

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06490

研究課題名(和文)tRNAレパートリー形成のためのtRNA遺伝子の発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the regulatory system for tRNA gene expression to establish a proper tRNA repertoire.

研究代表者

吉久 徹 (Yoshihisa, Tohru)

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：60212312

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): 翻訳因子であるtRNA種の個別の量的制御機構は未だ判っていない。酵母を用いた分子遺伝学的手法でこの機構を検討するため、tRNA遺伝子(tDNA)のプロモータ活性測定系の構築を目指した。まずはイントロンを含む前駆体tRNAのRT-qPCRを用い、同義遺伝子中、イントロン配列に特徴のあるtDNA由来の前駆体tRNAの量を特異的に分析できることを示した。次に、RNAiにおけるshRNAをtDNAをプロモータとして発現させ、標的であるEGFPの発現抑制でtDNAプロモータ強度を定量できるか検討した。しかし、異なるtDNAを用いても全て強くレポーターを押さえてしまい、定量比較には不向きであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は今まで知られていなかった個別tRNA遺伝子の発現制御を解析するための研究基盤の構築を試みた。学術的には、生理条件に応じた個別のtRNA遺伝子の発現制御を検出することはできたが、本来の目的である遺伝学的なスクリーニングに耐えるプロモータ活性の測定計の構築には至らなかった。RNAiやCRISPRiに用いられる低分子non-coding RNAの発現をベースとした検出系では、レポーターmRNAの発現量をかなり正確に調製する必要がある。今後は、tDNAプロモータで転写される機能性RNAが直接検出できる系での検討が必要であろう。

研究成果の概要(英文): Accumulating pieces of evidence revealed that tRNAs, essential for translation, is under transcriptional regulation, but their regulatory molecular mechanism has been obscure. To analyze this problem using yeast molecular biological technique, we tried to construct ways for analyze promoter activity of tRNA genes, or tDNAs. First, we adopted RT-qPCR to measure pre-tRNAs with an intron, a primary approximation of transcriptional activity of the corresponding tDNA. Second, we constructed RNAi system where an shRNA against EGFP mRNA is expressed from the tDNA promoter, and tested whether extent of suppression of EGFP expression is correlated with tRNA expression. However, all of our constructs so strongly suppressed EGFP expression that promoter activity of various tDNAs could not be compared.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：tRNA 転写制御 転写因子 tRNA検出因子 tRNAレパートリー

1. 研究開始当初の背景

tRNA は、そのアンチコドン配列と結合するアミノ酸残基で分類され、通常ゲノム当たり 50 種類以下の isoacceptor tRNA (アンチコドン配列による分類) で 61 種のコドンカバーする。各 isoacceptor tRNA の量比はその tRNA 種をコードする同義遺伝子数でおよそ決まると考えられ、また、ゲノム上に出現するコドン全体の頻度にもある程度対応している。このため、tRNA の発現は、生理条件や発生段階等に依存しない静的なものと考えられていた。しかし、近年、tRNA 種毎の存在量が生理的・人為的ストレス、疾患等の内的・外的要因で変化することが、酵母からヒトに至る生物種で報告された[1-3]。これは、ある条件下の細胞の tRNA の量的関係の総体 (tRNA レパートリー) が能動的・可塑的に保たれること意味する。

本課題では、分子遺伝学的・生化学的解析に適した出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料に、この tRNA レパートリー変化を可能にする制御機構の解明を目指す。具体的な tRNA の量的・機能的制御点としては、tRNA 遺伝子 (tDNA) の転写に加え、tRNA 前駆体の修飾、核—細胞質間の tRNA 輸送、tRNA の特異的分解、の 4 点が想定される。現時点で、前 3 者は、栄養飢餓等の生理条件で制御されることが判っている。例えば、tDNA の転写は TORC1 系の制御下にあり、この下流にある保存された転写因子 Maf1 が RNA polymerase III (Pol III) の機能を抑えることで、栄養飢餓時の転写を抑制する[4]。生理条件の変化で個々の tDNA の転写活性が異なることは、Pol III サブユニットの ChIP や CRAC (新生 RNA 鎖解析の一種) による網羅的解析で明らかになってきた[5,6]。他方、tDNA 周辺は基本的に nucleosome-free なので[7]、転写領域のクロマチン構造は制御されようがないが、その両側に存在する nucleosome の状態をクロマチン再編因子が調整することで、tDNA の転写状態が左右される [8]。同じく栄養飢餓時には tRNA は細胞質から核へ移動することで細胞質の tRNA 濃度が下がるが、これは TORC1 系と cAMP-protein kinase A 系といったシグナル伝達系で調節されている[9]。こうした研究では、あくまで、tRNA 全体の転写・細胞内分布の調節機構が研究されているのみで、個々の tRNA 種の能動的な量的調節機構に関する報告は未だ無い。

