

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22570139

研究課題名（和文） tRNAの細胞内動態に基づく生理機能制御の解明

研究課題名（英文） Analysis of physiological regulation of tRNA from the view of its intracellular dynamics.

研究代表者

吉久 徹 (YOSHIHISA TOHRU)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・准教授

研究者番号：60212312

研究成果の概要（和文）：

近年、細胞質における tRNA 機能の多様な制御と、シグナル分子としての tRNA 断片に興味が集まっている。本研究ではこのような視点の元、tRNA の断片化と細胞質における tRNA のスプライシング因子の関係、tRNA 本体と切り出されたイントロンの安定性、さらには、tRNA の核-細胞質間バランスを制御する輸送機構等について、出芽酵母を材料とした分子遺伝学的な手法によって、多面的に研究を進めた。

研究成果の概要（英文）：

Recently, many researchers are interested in various regulations of tRNA function in the cytoplasm and in tRNA fragments as signaling molecules. In this project, I performed molecular genetical analyses with budding yeast as a model organism to understand relation between tRNA fragmentation in the cytoplasm and the yeast splicing system, difference in stability between mature tRNAs and introns produced by cytoplasmic splicing, and mechanism of nuclear import and export of tRNAs, which determines nuclear-cytoplasmic balance of tRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：tRNA、細胞内動態、tRNA リガーゼ、スプライシング、tRNA 切断、出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

tRNA は翻訳に必須な古典的 non-coding RNA である。真核生物では RNA polymerase III によって転写された後、様々な修飾を経て細胞質で機能する。tRNA は house-keeping factor であり、生育環境に応じて量的、質的变化するとは考えられてこなかった。しかし近年、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における Pol. III

の抑制因子 Maf1p の発見や、ヒトの癌と開始 tRNA-Met の過剰発現との関連など、tRNA の量的、質的制御が注目を浴びつつある。

機能的な tRNA の量を制御するには、合成に加え、分解の制御も重要である。TRAMP/exosome 系や Rapid tRNA Decay (RTD) 系といった生合成途上の tRNA の品質管理に携わる分解系は明らかとなってい

るが、量的制御の主体としての分解系は未特定である。近年の低分子 non-coding RNA の網羅的解析の中で、通常真核細胞内にアンチコドンループ域の切断で生じる tRNA 断片が多量に存在することが明らかとなった。さらに、こうした tRNA 断片を生成する RNase として、出芽酵母とヒトそれぞれで、Rny1p および angiogenin が同定され、ある isoacceptor tRNA のごく一部のみを分解することで、シグナル分子としての tRNA 断片を生成し、翻訳を抑制することが指摘された。ただし、tRNA 断片が何によって認識され、また、その後どのような運命を辿るのかについては不明であった。

加えて真核細胞は、細胞質の tRNA 量を、その合成と分解だけでなく、細胞内分布を変えることで制御していることが明らかとなった。我々は、出芽酵母において、tRNA 前駆体のスプライシングが細胞質で起こることの発見をベースに、成熟体 tRNA が核と細胞質間をシャトルしつつ機能することを明らかにした。他方、米国オハイオ州立大の A. K. Hopper らは、tRNA の核内輸送が栄養飢餓時に活性化され、その活性化に Tor シグナル伝達系が関わることを見出した。この核内輸送の存在は、tRNA の細胞内分布を制御することで、細胞質において翻訳に関わる tRNA の量を制御する仕組みの存在を示唆している。しかし、tRNA の輸送システム、そして、栄養飢餓に基づく輸送機構の制御系の全貌は未だ明らかではなかった。

2. 研究の目的

このように現象としては tRNA の転写制御に加え、部位特異的切断や核への隔離といった「tRNA の一時的な不活性化」がいろいろな局面で明らかとなってきた。しかし、この一時的な不活性化の機構の全貌は必ずしも明らかでない。例えば、tRNA の核内輸送によって細胞質の tRNA レベル下げのため、翻訳レベルと核内輸送活性はどのような機構でリンクされているのか。そもそも、このステップに関わる輸送因子は何なのか。また、tRNA の分解について見た場合、tRNA のスプライシングでは、基本的にアンチコドンループに挿入されたイントロンが除かれ、その中間体は前述のアンチコドン切断断片と類似する。では、アンチコドンの切断が起こった tRNA は、スプライシング因子である tRNA ligase によって修復されるのか。また、細胞質でスプライスされた結果生じるイントロンのみを速やかに排除する分解系は、何故、成熟体 tRNA の脅威とならず、前述のような特異的 RNase のみが、ごく一部の tRNA を切断するのか。本計画では、こうした疑問に対し、出芽酵母を材料として遺伝学、生化学両面の解析で答えることを目指した。また、

