

学位論文抄録

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)

山本 隆広

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経外科学

指導教員

武笠 晃丈 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経外科学

富澤 一仁 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子生理学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: 2-Methylthio-N⁶-isopentenyl modification of adenosine (ms²i⁶A) is an evolutionally conserved modification that is found in mitochondrial (mt)-tRNAs. Cdk5 regulatory subunit-associated protein 1 (CDK5RAP1) specifically converts N⁶-isopentenyladenosine (i⁶A) to ms²i⁶A at position A37 of four mt-DNA-encoded tRNAs, and the modification regulates efficient mitochondrial translation and energy metabolism in mammals. Here, we report that the ms² conversion mediated by CDK5RAP1 in mt-tRNAs is required to sustain glioma-initiating cell (GIC)-related traits.

Methods: Patient-derived cell lines established in the Department of Neurosurgery, Kumamoto University Hospital were used in vitro and in vivo experiments. Lentiviral vectors were used for gene silencing or gene expression of CDK5RAP1 and others. Isolated proteins, RNAs and nucleosides were used for gene expression analysis, immunoblotting analysis, mass spectrometry analysis and mt-tRNA modification assessment.

Results: CDK5RAP1 maintained the self-renewal capacity, undifferentiated state, and tumorigenic potential of GICs. This regulation was not related to the translational control of mt-proteins. CDK5RAP1 abrogated the antitumor effect of i⁶A by converting i⁶A to ms²i⁶A and protected GICs from excessive autophagy triggered by i⁶A. The elevated activity of CDK5RAP1 contributed to the amelioration of the tumor-suppressive effect of i⁶A and promoted GIC maintenance. The hypoxic microenvironment in the tumor core activated CDK5RAP1, whose activity was inversely correlated with the oxygen concentration because of two [4Fe-4S] clusters in the enzyme.

Conclusions: This work demonstrates that CDK5RAP1 is crucial for the detoxification of endogenous i⁶A and that GICs readily utilize this mechanism for survival.

学位論文抄録

〔 目的 〕

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-メチルチオ修飾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いているとされている。本研究では、この CDK5RAP1 によるミトコンドリア tRNA の i6A を 2-メチルチオ修飾により 2-メチルチオ-N6-イソペンテニル (ms2i6A) へと変換する働きがグリオーマ幹細胞の生存に働くことを明らかにした。

〔 方法 〕

熊本大学医学部附属病院にて加療を受けた膠芽腫患者由来のグリオーマ幹細胞株を用いて *in vitro*、*in vivo* の実験を行った。同培養細胞における CDK5RAP1 やその他の遺伝子のノックダウンおよび遺伝子導入には作成したレンチウイルスベクターを使用した。電子顕微鏡や蛍光免疫染色での観察、フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能解析、培養細胞から分離、抽出したタンパク、RNA、ヌクレオシドをそれぞれウェスタンブロット、qPCR、LCMS/MS 等で解析することで検証を行った。

〔 結果 〕

CDK5RAP1 はグリオーマ幹細胞の自己複製能、未分化状態等に代表される幹細胞性の維持に働いていた。この働きは CDK5RAP1 のミトコンドリア内翻訳制御によるミトコンドリア機能の変化によるものではなく、ミトコンドリア tRNA の i6A を 2-メチルチオ修飾により ms2i6A へと変換することで細胞内 i6A の抗腫瘍作用を軽減していたためであった。グリオーマ幹細胞では細胞内に i6A が蓄積すると AMPK-mTOR 経路の活性を介してオートファジーが亢進し、幹細胞性の消失、細胞増殖能の低下が惹起されることが明らかとなった。また、この現象はミトコンドリア tRNA の i6A を ms2i6A へと修飾する CDK5RAP1 の活性により左右されることが分かった。さらに CDK5RAP1 は内包する硫黄-鉄クラスター構造の影響で細胞が低酸素状態にあると活性が亢進するため、低酸素状態であってもグリオーマ幹細胞が生存できる一因に CDK5RAP1 の働きがあることが示唆された。

〔 結論 〕

CDK5RAP1 によるミトコンドリア tRNA の i6A における 2-メチルチオ修飾はグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持、生存に働くことを明らかにした。