2. 研究の目的

本申請では、tRNA レパートリー制御の初発段階である tDNA の転写制御に着目した研究を計画した。特に、アンチコドンで特定される isoacceptor 単位での tRNA の量的制御に関わる転写制御系の実態を明らかにすることを目指す。tDNA の発現制御を考える際に、標的 tDNA にどのような転写因子が作用するか、いかに細胞内の tRNA の機能量を検知するか、が問題となる。本研究では特に前者の探求を目指し、まずそのために必要な、tDNA の転写状態あるいはプロモーター活性を簡便に測定できる解析系を検討した。今回は、イントロンを含む遺伝子から転写される tRNA の場合、イントロン部分の

3. 研究の方法

3.1 tRNA 前駆体の RT-qPCR による定量

酵母では一つの isoacceptor に属す tRNA の配列はほぼ単一である。しかし、イントロンを含む tRNA 遺伝子の中には、同義遺伝子座間でイントロン配列の異なるものがある。ここでは、tRNA^{Leu}_{CAA} をコードし、全 10 同義遺伝子中、同一の配列をもつ 5 同義遺伝子 tL(CAA)G2/G3/K/M/N の前駆体および他とイントロンの配列に 2 nt の違いがある tL(CAA)D の前駆体、やはり tRNA^{Phe}_{GAA} をコードする全 10 同義遺伝子中、同一の配列をもつ 6 同義遺伝子 tF(GAA)F/G/H1/H2/P1/P2 の前駆体、他とイントロン配列に 2 nt の違いがある tF(GAA)D の前駆体をそれぞれ特異的に増幅できる primer セットを用いた RT-qPCR で定量した。逆転写は Superscript III (Thermo Fisher Scientific)、qPCR は TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara Bio) を用いて反応を組み立てた。反応条件は、メーカーのマニュアルに従い、リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice TP860 (Takara Bio) を用い定量を行った。

なお、サンプルとなる酵母は W303-1A 株を用い、YPD (富栄養発酵培地) あるいは、YPGly (富栄養呼吸培地) で対数増殖期まで培養したものを用いた。また、必要に応じて 30°C から 37°C への熱ショック、終濃度 0.5 mM H₂O₂ の添加、2 μg/mL rapamycin の添加といったストレスを付与した。こうした酵母より 50 mM NaOAc [pH 5.2]、10 mM EDTA、1.0% SDS を用いたホットフェノール法で調製した RNA を RT-qPCR 等に用いた。

3.2 RNAi の shRNA を tDNA プロモーターより発現させる系

tDNA のプロモーター活性を測定する系として酵母内で発現させた EGFP レポーターを RNAi でノックダウン (KD) する際の shRNA を様々な tDNA をプロモーターとして発現させる系を検討した。*S. cerevisiae* には RNAi 系が存在しないので、Argonaut と Dicer のみから成る *S. castellii* の

