

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840005

研究課題名(和文) tRNAの新規成熟経路の解析と5' キャップによる成熟制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of alternative pathway of tRNA maturation and pre-tRNA capping in tRNA maturation

研究代表者

大平 高之(OHIRA, TAKAYUKI)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90727520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母における末端が未成熟なtRNA前駆体の細胞内輸送に関わる新規の輸送因子の探索し、成熟化に影響を与える核外輸送因子を特定した。また、5' リーダー配列を持ったtRNA前駆体の5'末端に見出された5' キャップ修飾(pre-tRNA capping)の生合成および生理的機能について解析を行い、既知の5' キャップ形成機構によって作られること、tRNA前駆体を5' エクソヌクレアーゼによる分解から保護し安定化していることが示された。これはpre-tRNA cappingはtRNA成熟化をサポートしていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)： We explored novel transporters required for tRNA maturation via alternative pathway in budding yeast, in which tRNA precursors (pre-tRNAs) with immature ends are exported to the cytoplasm for splicing and then imported back to nucleus to be end-matured, and identified the exportin which was required for normal tRNA maturation. In addition, we also analyzed the biosynthetic mechanism and the physiological function of 5'-capping formed at the 5'-termini of pre-tRNAs with 5'-leader sequences (pre-tRNA capping), and revealed that which was formed by a canonical capping machinery and stabilized the pre-tRNAs by preventing 5'-exonucleolytic degradation, indicating that pre-tRNA capping supported the tRNA maturation.

研究分野：分子生物学

キーワード：tRNA tRNA maturation 5' capping nuclear export RNA modification

1. 研究開始当初の背景

生物は自身が必要とするタンパク質を過不足なく正確に合成し続ける必要があります、そのためには mRNA 上の遺伝暗号を厳密に読み取ることができる機能的に成熟した tRNA が細胞内に十分量存在していなければならない。真核性物において tRNA は機能的に未熟な前駆体 (tRNA precursor: pre-tRNA) として核内で合成された後、様々な転写後プロセッシングを受けることで成熟体となる。転写後プロセッシングには 5' 末端および 3' 末端のトリミング、イントロンの切り出し、メチル化やアセチル化などの転写後修飾 (RNA 修飾) の導入がある。これらプロセッシングを行う酵素はそれぞれ様々な細胞内区画に局在していることから、tRNA の成熟化は細胞内をダイナミックに移動しながら遂行される。しかしながら、成熟機構には未だわかっていないことが多く、例えばどのように成熟化が開始するのか、RNA 修飾が成熟過程のどのタイミングで、細胞内のどこで導入されるか、といった基本的な問題も残されている。

このような背景から申請者は、tRNA 研究の材料として昔から用いられ、かつ遺伝学的手法などの様々な解析法が確立されている出芽酵母を用い、tRNA の成熟機構について研究を行っており、新規の tRNA 成熟経路 (Alternative 経路) が存在することを発見した (図 1b)。通常の成熟経路 (Classical 経路) では pre-tRNA は末端が成熟した後、細胞質へと輸送されるのだが、Alternative 経路では末端が成熟する前の pre-tRNA が細胞質へと輸送され、細胞質でスプライシングを受けた後、再び核に戻って末端の成熟が行われる (図 1a)。また、申請者は Alternative 経路から生じる末端未成熟の pre-tRNA の 5' 末端を調べたところ、一部にメチル化グアノシンキャップが付加されていることを発見し、この現象を pre-tRNA capping と命名した (図 1b)。

さらにこれらの発見について解析を行ったところ、Alternative 経路において末端未成熟の pre-tRNA を細胞質へ運ぶ輸送因子は、Classical 経路で働く既知の輸送因子とは異なることが判明した。また、これら 2 つの tRNA 成熟経路の選択機構を明らかにするため、それぞれの成熟経路から生じる pre-tRNA を単離し LC/MS 解析により各 RNA 修飾の導入率を調べたところ、Alternative 経路から生じる pre-tRNA は、Classical 経路のもの比べて一部の RNA 修飾の導入率がやや低いことが判明し、RNA 修飾が成熟経路の選択に影響することが示唆された。さらに 5' キャップについては、tRNA の種類によって 5' キャップの導入率が異なることや、5' 末端のトリミングを行う RNase P の活性を阻害し、末端未成熟の pre-tRNA を蓄積させると、5' キャップを持つものが顕著に増加することが判明した。これは 5' キャップが積極的に pre-tRNA に付加されており、tRNA によって

