

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0113

研究課題名(和文)核膜孔を介したRNA輸送のボトムアップ型再構成に向けての基盤整備

研究課題名(英文)Fundamental analysis for the bottom-up type reconstitute of RNA transport across the nuclear pore complex

研究代表者

吉久 徹 (Yoshihisa, Tohru)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60212312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：核膜孔のもつRNAに対する選択的輸送能の試験管内解析系の基盤作りのため、核膜孔を構成するnucleoporin (Nup) によるヒドロゲル形成と、このヒドロゲルに対するRNAの浸潤特性の解析を計画した。まずは、複数のNup、tRNA輸送関連因子群の組換え体等を調製し、Nupによるヒドロゲル形成を試みたが、適切なゲルブロック、ゲルシートの形成条件確立できなかった。Nupヒドロゲル様の人工ヒドロゲル創成を目指し、benzyl基を含むpolyacrylamide誘導体の合成を試みたが、ヒドロゲル形成条件を確立できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はRNAの核膜孔透過機構を解析する系の確立を目指したが、残念なことに十分な成果を得るには至らなかった。核膜孔構成タンパク質を用いたヒドロゲル、さらには、人工的構造からなるヒドロゲルを用いて、生体内と同様のRNAに対する透過障壁あるいは選択的輸送場を解析する実験系が確立すれば、今までその化学的な特徴が不明であったRNAの核-細胞質間輸送機構に多くの光を当てることが出来る。研究期間終了時点では、当初の目的を達することが出来なかったが、現在、問題点を分析して研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：To establish the in vitro system to analyze transport of RNAs through nuclear pore, we tried to construct nuclear porin (Nup) hydrogels and to set up the RNA diffusion/transport assay with the hydrogel. We prepared various recombinant proteins, such as various Nup, transport carriers, etc. However, we could not establish appropriate conditions to prepare Nup hydrogel blocks or gel sheets, which are essential for the assay. We also tried to synthesize artificial Nup-like hydrogels by introducing the benzyl group into polyacrylamide gels, but we could not find appropriate conditions for preparing such artificial hydrogels with an acrylamide derivative partly because of high hydrophobicity of an acrylamide derivative with a benzyl group.

研究分野：分子生物学・細胞生物学

キーワード：核膜孔複合体 核-細胞質間輸送 RNA ヒドロゲル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核膜孔複合体 (NPC) は、分子量が 60~125 MDa におよぶ巨大なタンパク質複合体で、クライオ電子顕微鏡観察やサブユニットの結晶構造解析等から、その詳しい構造が明らかになりつつある[1-3]。NPC は比較的剛直な構造を持つ部分と、天然変性状態にある領域とから成るハイブリッドなタンパク質集積体である。NPC は、様々な物質を双方向的に輸送でき、40~60 kDa 以下の分子なら自由拡散で、より大きな分子はシグナル依存の能動輸送で運ぶ[4,5]。最近の報告では、NPC が、自由拡散と能動輸送を異なった部分で担っている可能性も示唆されている[9]。NPC の物質輸送を担う領域は、Phe-Gly (FG) リピートを含む nucleoporin (Nup) が天然変性状態で詰まっているとされ、この領域が特定の分子量閾値を持つ透過障壁としても、能動輸送の場としても重要な役割を持つ[6-8]。NPC における能動輸送は、importin β /Ran システムで駆動される。輸送担体である importin β が「積荷」と結合するかどうかは低分子 GTP 結合タンパク質 Ran に依存し、核に豊富にある Ran-GTP に出会うと積荷を離す場合は核内輸送、Ran-GTP と積荷との 3 量体が安定な場合は核外輸送が駆動される[4]。そして、核内の Ran GEF (RCC1/Prp20) と細胞質側の Ran GAP (Rna1)、そして、GDP 型 Ran の核内輸送因子 Ntf2 によって形成される Ran-GTP の核膜を介した濃度勾配が、輸送のエネルギー源となる[4]。

