

氏 名 Cruz Diaz, Luis Antonio

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2504 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 A possible oncogenic origin of ovarian clear cell carcinoma
and post-transcriptional regulation of protein complex
subunits

論文審査委員 主 査 川本 祥子
遺伝学コース 准教授
中村 保一
遺伝学コース 教授
川上 浩一
遺伝学コース 教授
池尾 一穂
遺伝学コース 准教授
田嶋 敦
金沢大学 医薬保健研究域医学系 教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Cruz Diaz, Luis Antonio

Title : A possible oncogenic origin of ovarian clear cell carcinoma and post-transcriptional regulation of protein complex subunits

I delved into two primary subjects within this thesis. The first one is: a possible oncogenic origin of ovarian clear cell carcinoma, and the second one is: post-transcriptional regulation of protein complex subunits. To begin with, I explored the relation between endometriosis, a disease characterized by the growth of endometrial-like tissue and stroma in ectopic areas (areas outside of the normal uterine cavity), and the subsequent development of ovarian clear cell carcinoma. This particular malignancy constitutes a histological subtype of epithelial cancer that is resistant to chemotherapy, comprised of clear cells containing glycogen and hobnail cells. Genomic studies have been conducted in order to elucidate the relevance of cancer-associated mutations in the transformation of endometriotic lesions into ovarian clear cell carcinoma. These studies have allowed the identification of somatic mutations that are commonly present in both endometriosis and this type cancer, underscoring the relationship between these two diseases. However, while the concepts of whether endometriosis serves as a precursor condition to ovarian clear cell carcinoma and the molecular mechanisms that could trigger this malignant transformation are well recognized, they remain incompletely understood. To gain deeper insights into the molecular mechanisms involved in the shift from endometriosis to ovarian clear cell carcinoma, we collected multiple tissue samples from a 56-year-old patient, including histologically normal uterine endometrium, ovarian endometriotic tissues located both distant from and contiguous to the ovarian clear cell carcinoma tissue, cancer stromal cells, and the carcinoma itself. We then subjected the samples to whole-exome sequencing. This comprehensive multisampling approach facilitated the identification of somatic mutations shared among the epithelium samples, shedding light on the genomic evolution of these different tissues leading up to the point of malignant transformation. Secondly, I investigated the possible post-transcriptional regulation of complex subunits. Hetero-oligomeric protein complexes constitute quaternary structures composed of sets of protein subunits that are assembled together in order to perform a wide range of essential biological functions. Given the collaborative nature of these subunits, it is expected that their protein quantities are finely tuned to similar levels within the cell, preventing the wastage of cellular resources and energy. It was recently determined that protein complex components are synthesized in accordance with their specific stoichiometries, suggesting stringent control over subunit production. Nevertheless, the

precise mechanisms governing how mRNA levels of complex subunits are harnessed to yield consistent protein quantities in line with the complex's structure remain not well understood. To delve further into this phenomenon, I undertook a comprehensive comparative analysis. This analysis involved comparing the expression levels detected by RNA-seq and Ribo-seq experiments of subunits from 14 diverse protein complexes. This approach aimed to provide a more profound understanding of how these subunits are regulated within the framework of their specific complex structures. This comparison was possible thanks to the identification of subunit limiting factors (those subunits displaying the lowest expression levels in their respective protein complexes) that were used to normalize both RNA-seq and Ribo-seq data. The analyzed complexes included: 20S proteasome, 19S proteasome, anaphase-promoting complex, RNA exosome, 80S ribosome, condensin I, RFC complex, cohesin SA2, ARP2/3 complex, TRIC complex, prefoldin, coatomer, exocyst, and conserved oligomeric Golgi complex. These complexes showed regulated subunit synthesis according to their stoichiometries. Furthermore, among all the examined complexes, I identified that only the 20S proteasome displayed a significant decrease in the normalized Ribo-seq levels of its subunits when compared to their normalized RNA-seq levels in all five tested human cell lines (H9, HEK293T, MCF7, PANC1, and RPE-1 cells). Most of the 20S proteasome subunits exhibited significant decreases in their normalized Ribo-seq expression levels. Specifically, the 20S proteasome subunits $\alpha 1$ (*PSMA6*), $\alpha 4$ (*PSMA7*), $\alpha 5$ (*PSMA5*), $\alpha 6$ (*PSMA1*), $\alpha 7$ (*PSMA3*), $\beta 1$ (*PSMB6*), $\beta 2$ (*PSMB7*), $\beta 3$ (*PSMB3*), $\beta 5$ (*PSMB5*), and $\beta 7$ (*PSMB4*) exhibited significant decreases in their normalized Ribo-seq expression levels across the five tested cell lines. In contrast, the subunit $\beta 4$ (*PSMB2*) displayed a significant increase in its normalized Ribo-seq levels compared to its normalized RNA-seq levels in four out of the five cell lines. I analyzed the codon usage of these genes and found that the 20S proteasome subunits with decreased normalized Ribo-seq levels preferentially utilized non-optimal codons in most of the 20 amino acids available, whereas the subunit with increased normalized Ribo-seq levels preferentially utilized optimal codons in most amino acids. However, the difference in the number of non-optimal codons between the 2 groups of 20S proteasome genes is not statistically significant. These results suggest that the codon usage pattern of the 20S proteasome subunit genes may not function as a post-transcriptional regulatory mechanism for the components of this complex.

