

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏 名 茂松 恵
指導教員名 正木 春彦

論文題目

出芽酵母における tRNA 切断と細胞応答の解析

tRNA は、mRNA 上の遺伝暗号を対応するアミノ酸へと変換するアダプター分子である。1955 年に Crick によりその存在が予言され、その翌年に実体が発見されて以来、アダプター分子としての構造や機能の研究が盛んに行われてきた。ところが最近になって、これまでのアダプター分子としての機能とは異なる全く新しい生理現象に関する報告が相次いでなされている。それらの中で特に注目すべきこととして、ヒト培養細胞やシロイヌナズナ、テトラヒメナ、出芽酵母、放線菌など幅広い生物種において、アミノ酸飢餓、酸化、高温など種々のストレスに応答して tRNA の切断が誘導されることが明らかにされた。このことから、tRNA 切断が生物にとって普遍的な現象であることが示唆されている。そこで本研究では、出芽酵母において人工的に tRNA をノックダウンし、これに対する細胞応答を解析した。一方で、キラ酵母と呼ばれる *Kluyveromyces lactis* が生産する zymocin や、*Pichia acaciae* が生産する PaT が、それぞれ出芽酵母の tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln} を切断するトキシンであることが明らかにされた。感受性出芽酵母に対して、zymocin は G1 期で、PaT は S 期で細胞周期を停止させる。これらのトキシンによる tRNA 切断は、感受性菌の増殖阻害を目的として引き起こされるため、ストレスに対する応答としての tRNA 切断とは、生理的意義が本質的に異なると考えられる。そこで、キラ酵

母による tRNA 切断に対する細胞応答についても解析した。

第1章 D-CRD 発現株における細胞応答の解析

酸化水素水による酸化ストレスの誘導や、生育に必要なアミノ酸を欠いた培地を用いるアミノ酸飢餓の再現では、それらのストレスへの応答に埋もれてしまうため、tRNA の切断に対する細胞応答を追跡することは困難であると考えた。そこで本研究では、コリシン D の C 末端側にあるリボヌクレアーゼドメイン (D-CRD) を出芽酵母内で発現させることで、tRNA を人工的にノックダウンし、その細胞応答を解析した。コリシン D は大腸菌群の Col プラスミドにコードされるタンパク質性毒素であり、大腸菌に存在する 4 種類の tRNA^{Arg} (tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}CCG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU) を標的とする。

これまでに、 α 細胞において D-CRD により tRNA をノックダウンし、これにより発現変動する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、接合に関与する遺伝子群が発現上昇することを明らかにした。またこのとき、 α 細胞内では、通常転写が抑制されている a 細胞特異的遺伝子の発現が活性化していることを見出した。そこで、 α 細胞、a 細胞、a/ α 細胞を用いて tRNA をノックダウンした際の α 細胞特異的遺伝子 (*asg*) 及び a 細胞特異的遺伝子 (*asg*) の転写量の変化を調べた。すると、 α 細胞での *asg* の転写活性化は再現されたが、a 細胞では *asg* は転写されず、また a/ α 細胞でも *asg*, *asg* 共に発現は見られなかった。一方、cycloheximide で処理した細胞において接合型特異的遺伝子の転写量の変化を調べたところ、やはり α 細胞での *asg* が活性化した。従って、 α 細胞において *asg* の転写を抑制している Tup1p-Cyc8p complex の形成が、タンパク質合成の低下に伴って阻害されたために、このような現象が起きたと結論づけた。接合型特異的遺伝子の転写抑制は、細胞の恒常性を保つ上で重要であるが、接合型によってその抑制機構が異なるために、タンパク質合成の低下に対して接合型依存的な脆弱性を示すことが分かった。

第2章 tRNA を切断するキラートキシンに対する細胞応答の解析

キラートキシンである zymocin, PaT の tRNA 切断に対する細胞応答を解析するために、zymocin および PaT の tRNA 切断活性を持つサブユニットである γ -subunit, Orf2p をそれぞれ酵母内で発現させ、D-CRD が誘導する tRNA 切断に対する細胞応答と比較した。また、tRNA を切断するにも関わらず、zymocin は G1 期で、PaT は S 期で感受性酵母

