

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24年6月16日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780076

研究課題名（和文） 酵母 tRNase Z の細胞内機能の解明

研究課題名（英文） Analysis of cellular function of tRNase Z in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

高久 洋暁 (TAKAKU HIROAKI)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：70350717

研究成果の概要（和文）：

真核生物のエンド型リボヌクレアーゼ tRNase Z は、discriminator 部位において前駆体 tRNA の 3' 側を特異的に切断する酵素である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、ただ1つの tRNase Z を持っている。その組換え酵母 tRNase Z は、試験管内 3' tRNA プロセッシング活性を持っていた。酵母 tRNase Z は、核内に局在し、生育に必須であった。酵母 tRNase Z の温度感受性変異株を用いて前駆体 tRNA のプロセッシング解析をしたところ、3' 端非プロセッシング産物の蓄積が見られた。すなわち、SctRNase Z は、前駆体 tRNA の 3' 端プロセッシングに必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Endoribonuclease tRNase Z catalyzes the generation of the mature 3' end of tRNA precursors through specific endonucleolytic cleavage at discriminator site in eukaryotic organisms. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a single long form of tRNase Z. The recombinant yeast tRNase Z protein possesses precursor tRNA 3' -processing activity *in vitro*. The yeast tRNase Z protein localizes to the nucleus and is essential for growth. Temperature-sensitive (Ts) mutants of yeast tRNase Z exhibit the accumulation of 3' -unprocessed pre-tRNAs. Thus, our findings suggest that the sctRNase Z^L may be required for the 3' end processing of pre-tRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素

1. 研究開始当初の背景

tRNA 分子は翻訳において mRNA と蛋白質を繋ぐアダプター分子として中心的な役割を担っている。一般的に tRNA は 5' と 3' 端に伸長配列を持つ長い RNA として転写される。前駆体 tRNA の 5' 伸長配列の除去の反応は、真核生物、古細菌、真正細菌で共通であり、endoribonuclease の RNase P によって行われるが、前駆体 tRNA の 3' 端プロセッシングは、真核生物、古細菌、真正細菌の間で、さらには生物種によって異なることが多いため不明な点が多い。tRNase Z は真核生物、古細菌、真正細菌に存在し保存された蛋白質であるが、その 1 次構造の大きさから tRNase ZL (800-900 アミノ酸) と tRNase ZS (280-360 アミノ酸) に分けられ、tRNase ZL は真核生物のみに存在し、tRNase ZS は真正細菌、古細菌、ヒト、植物に存在する。tRNase Z をコードする遺伝子が初めてクローニングされたのは 2002 年とごく最近のことであるが、遺伝子が取得されたことにより急速に tRNase Z の知見が得られる結果となった。現在まで、様々な真核生物、古細菌、真正細菌の 3' 端プロセッシングについての *in vitro* の研究結果が報告され、tRNase Z が前駆体 tRNA の 3' 端プロセッシングを行うことが明らかになってきた。また、真核生物のヒト及び酵母 tRNase ZL は、前駆体 tRNA を基質とするだけでなく、これに類似した 2 分子 RNA 複合体をも基質とすることを見出されている。これは tRNase ZS にはない真核生物 tRNase ZL 特有の機能である。様々なストレス条件下の酵母細胞内では、細胞質に 5' -half-tRNA などの切断断片が蓄積し、その断片が特異的な mRNA の切断に関与するというモデルが Thompson らにより提唱されている。すなわち、tRNA の切断断片と mRNA が tRNase ZL の認識可能な 2 分子 RNA 複合体を形成することにより、tRNase ZL 依存的な RNA レベルにおける新しい細胞内制御機構を推測することが可能である。しかしながら、tRNase ZL は生育に必要な遺伝子であることもあり、真核生物における細胞内の tRNase ZL の解析はアメリカのグループによるショウジョウバエ及び分裂酵母の解析のみだけである。

2. 研究の目的

本研究では、真核生物のモデル生物の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を題材として、その酵母 tRNase Z の前駆体 tRNA の 3' 端プロセッシング活性だけでなく、その tRNA 構造の認識、切断部位についても明らかにする。さらには、温度感受性変異株を作製し、酵母細胞内における tRNase Z の解析を通して tRNase Z の生理学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酵母 tRNase Z の発現及び精製