こうした解析の中で、tRNA 遺伝子の一部に含まれるイントロンがスプライシングのステップを介して、tRNA の安定性自身を左右していないかについても検討を加えた。

3. 研究の方法

【*rlg1^{ts}* 変異の分離、*AtRLG1* 依存株の構築】 Mn^{2+} 存在下での low fidelity PCR を用いて出芽酵母の splicing tRNA ligase をコードする *RLG1* 遺伝子全長にランダムな変異を導入した DNA 断片を調製し、これを pRS314 にクローニングすることで変異 *rlg1* ライブラリーを構築した。このライブラリーを用いた plasmid shuffling 法で、染色体上の *rlg1Δ* 変異がライブラリープラスミド上の *rlg1* で相補された酵母株群を得、レプリカ法を用いて ts 株を選別した。Dr. H. Beier から分与された *AtRLG1* 遺伝子断片を元に、*CUP1p::HA-AtRLG1* を持つ pRS314 系プラスミドを構築し、前の plasmid shuffling 法で *rlg1Δ CUP1p::HA-AtRLG1* 株を構築した。

【tRNA 遺伝子の intron-less 株の構築】イントロンを遺伝子中に含む tRNA 遺伝子について、そのイントロン欠変異遺伝子を含む約 0.5 kb の染色体領域と、そのさらに上流もしくは下流の約 0.5 kb 領域を PCR で増幅し、Akada *et al.* (2002) *Yeast*, 19: 393-402 で報告されている *ADE2 GAL1p::GIN11M86* dual marker cassette を挟んでクローニングした。これを用いて BY418 株を親株として、isoacceptor tRNA 毎に逐次的に tRNA 遺伝子のイントロン欠失を行い、各 isoacceptor tRNA の全重複遺伝子からイントロンを除いた。イントロンの欠失は PCR で確認した。

【低分子 RNA の Northern 解析とイントロンの環化状態アッセイ】各出芽酵母株の低分子 RNA 解析には、guanidine thiocyanate 含有バッファーを用いた hot phenol 法で調製した全低分子 RNA 画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開して Hybond N⁺ 膜に転写後、terminal transferase で末端に digoxigenin-dU を付加したプローブを用いた Northern blotting 法を用いた。検出には、CDP-Star による化学発光法を用い、シグナルを冷却 CCD カメラで撮像した。*AtRLG1* 株または *rlg1^{ts}* 株中に見られる tRNA イントロンが環化しているかの検討は、イントロン部分に対する DNA プローブと RNase H を用いたイントロン切断反応を用いた。すなわち、tRNA^{leU} のイントロン部分に、切断用と検出用の 2 つのプローブを設計し、前者の存在/非存在下で全 RNA 画分を RNase H 処理した後、検出用プローブを用いて Northern blotting にてイントロンの

断片の検出を行った。直鎖状のイントロンはこの処理で短い 2 本の断片に分断され、その片方のみが検出プローブと hybridize するが、環化イントロンは切断用プローブ部分に相当する長さのみ短縮した長い 1 本の断片として検出される。

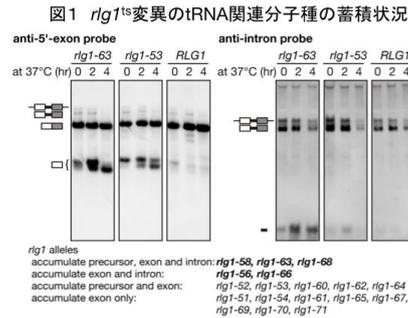
【tRNA の修飾解析】tRNA^{LeU}UAU を野生株、イントロン欠失株、および、*pus1Δ* 株から調製し、RNase T₁ で処理後、質量分析にてその修飾状態を検討した。Ψと U は質量分析では同値を与えるので、tRNA 標品は、Ψとのみ反応して 53.0 Da 分子量が増えた adduct を与える acrylonitrile 処理した後に質量分析にかけた。なお、実際の質量分析は、共同研究先である東京大学大学院工学研究科鈴木勉、鈴木健夫両博士が行った。

