

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07289

研究課題名(和文) 真核生物におけるtRNA組成の可塑性を導くtRNA遺伝子の個別制御の検討

研究課題名(英文) Regulation of individual tRNA genes, which enables the flexible tRNA repertoire in eukaryotic cells.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：複数の同義遺伝子にコードされるtRNAにおいて、個々の遺伝子がどう制御されるかに興味を持たれている。本研究では、まず、各種のtRNA量を正確に測定する系を開発し、異なる生理条件下の酵母におけるtRNAの発現状態を計測した。次に、遺伝子座固有の前駆体tRNA定量法を構築、同義遺伝子間で発現調節が異なる例を明らかにした。さらに、tRNA-Trpの網羅的な遺伝子欠失株シリーズを構築し、個々の遺伝子座がこのtRNAの発現にほぼ同等に寄与し、かつ、遺伝子数の減少を補正するような発現調節は起こらないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は今まで知られていなかった個別tRNA遺伝子の発現制御を解析するための研究基盤の構築を行った。学術的には、生理条件に応じた個別のtRNA遺伝子の発現制御が酵母の様な単純な生物でも見られたことから、広く生物間で保存された新規なtRNAの転写機構の発見につながると期待される。他方本研究では、今まで正確な測定が難しかったtRNAの新規絶対定量法を確立した。tRNA組成の変化は様々な疾患でも見られることから、医療面等での応用につながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, transcriptional regulation of tRNA, mostly encoded by multiple synonymous genes, has been gathering researchers' interest. In this study, we devised a new method to quantify absolute amount of tRNA, and analyzed tRNA repertoires of yeast cells under various physiological conditions. Next, we measured expression of individual genes encoding the same tRNA via analyzing gene-specific pre-tRNA amounts, and found that some of the synonymous tRNA genes are regulated individually. Finally, we constructed a complete set of deletion strains with various gene numbers of tRNA-Trp. This set enabled us to show that each of the genes contributes almost equally to production of tRNA-Trp, and that no compensatory regulation occurs to increase expression of tRNA-Trp per gene when the gene number of tRNA-Trp is reduced.

研究分野：分子生物学・細胞生物学

キーワード：tRNA遺伝子 同義遺伝子 tRNAレパートリー 転写制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成の制御は、主に、そのタンパク質をコードする mRNA の転写制御・安定性制御と、翻訳開始の制御で成り立っている。これに加えて、mRNA の翻訳は読み枠に登場するコドンの選択でも影響を受ける。同じアミノ酸に対する異なったコドンの利用頻度には、生物種特有の片寄り=コドンバイアスがある。他方、コドンバイアスに従った mRNA の翻訳効率を高める形で、コドンを読み取る tRNA の組成も片寄っている。特定のコドンに対応したアンチコドンを持つ tRNA=isoacceptor tRNA の多寡は、タンパク質の翻訳量を支配する要因なのである。今まで、tRNA レパートリーは生物種毎に一定だと考えられてきた。しかし、近年のトランスクリプトーム解析から、同一生物種でも、環境や組織、発生段階で tRNA レパートリーが変化することが明らかとなってきた[1-3]。即ち、特定の環境、組織におけるプロテオーム形成において、tRNA レパートリーの改変も翻訳制御の一端を担う可能性が示唆されているのである。

tRNA は、短い RNA 専用の RNA polymerase III (Pol III) で転写され、その制御には Maf1 という抑制因子が関わる。Maf1 は出芽酵母からほ乳類まで保存されており、TOR シグナル伝達の制御下にある[4]。しかし、TOR/Maf1 系は Pol III 全体の活性を制御し、個々の isoacceptor tRNA に対応した tRNA 遺伝子の転写制御を担うとは考えられない。多くの tRNA はゲノム上の多数の同義遺伝子から供給されるが、同じ isoacceptor tRNA に対する同義遺伝子でも、遺伝子座によって転写状態が異なる例が見つかってきた[5]。我々も、出芽酵母ゲノム上に 6 座位存在し、配列が全く同一の tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子の多重欠失株解析を通じ、同義遺伝子間に機能差のあることを明らかにした[6]。しかし、このことは、tRNA 遺伝子のプロモーターが tRNA のコード領域内にあり、tRNA 遺伝子の周辺領域がヌクレオソームフリーであること、即ち、同義 tRNA 遺伝子間でプロモーター近傍の DNA 配列やクロマチン状態にあまり差が無いことと一見矛盾する。今まで同義 tRNA 遺伝子が個別に制御されること自身が想定されておらず、tRNA 遺伝子座毎の機能・転写の違いといった「個性」がどう実現されているかは、解析されてこなかった。

