

博士論文

出芽酵母における tRNA 切断と細胞応答の解析

茂松 恵

目次

緒論	1
第1章 D-CRD 発現株における細胞応答の解析	14
1-1. 序	14
1-2. 材料と方法	16
1-3. 結果と考察	24
1-3-1. D-CRD による出芽酵母 tRNA のノックダウン	24
1-3-2. tRNA ノックダウン誘導後の tRNA の観察	28
1-3-3. 接合型依存的な細胞応答の比較	30
図表	38
第2章 tRNA を切断するキラートキシンに対する細胞応答の解析	52
2-1. 序	52
2-2. 材料と方法	55
2-3. 結果と考察	59
2-3-1. 出芽酵母の実験室株に対するキラートキシンの作用	59
2-3-2. tRNA 切断性サブユニット発現株の細胞応答の比較	61
図表	70
第3章 キラートキシン PaT による DNA 損傷誘導機構の解明	80
3-1. 序	80
3-2. 材料と方法	81
3-3. 結果と考察	85

3-3-1. 変異体 Orf2 を用いた <i>in vivo</i> での解析	85
3-3-2. <i>in vitro</i> での Orf2p の生化学的解析	87
図表	94
総論	102
実験材料についての補足	107
参考文献	113
論文要旨 (平成 22 年度博士論文要旨集より)	126
謝辞	130

緒論

tRNA 研究の背景

2003 年から今日まで、僅か 10 年足らずの間に、細胞内の tRNA 動態に関する様々な論文が相次いで発表された。2003 年、名古屋大学の吉久らのグループは、出芽酵母において tRNA のスプライシング酵素がミトコンドリア表層に局在していることを明らかにした[1]。動物細胞とのアナロジーから、出芽酵母においても tRNA の成熟化が核で起こるであろうと考えられていたため、この発見は意外であった。その数年後、吉久らとオハイオ州立大学の Hopper らのグループは、出芽酵母や動物細胞において、tRNA が細胞質から核へと再移行することを、それぞれ報告した[2-4]。これは、核内で転写された後、細胞質でその一生を終えると考えられていた tRNA 動態の常識を大きく覆す報告であった。この tRNA の核内輸送は複数の輸送担体を介して能動的に行われている[2, 3]。塩基修飾の欠損で不安定化した tRNA は核内に存在するヌクレアーゼ複合体 exosome で分解されることや[5]、CCA 付加酵素の変異株で 3' 末端の短縮化が進んだ tRNA が核内に蓄積することなどの報告があることから[2]、吉久らのグループは核内で tRNA の品質管理が行われると主張している[6]。一方 Hopper らは、出芽酵母を特定のアミノ酸欠乏条件に曝すと、そのアミノ酸に対応する tRNA が核内に蓄積することを見出しており[3]、アミノ酸飢餓の際に細胞質の tRNA 量を調節することで、細胞全体の翻訳活性を制御しているのではないかと予想している[7]。また 2007 年には、細胞が DNA 損傷を受けると、未成熟 tRNA の核から細胞質への移行が阻害され、これを介して細胞周期の G1 期停止が起こることが出芽酵母において報告された[8]。これは tRNA の生合成が細胞周期制御と関連していることを明らかにした極めて革新的な報告であった[9]。

さて、tRNA 研究の歴史が幕開けしたのは、およそ 50 年前のことである。1953 年の DNA の二重らせん構造の発見から 2 年後、Crick は遺伝暗号とアミノ酸の “adapter” となる分子の存在を提唱した[10]。そしてその翌年、Zamecnik らのグループは、ラット肝臓抽出液を用いた試験管内タンパク質合成系を用いた実験において、標識アミノ酸と結合する低分子 RNA を見出した[11]。これが tRNA の最初の発見である。以降、Holley らによる出芽酵母 tRNA^{Ala} の塩基配列の決定[12]、Klug や Rich らのグループが競合して取り組んだ酵母 tRNA^{Phe} の結晶構造解析など[13, 14]、tRNA の機能や構造に関する研究が盛んに行われた。また、1970 年代から Hinnebusch らのグループを中心に酵母や哺乳類におけるアミノ酸飢餓時の代謝応答についての研究が精力的に行われていたが、2000 年になって、アミノ酸飢餓時に非アミノアシル化 tRNA と Gcn2 キナーゼが直接結合することで、アミノ酸生合成系の酵素群の転写が活性化されることが報告された[15]。これにより tRNA は、遺伝暗号をアミノ酸へと変換するアダプター分子としてだけでなく、細胞内での情報伝達におけるシグナル分子として働くことが明らかとなった。

近年、タンパク質をコードしない機能性低分子 RNA、いわゆる non-coding RNA の研究が最盛期を迎えている。tRNA は最も古くから知られている non-coding RNA の一つであるが、アダプター分子以外の機能についての発見が遅れた理由として、第一に、細胞内での存在量の多さが挙げられるのではないだろうか。栄養源の豊富な環境で増殖している細胞では、TOR 経路の活性化により tRNA や rRNA の転写が活発に行われており[16]、細胞内全転写産物のうち mRNA が僅か 3-5%であるのに対し、tRNA は 10-15%、rRNA は 70-80%を占めている。第二に、tRNA が細胞内に比較的安定に存在する分子であることが考えられる。tRNA は、L 字型と呼ばれるコンパクトな立体構造を取っており、且つ様々な塩基修飾を持つため、安定性が高められている。このように、tRNA の存在量の多さと安定性のために、機能に障害がある tRNA が部分的に出現しても、

細胞への影響は極めて小さく、表現型として捉えられることが無かったのではないだろうか。また tRNA は、「wobble の法則」により 40-50 種類ほどしか存在しないが、tRNA 遺伝子の数は、The Genomic tRNA Database (<http://gtrnadb.ucsc.edu/>) によれば、ヒトでは 622 個、出芽酵母では 275 個、大腸菌では 88 個もあり、これらが染色体上の様々な場所に点在している[17]。このことは、既に述べたように膨大な量の tRNA の供給を可能にしていると同時に、特定の領域で生じた変異に因る影響を最小限に保つために効果的であると考えられる。しかしこうしたことが、tRNA 遺伝子の遺伝子工学的な手法による改変を困難にしており、研究の発展を妨げる一因となったかもしれない。

tRNA 研究の新展開

冒頭で述べたように、細胞内の tRNA 動態が明らかにされつつある一方で、これまであまり良く知られていなかった tRNA の分解に関する論文も相次いで報告された。2005 年、核内の RNA 分解 exosome である TRAMP complex の構成が明らかにされ[18]、この TRAMP complex によって不安定化した tRNA が分解されることが明らかとなった[18, 19]。これらの論文では、tRNA 修飾酵素の温度感受性変異株において、塩基修飾を失わせて人工的に不安定化させた tRNA が分解されることが報告された。

また、2005 年のテトラヒメナでの報告を皮切りに[20]、細胞内で自発的に起こる tRNA の切断現象が次々と明らかにされた[21]。テトラヒメナでは必須アミノ酸の欠乏時に、また放線菌や麹菌では、抗生物質産生時や形態分化の際に細胞内に切断された tRNA が蓄積することが報告された[20, 22, 23]。更に、出芽酵母やシロイヌナズナ、HeLa 細胞においては、酸化ストレスが tRNA 切断を誘導することが明らかとなった[24]。また、血管新生に関与するとされ、tRNA 切断活性

を持つ **angiogenin** がストレスに応答して **tRNA** を切断することが、ヒト骨肉腫細胞株である **U2OS** 細胞やヒト肝癌細胞株である **HepG2** 細胞などを用いて明らかにされた[25]。こうして約 5 年間のうちに、これまで殆ど知られていなかった **tRNA** の分解や切断に関する多くの現象が急速に明るみに出た。特に、ストレスに応答して起こる **tRNA** 切断は生物に普遍的な現象であることが示唆されたが、その分子機構の解明は、**tRNA** 切断の生物学的意義を知るための重要な課題である。

出芽酵母における **tRNA** 切断

出芽酵母における **RNA** 切断現象を紐解いて行く。**Thompson** らは、出芽酵母を酸化ストレスに曝すと、細胞内に **tRNA** 断片が蓄積することを報告した[24]。また、**tRNA** 切断を誘導するストレスは、酸化ストレスだけに限定されておらず、熱ショックやアミノ酸飢餓、或いは定常期での長期培養でも起こることを示した[24]。一方、**UV** 照射やグルコース飢餓、窒素飢餓では起こらなかった。更に同グループにより、通常は液胞に局在する **Rny1p** が、酸化ストレスに応答して細胞質へと放出され、**tRNA** を切断することが示された[26]。**Rny1p** は出芽酵母に唯一存在する **RNase T2** 型リボヌクレアーゼとして、2001年に同定された[27]。**RNase T2** は分泌性リボヌクレアーゼであり、一本鎖 **RNA** を非特異的に切断する活性を持つ。生物に普遍的に存在することからその重要性が指摘されているが、例えば植物の不和合性への関与など[28]、ごく少数の例を除き、その意義については殆ど明らかにされていない。酸化ストレスによって生じた **tRNA** の切断片は、そのサイズから、アンチコドンループの辺りで起こっていると考えられる。一本鎖 **RNA** を非特異的に分解すると考えられる **Rny1p** によりアンチコドンループが切断される理由は、**tRNA** のこの領域が分子の外側に剥き出しになっているから

だと推測される。Thompson らは、Rny1p が酸化ストレス下での細胞死を誘導していると主張している。RNase 活性を失わせた変異体でも細胞死は起こることから、tRNA 切断が細胞死の直接の原因とはならないとしながらも、彼らは、切断された tRNA 断片が何らかの機能を持つ可能性も想定している。偶然にもほぼ同時期に、動物細胞に tRNA の 5'切断片を人為的に導入すると、タンパク質合成が阻害されるという論文が報告されている[29]。

また時を同じくして、上述したストレス誘導性 tRNA 切断とは全く異なる出芽酵母の tRNA 切断についても報告された。酵母には、他の酵母を殺すタンパク質を細胞外に放出する株が存在する。この株をキラ酵母と呼び、タンパク質はキラー毒素と呼ばれる。これまでにキラ酵母として様々な酵母が見つかったが、殺菌活性の正体については未だ分かっていないものが多い。酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産するキラー毒素 zymocin は 3 量体のタンパク質で、出芽酵母の細胞壁を分解するキチナーゼ活性を持つ α -subunit と、疎水性に富んだ β -subunit、及び γ -subunit からなる[30, 31]。 α -subunit と β -subunit の働きで毒性の本体である γ -subunit が感受性菌の細胞内へと侵入し、細胞周期の G1 期停止を引き起こすことが古くから知られているが[32, 33]、その標的が何であるかは、長らく不明であった。そして 2005 年、zymocin が同定されてから 20 年以上を経て、 γ -subunit が tRNA^{Glu}UUC, tRNA^{Lys}UUU, tRNA^{Gln}UUG を特異的に切断する活性を持つことが報告された[34]。また、酵母 *Pichia acaciae* が生産するキラー毒素 PaT は、出芽酵母に対し DNA 損傷や細胞周期の S 期停止を引き起こすことが知られていたが、やはり殺菌活性の正体は不明であった[35]。しかし、2008 年、Meinhardt 率いるドイツのグループが、出芽酵母 tRNA^{Gln}UUG を切断することを突き止めた[36]。

コリシン D による tRNA ノックダウン

コリシンは、大腸菌またはその近縁種が持つ Col プラスミドより生産されるタンパク質性毒素であり、同種のプラスミドを持たない大腸菌に対して殺菌活性を示す。これまでに二十数種類のコリシンが発見され、作用機構などについての研究が行われている[37]。所属する研究室では、このうちコリシン E5, コリシン D が、tRNA に特異的なリボヌクレアーゼであることを発見し[38, 39]、生化学的な解析や結晶構造の決定を行ってきた。特に、コリシン D は、tRNA のアンチコドンループ内の特定の塩基に加え、tRNA の立体構造を巧みに認識することで、RNA の中でも tRNA に対して高い特異性を示す[40, 41]。

コリシン D は 697 アミノ酸からなる分子量約 7 万 5 千のタンパク質であり、リボヌクレアーゼ活性ドメインは C 末端側に存在する。特に、Asp532 以降の 166 残基からなるドメインが、コリシン D の全長と同じ基質認識能及び tRNA の分解活性を保持していることから[42]、N 末端より 532 番目以降の活性ドメインを D-CRD (Colicin D C-terminal Ribonuclease Domain) と名付けた。D-CRD は、大腸菌に対しては tRNA^{Arg} の 4 種類のアイソアクセプター（それぞれアンチコドンを添えて、以降、tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}CCG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU と表記する）を切断する[39]。当研究室のこれまでの研究により、D-CRD は tRNA のアンチコドンループ中、36 位の G や 36 位の U を好んで認識することが分かっている[40, 43]。これに加えて、D-CRD の N 末端が tRNA の D-arm と相互作用し、tRNA の構造を認識していると考えられる[41]。そして、38 位と 39 位の間のリン酸結合を切断し、2', 3'-cyclic phosphate 及び 5'-OH を形成する (Fig.0-1A) 。 D-CRD は、tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}CCG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU のうち、細胞内存在量が最も多い tRNA^{Arg}ICG を優先的に切断する[39]。zymocin, PaT が第一標的とする tRNA^{Glu}UUC, tRNA^{Gln}UUG も、それ

ぞれ細胞内存在量が最も多いものであることから、このことが、少なくとも tRNA を標的とした毒素の共通した戦略であると考えられる。

さて、大腸菌と出芽酵母の tRNA^{Arg}ICG のアンチコドンループ配列は、塩基の修飾を除くと全く同じである (Fig. 0-1A)。従って、コリシン D は少なくとも出芽酵母由来の tRNA^{Arg}ICG を切断し、出芽酵母における tRNA 切断モデルを構築することが出来ると考えた。これを確かめたところ、*in vitro* で tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU が切断された (Fig. 0-1B)。そこで、D-CRD を出芽酵母の細胞内で発現させると、同種の tRNA の切断が起こり (Fig. 0-2B)、コロニー形成が阻害されることが分かった (Fig. 0-2A)。また、コリシン D の生産菌内で発現しており、コリシン D の活性ドメインと結合することで自殺を防ぐタンパク質である ImmD を同時に発現させると、コロニー形成の阻害は抑制された (Fig. 0-2A)。

そこで、 α 細胞である TM142 株において、D-CRD を高コピープラスミドから発現させて tRNA 切断を誘導し、これに応答して発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。D-CRD による tRNA 切断を誘導すると、宿主酵母の静菌的な増殖停止を引き起こした (Fig. 0-3)。コリシン D は大腸菌に対して殺菌的に働くことを考えると、出芽酵母における tRNA 切断は少なくとも細胞死は誘導しないと考えられた。またマイクロアレイ解析の結果からは、非常に限定された数の遺伝子のみが発現変動していることが分かった (Table 0-1)。そしてこのとき、宿主として α 細胞を用いたにも関わらず、転写が抑制されているはずの α 細胞特異的遺伝子転写が活性化することを見出した (Table 0-2)。

既に述べたように、出芽酵母にとって、tRNA 切断は自然の環境下で起こる普遍的な現象であることが明らかにされた。しかし、zymocin, PaT による tRNA 切断は、感受性酵母にとって生育が阻害される現象であるのに対し、ストレス誘

導性の tRNA 切断は、作用機構は不明であるが、ストレスに対する適応の一環であると想像される。従って、キラートキシンによる tRNA 切断は、ストレス誘導性の tRNA 切断とは生理的意義が本質的に異なると考えられる。キラートキシンに対しては、感受性出芽酵母は細胞周期停止という応答を示すが、酸化ストレスなどによる tRNA 切断に対しては、どのような細胞応答を起こすのであろうか？本博士論文研究が始まった当初は、ストレス誘導性 tRNA 切断現象が、出芽酵母を含めた様々な生物で見られることがようやく分かってきた頃であり、tRNA 切断を担う因子は明らかにされていなかった。tRNA 切断に対する細胞応答の解析を目的として、例えば細胞を過酸化水素水に曝したり、アミノ酸飢餓条件下で培養したりすると、それらのストレスに対する応答に隠れてしまい、tRNA 切断に依存した細胞応答を抽出するのは不可能だと考えられる。コリシン D を用いた出芽酵母の tRNA 切断は、このようなストレス誘導性 tRNA 切断のモデルとすることが出来るかもしれない。

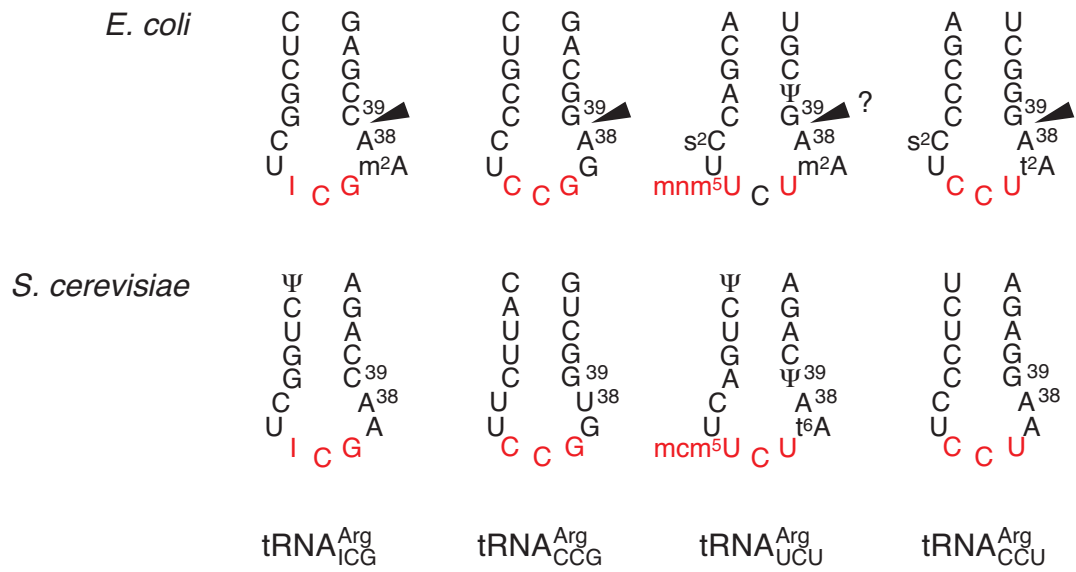
本研究の目的

本研究は、様々な生物種で普遍的に見られる tRNA 切断現象を理解するために、出芽酵母において tRNA 切断に対する細胞応答を明らかにすることを目的とした。D-CRD による tRNA 切断については、上述した結果に続く解析を行うことで、tRNA ノックダウンが誘導する細胞応答の全容を明らかにすることを目指した。またこれに加えて、細胞周期停止を引き起こすことが分かっている酵母キラートキシンである zymocin, PaT に由来する tRNA 切断酵素を用いることで、D-CRD による tRNA ノックダウンと、キラートキシンによる tRNA 切断との細胞応答を比較し、tRNA 切断の生物学的な意義を見出したい。

以上を踏まえ、本論文は以下の構成を取る。第 1 章では、D-CRD による tRNA

ノックダウンに対する細胞応答の解析について、続く第 2 章では、D-CRD と、キラートキシン由来の tRNA 切断酵素に対する細胞応答について述べる。また第 3 章では、第 2 章で得られた結果より着想した、キラートキシン PaT の作用機構の解析について述べる。そして各章で得られた成果を、総論で総合的に考察する。

A



B

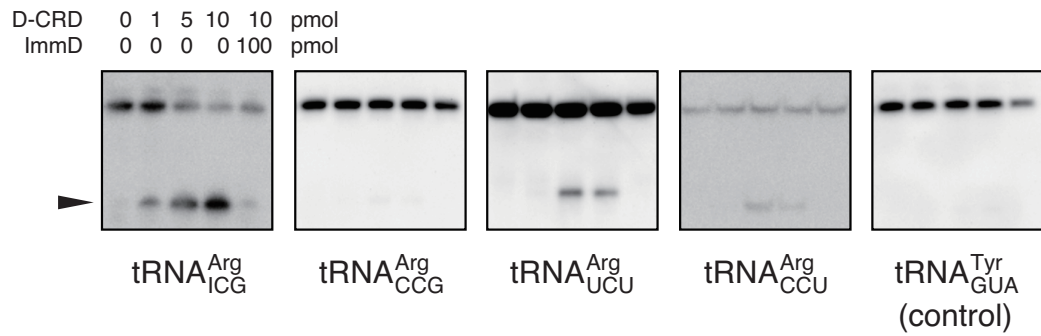
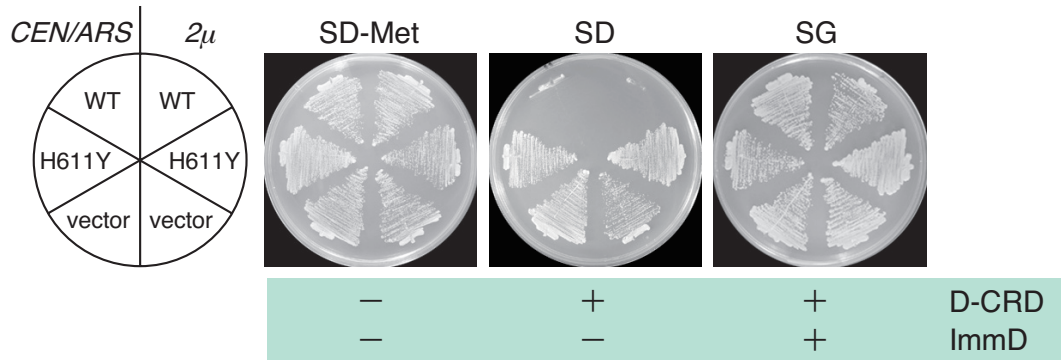


Fig. 0-1 D-CRD による *in vitro* での出芽酵母 tRNA^{Arg} の切断

(A) 大腸菌と出芽酵母の tRNA^{Arg} のアンチコドンループ配列の比較。コリシン D で切断される大腸菌 tRNA^{Arg} の切断部位を矢じりで示した。(B) 酵母より調製した total RNA を基質とし、*in vitro* で D-CRD と反応させ、tRNA^{Arg} に対するプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU では矢じりで示す位置に切断片が見られる。

A



B

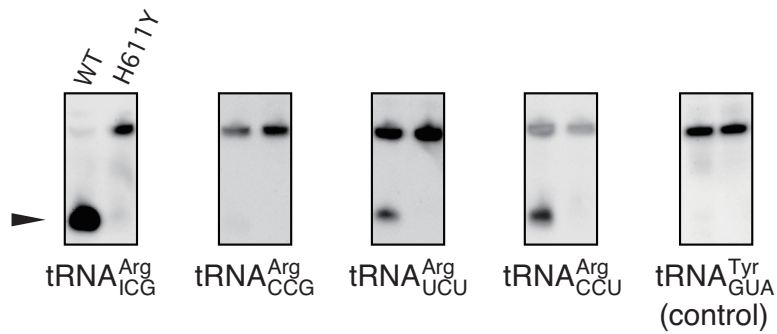


Fig. 0-2 D-CRD 発現株における tRNA 切断

(A) D-CRD, ImmD 発現誘導時の生育を固体培地上で比較した。D-CRD の発現でコロニー形成が阻害され、ImmD との共発現によりそれが抑制された。(B) D-CRD を高コピープラスミドから発現させた細胞より total RNA を抽出し、tRNA^{Arg} に対するプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU では矢じりで示す位置に切断片が見られた。

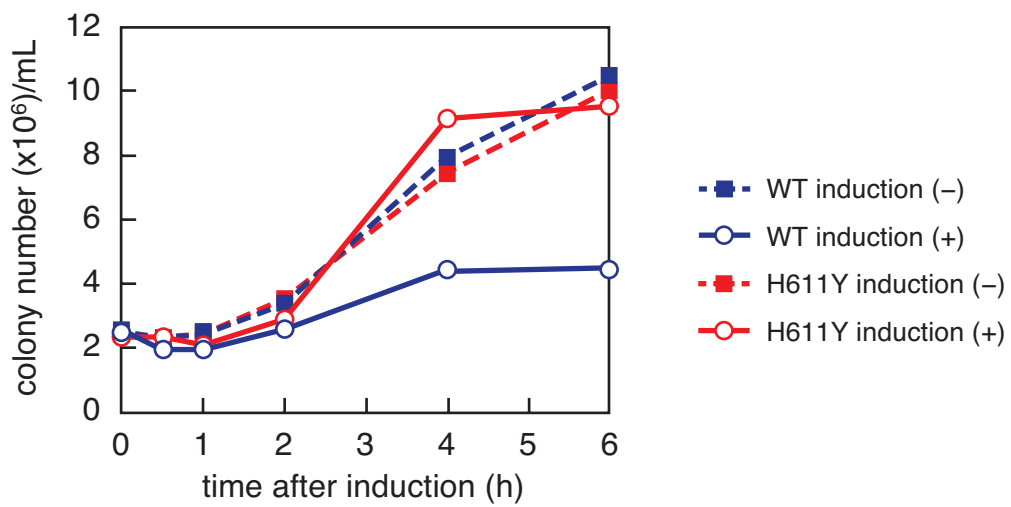


Fig. 0-3 D-CRD 発現誘導後の生菌数の変化

D-CRD を高コピープラスミドより発現する株において、発現誘導後の細胞を経時的にサンプリングし、メチオニンを含む培地上へ適宜希釈してプレーティングし、生菌数を測定した。

Table 0-1 DNA マイクロアレイ解析で 2 倍以上の発現変動を示した総遺伝子数

	time (h)					
	0	0.5	1	2	4	6
up	1	0	13	192	300	177
down	2	0	1	72	205	122
total	3	0	14	264	505	299

Table 0-2 発現誘導 4 時間における a 細胞特異的遺伝子の発現レベル

Gene	Function	Fold change
<i>STE2</i>	Mating-type α -factor pheromone receptor	27.8
<i>ASG7</i>	Unknown	19.1
<i>BAR1</i>	Aspartic-type endopepidase	16.1
<i>MFa2</i>	a-factor	15.3
<i>MFa1</i>	a-factor	11.6
<i>AGA2</i>	Cell adhesion receptor	5.9
<i>STE6</i>	ATP-binding cassette (ABC) transporter	3.6

第 1 章 D-CRD 発現株における細胞応答の解析

1-1. 序

修士論文研究では、D-CRD により出芽酵母の tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}CCU, tRNA^{Arg}UCU が切断されることを見出したが、これ以外の tRNA が切断される可能性については検討していなかった。緒論でもふれたが、これまでに見ついている tRNA 切断性トキシンには、細胞内含有量の多い tRNA を標的とするという共通した特徴がある[43]。コリシン D については、大腸菌において Arg を指定する tRNA の中で最も遺伝子数が多く、コドン使用頻度も高い tRNA^{Arg}ICG に対し、最も高い切断効率を示す[39]。またコリシン E5 も、その標的である、アンチコドンの一文字目と二文字目に QU (Q は G の修飾塩基) を持つ tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} は、同じアミノ酸を指定するそれぞれの tRNA isotype の中で、特に遺伝子数の多い tRNA である。*K. lactis* が生産する zymocin の第一標的である tRNA^{Gln}UUC、そして、*P. acaciae* が生産する PaT の標的である tRNA^{Gln}UUG も、出芽酵母のそれぞれの tRNA isotype の中で遺伝子数、コドン使用頻度共に最も多い tRNA である (Fig.1-1)。なお、tRNA の細胞内含有量は、遺伝子量効果により、その遺伝子数に比例する[44, 45]。それでは、出芽酵母内で発現させた D-CRD は、これらの tRNA 切断性トキシンの様に、細胞内含有量の多い tRNA を高い効率で切断するのであろうか。これを検証するために、出芽酵母の tRNA を D-CRD で切断し、この切断片の配列を網羅的に調べた。

また、修士論文研究において、出芽酵母の α 細胞内で D-CRD を発現させ、これ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解析した。その結果、接合に関与する遺伝子群が発現上昇すること、また、 α 細胞内では通常発現が抑制されている α 細胞特異的遺伝子 (α -cell specific gene; *asg*) の転写が活

性化することを見出した。これらの遺伝子群の変動は顕著であり、何らかの生理的意義がある可能性があると考え、解析を行った。

1-2. 材料と方法

D-CRD による *in vitro* での出芽酵母 tRNA 切断アッセイ

出芽酵母からの total RNA の調製はホットフェノール法により行った。反応溶液の組成は 20 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 100 µg/µL BSA であり、D-CRD の希釈にもこのバッファーを使用した。100 µL の反応溶液に対し 43 µg の出芽酵母 total RNA を加え、3 分間、70°C でインキュベーションして RNA の refolding を促進し、その後 50 pmol の D-CRD を加えて 37°C で 20 分間インキュベーションした。反応後、速やかに 2×loading solution (9M urea, 0.02% XC, 0.02% BPB) を等量加え氷上に静置することで、反応を停止させた。なお、D-CRD は当研究室の高橋が精製したものを使用した[41]。

tRNA 切断片のクローニングと解析

D-CRD と反応させた出芽酵母 tRNA を、10%ポリアクリルアミド変性ゲルにて電気泳動した。その後、ゲル上での tRNA の切断片の位置を UV 照射法により確認し、目的の断片をゲルから切り出した。このゲルに超純水を加えて 37°C で一晩振盪することで、ゲルから RNA を溶出した。翌日、室温にて 5,000rpm で 1 分間遠心した後、上清を 0.22 µm 口径の膜でフィルタリングし、エタノール沈殿により RNA を得た。

この RNA に対し、small RNA Cloning Kit (TaKaRa) を用い逆転写反応及び pUC19 へのクローニングを行った。詳細は添付のプロトコールに従った。以下に簡潔に手順を示す。調製した RNA 断片に対し、プロトコールに従って BAP 処理を行った後、3'末端に、逆転写の際の足場となるアダプターDNA をライゲーション

ンした。このアダプターDNA の更に 3'末端にはビオチンが結合しており、これを用いてストレプトアビジン結合マグネットビーズへ吸着させ、アダプターをライゲーションさせた RNA-DNA 断片を回収した。続けて 5'末端にもアダプターDNA をライゲーションした後、アダプターDNA に相補的なプライマーを用い、逆転写酵素 M-MLV にて逆転写を行った。得られた cDNA をマグネットビーズを用いて再度回収した後、両アダプターに相補的なプライマーを用いて PCR を行った。両末端のアダプター配列には制限酵素 *Sse8387I* による認識配列が導入されており、*Sse8387I* で消化した PCR 産物を、*PstI* 消化した pUC19 へとクローニングした。得られたコロニーを LB 培地で終夜培養した後、PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) を用いてプラスミドを精製し、シーケンス解析に用いた。シーケンス解析は株式会社ファスマックに外注した。

tRNA を検出するためのノザンハイブリダイゼーション

tRNA を検出するためのプローブは、目的とする tRNA の 39 位から variable loop もしくは T-stem までの配列に対して相補的な配列となるようなオリゴ DNA を使用した。オリゴ DNA は全て OPERON 社に依頼し作成した。DIG Oligonucleotide 3' -End Labeling Kit, 2nd Generation (Roche) を用いてオリゴ DNA の 3'末端を DIG-ddUTP で標識し、これをプローブとして使用した。

電気泳動には 10%ポリアクリルアミド変性ゲル (7M urea, 1×TBE) を用いた。TBE の組成は 49 mM Trizma base, 49 mM boric acid, 1 mM EDTA (pH8.0) とした。次に 1×TBE を用いて泳動後のゲルから一晩かけてナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) へ RNA を転写した。UV 照射により RNA をメンブレンへ固定した後、プリハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS) 中に浸して 37°C で 6-8 時間インキ

ュベートした。続いてバッファーをハイブリダイゼーションバッファー (900 mM NaCl, 90 mM Tris-HCl pH7.5, 6 mM EDTA pH8.0, 0.3% SDS) へと交換し、10 pmol のオリゴ DNA プローブを加え、37°Cで一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーションバッファーの作製に使用した 20×SSC の組成は 3M sodium chloride, 300 mM sodium citrate で、100×Denhardt's solution の組成は 2% BSA, 2% Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech), 2% polyvinylpyrrolidone である。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを 6×SSC で室温にて 15 分間浸すことで洗浄し、これを 2 回行った。続いて 3×SSC で 30 分間、37°Cで洗浄した。洗浄後、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) 及び CDP-Star (Roche) を用いて発光操作を行い、LAS-1000plus (FUJI FILM) を用いてバンドを検出した。

なお、*in vitro* でアッセイを行ったサンプルは RNA 3 μ g 分のサンプルを電気泳動に供し、*in vivo* での tRNA を観察する場合には 5 μ g、イントロンを検出する際には 8 μ g の total RNA を泳動した[46]。

出芽酵母における D-CRD の発現

出芽酵母内で D-CRD を発現するプラスミドは、当研究室の木戸が作製したものを使用した[47]。細胞内で、高コピーで保持される 2 μ プラスミドを vector として使用しており、野生型或いは変異型 D-CRD をコードする遺伝子領域を組込んだ。変異型 D-CRD とは、活性触媒残基である His611 を Tyr へと変異させたものを指し、以降 H611Y と表記する。これらのプラスミドには *MET3* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを導入しており、培地中のメチオニンが欠乏することで発現が誘導される[48, 49]。プラスミド DNA による出芽酵母の形質転換は全て酢酸リチウム法により行った。