大腸菌発現用プラスミド pGEX-6P-1 (GE Healthcare) のクローニングサイトに酵母 *S. cerevisiae* の tRNase Z をコードする遺伝子 *TRZ1* を PCR で増幅後、導入し、pGEX-6P-1/*TRZ1* を構築した。大腸菌 DH5 α に pGEX-6P-1/*TRZ1* を形質転換した株を培養し、IPTG により *TRZ1* を発現誘導させ、Trz1p を大量に細胞内に生産させた。その Trz1p に付加されている GST を利用してアフィニティーカラム (Glutathione Sepharose 4B) に結合させた後、Pre-scission protease を一晩作用させ、GST-tag を除去して、精製を行った。

(2) 酵母 tRNase Z の基質となる各種 tRNA の作製

基質の前駆体 tRNA の作製は、化学合成 RNA を鋳型にし、[α -³²P]UTP 存在下で、T7 RNA polymerase による *in vitro* 転写で作製した。転写された前駆体 tRNA は、ゲル濾過精製を行い、未反応 [α -³²P]UTP を除去した。

(3) 酵母 tRNase Z の *in vitro* 前駆体 tRNA 切断アッセイ

酵母 tRNase Z とラジオアイソトープラベルした tRNA を反応させ、切断活性を調べた。0.2 pmol 基質 tRNA と酵母 tRNase Z (10 pmol) を反応溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM DTT, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) に加え、30 °C で 10 min 反応を行った。切断部位は、8M 尿素-10%ポリアクリルアミドシークエンスゲルを用い、端に RNA アルカリ分解ラダーをサンプルと同時に流し、5' 側切断断片の長さを測定することにより決定した。

(4) RNA シーケンシング

非ラベル前駆体 tRNA と酵母 tRNase Z を反応させたサンプルをフェノール/クロロホルム抽出により、RNA 画分を抽出した。抽出した RNA の 3' 末端を [5'-³²P]pCp と T4 RNA ligase で標識した。標識したサンプルを chemical RNA シーケンシング法で解析することにより、切断部位の同定を行った。

(5) RNA の回収

酵母からの totalRNA の回収は、ISOGEN II (日本ジーン) を用いて行った。

(6) ノーザン解析

低分子画分の RNA 解析用の 8M 尿素-15%ポリアクリルアミドゲルで tRNA を分離し、Hybond N+ membrane (GE Healthcare) に転写後、ラジオアイソトープラベルされたそれぞれの tRNA に相補的な DNA をハイブリダイズさせ、検出を行った。

4. 研究成果

(1) 酵母 tRNase Z の様々な構造の前駆体 tRNA の認識及びその切断活性

酵母 tRNase Z の基質として、酵母 *S. cerevisiae* のイントロンを持つ Ser, Phe の前駆体 tRNA とイントロンを持たない Leu, Pro, Trp の前駆体 tRNA を作製した。それぞれの前駆体 tRNA には、適当な長さの 5' リーダー配列及び 3' トレーラー配列が付加されている。Ser, Phe の前駆体 tRNA の他に、5' リーダー配列が除去されたもの (RNase P の作用後を想定)、イントロン配列が除去された前駆体 tRNA も作製した。また、Leu, Pro, Trp の前駆体 tRNA については、それぞれ 5' リーダー配列が除去された前駆体 tRNA を作製し、合計 14 種類の様々な構造の前駆体 tRNA を作製し、以下のように名前をつけた。3' トレーラー配列のみを有する前駆体 tRNA (Ser1, Phe1, Leu1, Pro1, Trp1)、5' リーダー配列及び 3' トレーラー配列を有する前駆体 tRNA (Ser2, Phe2, Leu2, Pro2, Trp2)、イントロン配列及び 3' トレーラー配列を有する前駆体 tRNA (Ser3, Phe3)、5' リーダー配列、イントロン配列及び 3' トレーラー配列を有する前駆体 tRNA (Ser4, Phe4) (Fig. 1)。

これらの様々な構造の前駆体 tRNA に、大腸菌を利用して作製した組換え酵母 tRNA を作用させ、*in vitro* 前駆体 tRNA 切断アッセイを行った。Table1 に示すように、様々な構造の前駆体 tRNA に対する切断効率は異なったが、エンド型の切断様式は全て同じであった (Fig. 1)。また、切断部位も全て discriminator 塩基のあとで切断され (data not shown)、非常に特異性の高い酵素であることが分かった。