さて、この Nup タンパク質の天然変性部分は、それだけで透過障壁の形成に関わる興味深い特性を持つ [7-9]。すなわち、Nup の FG リピート部分は適切な条件下でヒドロゲルとなり、NPC 同様、特定の分子量範囲で透過特性が変わる透過障壁を形成する[7,8]。さらに、タンパク質の選択的かつ能動的な輸送にも、ヒドロゲル中の FG リピートと importin β 等の輸送担体との相互作用が重要だと考えられている。Görllich らのシナリオでは、1) importin β は FG リピートへの親和性を利用し、Nup のゲル化に関わる FG リピート間相互作用を一過的に破壊して Nup ヒドロゲルに浸潤するが、2) これにつれて importin β に結合した積荷もヒドロゲルに浸潤し、3) Importin β 分子の通過後に FG リピート間の再結合が起こる、とされている[7]。

こうした作業仮説は、主にタンパク質を積荷とした核内輸送の解析から明らかとなってきたが、タンパク質と並んで核-細胞質間輸送の重要な基質群である RNA については、*in vitro* での解析が遅れている。特に、前述の Nup ヒドロゲルが、タンパク質とは物性の異なる RNA に対しても同様の透過障壁として機能するか、輸送担体依存のゲルへの浸潤が RNA でもタンパク質と同様な機構で起こるのか、さらには RNA で幾つか報告されている非 importin β 型輸送担体は Nup ヒドロゲルをどう透過するのか、等については研究がなされていない[10,11]。さらに、今までのゲルブロックを利用した浸潤アッセイでは、物質輸送の方向性を加味した *in vitro* の解析が行えない。

申請者は、出芽酵母における tRNA の細胞質でのスプライシング[12,13]、成熟体 tRNA の核内への再輸送[14]等を発見し、tRNA の成熟化と細胞内動態の分野で成果を挙げてきた。さらに、昨年、出芽酵母では tRNA の核内輸送担体が Hsp70 の一種 Ssa2 であることを報告した[11]。こうした中で、tRNA の核-細胞質間の双方向輸送の理解には、NPC を介した tRNA 輸送の分子機構を解析するための輸送方向性を再現できる *in vitro* 系の構築が必要だと感じていた。そこで、本計画では、次項に示す具体的な研究目的の達成を通じ、巨大でユニークな特性を持ったタンパク質集積体である NPC の機能を担う化学的な特性の一端を明らかにすると共に、tRNA の一生における細胞内動態の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

申請者は、機能的な核膜孔を再構築する第一段階として、RNA の能動的核-細胞質間輸送をできるだけシンプルな成分で再構成することを目的に設定した。そのために、天然変性状態で特異なヒドロゲルを形成する Nup タンパク質に着目した以下の 4 つの目標をたて、研究を計画した。まず基盤整備として Nup 関連ヒドロゲルの作成と、低分子である tRNA を積荷とした輸送系の再構成を目指した。本研究では、当研究室で長年扱っているモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Nup および核-細胞質間輸送関連因子を用いた再構成系の構築を目指した。

【目標 1】構造特性の異なった RNA 種に対して透過障壁として働く Nup ヒドロゲルが作成できるか検討し、タンパク質輸送における Nup ヒドロゲルの透過障壁としての特性と比較する。

【目標 2】輸送担体依存の核外・核内双方向の輸送が明らかとなっている tRNA を取り上げ、tRNA の Nup ゲルへの浸潤が、核外輸送を担う importin β 型輸送担体 Los1 や Msn5、核内輸送を担う非 importin β 型輸送担体 Ssa2 によって促進される系の構築を目指す。

【目標 3】核膜孔で見られる、方向性を持ち、濃度勾配に逆らって基質を運べる tRNA の核-細胞質間輸送を、Nup ヒドロゲル「膜」を組み込んだチャンバーを構築することで再構成する。

【目標 4】NPC 様の透過障壁能をもったヒドロゲルが、ペプチドを含まないより単純な人工ポリマーで再現できるかを検討し、NPC 様の透過障壁能の人工構築を通じて、透過障壁能が発揮されるための化学的特性をより詳細に明らかにする。

これらに加えて、透過障壁実験を行う際には、酵母サイトゾルにおける tRNA の濃度を知る必要がある。このため、新規に開発した tRNA 絶対量測定法を用い、サイトゾルにおける tRNA 濃度の推定も計画した。

実際の研究展開では、研究成果に詳しく述べるように良好な Nup ヒドロゲルブロックの調製にかなりの困難が生じた上、acrylamide と疎水基を含んだ acrylamide 誘導体のコポリマーに