2. 研究の目的

今まで真核生物では、RNA polymerase II で転写される mRNA 遺伝子等に関しては、転写制御の研究が盛んに行われてきた。事実、タンパク質をコードする個別遺伝子の転写制御に関わる転写因子や cis 配列の種類は、真核生物の体制の複雑化に伴って顕著に増加する。他方、多数の同義遺伝子からの並行した転写によってそのプールが形成される tRNA に関しては、コドンバイアスに応じた isoacceptor tRNA の組成は、各 tRNA をコードする同義遺伝子の数で決まると漠然と考えられていた。近年、Pol III のサブユニットの ChIP 解析や、同義遺伝子の系統的欠失解析から、遺伝子座毎に機能性に違いがある例が明らかとなってきた [1,2,6]。しかし、同義 tRNA 遺伝子の転写の個性がどのような機構で成り立っているのか、さらには、内的外的条件に応じて isoacceptor tRNA の組成を変化させる際、その制御はどのような機構の下で行われるのかは、非コード RNA のトランスクリプトーム形成機構の理解における未踏の新大陸と言っても良い。こうした研究が難しかったもう一つの理由は、前述のように tRNA が多数の同義遺伝子から供給されるため、ゲノム上の多数の遺伝子座を同時に操作しないと、*in vivo* での解析系が構築できないことである。相同組換えでかなり自由に染色体が編集できる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてさえ、tRNA 遺伝子自身の分子遺伝学的研究は労力の必要な研究として敬遠されてきた。

そこで本計画では、同義 tRNA 遺伝子の個別の転写制御という新概念の検証を目指した。具体的には出芽酵母を用いて、tRNA-Leu_{CAA} 等の多数の同義遺伝子より転写される tRNA を対象にした個別遺伝子の転写状況のモニタ系を構築し、isoacceptor tRNA の必要量維持に対する個々の遺伝子座の関与を明らかにする実験系の確立を目指した。その上で、培養環境で tRNA の組成が変化する条件を見つけ出し、そうした isoacceptor tRNA の必要量の変化に伴って個別の遺伝子座での転写が制御されるのかを検討した。他方、6 つの同義遺伝子から転写される tRNA-Trp_{CCA} を材料に、網羅的な同義遺伝子欠失シリーズを構築、tRNA の最低限の必要量と、各遺伝子座の tRNA 発現量に対する寄与を持つ持った。加えて、tRNA の絶対定量法を新規に開発し、こうした解析において必要となる各生育環境における正確な「tRNA レパートリー」を計測、個々の tRNA 遺伝子の発現制御の総体の解析を行った。

我々のグループは、tRNA 遺伝子に見られるイントロンの生理的役割を解析するため、特定の isoacceptor tRNA に対するゲノム上の全ての同義遺伝子を逐次的にイントロン欠失型に変えるというプロジェクトを進めてきた。実際、出芽酵母においてイントロンを持った前駆体として転写される全 10 種類の isoacceptor tRNA について、各々全ての同義遺伝子のイントロンを欠失した酵母株セットの構築を進めるなど、多数の同義遺伝子をシステムティックに扱うノウハウを持っている[6, 7]。こうした経験を強みに、tRNA 遺伝子の個別転写制御という、今まで想定されていなかった概念の検証を目指した。

3. 研究の方法

3.1 tRNA の絶対定量法

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 isoacceptor 毎に tRNA 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 isoacceptor tRNA 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。