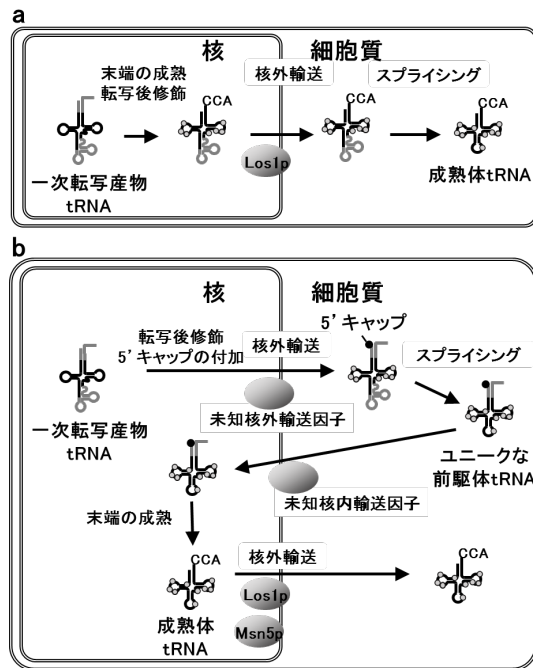


図 1. 出芽酵母における tRNA 成熟化機構。Classical 経路 (a) と Alternative 経路 (b)。Alternative 経路では末端未成熟な pre-tRNA が生じる (図中のユニークな tRNA 前駆体)。また、この経路では 5' キャップ (●: 黒丸) を持つ pre-tRNA が確認された。

異なる制御を受けていることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、Alternative 経路において必要となる核外・核内輸送因子の同定及び、2 つの tRNA 成熟経路の選択機構を明らかにし、tRNA 成熟機構をより詳細に理解すること、pre-tRNA capping の生合成機構および機能を明らかにし、tRNA 成熟化の観点からその意義を理解することを目指すと共に、これら解析を通して RNA の成熟や代謝制御における新しい概念を築くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) Alternative 経路に関わる pre-tRNA 輸送因子の探索

Alternative 経路では、末端未成熟の pre-tRNA を細胞質へ運ぶ核外輸送因子と、再び核内に運ぶ核内輸送因子が必要となる。出芽酵母における Importin- ファミリータンパク質は全部で 14 種ある。この内、Los1p と Msn5p は Classical 経路における tRNA の核外輸送に関わることが知られているが、Alternative 経路には必要ないことがこれまでの解析から判明している。そこで、これら以外の核外輸送因子の関与について調べる。一方、核内輸送因子である Mtr10p が tRNA 成熟体の核内輸送に関与することが示されている (文献)。また、Hsp70 ファミリーに属する Ssa2p も tRNA 成熟体の核内輸送に関与することが報告されている (文献)。そこで核内輸送因子については、まずはこれら 2 種

が Alternative 経路に関与するか調べる。具体的には、解析対象とした核内・核外輸送因子の遺伝子欠損株あるいは発現制御株を作成し、pre-tRNA の輸送阻害が見られるかどうかノーザン解析により確認することで特定する。複数の輸送因子が関与している可能性も考えられるので、二重あるいは三重遺伝子発現制御株を作成することも検討している。

輸送因子を特定することが出来たら、実際にどのように pre-tRNA を認識し、輸送しているのか解析を行う。まずは特定した輸送因子が pre-tRNA と直接相互作用しているのか調べるため、アフィニティタグを付加した輸送因子を細胞内で発現させ、アフィニティ精製により評価する。また、輸送因子が単独で pre-tRNA と相互作用できるか調べるため、精製した輸送因子と pre-tRNA を用いゲルシフトアッセイを行うことで評価する。さらに、輸送因子のアミノ酸置換変異やドメインを欠失したものを作成し、pre-tRNA の認識に必要な領域を特定する。また、pre-tRNA を認識する際にパートナータンパク質が必要かどうかといった点についても検証を行う。

(2) tRNA 成熟経路の選択機構の解析

Alternative 経路から生じる末端未成熟の pre-tRNA は、Classical 経路から生じる前駆体と比べて RNA 修飾の導入率が部分的に低かった点に注目し、tRNA 成熟経路の選択と RNA 修飾の関係について解析を行い、tRNA 成熟経路の選択における RNA 修飾の影響を明らかにする。

RNA 修飾酵素の遺伝子を欠損した出芽酵母株を用い、それら株において成熟経路の選択に変化が見られるかノーザン解析により調べる。修飾率の低い前駆体ほど Alternative 経路に流入すると考えられるので、RNA 修飾の遺伝子欠損株では末端未成熟の pre-tRNA の定常状態量が増加していると考えられる。この解析を通し、成熟経路を決める RNA 修飾が特定の修飾によるものなのか、あるいは修飾の組み合わせやパターンによるものかを明らかにする。