よるヒドロゲル形成が進まないことが発覚し、透過障壁アッセイを実施することが出来なかった。

3. 研究の方法

3-1. 組換えタンパク質の調製

3-1-1. 組換え Nup の精製

酵母 Nup のうち、FxFG リピートに富む Nsp1、GLFG リピートに富む Nup49、Nup115、Nup100 を取り上げ、ほぼ全長に渡って FG リピートが含まれる Nup49 以外は、それぞれ FG リピートドメイン (Nsp1 の 1-601 残基部分、Nup100 の 1-640 残基部分、Nup116 の 165-715 残基部分) をコードする遺伝子領域のみを、His₆ タグベクター pET-21d を改変した His タグ融合タンパク質発現ベクター pTYE582 にクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) 株に導入した。

Nsp1(1-601) は可溶性であったので、非変性状態で Ni-NAT agarose により精製した。不純物を除くため、Ni-NTA agarose 溶出画分を終濃度 5% w/v TCA で処理してタンパク質を変性・沈殿させ、HiTrap-SP HP 陽イオン交換カラムを装着した AKTA Prime による変性状態での精製を行った。すなわち Ni-NTA agarose による精製画分を 20 mM HEPES-NaOH、pH 7.5、1 mM EDTA、6 M urea で平衡化した HiTrap-SP HP に吸着後、0~500 mM NaCl 勾配により溶出、対応した画分を回収した。これに対し、Nup49、Nup100(1-640) および Nup116(165-715) は封入体として発現したため、大腸菌細胞抽出液から封入体を改修した後、6 M 尿素で可溶化し、尿素による変性条件下で Ni-NTA agarose により精製した。

3-1-2. 核-細胞質間輸送関連タンパク質の組換えタンパク質の精製

Los1 (酵母 exportin-t) : *LOS1* 遺伝子の 5'末端側に His₆ タグをコードする配列を融合した遺伝子が *GAL7* promoter から転写される酵母多コピープラスミド pTYSC213 を液胞プロテアーゼ欠損酵母株 TYSC188 に導入して、galactose の添加で過剰発現を誘導後、zymolyase 処理でスフェロプラスチ化し、ガラスビーズで細胞を破碎、His₆-Los1 を可溶性画分として回収した。Ni-NTA agarose で His₆-Los1 をアフィニティー精製した。

Kap95 (酵母 importin β) : *KAP95* 遺伝子全長を His₆ タグベクター pET21a に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) に導入、Kap95-His₆ を可溶性タンパク質として発現させ、Ni-NTA agarose にてアフィニティー精製した。

Srp1 (酵母 importin α) : *SRP1* 遺伝子全長を glutathione-S-transferase 融合タンパク質発現プラスミド pGEX-4T-2 に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) に導入、GST-Srp1 を可溶性タンパク質として発現させ、glutathione-Sepharose を用いてアフィニティー精製した。還元型 glutathione で溶出したサンプルは、Amicon Ultra を利用して濃縮した。

野生型および変異型 Gsp1 (酵母 Ran) : *GSP1* 遺伝子全長を、maltose-binding protein (MBP) 融合タンパク質発現プラスミド pMAL-c2 のクローニングサイト改変プラスミド pTYE169 に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) に導入、MBP-Gsp1 を可溶性タンパク質として発現させ、amylose resin にてアフィニティー精製した。同様にして、Gsp1 のヌクレオチド非結合型 Gsp1-T26N、GTPase 欠損型 Gsp1-Q71L を MBP 融合タンパク質として発現、精製した。MBP 部分と Gsp1 部分の連結部には Factor Xa サイトがあるため、必要に応じて Factor Xa 処理する事で、Gsp1 部分を MBP 部分から切り離し、Factor Xa は p-aminobenzamidin agarose で除去した。

3-1-3. 輸送基質の精製および調製

蛍光標識 tRNA : tRNA は、3'末端のジオール基を利用して Alexa488-hydrazide により蛍光標識した。市販 tRNA を尿素 PAGE で精製して夾雑 RNA を除き、過ヨウ素酸ナトリウムでジオール基をジアルデヒドに酸化後、Alexa488-hydrazide と反応させた。ethanol 沈殿およびスピンカラムで未反応物などを除いたものを Alexa488 標識 tRNA とした。

