

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18370069

研究課題名（和文） 新規 tRNA-タンパク質複合体の探索と機能解析-tRNA の一生の全貌解明に向けて

研究課題名（英文） Search for novel tRNA-protein complexes and analyses of their functions - to understand the life of tRNAs

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：

tRNAの一生における細胞内動態の全貌を明らかにする目的で、出芽酵母より新たなtRNA結合タンパク質の生化学的な単離・同定を行った。Hsp70ファミリーに属すSsa2pが新規tRNA結合タンパク質として同定され、実際、栄養飢餓時に見られるtRNAの核内輸送因子であることが、*in vivo*、*in vitro*の実験で明らかとなった。併せて、RNAの3'末端を配列特異的に可視化できる手法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：核酸 細胞内局在 RNA-タンパク質複合体 生合成 微生物 tRNA

1. 研究開始当初の背景

古典的細胞観によれば、細胞質で機能するRNAは核で転写され、成熟化した後に細胞質へ運ばれ、そこで一生を過ごす。細胞質での翻訳に関わるtRNAについても、このドグマは正しいと長年考えられてきた。しかし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、我々は、一部のtRNA遺伝子に含まれるイントロンが核ではなく細胞質でスプライスされることを明らかにし、tRNAの成熟化には核と細胞質の協調が必要であることを見出した。さらに我々は、成熟化したtRNAは細胞質に留まり続けるのではなく、核と細胞質

を行き来しつつその機能を果たすことを発見した。この中で、tRNAの核内輸送機構は、アミノアシル化されたtRNAに加え、3'-末端の短縮化したtRNAも運びうることを示された。tRNA核外輸送の際にはアミノアシル化されたtRNAのみを選択する品質管理が働いていること、不安定なtRNAが核内のRNase複合体 *exosome* で分解されることと合わせ、核は新規転写後もtRNAの機能管理に引き続き関わる可能性がある。また、アミノ酸飢餓のようなストレス下でtRNAの核内蓄積が明らかになり、成熟化後のtRNAの動態が細胞の機能制御に関わる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

tRNA の成熟化過程は、今まで核という細胞内区画のみを念頭に置いて解析されてきたが、上記の発見は、tRNA の成熟化過程でどの因子が、どのタイミングで、どこで結合解離するかを、もう一度洗い直す必要を迫るものである。他方、成熟体 tRNA の核内輸送に伴い、翻訳機能を持つようになった成熟体 tRNA も、翻訳関連以外の因子と相互作用して新たなプールを形成することが示唆されている。本研究は、tRNA の一生を、tRNA-タンパク質複合体 tRNP という観点から時系列的かつ、空間的に明らかにすることを目的として展開した。特に、我々の発見した tRNA の核内輸送に着目し、これに関わる因子の同定も念頭に置いて、tRNP 解析を進めた。

3. 研究の方法

【新規 tRNA 相互作用因子の検索】 様々な前駆体 tRNA (末端延長配列の有無、イントロンの有無)、成熟体 tRNA に特異的に結合するタンパク質を、tRNA を固定化したカラムを用いて酵母抽出液より単離した。その際、抽出液中の内在性 tRNA を、予め陰イオン交換樹脂で取り除いた。ここでは、多様で複雑な塩基修飾酵素群が得られる可能性があるため、固定化する tRNA は、*in vitro* 転写で得られたものではなく、酵母株から調製した tRNA を用いた。結合したタンパク質を peptide mass fingerprint 法で同定した。

【新規 tRNA 相互作用因子の核内輸送への影響の検討】 同定された Ssa2p 等の新規 tRNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の破壊株を用い、tRNA の Northern 解析によって、tRNA の発現量、末端のトリミングおよびスプライシング等の成熟化過程が影響を受けるかを検討した。また、tRNA の動態への影響を検討するため、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) によって tRNA 細胞内局在を解析した。

