

審査の結果の要旨

氏名 大平 高之

本研究は、出芽酵母 tRNA の成熟化過程において、RNA 修飾が序列的に形成されることを明らかにしたものである。特に、tRNA の細胞内輸送が RNA の修飾形成に関わるという概念を発見し、その分子機構を探究したものである。

トランスファーRNA(tRNA)は、遺伝暗号とアミノ酸を対応させるアダプター分子である。tRNA は転写後に様々な修飾が施されて成熟する。これらの修飾は tRNA の立体構造の安定化や、遺伝暗号の解読に重要な役割を担っている。これまで出芽酵母における tRNA の成熟化は核内において完了すると考えられてきたが、多くの RNA 修飾酵素が細胞質に局在していることや、tRNA のスプライシング装置が細胞質にあることから、tRNA の成熟化は細胞内をダイナミックに移動しながら行われる複雑な機構であることが示唆されてきた。しかし、tRNA の修飾が成熟過程のどのタイミングで、細胞内のどこで形成されるのか、また修飾形成に順序があるのかといったことについては、ほとんど解析がなされていなかった。このような背景から、論文提出者である大平高之君は本論文において、tRNA の成熟化と RNA 修飾の関係を明らかにするため、出芽酵母 tRNA の成熟過程における様々な前駆体の RNA 修飾について解析を行った。

本論第一章では、定常状態において微量に存在する tRNA 前駆体の単離精製と解析結果について記述されている。当研究室で開発された往復循環クロマトグラフィー法を駆使することにより、細胞内に存在する様々な tRNA 前駆体を精製することに成功した。次に、各前駆体に含まれる RNA 修飾を、キャピラリー液体クロマトグラフィー質量分析法(RNA マススペクトロメトリー)を用い解析を行った。出芽酵母の定常状態における tRNA 前駆体についての解析例はこの研究が初めてであり、高く評価できる点である。イソロイシン tRNA (tRNA^{Ile}_{UAU}) の一次転写産物およびいくつかの前駆体について解析を行った結果、成熟過程初期の前駆体では RNA 修飾によって修飾率に差があることを示しており、その傾向から RNA 修飾には転写直後に形成されるもの、転写後徐々に形成されるもの、スプライシング後に形成させるものの 3 種類に分類できることを明らかにした。この結果は、tRNA の成熟化過程において RNA 修飾は序列的に形成されていることを示している。また、転写直後に形成される RNA 修飾は、その後のプロセッシング反応を促進し効率的な成熟化に寄与している可能性について洞察している。

通常、tRNA の成熟化は 5'リーダー配列、3'トレーラー配列の除去がなされ、その後、細胞質へ輸送された後に、ミトコンドリアの外膜上でスプライシング反応が生じ、イントロ

ンの除去がなされることが知られている。しかし解析の過程で、提出者は 5'リーダー配列が結合しイントロンが除去された tRNA 前駆体(Spliced pre-tRNA)を発見した。この構造から tRNA 前駆体が、5'リーダー配列が除去される前に細胞質へ輸送される未知の成熟化経路が存在する可能性が示された。実際に 5'リーダー配列の除去に必須な遺伝子(pop4)を発現抑制すると、Spliced pre-tRNA が蓄積することから、Spliced pre-tRNA は最終的に成熟する前駆体であることが判明した。さらに、5'末端の詳細な解析から、Spliced pre-tRNA にはトリメチルグアノシンキャップ(TMGC キャップ)と未知のキャップ構造 (X キャップ) が形成されていることが明らかになった。これまでに RNA ポリメラーゼ III の転写産物にキャップ構造が見つかった例はなく、この結果はこの分野において強いインパクトを与える知見である。これらのキャップ構造が、Spliced pre-tRNA の細胞内輸送および成熟化機構に関与すると考えられる。

第二章では、スプライシング後に形成される RNA 修飾について記述されている。tRNA 前駆体にあるイントロンはアンチコドンの 37 位と 38 位の間に挿入されており、いくつかの修飾酵素の基質認識を妨げることが知られている。本章では、全部で 10 種あるイントロンを持つ tRNA 前駆体における RNA 修飾について調べており、合計 14 種の RNA 修飾が未形成であり、その多くが翻訳精度に関わるアンチコドンおよびその近傍に形成されるものであることを明らかにしている。この結果は、スプライシング後の RNA 修飾の形成が生存上極めて重要なプロセスであることを示している。

第三章では、細胞質でスプライシングされた tRNA がアンチコドン近傍の修飾を受けるために、核移行する必要性について記述されている。ワイプトシン (yW) はフェニルアラニン tRNA (tRNA^{Phe}) の 37 位に存在する嵩高い修飾塩基 (グアノシンの誘導体) であり、5 つの酵素群 (Trm5p, Tyw1p, Tyw2p, Tyw3p, Tyw4p) によって段階的に形成されることが、当研究室の先行研究で明らかになっている。tRNA^{Phe} にはアンチコドンループにイントロンが存在し、yW は細胞質でイントロンがスプライシングされた後に形成されることが知られている。この修飾形成の第一段階はグアノシンの 1 位のメチル化であり、その反応を触媒する Trm5p は核に局在している。したがって、Trm5p によるメチル化修飾はスプライシング後の tRNA^{Phe} 前駆体が一旦核へと輸送される必要がある。実際に、3 つの条件を用いて、核に蓄積させた tRNA^{Phe} 前駆体を解析したところ、37 位には *N*-メチルグアノシンが形成されていることが示された。また、Trm5p に核外移行シグナルを融合し、強制的に細胞質へミスローカライズさせたところ、*N*-メチルグアノシンの量が顕著に減少した。これらの結果は、tRNA の成熟過程において、細胞質から核への逆行性の移行が RNA の修飾形成に必須であることを示している。また、Trm5p と同様に核に局在する RNA 修飾酵素もいくつかあることから、tRNA の成熟化過程で tRNA が細胞質から核への逆行性の移行が一般的な現象なのではないかと論じている。

以上に示されたように、様々な tRNA 前駆体の詳細な解析から、tRNA の成熟化過程において RNA 修飾が序路的に形成されること、tRNA の成熟化過程には 5'末端の修飾や tRNA

前駆体の細胞内輸送が絡んでいるという新規の概念が示された。

以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。