

平成22年 5月 31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780072

研究課題名（和文） tRNA動態に依存した細胞周期制御機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the mechanism of cell cycle regulation depending on tRNA status

研究代表者

小川 哲弘（OGAWA TETSUHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40323480

研究成果の概要（和文）：tRNAの動態に依存した細胞周期停止機構の解明を目的とし、出芽酵母において、リボヌクレアーゼを用いてtRNAを人工的にノックダウンし、解析を行った。当初目的とした分子機構の解明には至らなかったが、切断されたtRNAが、tRNAスプライシング機構を介して修復される可能性などの有意義な情報が得られた。また、ストレスに応答してtRNAを切断するRNaseであるRny1pの細胞周期停止機構を明らかにするために、Rny1pの活性化に応答して発現変動する遺伝子を、DNAマイクロアレイにより解析した。

研究成果の概要（英文）：To examine the mechanism of cell cycle regulation depending on tRNA status, tRNA knock down was carried out with tRNA-specific RNase, colicin D, in *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, Rny1p, which is newly revealed to cleave tRNA resulting in cell cycle arrest during oxidative stress, was expressed in *S. cerevisiae*, and gene expression profile was comprehensively analyzed by DNA micro array.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：微生物・マイクロアレイ・発現制御・tRNA

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖にはタンパク質合成が不可欠である。一方で、タンパク質合成には莫大なエネルギー消費を伴う。こうしたことから、エネルギーの浪費を防ぐために、細胞は外的環境に応じて翻訳を調節し、細胞周期制御を行

っている。タンパク質合成においては、リボソームとtRNAとが「両輪」としての役割をなしており、それぞれが制御を受ける。rRNAに関する制御機構については様々な研究がなされている。一方、tRNAに関する制御機構については、ほとんど手をつけられていない。この理由のひとつとして、tRNA遺伝子

は染色体上に多数点在するため、遺伝子工学的手法による解析が困難であるためと考えた。そこで、申請者は tRNA を特異的に切断するリボヌクレアーゼであるコリシン D を用い、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)において、細胞内の tRNA をノックダウンする方法を検討した。コリシン D の C 末端活性ドメイン (D-CRD: colicin D C-terminal Ribonuclease Domain) を細胞内で発現させたところ、酵母 tRNA^{Arg} の特異的切断が見られ、酵母の生育を生菌的に阻害した。

次に、D-CRD を発現させて細胞内 tRNA をノックダウンし、これに応答して発現変動する遺伝子を、DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。その結果、D-CRD による tRNA 切断に応答して、非常に限定された遺伝子群の発現変動が見られ、特に *STE2*, *AFR1* 遺伝子等、 α 細胞内では本来発現が抑制されるべき a 細胞特異的遺伝子 (*asg*: a-cell specific gene) の発現上昇が見られた。一方、同様の実験を a 細胞内で行っても α 細胞特異的遺伝子 (*asg*: α -cell specific gene) の発現上昇は見られなかった。 α 細胞内での *asg* の発現は、転写仲介因子 (コリプレッサー) である Ssn6p および Tup1p 複合体により抑制されている。Ssn6p-Tup1p 複合体はグローバルなコリプレッサーであり、出芽酵母では、グルコース飢餓や種々のストレス等、幅広い生命現象に応答して標的遺伝子にリクルートされ、基本転写因子の機能を「仲介」することで発現抑制に関与している。以上から、細胞内 tRNA 量の減少に応答し、Ssn6-Tup1 が *asg* 抑制複合体から解離した可能性が高いと判断した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞質 tRNA を人工的にノックダウンし、これに伴う細胞周期制御の分子機構を、出芽酵母をモデルとして網羅的に解明することである。「1. 研究開始当初の背景」で述べた通り、本研究の前段階として、tRNA の切断が転写仲介因子 (コリプレッサー) である Ssn6p および Tup1p の挙動に影響を与えることが示唆されていた。そこで、本研究では、この情報を足がかりに更に詳細な解析を行うこととした。そこで、細胞質 tRNA 量に依存した細胞周期制御のメカニズムを(1)翻訳制御 (2)細胞周期制御 の二つの段階に分け、特に Ssn6p-Tup1p の挙動を足がかりに、分子レベルで網羅的に解析することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *asg* の発現抑制解除の分子機構の解明

