-6* を欠損した細胞で *CLB6* 遺伝子の 3' UTR の機能を評価したところ、Puf タンパク質非依存的に mRNA の安定性は制御されていることを明らかにしており、未知の Ccr4 のリクルート機構が存在する可能性を見出している。そこで次に、著者は BioGRID のパブリックデータベースより、*CLB6* mRNA と相互作用することが示唆されている Whi3 と Caf20、及び Caf20 に相互作用する Eap1 についても、各遺伝子の欠損株を構築し、*CLB* 遺伝子の安定性を評価したところ、Whi3 の欠損により、すべての *CLB* 遺伝子の mRNA 量が増加することを確かめている。よって、著者はストレス応答性の RNA 制御因子である Whi3 を介した *CLB* 遺伝子の発現制御機構が存在することを明らかにしている。

### (考察)

以上の結果から、著者は Ccr4 が *CLB* 遺伝子の転写後調節において律速的な役割を担っていることを明らかにし、*CLB6* のコーディング領域と 3' UTR がその遺伝子発現制御において重要であることを明らかにしている。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は、mRNA の安定性制御に中心的な役割を果たすデアデニラーゼ Ccr4 の標的遺伝子として *CLB* 遺伝子を新たに同定した研究であり、Ccr4 が *CLB6* mRNA の 3' UTR だけでなく、コーディング領域を介して、mRNA の安定性を制御することを示した論文である。また、Ccr4 を mRNA にリクルートする可能性のある RNA 結合タンパク質として、新たに Whi3 を同定した点も新規性がある。

令和4年5月27日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。