【tRNA の核内輸送因子 Ssa2 の生化学的解析】大腸菌内 His-tag fusion としてで発現させた Ssa2 または Ssa1 を Ni-NTA agarose を用いて精製した。Ssa タンパク質と tRNA の相互作用は label transfer assay にて検出した。すなわち、組換え Ssa タンパク質と、様々な ³²P 標識 tRNA とを混合して UV cross-link し、RNase 処理後に SDS-PAGE で展開することで、tRNA と光化学架橋した Ssa2 を検出した。

4. 研究成果

① 成熟体 tRNA のアンチコドンループ切断断片と、同じくアンチコドンに挿入されたイントロンがスプライスされる際の間体 (splicing endonuclease (Sen) による切断後) は、比較的良好に似た構造を持ち、かつ、細胞質に存在する。では、スプライシングに関わる tRNA ligase (Rlg1) は、この断片化 tRNA の修復に関わるのだろうか。我々は、tRNA のスプライシング過程および tRNA 型細胞質スプライシングを受ける *HAC1* mRNA の動態を解析する目的で、多数の *rlg1* 温度感受性変異株を単離した。制限温度下でにおいたこれら変異株では、イントロンを含む遺伝子より転写された tRNA の場合、Sen による切断後の 5'および 3'エキソンが明らかに蓄積し、*rlg1* 変異の生育温度感受性が tRNA エキシソンの結合不全によることが示された (図 1)。この時、イントロンを持たない遺伝子にコードされる isoacceptor tRNA である tRNA^{Lys}CUU、tRNA^{His}GUG では、アンチコドンループの切断によって生じた tRNA 断片は検出されなかった。従って、通常の条件でもごくわずかに生じている tRNA 断片を Rlg1 が積極的に修復しているという証拠は得られなかった。

さらに人為的に tRNA のアンチコドンループの切断を誘導して、その際の Rlg1 の効果を検証する目的で、出芽酵母でストレスに依存した tRNA のアンチコドンループ切断に関わる Rny1ヌクレアーゼの細胞質発現系の構



築を試みた。しかし、幾つかのコンストラクトを試したが、目的の結果が得られなかった。おそらく、ER における酸化性的フォールディング環境がないと、活性なコンフォーメーションがとれないものと思われる。実際、本研究期間中発表された Luhtala and Paker (2012) PLoS One, 7:e41111 において、Rny1 の活性発現にはシグナル配列が必要であることが報告された。

② 細胞質におけるスプライシングでは、生じた成熟体 tRNA とイントロンとはその安定性が極端に異なる。上記の *rlg1* 変異において、ライゲーションされない tRNA エキソンですらある程度細胞内に蓄積するのに対し、同じ *rlg1* 変異中、一部の變異のみで tRNA イントロンの蓄積が見られた (図 1)。そこで、イントロンの分解系が成熟体 tRNA とイントロンをどう見分けるかにせまる第一歩として、イントロンの分解因子の同定を試みた。出芽酵母では RNA 分解に関わることがわかっている、もしくは、推定されている遺伝子として 67 の遺伝子が存在するが、これらの欠失株もしくは発現抑制株から調製した RNA を Northern blotting で解析した。その結果、既知の RNA 分解関連単独変異で tRNA イントロンの蓄積するのは一部の *rlg1* 温度感受性株だけであった。

一方、本計画と並行して進行していた、tRNA 型細胞質スプライシングを受ける *HAC1* mRNA (小胞体ストレス応答 (UPR) の必須因子 mRNA) の解析の中で、出芽酵母の *RLG1* 遺伝子を *Arabidopsis thaliana* の