博士論文審査結果

^{Name in Full}
氏名 Cruz Diaz, Luis Antonio

^{Title}
論文題目 A possible oncogenic origin of ovarian clear cell carcinoma and post-transcriptional regulation of protein complex subunits

卵巣癌は腫瘍の中でも自覚症状に乏しく、診断時には既に癌が進行している場合も多い。卵巣癌には複数のタイプが存在するが、その中でも明細胞癌は日本人における発生率がやや高く比較的初期に発見されるものの化学療法抵抗性であることが知られている。また、子宮内膜症がリスクファクターの1つであり、その関連性を明らかにするための分子的な病態解明が必要とされている。これまでの研究で *PIK3CA*、*KRAS*、*ARID1A* などの癌関連遺伝子が明細胞癌で高率に変異していること、またそれらの変異が子宮内膜の細胞の一部ですでに生じていたこと等が報告されている。出願者は子宮内膜症と明細胞癌の関係を明らかにするために、子宮内膜症を合併した明細胞癌の1人の患者由来の複数のサンプルを用いて全エクソームシーケンスを実施した。その結果、*ARID1A*、*ATM*、*CDH4*、*NRAS*、*PIK3CA* の癌関連遺伝子変異を含む多くの体細胞変異が、正常子宮内膜、子宮内膜症の遠位部位と隣接病変、および癌で共有されていることを明らかにした。また、それらの遺伝子の変異アレル頻度は正常組織から子宮内膜症、癌へと進むにつれ増加していたこと、両アレル性の変異やコピー数異常が生じていたことを明らかにした。さらに、体細胞変異の情報により正常細胞から癌への進展を解析する手法を用いて、患者の卵巣癌が子宮内膜上皮から子宮内膜症を経てクローン進化した可能性を示した。本研究は1症例によるものであるものの、逆行性月経が原因となり子宮内膜症が発症することを支持する数少ない報告の1つであると共に、癌の進行に関連する遺伝子変異をゲノムレベルで明らかにしたことにより、正常子宮内膜において着目すべき変異の候補を示し、将来的に卵巣明細胞癌の予防に寄与する可能性がある成果である。

続いて出願者は、タンパク質複合体サブユニットの遺伝子発現調節に関する研究を行った。細胞は恒常性を保つために、必要なタンパク質の合成を様々な機構により調節している。これまでの研究で、構成するサブユニット数が多く、細胞内での発現量が高いタンパク質複合体のリボソームやプロテアソームでは、各サブユニットが化学量論的に等量になるよう合成されていることが、酵母等の解析から明らかになっている。出願者は、タンパク質複合体サブユニットの合成が、どの段階でどのような機構で調節されているかを明らかにするために、サブユニットをコードする遺伝子の翻訳量を、5種類のヒト培養細胞から取得されたリボソームプロファイリング (Ribo-seq) データを用いて比較した。その結果、調査した14種類のタンパク質複合体の全てにおいて、サブユニット間の翻訳量の違いは概ね2倍以内であることが分かった。そこで、調節は、mRNAの転写段階で調節されているのか、転写後に行われているのかを明らかにするために、同じ細胞由来のRNA-seqデータとRibo-seqデータを比較したところ、14種類の複合体のうち、20Sプロテアソーム

ム複合体において、mRNA の発現量のばらつきが、翻訳時に有意に減少していることが分かった。このことは 20S プロテアソーム複合体のサブユニットの化学量論的制御が転写後制御によるものであることを示唆する結果である。さらに 20S プロテアソームサブユニットを構成する 14 遺伝子に着目して RNA-seq データと Ribo-seq データを比較したところ、10 のサブユニットにおいて相対的発現量が減少していたが、*PSMB2* がコードするベータ 4 サブユニットのみ増加していた。*PSMB2* の 3'-UTR には mRNA の分解の標的として知られている AREs (Adenylate-uridylate-rich elements) が複数存在し、mRNA の安定性に影響している可能性があることが判った。また、14 遺伝子のコドン使用頻度を確認したところ、各遺伝子においてコドン使用頻度に特別な偏りは見られないことが分かった。これらの結果からタンパク質複合体のうち 20S プロテアソームの遺伝子発現について何らかの転写後制御が存在することが示唆された。また、RNA-seq データと Ribo-seq データの比較によって、転写及び転写後制御の有無が推測可能であることを示し、タンパク質合成の研究において NGS データの利用可能性を改めて示したものである。

以上、審査委員会は、出願者が実施した 2 つの研究を総合し、本論文が学位の授与に値すると判断した。