二倍体である TM143 株は、互いに isogenic である TM142 株と TM141 株を接合させて作出した。遺伝子マーカーが同一であるため、これらのマーカーには含まれない、*ade* 欠損株である TM220 株, TM221 株と接合しないことで二倍体であることを確認した。TM142, TM141, TM143 を各プラスミドで形質転換し、Met を添加した SD 培地 (以下、SD-Met と表記する) にて 36 時間振盪培養した後、培養液を新たな SD-Met へ 1%接種し、一晚培養した。660 nm における濁度が 0.5 に達したら 5,000 rpm で遠心して集菌し、滅菌蒸留水で細胞を 2 回洗浄後、Met を含まない SD 培地に懸濁し、振盪培養を再開し経時的に細胞をサンプリングした。

Gene Ontology Term Finder によるマイクロアレイデータ解析

SGD の Gene Ontology Term Finder (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>) を用いて、マイクロアレイにより得られたデータの解析を行った。解析の手順を以降に簡潔に記す。発現量が 2 倍以上変化した遺伝子を抽出し、発現量の変化値について $p < 0.01$ のものを統計学的に優位差有り と判断した。これらの遺伝子群を、SGD の Gene Ontology Term Finder (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>) を用いて各遺伝子が属する cellular process によって分類した。データを簡素化するため、10 以上の遺伝子を含む GO term のみをグラフにした。

定量 PCR による転写解析

D-CRD の発現誘導後 4 時間の細胞を集菌し、ホットフェノール法で total RNA を調製した。この total RNA 10 μ g を DNase I (Deoxyribonuclease I,

Amplification Grade, Invitrogen) で処理することで混在するゲノム DNA を消化した後、1 μ g 分の RNA を取り、逆転写反応により cDNA を得た。逆転写には ReverTra Ace - α - (TOYOBO) を用い、添付の Oligo (dT) 20 (5' -(dT)₂₀-3') をプライマーとして使用した。cDNA は超純水で適宜希釈して鋳型に用いた。定量 PCR の反応には LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) を用い、解析には LightCycler クイックシステム 350S (Roche) を使用した。

定量した各遺伝子の発現比の算出方法は次の通りである。目的遺伝子の転写量を *ACT1* mRNA 量により normalize した。変異型 D-CRD 発現株における「目的遺伝子の mRNA 量/*ACT1* mRNA 量」に対する、野生型 D-CRD 発現株での「目的遺伝子の mRNA 量/*ACT1* mRNA 量」を、tRNA ノックダウン誘導時の発現変動率とした。

ウエスタンブロッティングによるリン酸化 Fus3p/Kss1p の検出

タンパク質の調製はガラスビーズ (Glass beads, acid-washed, SIGMA) と Tissue Lyser (QIAGEN) を用いて行った。菌体を Extraction Buffer P (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM β -glycerol phosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EDTA pH7.5, 1 mM PMSF) に懸濁し、同体積のガラスビーズとプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor cocktail for fungal and yeast, SIGMA) を必要量加えた後、Tissue Lyser で最高速度 (frequency 250/s) で 8 分間破碎した。破碎終了後、遠心分離して得た上清をタンパク質溶液とした。調製したタンパク質の濃度は BIO-RAD PROTEIN ASSAY (BIO-RAD) を用いて Bradford 法により測定した。

得られたタンパク質のうち 12 μ g を、分離ゲル濃度を 10% とした SDS-PAGE

により電気泳動を行った。泳動後、3種類のトランスファーバッファー（バッファーA：300 mM Tris, 5% methanol、バッファーB：25 mM Tris, 5% methanol、バッファーC：25 mM Tris, 5% methanol, 40 mM 6-aminocaproic acid）を用いて Immobilon PVDF (MILLIPORE)へとタンパク質を転写した。一次抗体である Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) を用いて 4°Cで一晩反応させた後、Goat Anti-Rabbit IgG, HRP conjugate (Upstate) で二次抗体反応を行った。抗体反応後、ECL-plus (Amersham Pharmacia Biotech) により化学発光を行い、LAS-1000plus (FUJI FILM) を用いてバンドを検出した。TM141 (*MATa*) 株にフェロモン因子である α -factor ペプチド (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu, SIGMA) を添加したものを positive control とした。

mRNA を検出するためのノザンハイブリダイゼーション

STE2, *STE3* mRNA を検出するためのプローブは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて作成した。電気泳動には 1% アガロースゲルを使用し、その組成は 2% ホルムアルデヒド、1×MOPS (20 mM MOPS (pH7.0), 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA) とした。各レーン当たり 8 μ g の RNA を用い、MOPS バッファーを用いて電気泳動を行った。泳動後、10×SSC で RNA をナイロンメンブレンへ転写し、UV 照射により RNA をメンブレンへ固定した。DIG Easy Hyb Granules (Roche) を用いて 37°C でプリハイブリダイゼーションをした後、25 ng/mL となるようにプローブ溶液を加えてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) に添付されているプロトコールに準じて行った。

ヒストンアセチル化抗体によるクロマチン免疫沈降

D-CRD 発現誘導後の培養液に最終濃度 1% となるようにホルムアルデヒドを加え、室温で 15 分間緩やかに振盪した。続いて 125 mM となるようにグリシンを添加して 5 分間、同様にインキュベートした。集菌後、冷やした PBS で細胞を 2 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor cocktail for fungal and yeast, SIGMA) を含む冷やした MGH (500) buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) に懸濁した。このとき、各サンプル間で細胞濃度が均一となるように加える MGH (500) buffer の量を調節し、以降の操作にはそこから同量のサンプルを分注したものをを用いることで、サンプル間の細胞数を統一した。ガラスビーズを用いて細胞を破碎した後、超音波処理により染色体 DNA を断片化し、得られた lysate を 4°C で 15 分、15,000 rpm にて遠心し、上清を whole cell extract とした。

whole cell extract に anti-H4-K16Ac antibody (Upstate) を 5 μ L 加え、4°C で 3 時間、緩やかに回転させながらインキュベートした。その後、膨潤させた Protein A Sepharose CL-48 (Amersham Pharmacia Biotech) を加え、更に 1 時間インキュベートした。遠心によりビーズを回収し、MGH (500) buffer で 3 回、WashII (LiCl) buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) で 1 回、TE で 1 回、ビーズを洗浄した。ビーズを TE/1% SDS に懸濁し、65°C で 10 分間インキュベートした後 vortex し、遠心により上清を得た。

この上清を IP DNA サンプルとして、whole cell extract の一部を input DNA として、以降の操作を並行して行った。サンプルを 65°C で終夜インキュベートした後、0.8 mg/mL の RNase A, 0.8 mg/mL proteinase K でそれぞれ 30 分、2 時

間処理した。この溶液を phenol/CHCl₃ で処理し、上清をエタノール沈殿させることで DNA を回収し、定量 PCR を行った。

1-3. 結果と考察

1-3-1. D-CRD による出芽酵母 tRNA のノックダウン

D-CRD により切断される出芽酵母 RNA

トキシンの進化の過程には、細胞内で多数を占める因子を標的とすること、或いは細胞内のより少ない因子を標的とすることと云う、の二つの戦略が存在すると考えられる。前者の場合、それだけ多くの因子を分解、もしくは不活化する必要があるが、その分、これら標的因子が関与する多くの作用点で異常を誘発できる。後者の場合は、異常の誘発点は限定されるが、効率良く標的を捕えることが出来る。従って、コリシン D などの tRNA 切断性トキシンは、前者の戦略をとったと考えられる。つまりコリシン D で言えば、細胞内で多数を占める tRNA^{Arg}ICG を優先的に切断することで、mRNA 上の、tRNA^{Arg}ICG と対合する膨大な数のコドンでリボソームをストールさせることが出来る。この視点で考えると、D-CRD が出芽酵母でトキシンとしては作用しないならば、出芽酵母で多数派を占める tRNA を優先的に切断していないと考えられる。

cDNA fragment がクローニングされた pUC19 を保持する大腸菌として、200 個以上のコロニーを取得し、このうち 84 個のコロニーからプラスミドを精製した。これらのシーケンス解析を行ったところ、20 個のプラスミドには 2 種類の cDNA が、4 個のプラスミドには 3 種類の cDNA が、アダプター配列を挟んでタンデムにクローニングされており、合計で 112 種類の配列情報を得るに至った (Fig. 1-2A)。

解析した RNA 配列のうち、約 9 割が tRNA で、約 1 割が rRNA であった (Fig. 1-2B)。なお rRNA 配列のうち D-CRD による切断箇所が重複するものは無かつ

た。D-CRD は、tRNA のアンチコドンステムループ部分 (ASL, anticodon stem loop) のみを人工合成したオリゴ RNA を切断することも出来るため[50]、rRNA がステムループ構造を取っていれば切断されると考えられる。そこでこれらの rRNA の配列より、5'側上流の約 200 nt 及び 3'側下流の約 200 nt を含む合計で約 500 nt の rRNA 配列を *Saccharomyces* Genome Database (以下、SGD と表記する) (<http://www.yeastgenome.org/>) より取得した。次いでこの配列について Vienna RNA package version 2.2.0 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) の RNAfold server を用いて二次構造予測を行ったが、構造上では切断箇所はランダムに起きており、構造依存的な法則性を見出すことは出来なかった。基質とした total RNA のうち rRNA の含有比が約 80%、tRNA が約 15%であるのに対し、取得した RNA のうち 9 割が tRNA であることから、D-CRD の、tRNA に対する特異性の高さが伺える。またこのことから、RNA を取り扱う操作の過程で rRNA の非特異的な分解が起きたのではないかと考えられる。また仮に D-CRD が rRNA を切断するのだとしても、細胞内では rRNA は多くのリボソームタンパク質によりコーティングされているため、切断される可能性は低いと考えられる。

次に 98 個の tRNA 配列について、その内訳を示した (Fig. 1-2B)。98 個のうち 49 個は tRNA^{Lys}CUU, tRNA^{Asp}GUC, tRNA^{His}GUG で占めていた。また 48 個の tRNA は 38 位と 39 位の間で切断されていた (Fig. 1-2C)。これは大腸菌 tRNA^{Arg}の切断部位と同じである。また 4 つ以上の cDNA 配列が取得された tRNA について、切断されていた位置とその数の関係を Table 1-1 に示したが、切断部位は必ずしも 38 位と 39 位の間ではなく、tRNA の種類によって異なっており、tRNA^{Asp}GUC は 36 位と 37 位の間で、tRNA^{Ala}AGC やミトコンドリア tRNA^{Ala}UGC は 37 位と 38 位の間で切断されていると考えられる。なお、ミトコンドリア tRNA も、rRNA と同様に、*in vivo* では切断されないと考えられる。

98 個のうち、26 個は二分された tRNA のうち 5'側の配列が取得されていた。

pUC19 へのクローニングを行う際、プロトコールに従い BAP 処理を行った。しかし、D-CRD によって切断された tRNA の 3'側断片は、両末端ともに水酸基であるため、本来なら脱リン酸化は必要なく、そのままアダプターDNA をライゲーション出来る。一方、5'側断片のうち、5'末端はモノリン酸であるから BAP により脱リン酸出来るが、3'末端は 2', 3'-cyclic phosphate を形成しているため、本来ならこの処理では脱リン酸出来ない。しかし、実際には 5'側断片が得られている。これについて詳細は不明であるが、BAP は精製の過程で他の酵素の混入が認められることが経験的に知られており、そこに 2', 3'-cyclic phosphate を脱リン酸化出来る酵素が入っていた可能性がある。もしくは BAP 処理のためにアルカリ条件にしたために 2', 3'-cyclic phosphate が開裂し、これに BAP が作用したのかもしれない。実際に 26 個の配列を見てみると、38 位と 39 位の間で切断されてクローニングされていた配列は僅か 4 個であり、更に、他の 20 個は、全てアンチコドンループ内の何れかの箇所で切断された配列であった。このことから、D-CRD により 38 位と 39 位の間で切断された後に、何らかの原因により 5'側断片の 3'末端が削られたと推測できる。

D-CRD により切断される tRNA の種類に関する考察

取得した配列のうち約半分は 3 種類の tRNA 由来のもので占めていると述べたが、本質的にこれらの tRNA が D-CRD にとっての第一標的であるのか、或いは細胞内全 tRNA に対してこれら 3 種類の tRNA 量が多いために高い重複度で cDNA クローンが得られたのかについて、区別する必要がある。個々の tRNA が D-CRD によってどれだけ切断されるかというのは、各 tRNA に相補的なプローブを用いて行ったノザンハイブリダイゼーションの結果より知ることが出来る (Fig. 1-3A)。

Fig. 1-1 を見てみると、本実験で取得した tRNA の多くは、細胞内に豊富に存在するものであることが分かる。しかし、tRNA^{Asp}GUC や tRNA^{Trp}CCA, tRNA^{Arg}UCU などはノザンハイブリダイゼーションの結果を見る限り、切断されていない元の tRNA 量があまり減少していないことから (Fig. 1-3A)、積極的に切断されているのでは無いと言える。なお、tRNA のノザンハイブリダイゼーションにおいて、切断された tRNA の方がバンドのシグナルが強く出ているものが多く見られる。これは切断片の方がハイブリダイゼーション効率が高いためであり、切断片のバンドの強弱によって切断効率を議論することは出来ない。一方で、tRNA^{His}GUG や tRNA^{Arg}ICG は、細胞内含有量は高くないが、ノザンハイブリダイゼーションの結果を見ると効率良く切断されていることが分かる (Fig. 0-2, 1-1, 1-3A)。

またこのクローニングでは、細胞内含有量の多い tRNA に由来する切断片が数多く得られることから、取得されなかった tRNA のうちの幾つかについて、ノザンハイブリダイゼーションを行った。なおこの時のサンプルには、酵母の細胞内で D-CRD の発現誘導を 3 時間行った細胞より抽出した total RNA を使用した。この結果を見てみると、tRNA^{Ile}AAU, tRNA^{Ser}AGA, tRNA^{Val}AAC は切断されていなかったが、tRNA^{Cys}GCA, tRNA^{Lys}CUU, tRNA^{Met}CAU では元の tRNA の量の減少や切断片が観察された (Fig. 1-3B)。このうち特に tRNA^{Cys}GCA は、元の tRNA のバンドがかなり薄くなっており、細胞内含有量がかなり少ない tRNA であるが、高効率で切断されたことが分かった (Fig. 1-1, 1-3B)。

D-CRD による tRNA 切断の意義付け

D-CRD は大腸菌においては tRNA^{Arg} を第一義的な標的としているが、出芽酵母 tRNA を用いた場合には、少なくとも細胞内存在量が多い tRNA が優先的に切

断されている様子は見られなかった。寧ろ、tRNA^{His}GUG や tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Cys}GCA など、細胞内含有量の少ない tRNA に効率よく切断されるものが見出された。またこれに加え、D-CRD は実に様々な種類の出芽酵母 tRNA を切断することが分かった。ストレス誘導性の tRNA 切断では、tRNA^{Lys}CUU や tRNA^{Asp}GU, tRNA^{His}GUG などの tRNA が観察されており、特定の tRNA のみが切断される訳ではない。従って D-CRD による tRNA 切断は、キラートキシンによる tRNA 切断ではなく、どちらかと言えばストレス誘導性 tRNA 切断に似た現象であると言える。

1-3-2. tRNA ノックダウン誘導後の tRNA の観察

切断された tRNA の細胞内での追跡

修士論文研究において、D-CRD を発現させている間、宿主の viability は低下しており、発現誘導 4 時間から 6 時間にかけては増殖も細胞死もせず、静菌的であることを報告した (Fig. 0-3)。この時、細胞内では tRNA が切断され続けているのか、また、切断された tRNA 断片が TRAMP などのような機構により品質管理されたりしているのかを調べるため、tRNA の切断片の様子を経時的に調べた。すると、D-CRD の発現誘導後 2 時間から 6 時間にかけて、ほぼ同じ程度の量の tRNA の切断が見られた (Fig. 1-4)。また、5'側プローブで検出した結果を見てみると、tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Phe}GAA 共に、2 本の切断片が出ている。大腸菌細胞内では、コリシン D により 38-39 位間で切断が起こった後、更にコリシン D に非依存的に 33-34 位間で切断が起こることが分かっている [39]。出芽酵母においても、これと同じことが起きていると考えられる。更にこの 5'側プローブによる検出結果では、発現誘導 2 時間の点においては 2 本の切断片のうち、長い切断片の

方が多く、4 時間、6 時間においては長い切断片の方が量が少ない。このことから、4 時間、6 時間においては D-CRD による tRNA の切断は停滞しており、切断片は分解を受けることも無く細胞内に蓄積していることが分かった。

なお、tRNA のアンチコドンループ周辺は tRNA 分子の外に露出しているため、RNA を抽出する作業過程においても細胞内の RNase により切断されやすく、また物理的に切れやすい。従って、変異型 D-CRD 発現株において tRNA^{Arg}ICG の 3' 側に結合するプローブで検出された tRNA 切断片は、このようなことが原因で生じたものだと考えている。

tRNA ノックダウンによる tRNA の新規合成系への影響

緒論の中で、DNA 損傷により前駆体 tRNA が核に蓄積し、これを介して細胞周期停止が制御される報告や、アミノ酸飢餓により tRNA が核に退避するという報告について述べた。これらの現象は、環境変化に応答して tRNA の局在を変化させると云う生理的な応答である。本実験では D-CRD による tRNA ノックダウンという人工的な現象の追跡を行っていることから、もしこれに伴って細胞内 tRNA の動態が変わる様子が見られれば、細胞が潜在的な応答を示していると言えるのではないかと考えた。また、特定の tRNA が切断されることがフィードバックとなり、tRNA 合成全体が抑制される可能性も考えた。そこで、tRNA のイントロンに結合するプローブを用いることで、D-CRD 発現誘導後の、新規合成された核内の tRNA の様子を観察することとした。出芽酵母の tRNA のうち、イントロンを持つものは全部で 10 種類あり [51]、そのうち tRNA^{Leu}CAA, tRNA^{Lys}UUU, tRNA^{Phe}GAA, tRNA^{Ile}UAU のイントロンに対するプローブを製作し、ノザンハイブリダイゼーションを行った。また、このうち tRNA^{Leu}CAA, tRNA^{Lys}UUU, tRNA^{Phe}GAA が D-CRD により切断されることを、これらの成熟

tRNA の 3'側に結合するプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行うことで示した (Fig.1-5B)。なお、tRNA^{Ile}UAU についても D-CRD による切断の有無を調べたが、作製したプローブがハイブリダイズせず、検出されなかった。

イントロンに結合するプローブを用いた結果、tRNA^{Leu}CAA, tRNA^{Lys}UUU では発現誘導の直後から新規に転写される tRNA 量が減っており、tRNA^{Phe}GAA, tRNA^{Ile}UAU では発現誘導 2 時間後から徐々に減っている様子が見て取れた (Fig. 1-5A)。tRNA^{Leu}CAA, tRNA^{Lys}UUU はどちらも細胞内含有量の多い tRNA であるのに対し、tRNA^{Phe}GAA と tRNA^{Ile}UAU は対応するコドンの使用頻度が低く、細胞内含有量の少ない tRNA である。tRNA 遺伝子はその種類によって異なる転写調節を受けているとは考えにくいですが、少なくともこの結果からは、切断された tRNA の種類によって転写系に与える影響が異なる様子が伺えた。野生型 D-CRD 発現株では細胞内に存在する切り出されたイントロンの量が増加しているが、切断された tRNA も細胞内に留まっていることから (Fig. 1-4)、RNA の分解系が追いつかず、蓄積しているかの様に見えるのだと考えられる。

また、D-CRD による tRNA 切断に伴って細胞内 tRNA の動態が変わる様子は、残念ながら捉えられなかった。

1-3-3. 接合型依存的な細胞応答の比較

修士論文研究において、DNA マイクロアレイにより、D-CRD の発現による tRNA ノックダウンで発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。そしてこの解析結果として、 α 細胞における tRNA ノックダウンで、接合に関わる遺伝子群の転写が活性化すること、及び、本来は転写されることの無い a 細胞特異的遺伝子が発現することを報告した (Fig. 0-3)。そこで本項では、 α 細胞に加えて a 細胞、a/ α 細胞で tRNA ノックダウンを誘導し、接合関連遺伝子や接合型特異的遺伝子

の転写変動を調べることで、a 細胞、a/α 細胞でも接合関連遺伝子の活性化が見られるかを調べた。

発現変動遺伝子のプロファイリング

マイクロアレイ解析に用いたサンプルは、Fig. 0-3 に示すグラフにおいて経時的に viability を測定した際の細胞より調製した。この使用した株は一倍体のα細胞である。解析では、変異型 D-CRD を発現させたときの遺伝子発現量を基準とした、野生型 D-CRD の発現誘導後 1, 2, 4, 6 時間の発現変動を算出し、グラフに示した (Fig. 1-6)。

発現上昇したものには、sexual reproduction, response to pheromone, response to pheromone during conjugation with cellular fusion など、酵母の接合に関わる遺伝子群を示す GO term が多く含まれていた。また発現が低下した遺伝子群を見ると、その多くは細胞内の様々な代謝を表す GO term であり、その他に translation, transport などがあった。これらは、tRNA ノックダウンにより細胞内の代謝系全体やタンパク質合成が抑制されている様子を捉えた結果だと言える。

tRNA ノックダウンにより α 細胞では接合シグナル伝達系が活性化する

マイクロアレイ解析の結果から、tRNA ノックダウンにより接合に関連した遺伝子の発現量が上昇することが分かった。そこで、リン酸リレーにより活性化される接合シグナル伝達系が活性化しているかどうかを、α 細胞、a 細胞、a/α 細胞において調べることにした。これに先立ち、α 細胞、a 細胞、a/α 細胞における tRNA 切断の様子、及び tRNA ノックダウン誘導時の生育を比較した。

tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Phe}GAA に結合するプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行ったところ、 α 細胞と a 細胞ではほぼ同程度に tRNA が切断されていたのに対し、a/ α 細胞では検出された切断片の量がやや少なかった (Fig. 1-7B)。D-CRD は 2 μ プラスミドより発現させており、D-CRD の細胞内での発現量は、一倍体と二倍体で大きく違うことはないと思われる。これに対し、二倍体の方が細胞内 tRNA の絶対量が多いため、一倍体と比較して tRNA 切断が起こりにくくなったように見えるのではないだろうか。これを反映するように、a/ α 細胞の方が α 細胞, a 細胞よりも固体培地上での生育が良かった (Fig. 1-7A)。

続いて、接合シグナル伝達系の活性化のレポーター遺伝子である *FUS3*, *FUS1*, *FIG1* の転写量を調べた[52]。これらの遺伝子は接合シグナル伝達系の活性化に伴い転写量が 5 倍以上増えることが分かっている[53]。 α , a, a/ α 細胞において、tRNA ノックダウンを誘導した後、定量 PCR により *FUS3*, *FUS1*, *FIG1* の転写量を測定した (Fig. 1-8A)。その結果、*FUS3*, *FUS1*, *FIG1* の転写量が増加しているのは α 細胞だけであることが分かった。

次に Fus3p, Kss1p のリン酸化状態をウエスタンブロッティングにより調べた。Fus3p, Kss1p は、接合シグナル伝達系の下流でリン酸化され、最終的に転写因子である Ste12p をリン酸化する[53]。そしてこの Ste12p により、接合に必要な遺伝子の転写が活性化される。Fus3p と Kss1p は共に MAP キナーゼであり、シグナル伝達系において redundant に働くとされているが、接合シグナル伝達系の活性化には Fus3p が必須である[54, 55]。リン酸化した Fus3p, Kss1p に特異的な抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、Fus3p のバンドは TM142 において野生型 D-CRD の発現誘導を行ったサンプルでのみ特に強く表れていた (Fig. 1-8B)。以上の結果から、 α 細胞内でのみ、tRNA ノックダウンにより接合シグナル伝達系が活性することが分かった。

接合シグナル伝達系が活性化すると、細胞周期の G1 期停止が起こる。このこ

とから、少なくとも α 細胞においてはこの伝達系が活性化するために細胞周期が停止し、Fig. 0-3 に示すように静菌的となった可能性が示唆された。しかし D-CRD を発現させた α 細胞と a 細胞との間には生育に差が見られなかった (Fig. 1-7A)。また特に、接合シグナル伝達系の下流で細胞周期停止を行う CDK inhibitor である *FAR1* 遺伝子の破壊株でも D-CRD に対する感受性が変化しなかったため、接合シグナル伝達の活性化は、静菌的な生育停止に寄与していないと判断した。

a 細胞特異的遺伝子の転写により α 細胞内でシグナル伝達系が活性化する

緒論の中で、tRNA ノックダウンにより α 細胞内で a 細胞特異的遺伝子の転写が活性化することを述べた。そこで、tRNA ノックダウンを誘導した際の、 α 細胞、a 細胞、a/ α 細胞における a 細胞特異的遺伝子 (*asg*) 及び α 細胞特異的遺伝子 (*asg*) の転写を調べることにした。そのレポーターとして、*STE2*, *STE3* 遺伝子を選択した。*STE2* は α 細胞が放出する性フェロモンである α -factor を受容するレセプターをコードしている a 細胞特異的遺伝子であり、*STE3* は a 細胞が放出する a-factor を受容するレセプターをコードする α 細胞特異的遺伝子である。

それぞれの mRNA に結合するプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行ったところ、 α 細胞内で野生型 D-CRD の発現を誘導した株において *STE2* の転写が亢進している様子が再現された (Fig. 1-9)。しかし、a 細胞内では野生型 D-CRD を発現させても *STE3* の転写は起こらず、また a/ α 細胞では *STE2*, *STE3* の何れも発現しなかった。これは、接合シグナル伝達系の活性化の結果と一致している。即ち、 α 細胞では a 細胞特異的遺伝子の転写が亢進するため、自己の細胞内でシグナル伝達系の活性化が起きてしまったのだと考えられる。一方、a 細胞内では α 細胞特異的遺伝子の転写は起こらないため、シグナル伝達系の活性化

も起こらなかったと結論付けた。

接合型特異的遺伝子の転写は接合型によって異なる機構によって調節されている (Fig. 1-11)。a 細胞では、 α 細胞特異的遺伝子は積極的な転写抑制は行われておらず、転写を活性化する因子 $\alpha 1$ が発現していないために、転写が起こらない。これに対し α 細胞では、a 細胞特異的遺伝子は、細胞内でグローバルに働く転写抑制因子である **Top1p-Cyc8p complex** により積極的な転写抑制が行われている。従って、tRNA ノックダウンにより α 細胞内でこの複合体の形成が阻害されたために、a 細胞特異的遺伝子の転写が亢進したのではないかと考えられる。

tRNA ノックダウンにより *HML* 領域がユークロマチン化する

マイクロアレイ解析の結果から、接合型特異的遺伝子と同様に tRNA ノックダウンにより転写が活性化する遺伝子として *CHA1* に注目した。*CHA1* は、L-セリンや L-スレオニンを分解するデアミナーゼをコードしており [56]、第 III 染色体上の *HML* 領域の 3'側近傍に位置している。*HML* 領域はサイレンサータンパク質である Sir1-4p (Sir1p, Sir2p, Sir3p, Sir4p) によりヘテロクロマチン化されており、この影響で *CHA1* 遺伝子も通常は発現が抑制されている [57]。しかし、tRNA ノックダウンの誘導 4 時間後の時点で、*CHA1* 遺伝子の転写量が約 9 倍に上昇していた。*HML*, *HMR* は、一倍体細胞の接合型を決定する *MAT* locus の両側に存在する遺伝子領域である (Fig. 1-10A)。相同組換えにより *MAT* locus に *HML* が入ると α 細胞に、*HMR* が入ると a 細胞になる。*CHA1* 遺伝子が転写されていたことから、tRNA ノックダウンは *HML* 領域のヘテロクロマチン形成を阻害すると予想した。

ヒストン H4 の Lys16 残基がアセチル化を受けると、ヘテロクロマチンが解かれ、クロマチンは開いた状態になる [58]。なお、先に述べたサイレンサータンパ

ク質のうち、Sir2p が Lys16 残基のアセチル化を取り除くヒストン脱アセチル化酵素である[59]。そこで、アセチル化したヒストン H4 Lys16 残基に特異的に結合する抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。なお、定量 PCR による *HMR*, *HML* の検出は、各領域に含まれるサイレンシングエンハンサー領域と呼ばれる DNA 配列を標的として行った (Fig. 1-10A)[60]。また、このとき使用した α 細胞内において、野生型 D-CRD の発現により *STE2* が転写されていることを、定量 PCR により確認した (Fig. 1-10C)。その結果、*HML* 領域ではアセチル化が亢進しており、ヘテロクロマチン形成が阻害されていることが分かった (Fig. 1-10B)。図中の $Y\alpha$ 領域にコードされている $\alpha 1$, $\alpha 2$ の転写量がそれぞれ 1.5 倍、2.2 倍に上昇していたことがマイクロアレイにより示されており、これは *HML* 領域のヘテロクロマチン形成が阻害されたためだと言える。*HMR* 領域でもアセチル化が促進しているかのように見えるが、マイクロアレイのデータを見ると、 $Y\alpha$ 領域中の $\alpha 1$ は転写されていなかった。この実験において、ヘテロクロマチン形成のコントロールとして、テロメア領域のクロマチン形成の様子を同時に調べた。具体的には、第 VI 染色体の右腕の末端から約 0.6 kbp のところに位置しており、通常ヘテロクロマチン化されていることが分かっている領域を標的として、ChIP 解析を行った[61]。ところがこの領域は、tRNA ノックダウンを誘導してもアセチル化の程度には影響しなかった。テロメア領域のサイレンシングには Sir1p や、また Abf1p などのタンパク質は関与せず[62]、この様なヘテロクロマチン形成に必要な因子の微妙な違いが、tRNA ノックダウン誘導時のヘテロクロマチン形成への影響にした可能性がある。rDNA もテロメアと同じで Sir2-4p によってサイレンシングされていることから、これと比較することで少なくともクロマチン形成の解除が *HML* 領域に特異的な現象であるかどうか分かる。

タンパク質合成を阻害すると α 細胞で a 細胞特異的遺伝子が転写される

tRNA ノックダウンに起因する、 α 細胞における a 細胞特異的遺伝子の転写活性化が、tRNA 切断に特異的な現象であるか、もしくは tRNA 切断を介したタンパク質合成の低下が原因かを明らかにするため、cycloheximide で処理した細胞において接合型特異的遺伝子の転写量を定量 PCR により調べた。cycloheximide はリボソームの 60S サブユニットに結合してペプチド鎖の伸長を阻害する抗生物質である。

その結果、cycloheximide 添加後 1 時間において、 α 細胞内で a 細胞特異的遺伝子の転写が活性化した (Table 1-2)。また a/ α 細胞においても、 α 細胞ほどではないが、a 細胞特異的遺伝子が若干転写されていることが分かった。 α 細胞と a/ α 細胞では、a 細胞特異的遺伝子の転写抑制機構は Tup1p-Cyc8p complex を介する点で共通している (Fig. 1-11)。タンパク質合成の低下によりこの Tup1p-Cyc8p complex の存在量が減ったために、a 細胞特異的遺伝子が転写されたと考えられる。a/ α 細胞では、tRNA ノックダウンによる a 細胞特異的遺伝子の活性化は見られなかった。これは tRNA ノックダウンと cycloheximide 処理とは、タンパク質合成阻害の程度が違い、後者の方がより強く阻害するため、通常 α 細胞よりも細胞内タンパク質量の多い a/ α 細胞においても、Tup1p-Cyc8p complex が不足し、a 細胞特異的遺伝子が転写されたのではないだろうか。

また興味深いことに、cycloheximide 処理では、a 細胞や a/ α 細胞での α 細胞特異的遺伝子の転写が僅かに活性化していた。これらは普段積極的な転写抑制は行われていないことから (Fig. 1-11)、leaky に転写されている mRNA の分解が、タンパク質合成の低下により阻害されたためではないだろうか。

以上の結果から、tRNA ノックダウンにより引き起こされた α 細胞内での a 細胞特異的遺伝子の転写活性化やそれに伴う接合シグナル伝達系の活性化は、タン

パク質合成の低下により、転写抑制機構として働く Tup1p-Cyc8p complex の細胞内含有量が低下したためであると結論付けた。Tup1p-Cyc8p complex は、接合型特異的遺伝子の他にも、細胞内の様々なプロセスに関わる数多くの遺伝子の転写を抑制する複合体であり、標的遺伝子群のプロモーターに特異的に結合する様々な DNA binding repressor と結合するため、この DNA binding repressor を介して転写が調節されている (Table 1-11)[63-66]。また、Tup1p はヒストン H3 や H4 と結合することで、Cyc8p はヒストン脱アセチル化酵素をリクルートすることで、ヘテロクロマチン形成が促進される[67]。