3-2 tRNA の転写状況の解析

各 tRNA 遺伝子の転写状態を個別に見積もる系を検討した。mRNA の網羅的転写解析では、一般に当該遺伝子座の RNA polymerase II の占有状態で転写の強さを見積もるが、そもそも Pol III の占有率が高い tRNA 遺伝子の場合、これを補う手法が必要となる。酵母では一つの isoacceptor に属す tRNA の配列はほぼ単一である。しかし、イントロンを含む tRNA 遺伝子の中には、同義遺伝子座間でイントロン配列の異なるものがある。例えば、tRNA-Leu_{CAA} をコードする全 10 個の同義遺伝子のうち、*tL(CCA)A*、*tL(CCA)D*、*tL(CCA)G1*、*tL(CCA)L* の 4 遺伝子のイントロン配列はそれぞれがユニークなので、スプライシング前の前駆体 tRNA の qRT-PCR によって個別の tRNA 遺伝子の発現状態を予想出来ると考えられる。なお、多くの tRNA は逆転写を阻害する修飾箇所を含むため、primer ligation によって tRNA 全長の配列を逆転写するのではなく、イントロン部分を含む領域のみを逆転写する遺伝子特異的 primer セットで逆転写を行い、限られた RNA 群内での目的 tRNA の転写量推定を行った。

これと並行して、各 tRNA-Leu_{CAA} 遺伝子座の Pol III の占有状態は、Pol III の活性中心サブユニット Rpl60 に FLAG タグを導入した株を用いた ChIP-qPCR により検討した。

3-3 tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子欠失シリーズの構築

当研究室では出芽酵母のゲノム上に 6 つある tRNA-Trp_{CCA} 同義遺伝子 (*tW(CCA)G1*、*tW(CCA)G2*、*tW(CCA)J*、*tW(CCA)K*、*tW(CCA)M*、*tW(CCA)P*) 全てをそれぞれ別のマーカー遺伝子との置換で破壊し、その致死性をプラスミド上の野生型遺伝子 (*tW(CCA)K*) で相補した株を構築している [6]。この株と野生株の間のヘテロ二倍体を構築し、この二倍体株を用いたランダム孢子解析によって、全ての組み合わせである計 64 通りをカバーする網羅的な同義遺伝子欠失変異シリーズを構築した。この際、一倍体の選択には劣性薬剤耐性マーカー (野生型遺伝子とヘテロになると薬剤耐性が失われ、一倍体でのみその表現型である薬剤耐性が現れる) として canavanine 耐性を示す *can1Δ* と thialysine 耐性を示す *lyp1Δ* を利用し、両者に同時に耐性となることを一倍体の指標とした。得られた一倍体株は、*tW(CCA)K* 遺伝子と *URA3* マーカー遺伝子を持つ多コピープラスミドを有しているので、この株を *ura3* 変異株のみ生育可能となる 5'-fluoroorotic acid (5'-FOA) を含む培地で選択することで、どの組み合わせの tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子が残っている時に酵母が生育可能かを判断した。

3-4 tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子の残数が 2 である全ての株での tRNA 発現量比較

tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子の残数が 2 である組み合わせは ${}^6C_2 = 15$ 種類存在する。これら及び野生型の酵母株から全 RNA を調製し、Northern blotting によって tRNA-Trp_{CCA} 量を定量した。この際、遺伝的に影響を受けないはずの異なる tRNA (tRNA-Leu_{CAA}) の量を内部標準として用いた。

4. 研究成果

4-1 培地炭素源の変化に伴う tRNA レパートリーの変化-新規 tRNA 定量法 OTTER を用いた解析

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 isoacceptor 毎に tRNA の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 isoacceptor tRNA の絶対量を比較・検討した。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。また、各 isoacceptor tRNA においてその同義遺伝子が tRNA 現存量に対して全て同等に寄与すると仮定した場合、1 遺伝子あたりの発現寄与は最低で 0.016 pmol/μg RNA/gene (tRNA-Cys_{GCA})、最高で 0.080 pmol/μg RNA/gene (tRNA-Thr_{CGU}) と 5 倍の違いがあることが判った。

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 isoacceptor tRNA 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。ここで取り上げた 2 つの tRNA は何れも、1 種の isoacceptor で 1 つのアミノ酸の