tRNA 切断による *asg* の発現抑制解除の分

子機構を、Ssn6p-Tup1p の動態を足がかりに検討することを試みた。これまでの成果から、この抑制解除は、Ssn6p-Tup1p が *asg* 抑制複合体から解離したことが原因であると考えられた。そこで、免疫共沈降法により、tRNA を切断した時と切断しない時とで、Ssn6p-Tup1p 複合体と *asg* 抑制複合体との間の相互作用に変化が見られるかを比較解析することを目指し、以下の実験を計画した。まず、C 末端に Myc タグを付加した Ssn6p を発現する低コピープラスミドを構築し、*SSN6* 遺伝子破壊酵母細胞に導入する。得られた形質転換株において D-CRD の発現誘導により細胞内 tRNA を切断させた後、タンパク質を抽出する。抗 Myc 抗体を用いて Ssn6p を免疫沈降させる。得られた沈殿を泳動し、*asg* 抑制複合体を構成する因子 (MATa2) に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行う。Ssn6p-Tup1p が解離していれば、MATa2 が共沈しなくなると考えられる。

(2) tRNA 依存的生育停止に関与する遺伝子の同定

tRNA 依存的細胞周期停止を抑制する遺伝子を、マルチコピー抑制法により同定することで、細胞周期停止に係わる遺伝子を推定した。pAUR101(TaKaRa)に D-CRD 発現カセットを挿入し、出芽酵母に導入することで、ゲノムに D-CRD 発現カセットをインテグレートさせた。また、D-CRD のインヒビターである ImmD を、*GAL1* プロモーター下で発現誘導するプラスミドも導入した。作製した D-CRD 発現株に対して、高コピー YEp13 ベクターをベースにした出芽酵母ゲノムライブラリーを導入すると共に、D-CRD を発現する培地プレートに塗布した。D-CRD による生育阻害が抑制された結果、コロニーを形成した株をスクリーニングした。得られた株よりライブラリープラスミドを調製し、挿入された配列を決定し、更にその抑制機構を解析した。

(3) Rny1p のストレス応答性 tRNA 切断の意義の解明

本研究の進行中に、出芽酵母において、ストレスに応答して tRNA を切断する原因因子が RNase T2 ファミリーに属する Rny1p であり、これにより細胞周期停止を誘導することが明らかにされた。そこで、この分子機構の解明を目的とし、Rny1p 過剰発現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スクリーニングし、解析を行った。*GAL1* プロモーター下で野生型および活性中心変異型 Rny1p を発現するプラスミドを作製した。これらプラスミドを導入し

た出芽酵母において *Rny1p* を発現させ、1 時間が経過した段階で 0.4 mM H_2O_2 を添加した。その後、1, 3, 11 時間の段階 (*Rny1p* 発現後からは、2, 4, 12 時間後に相当する) で集菌し、RNA を調製した。得られた RNA を、出芽酵母 8X15K アレイ (Agilent) に供した。*RNY1* 遺伝子を挿入していないベクターをコントロールとし、二色法により、*Rny1p* 発現後、0, 2, 4, 12 時間経過時に発現変動した遺伝子を解析した。

4. 研究成果

当初、tRNA の切断による *Ssn6p-Tup1p* の動態変化に注目し、実験を進めることを計画していたが、*Ssn6p-Tup1p* の動態変化が明確に観察出来なかった。そこで、tRNA 切断による細胞周期停止を抑制する遺伝子をスクリーニングし、これに基づいて解析を進めることを中心に実験した。本来の目的達成には至らなかったが、D-CRD により切断された tRNA が、tRNA スプライシング機構により再度連結されることが示唆された。スプライシング機構は、決まった部位のみを連結するのではなく、柔軟な基質認識を行っている可能性が考えられた。更には、酵母の tRNA スプライシングが、スプライシング後の tRNA 断片の連結以外の機能にも関与することが示唆された。また、本研究の後半であらたに注目した *Rny1p* の分子機構について、アレイ解析を通して、細胞周期制御に関わる有用な情報が得られた。

