

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04997

研究課題名(和文) Pre-tRNA cappingが関与する遺伝子発現制御機構の探究

研究課題名(英文) Exploring the biological role of pre-tRNA capping in gene expression

研究代表者

大平 高之(Ohira, Takayuki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：90727520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、tRNA前駆体(pre-tRNA)が5' cap修飾される分子メカニズムやその生理学的意義を明らかにすることを目的とした。その成果として、pre-tRNAの5' cap修飾は自身の配列に影響されることが、あるストレス下において顕著に促進されることが判明し、その生合成は複雑に制御されていることを示した。また、pre-tRNAに付加された新規キャップ修飾についてはその構造と修飾酵素の特定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、私たちはpre-tRNAの5' cap修飾の生合成機構や機能に関する多くの知見を見出した。これら成果は全く新しい5' cap修飾の機能や生合成機構の存在を示すなど5' cap修飾の理解を広げ深めるとともにより包括的な視点からRNA全体の動態や機能発現を理解することの重要性を示した。さらには全く新しい遺伝子発現制御機構が存在する可能性を示唆するなど当該分野の発展に貢献することが期待される学術的に意義のある知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to reveal molecular mechanism and biological significance of 5' capping of tRNA precursor (pre-tRNA). We revealed that formation of pre-tRNA capping depended on the sequence of pre-tRNA itself and was promoted under stress condition, suggesting that the formation is controlled by a complex regulatory mechanism. Moreover, we identified a chemical structure and modifying enzyme responsible for novel cap structure.

研究分野：分子生物学

キーワード：tRNA 5' cap修飾 遺伝子発現制御 出芽酵母 RNA

### 1. 研究開始当初の背景

tRNA はタンパク質合成において遺伝暗号を解読しアミノ酸に対応付けるアダプター分子である。私たちは、真核生物において一部の tRNA 前駆体 (pre-tRNA) は 5'cap 修飾を付加されていることを見出し、この現象を pre-tRNA capping と命名した (図 1)。遺伝学的な解析からこのキャップ構造は既知のキャッピング機構によって導入されること、pre-tRNA を 5'末端からの分解から保護していることが明らかとなり、pre-tRNA capping は pre-tRNA を安定化することで効率的な成熟化に寄与していると考えられている。しかし、そもそもどのくらいの前駆体が 5'cap されるのかなど、pre-tRNA capping の実態や意義については不明な点が多く残されている。また 5'cap 修飾を付加された pre-tRNA は、mRNA や snRNA など他の 5' cap 修飾を持つ RNA とキャップ結合タンパク質を介して細胞内で競合し、それらの挙動や機能に影響を与えることで遺伝子発現を調節している可能性が考えられている。

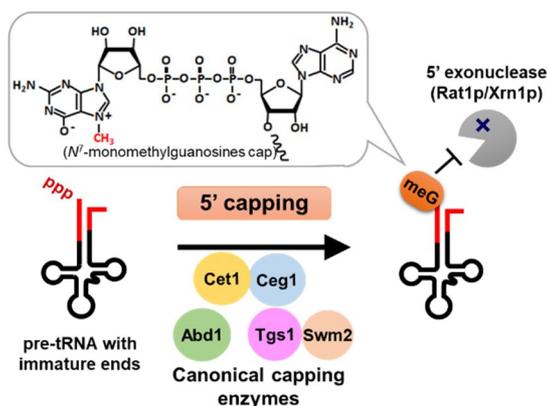


図 1. pre-tRNA capping。出芽酵母において一部の pre-tRNA は既知のキャップ修飾酵素群により 5' cap 修飾を付加され、5'末端からの酵素による分解から保護されている。

### 2. 研究の目的

RNA は転写後に末端領域やイントロンの切除、5'cap 修飾や poly(A)配列の付加、化学修飾の導入など様々な転写後プロセッシングを受け成熟する。成熟が不完全な RNA は場合によりその機能を喪失しており、結果的に遺伝子発現の破綻を招き、個体の生育不良・疾患・死に繋がることがある。従って、RNA の成熟機構の解明は遺伝子発現の制御機構を理解する上で重要である。転写後プロセッシングの一つである 5'cap 修飾は、RNA の 5'末端からの分解の保護、核外輸送や翻訳開始の目印、ウイルス RNA との識別など遺伝子発現の様々な場面で重要な役割を担う。その構造は、5'末端にメチルグアノシンが Head-to-Head で結合したものや、5'末端および 1 塩基目から数塩基目のリボースや塩基のメチル化がよく知られている。近年、精力的な研究により 5'cap 修飾の機能や代謝の理解が進んでいるが、未だ機能やその制御機構が不明の 5'cap 修飾があるなど未解明な点も多い。私たちは、出芽酵母における tRNA の成熟機構の解析過程で、5'末端が未成熟の pre-tRNA の一部は、5'末端にメチルグアノシンキャップが付加されていることを発見した。一般に、この 5'cap 修飾は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の転写産物に見られ、Pol III の転写産物である tRNA は 5'cap 修飾されないと信じられていた。従って、本発見は 5'cap 修飾の概念を覆すものであった。本研究では、私たちが発見した「pre-tRNA の 5'cap 修飾 (pre-tRNA capping)」という現象と「構造未知の 5'cap 修飾 (X cap)」に着目し、pre-tRNA が何故 5'cap 修飾を付加されるのか、その形成機構や tRNA 成熟化における重要性を明らかにし、5'cap 修飾の新たな意義を見出すことを目指す。さらに本申請では、5'cap された pre-tRNA が 5'cap 修飾を介して mRNA と競合しているか調べるなど、pre-tRNA capping が関わる遺伝子発現制御機構を探求し、pre-tRNA capping という現象をより深く広く理解し、その概念の定着と拡張を目指す。

### 3. 研究の方法

5'cap 修飾された pre-tRNA の細胞内における量や局在、細胞にストレスを与えた時の動態、tRNA の種類や成熟度との関連性を把握することは、その形成機構や機能の解明に繋がる重要な知見となる。そこで本研究では通常培養時やストレス時の出芽酵母における 5'cap 修飾された pre-tRNA について次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的同定、質量分析を用いた直接解析、細胞内局在解析などを行い、5'cap 修飾される pre-tRNA の特徴を調べる。また、pre-tRNA capping の機能の手掛かりを探るため、pre-tRNA と 5'cap 修飾依存的に結合するタンパク質を探求し、pre-tRNA が mRNA や snRNA と細胞内で競合している可能性を検証する。さらに、5'cap 修飾された pre-tRNA が mRNA のように翻訳されている可能性を検証するためレポーターアッセイやリボソームプロファイリングを行う。X cap についてはその生合成機構と機能を調べるため、質量分析や NMR による X cap の構造決定、その構造から推測される修飾酵素の絞り込み、候補酵素によるアッセイや候補酵素の遺伝子欠損株を作成することにより特定する。さらには X cap 修飾酵素遺伝子欠損株における tRNA 成熟化や細胞の生育への影響を調べる。

### 4. 研究成果

## 5'cap 修飾を持つ pre-tRNA の特定と形成機構の解析

5'cap 修飾された pre-tRNA を網羅的かつ高感度に特定するため、CAGE 法を基とした cDNA ライブラリ調製方法を確立し NGS 解析を行うことを予定していたが、予想に反して解析に十分な質と量の cDNA ライブラリが得られない等の理由により初年度では実験系全体を見直し、サンプル調製の各ステップについて詳細な条件検討を行った。主な変更点として 5'cap 修飾された pre-tRNA の調製には抗メチル化グアノシンキャップ抗体を使用した点と RNA サンプルの脱メチル化酵素処理の追加や cDNA ライブラリ調製時のライゲーション反応と逆転写反応に用いる酵素を変更した点が挙げられる。条件検討の際の RNA サンプルとして出芽酵母 Tet-POP4 株から調製した RNA を用いた。Tet-POP4 株は培地にドキシサイクリンを添加することで RNase P の構成因子である POP4p を転写抑制できるため、tRNA の成熟化をドキシサイクリン依存的に阻害し 5'cap 修飾を持つ pre-tRNA を蓄積させることができる。RNase P 抑制時の Tet-POP4 株から、低分子 RNA 画分をゲル切出し精製により調製し、抗メチル化グアノシン cap 抗体を用いた免疫沈降を行い、得られた RNA を鋳型とする cDNA ライブラリを作成した。NGS 解析の結果、ほぼ全ての pre-tRNA が 5'cap 修飾されていることが判明したが、その修飾率には大きな偏りがあった。詳細なデータ解析の結果、pre-tRNA の 5'リーダー配列と 3'トレーラー配列によって形成される二次構造がキャップ修飾効率に影響している可能性が示唆された。pre-tRNA の末端配列は一樣ではなく tRNA 遺伝子ごとに異なるためこれら末端配列によって形成されるその二次構造は遺伝子ごとに異なると考えられ、この違いが 5'cap 修飾酵素による認識に影響し修飾効率に違いが生じたと考えられる(図2)。本解析結果は、どの pre-tRNA も 5'cap 修飾されうることを示した。また、本解析によりほぼ全ての tRNA 遺伝子の転写開始点の候補部位が特定された。転写開始点を複数持つと思われる tRNA 遺伝子も見出された(図3)。これまで一部の tRNA 遺伝子については転写開始点を実験的に特定されていたが、本解析手法は tRNA 遺伝子の転写開始点を網羅的に同定する手法としても有効であることを示す。

次に、pre-tRNA capping が促進される生育条件やその生物学的意義に迫るため様々なストレス条件下で培養した酵母細胞における pre-tRNA の 5'cap 修飾を調べた。具体的には、細胞から全 RNA を調製した後、抗キャップ抗体を用いてキャップされた RNA を特異的に精製し、各 tRNA に対するノーザンブロットを行うことで評価した。その結果、多くのストレス条件下において pre-tRNA の減少が確認され、それに伴い pre-tRNA capping の減少も確認されたが、あるストレス条件下においては pre-tRNA capping の形成が促進されることが分かった(図4)。そこで、NGS 解析によりこのストレス条件下で増加する 5'cap 修飾を持つ pre-tRNA の網羅的な特定を行ったところ、多くの pre-tRNA が 5'cap 修飾を導入されることが判明し、pre-tRNA capping はストレス時の細胞においてダイナミックに変化し tRNA の成熟化や遺伝子発現の制御に関与している可能性が示唆された。pre-tRNA capping が促進される分子メカニズムについては現在、解析中である。

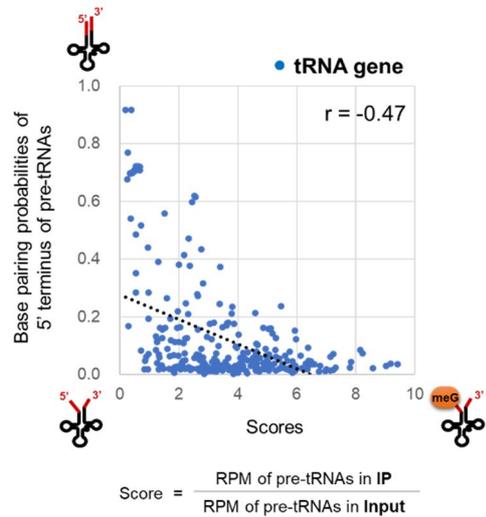


図2. 5' cap 修飾効率と pre-tRNA の末端構造の関係。Score の大きい(5'cap 修飾効率が高い pre-tRNA )pre-tRNA ほど、その末端構造が開いている傾向が見られた。

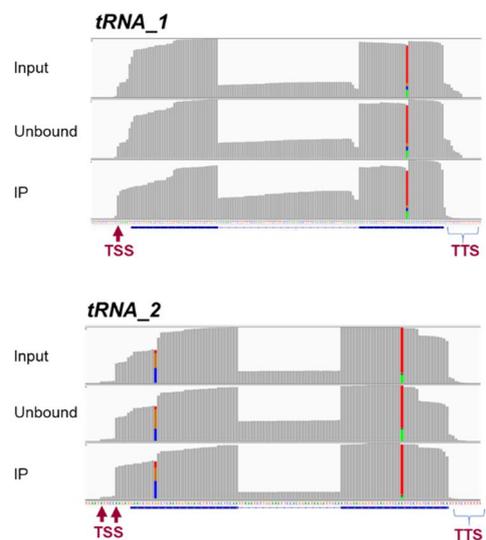


図3. tRNA\_1 と tRNA\_2 の遺伝子およびその近傍領域にリードをマップした結果。それぞれ上から Input, Unbound, IP の結果を示す。TSS は転写開始点を、TTS は転写終結点を示す。

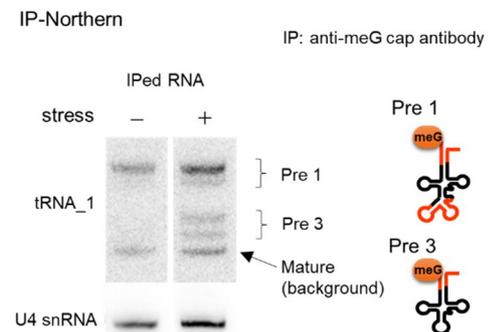


図4. pre-tRNA capping はストレスにより促進される。抗メチル化グアノシンキャップ抗体で精製した RNA 画分における tRNA\_1 についてノーザンブロットを行った結果。ストレスを与えた細胞では 5'cap 修飾された pre-tRNA が増加した。

pre-tRNA capping が関与する新規の遺伝子発現制御機構の探究

5' cap 修飾された pre-tRNA が細胞内においてキャップ結合タンパク質と相互作用しているかどうかを検証するため、FLAG タグを付加したキャップ結合タンパク質 X および Y の発現ベクターを Tet-POP4 株に形質転換し、キャップ結合タンパク質発現株を構築した。RNase P 抑制時の各発現株から調製した細胞抽出液についてアフィニティー精製を行った後、精製画分から調製した RNA に pre-tRNA が含まれているかノーザンブロットにより調べたところ、どちらのタンパク質についてもホルマリン依存的に pre-tRNA に由来するシグナルが検出された(図 5)。この結果は、対象としたキャップ結合タンパク質は細胞内で 5' cap 修飾された pre-tRNA と相互作用していることを示す。さらに本結果を別の方法により確認するため、ロイシン tRNA にアフィニティー精製の RNA アプターを挿入した改変株を構築し、細胞抽出液から改変ロイシン tRNA の前駆体をアフィニティー精製した後、ペプチドマス解析により 5' cap 修飾依存的に結合しているタンパク質を網羅的に調べたところ、上記のキャップ結合タンパク質が検出され、このキャップ結合タンパク質は pre-tRNA と細胞内で相互作用していることが再確認された。さらにタンパク質 Y と相互作用している pre-tRNA について NGS 解析を行ったところ、多くの pre-tRNA と相互作用していること、特に成熟化が進行した pre-tRNA と相互作用していることが確認された。

次に、5' cap 修飾された pre-tRNA が mRNA のように翻訳されているか調べるため、出芽酵母 Tet-POP4 株由来の細胞抽出液をシヨ糖密度勾配遠心法によりリボソーム画分を調製し、その画分中に pre-tRNA が含まれるかノーザンブロットによる確認を行った。その結果、pre-tRNA に由来するシグナルが観察され、5' cap 修飾された pre-tRNA が mRNA のように翻訳される可能性が示唆された。現在この可能性をさらに検証するため、リボソームプロファイリングや pre-tRNA 内部に ORF を挿入した改変 tRNA 遺伝子を有する出芽酵母株を作成し、その ORF が翻訳されるかなど検証実験を行っている。以上の本研究成果は、pre-tRNA と mRNA とのクロストークによって生み出される全く新しい遺伝子発現の調節機構が存在する可能性を示唆するものである。

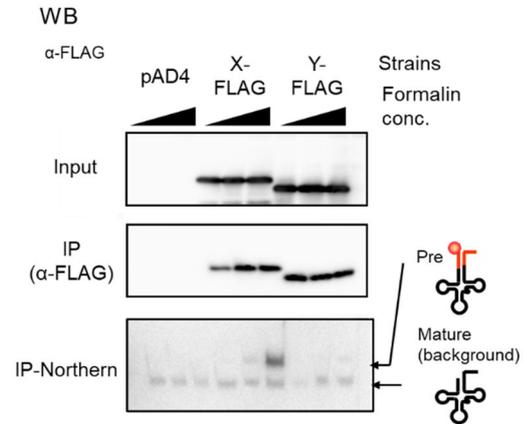


図 5. 5' cap 修飾を持つ pre-tRNA は細胞内でキャップ結合タンパク質と相互作用している。ホルマリン濃度依存的に pre-tRNA に由来するシグナルの増加が確認された。

X cap の生合成機構と機能の解析

X cap 修飾を持つ pre-tRNA を大量に調製し、質量分析を用いた構造解析によりその構造を決定することに成功した。次いで、その構造から生合成機構を推測し、X cap 修飾酵素の候補遺伝子を絞り込み、それらの遺伝子破壊株を構築した。しかし、各株における X cap 修飾を調べたところ X cap 修飾への影響は確認されなかった。そこで逆遺伝学的なアプローチではなく、細胞抽出液を用いた *in vitro* X cap 付加反応系を確立し(図 6)、多段階のカラムワークにより X cap 修飾酵素の絞り込みを行ったところ、X cap 付加酵素活性の高い画分を特定することに成功した。そこでこの精製画分を用い種々の生化学的解析を行い X cap 付加酵素の特性を調べた。得られたデータを基に、再度、候補タンパク質の絞り込みを行い、大腸菌発現系を用い候補タンパク質を取得した。得られた候補タンパク質を用いた *in vitro* における X cap 付加酵素反応を行った結果、この候補タンパク質が X cap 付加活性を有することが判明した。そこでこの遺伝子の発現抑制株を作成し、遺伝子発現抑制時における pre-tRNA の 5'末端構造を調べたところ、X cap が顕著に減少していることが確認され、この遺伝子が X cap 付加酵素であることが判明した(図 7)。また、この遺伝子の発現抑制下では pre-tRNA の定常状態量の若干減少することが確認され、X cap が pre-tRNA の細胞内における安定性に寄与している可能性が示唆された。本研究成果は、新規のキャップ修飾 X cap について、その構造や生合成機構や機能の一端を初めて明らかにしたものである。

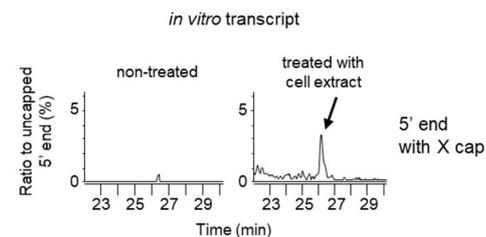


図 6. 細胞抽出液を用いた *in vitro* における X cap 修飾の再構成。多段階のカラムワークにより調製した細胞抽出液と基質 RNA を反応させた後、RNase で断片化し、LC/MS 解析により X cap を調べた結果。矢印は X cap を持つ 5'末端に由来するピークを示す。

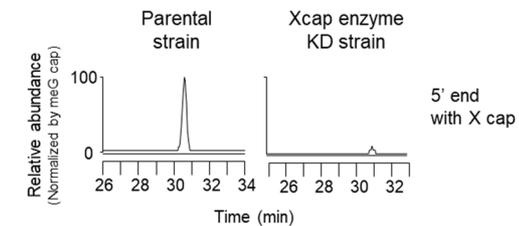


図 7. X cap 修飾酵素遺伝子の発現抑制による X cap 修飾量の低下。X cap 修飾酵素遺伝子の発現抑制株およびその親株から標的 RNA を単離し、LC/MS により X cap を調べた結果。

キャップ修飾 X cap について、その構造や生合成機構や機能の一端を初めて明らかにしたものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ohira, T., Kikuchi, I., Nakatsuka, T., and Suzuki, T
2. 発表標題 Functional analysis of pre-tRNA capping in budding yeast.
3. 学会等名 tRNA conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平 高之, 菊池 一徳, 中塚 太一, 鈴木 勉
2. 発表標題 出芽酵母におけるpre-tRNA capping の発見と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池 一徳, 大平 高之, 中塚 太一, 鈴木 勉
2. 発表標題 出芽酵母におけるpre-tRNA cappingの機能解析
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------