D-CRD の発現誘導時の Tup1p-Cyc8p の標的遺伝子の転写量を、マイクロアレイ解析のデータより抽出し、Table 1-11 に示した。これを見てみると、Tup1p-Cyc8p によって抑制される標的遺伝子の殆どは、野生型 D-CRD を発現しても転写に影響を受けていない。a 細胞特異的遺伝子のみが顕著に発現している理由として、 $\alpha 2$ が非常に不安定なタンパク質であるためと考えられた。 $\alpha 2$ はその N 末端側に *Deg1* と呼ばれるタンパク質の不安定化に寄与するアミノ酸配列を有しており、通常は Tup1-Cyc8p complex が結合し、この領域をマスクすることで細胞内での安定性が保たれている[68]。 $\alpha 2$ が単体で細胞内に存在する場合の half-life は 5 分以下であると推定されている[69]。このことから、Tup1-Cyc8p complex の存在量が減少すると $\alpha 2$ の分解が速やかに起こり、結果として a 細胞特異的遺伝子の転写という現象が捉えられたのではないだろうか。これは tRNA ノックダウンに対する特異的な細胞応答ではなく、タンパク質合成の低下に対する応答であったが、接合型特異的遺伝子の調節機構の複雑さに起因する、接合型依存的な応答であることが明らかにされた。

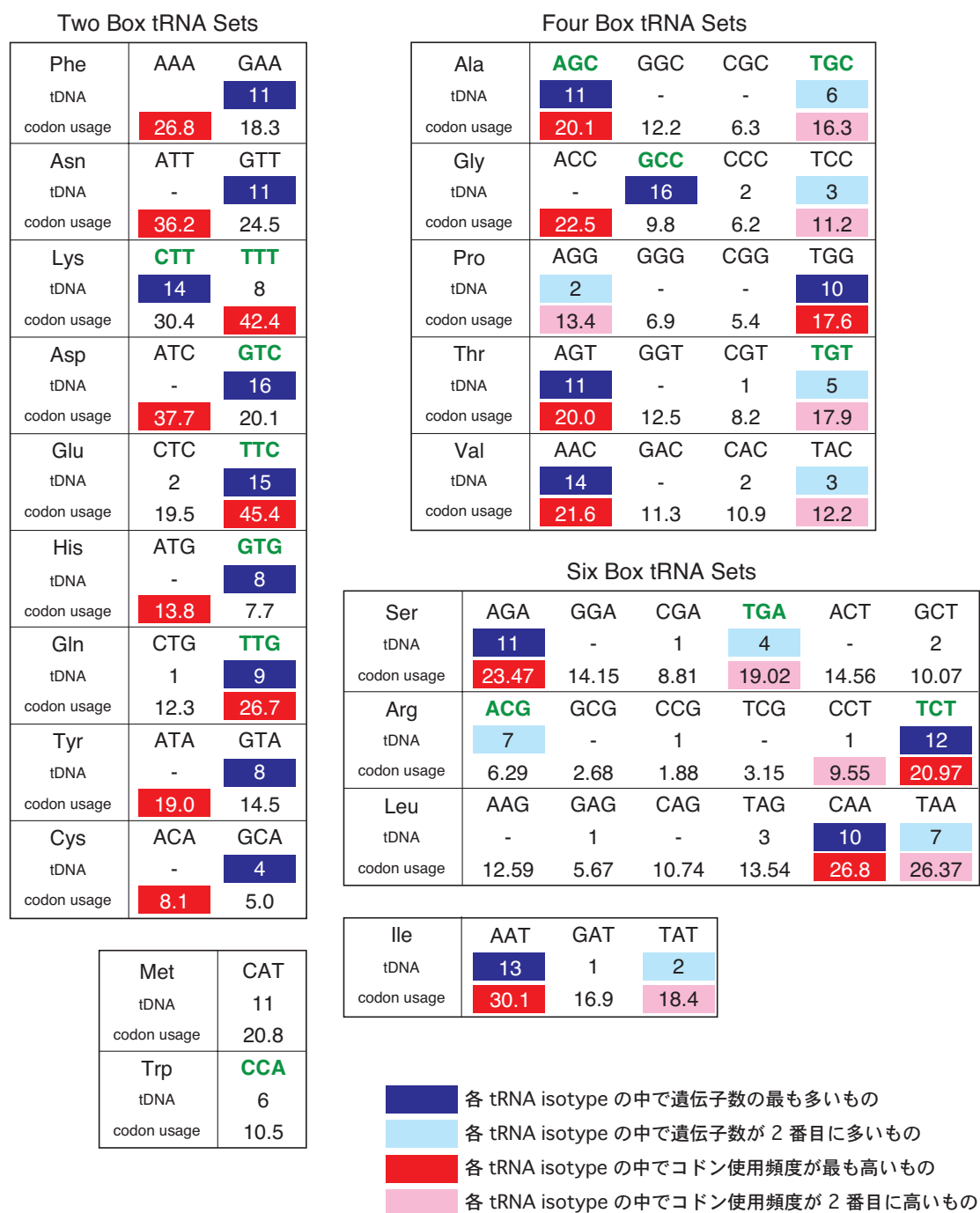


Fig. 1-1 出芽酵母の tRNA 遺伝子数とコドン使用頻度の関係

Genomic tRNA Database (<http://gtrnadb.ucsc.edu/>) を改変した。コドン使用頻度は千分率で示しており、SGD より引用した。同定した D-CRD が切断する tRNA のうち、2 つ以上の cDNA クローンが得られたものは、アンチコドンの遺伝子配列を緑色の太字で示した。

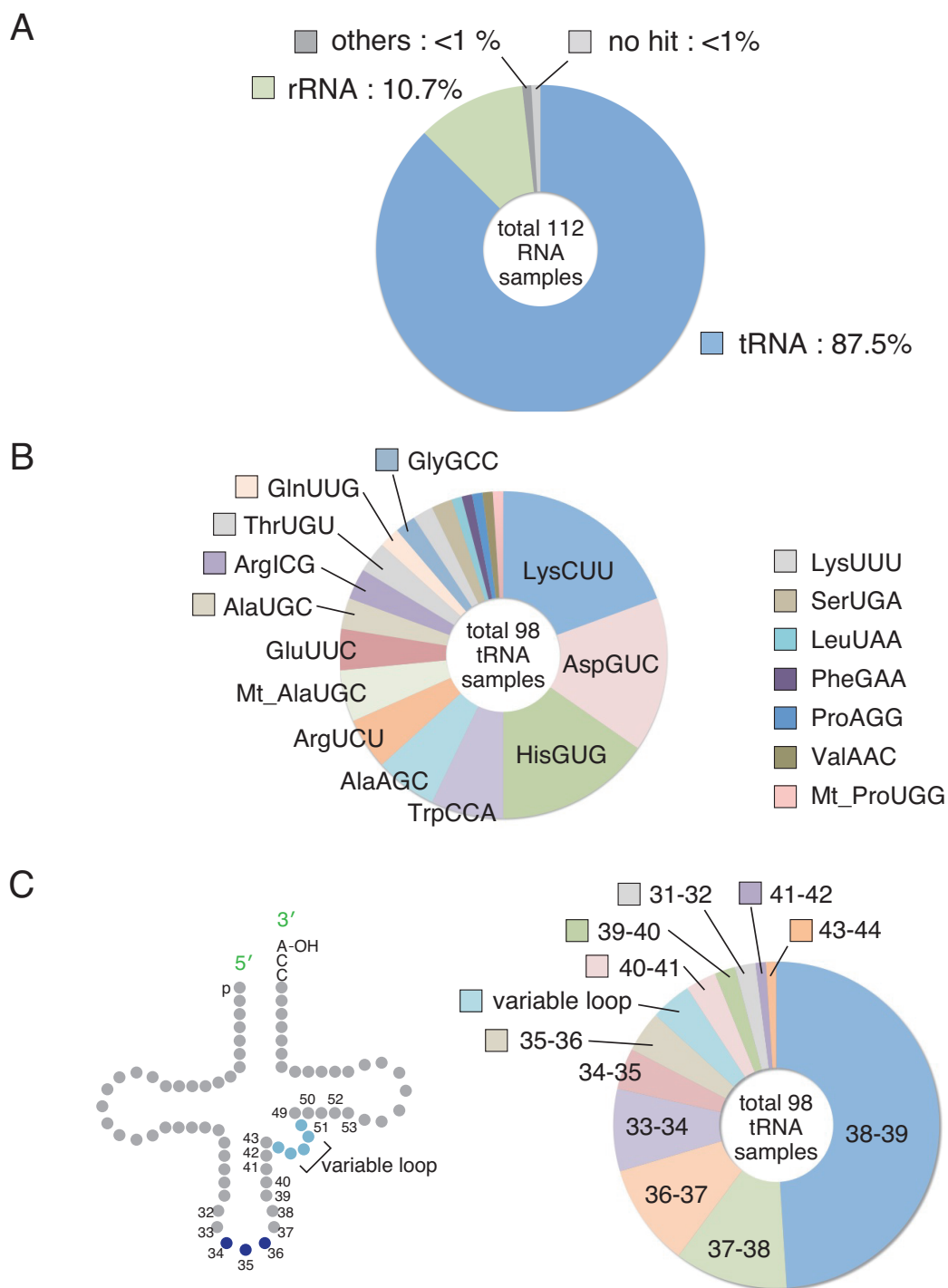


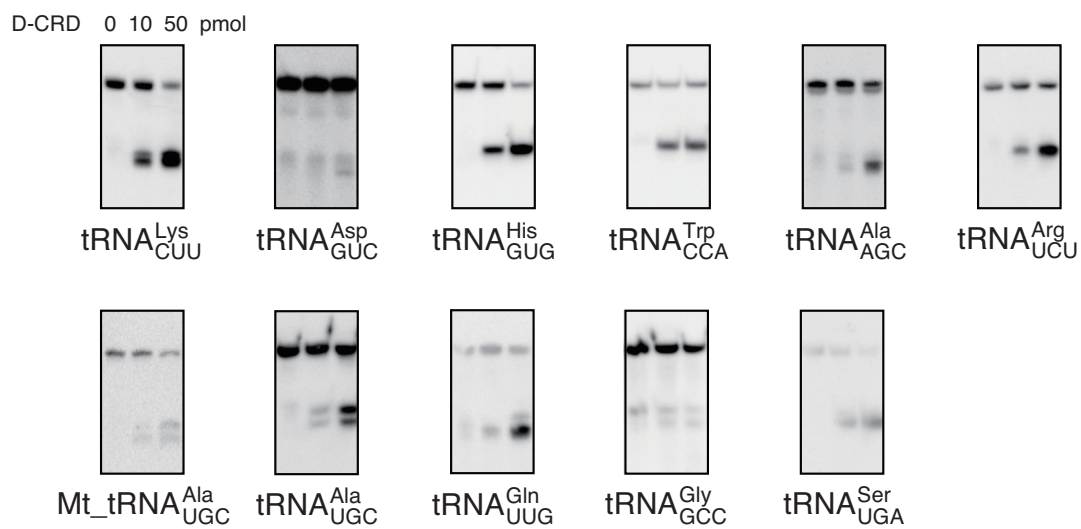
Fig. 1-2 D-CRD が切断する出芽酵母の RNA

(A) 取得した全 112 個の RNA サンプルの内訳。(B) 112 個のサンプルのうち、tRNA 98 個の内訳。Mt はミトコンドリア tRNA を指す。(C) 98 個の tRNA サンプルについて、得られた切断部位ごとの内訳を示す。塩基のナンバリングは左に示した。38-39 とは、tRNA の 38 塩基目と 39 塩基目で切断され、それよりも 5' 側若しくは 3' 側の RNA 配列が取得されたことを表す。

Table 1-1 各 tRNA の切断部位と得られた cDNA の数

tRNA	cleavage site									total
	31-32	33-34	34-35	35-36	36-37	37-38	38-39	40-41	>41	
tRNA ^{Lys} CUU	—	—	—	—	1	1	15	1	—	19
tRNA ^{Asp} GUC	1	3	2	1	8	—	1	—	—	15
tRNA ^{His} GUG	1	2	—	—	—	—	10	1	—	15
tRNA ^{Trp} CCA	—	—	—	—	—	1	4	—	2	7
tRNA ^{Ala} AGC	—	—	—	—	—	3	1	1	1	6
tRNA ^{Arg} UCU	—	—	—	1	—	—	3	—	1	5
Mt_tRNA ^{Ala} UGC	—	—	—	—	—	4	1	—	—	5
tRNA ^{Glu} UUC	—	—	—	—	1	1	2	—	—	4
total	2	5	2	2	9	11	37	3	4	75

A



B

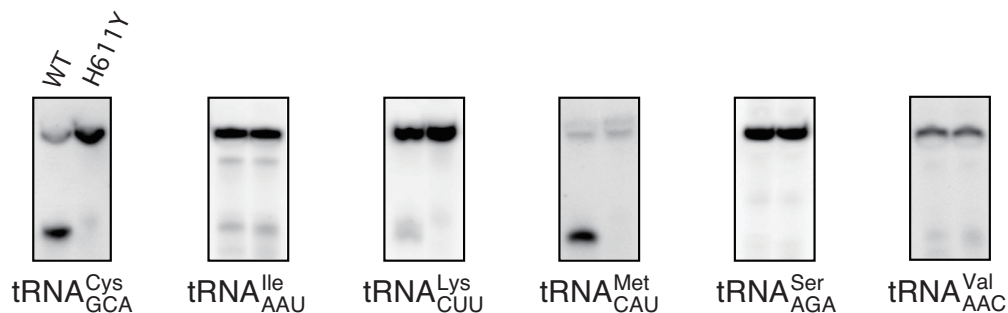


Fig. 1-3 ノザンハイブリダイゼーションによる tRNA 切断の確認

(A) 酵母より調製した total RNA を D-CRD と *in vitro* で反応させ、各 tRNA に対して相補的なプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。(B) D-CRD を細胞内で発現させてから 3 時間後に RNA を抽出し、ノザンハイブリダイゼーションを行った。

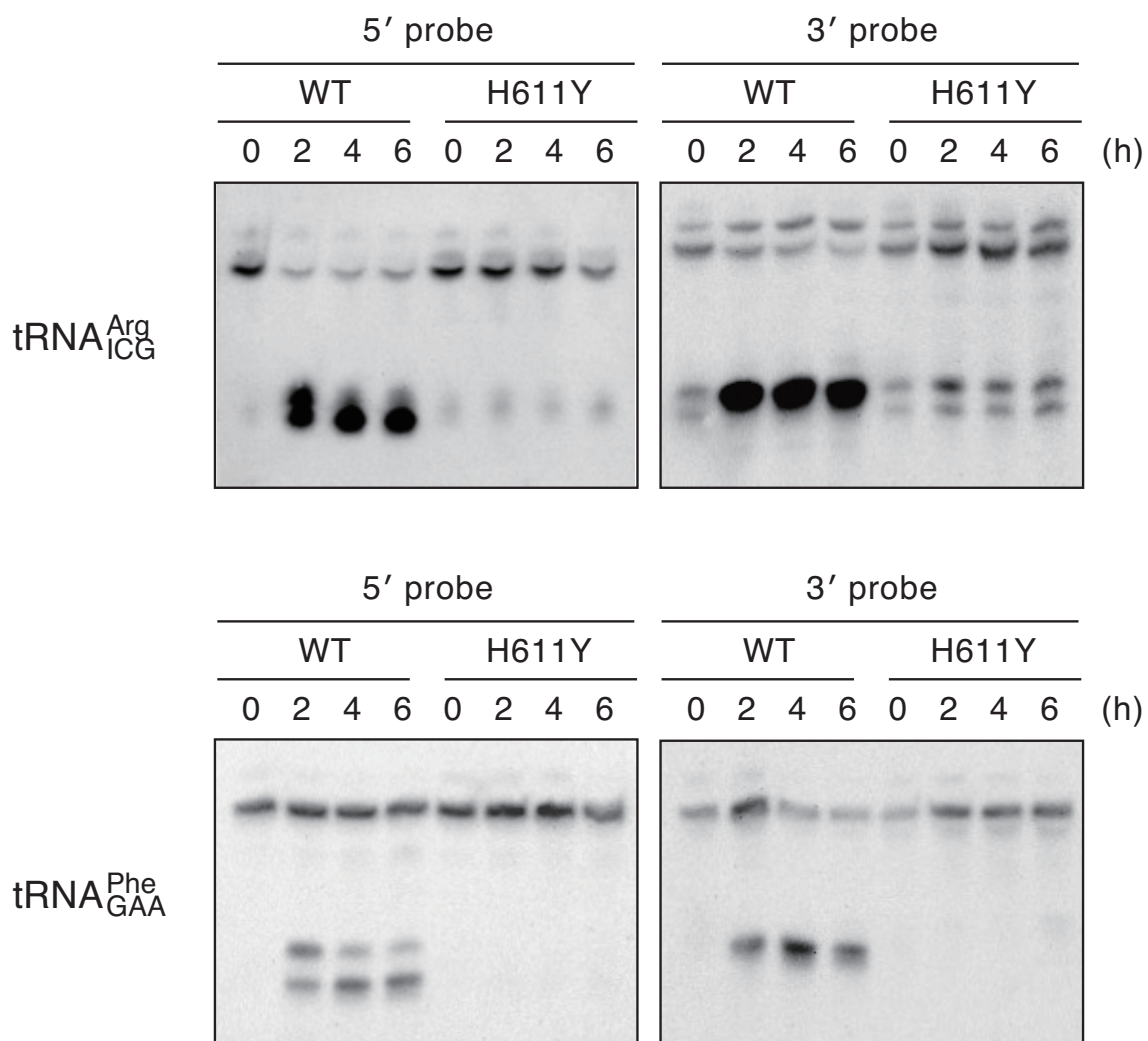
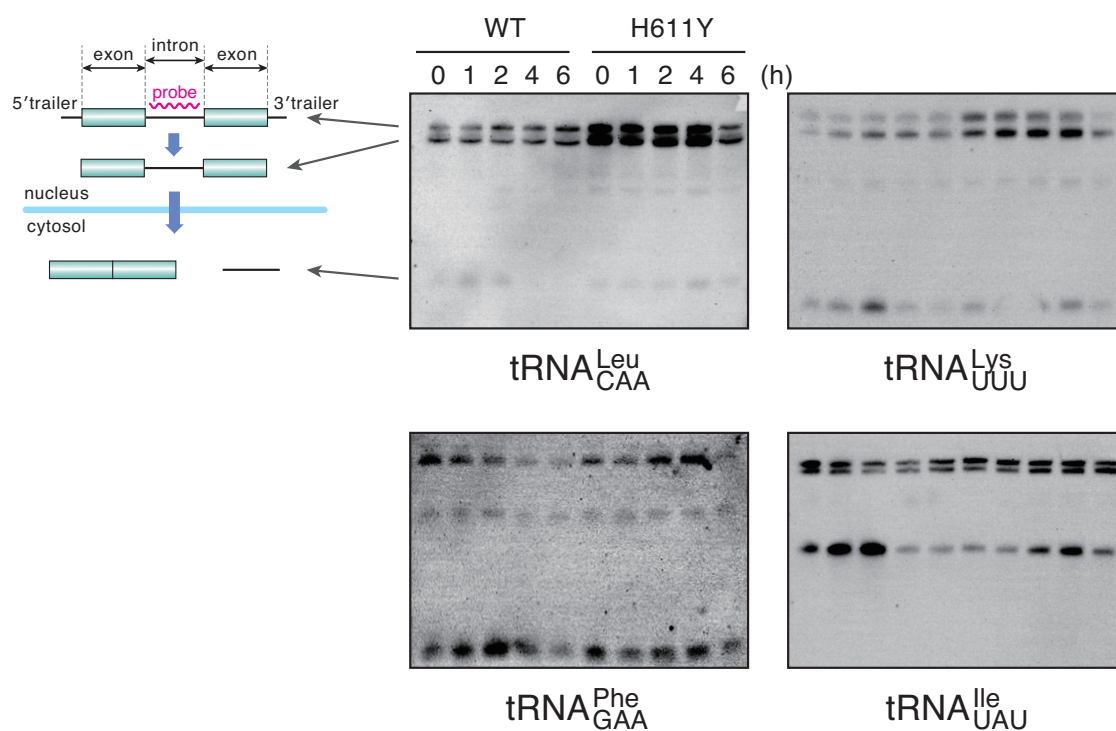


Fig. 1-4 5'側プローブと3'側プローブで検出される切断片の比較

D-CRDの発現誘導を行った後、経時的にサンプリングしてtotal RNAを抽出した。RNA各5 μgを泳動しノザンハイブリダイゼーションを行った。

A



B

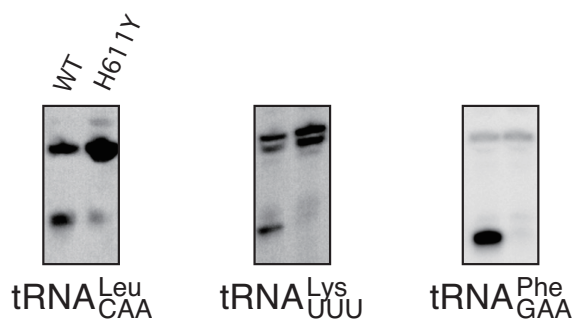


Fig. 1-5 イントロンプローブを用いた前駆体 tRNA の検出

(A) D-CRD の発現誘導を行った後、抽出した total RNA 各 8 μ g を泳動し、イントロンに結合するプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。tRNA のスプライシング過程の模式図を左に示した。イントロンの長さは、tRNA^{Leu}_{CAA} が 32 nt または 33 nt、tRNA^{Lys}_{UUU} が 23 nt、tRNA^{Phe}_{GAA} が 18 nt または 19 nt、tRNA^{Ile}_{UAU} が 60 nt である。(B) tRNA^{Leu}_{CAA}、tRNA^{Lys}_{UUU}、tRNA^{Phe}_{GAA} について、D-CRD により切断されるかどうかを variable loop に結合するプローブを用いて調べた。

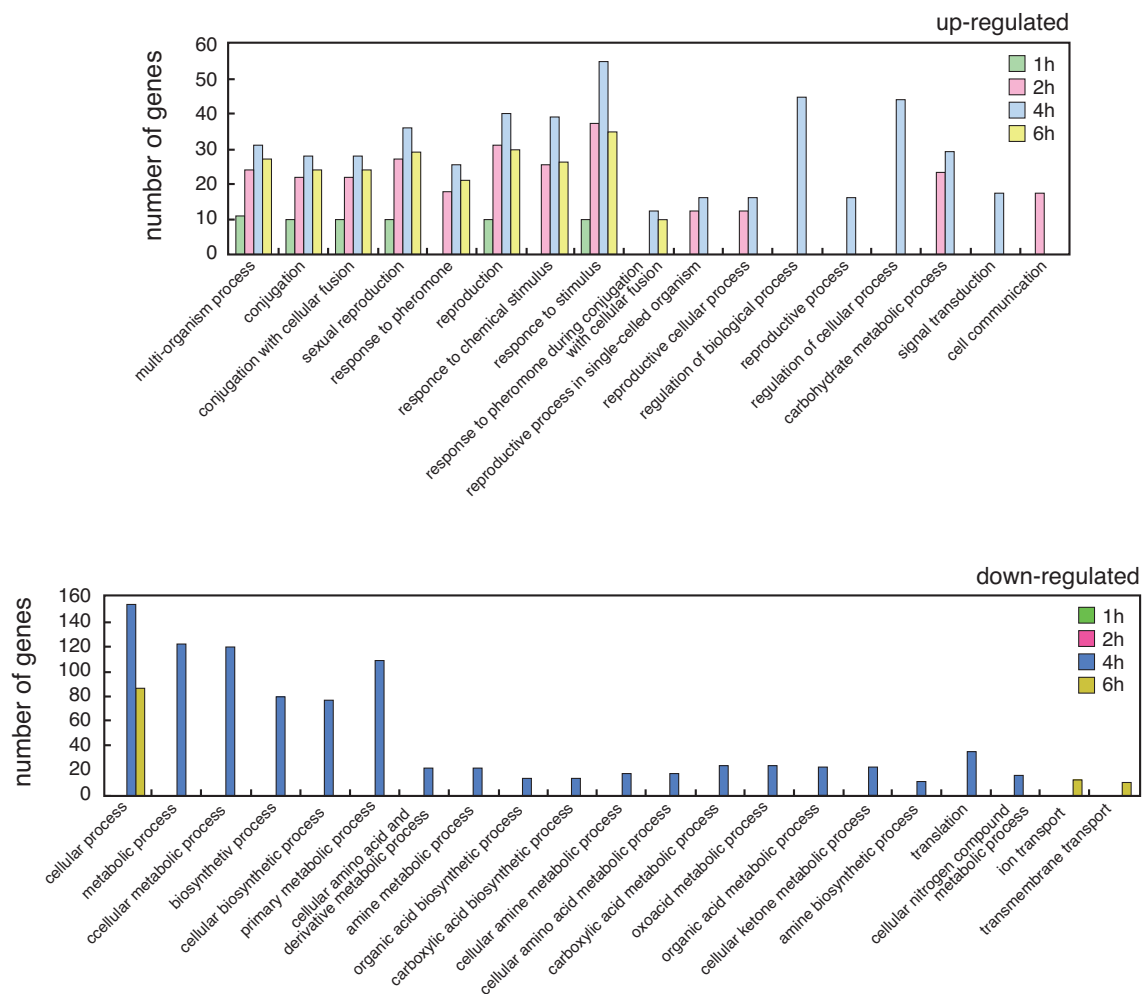
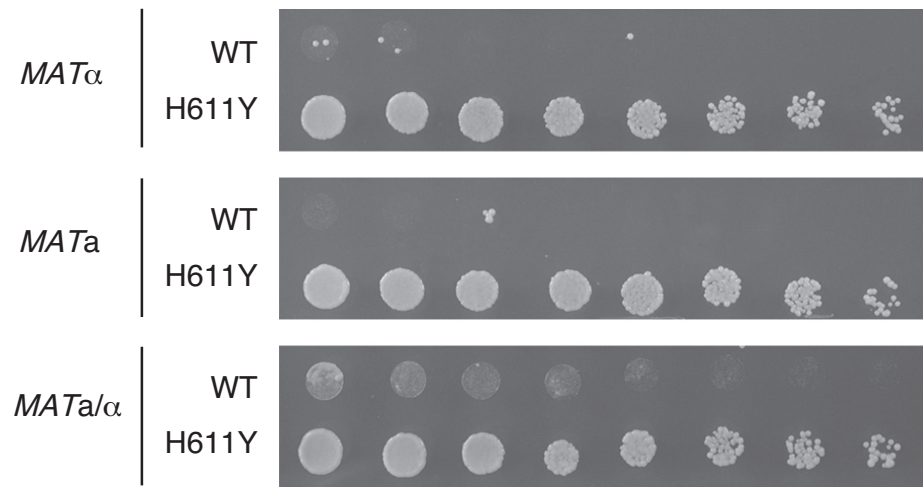


Fig. 1-6 マイクロアレイにおいて2倍以上の発現変動が見られた遺伝子の機能別の内訳
 DNA マイクロアレイの結果を Gene Ontology Term Finder にて解析し、2倍以上の発現変動が見られた遺
 伝子について、その機能を表す GO term ごとに分類した。縦軸は、各 GO term に含まれた総遺伝子数を
 表す。

A



B

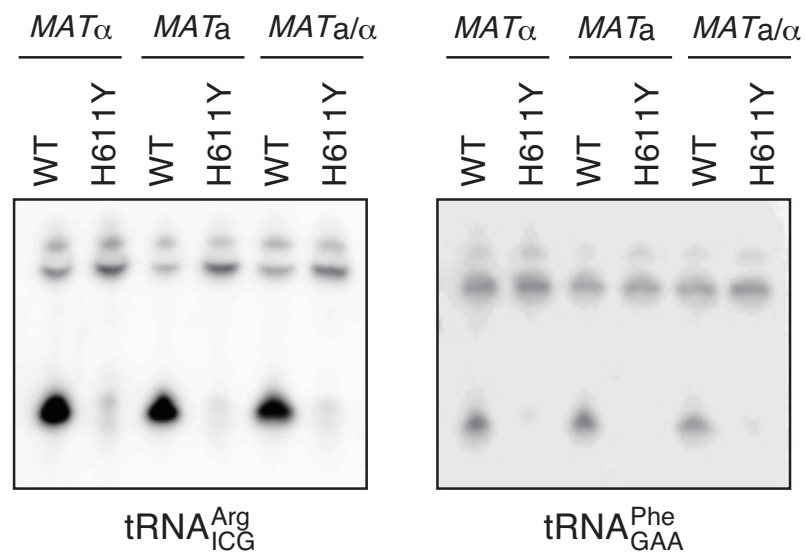
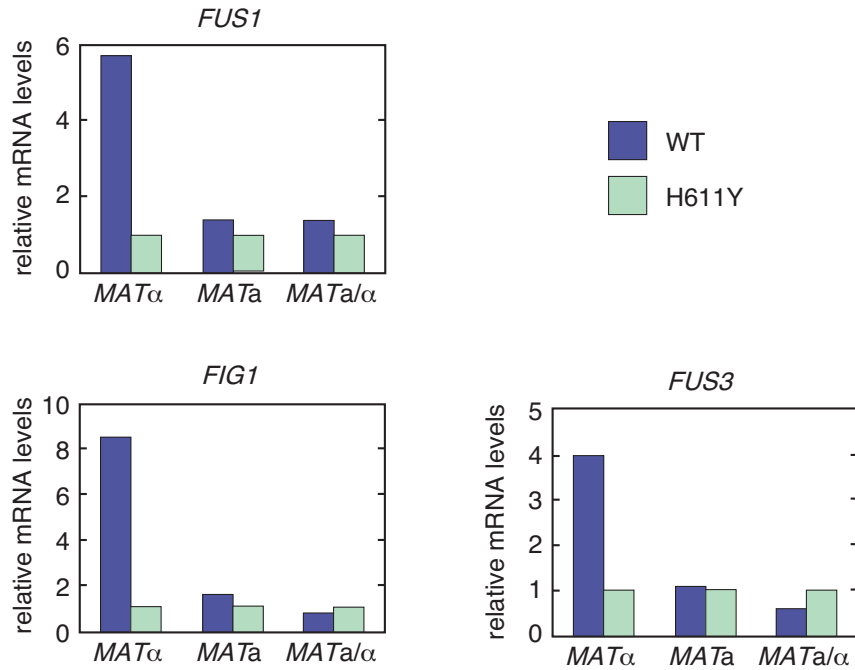


Fig. 1-7 α細胞、a細胞、二倍体細胞での tRNA ノックダウン

(A) α細胞、a細胞、二倍体細胞に D-CRD を発現する 2μ プラスミドを導入し、メチオニンを含まない固体培地上での生育を比較した。培養液を順次 2 倍希釈してスポットした。(B) これらの細胞における tRNA ノックダウンをノザンハイブリダイゼーションにより確認した。発現誘導 3 時間後の細胞から抽出した total RNA を使用した。

A



B

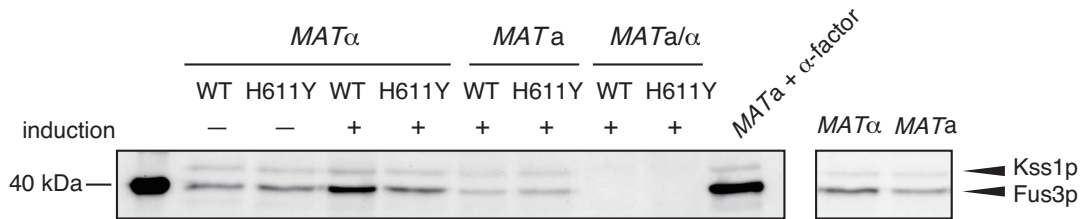


Fig. 1-8 α 細胞では接合シグナル伝達系が活性化する

(A) 各遺伝子の転写量を定量PCRにより測定し、 α 細胞、 a 細胞、二倍体細胞で比較した。それぞれの細胞における、変異型 D-CRD 発現株での *ACT1* mRNA 量に対する目的遺伝子の転写量を 1 として表した。
 (B) 抗 Phospho-p44/42 MAPK 抗体を用いて、Kss1p 及び Fus3p のリン酸化状態をウエスタンブロッティングで調べた。