【Ssa タンパク質と tRNA との相互作用の *in vitro* 解析】 Ssa1p および Ssa2p の組換えタンパク質を大腸菌より調製し、³²P 標識した tRNA を用いた *in vitro* ラベル転位反応で Ssa タンパク質と tRNA との相互作用を解析した。この際に競合分子として必要な修飾を全く受けいない tRNA を *in vitro* 転写反応で、完全に修飾を受けた tRNA を Chaplet Column Chromatography で精製した。

【新規 tRNA 可視化法による CCA 欠失 tRNA の細胞内局在解析】 固定細胞中の tRNA を RNA プライマー、この 3'末端にハイブルダイズする単鎖オリゴ DNA を鋳型とし、蛍光標識 dUTP 存在下、exonuclease 活性を完全に欠く DNA polymerase を *in situ* で作用させることで、3'末端近傍の配列特異的に tRNA

の 3'末端に蛍光標識を導入することができる。この際、CCA 末端を持つ成熟体 tRNA-Tyr^{GUA} および CCA 配列のみを欠く tRNA-Tyr^{GUA} に対しては、各々 5'-AAAAA AAAAA AAAAA TGGTC TCCCG GGGGC GAGTC GAACG CCGA TCTC-3' および 5'-AAAAA AAAAA AAAAA CTCCC GGGGG CGAGT CGAAC GCCCG ATCT C-3' をオリゴ DNA 鋳型として用いた。

4. 研究成果

【新規 tRNA 相互作用因子の検索】

tRNA が生合成途上、そして、成熟化後に形成する未知の tRNP を明らかにする目的で、tRNA に結合しうる新規なタンパク質の網羅的な同定を試みた。まず、野生型の酵母より調製した全 tRNA を、その 3'末端 ribose の 2', 3'-diol を利用して hydrazide 活性化樹脂に固定化し、これに結合するタンパク質群を精製した。この際、tRNA 核内輸送因子の同定も視野に入れ、サイトゾル画分中より新規 tRNA 結合タンパク質を探索した。核内輸送系は ATP をエネルギーとして必要とするため、クロマトグラフ時に ATP を添加する、または、添加しないことにより、固定化 tRNA 樹脂に ATP 依存的、または、ATP 感受性に結合するタンパク質を単離した (図 1)。

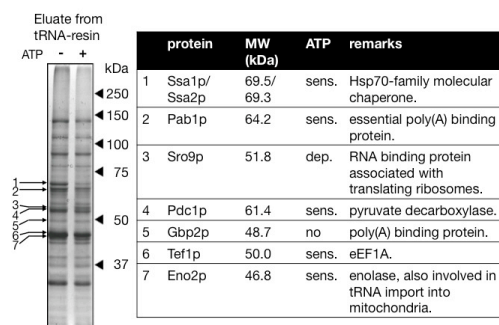


図 1 新規 tRNA 結合因子の同定

SDS-PAGE 上のバンドを切り出し、peptide mass fingerprint 法でそれらの同定を試みたところ、tRNA への結合が既知である eEF1A や enolase などに加え、酵母サイトゾル Hsp70 の一種である Ssa2p が同定された。Ssa2p が ATP 感受性に tRNA を結合することは、FLAG タグを C 末端に融合した Ssa2p-FLAG 発現株より抗 FLAG 抗体によって Ssa2p-FLAG を免疫沈降した際、tRNA-Pro^{UGG} が ATP 感受性に共沈降されることから確かめられた (図 2)。おもしろいことに、非常に Ssa2p とホモロジーの高い Ssa1p はほとんど tRNA を結合せず、両者の間で機能的な分化が見られることが示唆された (図 2)。以上、新規な tRNA の結合タンパク質として、Hsp70 タイプの分子シャペロン Ssa2p が同定され、Ssa2p は *in*