(1) *asg* の発現抑制解除の分子機構の解明

α 細胞において、tRNA の切断による α 細胞特異的遺伝子群 (*asg*) の発現抑制解除の分子機構解明を目的とし、tRNA 切断の有無で、*Ssn6p-Tup1p* 複合体と *asg* 抑制複合体との間の相互作用に変化が見られるかを免疫共沈降法により解析することを試みた。しかし、C 末端に Myc タグを付加した *Ssn6p* では効率よく免疫沈降出来なかった。現在、タグのデザインを変更して再度実験を試みているが、*Ssn6p-Tup1p* 複合体と *asg* 抑制複合体との相互作用に変化が見られるような結果はまだ得られていない。また、DNA 損傷におけるチェックポイント因子である *Mec3p* の遺伝子を破壊すると、tRNA 切断による細胞周期停止が若干抑制されることが分かった。酵母キラー因子である *zymocin* は、tRNA^{Glu} を特異的に切断するが、DNA 損傷のチェックポイント関連遺伝子の破壊株では、同様に生育阻害が低下することが報告されている。DNA 損傷に応答して *Ssn6p-Tup1p* がリクルートされることが分かっていることから、tRNA 切断が、DNA 修復機構を介して *Ssn6p-Tup1p* の動態変化を誘導し、*asg* の発

現抑制解除を行っている可能性が考えられる。

(2) tRNA 依存的生育停止に関与する遺伝子の同定

tRNA 依存的細胞周期停止を抑制する遺伝子を、マルチコピー抑制法によりスクリーニングした。その結果、tRNA^{Arg} 遺伝子、*TPT1*、*GAL4*、*SANI* が、D-CRD 発現による生育阻害を抑制することが分かった。D-CRD が出芽酵母の tRNA^{Arg} を切断することから、tRNA^{Arg} 遺伝子が得られたことは、細胞内のターゲット tRNA を増やすことで、生育阻害を回避していると考えられた。*GAL4* については、この遺伝子が高コピーで導入されることで、発現誘導を行っていない *ImmD*

(D-CRD のインヒビター活性を持つ) 遺伝子発現が活性化されることが分かり、このために D-CRD の活性が阻害されることが原因であった。*Tpt1p* は、イントロンを持つ tRNA がスプライシングされ、ライゲーションされた後、2'位に残されたリン酸基の除去を触媒する。D-CRD の切断部位は、tRNA のスプライシング部位の 3'側に一塩基だけずれているが、切断後の末端形状は同一である。このことから、D-CRD により切断された tRNA が再度ライゲーションにより修復された結果、生育が回復する可能性が考えられた。そこで、スプライシング後の tRNA 断片を連結するリガーゼである *Trl1p* の遺伝子を *TPT1* 遺伝子と同時に高コピーで導入したところ、*TPT1* 遺伝子のみを高発現させた場合に比べ、更に抑制度が上昇した。現在、切断された tRNA が実際に連結されているかを調べている。*San1p* は RING 型ユビキチンリガーゼであり、核内移行シグナルを持つ。近年、この *San1p* が核内の異常タンパク質の分解を行うことで、タンパク質の品質管理に関与することが報告された。*San1p* の核移行シグナルの欠失およびユビキチンリガーゼの触媒残基への変異導入により、生育阻害の抑制効果は消失した。したがって、D-CRD による生育阻害の抑制には、*San1p* の核移行、およびユビキチンリガーゼ活性が必要であることが分かった。このことから、tRNA 切断により、核内に異常タンパク質が蓄積した結果、細胞周期が停止するが、これに対して *San1p* を高発現させることで、細胞周期停止が解除される可能性を期待した。しかし、*San1p* の高発現により、D-CRD が不安定化することが分かった。D-CRD が *San1p* により直接ユビキチン化された結果、D-CRD の分解が起こったと考えている。しかし、いずれにしても、これらは全て tRNA 切断自体を避ける現象であり、目的としていた生育停止機構の解明には至らなかった。

