



Wobble inosine tRNA modification is essential to cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast

堤, 聡

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-10-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3132

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003132>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	堤 聡
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3132 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 10 月 12 日

【 学位論文題目 】

Wobble inosine tRNA modification is essential to cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast (分裂酵母において tRNA の wobble 位イノシン修飾は細胞周期の G1/S 期移行および G2/M 期移行に必須である)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博

教授中村 俊一教 授 古瀬 幹夫

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Wobble inosine tRNA modification is essential to cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast

分裂酵母において tRNA の wobble 位イノシン修飾は細胞周期の G1/S 期移行および G2/M 期移行に必須である

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻生化学・分子生物学講座
分子薬理・薬理ゲノム学分野 久野高義教授)

堤 聡

真核生物ではアミノ酸をコードする 61 種類のコドンに対して実際それらを解読する tRNA 遺伝子の数ははるかに少なく両者の数が合わない。実は tRNA の 34 位 (アンチコドンの 1 字目、あるいは wobble 位) のアデニンをイノシンに変換することにより、1 種類の tRNA で 3 字目に U,C,A がくる 3 種類のコドンを読み解けるようにしている。この tRNA のイノシン修飾は出芽酵母では Tad2p・Tad3p のヘテロダイマーからなる tRNA^A:34 deaminase によって触媒され、いずれのサブユニットをノックアウトしても致死となる。したがって tRNA の wobble 位イノシン修飾は生存に必須であるといえるが、その生理的役割についてはほとんど知られていない。本研究では、分裂酵母の細胞周期変異株として *tad3-1* 変異株を分離し、その表現型について詳細な解析を行うことで tRNA におけるイノシン修飾の生理的役割を検討した。

まず分裂酵母の新規の細胞周期関連変異株を分離する目的で、ニトロソグアニジン処理した野生株細胞 20 万個の中から温度感受性かつ制限温度下でフロキシシン B (死んだ細胞を赤く染める色素) に染まらない変異株をスクリーニングした。その結果 2 つの相補群が得られ、そのうち 1 つの相補群に属する KP186 株について一連の解析を行った。KP186 株は 27℃ では野生株と同様に生育するが、33℃ 以上ではまったく生育できず、強い温度感受性を示した。KP186 株を 36℃ で培養すると、細胞が伸長するとともに M 期細胞の割合が経時的に減少し、一方 FACS 解析では終始複製後の DNA 量を示すことから、G2 期で細胞周期停止を起こしていることが示唆された。一方窒素源飢餓により 27℃ で細胞周期を G1 期に同調させたのち 36℃ に移して細胞周期進行を再開させたところ、野生株と異なり KP186 株は G1 期で留まったままであった。以上より KP186 株は G1/S 期および G2/M 期の移行が障害された細胞周期変異株であることを確認した。

KP186 株の変異遺伝子を同定すべく温度感受性の相補を指標にゲノムライブラリーをスクリーニングしたところ、温度感受性を完全に相補する (36℃ での生育を可能にする) 遺伝子として出芽酵母 tRNA^A:34 deaminase の非触媒サブユニット Tad3p のホモログをコードする *tad3* 遺伝子を取得した。インテグレーションマッピングでは変異遺伝子と *tad3* 遺伝子座位の強い連鎖を認め、実際 Tad3 の deaminase domain 内にミスセンス変異 S257N ; AGT→AAT を同定した。以上より KP186 株は *tad3-1* 変異株であることを確認した。

次に tRNA^A:34 deaminase の酵素活性を検討すべく、その基質のひとつであるアラニン tRNA (アンチコドン AGC) の cDNA を調整してそのシーケンス解析を行った。その結果、野生株由来の cDNA では 15/15 クローン (100%) で 34 位にイノシン修飾を認めたのに対し、*tad3-1* 変異株由来の cDNA では 1/15 クローン (7%) にしかイノシン修飾を認めなかった。さらに *tad3-1* 変異株は翻訳過程を阻害するシクロヘキシミドに対して強い感受性を示した。以上より *tad3-1* 変異株では tRNA のイノシン修飾の低下が実際に起きており、そ

れに伴って翻訳過程も障害されていることが示唆された。

酵素活性のないTad3 サブユニットに生じたミスセンス変異がtRNA A:34 deaminaseの酵素活性を低下させるメカニズムを探るべく、*tad3-1* 変異株のマルチコピーサプレッサーをスクリーニングした。その結果、温度感受性を部分的に相補する（36℃では生育できないが33℃での生育は可能である）マルチコピーサプレッサーが1種類だけ取得でき、それは興味深いことに出芽酵母tRNA A:34 deaminaseの触媒サブユニットTad2pのホモログをコードする*tad2*遺伝子であった。このことからTad3 のS257N変異はTad2 との結合力を低下させることでTad2・Tad3 enzyme complexの不安定化をきたしている可能性が考えられた。そこでGFP-Tad2 fusion proteinをstableに発現する細胞株にGST、GST-野生型Tad3、あるいはGST-変異型Tad3 を発現するベクターを導入しそれぞれでGSTプルダウンアッセイを行ったところ、実際に変異型Tad3 は野生型Tad3 と比較してTad2 との結合力が明らかに低下していた。

tad3-1 変異株の温度感受性は、*tad3*遺伝子の導入により完全に相補され、*tad2*遺伝子の導入により部分的に相補される。一方液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)によりtRNAに含まれるイノシン量を測定したところ、*tad3-1* 変異株では野生株の36%にまで減少しているのに対し、*tad3*遺伝子の導入では95%とほぼ完全に回復し、*tad2*遺伝子の導入では69%まで回復していた。すなわち温度感受性の程度とイノシン修飾の程度の間に関連を認め、*tad3-1* 変異株の表現型はtRNAのイノシン修飾の低下によるものであることが示唆された。