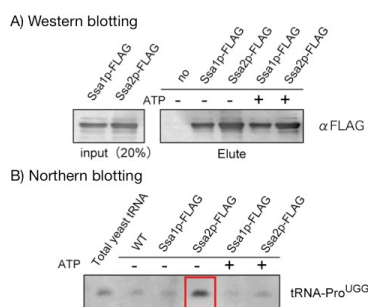


図2 Ssa1pではなくSsa2pがtRNAと共免疫沈降される

*vivo*において、tRNAとATP感受性に相互作用することがわかった。

【新規 tRNA 相互作用因子の核内輸送への影響の検討】

今回 tRNA 結合タンパク質として同定された Ssa2p が、tRNA の核内輸送に関わるかどうかについて検討した。tRNA の核内輸送には、栄養増殖時に働く Ran 非依存性の経路と栄養飢餓時に働く Ran 要求性の経路が存在する。まず、栄養増殖時の核内輸送活性への影響を調べる目的で、二つの tRNA の核外輸送担体遺伝子を欠失した結果、核内に tRNA が顕著に蓄積する *los1Δ msn5Δ* 二重変異より *SSA1* 遺伝子または *SSA2* 遺伝子を失った三重変異を構築した。この株の tRNA の細胞内局在を FISH 法によって検討したが、野生型とほとんど差は見られなかった (図3)。他方、

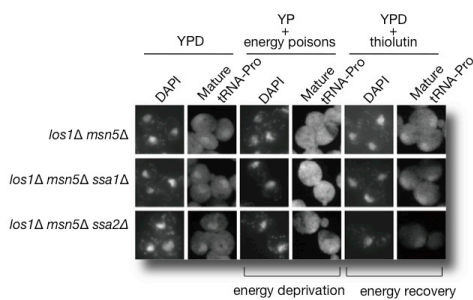


図3 *ssa1Δ*変異および *ssa2Δ*変異は、栄養増殖時の tRNA 核内輸送には影響しない

*ssa1Δ*株または *ssa1Δ*株が栄養飢餓時に tRNA の核内輸送を正常に行えるかどうか検討したところ、*ssa2Δ*株にのみ顕著な核内輸送欠損が見られた (図4)。サイトゾルの Hsp70 の一つが tRNA の核内輸送に関わることは非常に驚きであったが、サイトゾル Hsp70 の co-chaperone である Sis1p および Ydj1p の変異についても FISH 解析を行ったところ、両者とも栄養飢餓時の tRNA の核内輸送に障害があることがわかった。この間、tRNA はアミ

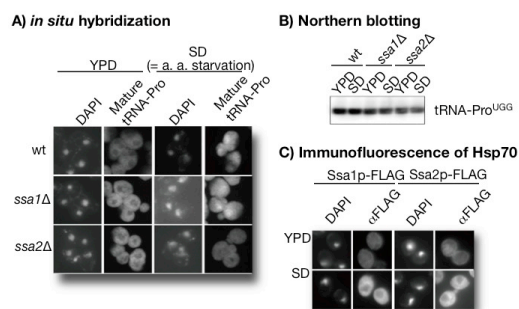


図4 *ssa2Δ*は栄養飢餓時の tRNA 核内輸送に欠損を示す

ノアシル化されている状態を保っており (図4B)、核内への成熟体 tRNA の蓄積は、脱アシル化 tRNA が核に運ばれるためというより、tRNA 全体の核内輸送が活性化しているためであることを示唆している。また、Ssa2p 自身の細胞内局在が栄養飢餓により影響を受け、核から排除され細胞質に多く局在している通常時に比べ、より多くの Ssa2p が核内に存在することも明らかになった。

【Ssa タンパク質と tRNA との相互作用の *in vitro* 解析】

我々は次に、Ssa2p が直接 tRNA を結合できるかを、大腸菌より調製した組換え Ssa1p および Ssa2p と、*in vitro* 転写反応で調製した ³²P 標識 tRNA を用いたラベル転位アッセイで検討した。その結果、成熟体 tRNA に加え、CCA 欠失 tRNA、さらには、イントロンを含む前駆体 tRNA と Ssa1p、Ssa2p いずれもが、ATP 感受性に直接相互作用することがわか