図2 植物の Rlg1 ホモログは酵母 Rlg1 を代替できるが、UPR 欠損を示す。

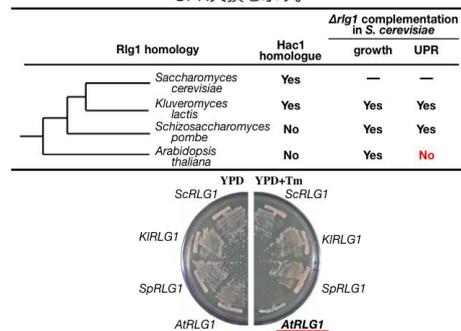
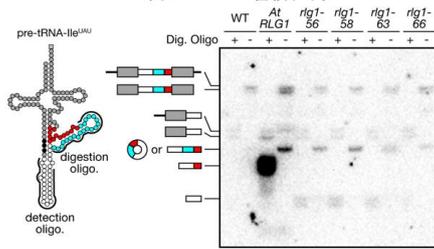
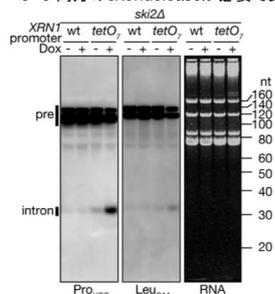


図3 *AtRLG1* 中では、 $tRNA^{IleUAU}$ のイントロンは、環状RNAとして蓄積する。



RLG1 遺伝子 (*AtRLG1*) で置き換えると、前駆体 tRNA に加え、*HAC1* mRNA は正常にスプライスされるものの、*HAC1* のイントロンが環化して細胞内に蓄積し、UPR 欠損を示すことが明らかとなった (図2、論文①)。その後の解析で *AtRLG1* 株は tRNA のイントロンも蓄積しており、それが *HAC1* イントロン同様環化しているが、*rlg1^{ts}* 変異中のイントロンは直鎖状で存在することが判った (図3)。*AtRLG1* 株の結果は、tRNA のイントロンがその両末端から exonucleolytic に分解されており、endonuclease は関与しないことを示唆している。そこで、細胞質で主な RNA 分解を担う 5'-3' exonuclease (exosome) と 5'-3' exonuclease (Xrn1) の機能を同時に失わせた株を構築し、tRNA のイントロンの蓄積を検討した。実際、*ski2Δ tetO::XRN1* 二重変異中 (*Ski2* は cytoplasmic exosome の活性に必須な因子) では、*XRN1* の発現抑制によって tRNA のイントロンの蓄積が観察された (図4)。*Rlg1* が tRNA のイントロンと相互作用することは以前から知られており、おそらく、tRNA のイントロンは exosome と Xrn1 により両末端から分解されるが、そのためにイントロンは、スプライシング後に適切に *Rlg1* からこれら分解酵素に引き渡される必要があると考えられる。さらに、tRNA の成熟体とイントロンの細胞質内の分解系に対する感受性の違いには、この *Rlg1* による引き渡しに関わっているのかもしれない。

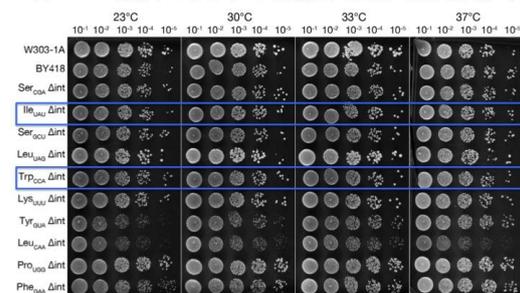
図4 tRNAイントロンの分解には、5'-3'および3'-5'両方のexonucleaseが必要である。



③ 選択的スプライシング等で多様性を生む必要の無い tRNA 遺伝子上のイントロン

は、除かれるだけのために存在するように見える。切除後のイントロンは二つの exonuclease で速やかに分解されるため、その生理的意義の推定は難しい。少なくとも成熟体 tRNA の修飾のうち、 $tRNA^{IleUAU}$ の 34 位、35 位の U の pseudouridine 化 (Ψ 化) 酵素 Pus1 のように、*in vitro* では前駆体 tRNA のみを基質とする酵素による修飾が知られている。本研究では、切り出されたイントロンの成熟体 tRNA の安定性への寄与の検討も兼ね、isoacceptor tRNA 毎に全重複遺伝子を intron-less 化した株の構築を行った。出芽酵母にはイントロンを含む遺伝子にコードされた isoacceptor tRNA として 10 種類の tRNA が存在し、多いものでは一つの isoacceptor tRNA が 10 個の重複遺伝子にコードされている。本研究ではモデルケースとして、 $tRNA^{TrpCCA}$ (重複遺伝子 6 個) と $tRNA^{IleUAU}$ (重複遺伝子 2 個) の全遺伝子の intron-less 化を行い、得られた株についてさらに詳しく解析