の細胞周期を停止させる。そこで、こうした違いが生じる原因についても併せて解明することとした。 γ subunit, Orf2p をコードする遺伝子を *GAL1* プロモーターに繋ぎ、出芽酵母の染色体に組込んで発現誘導を行った。その結果、 γ subunit, Orf2p によりそれぞれ tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln} が切断され、これによる生育阻害が確認された。但し、 γ subunit の発現による生育阻害の程度は、Orf2p と比較して低かった。また FACS を用いた解析で、 γ subunit の発現により宿主の細胞周期が G1 期で、Orf2p の発現により S 期でそれぞれ停止することも観察された。一方で、コントロールとして D-CRD 発現株の細胞周期解析も行ったが、特定のフェーズでの細胞周期停止は観察されなかった。PaT は感受性酵母に対し DNA 損傷を引き起こすことが報告されている。そこで、ヒストン H2A の特異的リン酸化状態を指標として、 γ subunit, Orf2p 発現株における DNA 損傷誘導の有無について検証した。その結果、Orf2p 発現株でのみヒストンのリン酸化が観察された。このことから、zymocin と PaT との間で細胞周期停止のフェーズが異なるのは、PaT が、tRNA 切断活性に加えて DNA 損傷を誘導する活性を持つためであることが示唆された。また、これらの株 (α 細胞) において *asg* の発現量を調べたところ、Orf2p 発現株では D-CRD 発現株の場合と同様に転写量が上昇していたが、 γ subunit 発現株では転写の活性化は見られなかった。このことから、 γ subunit 発現株ではタンパク質合成の低下に対する応答とは異なる細胞応答を示していると考えられた。

第3章 キラートキシン PaT による DNA 損傷誘導機構の解明

第2章で得られた結果から、PaT は tRNA 切断と DNA 損傷の誘導という二つの活性を持つことが示唆された。しかしながら一方で、PaT による tRNA^{Gln} の切断が DNA 損傷を誘導する可能性も否定出来ない。そこで、*in vivo*, *in vitro* において tRNA 切断活性を失った Orf2p の機能を調べることで、これを明らかにすることとした。tRNA 切断活性に関与するアミノ酸として、Orf2p に存在する 4 つの His 残基に注目した。これらを Ala に変異させた変異型 Orf2p を作出し出芽酵母で発現させた結果、Orf2p-H299A は、宿主の生育阻害及び tRNA 切断を起こさなかった。また Orf2p-H299A 発現株では、ヒストン H2A のリン酸化も見られなかった。このことから、H299 が tRNA 切断活性と DNA 切断活性の両方に共通した触媒残基である可能性を考えた。また Orf2p の免疫染色を行った結果、核に局在している様子が見られたことから、Orf2p は細胞質で tRNA を切断するだけでなく、核に移行して DNA と直接作用することが示唆された。次に、精製した

野生型 Orf2p 及び Orf2p-H299A を、*in vitro* で出芽酵母の染色体や λ phage 由来の DNA 断片と反応させ、電気泳動を行った。その結果、野生型 Orf2p は、DNA との結合能を持つことが分かった。一方で、Orf2p-H299A は DNA 結合能を消失していた。また、基質 DNA の修飾が、Orf2p との相互作用に影響することが示唆された。現在、Orf2p が DNA 切断活性を持つ可能性を検討している。

総括

本研究では、D-CRD を用いて tRNA ノックダウンモデル細胞を構築し、細胞質 tRNA の切断に対する細胞応答を解析した。また、tRNA 切断性キラー毒素である zymocin や PaT によって引き起こされる tRNA 切断と、D-CRD による tRNA ノックダウンに対する細胞応答を比較した。D-CRD 及び Orf2p の発現による接合型特異的遺伝子の抑制機構の解除は、tRNA 切断に特異的な現象では無く、タンパク質合成の低下が原因であると考えられた。今後は、D-CRD の発現では特異的な細胞周期停止が起こらず、 γ subunit 発現株では G1 期停止が起こることが、切断される tRNA の量や種類に起因するかを検証していくことで、tRNA と細胞周期制御の関連を明らかにしていきたい。一方 Orf2p は、tRNA 切断活性に加え、DNA と直接相互作用することで、細胞周期の S 期停止を誘導することが分かった。このことから、PaT が tRNA と DNA の両方を標的とする極めて新規性の高い毒素である可能性が示された。

発表論文

Shigematsu, M., Ogawa, T., Kido, A., Kitamoto, HK., Hidaka, M., Masaki, H. (2009)
Cellular and transcriptional responses of yeast to the cleavage of cytosolic tRNAs induced by colicin D. *Yeast*, **26**, 663-73.