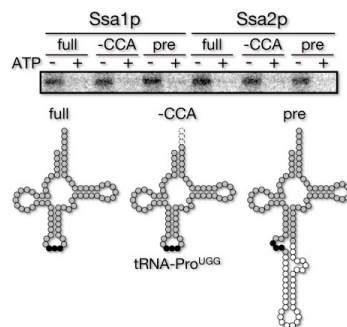


図5 *in vitro* での ³²P 標識 tRNA から Ssa タンパク質へのラベル転位

った (図5)。Ssa1p と Ssa2p の tRNA 結合に大きな差が見られないことは驚きであり、*in vivo* では何らかの活性制御によって両者の機能分化が図られている可能性が示唆された。また精製した RNA を用いた競合実験では、*in vitro* 転写した tRNA も酵母から精製した tRNA もいずれもが結合すること (図6)、tRNA の結合は Ssa タンパク質の既知の基質

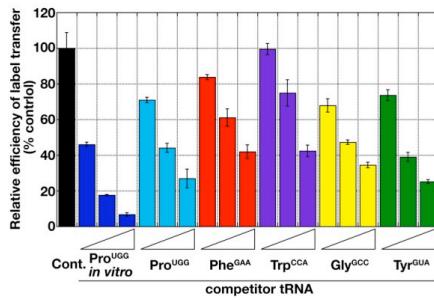


図6 様々な tRNA による競合実験

である変性タンパク質とは競合しないことが明らかとなった。さらに、アンチセンス DNA とのハイブリダイズなど、tRNA の高次構造を壊すような条件下では、tRNA と Ssa タンパク質との結合が低下することを明らかにした。以上のことから、Ssa タンパク質は様々な tRNA を特異的に認識し、直接 tRNA を結合することで、その核内輸送に関わる輸送担体であることがわかった。

現在我々の得た知見を元に、tRNA の細胞内動態をまとめたのが図7である。このように tRNA は、核-細胞質間をシャトルしながら、翻訳その他における機能を担っている。そして、tRNA の動態は細胞質における機能的に正常な tRNA の存在量の調整、及び、品質管理に深く関わるものと予想される。こうした tRNA の細胞内動態に、本来タンパク質の高次構造形成・品質管理に関わる Hsp70 の一つ Ssa2p が、核内輸送担体として関与していたことは驚きである。今後は、輸送経路の詳細を明らかにすると共に、どのようにして栄養飢餓時の輸送の調製が行われているかの制御メカニズムについても明らかにしてゆく必要がある。

