

山本 隆広 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

2-Methylthio Conversion of N⁶-Isopentenyladenosine in Mitochondrial tRNAs by CDK5RAP1 Promotes the Maintenance of Glioma-Initiating Cells
(CDK5RAP1 によるミトコンドリア tRNA の N⁶-イソペンテニルアデノシンにおける 2-メチルチオ修飾はグリオーマ幹細胞の生存に働く)

Cdk5 regulatory subunit-associated protein 1 (CDK5RAP1) はミトコンドリア内に局在し、ミトコンドリア tRNA の A37 位を 2-メチルチオ修飾する酵素である。CDK5RAP1 は N⁶-イソペンテニルアデノシン (i⁶A) を 2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデノシン (ms²i⁶A) に変換することでミトコンドリア内の翻訳制御、エネルギー代謝に働くことが知られている。本研究では、ミトコンドリア tRNA の i⁶A を ms²i⁶A に変換する CDK5RAP1 の酵素活性がグリオーマ幹細胞の維持に寄与する可能性について明らかにすることを目的とした。

熊本大学附属病院で診療を受けた膠芽腫患者に由来するグリオーマ幹細胞株を用いて、in vitro の実験 (sphere 形成能、分化誘導、未分化・分化マーカーの検出)、マウスを用いた in vivo の実験 (腫瘍形成能、生存率) を行った。同培養細胞における CDK5RAP1 やその関連遺伝子のノックダウンおよび遺伝子導入にはレンチウイルスベクターを作成・使用した。電子顕微鏡や蛍光免疫染色での観察、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の解析、培養細胞から分離・抽出したタンパク質、RNA、ヌクレオシドをそれぞれウェスタンブロット、定量 PCR、質量分析 LCMS/MS 等で検討した。また低酸素濃度による CDK5RAP1 の機能の変化について検討した。

CDK5RAP1 は自己複製能と未分化状態で示されるグリオーマ幹細胞の特性の維持に関わっていた。この働きは CDK5RAP1 のミトコンドリア内の翻訳やミトコンドリア機能の制御によるものではなく、ミトコンドリア tRNA の i⁶A を ms²i⁶A に変換することで、細胞内外の i⁶A の抗腫瘍効果を軽減することによると考えられた。グリオーマ幹細胞では i⁶A が蓄積すると AMPK-mTOR 経路を介してオートファジーが亢進し、幹細胞の特性の消失、細胞増殖能の低下が誘導されることが明らかになった。さらに CDK5RAP1 は硫黄-鉄クラスターを内包するため、細胞が低酸素状態にあると酵素活性が亢進することから、低酸素状態でグリオーマ幹細胞が生存する一因に CDK5RAP1 が関わる可能性が示唆された。

審査において、(1) Cdk5rap1 の発現制御と種保存性；(2) Cdk5rap1 によるミトコンドリア tRNA の A37 位の 2-メチルチオ修飾の特異性；(3) グリオーマ幹細胞株の分子生物学的な背景；(4) Cdk5rap1 阻害下の正常細胞とがん細胞におけるミトコンドリア機能変化の差異；(5) ミトコンドリアストレスと Cdk5rap1 の役割；(6) Cdk5rap1 阻害による AMPK の活性化、オートファジーに至る機序；(7) Cdk5rap1 によるステムネスとミトコンドリアの関連性；(8) Cdk5rap1 阻害下で細胞内外の i⁶A が増加する意義；(9) グリオーマ幹細胞の培地に加えた i⁶A 濃度の妥当性；(10) Cdk5rap1 が低酸素状態で働く機序とその意義；(11) Cdk5rap1 高発現のグリオーマの予後不良に関する考察；(12) 本研究に基づく治療・制御法の可能性、などについて活発な質疑が行われ、申請者から適切な回答が得られた。

本研究は、CDK5RAP1 によるミトコンドリア tRNA の i⁶A の 2-メチルチオ修飾がグリオーマ幹細胞の特性の維持および生存に関わることを明らかにし、がん幹細胞の新たな分子病態を解明したことから、学位論文に相応しいと評価された。

審査委員長 細胞医学担当教授

中尾 忠善