

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 茂松 恵

タンパク質合成における tRNA の重要性は明らかであるが、真核生物の tRNA 遺伝子は多コピー性のため、遺伝子変異が生じても表現型に反映されず遺伝学的解析が難しく、単コピー性のミトコンドリア以外に tRNA の異常はほとんど研究されてこなかった。しかし近年、酵母を含む様々な生物において、酸化ストレスや熱ショック、アミノ酸飢餓などのストレス時に tRNA が切断される現象が報告されている。これらは tRNA 切断が生物にとって普遍的な現象であることを示唆するが、その関与するメカニズムは明らかでない。さて、大腸菌では特定の tRNA を切断する“tRNase”活性をもったトキシン、コリシン D や E5 が知られていたが、最近真核生物でも、感受性酵母の細胞周期を G1 期で停止させる *Kluyveromyces lactis* のキラー、ザイモシン、あるいは細胞周期を S 期で停止させる *Pichia acaciae* のキラー PaT が、特定の tRNA を切断する tRNase 活性をもつことが示された。

本研究は、酵素的に細胞内の特定の tRNA を効率よくノックダウンさせる“tRNase”に着目し、コリシン D、ザイモシン、PaT という 3 種のトキシンの tRNase 活性を、真核細胞制御を研究する新しいツールとして開発し、それらに対する出芽酵母の細胞応答とその差異を追求したものである。

第 1 章では、大腸菌コリシン D の tRNase ドメイン D-CRD を、酵母内で誘導的に発現させ tRNA 切断時の転写変動を調べている。とくに α 細胞内で D-CRD を発現させると、ふだん抑えられている a 細胞特異的遺伝子が転写され接合シグナル伝達系が活性化する。これに対し a 細胞や a/ α 細胞では、tRNA 切断によって接合型特異的遺伝子の転写は起こらない。翻訳阻害剤シクロヘキシミドを作用させても α 細胞内で a 細胞特異的遺伝子の転写が活性化したことから、D-CRD の tRNA 切断では、タンパク質合成が低下し α 細胞内で a 細胞特異的遺伝子の転写を抑制する複合体が解離したため、転写が活性化したと推定した。またタンパク質合成の低下は接合型依存的な細胞応答を示すことを明らかにした。

第 2 章では、D-CRD に加えザイモシンや PaT の tRNA 切断性サブユニットをそれぞれ細胞内で誘導発現させ、宿主酵母の細胞応答の違いを比較解析した。ザイモシンのサブユニットを発現させると、特異的な tRNA のみが切断され宿主酵母の G1 期停止が起こるが、このときタンパク質合成は低下せず固体培地上でコロニーを形成する。G1 期停止は感受性酵母が獲得した防御機構であると結論付けた。これに対し、D-CRD は様々な種類の tRNA を切断し、宿主のタンパク質合成を阻害するとともに静菌的な増殖停止を引き起こす。一方、PaT の活性サブユニット Orf2p はタンパク質合成を低下させ S 期停止を起こすが、このとき DNA 損傷も起こることから、Orf2p は DNA に直接作用すると推測し、以下の第 3 章にてこれを検証した。

Orf2p の RNase 活性の触媒残基として His299 を同定し、宿主の生育を阻害しない変異体 Orf2p を取得した。これを発現させると、tRNA 切断がなくなると同時に、DNA 損傷や S 期停止も起こらなかったことから、Orf2p が DNA に直接作用すると考え、細胞内局在を観察してこれが核へ移行することを示した。さらに、精製した野生型及び変異型 Orf2p を用いて、Orf2p が tRNA 切断と同じ触媒残基 His299 を介して DNA を切断する活性を持つことを示唆した。

以上、本研究は起源と標的特異性の異なる 3 種類の tRNase による tRNA 切断に対する、出芽酵母の細胞応答が互いに異なることを明らかにした。とくに 3 者の細胞周期へ及ぼす効果が異なることを示し、またキラー PaT の Orf2p は、tRNA 以外に DNA を切断するタンパク質毒素である可能性を示したことは、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。