

Molecular Biomachine

分子機械学

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。

また近年、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。まずは、tRNA レパートリーの制御に関し、特に定常期における 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ている。この中で、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^{TrpCCA}についてシステマ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。

一方、tRNA レパートリーの変化は、タンパク質の翻訳を通じてその機能にも影響する可能性がある。実際、酵母の各 tRNA 種の発現量は発酵条件下ではその tRNA をコードする同義遺伝子の数に高い相関を示すが、発酵条件下では minor tRNA の発現が上昇する一方、major tRNA の発現が低下する。こうした tRNA 環境の変化が呼吸条件下で機能の亢進が見られるミトコンドリアタンパク質にどう影響するかについて、ミトコンドリア内膜透過装置 TIM23 複合体を材料に検討した。その結果、特定の保存された残基が呼吸条件下で発現が上昇する minor tRNA 種でデコードされる場合の多い Tim17 タンパク質は、そうした tRNA の数倍の過剰発現で発現量が上昇する、すなわち、tRNA レパートリー依存の発現制御を受けていることを見いだした。

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なく、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.

我々のグループでは、林紗千子特任助教が主導して、以下の様な翻訳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。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が、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 吉久徹：第3章 tRNA、リボソームと rRNA：RNA の科学、pp. 40–53（朝倉書店）（2024）
- I-2 Yoshihisa, T., Sasada, T., Irie, M., Sakasegawa, M., Kurita, D., Nagai, A., Hayashi, S: Alteration of tRNA repertoires upon nutrient starvation- implication of autophagy. : 29th tRNA Conference（国際学会）（2024）
- I-3 田村 匠，永井 陽久，林 紗千子，吉久 徹：炭素源による Tim50 の運命の違いは、翻訳時の tRNA 環境の影響によるものか？：第 47 回日本分子生物学会（2024）
- II-1 Hayashi, S., Nakamura, R., Kato, H., Shichino, Y., Iwasaki, S., Yoshihisa, T.: tRNA intron and protein folding: how so close? : 第 25 回日本 RNA 学会年会（2024）
- II-2 久戸瀬隆，吉久徹，林紗千子：出芽酵母におけるイントロン含有 tRNA^{LeuCAA} と相互作用する因子探索の試み：第 47 回日本分子生物学会（2024）
- II-3 林 紗千子，中村 龍二郎，受田 宗次郎，加藤 瞳，吉久 徹：出芽酵母の Leu^{CAA} イントロン欠失により生じる細胞内ストレスについて：第 47 回日本分子生物学会（2024）
- VI-1 Sato, N., Matsuki, T., Nakano, Y., Matsuo, Y., Yoshihisa, T., Inada, T.: Elucidation of the molecular mechanism for ribosomal protein eS7A ubiquitination that contributes to Unfolded Protein Response.: 第 25 回日本 RNA 学会年会（2024）
- VI-2 佐藤 二千翔，中野 裕，松木 泰子，松尾 芳隆，吉久 徹，稲田 利文：ボソームタンパク質 eS7A のモノユビキチン化は HAC1i mRNA の翻訳制御に必須である：第 47 回日本分子生物学会（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のか？
- 阿相真人： ミトコンドリアのペプチジル tRNA 加水分解酵素の役割に関する研究

科学研究費補助金等

- 1 公益財団法人発酵研究所 2024 年度 一般研究助成（令和 6～7 年度）
 - 研究課題 tRNA レパートリーの変化が翻訳を通じてミトコンドリアタンパク質の機能化に及ぼす影響の解析
 - 研究代表者 吉久徹