コドン全てをまかなうものである (Trp に関しては元々コドンが 1 種のみ)。面白いことに、同じアミノ酸の異なる isoacceptor tRNA 間でも違いがあり、tRNA-Leu の場合、全体では YPD 中で 0.82 pmol/μg RNA から YPGly では 0.69 pmol/μg RNA へと 16%減少するのに対して、4 つある isoacceptor のうちのマイナーコドンに対応する tRNA-Leu_{GAG}のみ 0.030 pmol/μg RNA から 0.059 pmol/μg RNA へと約 2 倍の増加を見せている。このように、酵母の tRNA は、生理的な条件下でも、isoacceptor レベルで数倍の幅で現存量の調節が行われ、とりわけ、tRNA-Leu などでは同じアミノ酸に対するコドン読み取りやすさが制御されている可能性が明らかとなった。

以上のように、isoacceptor レベルでは、tRNA の発現制御は生理的培養条件下では数倍程度であり、おそらく個別遺伝子における発現制御もこれを大きく逸脱しない変化幅での制御が主であると予想される。従って、以下の解析において、検出すべき転写に関わる測定値の変化幅がこの程度であることを考慮して解析を進める必要があると結論づけた。

4-2 各 tRNA 遺伝子の発現状態の検討

本研究では、10 個の同義遺伝子にコードされる tRNA-Leu_{CAA} の遺伝子 (*tL(CAA)A*, *tL(CAA)C*, *tL(CAA)D*, *tL(CAA)G1*, *tL(CAA)G2*, *tL(CAA)G3*, *tL(CAA)K*, *tL(CAA)L*, *tL(CAA)M*, *tL(CAA)N*) に着目して、各々の転写状態の比較を行った。なお、我々が用いた出芽酵母親株 (BY418) の系統は、そもそも *tL(CAA)C* 遺伝子を含む染色体領域に欠失を持つ株であり、*tL(CAA)C* 以外の遺伝子座のみについて検討を加えた。これら 9 遺伝子座のイントロン配列を比較すると、*tL(CAA)A*, *tL(CAA)D*, *tL(CAA)G1*, *tL(CAA)L* の 4 遺伝子座のイントロン配列はその他の遺伝子座のものに加え、この 4 者間相互にも異なる SNP を含んでいる。これを利用して上記 4 者のイントロンを含んだ前駆体 tRNA 特異的に増幅できると予想される PCR primer をデザインした。また、上記遺伝子座以外の 6 遺伝子座由来の前駆体 tRNA を増幅できる PCR primer もデザインした。なお、上記 4 者の遺伝子座の単独欠失株をコントロールとした検討から、*tL(CAA)G1* に対するプライマーは他の前駆体 tRNA-Leu_{CAA} との交叉相補対形成が無視できなかつたため、解析対象から除外した。*tL(CAA)A*, *tL(CAA)D*, *tL(CAA)L* の 3 者に対する primer set を用いた半定量 PCR によって、培地中の炭素源変化に伴う tRNA の転写状態変化を検討した。面白いことに、炭素源を発酵を促すグルコースから呼吸での生育が必要となるグリセロールに変更すると tRNA-Leu_{CAA} の現存量は 0.39 pmol/μg RNA から 0.28 pmol/μg RNA へと約 30%減少する。これと呼応するように、*tL(CAA)A*, *tL(CAA)D*, *tL(CAA)L* 以外の tRNA-Leu_{CAA} 遺伝子座から発現する前駆体 tRNA 量はおよそ 50%減少した。ところが、上記 3 者の前駆体 tRNA の量はそれぞれ約 72%、約 88%、約 78%とより大きく減少しており、特定の遺伝子座の転写状態が他の遺伝子座のそれより環境要因に対してより敏感に応答することが示された。なお、発酵培地中での RNA Pol III の活性サブユニット Rpc160 の各 tRNA-Leu_{CAA} 遺伝子座の占有状態を ChIP-qPCR で比較したところ、*tL(CAA)G2* 遺伝子座と *tL(CAA)M* 遺伝子座の占有率が他に比べて多少高いものの、その他の遺伝子座における Rpc160 の占有状態に大きな違いは見られなかつた。

tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子欠失シリーズの構築

出芽酵母のゲノム上に 6 つある tRNA-Trp_{CCA} 同義遺伝子 (*tW(CCA)G1*, *tW(CCA)G2*, *tW(CCA)J*, *tW(CCA)K*, *tW(CCA)M*, *tW(CCA)P*) 全てをそれぞれ別々のマーカー遺伝子との置換で破壊し、その致死性をプラスミド上の野生型遺伝子 (*tW(CCA)K*) で相補した株を利用したランダム胞子解析で、全ての組み合わせである計 64 通りをカバーする同義遺伝子数減少変異シリーズを構築した。「3. 研究の方法」で示した様に、得られた一倍体株は、染色体上の tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子の欠失による生育悪化の可能性を、*URA3* マーカーを持つ多コピープラスミドに載せた *tW(CCA)K* 遺伝子で相補しているため、染色体上の全 tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子が欠失した株もほぼ問題無く生育した。これらを野生型 *tW(CCA)K* 遺伝子の載ったプラスミドが欠失して *ura3* となった株を特異的に選択できる 5'-FOA 培地に展開して、生育が可能か検討したところ、株の残存遺伝子数が 2 以上の場合、野生株に近い生育を示した。もちろん、以前報告したとおり 6 同義遺伝子すべてを欠失した株は生育できなかったが[6]、残りが 1 遺伝子である株 (5 重欠失株) は全て非常に生育が悪かった。しかし、その生育には遺伝子座毎に違いがあり、*tW(CCA)G1* あるいは *tW(CCA)G1* のみを持つ株の生育が最も良く、ついで *tW(CCA)K* あるいは *tW(CCA)P* のみを持つ株はある程度のコロニーが形成できたが、*tW(CCA)J* あるいは *tW(CCA)M* のみを持つ株は、以前の四分子分析による報告通り[6]極めて生育が悪かった。

相対的には生育の良い *tW(CCA)G1* あるいは *tW(CCA)G2* のみを持つ株を含めてこれらの全ての株の生育状態は詳細な解析に用いるのは難しかったため、染色体上の残存 tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子が 2 である計 15 種類の 4 重欠失株に着目した。これらを全て比較することで、生育や tRNA 産生に対する個別の同義遺伝子の寄与に関する情報が得られると期待して解析を進めた。富栄養発酵液体培地 (YPD) 中での対数増殖期におけるこれら 15 株の分裂時間を生育曲線より計算したところ 124~137 min で、かなり野生株 (125 min) に近い生育速度を示した。また、特定の 1 遺伝子座が残存している 5 種の 4 重欠失株の分裂時間の平均を比較しても 129 ± 4 min ~ 135 ± 3 min で、特定の遺伝子座の残存で他より有意に分裂時間の平均値が変化するような結果は得られ無かつた。

これら 15 種の 4 重欠失株中の tRNA-Trp_{CCA} の野生株に対する相対量を Northern blotting で比較したところ、 $0.29 \pm 0.04 \sim 0.39 \pm 0.11$ の範囲にあり、その平均は 0.36 ± 0.03 であった。また、特定の 1 遺伝子座が残存している 5 種の 4 重欠失株の平均も、 $0.33 \pm 0.04 \sim 0.37 \pm 0.06$ と大きな際は認められなかった。これらの値はほぼ遺伝子数が野生型の 6 遺伝子から 2 遺伝子に減った比率 (0.33) に対応しており、tRNA-Trp_{CCA} に関しては各同義遺伝子の tRNA 量に対する寄与はほぼ同じだと判断された。

こうしたことを総合すると、残存遺伝子数が 1 の場合の生育の差は、各遺伝子座から供給される tRNA-Trp_{CCA} の量に依存するものではない可能性が高い。tRNA-Trp_{CCA} の遺伝子は、イントロンを含んでいるが、6 つの同義遺伝子間では、イントロンとおよび最終的に tRNA 分子に組み込まれる部分の配列は全く同じであり、転写領域内にプロモーターを持つ tRNA 遺伝子の特徴を考えると、6 者間で発現に違いが無いことと対応するものと思われる。また、tRNA-Trp_{CAA} については、生育に大きな影響がない 4 重欠失変異までは、遺伝子数相応の tRNA が発現しており、野生型レベルまで不足分を補おうとする発現補正のような現象は起きないことも判った。しかし、これが更に生育に影響を及ぼすほど低下したときに、残りの遺伝子において転写の亢進が起きる可能性は別途解析する必要がある。また、野生株の 1/3 まで tRNA-Trp_{CCA} が減ってお増殖が盛んな状態を維持できる (= 必要な翻訳レベルを維持できる) ことは驚きであり、何故、最低限必要量の 3 倍もの tRNA を供給できる遺伝子数が維持できるのかには興味を持たれる。

では、前述の 5 重欠失変異の生育の違いは何によるのだろうか? tRNA 量の違いでないとするれば、tRNA-Trp_{CCA} の遺伝子とその座位から失われたことによって (あるいは、遺伝子組換えを確認する選択マーカー遺伝子に置き換わったことによって)、周囲のクロマチン環境、ひいては近傍の遺伝子の発現に影響した結果の積算である可能性がある。しかし 6 つの tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子の直近には必須遺伝子はなく、1 kb 以上離れるか、別の転写ユニットを挟まないと必須遺伝子が現れないことから、具体的にクロマチン構造にがどう変化し、どの近隣遺伝子の発現に影響されたかについて今後解析を進める必要がある。ただし、先に述べたように 5 重欠失変異の生育は非常に悪いので、これらを用いた解析は必ずしも現実的でないのが難点である。

文献)

- [1] Pavon-Eternod *et al.* (2013) *RNA* **19**:461. [2] Gingold *et al.* (2014) *Cell* **158**:1281. [3] van Bortle *et al.* (2015) *RNA* **21**:1807. [4] Moir & Willis (2013) *Biochim Biophys Acta* **1829**:361. [5] Moqtaderi & Struhl (2004) *Mol Cell Biol* **24**:4118. [6] Mori *et al.* (2011) *RNA* **17**:1760. [7] Hayashi *et al.* (2019) *Nucleic Acids Res* **47**:5936.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Arima Kengo, Tamaaki Daisuke, Mineyuki Yoshinobu, Yasuhara Hiroki, Nakai Tomonori, Shimmen Teruo, Yoshihisa Tohru, Sonobe Seiji | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Displacement of the mitotic apparatuses by centrifugation reveals cortical actin organization during cytokinesis in cultured tobacco BY-2 cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Plant Research | 6. 最初と最後の頁 803～815 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s10265-018-1047-4 | 査読の有無 有 |
| 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 - |
| 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27件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6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 Sachiko Hayashi and Tohru Yoshihisa |
| 2. 発表標題 Intron removal from tRNA genes 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 Sachiko Hayashi and Tohru Yoshihisa |
| 2. 発表標題 Intron removal from tRNA genes in <i>S. cerevisiae</i> . |
| 3. 学会等名 The 27th tRNA Conference (Strasbourg, France) (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 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トランスクリプトーム解析 |
| 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 林紗千子、岩元夏純、吉久徹 |
| 2. 発表標題 モノソーム偏在mRNAとして同定された核コードミトコンドリアmRNAの翻訳制御に関する解析 |
| 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 吉見理子、山本智加、吉久徹 |
| 2. 発表標題 酵母HAC1 mRNAの安定化に関するtRNA ligase、Rlg1の遺伝的解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 林紗千子、七野悠一、岩崎信太郎、吉久徹 |
| 2. 発表標題 tRNA-LeuCAA遺伝子からのイントロン削除が与える影響について |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018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トランスクリプトーム解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 永井陽久、森滉平、吉久徹 |
| 2. 発表標題 出芽酵母における各 isodecoder tRNAの絶対定量 |
| 3. 学会等名 日本RNA学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 林紗千子、吉久徹 |
| 2. 発表標題 出芽酵母を用いたtRNAイントロンの持つ生理的意義の解明 |
| 3. 学会等名 日本RNA学会 |
| 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 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 Yuiko Sato, Tohru Yoshihisa |
| 2. 発表標題 Do No-Go Decay (NGD) factors compete with minor tRNAs to occupy the ribosomal A-site in translation? |
| 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 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 Akihisa Nagai, Ryunoshin Kohno, Sachiko Hayashi, Tohru Yoshihisa |
| 2. 発表標題 Analysis and manipulation of the tRNA repertoire affecting protein synthesis in yeast cells |
| 3. 学会等名 International Symposium on Protein Quality Control (国際学会) |
| 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) |
| 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 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42会日本分子生物学会 |
| 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) | |