蛍光タンパク質 : 比較対象とする蛍光タンパク質基質として、分子量が NPC の自由拡散閾値である 60 kDa 以上で、かつ、Srp1/importin α に認識される MBP-GFP-NLS、Srp1/importin α に認識されない MBP-GFP、および、自由拡散マーカーである His₆-mRFP をそれぞれ、融合タンパク質として発現、amylose resin あるいは Ni-NTA agarose でアフィニティー精製した。

3-2. 人工ヒドロゲル形成のための acrylamide 誘導体の合成

3-2-1. benzyl acrylamide の合成

benzyl acrylamide は、benzylamine と acryloyl chloride の縮合反応で合成した。先の反応物および triethylamine を 5 mmol ずつを氷冷した 1,2-dichloroethane 中で混和し、一晚反応させた。副生成物である triethylamine 塩酸塩を水による 2 相分配で除いた後、有機相を蒸発乾燥、少量の 1,2-dichloroethane に溶解した。n-hexane で平衡化したシリカゲルカラムに吸着させ、n-hexane : ethyl acetate = 1 : 3 を溶出溶媒として目的物を精製、エバポレーターで溶媒を蒸発させ、最終標品を得た。構造は CCl₃D 中の NMR 測定で確認した。

3-2-2. benzyl acrylamide を含む polyacrylamide 重合条件検討

benzyl acrylamide は水には不溶であったため、水/ethanol、あるいは、水/acetonitrile の混合溶媒中での重合を検討した。水 : ethanol = 1 : 3 あるいは水 : acetonitrile = 1 : 3 で 0.70 M

acrylamide、0.20 M benzyl acrylamide 溶液を調製し、過硫酸アンモニウムと tetramethyl ethylenediamine を添加して、重合を開始した。

3-3. 浸潤アッセイに必要な *in vivo*におけるサイトゾルの tRNA 濃度の推定

我々は、tRNA の 3'末端に近い部分の配列多様性を利用し、個々の tRNA 種毎の絶対量を定量出来る手法 (Oligonucleotide-directed Three prime Terminal Extension of RNA : OTTER) を開発した。この手法では、tRNA の 3'-末端と相補対を形成し、かつ、その 5'側に 5 塩基の 1 本鎖部分を形成する oligo DNA probe を用い、tRNA を RNA primer、oligo DNA の 5'-突出末端を鋳型として Klenow enzyme による tRNA の伸長反応を行った。この際、鋳型 1 本鎖部分には 1 カ所のアデノシン以外全てチミジンの oligo DNA probe を用い、dATP と tetramethylrhodamine-dUTP (TMR-dUTP) の存在下で伸長反応を行うことで、各 tRNA 種特異的に 1 分子の TMR を取り込ませた。反応後に urea-PAGE で展開、蛍光スキャナーでシグナルを読むことで、蛍光強度から tRNA の絶対量を測定した。なお、tRNA の修飾や高次構造の安定性の違いによって tRNA と probe との相補対形成効率は変化する。そこで、反応産物を Northern blotting で解析することで伸張効率を求め、真の tRNA 量を計算する際の補正に用いた。

4. 研究成果

4-1. 組換えタンパク質を用いた Nup ヒドロゲルの再構成

本研究では、NPC のコアを形成すると想定されている FG リピートに富んだ Nup によるヒドロゲル状態を再構成し、これまで解析されていなかった RNA を輸送基質として単一種の Nup が形成するゲルブロックへの浸潤アッセイ法の確立を試みた。出芽酵母の Nup として Nsp1、Nup49、Nup100、Nup116 の FG リピート領域を大腸菌より組換えタンパク質として精製することに加え、各種の核-細胞質間輸送関連因子群 (Srp1、Kap95 といったタンパク質の核内輸送用 importin タンパク質、tRNA の核外輸送用 exportin である Los1、酵母 Ran GTPase ホモログである Gsp1 の野生型、GTP 型、ヌクレオチド非結合型) および、各種浸潤アッセイ用基質 (RNA 基質として蛍光標識ヒドラジドを用いて 3'-末端を特異的に蛍光標識した tRNA や、タンパク質基質であり Srp1・Kap95 に結合して核内に輸送される MBP-GFP-NLS 等) についても、調製が滞りなく進行した。