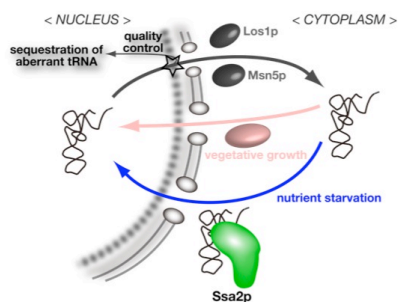


図7 tRNA の細胞内動態と Hsp70 の関与【新規 tRNA 可視化法による CCA 欠失 tRNA の細胞内局在解析】

我々は以前、tRNA の CCA 付加酵素の温度感受性変異 *cca1-1* を用いて、CCA 欠失 tRNA が蓄積する条件下でも tRNA の核内輸送が見

られることを見出し、tRNA の核内輸送システムが完全長の成熟体に加えて、3'末端の短縮化した tRNA も輸送する可能性を示した。これを最終的に証明するには、CCA 欠失 tRNA の局在を完全長のものと分けて検出することが必要となる。我々は、RNA の3'末端をこれにアニールさせた単鎖オリゴ DNA 鋳型に対するプライマーとすることで、ターゲット RNA の3'末端特異的に蛍光標識ヌクレオチドを *in situ* で取り込ませる方法、Oligonucleotide-directed Three-prime Terminal Extension of RNA 法 (OTTER 法) を開発した。図8左に示すように、通常の Northern blotting では、完全長および CCA 欠失 tRNA を特異的に検出することは不可能であり、同じ原理を用いた FISH 像では得られた蛍光シグナルがどちらの tRNA に由来するかはわからない。しかし、図8右の OTTER 法では、完全長 tRNA の3'末端にアニールするプローブでは *cca1-1* 株の制限温度下でも核に比べて細胞質に高い蛍光シグナルが見られるのに対し、CCA 欠失 tRNA 特異的プローブでは、制限温度下になつてはじめてシグナルが見られ、かつ、そのシグナルは核に局在することがわかった。このように、OTTER 法は3'末端配列特異的な新規の RNA 可視化法として有効であることが示された。

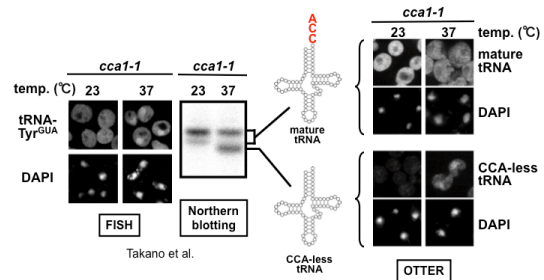


図8 OTTER 法による CCA 欠失 tRNA の特異的検出

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 4件)

- ① Tohru Yoshihisa*, Chie Ohshima, Kaori Yunoki-Esaki, Toshiya Endo Cytoplasmic splicing of tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Cells 12, 285-297 (2007) 査読有り
- ② Tohru Yoshihisa tRNA, new aspects in intracellular dynamics. Cell. Mol. Life Sci. 63, 1813-1818 (2006) 査読有り
- ③ 吉久徹 tRNA の成熟化と細胞内ダイナミクス-tRNA の一生における新展開 蛋白質

核酸酵素増刊「RNA と生命」 51, 2568-2573 (2006) 査読無し

④吉久徹, 高野晃, 遠藤斗志也 核内 tRNA の生理的意義 蛋白質核酸酵素増刊「細胞核の世界」 51, 2232-2234 (2006) 査読無し

[学会発表] (計 15 件)

① Akira Takano, ... Toshiya Endo, Tohru Yoshihisa (計 5 名) Nuclear import of tRNA in yeast - Ssa2p, one of cytoplasmic Hsp70, involves in tRNA dynamics. 第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会合同大会

シンポジウム「核-細胞質間輸送と生命機能のインターフェイス」 2008 年 12 月 9 日-12 日 神戸市神戸ポートアイランド

② 森俊輔, 遠藤斗志也, 吉久徹 tRNA のイントロンは出芽酵母に必要か 第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 2008 年 12 月 9 日-12 日 神戸市神戸ポートアイランド

③ 水谷和揮, 吉久徹, 遠藤斗志也 ミトコンドリア行きシグナルとその受容体 Tom20 の同時改変 第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 2008 年 12 月 9 日-12 日 神戸市神戸ポートアイランド

④ Akira Takano, ... Toshiya Endo, Tohru Yoshihisa (計 7 名) Nuclear import of tRNA in budding yeast, implication of Hsp70 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, "Dynamic Organization of Nuclear Function" 2008 年 9 月 17 日-21 日 Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

⑤ 森俊輔, 遠藤斗志也, 吉久徹 tRNA のイントロンは出芽酵母に必要か 第 72 回日本生化学会中部支部会例会 2008 年 5 月 24 日 岐阜大学医学部記念会館

⑥ 吉久徹, ... 遠藤斗志也 (計 9 名) 酵母における tRNA の動態-細胞質スプライシングとスプライシング因子の新機能 酵母遺伝学フォーラム「松井記念シンポジウム」 2007 年 9 月 13 日 大阪大学コンベンションセンター

⑦ 高野晃, 遠藤斗志也, 吉久徹 出芽酵母における tRNA 核内輸送因子の検索 第 9 回 RNA ミーティング (日本 RNA 学会年会) 2007 年 7 月 28 日-29 日 名古屋市名古屋国際会議場

