

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、翻訳伸張に関わる tRNA 群と異なり翻訳開始 tRNA^{Met} 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^{Trp}CCA についてシステマティックな多重欠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^{UUA}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、我々のグループに属する林紗千子特任助教が中心となって、tRNA-Leu^{CAA}のintron欠失株において、intron欠失のmRNAレパ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。さらに、通常の酵母株では連続のLeu残基やLys残基の翻訳はその残基数が増えると翻訳が遅延、さらには、停滞するが、この効果がtRNA-Leu^{CAA}のintron欠失株で弱まっていることを見出し、その機構に関して研究を進めている。

Ⅲ mRNAの翻訳制御機構の解析

Investigation of mechanisms for translational regulation in yeast.

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、我々のグループでは、林紗千子特任助教が主導して、以下の様な本制御に関する研究テーマの展開している。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を明らかとなった。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。加えて、ribosomeタンパク質Rps7はRPS7AとRPS7Bという2つのパラログ遺伝子から供給されるが、これらの発現制御は二者の間で異なる事を我々は明らかにした。現在、これらパラログの発現制御のクロストークに

関しても研究を進めている。

IV ミトコンドリアに局在する ペプチジル tRNA 加水分解酵素の機能解析

Analyses of functions of peptidyl-tRNA hydrolases localized to the mitochondria

井澤俊明・吉久徹
Izawa, T., Yoshihisa, T.

タンパク質の合成過程においては一定の頻度でリボソームの不安定化や異常停滞が引き起こされ、翻訳が途中で終了することがある。この際に産生される合成途上のペプチジル tRNA はペプチジル tRNA 加水分解酵素によってポリペプチド鎖と tRNA に分解され、tRNA はリサイクルされるとともにポリペプチド鎖は分解される。私たちはこれまでに、この機構に関わるサイトゾルのペプチジル tRNA 加水分解酵素である Vms1 を同定し、その機能がミトコンドリアタンパク質の恒常性維持に重要な役割を担うことを示してきた。しかしサイトゾルには Vms1 以外に、もう 1 つのペプチジル tRNA 加水分解酵素である Pth2 が存在する。興味深いことに、Pth2 はミトコンドリア外膜に局在する一回膜貫通タンパク質であることから、ミトコンドリア外膜上で機能すると考えられる。それでは、Pth2 がミトコンドリア外膜に局在することの生理的意義は何だろうか？本研究では Pth2 の機能を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、Pth2 がミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成に必要であること、Pth2 のミトコンドリア膜貫通ドメインがその機能に必須であることを見出した。現在は Pth2 の機能について詳細な解析を行っている。

また、ミトコンドリアは独自のゲノムを有するオルガネラであり、ミトコンドリアマトリクスにはサイトゾルの翻訳系とは異なる専用の翻訳系が存在する。ミトコンドリア翻訳系においても同様に翻訳の途中終了が一定の頻度で生じると考えられ、したがってミトコンドリア内にも複数のペプチジル tRNA 加水分解酵素が存在する。本研究ではミトコンドリアマトリクスのペプチジル tRNA 加水分解酵素である Pth1 の欠失細胞を作成し、ペプチジル tRNA の蓄積の検出を試みた。現時点ではペプチジル tRNA の検出には至っておらず、引き続き検出できる実験系の確立を進める。

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・井澤俊明・横田悦雄
Yoshihisa, T., Izawa, T., Yokota, E.

発表論文 List of Publications

- I-1 Matsui, M., Ikeda, A., Nagai, A., Taniwaki, M., Sasada, N., Irie, M., Hayashi, S., and Yoshihisa, T.: Regulation of tRNA repertoires in the budding yeast : 2023 Taiwan-Japan Bilateral Meeting on RNA and Biofunctions (国際会議) (2023)
- I-2 Hayashi, S., Kayo, H., Nakamura R., Shichino, Y., Iwasaki, S., and Yoshihisa, T.: Intricated connection of the tRNA^{LeuCAA} intron with cytosolic ribosomes and mitochondrial gene expression in budding yeast : 第 25 回日本 RNA 学会年会 (2023)
- II-1 中村龍二郎、加藤瞳、吉久徹、林紗千子：出芽酵母の tRNA^{LeuCAA}イントロン欠失株で生産されるリボソームに関する解析：第 46 回日本分子生物学会年会 (2023)
- III-1 Hayashi, S., Iwamoto, K., and Yoshihisa, T. : A non-canonical Puf3p-binding sequence regulates *CAT5/COQ7* mRNA under both fermentable and respiratory conditions in budding yeast : *PLoS One* **18**, e0295659 (2023)
- III-2 林紗千子、岩元夏純、吉久徹：出芽酵母 *CAT5/COQ7* mRNA は非典型的結合配列により、呼吸と発酵の両方で Puf3p に制御される : 第 46 回日本分子生物学会 (2023)
- IV-1 井澤俊明：リボソーム関連品質管理とオルガネロスタシス：第 3 回関西 RNA クラブ (2024)
- IV-2 井澤俊明：リボソームが立ち往生する時、細胞はどう対処するか? : 県立大学理学部・県立健康科学研究所 合同研究発表会 (2024)

生命科学専攻

博士前期課程

田村 匠： 培地の炭素源に依存してミトコンドリアタンパク質の翻訳状況はどう変化するか?

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 5~6 年度) 挑戦的研究 課題番号 23K18100

研究課題 修飾状態を反映した RNA 可視化法の開発とその tRNA 動態解析への応用
研究代表者 吉久徹

2 AMED 革新的先端研究開発支援事業 プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出 (令和 2~5 年度)

研究課題 新生ポリペプチド鎖の品質管理から理解するオルガネロスタシス
研究代表者 井澤俊明

3 公益財団法人 内藤記念科学振興財団 内藤記念科学奨励金・研究助成 (令和 5~7 年度)

研究課題 小胞体タンパク質品質管理における CAT テイリングの役割の解明
研究代表者 井澤俊明

4 公益財団法人 武田科学振興財団 2023 年度 ライフサイエンス研究助成 (令和 5 年度~7 年度)

研究課題 CAT テイリングと糖鎖修飾機構の協奏による新規タンパク質品質管理機構の解明
研究代表者 井澤俊明