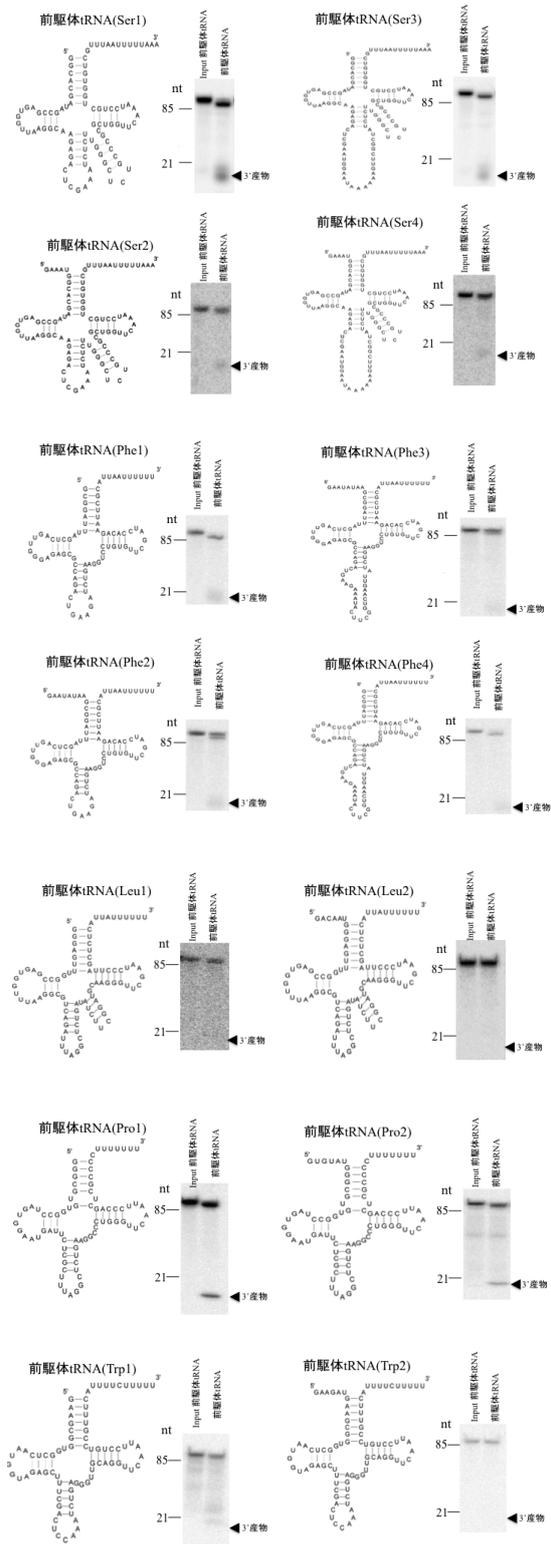


Fig. 1 様々な構造の前駆体 tRNA における酵母 tRNaseZ の切断活性

また、様々な構造の前駆体 tRNA に対する酵母 tRNaseZ の切断効率について Table1 にまとめた。全体的に 5' リーダー配列が除去されている前駆体 RNA を基質としたとき、その切断効率は非常によい。これは 5' リーダー配列と 3' トレーラー配列が共存するときには、5' リーダー配列と 3' トレーラー配列の間で水素結合による RNA の二本鎖が形成され、通常よりも長いアクセプターステムが形成されることにより、酵母 tRNaseZ の基質の認識及び結合が困難になるからであると考えられる。特に Leu2, Trp2 の前駆体 tRNA をみると分かるが、discriminator 塩基が 5' リーダー配列側の塩基と対をなし、さらに 5' リーダー配列と 3' トレーラー配列の間で形成させる水素結合の数が多いため、切断効率が悪くなる。これは、5' リーダー配列と 3' トレーラー配列の間で水素結合により RNA の二本鎖を形成する前駆体 tRNA の割合が多くなり、酵母 tRNaseZ の認識、結合できる構造の前駆体 tRNA の割合が少なくなるからであると考えられる。

Table1 酵母 tRNaseZ の各種前駆体 tRNA に対する切断効率

前駆体 tRNA	5'リーダ	イントロン	3'トレーラ	切断効率(%)
Ser	Ser1	-	+	87
	Ser2	+	+	62
	Ser3	-	+	90
	Ser4	+	+	38
Phe	Phe1	-	+	93
	Phe2	+	+	53
	Phe3	-	+	84
	Phe4	+	+	51

前駆体 tRNA	5'リーダ	3'トレーラ	効率(%)	
Leu	Leu1	-	+	72
	Leu2	+	+	10
Trp	Trp1	-	+	63
	Trp2	+	+	5
Pro	Pro1	-	+	67
	Pro2	+	+	58

イントロン配列の有無に関する酵母 tRNaseZ の前駆体 tRNA の切断効率は、イントロン配列を持つ前駆体 tRNA のイントロンの構造に関係があると考えられる。Phe 前駆体 tRNA の持つイントロン配列のように水素結合により二本鎖を形成し、アンチコドンアーム付近がコンパクトになっているものはあまり、イントロン配列の切断効率への影響が見られないが、Ser 前駆体 tRNA の持つイントロン配列のようにアンチコドンアーム付近