⑧ 高野晃, 遠藤斗志也, 吉久徹 出芽酵母における tRNA 核内輸送因子の検索 第 71 回日本生化学会中部支部会例会 2007 年 5 月 19 日 名古屋大学野依記念国際交流館

⑨ 森隆雄, ..., 遠藤斗志也, 吉久徹 (計 7 名) 小胞体ストレス応答における Hac1p の翻訳制御における tRNA リガーゼ Rlg1p の新たな役割 第 7 回日本分子生物学会春季シンポジウム 2007 年 4 月 23 日 淡路市淡路夢舞台

⑩ 森俊輔, 藤城雅子, 花村雅人, 遠藤斗志也,

吉久徹 tRNA のイントロンは出芽酵母に必須か 2006 フォーラム「分子生物学の未来」 2006 年 12 月 6 日-8 日 名古屋市名古屋国際会議場

⑪ 高野晃, 花村雅人, 遠藤斗志也, 吉久徹 出芽酵母における tRNA 核内輸送因子の検索 2006 フォーラム「分子生物学の未来」 2006 年 12 月 6 日-8 日 名古屋市名古屋国際会議場

⑫ 花村雅人, 森隆雄, 遠藤斗志也, 吉久徹 酵母細胞における tRNA ligase の機能領域の検討~標的 RNA の 3'末端を検出する新手法による解析~ 2006 フォーラム「分子生物学の未来」 2006 年 12 月 6 日-8 日 名古屋市名古屋国際会議場

⑬ Takao Mori, ..., Toshiya Endo, Tohru Yoshihisa (計 7 名) tRNA ligase Rlg1p is required for both splicing and translation regulation on unfolded protein response through Hac1p expression International Symposium RNA 2006 Izu 2006 年 12 月 3 日-7 日 伊豆の国市大仁ホテル

⑭ 森隆雄, ..., 遠藤斗志也, 吉久徹 (計 6 名) UPR における酵母 tRNA リガーゼ Rlg1p の翻訳抑制機能 第 8 回 RNA ミーティング (日本 RNA 学会年会) 2006 年 7 月 18 日-20 日 淡路市夢舞台

⑮ 森俊輔, 藤城雅子, 花村雅人, 遠藤斗志也, 吉久徹, tRNA のイントロンは出芽酵母に必須か 第 8 回 RNA ミーティング (日本 RNA 学会年会) 2006 年 7 月 18 日-20 日 淡路市夢舞台

[図書] (計 5 件)

① 吉久徹 羊土社 RNA 実験ノート(上) (稲田利文、塩見春彦編) : 第 1 章第 3 節電気泳動 p. 47~p. 53 全 187 ページ中 7 ページ (2008)

② 吉久徹 羊土社 RNA 実験ノート(上) (稲田利文、塩見春彦編) : 第 2 章第 3 節 whole mount in situ hybridization ④出芽酵母における FISH 法 p. 89~p. 95 全 187 ページ中 7 ページ (2008)

③ 遠藤斗志也, 吉久徹, 森和俊, 田口英樹 羊土社 タンパク質の一生集中マスター: 細胞における成熟・輸送・品質管理 p. 12~p. 35 全 146 ページ中 24 ページ (2007)

④ 吉久徹, 遠藤 斗志也 朝倉書店 生物物理学ハンドブック (石渡 信一, 桂 勲, 桐野 豊, 美宅 成樹編)、細胞の構造: 概論 全 680 ページ中 5 ページ (2007)

⑤ 吉久徹 東京化学同人 生化学辞典第 4 版: 「ミトコンドリアリボソーム RNA」項など 全 1616 ページ中 4 ページ (2007)

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
遠藤 斗志也 (ENDO TOSHIYA)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 70152014
(H18 および H19 年度)

(3)連携研究者
遠藤 斗志也 (ENDO TOSHIYA)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 70152014
(H20 年度)