以上の結果より、分裂酵母においてtRNAのwobble位イノシン修飾は出芽酵母同様Tad2・Tad3のヘテロダイマーからなるtRNA A:34 deaminaseにより触媒され、生理的には細胞周期のG1/S期移行およびG2/M期移行に必須であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2089号	氏 名	堤 聡
論文題目 Title of Dissertation	分裂酵母において tRNA の wobble 位イノシン修飾は細胞周期の G1/S 期移行および G2/M 期移行に必須である Wobble inosine tRNA modification is essential to cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast		
審査委員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner 副 査 古瀬 幹夫 Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

真核生物ではアミノ酸をコードする 61 種類のコドンに対し、それらを解読する tRNA
遺伝子の数ははるかに少ないが、tRNA の 34 位（アンチコドンの 1 字目、または wobble 位）
のアデニンをイノシンに変換することにより、1 種類の tRNA で 3 字目に U,C,A がくる
3 種類のコドンを読解できるようにしている。
この tRNA のイノシン修飾は出芽酵母では Tad2p・Tad3p のヘテロダイマーからなる
tRNA A:34 deaminase によって触媒され、いずれをノックアウトしても致死となる。
しかし、tRNA の wobble 位イノシン修飾の生理的役割については殆ど知られていない。
本研究では、分裂酵母の細胞周期変異株として <i>tad3-1</i> 変異株を分離し、表現型について詳細な解析を行うことで tRNA におけるイノシン修飾の生理的役割を検討した。
まず分裂酵母の新規細胞周期関連変異株を分離するため、ニトロソグアニジン処理した
野生株細胞 20 万個の中から温度感受性かつ制限温度下でフロキシシン B に染まらない
変異株を選定した。得られた 2 つの相補群の内、1 つの相補群に属する KP186 株は
27℃では野生株と同様に生育するが、33℃以上では生育できず、強い温度感受性を示した。
KP186 株を 36℃で培養すると、細胞が伸長するとともに M 期細胞の割合が経時的に減少し、
一方 FACS 解析では終始複製後の DNA 量を示すことから、G2 期で細胞周期停止を
起こしていると示唆された。窒素源飢餓により 27℃で細胞周期を G1 期に同調させた後
36℃にし細胞周期進行を再開させたところ、野生株と異なり KP186 株は G1 期で
留まったままであり、KP186 株は G1/S 期及び G2/M 期の移行が障害された細胞周期変異株
であることが示された。
KP186 株の変異遺伝子を同定すべく温度感受性の相補を指標にゲノムライブラリーを
スクリーニングし、温度感受性を完全に相補する遺伝子として出芽酵母 tRNA A:34
deaminase の Tad3p ホモログをコードする <i>tad3</i> 遺伝子を取得した。
Tad3 の deaminase domain 内にミスセンス変異 S257N ; AGT→AAT を同定し、
KP186 株は <i>tad3-1</i> 変異株であることが確認された。
次に tRNA A:34 deaminase の酵素活性を検討するため、基質の 1 つであるアラニン

tRNA の cDNA を調整しシーケンス解析を行った。野生株由来の cDNA では 15/15
クローンで 34 位にイノシン修飾を認めたのに対し、 <i>tad3-1</i> 変異株由来 cDNA では
1/15 クローンにしかイノシン修飾を認めなかった。さらに <i>tad3-1</i> 変異株は翻訳過程を
阻害するシクロヘキシミドに対して強い感受性を示した。以上、 <i>tad3-1</i> 変異株では
tRNA のイノシン修飾の低下が起きており、それに伴って翻訳過程も障害されている。
Tad3 サブユニットに生じたミスセンス変異が酵素活性を低下させる機構を探るため、
<i>tad3-1</i> 変異株のマルチコピーサプレッサーをスクリーニングした。
その結果、温度感受性を部分的に相補するマルチコピーサプレッサーが 1 種類取得でき、
それは出芽酵母 tRNA A:34 deaminase の触媒サブユニット Tad2p ホモログをコードする
<i>tad2⁺</i> 遺伝子であった。GFP-Tad2 fusion protein を stable に発現する細胞株に GST、
GST 野生型 Tad3、または GST 変異型 Tad3 を発現するベクターを導入し、
GST プルダウンアッセイを行ったところ、変異型 Tad3 は野生型 Tad3 と比較し
Tad2 との結合力が明らかに低下していた。
<i>tad3-1</i> 変異株の温度感受性は、 <i>tad3⁺</i> 遺伝子の導入により完全に相補され、 <i>tad2⁺</i> 遺伝子
の導入により部分的に相補される。一方 LC/MS により tRNA に含まれるイノシン量を
測定したところ、 <i>tad3-1</i> 変異株では野生株の 36% まで減少しているのに対し、
<i>tad3⁺</i> 遺伝子の導入では 95% とほぼ完全に回復し、 <i>tad2⁺</i> 遺伝子の導入では 69% まで
回復した。即ち、温度感受性の程度とイノシン修飾の程度の間に関連を認め、 <i>tad3-1</i>
変異株の表現型は tRNA のイノシン修飾の低下によるものと考えられる。
本研究は、分裂酵母における tRNA の wobble 位イノシン修飾の生理的役割を研究した
ものであるが、従来解明されていなかった細胞周期の G1/S 期移行及び G2/M 期移行に
おける役割を見出したものとして価値ある業績と認める。
よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

2. 外国語について

第 48 回（平成 21 年度）乙号外国語試験（英語）合格

1 および 2 の結論の要旨

質問に対して、いずれの委員の諮問についても的確な回答が得られた。また、乙号外国語試験（英語）に合格している。よって、申請者は博士（医学）の学位を得るのに十分な学力を有していると判定し、合格とした。