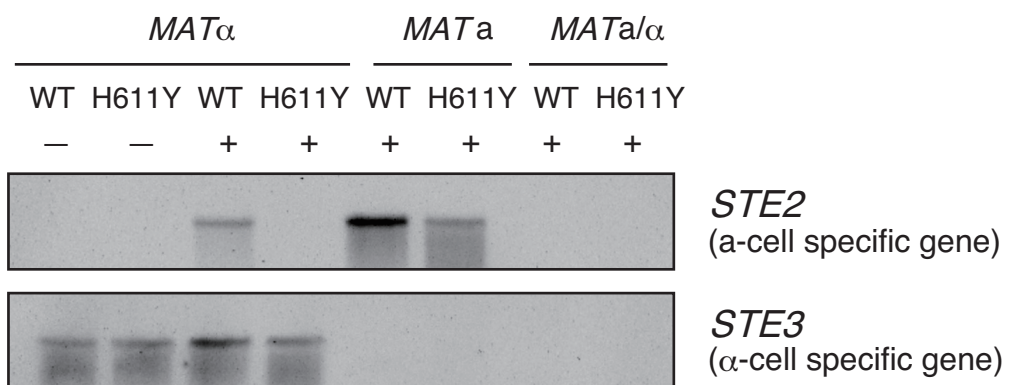


Fig. 1-9 α 細胞でのみ接合型特異的遺伝子の転写異常が起こる
 α 細胞、a細胞、二倍体細胞における *STE2*, *STE3* の転写量をノザンハイブリダイゼーションにより調べた。

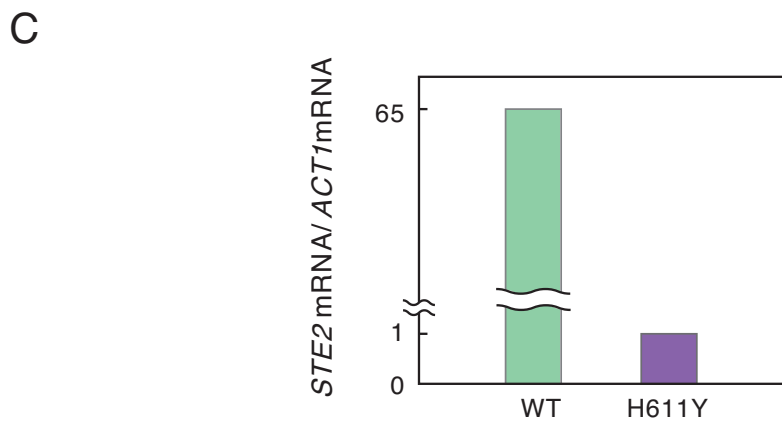
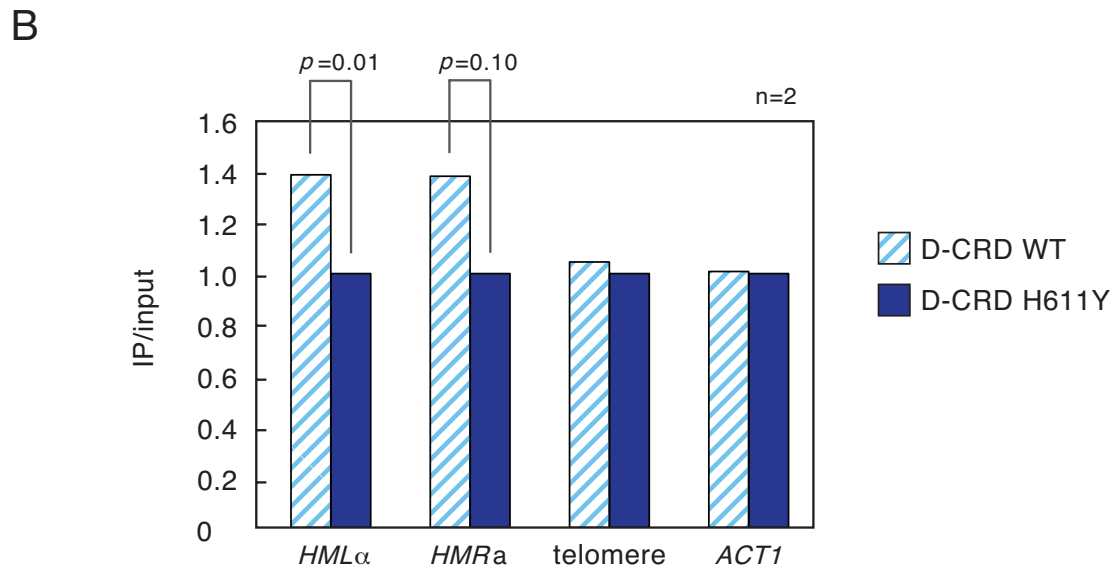
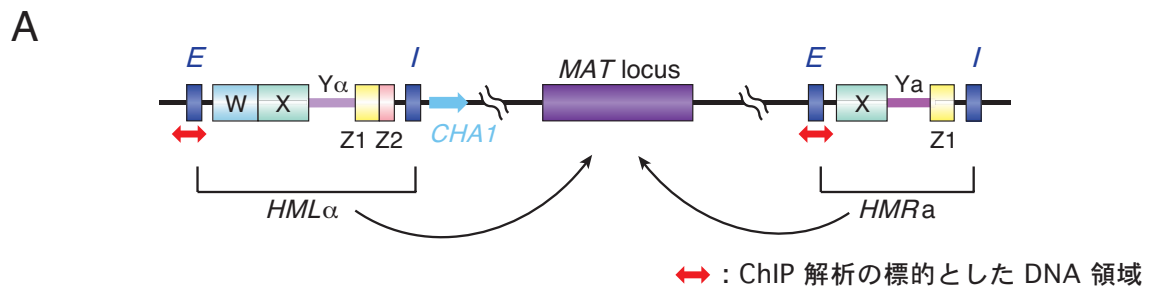





Fig. 1-10 *HML α* , *HMRa* 領域のヒストンのアセチル化が亢進する

(A) 第 III 染色体上の *HML*, *HMR*, *MAT* 遺伝子座の構造。図中の *E*, *I* は Sir1-4p によるサイレンシングに必要なエンハンサー領域である。(B) 抗ヒストン H4 Lys16 アセチル化抗体を用いた ChIP の結果。whole cell extract 中の標的 DNA 領域の量 (input) に対する、抗体で落とした免疫沈殿画分中の標的 DNA 領域の量 (IP) を、変異型 D-CRD 発現株における値を 1 とした。(C) (B) の実験に用いた細胞での *STE2* 遺伝子の転写量を定量 PCR により求めた。野生型 D-CRD 発現株における *ACT1* mRNA 量に対する *STE2* mRNA 量を 1 とした。

Table 1-2 cycloheximide 処理後の接合型特異的遺伝子の転写量の変化

		<i>STE2/ACT1</i>			<i>STE3/ACT1</i>			(h)
		0	1	3	0	1	3	
 <i>MATα</i>	mock	0.012	0.008	0.004	0.726	0.816	0.634	
	CHX	0.020	3.279	1.443	0.939	0.956	0.662	
 <i>MATa</i>	mock	0.998	0.767	0.765	0.026	0.018	0.026	
	CHX	1.226	2.920	2.478	0.034	0.482	0.427	
 <i>MATa/α</i>	mock	0.017	0.069	0.055	0.020	0.122	0.067	
	CHX	0.032	0.658	0.645	0.024	0.763	0.712	

mock に対して *STE2/ACT1* の値が 10 倍以上増えていたものを赤字で、2-10 倍に増えていたものを橙色の文字で示した。

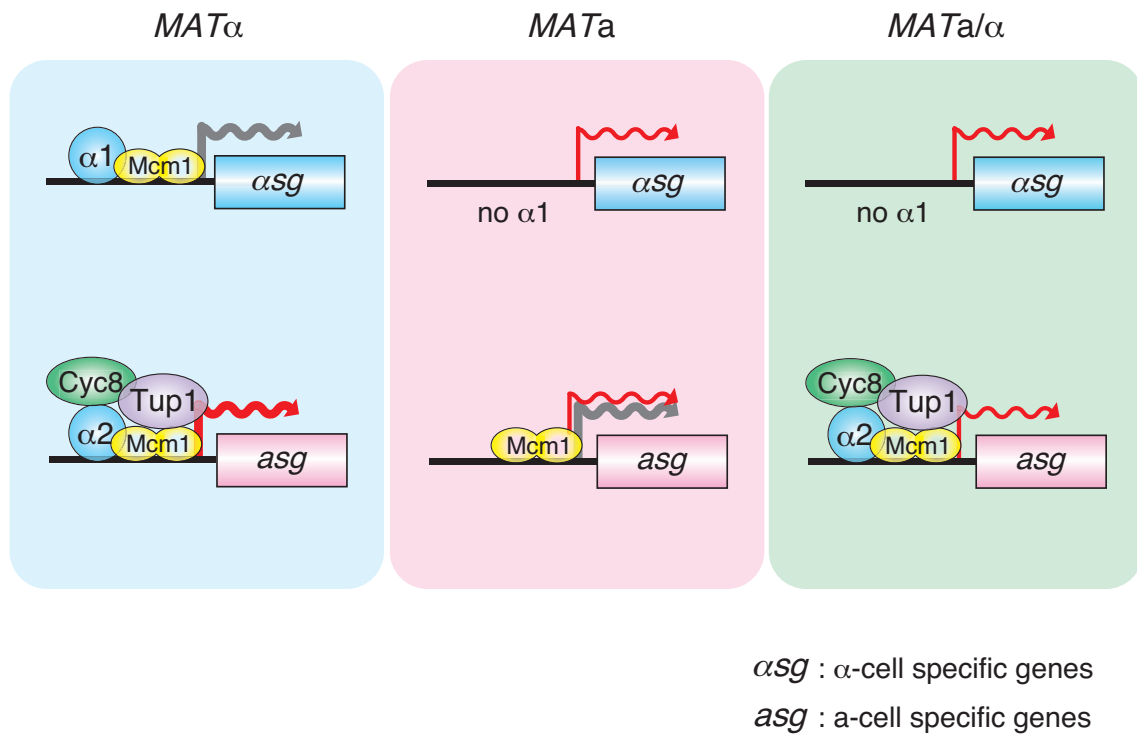


Fig. 1-11 接合型特異的遺伝子の転写調節機構

α 細胞、a細胞、二倍体細胞内での接合型特異的遺伝子の転写調節機構。tRNA ノックダウンや cycloheximide 処理で転写が活性化する様子を、赤の波線で表した。

Table 1-3 Tup1p-Cyc8p により転写調節される遺伝子

response	DNA binding repressor	target gene	D-CRD WT	D-CRD H611Y
glucose repression	Mig1p, Nrg1p	<i>GAL1</i>	169	120
		<i>GAL4</i>	17	44
		<i>SUC2</i>	3021	3080
glucose repression	Nrg1p	<i>NRG1</i>	39523	5075
		<i>NRG2</i>	12604	4430
DNA damage	Crt1p	<i>RNR1</i>	1758	3946
		<i>RNR2</i>	9869	10976
		<i>RNR3</i>	148	181
anaerobic response	Rox1pp	<i>ANB1</i>	1020	2240
osmotic stress	Sko1p	<i>GRE1</i>	324	358
		<i>AHP1</i>	26684	22641
a-cell specific genes	α 2p	<i>STE2</i>	6180	222
		<i>BAR1</i>	1921	119

マイクロアレイのデータより、発現誘導 4 時間における Cy3 (D-CRD), Cy5 (D-CRD H611Y) の蛍光強度を抽出した。

第2章 tRNA を切断するキラートキシンに対する細胞応答の解析

2-1. 序

いわゆる酵母とされる真菌の中には、他の酵母の生育を阻害する物質を生産するものが数多く見出されており、このような毒素を総称してキラートキシンと呼んでいる。キラートキシンの多くは、他の酵母の細胞内に侵入するために必要なキチン分解活性やグルカン、マンナン等に結合するドメインを持っている点で共通するが、トキシン本体の作用機構や遺伝子の構造は実に様々である。かつてはキラ酵母やキラートキシンの醸造への応用が期待され注目されたこともあったようだが、研究の最盛期を過ぎた現在では、多くのキラートキシンの作用機構が不明のままである。コリシン E5, D の酵素活性を明らかにした経緯から我々は微生物由来の tRNA 特異的リボヌクレアーゼに兼ねてから注目していた。そのような背景の中で、本研究を遂行中に酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産するキラートキシン zymocin が tRNA を標的とすることが報告された[34]。そしてこれに続き、酵母 *Pichia acacie* が生産するキラートキシン PaT も、tRNA を切断することが明らかにされた[36]。これらは真核生物の中で初めて見つかった tRNA 切断性トキシンである。

zymocin、PaT は共に、キラ酵母産生株の細胞質に存在する 2 種類の線状プラスミドから生産される (Table 2-1)。zymocin を生産する *K. lactis* に存在するプラスミドが pGKL1 と pGKL2、PaT を生産する *P. acaciae* に存在するプラスミドが pPac1-1 と pPac1-2 である[70, 71]。これらのプラスミド上には、トキシンの本体以外に、トキシンに対し免疫性を発揮し産生株自身の自殺を防ぐ immunity protein、トキシンの発現に必要な DNA polymerase や RNA polymerase、その他プラスミドの保持に必要な遺伝子等がコードされている (Fig. 2-1) [31, 72]。

zymocin は三量体タンパク質で、exochitinase 活性を持つ α -subunit、細胞内への侵入に必要な β -subunit、細胞内に侵入するトキシンの本体である γ -subunit という 3 つのサブユニットから構成されている。一方、PaT も多量体であることが分かっているが、キチンに結合する Orf1p、キラートキシンの本体である Orf2p 以外の構成については不明である。前述の論文では、zymocin の γ -subunit が $\text{tRNA}^{\text{Glu}}\text{UUC}$, $\text{tRNA}^{\text{Lys}}\text{UUU}$, $\text{tRNA}^{\text{Gln}}\text{UUG}$ を特異的に切断する活性を持つことが報告された [34]。これらの tRNA のアンチコドン一文字目には修飾塩基である $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ が存在しており、 γ -subunit はこの修飾塩基を特異的に認識し、tRNA を切断する。また PaT の Orf2p も $\text{tRNA}^{\text{Gln}}\text{UUG}$ や $\text{tRNA}^{\text{Glu}}\text{CUG}$ を切断することが報告され、PaT の場合にはアンチコドン一文字目の mcm^5U が切断に必要である [36]。どちらも tRNA 切断性トキシンであることが明らかとなったが、そもそも zymocin は感受性酵母の細胞周期を G1 期で、PaT は S 期で停止させる作用があると知られていた。PaT に関しては tRNA 切断に加えて DNA 損傷やアポトーシスを引き起こすことも知られている [73]。その他、これまでに報告されている両トキシンの作用機構や、出芽酵母から得られたトキシン耐性株の違いなどについて Table 2-1 にまとめた。特に zymocin は、これまでに様々な耐性株などが得られているが、その殆どは、zymocin が細胞内へ侵入するのに必要なタンパク質や、zymocin による認識に不可欠な tRNA の修飾を行う酵素などの遺伝子破壊株である。Table 2-1 には、このような株を除き、現時点においてキラートキシンに耐性や超感受性を付与する原因が明らかとなっていないものを記載した [74-79]。

これらのキラートキシンは、感受性菌に対して細胞毒となるため、生存戦略の一環であると予想されるストレス誘導性 tRNA 切断とは本質的に異なる。更に、tRNA 切断性サブユニットである zymocin の γ -subunit、PaT の Orf2p を細胞内で発現させても、細胞周期の G1 期、S 期停止がそれぞれ起こることにも注目し

た[35, 80]。どちらも tRNA を切断するにも関わらず、宿主に対して異なる細胞応答を引き起こす原因は何であろうか。また、PaT が感受性菌に対して DNA 損傷を誘導するのに対し、zymocin にはそうした作用を引き起こすことは報告されていない。本章では、こうした差異に注目し、その原因を探ることにした。これを調べるにあたり、キラートキシンの活性ドメイン（以降、tRNase と表す）のみを細胞内で発現させた。キラートキシン本体以外のサブユニットも感受性菌に対して影響を与えてしまうためである。前述の耐性株や超感受性株も、tRNA 切断に応答する因子ではなく、キラートキシンによる tRNA 切断以外の作用に対する細胞応答に関与するものも含まれていると考えられる。

2-2. 材料と方法

eclipse assay によるキラートキシンの活性評価

indicator strain とする出芽酵母の培養液の濁度を一様に揃え、YPD 固体培地上へスポットした。その円周上の 1 点に、爪楊枝を用いてキラー生産菌のコロニーを植菌した。培養後に見られる生育阻止円の大きさで定性的に生育阻害活性の有無を判断した。

キラートキシンの調製と生育阻止アッセイ

YPD で 30°C にて 12 時間以上培養した *K. lactis*, *P. acaciae* の培養液を 6,000 rpm で 5 分間、室温で遠心し、培養上清を得た。再度同様の条件で遠心し、キラー生産菌の混入を最小限に抑えた。この培養上清を Vivaspin (3,000 MWCO, Viva science) を用いて 5,500 rpm, 4°C で遠心し、これをキラートキシン濃縮液とした。遠心は、*K. lactis* の培養上清は約 2 時間、*P. acaciae* は約 2 時間半行った。

生育阻止アッセイは 24 穴プレートを用いて以降の手順で行った。指示菌として TM142 を用い、YPD での培養液の 660 nm における濁度を 0.8 に合わせた。これを YPD で更に 10 倍希釈したものを指示菌液とし、24 穴プレートに分注した。各ウェルに適宜希釈したキラートキシニン濃縮液を加え、30°C で静置培養しつつ、経時的にサンプリングして濁度や生菌数を測定した。

フローサイトメーターによる細胞周期解析

キラートキシンを作用させた出芽酵母の細胞周期解析には、FACSCalibur (BD) と、解析ソフトウェアとして CellQuest (BD) を用いた。これらは東京大学分子細胞生物学研究所染色体動態研究分野のものを使わせて頂いた。

サンプルの調製方法は以下の通りである。集菌した細胞を PBS で 1 回洗浄した後、70% エタノール中で-20°C にて一晩固定した。これを集菌後、PBS で 2 回洗浄し、400-600 μ L の PBS に再懸濁し、10-15 秒間超音波処理した。続いて終濃度 0.5 mg/mL となるように RNaseA を添加して 30°C で一晩静置した後、0.025 mg/mL となるように propidium iodide を加え、遮光して 4°C で 10 分間インキュベートした。最後に細胞を PBS で 1 回洗浄し、適量の PBS に再懸濁したものを FACS 解析に用いた。

D-CRD, γ -subunit, Orf2p 発現株の作製

はじめに、D-CRD, γ -subunit, Orf2p をコードする遺伝子を PCR で増幅し、2 μ プラスミドである pGML20 の *Xba*I, *Sac*I サイトに組込んだ。 γ -subunit, Orf2p の PCR には、それぞれ *K. lactis*, *P. acaciae* から抽出したプラスミド DNA を鋳型として用いた[81]。続いてこのプラスミドを、*GAL1* プロモーターと、挿入した遺伝子、及び *ADH1* ターミネーターを含むように *Sph*I と *Eco*RV で消化し、染色体組込み型プラスミドである pAUR101 (TaKaRa) の *Sph*I, *Sma*I サイトへクローニングした。完成したプラスミドで CG379 を形質転換し、0.5 μ g/mL の Aureobasidin A を含む YPD 上でコロニーを選択した後、コロニーPCRにより目的遺伝子が染色体上に挿入されていることを確認した。形質転換の方法は pAUR101 に添付のプロトコールに従った。

D-CRD, γ -subunit, Orf2p の発現誘導

使用した培地の組成は論文の最後にまとめて記載した。本実験では galactose により発現が誘導される *GAL1* プロモーターを tRNase の発現に使用しているため、前培養液には raffinose を、発現抑制には glucose を、発現誘導には galactose をそれぞれ使用した。

2 μ プラスミドである pGML20 から発現させる場合は、SRaff 培地にて前培養を行ったのち、SD 培地若しくは SG 培地上に、順次 5 倍希釈したものをスポットした。或いは、SRaff 培地での培養液に、終濃度 2% となるように glucose または galactose を添加した。

tRNase 遺伝子を染色体へ組換えさせた株での発現方法は次の通りである。各 tRNase 発現株を YPD で終夜培養したのち、YPRaff 培地へ 1% 接種した。6-8 時間振盪培養後、OD₆₆₀=0.2-0.3 の時に、2% galactose を加えることで、tRNase の発現を誘導した。液体培地上で発現させる時は、YPRaff 液体培地で培養した株を、順次 5 倍希釈して YPD や YPGal 培地へスポットした。

ヒストン H2A Ser129 残基の特異的リン酸化の検出

タンパク質の調製方法やウエスタンブロッティングの方法は 1-2 に記した通りである。ヒストン H2A のリン酸化を検出するために、Rabbit polyclonal to Histone H2A (phospho S129) (Abcam) を使用した。またコントロールとしてヒストン H2A を検出するために、anti-Histone H2A (BioLegend) を使用した。二次抗体には何れも Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate (Upstate) を使用し、ECL-plus (Amersham Pharmacia Biotech) 及び LAS-1000plus (FUJI FILM) によりバンドを検出した。

また、この実験に使用した zymocin は、共同研究者である北本らがキチンカラムを用いて精製したものであり、TM142 の培養液に対して 1/1500 量の zymocin 溶液を添加し、振盪培養を行った。zymocin 溶液の添加量は次のような予備実験に基づいて決定した。200 μL の YPD に TM142 の培養液 1 μL と、zymocin 溶液を添加し、静置培養を行った。16 時間後、感受性菌の濁度が zymocin を加えていないサンプルの 10 分の 1 以下になるときの、培地に対する zymocin 希釈率が 1/1500 であった[35]。

2-3. 結果と考察

2-3-1. 出芽酵母の実験室株に対するキラートキシンの作用

キラ酵母は実験室株に対しても生育阻害を引き起こす

キラ酵母の研究には、その表現型の追い易さから、感受性の高い出芽酵母株が用いられている。例えば LS20 株, LL20 株, KY117 株などの出芽酵母株がそれに相当する。また GS1731 株は、対数増殖期の初期において一度に複数出芽する性質 (multi-budding) を持っており、やはりキラ酵母への感受性が高いことからこれを好んで使う研究グループもある[82]。株によって感受性の強さが異なる原因を追究した報告は無いが、GS1731 のような株の性質から見ると、細胞壁中のキチンの含有量が多いと感受性が高くなるのだと考えられる。従って、キラートキシンの引き起こす生育阻害や細胞周期停止は、それらの株に起こる限定した現象である可能性がある。そこで先ず、出芽酵母の標準的な実験室株にキラを作用させ、その表現系を調べた。

指示菌として、TM142, BY4742, CG379, GS1731 を使用した。各株の遺伝子型については本論文の最後に記した。TM142 は、出芽酵母のゲノム解読に用いられた S288C の派生株である[83]。また BY4742 は、EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis) により全非必須遺伝子についてその一遺伝子破壊株が作出されたことから、実験室株として広く使用されるようになった。CG379 については 2-3-2 で詳しく述べる。

これらの株のキラ感受性を eclipse assay により調べた結果、*K. lactis* は、指示菌として用いた全ての株に対して halo を形成した (Fig. 2-2A)。一方 *P. acaciae* は GS1731 対しては明らかな halo を形成したが、BY4742 と CG379 に

対しては、ごく僅かに形成する程度であった。*P. acaciae*は*K. lactis*より殺菌活性が低いと思われる。

*P. acaciae*は eclipse assay で判断する限りでは、TM142 に対して生育阻害活性を示さなかった。但し eclipse assay は、感受性菌がコロニーを形成するまで培養を続ける必要があり、作用させてから早い段階で一過的に生育阻害効果がある場合には、eclipse assay では halo は見られない。そこで、液体培地にキラートキシンを添加することで、短時間での生育阻害の有無を定量的に見られるのではないかと考えた。キラートキシン濃縮液として、*K. lactis* の培養上清を約 28 倍に濃縮したもの、及び *P. acaciae* の培養上清を約 11 倍に濃縮したものを、それぞれ zymocin 溶液、PaT 溶液とした。このトキシン溶液を、TM142 の YPD 希釈液に対して 1/25 から 1/100 量となるように接種し、6 時間後の濁度を測定した。その結果、PaT の添加によって TM142 の生育が阻害されていることが確認できた (Fig. 2-2B)。

zymocin, PaT は TM142 に対しても細胞周期停止を引き起こす

次に、感受性株として TM142 を用い、キラートキシン添加後の viability を測定したところ、zymocin, PaT の添加により viability が低下することが確認された (Fig. 2-3A)。なお、zymocin は、約 28 倍に濃縮したものを培地に対して 1/50 量、PaT は約 11 倍に濃縮したものを培地に対して 1/11 量添加した。この実験において PaT による生育活性は zymocin よりも低かったが、一時的ではあるが TM142 の生菌数が下がっているため、トキシンとして働く上ではニッチを獲得するのに十分な活性を保持していると考えた。

続いて、経時的に viability を計測した細胞について FACS 解析を行った。FACS のヒストグラムは、縦軸が細胞数を、横軸が核染色に使用した propidium iodide

の蛍光強度を表す。その結果、zymocin を与えてから 9 時間後の TM142 では、細胞周期の特異的な停止が見られた (Fig. 2-3B)。ピークの位置がやや右にずれているのは、核の蛍光強度が高くなっていることを表している。このとき、顕微鏡で観察してみると出芽していない細胞が集団の殆どを占めているため、これは G1 期停止である[84]。細胞の形態としては G1 期で停止しているが、DNA 複製を開始した直後に細胞周期が停止しているのではないかと考えられる。またこのときの解析データについて、細胞の大きさを表す前方散乱光の強度を横軸にしたものを Fig. 2-3B に示す。これを見ると、細胞のサイズが大きくなっていることが分かる。一方、PaT を作用させた細胞では、S 期で細胞周期が停滞している傾向は見られたものの、完全な S 期停止では無かった。PaT による S 期停止を最初に報告している論文では、キラー感受性株として古くから使われている KY117 が使用されており[35]、TM142 はこれに比べて感受性が低いために完全な S 期停止が起こらなかったのではないだろうか。

以上の実験により、zymocin, PaT による生育阻害及び細胞周期停止が実験室株においても再現されたことから、以降の解析を行った。

2-3-2. tRNA 切断性サブユニット発現株の細胞応答の比較

γ -subunit 発現コンストラクトの検討

γ -subunit の N 末端側には、生産菌内において細胞外分泌経路へソーティングされるために必要な、分泌シグナル配列がついている (Fig. 2-4A)[31]。この分泌タグは、細胞内発現のためには不要であり、更には疎水性であるため、 γ -subunit の発現に阻害的に影響する可能性が考えられた。またウエスタンブロッティングを行うために、Flag tag (DYKDDDDK) を付加する必要があった。そこで、分泌

シグナル配列や Flag tag の有無、Flag tag を N 末端と C 末端の何れに付加させるかについて、幾つかの組み合わせによるコンストラクトを作製し、実際に発現させて生育を比較することで評価した。この実験には、 2μ プラスミドである pGML20 にクローニングしたものをを用いており、SD 培地及び SG 培地上で生育を調べた。なお、過去に γ -subunit の細胞内発現による G1 期停止を報告している論文では、分泌シグナル配列を含む完全長のものを、epitope tag 等を付加せずに発現させている[80]。

Flag tag を持たず、且つ分泌シグナル配列を持つ完全長のもの、及び、Flag tag も分泌シグナル配列を持たないコンストラクトは、SG 培地上で互いに同程度の生育阻害活性を示した (Fig. 2-4B)。これに対し、シグナル配列を欠失させ、N 末端に Flag tag を付加したコンストラクトの生育阻害活性は若干低下した。逆に、シグナル配列を欠失させ、C 末端に Flag tag を付加すると、僅かな差ではあるが生育阻害活性が高まった。しかしながら、この改変 γ -subunit 発現株では tRNA 切断活性が見られなかった。この理由は分からないが、発現させた γ -subunit の refolding が正しく行われおらず、タンパク質の凝集が起こり、これが細胞毒性を示しているのではないかと考えている。また完全長の γ -subunit の C 末端に Flag tag を導入した株では、生育阻害が殆ど見られなかった。C 末端側に tag を付けると、活性が阻害されることが分かった。

以上の結果から、N 末端に Flag tag を持ち、シグナル配列を欠いたコンストラクトを、以降の実験に用いることとした。

Orf2p 発現コンストラクトの検討

Orf2p についても γ -subunit と同様に、シグナル配列の有無や Flag tag について発現コンストラクトの最適化を行った。Orf2p の N 末端側にも、 γ -subunit と

同様に、生産菌内において細胞外分泌経路へソーティングされるために必要な分泌シグナル配列がついている (Fig. 2-4A)。Orf2p の分泌シグナル配列は N 末端から数えて 13 番目の Gly までであると推定されているが[35]、シグナルペプチドの配列予測プログラムである SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) で独自に検証したところ、18 番目の Cys までと予測された。そこで、N14 から始まるもの、そして L19 から始まるものと、Flag tag 配列を組み合わせたコンストラクトを作製し、生育を調べた。その結果、N19 から始まるコンストラクトは、N 末端に Flag tag を付けた場合も C 末端に Flag tag を付けた場合も生育阻害活性が低かった (Fig. 2-4C)。一方 N14 から始まるコンストラクトでは、Flag tag の有無によらずほぼ同程度に生育が阻害されていた。また Flag tag を付加していない N19 コンストラクトも、僅かではあるが N14 と比較して生育阻害活性が低かった。このことから、C 末端側に Flag tag を付加した N14 から始まるコンストラクトを以降の実験に使用した。なお Orf2p については、分泌シグナル配列を含む完全長のものを細胞内で発現させた例は無い。

tRNA の切断によりコロニー形成が阻害される

2 μ プラスミドである pGML20 に各 tRNase 遺伝子を組込み、これを TM142 へ導入した株について、tRNase を発現させた際の生育を固体培地にて調べた。すると、D-CRD, γ -subunit, Orf2p の発現誘導により、コロニー形成が阻害された (Fig. 2-5A)。このうち、 γ -subunit による生育阻害の程度は、D-CRD 及び Orf2p 発現株に比べるとやや低かった。ところがこれらの株について、液体培地にて発現誘導を行い、12 時間後の細胞を用いて FACS 解析を行ったが、何れの細胞においても細胞周期停止が見られなかった (Fig. 2-5B)。なお、これらの株において、

tRNase が発現していること、及び tRNA の切断が起こっていることは、それぞれウエスタンブロッティング、ノザンハイブリダイゼーションにより確認している。

そこで次に、 γ -subunit の発現で細胞周期停止が起こることが報告されている CG379 の染色体に各 tRNase 遺伝子を組み込み、同様にコロニー形成能の比較と FACS 解析を行った。CG379 は galactose の資化性が良いと言われている実験室株であり、 γ -subunit の細胞内発現では、発現誘導 12 時間後に G1 期停止が起こると報告されている[80]。また zymocin を酵母に与えた場合も、細胞周期の G1 期停止が起こるまでに 8-10 時間を要することが分かっている[32, 80]。GAL1 プロモーターは発現誘導を行ってから実際に目的タンパク質が発現するまでの時間が比較的長いと言われていることから[85]、galactose 資化性の高い CG379 が使われたようである。なお、TM142 と CG379 の液体培地での増殖を比較したが、YPGal 培地だけではなく、YPD 培地においても CG379 の生育速度は速かった。はじめに、tRNase 発現株の生育を固体培地上で比較したところ、Orf2p 発現株と D-CRD 発現株のコロニー形成はほぼ完全に抑制されていた (Fig. 2-6A)。ところが、 γ -subunit 発現株では、コロニー形成の阻害の程度は僅かであった。また、この実験では分泌シグナル配列を含む完全長の γ -subunit, Orf2p を発現する株も使用した。するとこれらの株では、固体培地上の生育阻害が全く起こらなかった。 γ -subunit については、分泌シグナル配列を含む完全長のものを発現させても生育阻害が起こることが報告されていることから、N 末端側の Flag tag とその直後に分泌シグナル配列を持つことで活性を持たなくなってしまったと考えられる。Orf2p も、Flag tag と分泌シグナル配列を両方持つことで活性が無くなってしまったが、分泌シグナル配列自体が活性を失った原因である可能性も考えられる。以降は、分泌シグナル配列を含む完全長の γ -subunit, Orf2p 発現株は使用していない。

D-CRD, γ -subunit, Orf2p の発現により、標的とする tRNA をそれぞれ切断していることを、ノザンハイブリダイゼーションにより確かめた (Fig. 2-6B)。興味深いことに、tRNA 切断の経時的なパターンが何れの株も異なっていた。 γ -subunit 発現株では発現誘導後 8 時間と 12 時間の時に tRNA が多く切断されており、D-CRD 発現株では 4 時間のときに tRNA 切断が最も多く観察された。一方 Orf2p 発現株では、発現誘導後 4 時間の時にのみ tRNA の切断片が検出された。なお、ウエスタンブロッティングでは各 tRNase の発現は確認出来なかった。D-CRD を低コピープラスミドから発現させた時もウエスタンブロッティングで D-CRD のバンドを検出することが出来なかったことから[86]、発現量が低いためだと考えられる。

γ -subunit, Orf2p の発現により細胞周期停止が起こる

液体 YPGal 培地にて発現誘導を行った後、発現誘導 8 時間後と 12 時間後の細胞について FACS 解析を行った (Fig. 2-7A)。野生型 D-CRD 及び変異型 D-CRD 発現株のヒストグラムは、tRNase 遺伝子を導入していない CG379 野生株と同じであり、特定のフェーズでの細胞周期停止は見られなかった。これに対し γ -subunit 発現株は、発現誘導 12 時間後の時に G1 期停止していた。なお、 γ -subunit の発現による G1 期停止は、宿主を TM142 とした場合にも観察できた。一方 Orf2p 発現株は、PaT を培養液に加えたときと同様で、完全な S 期停止は見られなかったが、S 期や G2/M 期にある細胞の数が増えている様子は捉えられた。