RNAi 系の遺伝子 (*ScaAGO1*, *ScaDCR1*) を構成的な *S. cerevisiae* の *TEF1* プロモータ下につないだプラスミドを構築、W303-1A 株に導入して RNAi 活性な *S. cerevisiae* 株とした。これに、レポーターとしてやはり構成的な *ADHI* プロモータより EGFP レポーターを発現するプラスミドを導入した。レポータープラスミドは定コピーベクターに *ADHIp::EGFP* ユニットを 2 つ載せたものと、多コピーベクターに *ADHIp::EGFP* ユニットを 1 つ載せたものを用いた。最後に、各種 tDNA (*tT(CGU)K*, *tY(GUA)J2*, *tR(UCU)K*, *tM(CUA)J1*, *tC(GCA)B*) の各成熟体 tRNA コード部分の 3'末端に、EGFP ORF の 5'領域に 90 bp 部分に対する shRNA を挿入したプラスミドを導入した。EGFP の発現は蛍光顕微鏡で確認すると共に、対数増殖期にある酵母培養液から回収した酵母細胞中の EGFP 量を定量的な western blotting で検討した。

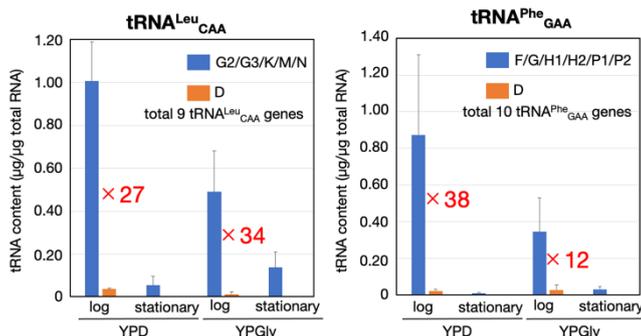
4. 研究成果

3.1 tRNA 前駆体の RT-qPCR による定量

tDNA のプロモーター活性を近似する生細胞中のパラメーターとして前駆体 tRNA に着目した。特にイントロンを含む tDNA から転写される tRNA の場合、イントロン部分を指標とすることで前駆体を特異的に検出できる。また、tRNA を定量する際、成熟体 tRNA は強固な 2 次構造と様々な修飾が逆転写を阻害するために逆転写が難しいが、前駆体 tRNA は修飾が進んでいないこと、修飾がほとんどないと考えられるイントロン部分を主に逆転写することから、むしろ、転写初期に近い状態の前駆体がより効率的に RT-PCR で増幅されると期待できる。

ここでは、遺伝子レベルでの tDNA の転写状態をモニタすることを考慮して、出芽酵母題材に、イントロンを含む tDNA の中でもイントロン配列に SNP の見られる $tRNA^{Leu_{CAA}}$ や $tRNA^{Phe_{GAA}}$ に着目した。ゲノム上 $tRNA^{Leu_{CAA}}$ は 10 個の同義遺伝子のうち、*tL(CAA)G2/G3/K/M/N* の計 5 遺伝子は全く同一のイントロン配列を持つが、*tL(CAA)D* や *tL(CAA)L* はこれらとは 2 nt 配列が異なっており、これら由来の前駆体を特異的に増幅する PCR プライマーが設計可能である。そこで、5 遺伝子由来の前駆体 $tRNA^{Leu_{CAA}}$ を合わせて増幅できるプライマーと *tL(CAA)D* 由来の前駆体のみを増幅できるプライマーを設計し、RT-qPCR で前駆体 tRNA の定量を行い比較した。予備的な実験で、Pol III を含めた転写阻害剤 thiolutin を用いたチェイス実験では前駆体のみが急速に失われることが判っており、前駆体量は転写の強さを反映していることが示唆された。