しかし、精製した Nup を高濃度のタンパク質溶液として調製する事に困難が生じた。文献[7,8]では、200 mg/ml の Nup 溶液を 2 M guanidine-HCl、0.1% TFA に溶解することが可能であるとの記述に従って溶液の調製を試みたが、我々の調製した Nup 標品ではこれだけの濃度で溶解しようとするに既にゲル状態になってしまい、蛍光標識 RNA の浸潤アッセイに必要な形に成形したゲルブロックを形成させることが出来なかった。上記 4 者の Nup のうち、Nsp1(1-601)および Nup49 については、タンパク質の溶解に関して、guanidine-HCl 濃度、TFA 濃度、溶解温度などを様々に検討したが、ゲル化条件をコントロールする形でのゲル形成には至らなかった。特に、Nsp1(1-601)に関しては、Ni-NTA agarose 精製後の不純物が問題となっている可能性を排除するため、非変性でアフィニティー精製した Nsp1(1-601)を 6 M 尿素存在下で陽イオン交換樹脂により精製するなどの工夫を加えたが、精製標品の溶解性を向上するには至らなかった。研究期間が終了しているが、この点に関しては現在も検討を加えており、是非、良好な Nup ヒドロゲルブロックの形成を成功させたい。

4-2. 芳香環を含む acrylamide 誘導体の合成と、人工ヒドロゲル形成の試み

上記、Nup ヒドロゲル形成と並行して、タンパク質に含まれるアミノ酸残基をユニットとしないより単純なヒドロゲルの生成を、polyacrylamide に FSFG tetrapeptide を組み込んで Nup 様ヒドロゲルを合成した[15]の手法を参考に、芳香環 (今回は benzyl 基) を含む acrylamide 誘導体を合成し、acrylamide との共重合体を生成、これによる人工ヒドロゲルの構築を試みた。まずは、共重合モノマーとしての benzyl acrylamide の合成を行った。benzyl acrylamide は、等モル量の benzylamine と acryloyl chloride を 1,2-dichloroethane 中、同じく当モル量の塩基 (triethylamine) 存在下で反応させた。反応はほぼ定量的に進むと期待したが、副生成物である triethylamine・HCl を除いた後の標品の TLC 分析で副反応物の存在が確認されたので、シリカゲルカラムで精製した。n-hexane で平衡化したシリカゲルに吸着した産物は、n-hexane : ethyl acetate = 1 : 3 を溶媒として溶出させた。最終標品の構造を H-NMR で確認したところ、ベンゼン環、アミド、オレフィンに特徴的なケミカルシフトを持つピークが、各々の H 数にほぼ相当するシグナル積算強度で検出されたため、目的物である benzyl acrylamide が得られたことが確認された。

得られた benzyl acrylamide と acrylamide を用いた共重合反応を試みたが、まず、benzyl acrylamide の水への溶解度が低かったため、水中での共重合反応は行えなかった。そこで、ethanol と水あるいは acetonitrile と水の混合溶媒中 (何れも混合比は 3:1 が benzyl acrylamide の溶解には必要) での共重合反応を試みた。定法に従って過硫酸アンモニウムと TEMED の添加で重合反応を開始したが、水中での acrylamide 単独での重合と異なり、ゲル形成は起こらなかった。実際、同溶媒中で acrylamide と *N,N*-methylene-bis-acrylamide との共重合を行わせると一部の重合体が相分離を起こした状態で回収されたことから、この条件では反応体積全体

にわたるゲル化は起きないことが判った。他方、acrylamide と benzyl acrylamide との共重合反応液を水に拡散させると液は乳濁し、顕微鏡観察で共重合体と思われる液滴の形成が確認された。おそらく、benzyl 基を含むことで疎水性の高まった acrylamide 共重合体が液液相分離を起こしたものと思われた。他方、benzyl acrylamide 中の不純物の影響か、こうした液滴は広い波長に渡る自家蛍光を発した。このため、蛍光標識基質を用いた蛍光顕微鏡下でのアッセイには現状では用い難いことが明らかとなった。