次に、RNA 修飾が、tRNA 輸送因子の認識に影響するのか解析を行う。RNA 修飾を欠いた pre-tRNA に対する tRNA 輸送因子の親和性をゲルシフトアッセイおよび免疫沈降により評価する。基質とする pre-tRNA は、RNA 修飾酵素の遺伝子欠損株から単離したものをを用いる。本解析によって、輸送因子が RNA 修飾の導入率の低い pre-tRNA を好んで結合するという結果が得られれば、この輸送因子と RNA 修飾が成熟経路を決める上で重要な因子であることを示すことが出来ると考えている。

(3) Pre-tRNA capping の生合成機構の解析

研究目的の に関連し、pre-tRNA capping の生合成に関わる因子を同定するため、まずは既知の 5' キャップ形成に関わる

遺伝子群 (*CET1*, *CEG1*, *ABD1*, *TGS1*, *SWM2*) の欠損株あるいは発現制御株を作成し、それら株において pre-tRNA capping の形成が阻害されるか、pre-tRNA を単離し、LC/MS 解析による構造解析を行う。しかしながら、野生株では pre-tRNA は極微量で解析が困難であるため、pre-tRNA を蓄積させることができる RNase P の発現抑制株 (*tetO₇-POP4* 株) を親株とすることで量的な問題をクリアする。もし、pre-tRNA capping の形成阻害が見られなかった場合は、未知の酵素が pre-tRNA capping の形成に関与していると考えられるので、その際はキャップ付加能を持つと思われる酵素を絞り込み、その遺伝子欠損株を作成し、pre-tRNA capping 形成が阻害されるか解析を行う。

また、tRNA の種類や成熟の程度によって pre-tRNA capping の形成率に違いが見られた原因についても解析を行う。これまでの解析から、pre-tRNA の末端の構造的安定性が 5' キャップの形成効率に影響していると考えており、これを検証するため、いくつかの pre-tRNA を実際に単離し、LC/MS 解析による末端の構造解析から、pre-tRNA capping の形成効率との関係性を明らかにする予定である。

(4) Pre-tRNA capping の機能解析

tRNA の成熟化における pre-tRNA capping の機能を調べるため、(3) で作成した 5' キャップの形成阻害株を用い、この株における pre-tRNA の定常状態量、細胞内局在、プロセシング効率を調べる。まずは、pre-tRNA capping の阻害により、pre-tRNA の定常状態量や前駆体と成熟体との比率に変化が見られるかノーザン解析を行う。Pre-tRNA の蓄積量の減少が見られた場合は、5' キャップは pre-tRNA を分解から保護していると考えられる。その場合は、分解機構を明らかにするため分解酵素の特定を行う。分解は 5' エキソヌクレアーゼである *Xrn1p* あるいは *Xrn2p* によると考えられるので、5' キャップ形成阻害株を親株とし、これら 5' エキソヌクレアーゼの遺伝子欠損株を作成し、これら株における tRNA についてノーザン解析を行い、pre-tRNA の蓄積量が回復するか確認する。Pre-tRNA が 5' エキソヌクレアーゼによって分解されているという報告はこれまでになく、本研究が初めての試みとなる。

Pre-tRNA capping の阻害によって、pre-tRNA は増加したが、成熟体は減少したといったパターンの変化が確認された場合は、5' キャップは tRNA の成熟を促進していると推測される。これを確かめる場合は、5' 末端および 3' 末端のプロセシングを行う RNase P と *Trz1p* をそれぞれ調製し、これらによるプロセシングが 5' キャップによる影響を受けるのか *in vitro* において調べる。

Pre-tRNA capping が pre-tRNA の細胞内局在を制御している可能性について検証する

場合は、pre-tRNA 特異的に結合する DNA プロンプを用い、*in situ* ハイブリダイゼーションにより評価する。Pre-tRNA capping の阻害により細胞内局在に違いが見られた場合は、局在化を制御する因子を同定するため、5' キャップを持つ pre-tRNA と結合するタンパク質の探索を行う。具体的に述べると、まず、5' キャップを持つ pre-tRNA と 5' キャップを持たない pre-tRNA をそれぞれ用意し担体に固定化する。次いで、調製した担体と出芽酵母の細胞抽出液を混合し、5' キャップを持つ pre-tRNA を固定化した担体のみ特異的に結合したタンパク質を特定する。そして、特定したタンパク質の遺伝子欠損株を作成し、細胞内局在の変化が見られるか、pre-tRNA について *in situ* ハイブリダイゼーションによる確認を行う。