(3) Rny1p のストレス応答性 tRNA 切断の意義の解明

本研究の進行中に、出芽酵母において、ストレスに応答して tRNA を切断する原因因子が、RNase T2 ファミリーに属する Rny1p であり、これにより細胞周期停止を誘導することが明らかにされた。この論文によると、通常、Rny1p は液胞に局在しているが、H₂O₂ 等のストレスに曝露されることで細胞質に分泌され、tRNA の切断、細胞周期停止、更には細胞死を誘導することが示された。この現象は、ストレスに応答して自身の tRNA を切断し、細胞周期制御を行う、まさに tRNA 動態に依存した細胞周期制御の一例ではないかと考えた。RNase T2 ファミリーに属する RNase は、生物に普遍的に存在し、かつ重要な生理的役割を担っていると考えられているが、機構についてはその大部分が不明である。そこで、Rny1p による細胞周期制御の分子機構の解明を目的とし、ストレス条件下での Rny1p の発現に応答して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。野生型および活性中心変異型 Rny1p を発現させ、一時間後に H₂O₂ を作用させることで、発現変動する遺伝子を調べた。発表された論文では、変異型 Rny1p も野生型 Rny1p と同様に細胞周期を停止させることから、細胞周期停止には RNase 活性は必要でないことが主張されたが、今回のアレイの結果から判断すると、変異型 Rny1p に応答した遺伝子変動は、野生型 Rny1p のものに比べて少なかった。このことから、Rny1p による細胞周期停止には、やはり RNase 活性が必要ではないかと考えている。野生型 Rny1p の発現を誘導し、H₂O₂ を作用させることで、リボソームタンパクなど、リボソームの構成に必要な因子の発現が一過的に低下し、その後、再度活性化されていた。また、トランスポーターに関与する遺伝子の発現が上昇していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) 茂松恵、小川哲弘、木戸淳裕、北本宏子、日高真誠、正木春彦、Cellular and transcriptional responses of yeast to the cleavage of cytosolic tRNAs induced by colicin D. *Yeast*, **26**, 2009, 663-673. (査読有)
- (2) 宮本哲也、関根正恵、小川哲弘、日高真誠、本間 浩、正木春彦、Detection of D-amino acids in purified proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, **38**, 2009, 1377-1385. (査読有)

(3) 正木春彦、小川哲弘、矢嶋俊介、多彩なバクテリオシン：mRNA や tRNA をまねるコリシンの構造と機能、蛋白質 核酸 酵素、**54**, 2009, 593-600. (査読無)

(4) 小川哲弘、日高真誠、河野憲二、正木春彦、Colicin E5 ribonuclease domain cleaves *Saccharomyces cerevisiae* tRNAs leading to impairment of the cell growth. *Journal of Biochemistry*, **145**, 2009, 461-466. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 小川哲弘、中西孝太郎、伊藤考太郎、高橋一敏、日高真誠、正木春彦、コリシン D の基質 tRNA における選択性の決定機構、日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京大学駒場キャンパス (東京))、2010 年 3 月 29 日
- (2) 大本哲也、茂松恵、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、酸化ストレスに応答した tRNA 切断の分子機構の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京大学駒場キャンパス (東京))、2010 年 3 月 28 日
- (3) 茂松恵、大本哲也、小川哲弘、北本宏子、日高真誠、正木春彦、CELLULAR AND TRANSCRIPTIONAL RESPONSES TO TRNA CLEAVAGE INDUCED BY TRNA-TARGETING RIBONUCLEASE, COLICIN D., Cold Spring Harbor Laboratory Meeting YEAST CELL BIOLOGY (Cold Spring Harbor Laboratory (NY, USA)), 2009 年 8 月 13 日
- (4) 茂松恵、大本哲也、小川哲弘、北本宏子、日高真誠、正木春彦、tRNA の切断が接合シグナル伝達系を活性化させる、酵母遺伝学フォーラム (つくばノバホール (茨城))、2009 年 7 月 30 日
- (5) 大本哲也、茂松恵、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、tRNA 損傷による生育阻害を抑制するユビキチンリガーゼ San1p、日本農芸化学会 2009 年度大会 (マリンメッセ福岡 (福岡))、2009 年 3 月 29 日
- (6) 茂松恵、大本哲也、小川哲弘、北本宏子、日高真誠、正木春彦、tRNA 切断と DNA 損傷修復機構との関連性の検討、日本農芸化学会 2009 年度大会 (マリンメッセ福岡 (福岡))、2009 年 3 月 29 日
- (7) 大本哲也、茂松恵、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、ユビキチンリガーゼが tRNA

ノックダウンによる細胞周期停止を抑制する、酵母遺伝学フォーラム（北海道大学・学術交流館（北海道））、2008年9月11日

(8) 茂松恵、大本哲也、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、tRNAノックダウンに対するDNA損傷応答の関与、酵母遺伝学フォーラム（北海道大学・学術交流館（北海道））、2008年9月10日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 哲弘 (OGAWA TETSUHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40323480

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：