以上のことから、現在は芳香環を持ちながらより親水性の高い acrylamide 誘導体をの合成を進めている。まずは当初の目的とはそぐわないが、Nup の FG リピートの最もコアな配列である L-phenylalanyl-glycine ユニットあるいは単独の L-phenylalanine を N-succinimidyl acrylate と反応させて N-acryloyl-L-phenylalanyl-glycine あるいは N-acryloyl-L-phenylalanine を合成し、acrylamide との共重合ポリマーがヒドロゲルを形成するか検討している。

4-3. 輸送基質である tRNA のサイトゾルにおける濃度の推定

本計画では、*in vitro* での Nup ヒドロゲルあるいは人工ヒドロゲルへの浸潤アッセイの RNA 基質として tRNA を中心として解析を進める計画を立てたが、出芽酵母のサイトゾルでは 42 種類の tRNA がタンパク質の翻訳に働いている。細胞あたりのタンパク質の分子数に関しては、近年の proteomics 解析の展開に伴い、様々な推定値が示されている。アッセイの際の輸送関連タンパク質因子群の濃度については、これらのデータを参考にすることが可能である。他方、基質である tRNA に関しては、microarray や RNA-Seq によって細胞内外の環境変化に対応した各種 tRNA の相対濃度変化は解析されているもの、これらの手法の原理上、tRNA の絶対量に関する情報は限られている。そこで、我々は、tRNA の 3'末端に近い部分の配列多様性を利用して、個々の tRNA 種毎に絶対量を定量出来る手法 – OTTER 法 – を開発し、これを用いていくつかの生理的条件下での培養した出芽酵母の tRNA の絶対量を測定した。この中で、我々は 1) 標準的な出芽酵母の富栄養発酵培地である YPD (炭素源はグルコース) で対数増殖期まで生育させた酵母における tRNA 量は、0.030~0.73 pmol/μg RNA と見積もられ、最も少ない tRNA-Leu^{GAG} と tRNA-Asp^{GUC} で 24 倍の違いがあった。こうした値と過去に報告されている酵母 1 細胞あたりの RNA 量、細胞あたりのサイトゾル体積などを元に [16-18]、tRNA の濃度を推定すると、それぞれの tRNA 種では 0.6~13 μM、tRNA 全体では約 160 μM となり、予想通り、かなりたか高い濃度で存在することが明らかとなった。

次に異なる生理条件下での tRNA 量を比較したところ、対数増殖期の酵母と定常期の酵母では、平均して定常期の方が約 2.7 倍の tRNA を含むこと、また、増え方も tRNA 種間で 1.6 倍 (tRNA-Arg^{CCG}) ~3.8 倍 (tRNA-Gly^{CCC}) の開きがあることが判った。他方、発酵培地 (YPD) と呼吸培地 (YPGly: 炭素源はグリセロール) で tRNA レパートリーには変化があり、YPD に比べて tRNA-Asp^{GUC} は約 42%に減少するのに対して、tRNA-Trp^{CCA} は 183%に増加していた。こうしたことから、*in vitro* の実験でもおよそ μM オーダーから 100 μM オーダーの tRNA が存在する際の挙動を解析すべきであると考えられる。