が大きく膨らむような構造をもつ基質に対しては切断効率が落ちると考えられる。

(2) 酵母 tRNase Z の細胞内における機能解析

上記(1) 酵母 tRNase Z の様々な構造の前駆体 tRNA の認識及びその切断活性の結果より、酵母 tRNaseZ は、前駆体 tRNA の 3' トレーラー配列を切断、除去する機能を持ち、tRNA の成熟化機構に関与していることが示唆された。そこで、実際に酵母細胞内で tRNA の成熟化機構に関与しているかどうかについて調査を行った。酵母 *S. cerevisiae* の tRNaseZ は生育に必須であることが分子遺伝学的解析により明らかとなっている。そこで大腸菌テトラサイクリン耐性オペロンの転写調節に働く Tet リプレッサーと Tet オペレーター配列の特性を利用した転写制御システムを利用して、酵母 tRNaseZ をコードする *TRZ1* 遺伝子の発現を調節し、tRNA 成熟化への影響を調べようとしたが、ドデキシサイクリン添加後の *TRZ1* 遺伝子の発現制御がうまくいかずにこのシステムの利用を断念した。

次に酵母 tRNaseZ の切断活性に重要なヒスチジンモチーフ上に存在する 537 番目のチロシンがロイシンに置換された変異型 tRNaseZ (Y537L) 及び 538 番目のロイシンをリシンに置換した変異型 tRNaseZ (L538K) は温度感受性を示すことから、これらの酵素を導入し、染色体上の *TRZ1* 遺伝子を欠失させた株、W303/ Δ TRZ1-TRZ (Y537L) 及び W303/ Δ TRZ1-TRZ (L538K) を作製し、酵母細胞内における tRNaseZ の tRNA 成熟化機構に関する解析を行った。それぞれの変異株が温度感受性を示すのは、至適生育温度の 30°C から低温の 25°C 或いは高温の 37°C に温度をシフトしたときである。特に 30°C から 25°C に温度をシフトしたときにその感受性の程度が大きかったことから、この条件における tRNaseZ の tRNA 成熟化機構についてトリプトファン tRNA を指標に解析を行った。ノーザン解析の結果、野生株は 30°C のときでも 25°C のときでも tRNA 成熟化機構に変化はなく、成熟 tRNA を検出することができた (Fig. 2)。しかしながら、W303/ Δ TRZ1-TRZ (Y537L) 及び W303/ Δ TRZ1-TRZ (L538K) の温度感受性変異株は、30°C のときは tRNA 成熟化に変化はみられなかったが、25°C のときは、両変異株ともに成熟 tRNA を示すバンドがほとんどなくなり、逆に 3' トレーラー配列を付加した前駆体 tRNA を示すバンドがメインとなった。また、その上流には、イントロン配列と 3' トレーラー配列を付加した前駆体 tRNA を示すバンドが検出された (Fig. 2)。これらのことから、酵母 tRNaseZ は、酵母細胞内で tRNA の成熟化機構に関与し、特に 3' トレーラー配列の切断除去に大きく関与していること

が示唆された。また、主なバンドではないが、イントロン配列と 3' トレーラー配列を付加した前駆体 tRNA が検出されたことから、これらの変異株では、前駆体 tRNA の 3' 端プロセシングの前に、イントロンのスプライシングがある可能性が考えられた。

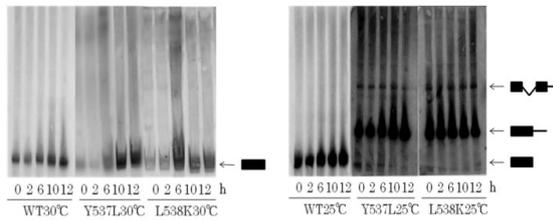


Fig. 2 野生株及び温度感受性変異株の酵母細胞内の前駆体及び成熟 tRNA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

①高久洋暁、梨本正之、tRNase Z と TRUE gene silencing 効率的な mRNA 発現制御に役立つ tRNA 前駆体切断酵素とその生体内での役割、化学と生物、査読なし、Vol. 49、No. 3、2011、pp. 150-152

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高久 洋暁 (TAKAKU HIROAKI)
新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授
研究者番号：70350717

(2) 研究協力者

梨本 正之 (NASHIMOTO MASAYUKI)
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
研究者番号：30228069

高木 正道 (TAKAGI MASAMICHI)
新潟薬科大学・学長
研究者番号：50018339