図5 tRNA遺伝子上のイントロンは、酵母の生育に必須では無い。



した。図5に示すように両 intron-less 株とも正常に生育し、これらのイントロンは酵母の生育に必須でないことが判った。さらに、 $tRNA^{TrpCCA}$ のイントロン欠失株ではほぼ野生株並みの量の $tRNA^{TrpCCA}$ が検出され、翻訳に必要なアミノアシル化状態も正常であった (図6、論文③)。他方、 $tRNA^{IleUAU}$ ではそのアンチコドン部分の修飾状態を中心に解析を進めた。実際、 $tRNA^{IleUAU}$ のイントロン欠失株では 34 位、36 位の U は Ψ 化されておらず、 $tRNA^{IleUAU}$ の Ψ 化が *in vivo* でもイントロンに依存することがわかった (図7)。しかも、一部の 34 位の U は、本来 $tRNA^{IleUAU}$ には見られない ncm^5U に変換されていた。 $tRNA^{IleUAU}$ がイントロンを持つことは、34 位の U をより A 特異的な認識に適した Ψ に変換するためであると同時に、対合する塩基の特性を下げる ncm^5U への変換を防ぐ役割があることが明らかとなった。

④ 細胞質の tRNA 量の制御には、tRNA の核内輸送に関わることは、我々のグループと A. K. Hopper らのグループの研究で明らかとなっているが、栄養条件に依存し

図6 イントロン欠失遺伝子からは、
機能的にも量的にも正常なtRNA^{Trp}_{CCA}が生産される。

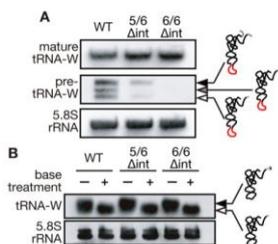
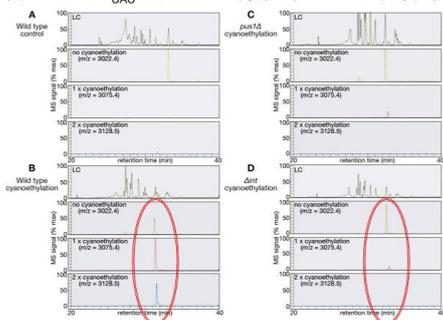


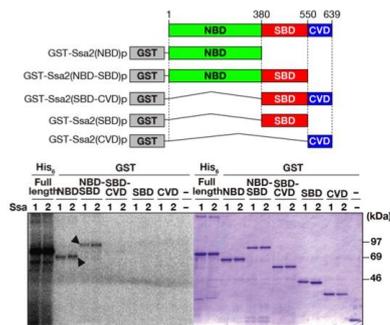
図7 tRNA-Ile_{UAU}のアンチコドン部分は、*in vivo*でΨ化されない。



た核への tRNA の格納制御のターゲットとなる輸送因子に関しては、必ずしも十分な知見が得られていない。我々は先行研究で、tRNA の核内輸送に酵母の細胞質のメジャーな Hsp70 の一つである Ssa2 が関わることを明らかにしていた。また、*in vitro* の解析から Ssa2 が直接、多様な tRNA に結合し、その結合は Ssa2 の本来の基質である変性タンパク質と競合しないことを見出していた。本研究では、Ssa2 が tRNA 認識をどのインターフェースを使って行うかに関して、Ssa2 組換えタンパク質の様々な変異を用いて検討した。その結果、tRNA の認識は、Ssa2 のタンパク質性基質の認識部位である SBD には依存せず、ATP の加水分解を通じて SBD におけるタンパク質基質の結合を制御する NBD 単独でも行えることが判った (図 8)。また、様々な点変異導入 Ssa2 NBD の解析から、ATP 結合状態へと変換を促す nucleotide exchange factor に影響される部位の変異は tRNA の結合を高め、逆に ATPase 活性化因子である DnaJ の効果を低下させる変異は tRNA の結合を抑えることが判った。即ち、Ssa タンパク質の NBD 上にある tRNA の結合インターフェースの活性は、NBD 自身のヌクレオチド状態で制御されていることが示唆された。