次に、FACS 解析に使用した細胞について、エタノール固定する前のサンプルを光学顕微鏡で観察したものを Fig. 2-7B に示した。これを見ると、 γ -subunit の発現株では細胞のサイズが増大した状態で G1 期停止していることが分かる。これは、zymocin 溶液を与えた時に観察された結果と同じである (Fig. 2-3C)。

zymocin や γ -subunit により G1 期停止した細胞では細胞サイズが増すことは既に報告されており、それ故、tRNA が切断されてもタンパク質合成の低下が起こらないと言われている[32]。

Orf2p 発現株では α 細胞特異的遺伝子の転写が起こる

各 tRNase 発現株の発現誘導 12 時間後の顕微鏡画像を見ると、D-CRD 発現株と Orf2 発現株では細胞が凝集しているように見えた (Fig. 2-7B)。第 1 章で報告したように、D-CRD を α 細胞で発現させると α 細胞特異的遺伝子の転写が活性化するため、これは接合の際に起こる性的凝集ではないかと考えた。そこで、これらの発現株における *STE2* の mRNA 量を定量 PCR により算出した。これに先立ち、CG379 の染色体に tRNase 遺伝子を組込んだ株において、発現誘導後に *STE2* の転写量が最も高くなる点を、野生型 D-CRD 及び変異型 DM-CRD 発現株より調製した RNA を用いて調べた。その結果、D-CRD の発現誘導後 4 時間の時に転写量が最も高くなることが分かった (Table 2-2)。この結果より、発現誘導 4 時間後に各 tRNase 発現株より RNA を調製し、*STE2* の転写量を調べた。CG379 野生株における *ACT1* の転写量に対する *STE2* の転写量を 100 としたところ、D-CRD 発現株では *STE2* 発現量が最も高く、また Orf2p 発現株でも転写活性化が認められた (Table 2-3)。しかし、 γ -subunit 発現株では *STE2* の転写活性化は起こらなかった。なお、ノザンハイブリダイゼーションにより、D-CRD, γ -subunit, Orf2p 発現株において発現誘導 4 時間後のときに tRNA 切断が起きていることを確認しているが (Fig. 2-6B)、*STE2* の転写に関してはこのような違いがあることが分かった。

α 細胞における α 細胞特異的遺伝子の転写活性化は、cycloheximide で処理した細胞でも起こることから (Table 1-2)、タンパク質合成の低下に対する細胞応答

である。このことから、 γ -subunit の発現は、tRNA を切断してもタンパク質合成阻害を引き起こさないか、引き起こしたとしても極めて低い程度なのではないかと考えた。これの裏付けとして、tRNA 切断がタンパク質合成の低下を引き起こすと、tRNase 自身の発現量も低下するため、tRNA の切断が次第に起こらなくなるはずである。実際に、D-CRD を発現させた場合には、発現誘導をかけた初期の方が tRNA の切断量が多いことがノザンハイブリダイゼーションの結果より見て取れる (Fig. 1-4, 2-6B)。これに対し、 γ -subunit 発現株では tRNA の切断は発現誘導を行っている間、次第に増えている (Fig. 2-6B)。また顕微鏡による観察でも、 γ -subunit 発現株では細胞のサイズが少し大きくなっていた (Fig. 2-7B)。*STE2* mRNA の定量は、D-CRD 発現株での結果を基準としたことから、発現誘導 4 時間後のサンプルのみ解析を行った。従って、 γ -subunit では発現誘導 8 時間後や 12 時間後に *STE2* の転写が活性化する可能性も考えられる。しかし、tRNA 切断が常に観察されるというノザンハイブリダイゼーションの結果から、 γ -subunit 自身の発現が滞っていないことが分かり、従って γ -subunit はタンパク質合成を阻害しないと考えた。

γ -subunit を *2 μ* プラスミドから発現させた場合と、ゲノムから発現させた場合では、コロニー形成の阻害の程度が異なっていた (Fig. 2-5A, 2-6A)。ゲノムから発現させた場合、完全培地 (YPGal) で発現誘導を行うと G1 停止が起こるが、最少培地 (SG) では細胞周期停止が起こらないことを確認している。*2 μ* プラスミドから発現させる場合には、プラスミドを保持させるために最少選択培地で培養する必要があり、このために細胞周期停止が起こらなかったと考えられる。つまり、細胞周期停止が起こらない条件では固体培地でのコロニー形成能が低く、細胞周期停止が起こる条件では固体培地上での生育が良いと言える。これは、キラー毒素に対して細胞周期停止という応答を示すことが出来ると、結果として固体培地上で生存することができることを表しているのではないだろうか。DNA

損傷が起きた場合、細胞周期を停止できない株では DNA 修復が行えず、やはり固体培地上での生育が悪くなる。従って zymocin によって引き起こされる G1 期停止は、感受性出芽酵母が獲得した防御機構であると考えることが出来る。

Orf2p の発現により DNA 損傷が起こる

これまでの実験結果より、(1) D-CRD の発現ではタンパク質合成が低下し、細胞周期の特異的なフェーズでの停止は起こらない (2) γ -subunit の発現ではタンパク質合成は低下しないが、G1 期停止が起こる (3) Orf2p の発現ではタンパク質合成が低下し、細胞周期は S 期で停滞する という、三者三様の応答を示すことが分かった。D-CRD と Orf2p では共にタンパク質合成が低下するが、a 細胞特異的遺伝子の転写量には数倍の違いがある (Table 2-3)。PaT は、感受性酵母に対し DNA 損傷を引き起こし、これにより DNA 損傷チェックポイントである Rad53p のリン酸化が起こることが報告されている [73]。また、DNA 二重鎖切断修復に関わる Rad52p、DNA 一本鎖修復における塩基除去修復に関わる Apn1p, Apn2p をコードする遺伝子を破壊すると、zymocin, PaT に高感受性となる (Table 2-1) [79]。PaT が tRNA 切断性トキシンであることを報告した Meinhardt のグループは、これらの報告と併せ、tRNA の切断が引き金となって副次的に DNA 損傷が引き起こされたり、或いは tRNA 切断に対する細胞応答に DNA 損傷修復因子が関わっているのではないかと主張している [36, 77, 79]。そこで D-CRD, γ -subunit, Orf2p 発現株において DNA 損傷が起こるかどうかを、ヒストン H2A Ser129 のリン酸化を指標として調べた。一般にヒストンのリン酸化は DNA 損傷の直後に最も早く起こる応答で、損傷を与えてから 30 分以内に観察される [87]。出芽酵母においては、損傷部位周辺のヒストン H2A が Mec1p や Tel1p などのキナーゼによりリン酸化され、これが損傷修復のための目印となり、他の

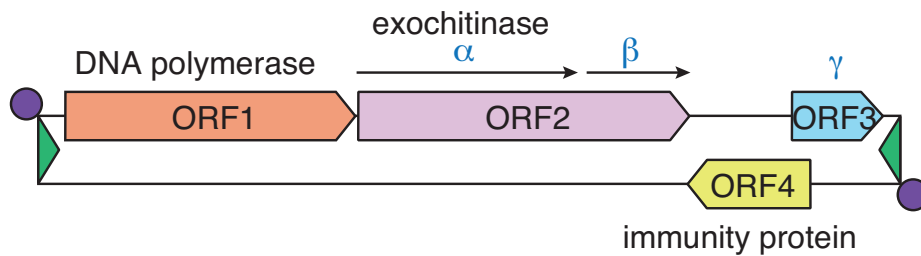
損傷修復タンパク質がリクルートされる[88, 89]。リン酸化されたヒストン H2A Ser129 に特異的に結合する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、Orf2p 発現株でのみ強いバンドが検出された (Fig. 2-8A)。D-CRD, γ -subunit 発現株ではリン酸化は起こらなかったことから、これは Orf2p に特異的な応答であり、tRNA 切断に付随して起こる普遍的な現象では無いと考えた。寧ろ、Orf2p は DNA 切断活性を有していると推測された。これについては第 3 章で検証する。

一方、DNA 修復系のうち non-homologous end joining (NHEJ) において切断された DNA の末端に結合するタンパク質 Yku70p, Yku80p をコードする遺伝子を破壊すると、zymocin, PaT に対して低感受性となることが報告されている (Table 2-1) [36, 77]。これらのメカニズムは明らかにされていないが、少なくとも γ -subunit や Orf2p を細胞内発現させた場合には共通の細胞応答は示さないことから、キラートキシンを外から与えた場合には DNA 損傷の誘導という共通した現象が起こるのではないかと考え、zymocin についてこれを検証した。その結果、zymocin を添加して 2 時間後には、ヒストン H2A のリン酸化が起こっていることが分かった (Fig. 2-c)。zymocin の生育阻害活性の本体である γ -subunit は DNA 損傷を引き起こさないことから、zymocin を構成するその他のサブユニットに DNA 損傷を起こす活性を持つものが含まれるのだろうか。zymocin の β -subunit の機能や感受性細胞内での γ -subunit の局在が明らかとなっていないため、この可能性を否定することは出来ない。しかし、北本らによれば、zymocin を高濃度で与えると細胞周期の G1 期停止が起こらず、また同時に propidium iodide で DNA を染色して観察すると、核内の DNA が断片化している様子が見られると言う。このことから、zymocin を高濃度で与えると、アポトーシスによる DNA 断片化が起こり、これに対する部分的な応答としてヒストン H2A のリン酸化が起こるのではないかと考えられる。

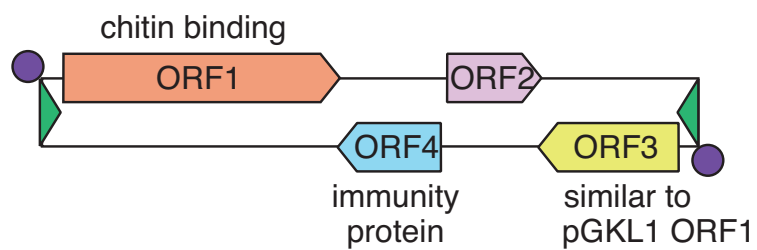
Table 2-1 zymocin と PaT の諸性質のまとめと比較

	zymocin	PaT
キラー生産菌株	<i>K. lactis</i> IFO1267	<i>P. acaciae</i> NRRL Y-18665
キラープラスミド	pGKL1, pGKL2	pPac1-1, pPac1-2
キラー毒素の構造	α -subunit, β -subunit, γ -subunit	Orf1p, Orf2p, ?
subunit のサイズ	99 kDa, 30 kDa, 27.5 kDa	110 kDa, 38 kDa, 39 kDa ?
標的 tRNA	tRNA ^{Glu} UUC, tRNA ^{Lys} UUU, tRNA ^{Gln} UUG	tRNA ^{Gln} UUG, tRNA ^{Glu} CUG
認識部位	mcm ⁵ s2U	mcm5U
感受性酵母の細胞周期	G1 期停止	S 期停止
耐性株	<i>sir1-4</i> , <i>yku70</i> , <i>yku80</i>	<i>sir1-4</i> , <i>yku70</i> , <i>yku80</i>
multi-copy suppressor	<i>MATa</i> , <i>MATα</i>	
超感受性株	<i>rad52</i> , <i>spt3</i> , 7, 20, <i>gcn5</i> , <i>ada2</i> , 3 <i>swi2</i> , 3, 5, 6, <i>ccr4</i> , <i>caf1</i> , <i>not4</i> , 5, <i>apn1</i> , 2	<i>rad51</i> , 52, 55, 59, <i>sgs1</i> , <i>mus81</i> , <i>apn1</i> , 2, <i>mag1</i> , <i>rad6</i> , 18, 5
その他の作用		Rad53p のリン酸化、アポトーシス

■ pGKL1 (8,874 bp)



■ pPac1-2 (6785 bp)

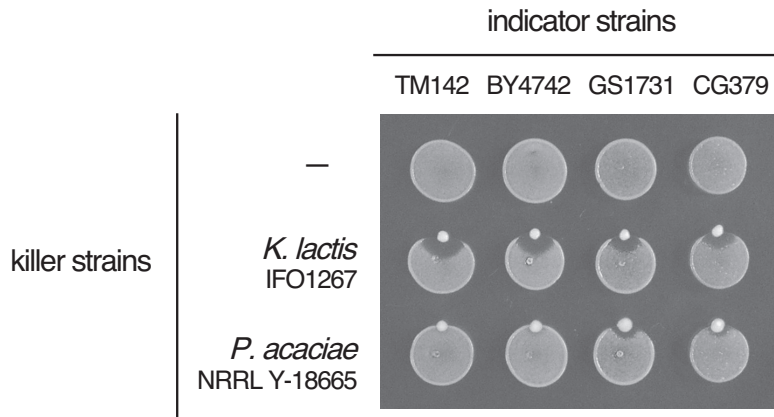


● : terminal protein

▶ : terminal inverted repeat

Fig. 2-1 キラートキシンの細胞質性プラスミド pGKL1 と pPac1-2 の構造
zymocin をコードする *K. lactis* の pGKL1、及び PaT をコードする *P. acaciae* の pPac1-2 の構造を示した。

A



B

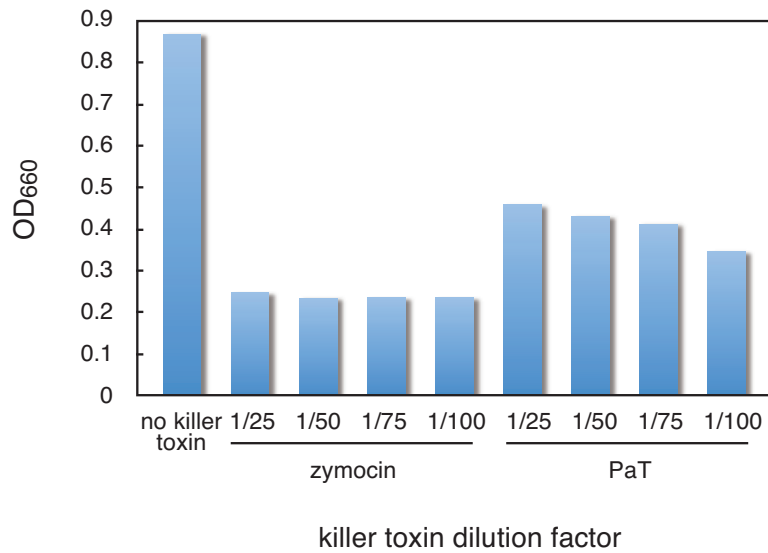


Fig. 2-2 キラートキシンに対する出芽酵母の感受性の確認

(A) *K. lactis* 及び *P. acaciae* による 4 種類の出芽酵母の生育阻害の様子を YPD 培地上での eclipse assay により調べた。(B) 液体培地でのキラートキシンによる生育阻害の確認。YPD で希釈した TM142 の培養液にキラートキシンを与え、静置培養して 6 時間後の濁度を示した。培地に対するキラートキシンの希釈率を横軸に示した。

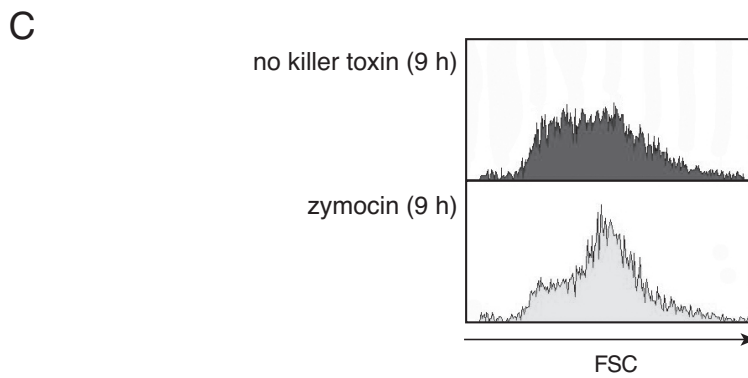
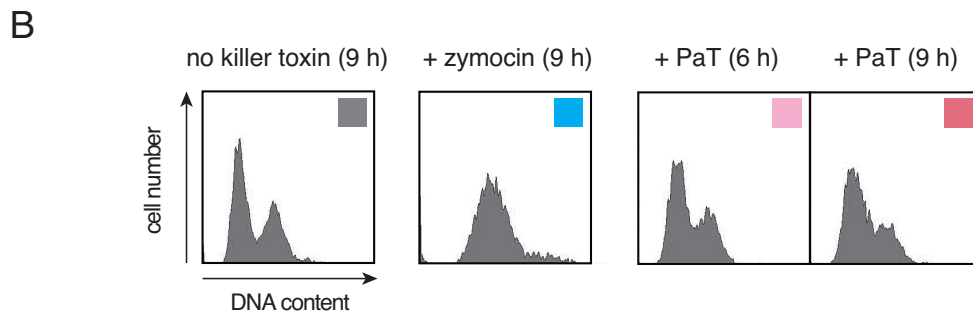
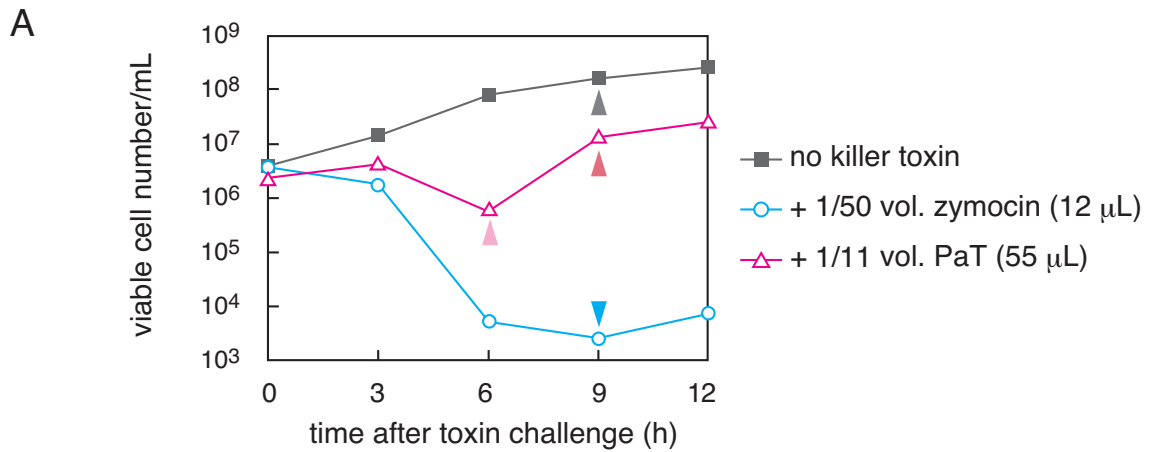


Fig. 2-3 TM142 に対するキラー毒素の作用

(A) zymocin, PaT を TM142 の培養液に与え、静置培養における生菌数を経時的に調べた。(B) (A) の実験において、矢じりで示す点において細胞を別に採取し、FACS 解析を行った。(C) (B) の解析におけるトキシン添加後 9 時間のデータについて、縦軸に細胞数を、横軸に前方散乱光 (FSC) を取ったヒストグラムを示す。

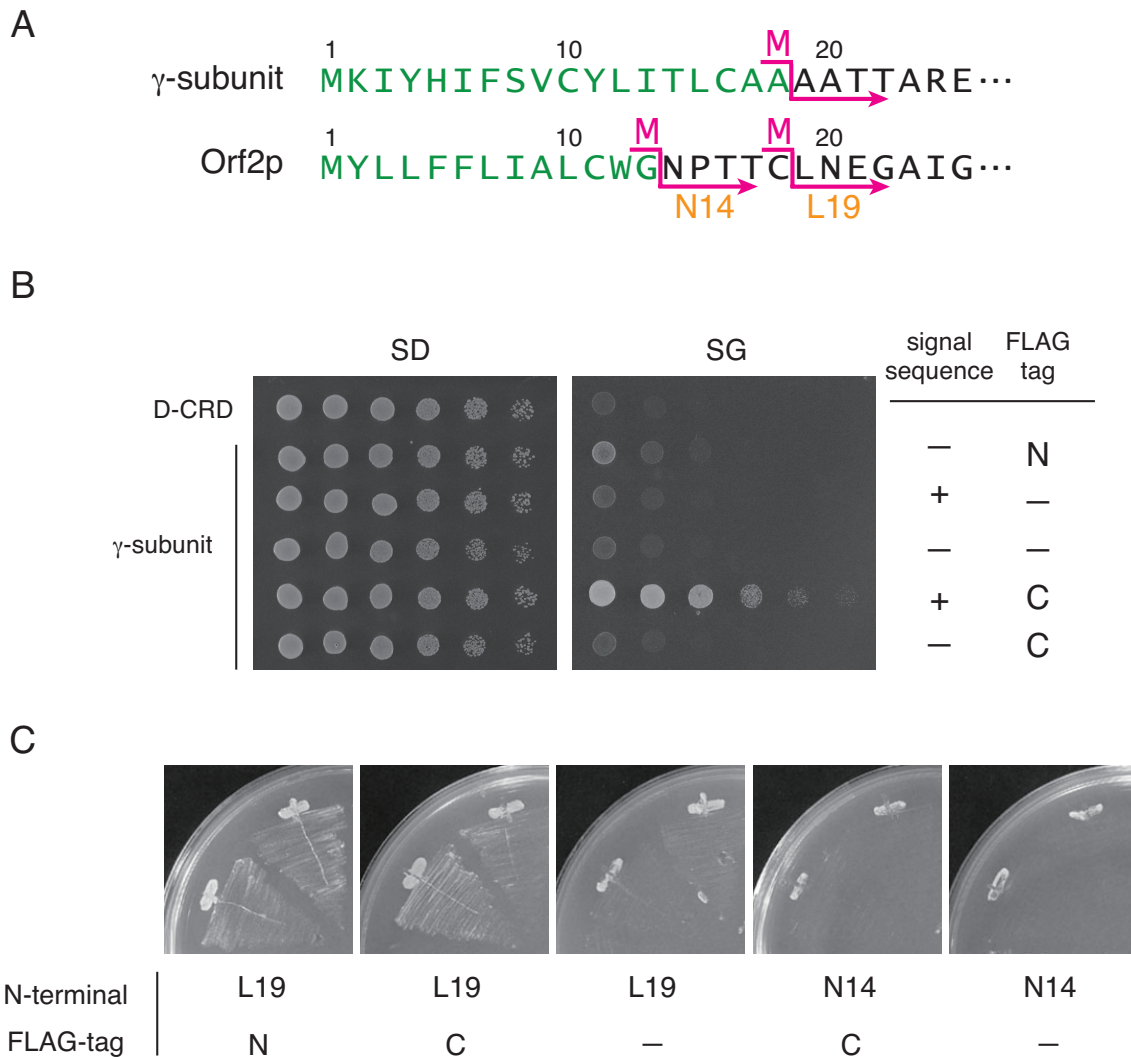


Fig. 2-4 細胞内発現コンストラクトの検討

(A) zymocin γ -subunit 及び PaT Orf2p の N 末端のアミノ酸配列の比較。緑色で示す文字は推定されている分泌シグナル配列を表す。Orf2p はシグナル配列の位置に関して 2 種類のコンストラクトを作製した。(B) γ -subunit 発現株のコロニー形成能の比較。培養液を順次 5 倍希釈しスポットした。(C) Orf2p 発現株のコロニー形成能の比較。得られた形質転換体から 2 つコロニーを選択し、SG 培地へストリークした。

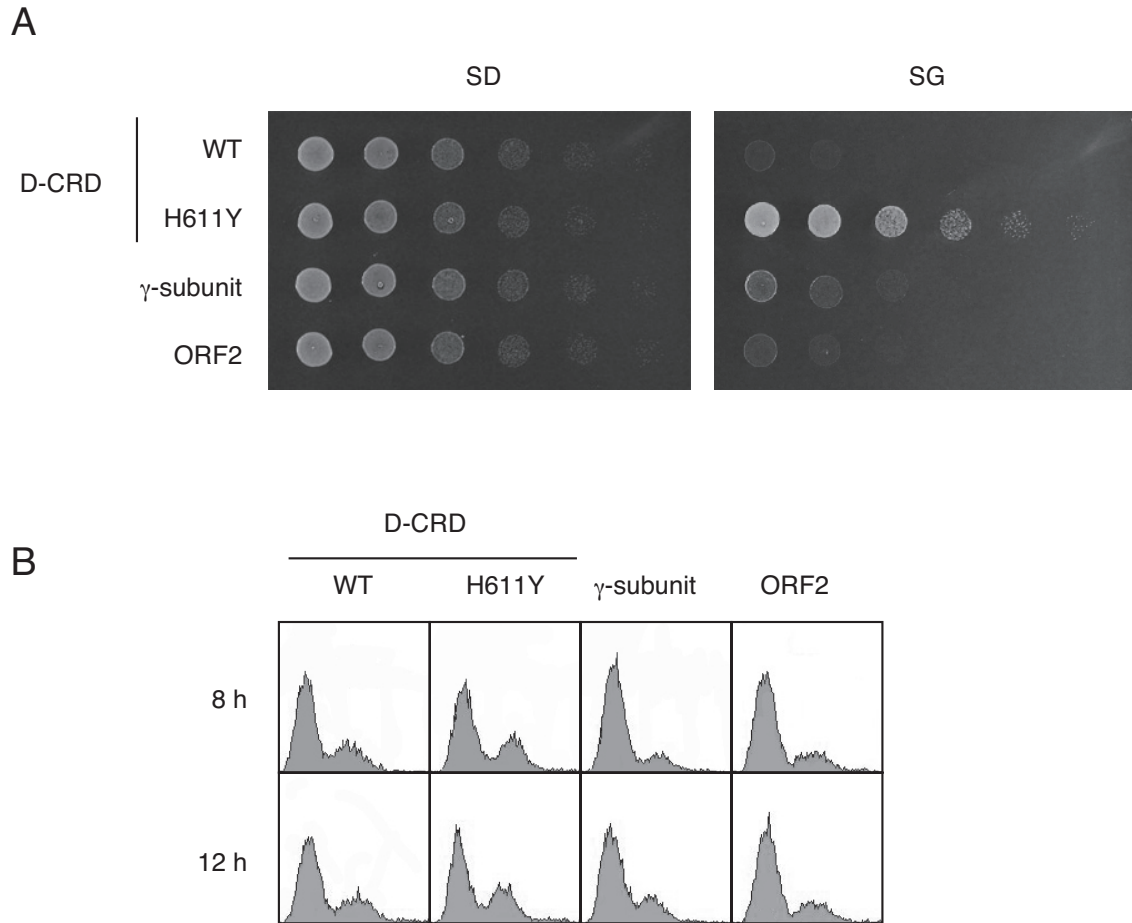


Fig. 2-5 tRNase を 2μ プラスミドより発現する株の表現型と細胞周期解析
 (A) pGML20 vector の *GAL1* プロモーター下流に各 tRNase 遺伝子を挿入し、TM142 を形質転換した。培養液を順次 5 倍ずつ希釈しスポットし生育を比較した。(B) 各 tRNase 発現株を液体 SG 培地にて培養し、8 時間及び 12 時間経過後に細胞をサンプリングし FACS 解析を行った。

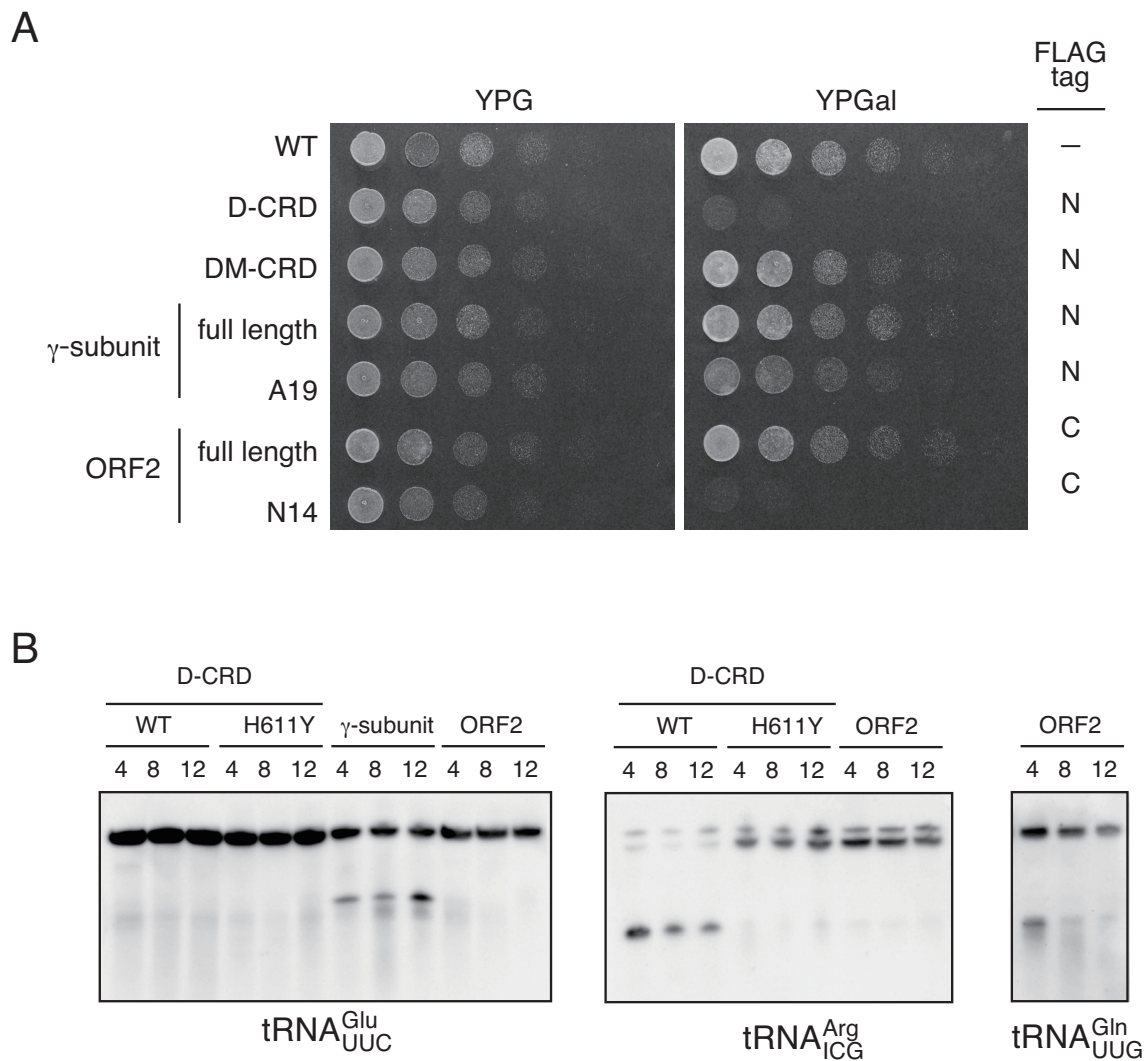


Fig. 2-6 tRNase 発現株の表現型と tRNA 切断の様子

(A) 各 tRNase 遺伝子を CG379 の染色体に導入した株のコロニー形成能の比較。培養液を順次 5 倍希釈しスポットした。(B) この株を液体 YPGal 培地で培養し、経時的にサンプリングして tRNA の切断をノザンハイブリダイゼーションにより確認した。

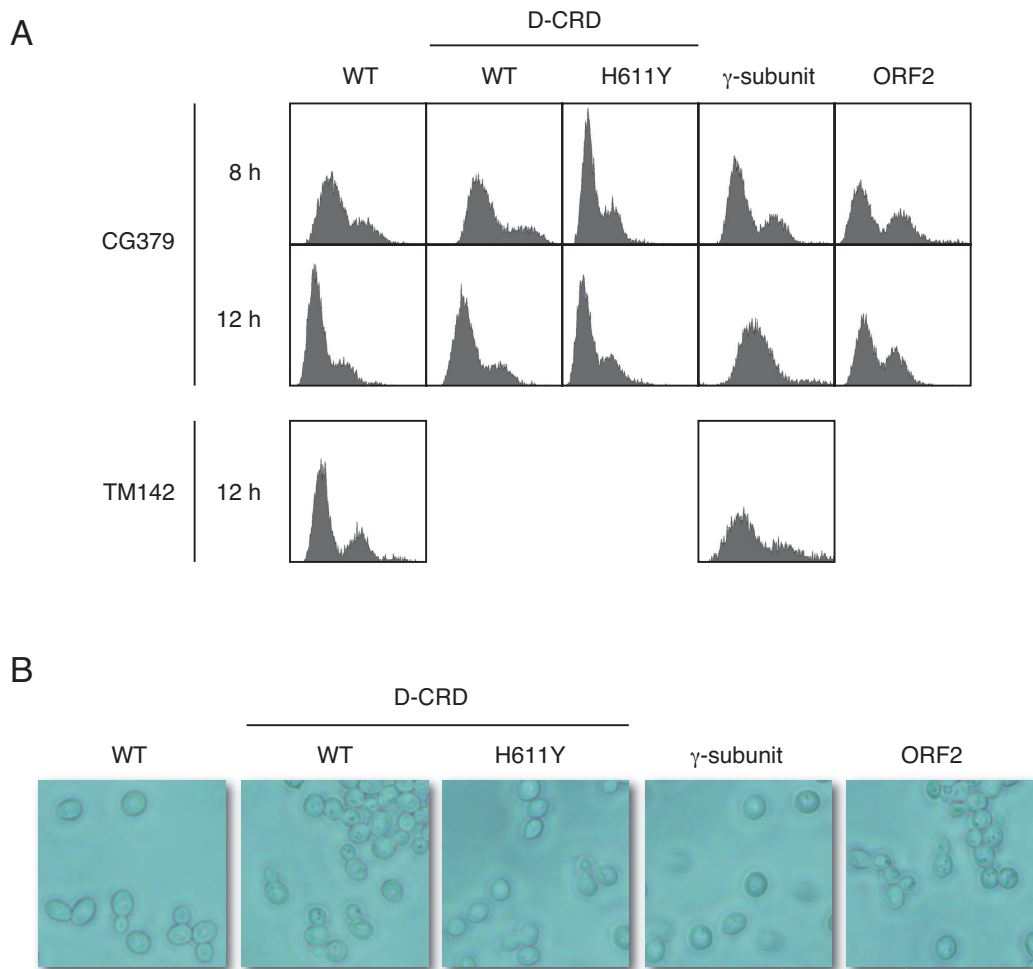
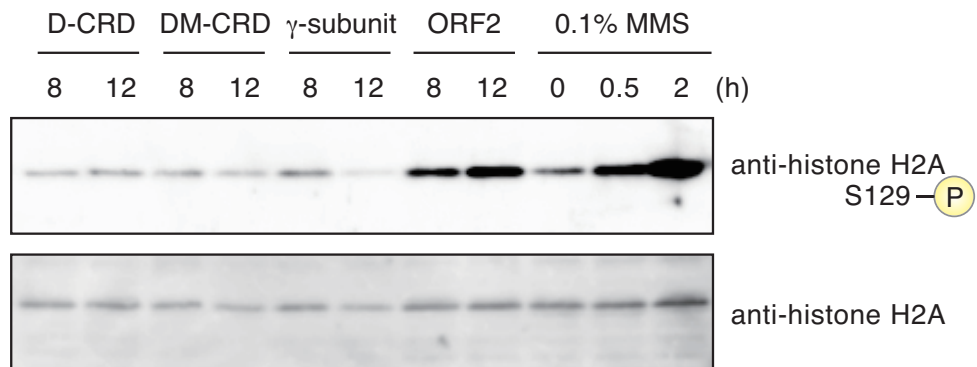


Fig. 2-7 tRNase 発現株の細胞周期の比較

(A) 各 tRNase の発現誘導後、8 時間及び 12 時間経過後に細胞をサンプリングし、FACS で解析した。

(B) (A) の実験に使用した CG379 の発現誘導 12 時間後の細胞を光学顕微鏡で観察した。

A



B

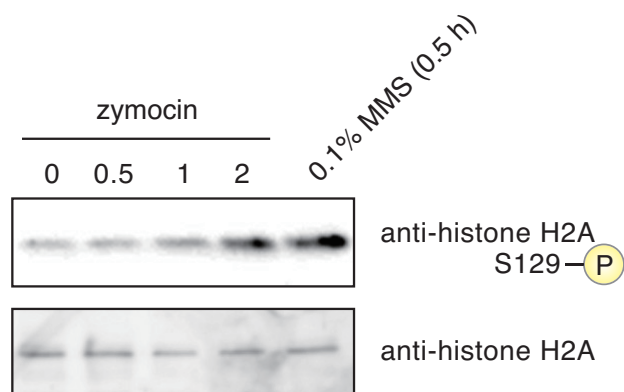


Fig. 2-8 ヒストンH2Aの特異的リン酸化の様子

(A) 各 tRNase の発現誘導後の細胞からタンパク質を抽出し、ヒストンH2A Ser129 残基のリン酸化特異的抗体を用いてウエスタンブロットングを行った。(B) zymocin を作用させた TM142 からタンパク質を抽出し、同様にウエスタンブロットングを行った。

Table 2-2 D-CRD 発現株における *STE2* 転写量の経時的変化

	<i>STE2/ACT1</i>			(h)
	4	8	12	
WT	158992	12796	5163	
H611Y	100	100	100	

Table 2-3 発現誘導 4 時間後における各 tRNase 発現株での *STE2* 転写量

	<i>STE2/ACT1</i>	WT との比較
WT	0.018	100
D-CRD WT	6.201	33565
D-CRD H611Y	0.020	111
γ -subunit	0.029	155
ORF2	1.519	8221

第3章 キラートキシン PaT による DNA 損傷誘導機構の解明

3-1. 序

第2章の結果より、PaT の Orf2p は DNA 切断活性を持つのではないかと考えた。PaT Orf2p の標的が tRNA であることを明らかにした Meinhardt らは、Orf2p の標的となる tRNA^{Gln}UUG, tRNA^{Glu}UUC を同時にプラスミドで供給することで、PaT に曝しても生育阻害が起こらなくなると報告しているが、このときのデータを見てみると、完全耐性とはなっていない[36]。また、Meinhardt らが、DNA 損傷はあくまでも tRNA 切断によって引き起こされる現象だと主張している理由として、Orf2p が細胞質に局在していることが挙げられる。彼らは、GFP を融合した野生型 Orf2p を細胞内発現させると、細胞質に局在することを確認している[36]。ところがこのコンストラクトには幾つかの問題点がある。先ず、Orf2p のサイズは 38 kDa であり、これに 27 kDa もある GFP を融合することで、細胞内局在に影響する可能性は充分考えられる。また、野生型 Orf2p の発現はタンパク質合成を低下させるため、Orf2p 自身の発現量も低下し、顕微鏡下で検出しにくくなる。更に、Fig. 2-6B に示すノザンハイブリダイゼーションの結果では、tRNA 切断が発現誘導 8 時間以降には検出されなくなっていた。これは、Orf2p が核内へと移動したことを想起させる。そこで本項では、生育阻害活性を持たない変異体 Orf2p を取得し、これを用いて細胞内発現株の細胞応答、及び細胞局在を調べた。更に、精製した Orf2p を用いることで、DNA を切断する活性を持つかどうかを *in vitro* で検証した。

3-2. 材料と方法

Orf2p 変異体の作成

変異体は、2-2 で作製した pGML20 に *ORF2* を組込んだものを鋳型にした site-directed mutagenesis により作製した。CG379 の染色体への組込みも 2-2 に示した方法で行った。

免疫染色法による Orf2p の細胞内局在の観察

顕微鏡サンプルの調製手順は次の通りである。培養後の細胞を PBS で 1 回洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド溶液中で 30 分間インキュベートし、細胞を固定した。再度 PBS で洗浄し、1.2 M sorbitol in PBS w/ 0.1 M DTT で懸濁した。これに lyticase を加えて 37°C でインキュベートし、細胞壁を分解した。50 mM NH₄Cl 入りの 1.2 M sorbitol in PBS で洗浄した後、1.2 M sorbitol in PBS に再懸濁した。スライドガラス上に細胞懸濁液を滴下して室温で 30 分静置した後、-20°C に冷やしたメタノールに 10 分、-20°C に冷やしたアセトンに 2 分、この順番で浸して、細胞をスライドガラスに固定した。続いて、PBST (PBS, 0.1% Tween20) に溶解した 3% skim milk でブロッキングし、1% skim milk in PBST で洗浄後、一次抗体として anti-FLAG M2 Antibody (SIGMA) を、その次に二次抗体として Alexa Fluor 594 F (ab')₂ fragment of anti-mouse IgG (invitrogen) を加えて抗体反応を行った。抗体反応の前後には 1% skim milk in PBST を用いて 20 分以上洗浄した。最後に 0.1 µg/mL DAPI で核染色を行った後、mounting solution (90% glycerol, 25 µM NaOH in PBS) で封入した。顕微鏡には、Olympus FV500 (倒立顕微鏡 IX81) を使用し、100×対物レンズ (Olympus) を

用いた。また画像解析ソフトには Fluoview ver. 5.0 (Olympus) を使用した。

Orf2p-His6 の精製

Orf2p-His6 及び Orf2p-H299A-His6 は、当研究室の田中が精製したものを使用した。手順を以下に簡潔に記す。pET-24d (+) (Novagen) に *ORF2* をクローニングし、BL21 (DE3) (Novagen) を形質転換した。この株を 25°C で培養し、1 mM IPTG を加えることで発現を誘導し、8 時間後に集菌した。破碎後、HiTrap Chelating HP 5ml (GE Healthcare) を用いて精製し、10 mM Tris-HCl pH7.5 を用いて透析した。最後に Vivaspin (5,000 MWCO, Viva science) を用いて濃縮したものをアッセイに用いた。精製したタンパク質のうち 1 µg を、アクリルアミド濃度を 14% とした SDS-PAGE により分離し、SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) で染色してバンドを確認した。

RNA を基質とした *in vitro* Orf2p アッセイ

反応溶液の組成は 10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT とした。反応溶液に total RNA を入れた後、70°C で 5 分インキュベートすることで RNA の refolding を行った。室温に戻るまで静置した後、Orf2p を添加し、30°C で 20 分間インキュベートした。反応後、速やかに 2×loading solution (9M urea, 0.02% XC, 0.02% BPB) を等量加え氷上に静置することで、反応を停止させた。切断される RNA を網羅的に調べるためのアッセイの際には、42 µL の反応溶液中で 12 µg の total RNA と 50 pmol の Orf2p を反応させた。なお一部の実験には、コントロールとして当研究室の高橋が HiTrap Chelating HP 5ml (GE Healthcare) 及び Mono Q カラム (GE Healthcare) を用いて精製し

た γ -subunit を使用した[41]。反応溶液の組成は、10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA である。補足として、出芽酵母の total RNA のうち、tRNA が約 15%含まれていると仮定すると、total RNA 1 μ g 中に含まれる tRNA は約 8 pmol である。

RNA 切断片のクローニング

Orf2p により切断される RNA の同定は、1-2 に示す方法で行った。但し、BAP による脱リン酸化処理の操作は行わなかった。これにより、tRNA の 3' 側断片のみを取得することとした。

ホルムアルデヒドゲルによる rRNA の電気泳動

rRNA の電気泳動は、1-2 に示す方法で行った。但し泳動後は、ゲルを超純水に 1 時間浸すことでホルムアルデヒドゲルを抜いたのち、エチジウムブロマイドによって染色した。

DNA を基質とした *in vitro* Orf2p アッセイ

反応溶液の組成、及び反応条件は RNA を基質としたアッセイの時と同じである。但し、基質の refolding は行わず、また反応時間は 30 分とした。

基質の調製方法は次の通りである。Lambda DNA (Klenow fragment treated) (ニッポンジーン) を *StyI* で消化し、7743 bp、及び 6223 bp の断片をそれぞれアガロースゲルより切り出した。また 7743 bp のバンドについては、3'側半分、5'側半分をそれぞれ PCR で増幅し、pUC19 へクローニングした。このプラスミド

で大腸菌の DH5 α , GM33, GM199 を形質転換し、プラスミドを精製した後、*EcoRI*, *PstI* でインサートを切り出し、アガロースゲルから抽出した。出芽酵母からの染色体 DNA の精製には、Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を使用した。精製方法は添付のプロトコールに従った。また基質とした DNA は、その種類によらず 300-500 ng を使用した。4000 bp の DNA を基質として 400 ng 使用した場合、これは約 0.15 pmol に相当する。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 変異体 Orf2p を用いた *in vivo* での解析

Orf2p の活性触媒残基は His299 である

γ -subiunit と Orf2p のアミノ酸配列の相同性は、ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) によると 15.0%であった (Fig. 3-1A)。 γ -subiunit については、活性触媒残基として、His209 が候補に挙げられている [90]。また、RNase A や RNase T1、そして D-CRD もその触媒残基は His である [39, 91, 92]。このことから、Orf2p の RNase としての触媒残基も His である可能性が高い。そこで、Orf2p のアミノ酸配列中の 4 つの His である His99, His150, His234, His299 をそれぞれ Ala に置換した変異体を作製した。このプラスミドで TM142 を形質転換し、SG 培地上での生育を調べたところ、Orf2p-H299A を導入した株において生育阻害が完全に抑制された (Fig. 3-1B)。このことから、H299 は RNase 活性の触媒残基であることが示唆された。

Orf2p-H299A 発現株では tRNA 切断及び DNA 損傷が起こらない

CG379 の染色体に *ORF2* 及び *ORF2-H229A* を導入した株について、液体培地で発現誘導を行った後、RNA を抽出してノザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、野生型 Orf2 発現株では tRNA^{Gln}UUG の切断が見られたが、Orf2p-H299A 発現株では tRNA の切断は起こらなかった (Fig. 3-2A)。また、抽出したタンパク質を用いてヒストン H2A S129 のリン酸化特異抗体によるウエスタンブロッティングを行ったところ、Orf2p-H299A 発現株ではリン酸化が見ら

れないことから、DNA 損傷が起きていないと判断した (Fig. 3-2B)。更に発現誘導 12 時間の細胞を用いて FACS 解析を行うと、Orf2p-H299A 発現株のヒストグラムは CG379 野生株と同じ波形を示した (Fig. 3-2C)。以上のことから、His299 は少なくとも tRNase としての触媒残基であることが分かった。しかし、DNaseI にも見られるように、His 残基は DNase の触媒残基としても用いられるため[93]、Orf2p が His299 により DNase 活性を持つ可能性も考えられる。従って、以上の結果だけでは、Orf2p が tRNA と DNA の両方を分解する活性をもつのか、或いは DNA 損傷は tRNA 切断に付随して起こるのかは判断出来ない。そこで、以降の *in vitro* の実験でこれを検証する。

Orf2p は核に移行する

Orf2p がゲノム DNA を切断するためには、核に移行しなければならない。そこで、タンパク質の細胞内局在予測プログラムである PSORT WWW server (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) で核に局在する可能性について調べたところ、D-CRD, γ -subunit, Orf2p の結果はそれぞれ 52.2%, 43.5%, 56.5%であった。なお、 γ -subunit, Orf2p の局在予測に際しては、分泌シグナル配列は生産菌内でプロセッシングを受けることが分かっているため、これらの配列を除いたアミノ酸配列を用いた。また、同プログラムでは Orf2p のみ NLS (nuclear localization signal) があると推定され、それは Lys169 から Lys186 であった。また、核膜に存在するタンパク質輸送担体である importin- α (出芽酵母では Srp1p) に特化した NLS 予測プログラムである cNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) にて同様に NLS を推定したところ、Asp182 から Thr213 となった。このことから、NLS 領域を欠いた Orf2p を作出し、DNA 損傷が起こるかどうかを調べることも検討し

たが、予測した NLS がアミノ酸配列の中央に位置することから、断念した。特に、Orf2p には Cys18, Cys329 という 2 つのシステイン残基が存在するが、2-3-2 で作製した N 末端から分泌シグナル配列として 18 アミノ酸欠いた L19 というコンストラクトでは、生育阻害活性を引き起こさなかった (Fig. 2-4C)。このことから、Cys18 は活性に必要であり、且つ分子内或いは分子間でこのシステインがジスルフィド結合していると推測している。分子内でジスルフィド結合を形成していれば、NLS と予測される中央の十数残基を除いたり、置換したりすることは立体構造に大きな影響を及ぼすと考えたため、NLS 配列を置換する実験は行わなかった。

液体培養にて Orf2p を発現誘導した後、FLAG tag に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、Orf2p-H299A 発現株ではバンドが確認された (Fig. 3-3A)。このときの発現誘導 12 時間の細胞を用いて免疫染色を行ったところ、発現させた Orf2p-H299A は核に局在している様子が見られた (Fig. 3-3B)。野生型 Orf2p を発現させた場合には、発現誘導 12 時間の時には tRNA 切断が見られないが、DNA 損傷は起きていることから (Fig. 3-2A, 3-2B)、核に局在して DNA に直接作用すると考えた。

3-3-2. *in vitro* での Orf2p の生化学的解析

Orf2p の tRNA 切断活性の触媒残基は His299 である

total RNA と Orf2p を反応させ、ノザンハイブリダイゼーションを行ったところ、Orf2p によって tRNA^{Gln}UUG が切断されるが、Orf2p-H299A では tRNA の切断は見られなかった (Fig. 3-4B)。これにより、His299 が tRNase としての触媒残基であることが、*in vitro* で実証された。また、SYBR Green II による染色

の結果では、Orf2p の添加量が最大の時に RNA がスミアしていることが分かり、rRNA も切断している可能性が考えられた。

Orf2p の基質となる RNA の同定

Orf2p は、tRNA の塩基修飾欠損株 *trm3* が PaT 耐性になるという zymocin とのアナロジーから、tRNA を切断することが明らかにされた[36]。TRM9 は tRNA をメチル化するトランスフェラーゼをコードしており、tRNA^{Arg}UCU や tRNA^{Gln}UUC などの tRNA に対し、wobble 位である 34 位の cm⁵U (5-carboxylmethyluridine) にメチル基を付加し、mcm⁵U (5-methoxycarbonyl-methyluridine) へと変換する[94, 95]。34 位に mcm⁵U を持つ tRNA のうち、tRNA^{Gln}UUG 遺伝子を高コピープラスミドで供給させた場合に PaT に対して耐性となったことから、これが PaT の第一標的であることが明らかにされた。*trm9* 欠損株では、tRNA^{Gln}UUG の 34 位は mcm⁵U とならず、cm⁵U のままであると考えられるが、この tRNA は PaT により切断されない。更に、34 位の U を C へ置換した tRNA^{Gln}CUG は切断されなくなる[36]。これらのことから、PaT による認識には mcm⁵U が必須であると考えられるが、34 位に同じ修飾塩基を持つ tRNA^{Gly}UCC や tRNA^{Arg}UCU は標的となっていない。そこで、第 1 章で行った RNA 断片を網羅的に解析する実験手法を用いて、Orf2p により切断される RNA を調べた。

Orf2p による RNA 切断アッセイの後、total RNA 3 µg に相当する反応溶液を電気泳動したものを、Fig. 3-5A に示す。Orf2p の添加により tRNA の切断片と思われる 2 本の薄いバンドが確認できた。最終的に cDNA 化した RNA 切断片がクローニングされた pUC19 を保持する大腸菌を 46 個取得した。このうち 3 つには cDNA がタンデムに並んで挿入していたため、合計として 49 個の配列を得た

(Fig. 3-5B)。更に、このうち 27 個の tRNA についてその内訳を Fig. 3-5C に、3 つ以上のクローンとして重複して得られた tRNA に関して、その切断部位と取得したクローン数の関係を、Table 3-1 に示した。

tRNA^{Gln}UUG は、Orf2p の第一標的であり、本実験においても最も多くのクローンが取得された。またその全てが 35 位以降の 3' 側の配列であったことから、tRNA^{Gln}UUG に対しては、34 位の mcm⁵U を認識し、34 位と 35 位の間で切断する可能性が高いと言える。tRNA^{Glu}UUC は 34 位に mcm⁵s²U を有しており、PaT による第二の標的であると報告されているが、切断効率は極めて低い[36]。実際、ノザンハイブリダイゼーションを行った結果からは、切断は見られなかった (Fig. 3-6A)。tRNA^{Glu}UUC は細胞内含有量がかなり高い tRNA であるため (Table 1-1)、切断効率が低いにもかかわらず、RNA 断片としては多くのクローンが取得されたと考えられる。またその他の tRNA も、tRNA^{Pro}UGG 以外はノザンハイブリダイゼーションで切断片は検出されなかった (Fig. 3-6A)。この tRNA^{Pro}UGG について見てみると、37 位と 38 位の間で切断されたものが 2 クローン、39 位と 40 位の間で切断されたものが一つ、得られている (Table 3-1)。後述するが、Orf2p はメチル基を認識している可能性が考えられる。tRNA^{Pro}UGG の 37 位は m¹G (1-methylguanosine) であるため、37 位と 38 位の間での切断に、この m¹G が関与している可能性がある。tRNA^{Glu}UUC と同様に、tRNA^{Asp}GUC と tRNA^{Ile}AAU については、細胞内含有量が比較的高いことから複数クローン得られたと考えられるが、切断部位がばらばらであったこと、またノザンハイブリダイゼーションでは切断が再現されなかったことから、これらが Orf2p による特異的な切断を受けたと保証することは出来ない。

次に、rRNA の配列が 14 個得られたことから、Orf2p が rRNA を切断する可能性について考察する。Fig. 3-4B で行った *in vitro* の切断アッセイ後の RNA を見てみると、Orf2p を 100 pmol 入れたサンプルでは、全体がスミアしている様

子が見られたことから、やはり rRNA が切断されると考えられた。total RNA 36 μg を 10 pmol, 50 pmol の Orf2p と反応させ、ホルムアルデヒド含有 1%アガロースゲルで泳動後の写真を見ると、50 pmol のサンプルにおいて、僅かにスメアしているように見えた (Fig. 3-6B)。なお、バンドが 2 本見られるのは、上から順に 25S rRNA (3396 nt), 18S rRNA (1800 nt) であると考えられる。しかし、Orf2p を細胞内発現させた株より抽出した RNA を同様にホルムアルデヒド含有 1%アガロースゲルで泳動したところ、25S rRNA 及び 18S rRNA が分解している様子は見られなかった (Fig. 3-6C)。ところが驚くべきことに、35S rRNA (6858 nt) と思われるバンドが、Orf2p-H299A 発現株から抽出した RNA では観察されたが、野生型 Orf2p 発現株からのものでは消失していた。rRNA は、プロセッシング後、修飾を受けることが知られているが、この中で特に多いのがメチル基修飾である [96]。Orf2p が前駆体 rRNA のメチル基を認識し、これを分解したのではないだろうか。また、成熟体である 25S, 18S rRNA が分解されなかった理由は、これらリボソームタンパクと複合体を形成することで、Orf2p による認識を受けづらくなったためではないかと考える。

以上の結果からまとめると、Orf2p は tRNA^{Gln}UUG に対して特異性が最も高く、これを 34 位と 35 位の間で切断すること、これに加え、tRNA^{Pro}UGG も 37 位の m¹G を認識してその 3' 側を切断する可能性があることが分かった。また、前駆体 rRNA も、メチル基修飾により分解を受けることが示唆された。

Orf2p は DNA に結合する

Orf2p が DNA に作用するかどうかを調べるため、はじめに、 λ phage DNA と Orf2p を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。これを 0.8%アガロースゲルで泳動したところ、Orf2p を 500 pmol 添加したサンプルにおいて、DNA のバ

ンドが上にシフトしているのが見られた (Fig. 3-7A)。λ phage DNA を *StyI* で消化したもの (*λStyI*) を基質とした場合にも、上から 2 本目、3 本目のバンドが消えており、レーンの上方にバンドがシフトしていた。この様なバンドのシフトは、 γ -subunit を添加した場合には起こらなかった。*λStyI* を基質とした時、上から 2 番目と 3 番目の断片 (それぞれ 7743 bp, 6223 bp) が特にシフトしていた。そこで 3 番目のバンドをアガロースゲルから切り出したものを基質とし、Orf2p とインキュベートしたところ、Orf2p を 10 pmol 加えるとバンドが消失した。このサンプルにおいては、バンドのシフトや、DNA がスミアしているような様子は見られなかった。

Orf2p が DNA 切断活性を持つ可能性についての検討

次に、Orf2p と結合した DNA が分解されるのかどうかを調べるために、Orf2p と Orf2p-H299A をそれぞれ出芽酵母の染色体 DNA と反応させてこれを調べた。Orf2p と染色体 DNA を反応させた後、反応溶液の半分を phenol/CHCl₃ で処理することで Orf2p を除去し、エタノール沈殿後の DNA を泳動した。その結果、Orf2p, Orf2p-H299A を加え反応させた直後のサンプルでは、やはりバンドがシフトしている様子が認められた (Fig.3-7B)。しかし、phenol/CHCl₃ 処理によりタンパク質成分を除去して泳動すると、Orf2p と混合した DNA のバンドが薄くなり、一方 Orf2p-H299A と混合した DNA はバンドの量は減っていなかった。また γ -subunit と反応させた場合には染色体 DNA を基質としてもバンドシフトが起こらなかった。このことから、Orf2p は His299 を介して DNA を分解していることが間接的に認められた。また His299 は DNA への結合には関与しないと言える。最も代表的な DNA 分解酵素であるウシ脾臓由来の Deoxyribonuclease I や、コリシンのうち DNA を標的とするコリシン E9 は、やはり His 残基を一般

酸塩基触媒として利用している[93, 97]。従って Orf2p の His299 が DNA 分解を担っていることは自然であるが、構造の異なる RNA と DNA を共通する残基 His299 を介してどのように分解しているのかは、不明である。RNA を基質とした場合と比較し、Orf2p の DNA 分解活性があまり高くないことから、二重らせんが解けて一本鎖 DNA になっている箇所や、切断され部分的に一本鎖になっている箇所に結合し、切断する可能性も考えられる。

Orf2p の DNA 切断機構についての検討

λ StyI の上から 2 本目、及び 3 本目の断片が Orf2p と結合することが分かったことから、基質を大量に調製するため、同じ配列を PCR により増幅した。ところが興味深いことに、この PCR 増幅して得た DNA は、Orf2p と混合しても電気泳動においてバンドのシフトが起こらなくなり、Orf2p と結合しないことが分かった。この実験に使用した λ phage DNA は、DNA methylase を持つ *dam*⁺, *dam*⁺ の大腸菌より調製されたものであることから、Orf2p と DNA の結合には DNA の修飾を必要とするのではないかと考えた。そこで、メチル化修飾された DNA 断片の大量調製を目的とし、 λ StyI マーカーの 2 番目のバンドを中央付近で分断するようにそれぞれ PCR し、pUC19 へクローニングした。分断するように二つに分けて PCR した理由は、クローニングや基質を調製する上でサイズが小さい方が扱い易いためである。これを大腸菌 DH5 α へ導入し、プラスミド精製後にインサート部位を切り出し、基質とした。Orf2p と反応後、電気泳動すると、5'側の断片ではバンドのシフトが見られなくなり、3'側の基質ではバンドが無くなっていた (Fig. 3-7C)。そこで、3'側の DNA 断片について、大腸菌の DH5 α (*dam*⁺, *dcm*⁺), GM119 (*dam*⁻, *dcm*⁻), GM33 (*dam*⁻) を用いて再度 DNA 断片を調製することで、メチル化のパターンが異なる DNA を取得した。これをそれぞれ Orf2p

とインキュベートすると、DH5 α より調製したDNAでは反応後にバンドが消失しており、GM 119やGM33より調製した基質では、バンドが薄くなった (Fig. 3-7C)。このことから、Orf2pのDNAとの結合には、DNA上のメチル基が必要であることが示唆された。Damは塩基配列GATC中のAを、DcmはCCWGG中の2番目のCをメチル化する酵素である。基質に用いた5'側断片には、Damによるメチル化部位は17箇所、Dcmによるメチル化部位は4箇所ある。また3'側にはそれぞれ8箇所、6箇所ある。3'側の方がOrf2pと反応し易いと云うことは、Orf2pはDcmによるメチル化部位を認識する可能性があるが、同じ*dam+*であるDH5 α と比較した時に、GM33から調製した3'側断片も感受性が落ちていることから、これは否定される。これらの結果から、Orf2pはDNAにメチル基が存在するとより強く認識し、切断すると考えられるが、この結果には矛盾点が残る。出芽酵母はDNA methylaseを持っておらず、染色体DNAは修飾されていないと考えられているためである[98]。分裂酵母はDNA methylaseであるDnmt1遺伝子が存在するのに対し[99]、出芽酵母ではDNA methylaseが同定されていない。しかし、ヒトに比べると酵母のDNAの修飾については報告が少なく、出芽酵母、分裂酵母ともに若干のメチル化修飾があるとも言われている。なお、PaTは分裂酵母にも作用するかどうかをeclipse assayにより調べたが、haloは観察されなかった。しかし、出芽酵母TM142のeclipse assayでもhaloは殆ど作られていないのに対し、液体培地では生育阻害が観察されたことから、分裂酵母がPaT感受性である可能性は否定できない。

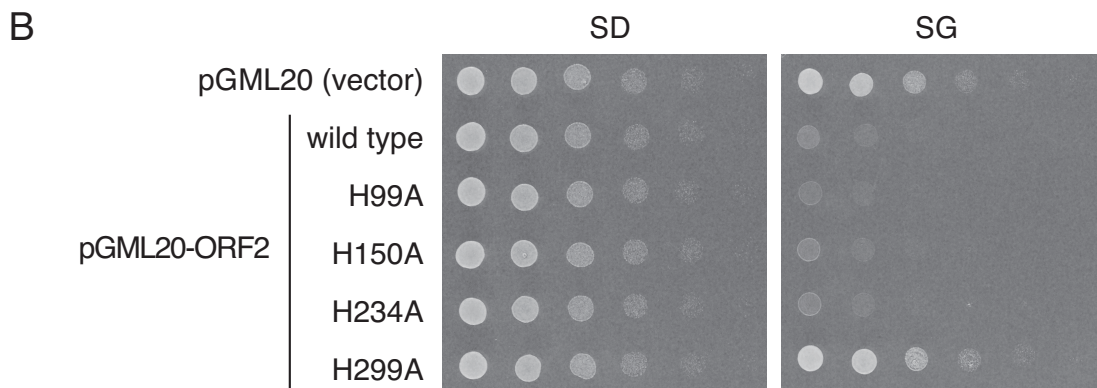
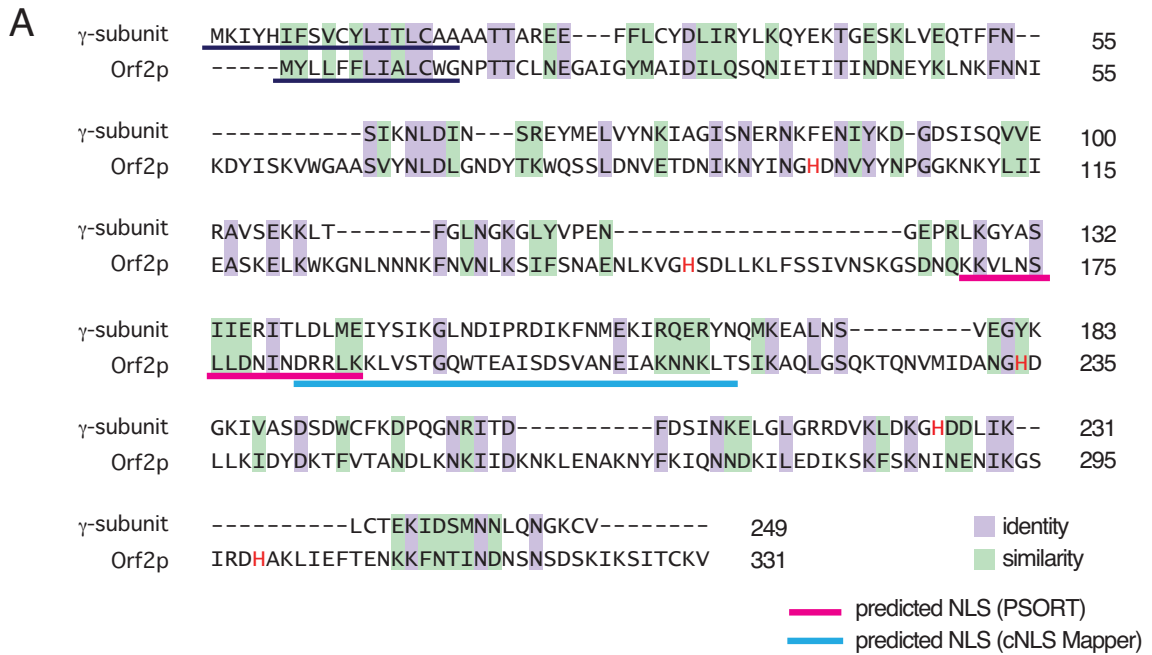


Fig. 3-1 Orf2p の活性触媒残基の推定

(A) γ -subunit と Orf2p のアミノ酸配列の比較。赤字で示す文字は、 γ -subunit については活性触媒と推定されているアミノ酸残基を、Orf2p については本研究で活性触媒と予想したアミノ酸残基をそれぞれ表す。また、分泌シグナル配列と推定されているアミノ酸は下線で示した。(B) 各変異体を *GAL1* プロモーター下で発現させ、固体培地上での生育を比較した。

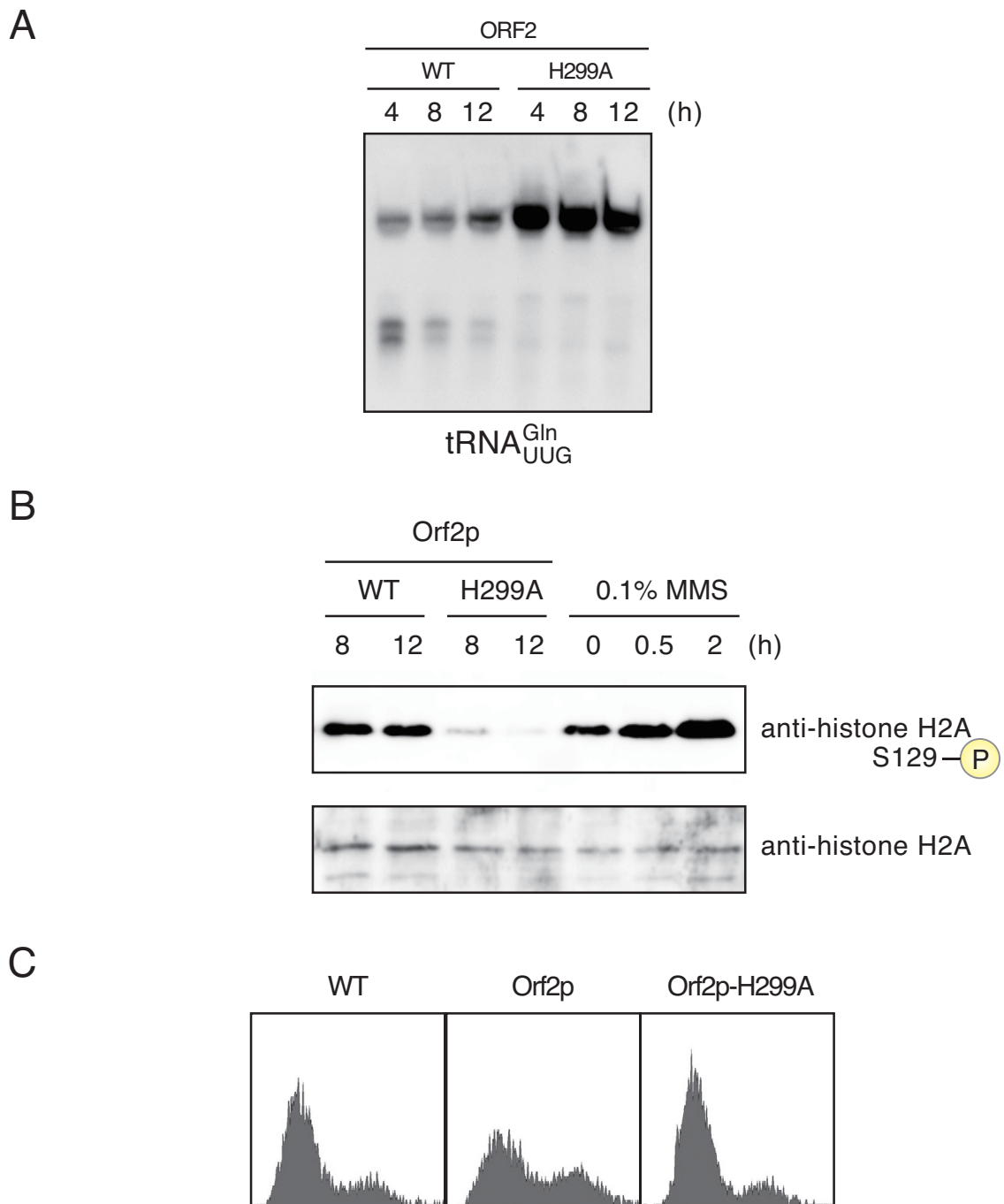
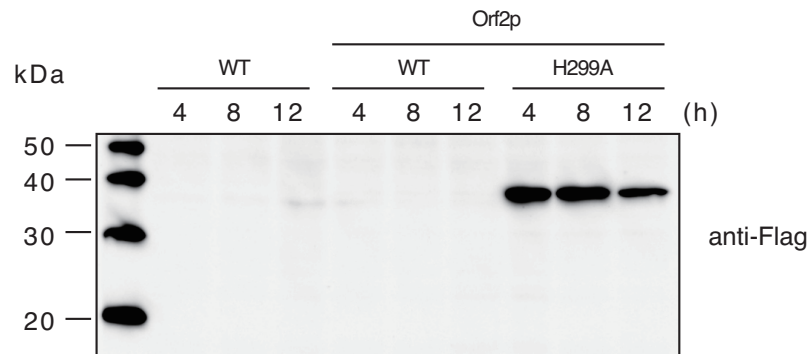


Fig. 3-2 Orf2p-H299A は tRNA 切断、DNA 損傷を起こさない

(A) total RNA を抽出し、tRNA^{Gln}UUG に特異的なプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。(B) リン酸化されたヒストン H2A Ser129 に特異的な抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。(C) FACS により発現誘導 12 時間における細胞周期を観察した。

A



B

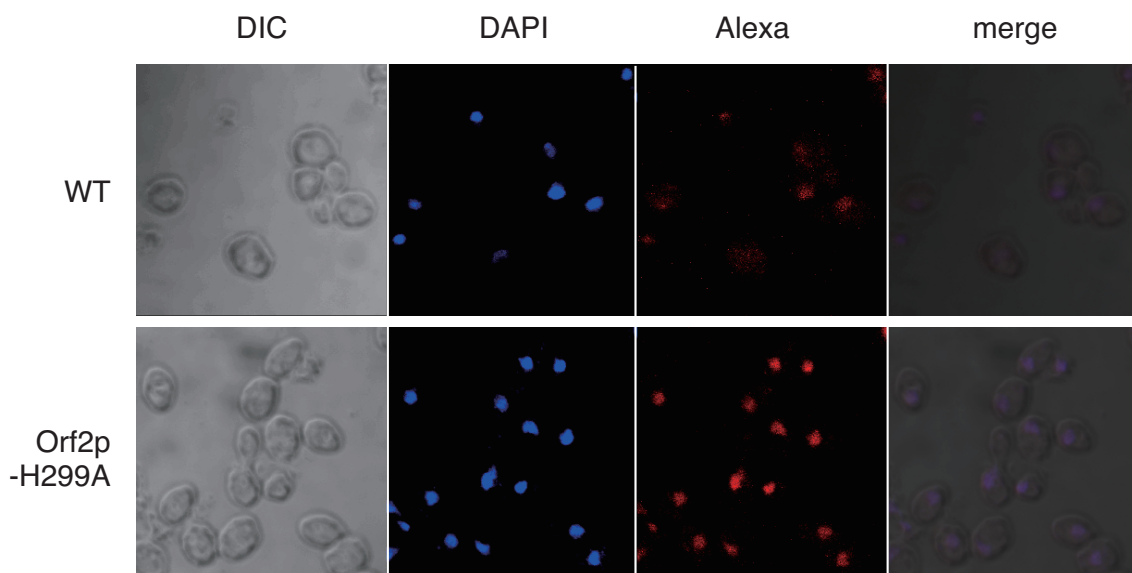
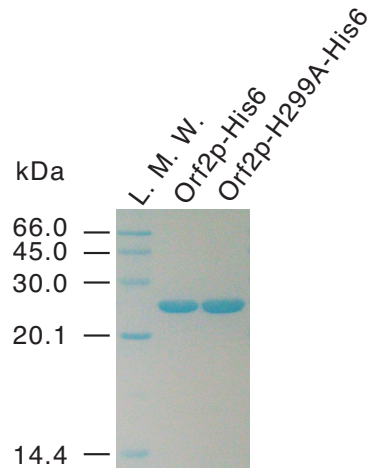


Fig. 3-3 Orf2p-H299A は核に移行する

(A) 発現誘導後の細胞からタンパク質を調製し、抗 Flag 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。Orf2p-H299A のサイズは 38 kDa である。(B) 発現誘導 12 時間後の細胞に対し、抗 Flag 抗体を用いて免疫染色を行った。

A



B

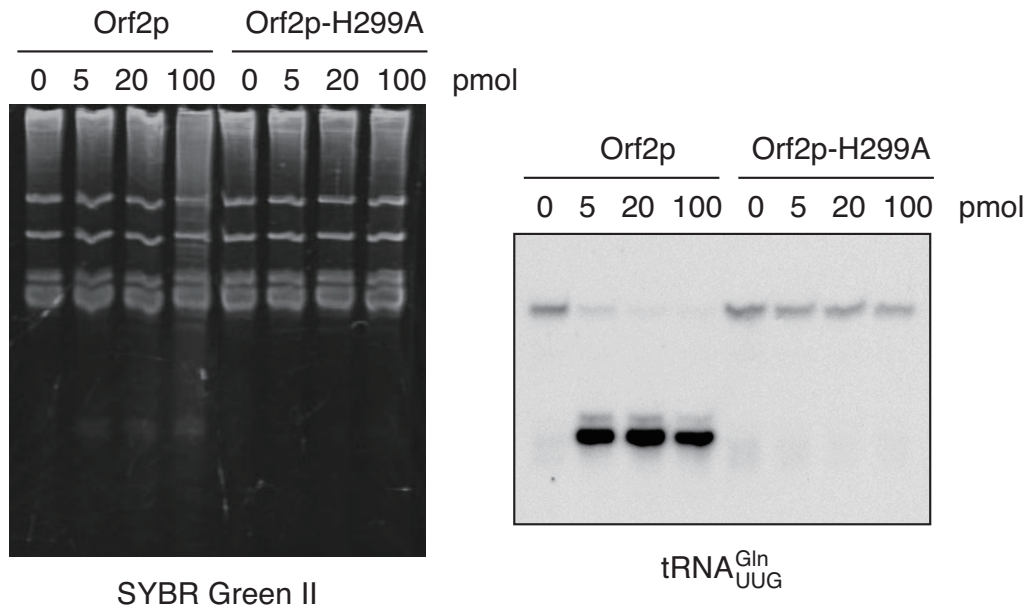


Fig. 3-4 精製した Orf2p による RNA 切断アッセイ

(A) 精製した Orf2p を SDS-PAGE にて確認した。(B) 酵母より調製した total RNA を基質とし、Orf2p と反応させた。泳動後のゲルを SYBR Green II で染色したものと、同じサンプルについてノザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。

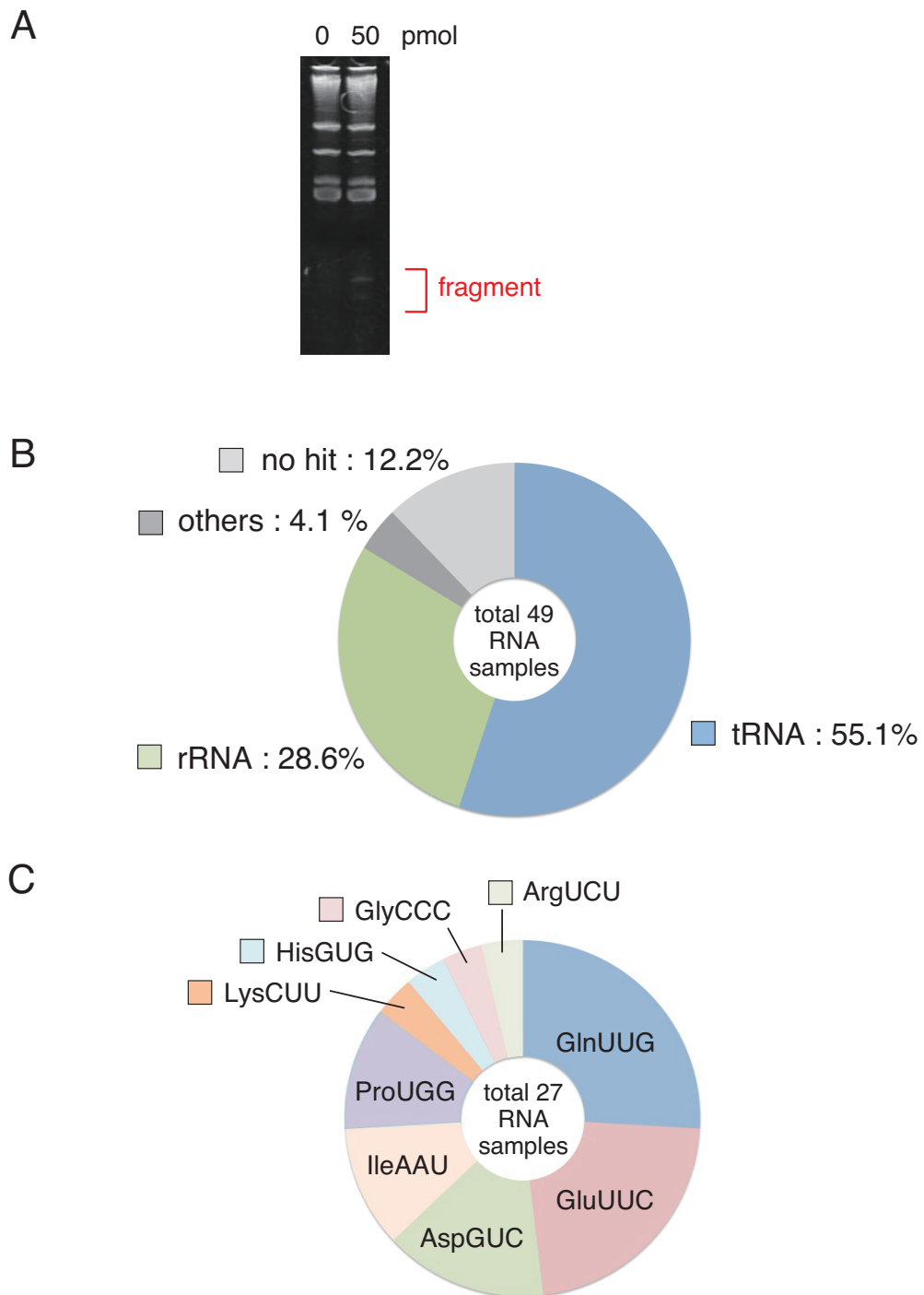


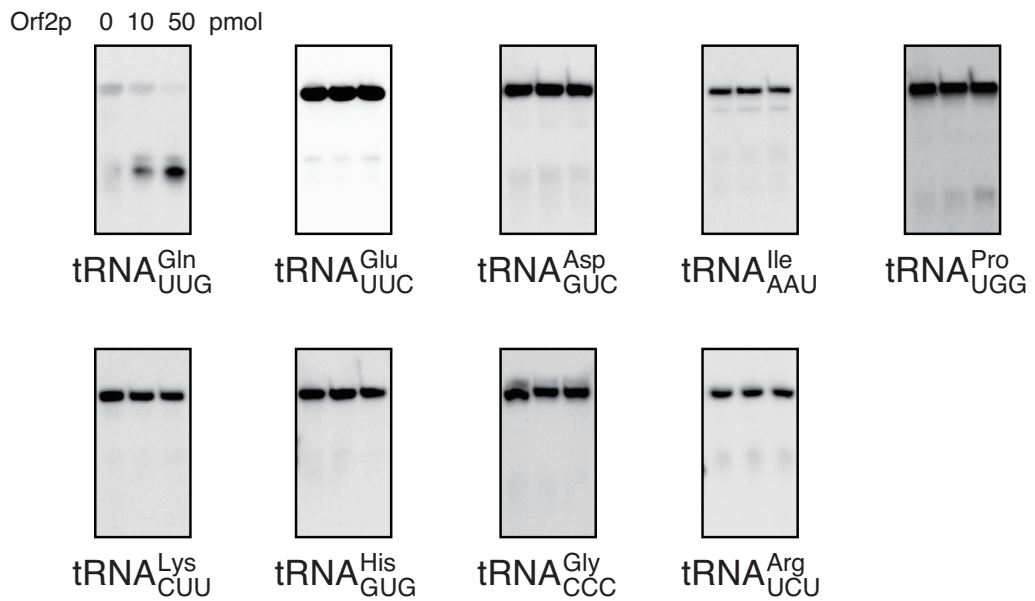
Fig. 3-5 Orf2pが切断するRNA

(A) *in vitro*切断アッセイに使った一部のRNAを泳動して切断片を確認した。(B) 取得した全49個のRNAの内訳。(C) 全49サンプルのうち、27個のtRNAについての内訳。

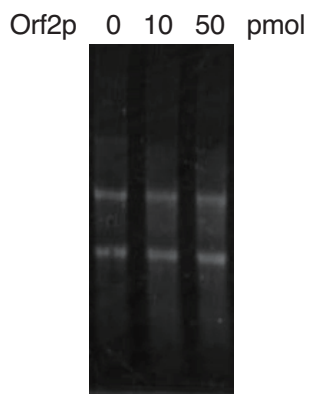
Table 3-1 取得した各 tRNA の切断部位の内訳

tRNA	cleaved site								total
	32-33	34-35	35-36	36-37	37-38	38-39	39-40	>41	
tRNA ^{Gln} UUG	—	7	—	—	—	—	—	—	7
tRNA ^{Glu} UUC	1	1	1	1	—	2	—	—	6
tRNA ^{Asp} GUC	1	—	—	1	1	—	—	1	4
tRNA ^{Ile} AAU	—	—	—	—	—	1	—	2	3
tRNA ^{Pro} UGG	—	—	—	—	2	—	1	—	3
total	2	8	1	2	3	3	1	3	23

A



B



C

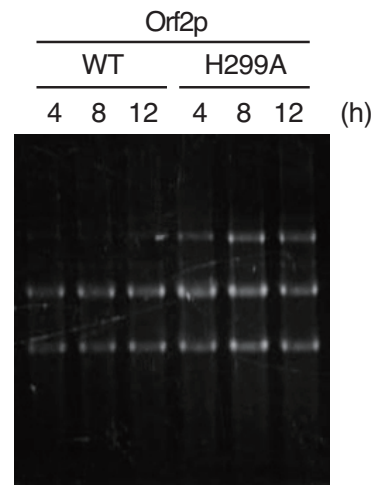


Fig. 3-6 Orf2p による tRNA, rRNA の切断の確認

(A) Fig. 3-5 で取得した各 tRNA に特異的なプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。
 (B) (A) と同じサンプルについて、ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。
 (C) Orf2p の細胞内発現株を用い、発現誘導後の細胞から total RNA を抽出し、(B) と同様の方法で電気泳動を行った。

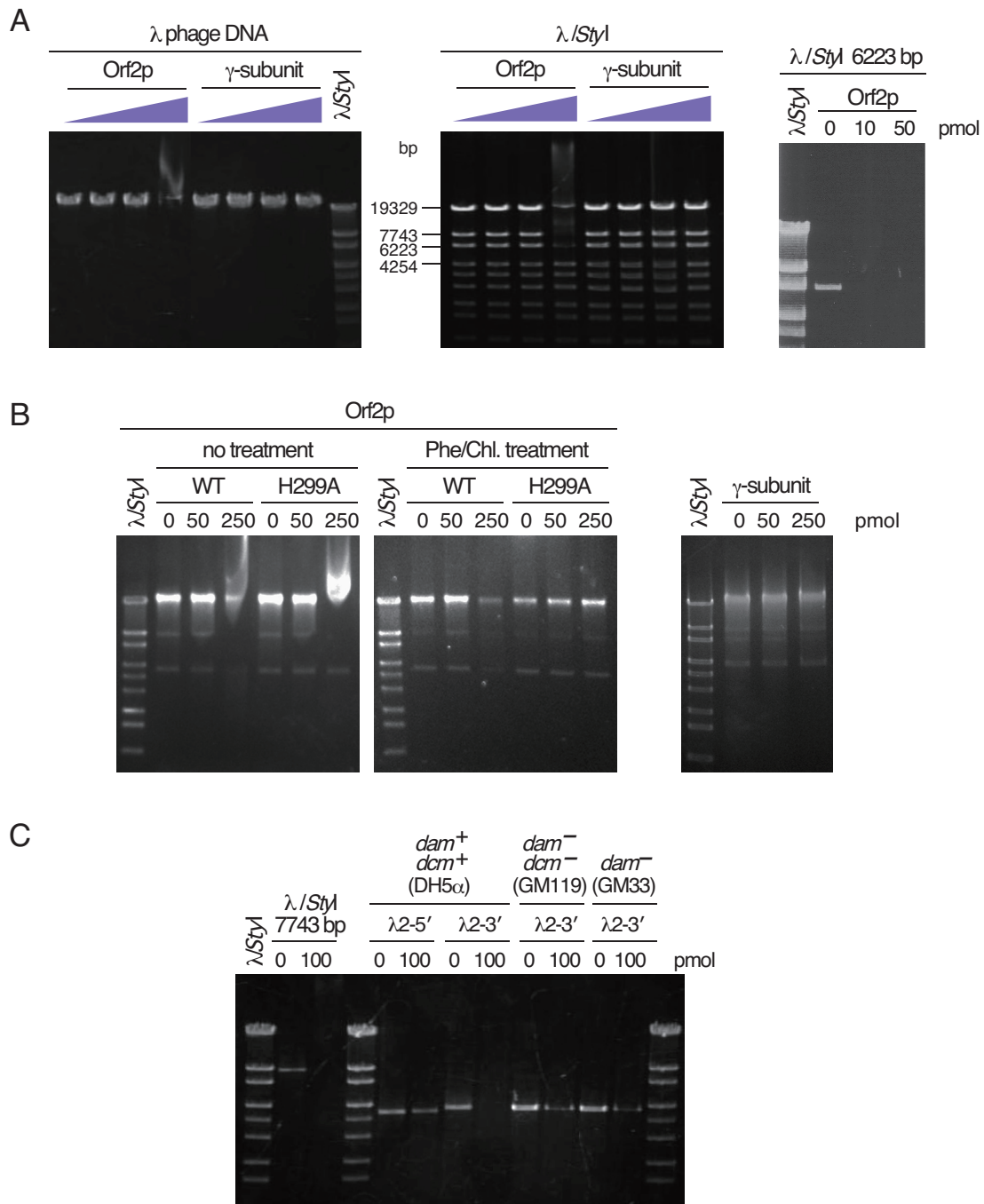


Fig. 3-7 様々なDNAを基質としたOrf2pによるアッセイ

(A) λ phage DNA 及び λ phage DNA を *StyI* 消化した DNA を基質とし、精製した Orf2p または γ-subunit と反応させた。加えたタンパク質量は、0, 10, 100, 500 pmol である。(B) 出芽酵母より抽出した染色体 DNA を Orf2p または γ-subunit と反応させた。(C) λ/*StyI* マーカーの 7743 bp (図中で λ2 と表記) のバンドを基質とし、Orf2p と反応させた。

総論

本研究では、微生物由来の様々な tRNase を出芽酵母の細胞内で発現させ、その細胞応答を解析した。これにより、ストレス誘導性の tRNA 切断とキラートキシンによる tRNA 切断の違いや、また tRNA 切断そのものの生物学的意義を明らかにすることが、本研究の目標であった。ストレス誘導性に自己の細胞内で起こる tRNA 切断は、生存戦略の一環であると想像される。これに対し、キラートキシンである zymocin, PaT による tRNA 切断は、感受性菌にとっては生育を阻害される tRNA 切断である。ところが、大腸菌由来の tRNA 特異的リボヌクレアーゼである D-CRD、キラートキシン *K. lactis* が生産する zymocin の tRNA 切断性サブユニットである γ -subunit、そして *P. acaciae* が生産する PaT の Orf2p は、宿主の酵母に対してそれぞれ異なる細胞応答を引き起こした。

第 1 章では、D-CRD を発現する tRNA ノックダウン細胞を用いて、tRNA 切断に対する細胞応答を調べた。我々は、毒素としての tRNA 切断は、細胞内存在量の多い tRNA を優先的に切ることでありと考えている。これは、コリシン D、コリシン E5、zymocin、PaT が標的とする tRNA が、それぞれの感受性菌において細胞内存在量の極めて高いグループに含まれることに基づいている[50]。D-CRD は出芽酵母に対しては、細胞内含有量が比較的少ない tRNA^{Arg}ICG や tRNA^{Cys}GCA なども効率良く切断した。従って出芽酵母内での D-CRD の発現は、トキシンによる tRNA 切断ではなく、ストレス誘導性の tRNA 切断に類似していると考えられた。

細胞内で tRNA の切断片は、意外にも安定に存在していることが分かった。異常 tRNA の分解を行う TRAMP complex は、tRNA の folding に基づいて正常 tRNA と異常 tRNA を識別している[100]。D-CRD によってアンチコドンにニッ

クが入っただけでは、tRNA の高次構造は維持されており、TRAMP に認識されないのかもしれない。また未成熟 tRNA 量の変化の様子が tRNA の種類によって違っていたことから、切れる tRNA の種類によっては転写や生合成系に何らかのフィードバックがかかることも考えられた。

マイクロアレイ解析により、tRNA ノックダウンが α 細胞において a 細胞特異的遺伝子の転写活性化を引き起こすことを見出した経緯から、 α 細胞、a 細胞、a/ α 細胞で tRNA ノックダウンを誘導した際の接合型特異的遺伝子の転写量を比較した。その結果、a 細胞では tRNA ノックダウンを誘導しても α 細胞特異的遺伝子の転写は起こらず、また a/ α 細胞でも a 細胞特異的遺伝子、 α 細胞特異的遺伝子は発現しなかった。cycloheximide で処理した細胞について同様の実験を行った結果から、これらは tRNA 切断そのものに対する特異的な現象では無く、タンパク質合成が阻害されたことによって生じる現象であることが分かった。しかし、タンパク質合成の低下が接合型によってにこれほど異なる影響を及ぼしたことは意外であり、接合型特異的遺伝子の転写が巧みな調節機構によって制御されているが故に、接合型に依存してタンパク質合成阻害の影響を顕著に受けってしまうことが分かった。また、 α 細胞での tRNA ノックダウンは、HML 領域のヘテロクロマチンのアセチル化を促進することが分かった。これはヒストン脱アセチル化酵素である Sir2p のタンパク質量が減少したためであると考えられるが、Sir2p の他のターゲットであるテロメア領域ではアセチル化が起こらなかった。原因を明らかにするためには更なる解析が必要であるが、接合型特異的遺伝子のように、tRNA ノックダウンはゲノム上で局所的に異常を引き起こしたと言える。

酸化ストレスやアミノ酸飢餓などにおいても、tRNA 切断はタンパク質合成の低下を引き起こすであろう。Thompson らは、酸化ストレス時の tRNA 切断によって細胞死が促進されると主張するが、D-CRD による tRNA ノックダウンでは宿主の生育停止は静菌的であり、細胞死は起こらない。寧ろこの時の細胞は、増

殖を開始できる状態になるまで、ただじっと待機しているようにも見える。アミノ酸飢餓や熱ショック、定常期培養で見られる tRNA 切断は、酸化ストレスと同様に細胞死を促進するための応答であるのか、或いはそのストレスに順応するためにタンパク質合成を一時的に停止させているのかを明らかにすることは、tRNA 切断の生物学的な意義を明らかにする上で、非常に興味深い課題である。

第 2 章では、キラートキシンという細胞毒による tRNA 切断に対する細胞応答を解析した。当初は γ -subunit とのアナロジーから、D-CRD による tRNA ノックダウンでも細胞周期の G1 期停止を引き起こすのではないかと予想していた。ところが D-CRD 発現株では G1 期停止は見られなかった。これは、D-CRD とキラートキシンとは、tRNA 切断の細胞に対する影響が異なることの証左であり、切断する tRNA の種類や量に依存している可能性がある。当研究室の妻鳥らは、コリシン D による tRNA 切断が、大腸菌に対してプログラム細胞死を引き起こすかどうかを調べることを目的とし、非許容温度で失活する温度感受性コリシン D を作製した[101]。この温度感受性 D-CRD を出芽酵母で発現させた場合に細胞周期の G1 期停止が起こるかどうかを調べることで、細胞周期停止が tRNA の切断量に依存して起こるのかどうかについて検証できると考えられる。またキラートキシンは、感受性菌に対して細胞周期停止を引きこすことで、周りの酵母が生育を一時的に止めている間にニッチで優勢となると考えていた。ところがこの実験では、細胞周期停止出来る株の方が結果として固体培地上でのコロニー形成能が高いことが分かった。このことから G1 期停止は感受性側の株が積極的に行っている応答であり、tRNA 切断から回復するメカニズムを有すると考えられた。

PaT が tRNA 切断活性を持つと報告されてから、tRNA と DNA 損傷修復の関連を追跡していた。DNA 修復系の一つである非相同末端接着 (Non-homologous end joining) に必須の *YKU70*, *YKU80* 遺伝子の破壊株や、相同組換えの中核とな

る遺伝子群である *RAD52* epistasis group のうちの一部の遺伝子の破壊株が、zymocin や PaT に抵抗性を示すことが報告されていたからである[78]。PaT が tRNase であると明らかにされたことから、これらの遺伝子が tRNA 切断に対する応答に関連するかもしれないと考えた。そこで BY4742 を親株として作られた、相同組換え修復、非相同末端接着修復、DNA 損傷チェックポイントを担う 40 数種類の破壊株に D-CRD 発現プラスミドや γ -subunit 発現プラスミドを導入し、固体培地や液体培地での生育を調べた。ところが γ -subunit を導入した株でも、生育が変化する破壊株を取得することはできなかった。今となつては選択培地上では γ -subunit を発現させても細胞周期停止を引き起こさないことが分かっているため、完全培地でこの実験を行っていたら、感受性の変わる破壊株を取得できていたかもしれない。

第 3 章では、PaT が DNA 損傷を誘導することに関して、Orf2p が tRNA 切断と、DNA 切断の二つの活性を持つと仮定して、これを検証した。先ず Orf2p の tRNase 活性を持たない変異体として H299A を取得した。この変異型 Orf2p は、細胞内で DNA 損傷を誘導しなかったことから、*in vitro* で実際に DNA 切断活性があるかどうかを調べた。その結果 Orf2p には、DNA と結合し、切断する活性を持つことが示唆された。また興味深いことに、His299 を変異させると、tRNA だけではなく DNA の切断も起こらなくなった。Orf2p による DNA の切断機構は明らかになっていないが、弱いながらも DNA を切断する活性があると考えている。今後は一本鎖 DNA や分裂酵母のゲノムなど用いて DNA の切断機構を明らかにしたい。PaT が本当に DNase 活性を有しているとするれば、これまでに例の無い新しい作用機構を有したトキシンを発見したことになる。また PaT Orf2p が、タンパク質中のどのようなモチーフやドメインを介して、tRNA や DNA の認識・切断を行っているのかを明らかにすることことで、キラートキシンとして

だけではなく、酵素学的にも新しい発見があるのではないだろうか。

おわりに

tRNA の切断は、ここ数年の間に明らかにされたばかりの新しい細胞内現象である。その生物学的意義を知るためには、各生物種における tRNA 切断機構と、tRNA 切断によって引き起こされる現象とをそれぞれ明らかにする必要がある。本研究では、コリシン D という tRNA を特異的に切断する酵素を用いることで、細胞内における tRNA 切断現象をいち早く再現することが出来た。また、出芽酵母を題材とし、zymocin, PaT という tRNA を切断するキラートキシンと、コリシン D による tRNA 切断とを比較することで、一概に tRNA 切断と言っても、それを引き起こす要因、或いは切断される tRNA の種類や量によって細胞はそれぞれ異なる応答を示すことが明らかとなった。所属する研究室では現在、ストレス条件下で tRNA 切断を行う Rny1p の機能解析が行われている[102]。これと併せて、自然界で起こる tRNA 切断に対する細胞の潜在的な応答機構や、切断現象の生物学的意義が今後さらに明らかにされていくことを期待する。

また、コリシン D と zymocin に対する異なる細胞応答を見出したことから、これを糸口とすることで、長年不明であった zymocin によって引き起こされる G1 期停止のメカニズムを解明することが出来るかもしれない。zymocin や PaT による tRNA 切断に対する細胞応答は、トキシンによってのみ引き起こされる特異的なものであるかもしれない。しかし、細胞内に豊富に存在する tRNA のうち、特定の tRNA にのみ生じた異常事態を細胞がどのように認識し、応答するかを明らかにすることで、細胞内の tRNA プールを保つような、或いは翻訳系を制御するような、重要なメカニズムが存在することを示すことが出来るだろう。

実験材料についての補足

使用菌株

Saccharomyces cerevisiae

Strain	Genotype	Source
TM142	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3</i>	※1
TM141	<i>MATαura3 leu2 trp1 his3</i>	※1
TM143	<i>MATα/α ura3 leu2 trp1 his3</i>	This study
BY4742	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
TM220	<i>MATα ade8</i>	※1
TM221	<i>MATα ade8</i>	※1
CG379 (BY24966)	<i><u>MATα ade5 can1 leu2 trp1 ura3 GAL+</u></i>	NBRP
GS1731	<i>MATα, ade1, his</i>	

※1 …東京大学分子細胞生物学研究所前田達哉准教授より恵与された

Kluyveromyces lactis

Strain	Genotype	Source
IFO1267	<i>MATα [pGKL2+ pGKL1+]</i>	JCM

Pichia acaciae

Strain	Genotype	Source
NRRL Y-18665	[pPac1-1+ pPac1-2+]	ARS Culture Collection

Escherichia coli

Strain	Genotype
DH5 α	F ⁻ , Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _K m _K ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1
GM33	F ⁻ , dam-3 sup-85 (Am)
GM119	F ⁻ , dam-3 dcm-6 metB1 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1 (thi-1)

使用したプラスミド

Plasmid	Experiment
pUC19	small RNA cloning, λ phage DNA の cloning
pRS326[103]	D-CRD の発現
pYO316[104]	D-CRD の発現
pGMT10[105]	ImmD の発現
pGML20[105]	tRNase の発現

使用した培地

培地	組成
LB	1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl
YPD	1% Bacto yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% glucose
YPGal	1% Bacto yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% galactose
YPRaff	1% Bacto yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% raffinose
SD	0.67% Bacto yeast nitrogenbase w/o amino acids, 2% glucose
SG	0.67% Bacto yeast nitrogenbase w/o amino acids, 2% galactose
SRaff	0.67% Bacto yeast nitrogenbase w/o amino acids, 2% raffinose

tRNA のノザンハイブリダイゼーションに用いたオリゴ DNA

Name	Sequence
Y-tRNA-Tyr	TCTCCCGGGGGCGAGTC
Y-tRNA-ArgICG	GGACTTGAACCTGGAATCTTCTG
Y-tRNA-ArgUCU	GTCGAACCCATAATCTTCTG
Y-tRNA-ArgCCU	CTCGAACCCGCAGTCTTCT
Y-tRNA-ArgCCG	ACTCGAACCCGGATCACAG
Y-tRNA-AspGUC	AATTGAACCCCGATCTGGCA
Y-tRNA-CysGCA	TCGAACTAAGGACCAACAG
Y-tRNA-GlnUUG	ATTCTGAACCGGGGTTGTCCG
Y-tRNA-CysGCA	TCGAACTAAGGACCAACAG
Y-tRNA-LysUUU	GCTCGAACCCCTGACATTT
Y-tRNA-LeuCAA	TCTTGCATCTTACGATACCTG
Y-tRNA-GlyGCC	TCGAACCGGGGGCCCAACG
Y-tRNA-GluUUC	AGTCGAACCCCGGTCTCCACG
Y-tRNA-AlaAGC	GGAATCGAACCCGGAGACCT
Y-tRNA-ValAAC	TCGAACTGGGGACGTTCTG
Y-tRNA-ProUGG	TTGAACCCAGGGCCTCTCG
Y-tRNA-CysGCA	TCGAACTAAGGACCAACAG
Y-tRNA-GlnUUG	ATTCTGAACCGGGGTTGTCCG
Y-tRNA-GlyGCC	TCGAACCGGGGGCCCAACG
Y-tRNA-HisGUG	CCTAGAATCGAACCCAGGGTTT
Y-tRNA-LysCUU	TCGAACCCCTAACCTTATG
Y-tRNA-MetCAU	TCGATCCGAGGACATCAG
Y-tRNA-ProUGG	TTGAACCCAGGGCCTCTCG
Y-tRNA-ValAAC	TCGAACTGGGGACGTTCTG
tRNAArgICG-5half	GCCAGACGCCGTGACCATT
tRNAPheGAA-5half	GTCTGGCGCTCTCCCAACT

Lys_intron	ATCCTTGCTTAAGCAAATGCGCT
Ile_intron	CCTGTTTGAAAGGTCTTTGGCACA
Leu_intron	CCCACAGTTAACTGCGGTC
Phe_intron	AACTTGACCGAAGTATTT
Mt-tRNA-LysUUU	GTTGAACCAAGCATGGGTTG
tRNA-GlyCCC	AATCGAACCCGGGCCTCATG
Mt-tRNA-AlaUGC	ACTTGAACTCATATTAAATGC
ProUGG-intron	TGCTTTGTCTTCCTGTTTATTCAGGAAG
tRNA-SerUGA	AACAGATTTCAAGTCTGTC

PCR プライマー

Name	Sequence
tADH-NaeI	AAAGGCGGCCATGCCGGTAGAGGTGTGGTCAA
Cter-ImmD-SacI	CGGGAGCTCTTATAATTTAAATTTTTCCAAGATAGATCGG
Flag-D-CRD532-XbaI	AAATCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGACAG GTAATCATCAACCCGTTCCG
Nterm-ImmD-BamHI	AAAGGATCCATGAATAAGATGGCAATGATCGATTT
tADHnewFw	ATACGCTTAACTGCTCATTG
Y-STE2-F	TCACCGGATTTCTCAGTTC
Y-STE2-R	AACTCGTAGGTGTGGGCAAC
Y-STE3-F	ATGGACGAAAATCGTCAAGG
Y-STE3-R	TCGACATAGAAATGCGCTTG
Y-FUS3-F2	ATAAAGTCGCTTCCCATGTACC
Y-FUS3-R2	GTTTCTTGAGGTCTTTCGTCTGT
Y-ACT1-F1	TTGACCAAACACTTACAACCTCCA
Y-ACT1-R1	TTGTGGTGAACGATAGATGGAC
Y-STE2-F2	GCTGTCTAGCTTTCAAACCTGAT
Y-STE2-R2	AACTTTCTGGCTTCCTCATC

Y-STE3-F2	TGTCGACTATAGGATTCCAGATG
Y-STE3-R2	TGAGCTTGAATTCTCTTCTTTTG
Y-FIG1-F1	AGTTTTGACATGGGGTATTGGT
Y-FIG1-R1	TGCAATGTAGATGAATCCGAAG
Y-FUS1-F1	TTGTCACGTTCTAAACCATTGC
Y-FUS1-R1	GAGACAGTCACCAGGCACAAT
ACT1-F2	CTGAAGCTCCAATGAACCCTAAA
ACT1-R2	TGGAACGTTGAAAGTTTCAAACAT
Tel-VI-R0.6-F	GCCTCCTATATTTAGCCTTTTTTGATAT
Tel-VI-R0.6-R	CCGAACGCTATTCCAGAAAGTAG
HMR-E-F	CCCGTCCAAGTTATGAGCTTAATCT
HMR-E-R	GGAGTCTTAATTTCCCTGATTTTAGTTAG
HML-E-F	TTTTTCGCCTTTTATACAGACTTCAA
HML-E-R	ACTTAAGAAATTACATTCCATTGCGATAC
gamma-SacI-R1	CGGGAGCTCTTATACACATTTTCCATTCTG
XbaI-gamma-sig-F1	AAATCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAAGA TATATCATATATTTAGTG
XbaI-gamma-F1	AAATCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCAG CTACTACTGCGAGAGAGGAG
Met/seq-primer	CTTGGTTCTTTTTTAGCTTGTGATCTC
XbaI-PaT_ORF2-sig-F1	AAATCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTATTT ATTATTCTTCTTGA
XbaI-PaT_ORF2-F1	AAATCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTTAAA TGAAGGTGCTATTGG
PaT_ORF2-SacI-R1	CGGGAGCTCCTAAACCTTACATGT
PGAL1-F1	TCGGTTTGTATTACTTCTTATTC
XbaI-PaT_ORF2-F2	GCTCTAGAATGAATCCTACTACATGTTT
XbaI-PaT_ORF2-F3	GCTCTAGAATGTTAAATGAAGGTGCTAT
PaT_ORF2-SacI-R2	GCGAGCTCCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAACCTT

	ACATGTAATACTTTT
PaT_ORF2-SacI-R3	GCGAGCTCCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAACCTT ACATGTAATACTTTTGATTTTACTGTCAG
BamHI-G-sig-F1	CGGGATCCATGAAGATATATCATATATT
BamHI-G-F1	CGGGATCCATGGCAGCTACTACT
G-FLAG-SacI-R1	GCCGAGCTCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTACAC ATTTTCCATTCTGTAGATTATTC
MATalpha2-F1	CAAGGGCCTAGAGAATCTAATGA
MATalpha2-R1	ATTCTGGAGCGATTGTTATTGTT
ORF2-H99A-F1	ATATTAACGGAGCTGATAATGTTTATTA
ORF2-H150A-F1	ATCTTAAAGTAGGAGCTTCAGATTTATTA
ORF2-H234A-F1	CGATGCAAATGGAGCTGATTTACTGAAAA
ORF2-H299A-F1	GGAAGCATAAGAGATGCTGCAAATTAATAG
ORF2-H99A-R1	TAATAAACATTATCAGCTCCGTTAATAT
ORF2-H150A-R1	TAATAAATCTGAAGCTCCTACTTTAAGAT
ORF2-H234A-R1	TTTTCAGTAAATCAGCTCCATTTGCATCG
ORF2-H299A-R1	CTATTAATTTTGCAGCATCTCTTATGCTTCC
lambda2-F1	CTTGGCAACCTTTTTTATATCCCTT
lambda2-R1	CATGGCAATCTCTGCATCTTG
lambda2-internal-R1	GCTCCTTTCAGTCCGAACTTAG
lambda2-internal-F1	AAGTGTATGACGGGCAAAGA

参考文献

1. Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., and Endo, T. (2003). Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol Biol Cell* *14*, 3266-3279.
2. Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T. (2005). tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* *309*, 140-142.
3. Shaheen, H.H., and Hopper, A.K. (2005). Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11290-11295.
4. Shaheen, H.H., Horetsky, R.L., Kimball, S.R., Murthi, A., Jefferson, L.S., and Hopper, A.K. (2007). Retrograde nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in rat hepatoma cells in response to amino acid deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 8845-8850.
5. Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* *18*, 1227-1240.
6. Yoshihisa, T. (2006). tRNA, new aspects in intracellular dynamics. *Cell Mol Life Sci* *63*, 1813-1818.
7. Hopper, A.K., and Shaheen, H.H. (2008). A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics. *Trends Cell Biol* *18*, 98-104.
8. Ghavidel, A., Kislinger, T., Pogoutse, O., Sopko, R., Jurisica, I., and Emili, A. (2007). Impaired tRNA nuclear export links DNA damage and

- cell-cycle checkpoint. *Cell* *131*, 915-926.
9. Weinert, T., and Hopper, A.K. (2007). tRNA traffic meets a cell-cycle checkpoint. *Cell* *131*, 838-840.
 10. Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* *12*, 138-163.
 11. Hoagland, M.B., Stephenson, M.L., Scott, J.F., Hecht, L.I., and Zamecnik, P.C. (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* *231*, 241-257.
 12. Holly, R.W., Everett, G.A., Madison, J.T., and Zamir, A. (1965). Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem* *240*, 2122-2128.
 13. Klug, A., Robertus, J.D., Ladner, J.E., Brown, R.S., and Finch, J.T. (1974). Conservation of the molecular structure of yeast phenylalanine transfer RNA in two crystal forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 3711-3715.
 14. Rich, A. (1974). Transfer RNA and the translation apparatus in the origin of life. *Orig Life* *5*, 207-219.
 15. Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* *6*, 269-279.
 16. Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* *25*, 6384-6391.
 17. Hani, J., and Feldmann, H. (1998). tRNA genes and retroelements in

- the yeast genome. *Nucleic Acids Res* *26*, 689-696.
18. LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* *121*, 713-724.
 19. Wang, X., Jia, H., Jankowsky, E., and Anderson, J.T. (2008). Degradation of hypomodified tRNA(iMet) in vivo involves RNA-dependent ATPase activity of the DExH helicase Mtr4p. *RNA* *14*, 107-116.
 20. Lee, S.R., and Collins, K. (2005). Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *J Biol Chem* *280*, 42744-42749.
 21. Li, Y., and Zhou, H. (2009). tRNAs as regulators in gene expression. *Sci China C Life Sci* *52*, 245-252.
 22. Haiser, H.J., Karginov, F.V., Hannon, G.J., and Elliot, M.A. (2008). Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* *36*, 732-741.
 23. Jöchl, C., Rederstorff, M., Hertel, J., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., Schrettl, M., Haas, H., and Hüttenhofer, A. (2008). Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic Acids Res* *36*, 2677-2689.
 24. Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J., and Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* *14*, 2095-2103.
 25. Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., and

- Zheng, X. (2009). Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett* *583*, 437-442.
26. Thompson, D.M., and Parker, R. (2009). The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *185*, 43-50.
 27. MacIntosh, G.C., Bariola, P.A., Newbigin, E., and Green, P.J. (2001). Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes? *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 1018-1023.
 28. Hua, Z.H., Fields, A., and Kao, T.H. (2008). Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol Plant* *1*, 575-585.
 29. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.F., and Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol* *185*, 35-42.
 30. Stark, M.J., and Boyd, A. (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J* *5*, 1995-2002.
 31. Schaffrath, R., and Breunig, K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* *30*, 173-190.
 32. Butler, A.R., White, J.H., and Stark, M.J. (1991). Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J Gen Microbiol* *137*, 1749-1757.
 33. Butler, A.R., O'Donnell, R.W., Martin, V.J., Gooday, G.W., and Stark, M.J. (1991). *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase

- activity. *Eur J Biochem* 199, 483-488.
34. Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M.J., and Byström, A.S. (2005). The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* 11, 1648-1654.
 35. Klassen, R., Teichert, S., and Meinhardt, F. (2004). Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Mol Microbiol* 53, 263-273.
 36. Klassen, R., Paluszynski, J.P., Wemhoff, S., Pfeiffer, A., Fricke, J., and Meinhardt, F. (2008). The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA(Gln). *Mol Microbiol* 69, 681-697.
 37. Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 158-229.
 38. Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T., and Masaki, H. (1999). A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science* 283, 2097-2100.
 39. Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., and Masaki, H. (2000). A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8278-8283.
 40. 中西孝太郎、修士論文 (2003)
 41. 高橋一敏、博士論文 (2008)
 42. 石田亘、修士論文 (2002)
 43. Nakanishi, K. *et al.*, in preparation
 44. Ikemura, T. (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia*

- coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol* 146, 1-21.
45. Ikemura, T., and Ozeki, H. (1983). Codon usage and transfer RNA contents: organism-specific codon-choice patterns in reference to the isoacceptor contents. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2, 1087-1097.
 46. Wang, S.S., and Hopper, A.K. (1988). Isolation of a yeast gene involved in species-specific pre-tRNA processing. *Mol Cell Biol* 8, 5140-5149.
 47. 木戸淳裕、修士論文 (2006)
 48. Mao, X., Hu, Y., Liang, C., and Lu, C. (2002). *MET3* promoter: a tightly regulated promoter and its application in construction of conditional lethal strain. *Curr Microbiol* 45, 37-40.
 49. Mountain, H.A., and Korch, C. (1991). TDH2 is linked to MET3 on chromosome X of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 873-880.
 50. 鈴木智子、修士論文 (2009)
 51. Ogden, R.C., Lee, M.C., and Knapp, G. (1984). Transfer RNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*: defining the substrates. *Nucleic Acids Res* 12, 9367-9382.
 52. Kisseleva-Romanova, E., Lopreiato, R., Baudin-Baillieu, A., Rousselle, J.C., Ilan, L., Hofmann, K., Namane, A., Mann, C., and Libri, D. (2006). Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J* 25, 3576-3585.
 53. Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., et al. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by

- a matrix of global gene expression profiles. *Science* 287, 873-880.
54. Breitskreutz, A., and Tyers, M. (2002). MAPK signaling specificity: it takes two to tango. *Trends Cell Biol* 12, 254-257.
 55. Cherkasova, V., Lyons, D.M., and Elion, E.A. (1999). Fus3p and Kss1p control G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae* through a balance of distinct arrest and proliferative functions that operate in parallel with Far1p. *Genetics* 151, 989-1004.
 56. Petersen, J.G., Kielland-Brandt, M.C., Nilsson-Tillgren, T., Bornaes, C., and Holmberg, S. (1988). Molecular genetics of serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119, 527-534.
 57. Moreira, J.M., and Holmberg, S. (1998). Nucleosome structure of the yeast *CHA1* promoter: analysis of activation-dependent chromatin remodeling of an RNA-polymerase-II-transcribed gene in TBP and RNA pol II mutants defective in vivo in response to acidic activators. *EMBO J* 17, 6028-6038.
 58. Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
 59. Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417-435.
 60. Rine, J., and Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116, 9-22.
 61. Kimura, A., Umehara, T., and Horikoshi, M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p

- functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet* *32*, 370-377.
62. Perrod, S., and Gasser, S.M. (2003). Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences. *Cell Mol Life Sci* *60*, 2303-2318.
 63. Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* *94*, 595-605.
 64. Komachi, K., Redd, M.J., and Johnson, A.D. (1994). The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes Dev* *8*, 2857-2867.
 65. Smith, R.L., and Johnson, A.D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* *25*, 325-330.
 66. Nehlin, J.O., Carlberg, M., and Ronne, H. (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J* *10*, 3373-3377.
 67. Malavé, T.M., and Dent, S.Y. (2006). Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol* *84*, 437-443.
 68. Laney, J.D., Mobley, E.F., and Hochstrasser, M. (2006). The short-lived Matalpha2 transcriptional repressor is protected from degradation in vivo by interactions with its corepressors Tup1 and Ssn6. *Mol Cell Biol* *26*, 371-380.
 69. Hochstrasser, M., and Varshavsky, A. (1990). In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell* *61*, 697-708.
 70. Gunge, N., and Sakaguchi, K. (1981). Intergeneric transfer of

- deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGK11 and pGK12, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *J Bacteriol* 147, 155-160.
71. Bolen, P.L., Eastman, E.M., Cihak, P.L., and Hayman, G.T. (1994). Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPacl-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 10, 403-414.
 72. Paluszynski, J.P., Klassen, R., and Meinhardt, F. (2007). *Pichia acaciae* killer system: genetic analysis of toxin immunity. *Appl Environ Microbiol* 73, 4373-4378.
 73. Klassen, R., and Meinhardt, F. (2005). Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol* 7, 393-401.
 74. Butler, A.R., White, J.H., Folawiyo, Y., Edlin, A., Gardiner, D., and Stark, M.J. (1994). Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin. *Mol Cell Biol* 14, 6306-6316.
 75. Kitamoto, H.K., Jablonowski, D., Nagase, J., and Schaffrath, R. (2002). Defects in yeast RNA polymerase II transcription elicit hypersensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Genet Genomics* 268, 49-55.
 76. Klassen, R., Jablonowski, D., Stark, M.J., Schaffrath, R., and Meinhardt, F. (2006). Mating-type locus control of killer toxins from *Kluyveromyces lactis* and *Pichia acaciae*. *FEMS Yeast Res* 6, 404-413.
 77. Klassen, R., Krampe, S., and Meinhardt, F. (2007). Homologous

- recombination and the yKu70/80 complex exert opposite roles in resistance against the killer toxin from *Pichia acaciae*. *DNA Repair (Amst)* *6*, 1864-1875.
78. Jablonowski, D., and Schaffrath, R. (2007). Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans* *35*, 1533-1537.
 79. Klassen, R., Wemhoff, S., Krause, J., and Meinhardt, F. (2011). DNA repair defects sensitize cells to anticodon nuclease yeast killer toxins. *Mol Genet Genomics* *285*, 185-195.
 80. Butler, A.R., Porter, M., and Stark, M.J. (1991). Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast* *7*, 617-625.
 81. Banerjee, H., Kopvak, C., and Curley, D. (1998). Identification of linear DNA plasmids of the yeast *Pichia pastoris*. *Plasmid* *40*, 58-60.
 82. Singh, V.K., McCracken, D.A., Nadakavukaren, M.J., and Jayaswal, R.K. (1998). Unique morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* strain GS1731. *FEMS Microbiol Lett* *166*, 95-101.
 83. Winston, F., Dollard, C., and Ricupero-Hovasse, S.L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* *11*, 53-55.
 84. Lew, D.J., and Reed, S.I. (1995). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* *5*, 17-23.
 85. Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and

- their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* *22*, 5767-5768.
86. Shigematsu, M., Ogawa, T., Kido, A., Kitamoto, H.K., Hidaka, M., and Masaki, H. (2009). Cellular and transcriptional responses of yeast to the cleavage of cytosolic tRNAs induced by colicin D. *Yeast* *26*, 663-673.
 87. Redon, C., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Orr, A.H., Lowndes, N.F., and Bonner, W.M. (2003). Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep* *4*, 678-684.
 88. Heideker, J., Lis, E.T., and Romesberg, F.E. (2007). Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell Cycle* *6*, 3058-3064.
 89. Fu, Y., Pastushok, L., and Xiao, W. (2008). DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 908-926.
 90. Keppetipola, N., Jain, R., Meineke, B., Diver, M., and Shuman, S. (2009). Structure-activity relationships in *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin, a eukaryal tRNA anticodon nuclease. *RNA* *15*, 1036-1044.
 91. Raines, R.T. (1998). Ribonuclease A. *Chem Rev* *98*, 1045-1066.
 92. Nishikawa, S., Morioka, H., Kim, H.J., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K., Ohtsuka, E., and Ikehara, M. (1987). Two histidine residues are essential for ribonuclease T1 activity as is the case for ribonuclease A. *Biochemistry* *26*, 8620-8624.
 93. Jones, S.J., Worrall, A.F., and Connolly, B.A. (1996). Site-directed mutagenesis of the catalytic residues of bovine pancreatic

- deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* *264*, 1154-1163.
94. Jablonowski, D., Zink, S., Mehlgarten, C., Daum, G., and Schaffrath, R. (2006). tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. *Mol Microbiol* *59*, 677-688.
 95. Kalhor, H.R., and Clarke, S. (2003). Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. *Mol Cell Biol* *23*, 9283-9292.
 96. Kelker, H.C., and Pogo, A.O. (1980). The stringent and relaxed phenomena in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *255*, 1526-1535.
 97. Pommer, A.J., Cal, S., Keeble, A.H., Walker, D., Evans, S.J., Kühlmann, U.C., Cooper, A., Connolly, B.A., Hemmings, A.M., Moore, G.R., et al. (2001). Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9. *J Mol Biol* *314*, 735-749.
 98. Proffitt, J.H., Davie, J.R., Swinton, D., and Hattman, S. (1984). 5-Methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA. *Mol Cell Biol* *4*, 985-988.
 99. Wilkinson, C.R., Bartlett, R., Nurse, P., and Bird, A.P. (1995). The fission yeast gene *pmt1+* encodes a DNA methyltransferase homologue. *Nucleic Acids Res* *23*, 203-210.
 100. Schneider, C., Anderson, J.T., and Tollervy, D. (2007). The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. *Mol Cell* *27*, 324-331.
 101. 妻鳥奈津子、修士論文 (2008)
 102. 大本哲也、修士論文 (2010)

103. Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *122*, 19-27.
104. Qadota, H., Anraku, Y., Botstein, D., and Ohya, Y. (1994). Conditional lethality of a yeast strain expressing human RHOA in place of RHO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9317-9321.
105. Iha, H., and Tsurugi, K. (1998). Shuttle-vector system for *Saccharomyces cerevisiae* designed to produce C-terminal-Myc-tagged fusion proteins. *Biotechniques* *25*, 936-938.

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏 名 茂松 恵
指導教員名 正木 春彦

論文題目

出芽酵母における tRNA 切断と細胞応答の解析

tRNA は、mRNA 上の遺伝暗号を対応するアミノ酸へと変換するアダプター分子である。1955 年に Crick によりその存在が予言され、その翌年に実体が発見されて以来、アダプター分子としての構造や機能の研究が盛んに行われてきた。ところが最近になって、これまでのアダプター分子としての機能とは異なる全く新しい生理現象に関する報告が相次いでなされている。それらの中で特に注目すべきこととして、ヒト培養細胞やシロイヌナズナ、テトラヒメナ、出芽酵母、放線菌など幅広い生物種において、アミノ酸飢餓、酸化、高温など種々のストレスに応答して tRNA の切断が誘導されることが明らかにされた。このことから、tRNA 切断が生物にとって普遍的な現象であることが示唆されている。そこで本研究では、出芽酵母において人工的に tRNA をロックダウンし、これに対する細胞応答を解析した。一方で、キラ酵母と呼ばれる *Kluyveromyces lactis* が生産する zymocin や、*Pichia acaciae* が生産する PaT が、それぞれ出芽酵母の tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln} を切断するトキシンであることが明らかにされた。感受性出芽酵母に対して、zymocin は G1 期で、PaT は S 期で細胞周期を停止させる。これらのトキシンによる tRNA 切断は、感受性菌の増殖阻害を目的として引き起こされるため、ストレスに対する応答

としての tRNA 切断とは、生理的意義が本質的に異なると考えられる。そこで、キラー酵母による tRNA 切断に対する細胞応答についても解析した。

第 1 章 D-CRD 発現株における細胞応答の解析

過酸化水素水による酸化ストレスの誘導や、生育に必要なアミノ酸を欠いた培地を用いるアミノ酸飢餓の再現では、それらのストレスへの応答に埋もれてしまうため、tRNA の切断に対する細胞応答を追跡することは困難であると考えた。そこで本研究では、コリシン D の C 末端側にあるリボヌクレアーゼドメイン (D-CRD) を出芽酵母内で発現させることで、tRNA を人工的にノックダウンし、その細胞応答を解析した。コリシン D は大腸菌群の Col プラスミドにコードされるタンパク質性毒素であり、大腸菌に存在する 4 種類の tRNA^{Arg} (tRNA^{Arg}ICG, tRNA^{Arg}CCG, tRNA^{Arg}UCU, tRNA^{Arg}CCU) を標的とする。

これまでに、 α 細胞において D-CRD により tRNA をノックダウンし、これ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解析した。その結果、接合に関与する遺伝子群が発現上昇することを明らかにした。またこのとき、 α 細胞内では、通常転写が抑制されている a 細胞特異的遺伝子の発現が活性化していることを見出した。そこで、 α 細胞、a 細胞、a/ α 細胞を用いて tRNA をノックダウンした際の α 細胞特異的遺伝子 (*asg*) 及び a 細胞特異的遺伝子 (*asg*) の転写量の変化を調べた。すると、 α 細胞での *asg* の転写活性化は再現されたが、a 細胞では *asg* は転写されず、また a/ α 細胞でも *asg*, *asg* 共に発現は見られなかった。一方、cycloheximide で処理した細胞において接合型特異的遺伝子の転写量の変化を調べたところ、やはり α 細胞での *asg* が活性化した。従って、 α 細胞において *asg* の転写を抑制している Tup1p-Cyc8p complex の形成が、タンパク質合成の低下に伴って阻害されたために、このような現象が起きたと結論づけた。接合型特異的遺伝子の転写抑制は、細胞の恒常性を保つ上で重要であるが、接合型によってその抑制機構が異なるために、タンパク質合成の低下に対して接合型依存的な脆弱性を示すことが分かった。

第 2 章 tRNA を切断するキラー毒素に対する細胞応答の解析

キラー毒素である zymocin, PaT の tRNA 切断に対する細胞応答を解析するため

に、zymocin および PaT の tRNA 切断活性を持つサブユニットである γ -subunit, Orf2p をそれぞれ酵母内で発現させ、D-CRD が誘導する tRNA 切断に対する細胞応答と比較した。また、tRNA を切断するにも関わらず、zymocin は G1 期で、PaT は S 期で感受性酵母の細胞周期を停止させる。そこで、こうした違いが生じる原因についても併せて解明することとした。 γ -subunit, Orf2p をコードする遺伝子を *GAL1* プロモーターに繋ぎ、出芽酵母の染色体に組込んで発現誘導を行った。その結果、 γ -subunit, Orf2p によりそれぞれ tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln} が切断され、これによる生育阻害が確認された。但し、 γ -subunit の発現による生育阻害の程度は、Orf2p と比較して低かった。また FACS を用いた解析で、 γ -subunit の発現により宿主の細胞周期が G1 期で、Orf2p の発現により S 期でそれぞれ停止することも観察された。一方で、コントロールとして D-CRD 発現株の細胞周期解析も行ったが、特定のフェーズでの細胞周期停止は観察されなかった。PaT は感受性酵母に対し DNA 損傷を引き起こすことが報告されている。そこで、ヒストン H2A の特異的リン酸化状態を指標として、 γ -subunit, Orf2p 発現株における DNA 損傷誘導の有無について検証した。その結果、Orf2p 発現株でのみヒストンのリン酸化が観察された。このことから、zymocin と PaT との間で細胞周期停止のフェーズが異なるのは、PaT が、tRNA 切断活性に加えて DNA 損傷を誘導する活性を持つためであることが示唆された。また、これらの株 (α 細胞) において *asg* の発現量を調べたところ、Orf2p 発現株では D-CRD 発現株の場合と同様に転写量が上昇していたが、 γ -subunit 発現株では転写の活性化は見られなかった。このことから、 γ -subunit 発現株ではタンパク質合成の低下に対する応答とは異なる細胞応答を示していると考えられた。

第 3 章 キラートキシン PaT による DNA 損傷誘導機構の解明

第 2 章で得られた結果から、PaT は tRNA 切断と DNA 損傷の誘導という二つの活性を持つことが示唆された。しかしながら一方で、PaT による tRNA^{Gln} の切断が DNA 損傷を誘導する可能性も否定出来ない。そこで、*in vivo*, *in vitro* において tRNA 切断活性を失った Orf2p の機能を調べることで、これを明らかにすることとした。tRNA 切断活性に関与するアミノ酸として、Orf2p に存在する 4 つの His 残基に注目した。これらを Ala に変異させた変異型 Orf2p を作出し出芽酵母で発現させた結果、Orf2p-H299A は、宿主の生育阻害及び tRNA 切断を起こさなかった。また Orf2p-H299A 発現株では、ヒ

ストン H2A のリン酸化も見られなかった。このことから、H299 が tRNA 切断活性と DNA 切断活性の両方に共通した触媒残基である可能性を考えた。また Orf2p の免疫染色を行った結果、核に局在している様子が見られたことから、Orf2p は細胞質で tRNA を切断するだけでなく、核に移行して DNA と直接作用することが示唆された。次に、精製した野生型 Orf2p 及び Orf2p-H299A を、*in vitro* で出芽酵母の染色体や λ phage 由来の DNA 断片と反応させ、電気泳動を行った。その結果、野生型 Orf2p は、DNA との結合能を持つことが分かった。一方で、Orf2p-H299A は DNA 結合能を消失していた。また、基質 DNA の修飾が、Orf2p との相互作用に影響することが示唆された。現在、Orf2p が DNA 切断活性を持つ可能性を検討している。

総括

本研究では、D-CRD を用いて tRNA ノックダウンモデル細胞を構築し、細胞質 tRNA の切断に対する細胞応答を解析した。また、tRNA 切断性キラー毒素である zymocin や PaT によって引き起こされる tRNA 切断と、D-CRD による tRNA ノックダウンに対する細胞応答を比較した。D-CRD 及び Orf2p の発現による接合型特異的遺伝子の抑制機構の解除は、tRNA 切断に特異的な現象では無く、タンパク質合成の低下が原因であると考えられた。今後は、D-CRD の発現では特異的な細胞周期停止が起こらず、 γ -subunit 発現株では G1 期停止が起こることが、切断される tRNA の量や種類に起因するかを検証していくことで、tRNA と細胞周期制御の関連を明らかにしていきたい。一方 Orf2p は、tRNA 切断活性に加え、DNA と直接相互作用することで、細胞周期の S 期停止を誘導することが分かった。このことから、PaT が tRNA と DNA の両方を標的とする極めて新規性の高い毒素である可能性が示された。

発表論文

Shigematsu, M., Ogawa, T., Kido, A., Kitamoto, HK., Hidaka, M., Masaki, H. (2009) Cellular and transcriptional responses of yeast to the cleavage of cytosolic tRNAs induced by colicin D. *Yeast*, **26**, 663-73.

謝辞

本論文は、東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程在学中の研究成果をまとめたものです。

本研究を行うにあたり、終始適切な御助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科分子育種学研究室教授正木春彦先生に心より御礼申し上げます。また研究に対して有益な御助言を賜るとともに、私の良き理解者ともなって頂いた同研究室准教授日高真誠先生にも、心から感謝を申し上げます。そして同研究室助教小川哲弘先生には、日頃からいちばん身近なところで私を叱咤激励し、研究を導いてくださいました。ありがとうございます。

共同研究者である農業環境技術研究所北本宏子博士には、多くの株やプラスミドを提供して頂きました。未熟な私をいつも見守って下さったことにも、重ねて御礼申し上げます。東京大学分子細胞生物学研究所准教授前田達哉先生、東京大学農学生命科学研究科生物化学研究室准教授舘川宏之先生、同分子生命工学研究室助教野田陽一先生には、酵母の株やプラスミドをお譲り頂いただけでなく、実験や研究に対する御助言を頂き、また学会でも大変お世話になりました。ここに深く感謝致します。また私の研究に不可欠であった FACS をお貸し頂いた東京大学分子細胞生物学研究所教授渡邊嘉典先生にも深く御礼申し上げます。細胞遺伝学研究室の先生、先輩方には研究以外の面でも大変お世話になりました。ありがとうございます。

日頃から研究室で生活を共にしてきた分子育種の先輩や後輩、そしてこの生物生産工学研究センターの同期のみんなに、感謝致します。5年間ただひたすら楽しい研究生活を送ることが出来たのは、あなたたちのおかげです。そして何より、一緒に分子育種での酵母研究を盛り上げてくれた大本哲也、大石早希子、田中亘、眞鍋瑛美、これまでついて来てくれて、本当にありがとう。

最後に、長きに渡る学生生活を支え、いつも遠くから応援してくれていた両親に、感謝します。

2011年3月15日