文献

- [1] Beck *et al.* (2007) *Nature* **449**:611
- [2] Szymborska *et al.* (2013) *Science* **341**:655
- [3] Lin *et al.* (2016) *Science* **352**:aaf1015
- [4] Cook *et al.* (2007) *Annu Rev Biochem* **76**:647
- [5] Timney *et al.* (2016) *J Cell Biol* **215**:57
- [6] Patel *et al.* (2007) *Cell* **129**:83
- [7] Frey & Görlich [2007] *Cell* **130**:512
- [8] Labokha *et al.* (2013) *EMBO J* **32**:204
- [9] Ma *et al.* (2012) *PNAS* **109**:7326
- [10] Stewart (2010) *Trends Biochem Sci* **35**:609
- [11] Takano *et al.* (2015) *eLife* **4**:e04659
- [12] Yoshihisa *et al.* (2003) *Mol Biol Cell* **14**:3266
- [13] Yoshihisa *et al.* (2007) *Genes Cells* **12**:285
- [14] Takano *et al.* (2005) *Science* **309**:140.
- [15] Bird & Baker (2011) *Biomacromol* **12**:3119.
- [16] Boehlk & Friesen JD (1975) *J Bacteriol* **121**: 429.
- [17] Jorgensen *et al.* (2002) *Science* **297**: 395.
- [18] Yamaguchi *et al.* (2011) *J Electron Microscop* **60**: 321.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hayashi Sachiko, Mori Shunsuke, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Yoshihisa Tohru	4. 巻 47
2. 論文標題 Impact of intron removal from tRNA genes on <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5936-5949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1093/nar/gkz270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshihisa Tohru	4. 巻 30
2. 論文標題 Maturation of tRNAs and their dynamics between the nucleus and the cytoplasm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 37 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.5685/plmorphol.30.37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Herrmann Johannes M., Carvalho Pedro, Hayer-Hartl Manajit, Yoshihisa Tohru	4. 巻 25
2. 論文標題 Life of proteins: from nascent chain to degradation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 996 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1038/s41594-018-0150-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ryuji Yanase, Yukinori Nishigami, Masatoshi Ichikawa, Tohru Yoshihisa, Seiji Sonobe	4. 巻 1
2. 論文標題 The neck deformation of <i>Lacrymaria olor</i> depending upon cell states	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Protistology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.18980/jop.e001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanai Akio, Yoshihisa Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Current Advances in the Research of RNA Regulatory Enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3389/fgene.2019.00973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Akihisa Nagai, Kohei Mori, Yuma Shiomi, and Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Measurement and alteration of tRNA repertoires in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (Shiga, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihisa Nagai, Kohei Mori, Yuma Shiomi, and Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 OTTER, a new method for measuring absolute quantity of tRNAs.
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of the RNA Society (Berkeley, USA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihisa Nagai, Kohei Mori, Yuma Shiomi, and Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 How to measure absolute quantity of tRNAs.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井陽久、塩見由麻、森滉平、池田彩乃、佐藤友衣子、河野龍之進、荒井麻里、粕谷日向子、吉久徹
2. 発表標題 出芽酵母におけるtRNAレパートリーの解析と改変
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihisa Nagai, Kouhei Mori, Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Absolute quantification of tRNA isodecoders in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sachiko Hayashi, Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Impact of intron removal from tRNA genes in <i>S. cerevisiae</i>
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉久徹
2. 発表標題 核を巡るtRNAのダイナミクス
3. 学会等名 日本植物学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井陽久、塩見由麻、森滉平、佐藤友衣子、河野龍之進、林紗千子、吉久徹
2. 発表標題 プロテオーム形成を影から支えるtRNAレパートリーを解析する
3. 学会等名 植物RNA研究ネットワークシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Analysis of dynamics of tRNAs in yeast, where and how much.
3. 学会等名 理研シンポジウム「Recent Progress in tRNA Biology and Translation」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sachiko Hayashi, Yuichi Shichino, Shintaro Iwasaki, and Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Intron removal from tRNA ^{LeuCAA} genes in <i>S. cerevisiae</i>
3. 学会等名 The 24th RNA Meeting (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihisa Nagai, Kouhei Mori, Yuma Shiomi, and Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 How to measure absolute quantity of tRNAs.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質学会・第71回日本細胞生物学会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 紗千子、七野 悠一、池田 彩乃、松井 将也、鈴木 健夫、鈴木 勉、岩崎 信太郎、吉久 徹
2. 発表標題 出芽酵母におけるシステムティックな遺伝子改変をベースにしたtRNA機能の解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 陽久、塩見 由麻、森 滉平、吉久 徹
2. 発表標題 出芽酵母におけるtRNA発現解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩元 夏純、林 紗千子、吉久 徹
2. 発表標題 モノソーム集積型mRNAの翻訳制御機構とミトコンドリアターゲティングに関する解析
3. 学会等名 第42会日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Hayashi, Yuichi Shichino, Shintaro Iwasaki, and Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Ic-tRNA leads ribosome biogenesis and mitochondrial functions
3. 学会等名 第42会日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Akio Kanai and Tohru Yoshihisa (editors)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Frontiers Media SA	5. 総ページ数 131
3. 書名 Current Advances in the research of RNA regulatory enzymes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	林 紗千子 (Hayashi Sachiko) (40791869)	兵庫県立大学・生命理学研究科・特任助教 (24506)	