本研究では、合わせて、核内に格納されていた tRNA が再び核外に輸送される際の細胞質側の因子として機能することが報告されている Cex1 の構造解析を進めたいた東京大学大学院理学系研究科の濡木理博士と共同研究を行い、Cex1 変異の tRNA 輸送に関する *in vivo* 解析を行った。Cex1 は構

図8 Ssaタンパク質は、SBDではなくNBDでtRNAを結合する。



造上 N 末端の kinase 様ドメインと C 末端の heat repeat を含むドメインからなるが、heat repeat ドメインには、*in vitro* の tRNA 結合アッセイで tRNA 結合に必要な塩基性残基が同定された。このうち2つの残基をペアにして Ala 残基に置換した *cex1* 変異遺伝子を *cex1Δ* 酵母株に導入したが、*in vivo* での明確な機能の異常は見られず、生体内での tRNA 認識には多数の塩基性残基が冗長に機能する可能性が示唆された (論文④)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① T. Mori, C. Ogasawara, ..., and T. Yoshihisa (7名中7番目) Dual functions of yeast tRNA ligase in the unfolded protein response: Unconventional cytoplasmic splicing of *HAC1* pre-mRNA is not sufficient to release translational attenuation. *Mol. Biol. Cell* (査読有り), **21**, 2010, 3722-3734. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0693.
- ② T. Endo, K. Yamano, and T. Yoshihisa Mitochondrial matrix reloaded. *Cell* (査読有り), **142**, 2010, 362-363. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.024.
- ③ S. Mori, T. Endo, and T. Yoshihisa The intron of tRNA-Trp_{CCA} is dispensable for growth and translation of *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* (査読有り), **17**, 2011, 1760-1769. doi: 10.1261/rna.2851411.
- ④ K. Nozawa, R. Ishitani, T. Yoshihisa 他 (11名中3番目). Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm. *Nucleic Acids Res.* (査読有り), **41**, 2013, 3901-3914. doi: 10.1093/nar/gkt010.
- ⑤ 吉久 徹, tRNA 型スプライシングの新展開. 生化学 (査読有り), **85**, 2013, 89-92
- ⑥ T. Yoshihisa tRNA subcellular dynamics.

Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (査読有り), in press.

[学会発表] (計 15 件) 発表者に下線を付す。

- ① T. Yoshihisa, T. Mori 他 (8 名中 1 番目) Translational regulation of *HAC1* mRNA, of which translational stall is essential for its unconventional cytoplasmic splicing in budding yeast. The 19th CDM Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology, 2010/5/11, 理研 CDB・神戸市 (招待講演)
- ② T. Yoshihisa, A. Takano, M. Mochizuki and T. Endo. Involvement of the cytoplasmic Hsp70 system in tRNA import into the yeast nucleus. The 15th Annual Meeting of the RNA Society, 2010/6/25, Univ. of Washington, Seattle, USA
- ③ S. Mori, ... and T. Yoshihisa (5 名中 5 番目) Necessity of tRNA introns for yeast growth. The 16th Annual Meeting of the RNA Society, 2011/6/17, 京都国際会館
- ④ T. Yoshihisa. Introns removed from in the yeast cytoplasm: usual for tRNA and unusual for mRNA. Furano Conference, 2012/3/6, フラノ寶亭留 (招待講演)
- ⑤ 吉久 徹 出芽酵母細胞質のメジャーな Hsp70 の一つである Ssa2p は、tRNA と直接結合し、その核内輸送に関わる。日本蛋白質科学会大 1 2 回年会, 2012/6/21, 名古屋国際会議場 (招待講演)
- ⑥ T. Yoshihisa. Any introns of the tRNA genes are dispensable for *Saccharomyces cerevisiae*. XXIV tRNA Conference, 2012/12/3, Olumue, Chile.
- ⑦ 吉久 徹 出芽酵母にとって tRNA のイントロンは必須ではない。日日本分子生物学会大 3 5 回年会, 2012/12/13, 福岡国際会議場 (招待講演)

他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉久 徹 (YOSHIHISA TOHRU)
名古屋大学・物質科学国際研究センター・
准教授
研究者番号: 60212312

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし