

I 出芽酵母を用いた空間的・量的 tRNA 動態の解析

Analyses of tRNA kinesis, dynamics of abundance and localization of tRNAs, in budding yeast

吉久徹

Yoshihisa, T.

真核生物の tRNA は、転写後に様々な修飾を受けて成熟化し、最終的には細胞質で働く。一部の tRNA は intron を含んだ前駆体として転写されるが、ほとんどの intron は anticodon 近傍に挿入されており、その splicing は tRNA の機能化に必須である。tRNA の splicing は、mRNA とは異なり、タンパク質のみから成る酵素群が司るが、我々は出芽酵母の splicing 酵素群が、細胞質、特にミトコンドリア表面で働くこと、さらには、成熟体 tRNA が細胞質と核とを行き来しながらその一生を過ごすことを見出している。現在、この過程を司る分子機構の全貌を明らかにするため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を進めている。

さらに近年、tRNA のレパートリーが、生理的環境や生物の発生段階、組織形成に応じて変化するという証拠が得られつつある。我々は、tRNA 量の新規絶対定量法である OTTER 法を開発し、また、積極的な tRNA 量の改変系を構築することで、tRNA レパートリーの生理的環境に応じた動態の詳細や、それを可能にする機構、さらには、そうしたレパートリー変化が翻訳をはじめとする生理機能へ及ぼす影響を解析している。この中で、定常期における tRNA レパートリー形成への自食作用の影響についても研究を進め、一部の tRNA が選択的自食作用で液胞に取り込まれていることを明らかにしている。また、複数の同義遺伝子にコードされる tRNA について、個々の tRNA 遺伝子の tRNA 産生、生育への寄与を解析する為に、tRNA^{TrpCCA} についてシステムティックな多重欠失変異株セットを構築し、tRNA の産生については個々の tRNA の寄与はほぼ透過であるものの、遺伝子によっては生育への寄与に違いがあることを突き止めた。

II 出芽酵母の tRNA 遺伝子に含まれる intron の生理的意義の解析

Studies on physiological functions of tRNA introns in budding yeast

吉久徹

Yoshihisa, T.

前駆体 tRNA 中の intron は除かれることが tRNA の機能化に必須だが、逆に言えば tRNA 遺伝子に intron は必要なのだろうか？我々は、染色体上の遺伝子組換えが容易な出芽酵母の特性を生かし、tRNA の種類毎に、intron を持つ遺伝子全てを intron 欠失型に置き換えるプロジェクトを進め、

全ての isoacceptor tRNA にとって intron は必ずしも必要でないことを明らかにしている。intron 欠失株の表現型解析を進めるなかで、tRNA-Ile^UAU の intron が必要なアンチコドン修飾に必須であるだけで無く、不必要な修飾を防ぐ役割を持つこと、intron 欠失株の一部では、rRNA の成熟化や核小体の形態に異常が見られることを明らかにした。現在、tRNA-Leu^CAA の intron 欠失株において、intron 欠失の mRNA レポートリーや翻訳への影響を網羅的な解析で検討し、特に ribosome タンパク質の翻訳に影響が出ていることを見出した。現在、tRNA intron と ribosome の機能化の関係について研究を進めている。

Ⅲ 一時的翻訳停止を必要とする mRNA の翻訳再開と品質管理回避のメカニズムの解析

Investigation of mechanisms that allow translational restart and avoidance from mRNA surveillance of certain mRNAs that require tactical translational arrest for their regulation.

吉久徹
Yoshihisa, T.

出芽酵母の小胞体ストレス応答の鍵転写因子である Hac1 は、tRNA 型の細胞質スプライシングを受けるめずらしい mRNA から翻訳される。しかし、前駆体 *HAC1* mRNA は、(1) 翻訳停止状態にあること、(2) 見かけ上、未成熟終止コドンと認識されうる読み枠構造をもつこと等から、mRNA の品質管理機構によって分解されるべき特性を持つにもかかわらず、非ストレス下で安定な休眠状態にある。他の mRNA でも、その 2 次構造や rare codon を用いた一時的翻訳停止を用いて、タンパク質のドメイン毎の折りたたみを可能にする例があるが、こうした mRNA の翻訳停止機構がある程度理解されているに対し、その翻訳再開機構はよくわかっていない。当然、こうした mRNA もこれらも見かけ上、RNA の品質管理に抵触している。そこで、*HAC1* mRNA をはじめとする一時的翻訳停止を伴う mRNA の品質管理回避や、翻訳再開の機構について研究を進めている。特に、*HAC1* mRNA の翻訳制御にも関わり、この mRNA の細胞質スプライシング因子でもある Rlg1 に着目した解析を進めている。この中で、小胞体ストレス応答不全となる *rlg1* 変異の中には非ストレス下の *HAC1* mRNA が不安定になる変異があること、また、小胞体ストレス下では酵母 Ski 複合体が *HAC1* の翻訳制御に関わることを明らかにした。

一方、複数のリボソームが同じ mRNA 分子上に並んで翻訳を進めるのが普通であるが、一部の mRNA では十分な長さがあるにもかかわらず、1 分子の mRNA に 1 個のリボソームしか結合しない状態(モノソーム状態)で翻訳される。こうした mRNA の翻訳制御についても研究を進めている。特に、こうした mRNA の一部では、Puf3 という RNA 結合タンパク質がモノソーム状態を保つことに関わることが明らかとなった。さらに、一部のミトコンドリアタンパク質の mRNA には、非典型的な Puf3 結合配列が見られることも明らかにした。さらに、ribosome タンパク質 Rps7 のパラログの発現制御の相互作用に関する研究も展開している。

IV 原生動物の運動に関与する分子機械

Studies on biomolecules responsible for motility of protozoa

園部誠司・吉久徹
Sonobe, S., Yoshihisa, T.

原生動物は1個の細胞が1個体であり、運動、摂食、分裂、環境応答など多細胞生物が持つ様々な機能を同等に持っているが、1細胞であるがゆえに多細胞生物の細胞には見られない独特の様式でこれらの機能を発現している。特に運動様式は特殊なものが多くみられる。しかし、そこで用いられている運動タンパク質は微小管、アクチンといった多細胞生物と共通のものである。さまざまな原生動物を用いて、それらの特殊な運動様式の仕組みの解明を行い、それを通じて運動機構の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。

V 植物小胞体の形態形成に関与する分子機械

Studies on biomolecules responsible for morphogenesis of
endoplasmic reticulum in plant cells

横田悦雄・吉久徹
Yokota, E., Yoshihisa, T.

植物細胞の機能発現において、細胞骨格は重要な役割を果たしている。原形質流動におけるアクチン-ミオシン系の役割について、研究を行ってきた。植物特異的なミオシン XI による小胞体流動により、原形質流動が引き起こされること、また原形質流動の速度が植物のサイズに影響を及ぼすことを明らかにした。そして輸送だけではなく、小胞体の形態形成機構におけるアクチン-ミオシン系や、小胞体膜タンパク質である RHD3 の役割について解析を行っている。その結果 RHD3 が小胞体膜融合因子であり、リン酸化によりその活性が調節されることが示された。

VI その他の共同研究

Other collaborations

吉久徹・園部誠司・横田悦雄
Yoshihisa, T., Sonobe, S., Yokota, E.

発表論文 List of Publications

- I-1 Hayashi, S., Matsui, M., Ikeda, A., and Yoshihisa, T. : Six identical tRNA^{Trp}CCA genes express a similar amount of mature tRNA^{Trp}CCA but unequally contribute to yeast cell growth. : *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* **86**, 1398–1404 (2022)
- I-2 吉久 徹、笹田 奈友子、入江 百香 : 出芽酵母における tRNA のオートファジー : tRNAutophagy : 第 74 回日本細胞生物学会大会 (2022)
- I-3 Yoshihisa, T., Sasada, N., Irie, M., Taniwaki, N., and Nagai, A. : Multiphasic regulation of tRNA repertoires in budding yeast. : 第 23 回日本 RNA 学会年会 (2022)
- I-4 Sasada, N., Irie, M., Taniwaki, M., Matsui, M., Ikeda, A., Hayashi, S., Nagai, A., and Yoshihisa, T. : Formation and Maintenance of tRNA Repertoires in *Saccharomyces cerevisiae* : The 30th Tokyo RNA Club (招待講演) (2022)
- I-5 林紗千子、松井将也、池田彩乃、吉久徹 : 酵母の 6 つの完全に相同な tRNA^{Trp}CCA 遺伝子は、等しく成熟 tRNA^{Trp}CCA を供給するものの、生育に遺伝子座固有の影響を持つ。 : 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)
- I-6 Sasada, N., Irie, M., Nagai, A., Taniwaki, M., Hayashi, S., and Yoshihisa, T. : Regulation of tRNA repertoires in the budding yeast. : CSH Asia RNA Biology (国際学会) (2022)
- II-1 林紗千子、吉久徹 : *tL(CAA)* 遺伝子のイントロンの有無との奇妙な繋がり : 出芽酵母での Rps7 パラログ選択性と関連した細胞質及びミトコンドリアでの翻訳 : 第 45 回日本分子生物学会年会 (2022)
- III-1 Hayashi, S. and Yoshihisa, T. : Paralogue-specific regulation of *RPS7eS7* mRNAs via the 3'-UTR in budding yeast. : 第 23 回日本 RNA 学会年会 (2022)
- III-2 Pumilio homologue Puf3p coordinates *CAT5/COQ7* expression noncanonical binding-sequence dependently. : CSH Asia RNA Biology (国際学会) (2022)

科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 2~4 年度) 基盤研究(C) (一般) 課題番号 20KT06490
研究課題 tRNA レパートリー形成のための tRNA 遺伝子の発現制御機構の解明
研究代表者 吉久徹
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金 (令和 3~4 年度) 学術変革研究(A)・公募研究 課題番号 21H05726
研究課題 tRNA レパートリーの変化が与えるタンパク質の多面性
研究代表者 吉久徹