(5) Pre-tRNA capping の進化的保存性

出芽酵母以外の生物種（ヒト、マウス、植物、分裂酵母など）においても pre-tRNA がキャップされているか調べ、進化的保存性という観点からその重要性を明らかにする。解析対象とする tRNA はこれまでの結果から、5' キャップされやすそうなものを選択し、抗キャップ抗体を用いた IP-ノーザン解析または、実際に pre-tRNA を単離し LC/MS 解析から 5' キャップの有無について調べる。

4. 研究成果

(1) Alternative 経路に關与する核外・核内輸送因子の解析

核外輸送因子の温度感受性株を非許容温度で培養した時の tRNA についてノーザン解析を行ったところ、発現抑制により pre-tRNA の輸送阻害が起こる輸送因子を特定した。また、この輸送因子に FLAG タグを付加した株を構築し、アフィニティ精製により tRNA 前駆体と細胞内において相互作用していることを確認した。

核内輸送因子については未だ解析中であり特定には至っていない。

(2) tRNA 成熟経路の選択機構の解析

tRNA 修飾酵素遺伝子を欠損した酵母株における tRNA についてノーザン解析を行ったところ、RNA 修飾を欠損することで Alternative 経路への流入が増えることが確認された。さらに、(1) で特定した輸送因子との遺伝的相互作用について解析を行ったところ、修飾酵素遺伝子を欠損したことによる生育速度の低下が、この輸送因子を過剰に発現することで若干回復することが確認された。これは tRNA 修飾が輸送効率に影響していることを示唆している。

(3) Pre-tRNA capping の生合成の解析

mRNA などの 5' キャップ形成を担う既知の酵素群の遺伝子欠損株や発現制御株を構築し、それら株における pre-tRNA capping を

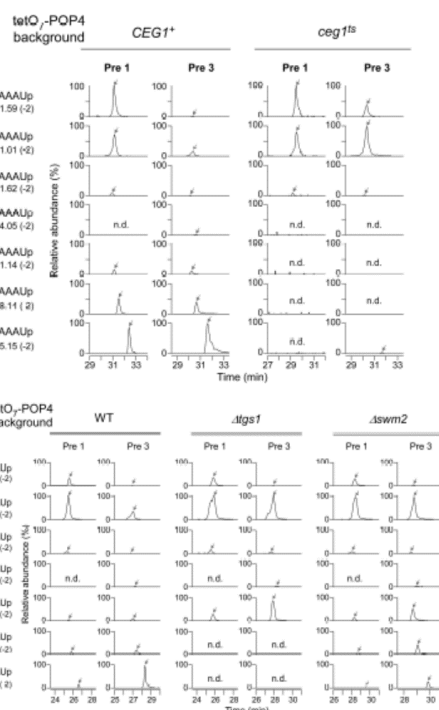


図2. Pre-tRNA capping の生合成
キャップ付加酵素 Ceg1p の過剰発現株と温度感受性株（上側）と TGS1 と SWM2 遺伝子欠損株（下側）から単離した pre-tRNA^{11e} の LC/MS による 5' 末端の構造解析。

調べたところ、キャップ形成が阻害されていることを確認した。これは pre-tRNA capping が既知の 5' キャップ形成機構によって作られることを示す（図2）。

また、pre-tRNA capping の導入率と pre-tRNA の末端の構造的安定性との関連について解析を行ったところ、末端構造が緩く不安定な前駆体ほどキャップされ易く、逆に末端構造が固い前駆体はキャップをほとんど付加されないことが分かった。これはキャップ付加酵素である Ceg1p は末端構造が緩い方を基質として好むことを示唆する。

通常、5' キャップは mRNA など RNA pol II の転写産物の 5' 末端に転写と共役して導入される。そこで RNA pol III の転写産物である tRNA がどのようにキャップを付加されるのか、あるいは RNA pol II によって転写されているのか、といった点について RNA pol III の温度感受性株を用い検証した。解析の結果、RNA pol III の活性を抑制すると、5' キャップを持つ pre-tRNA 前駆体が減少することが確認された。この結果は、RNA pol III によって転写された pre-tRNA が転写後にキャップされていることを示す。この発見はキャップ形成に関する従来の考えを覆す驚くべき発見であった。

(4) Pre-tRNA capping の機能解析

(3) で構築したキャップ付加酵素 Ceg1p の温度感受性株を非許容温度で培養した時の tRNA についてノーザン解析を行ったところ、

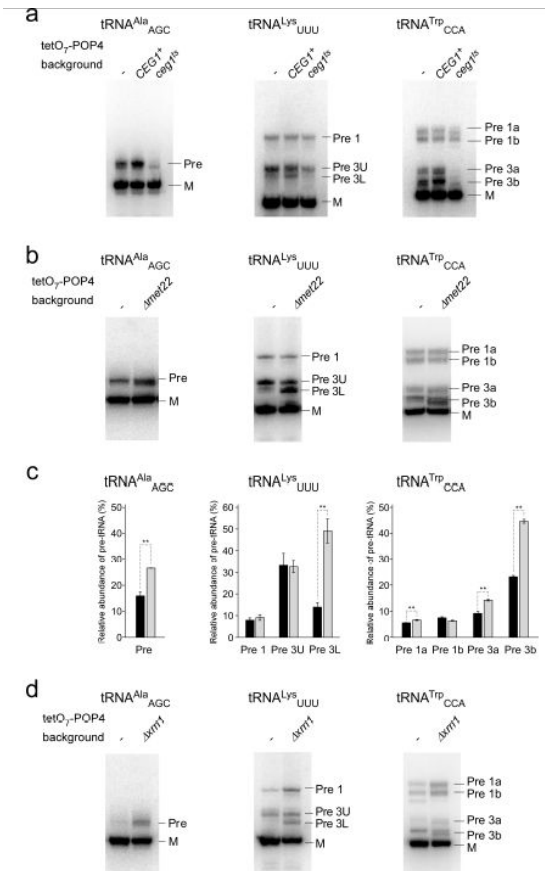


図3. Pre-tRNA capping は 5' エキソヌクレアーゼによる分解から pre-tRNA を保護している。

(A) キャップ付加酵素 Ceg1p の過剰発現株と温度感受性株における tRNA のノーザン解析。(B, C) met22 遺伝子欠損株における tRNA のノーザン解析と成熟体に対する前駆体の割合を示した棒グラフ。(D) xrn1 遺伝子欠損株における tRNA のノーザン解析。

pre-tRNA の蓄積量は顕著に減少したのに対し、成熟体量はほとんど影響が見られなかった(図 3a)。そこで、met22 遺伝子欠損による 5' エキソヌクレアーゼ活性の間接的な障害や 5' エキソヌクレアーゼの 1 つである Xrn1p の遺伝子欠損株を構築し、それら株における tRNA についてノーザン解析を行ったところ、pre-tRNA の蓄積量の増加が見られた(図 3b,c,d)。これら結果は、pre-tRNA は 5' エキソヌクレアーゼにより分解されており、pre-tRNA capping はこの分解から pre-tRNA を保護していることを示唆している。これらの結果は、pre-tRNA capping は成熟過程の pre-tRNA を分解から保護することで成熟化をサポートしていることを示唆する。

Pre-tRNA capping が pre-tRNA の細胞内局在や末端のトリミング等の他のプロセッシング反応に与える影響については現在解析中である。

(5) Pre-tRNA capping の進化的保存性
ヒト子宮頸癌細胞 HeLa を用い、ヒト細胞

においても pre-tRNA capping がみられるのか、いくつかの tRNA について抗キャップ抗体を用いた IP-ノーザン解析を行ったところ、出芽酵母と比べると導入率は少ないが、5' キャップを持つ pre-tRNA の存在が確認された。この結果は、pre-tRNA capping が真核生物においては広く保存された現象であることを示唆している。

<引用文献>

Shaheen HH. and Hopper AK., Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 102(32), 2005, 11290-11295.

Yoshihisa T., Dynamics of tRNAs in their life., Tanpakushitsu kakusan koso, 54, 2009, 2121-2126.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Takayuki Ohira and Tsutomu Suzuki. Precursor of tRNAs are stabilized by methylguanosine cap structures. Nature Chemical Biology. 査読有. 2016. 印刷中.

[学会発表](計2件)

大平高之、鈴木 勉. Precursor of tRNAs are stabilized by methylguanosine cap structures that prevent 5' exonucleolytic degradation. RNA 2016. 2016年6月30日(予定). 国立京都国際会館、京都府京都市左京区。

大平高之、鈴木 勉. Precursor of tRNAs are stabilized by methylguanosine cap structures that prevent 5' exonucleolytic degradation. 第17回日本RNA学会. 2015年7月16日. ホテルライフォート札幌、北海道札幌市中央区。

6. 研究組織

(1)研究代表者

大平 高之 (TAKAYUKI OHIRA)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号: 90727520

(2)研究協力者

鈴木 勉 (TSUTOMU SUZUKI)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 20292782