図 1 イントロン配列を利用した前駆体 tRNA の定量



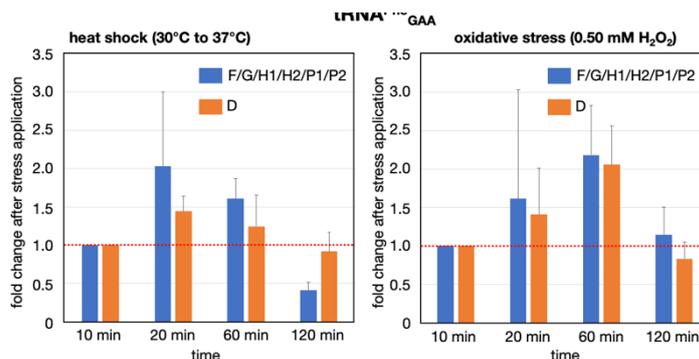
tL(CAA)D 由来の前駆体 tRNA は *tL(CAA)G2/G3/K/M/N* 由来の前駆体の 1/27、富栄養呼吸培地 YPGly では 1/34 しか存在せず、遺伝子数効果から予想される 1/5 より遙かに少ない転写量である可能性が示された。同様のことは、 $tRNA^{Phe_{GAA}}$ の同一配列の 6 同義遺伝子 *tF(GAA)F/G/H1/H2/P1/P2* より転写される前駆体と、他と異なるイントロン配列を持つ *tF(GAA)D* の間でも見られた。これらの遺伝子の Pol III 占有率は ChIP 解析で差が見られていないので、転写状態は ChIP だけでは推定できない可能性がある。

次に、出芽酵母に様々なストレスを与えた際の前駆体量の変化について検討した(図 2)。30°C から 37°C への熱ショック、および、 H_2O_2 による酸化ストレスを与えたときの前駆体 $tRNA^{Phe_{GAA}}$ 量の時間変化を検討したところ、酸化ストレスの際には、*tF(GAA)F/G/H1/H2/P1/P2* の 6 遺伝子由来の前駆体 tRNA の挙動と *tF(GAA)D* 由来の前駆体の挙動は一致した。しかし、熱ショックの場合、

tF(GAA)F/G/H1/H2/P1/P2 の 6 遺伝子由来の前駆体 tRNA は 20 分から 60 分にかけて一過的に増えた後、120 分では明確に下がるのに対し、*tF(GAA)D* 由来の前駆体はこの時間枠内ではあまり

我々が行った $tRNA^{Trp_{CCA}}$ 網羅的欠失組み合わせ変異の解析では、各同義 tDNA 遺伝子の $tRNA^{Trp_{CCA}}$ 供給への寄与は全て等価だったことから、 $tRNA^{Leu_{CAA}}$ 同義遺伝子についても同様のことが期待された。これは、tDNA のほとんどがほぼ同様に Pol III で占有されているという ChIP 解析のデータとも一致する[11]。しかし驚いた事に、図 1 にあるように、富栄養発酵培地 YPD 中では

図 2 ストレス負荷時の $tRNA^{Leu_{CAA}}$ 遺伝子の転写状態変化



変化しなかった。即ち、多数の tRNA^{Phc_{GAA}} 遺伝子は熱ショックで一過的に転写が高まるがその後 2 時間程度で転写が抑えられるのに対し、*tF(GAA)D* ではこうした転写変化がほぼ起きないことが示唆された。

3.2 RNAi の shRNA を tDNA プロモーターより発現させる系

前駆体 tRNA で転写活性をある程度見積もる方法が得られたが、tDNA 遺伝子の発現状態を明らかにするためには、まずは様々な tDNA のプロモータ強度や、特定の tDNA のプロモータ活性の様々な生育環境下での変化を調べる解析系が必要である。Pol II で転写されるタンパク質遺伝子のプロモータ活性は、ORF 上流のプロモータ領域の下流に適当なレポーター遺伝子 (β -galactosidase 遺伝子である *lacZ*、luciferase 遺伝子、GFP 遺伝子等) を融合し、そうした酵素/タンパク質の持つ活性の定量などを介して、簡便に測定することが可能である。しかし、Pol III が比較的短い RNA の転写に特化していること、Pol III の転写産物は Cap や Poly(A) といった mRNA の翻訳に深く関わる末端修飾を受けないことから、tDNA のプロモータ活性を同様の方法で測定することは難しく、何らかの機能性低分子 non-coding RNA をレポーターとして用いる系を構築する必要がある。ここでは、RNAi における siRNA の下となる shRNA の供給を目安にした系の構築を試みた。ただし、*S. cerevisiae* には RNAi 系は存在しない。そのため、近縁種である *S. castellii* の持つ Dicer と Argonaut のみからなる RNAi 系を導入し[12]、標的認識に関わる siRNA (small interference RNA) のソースとなる shRNA (short hairpin RNA) を tDNA プロモータから発現させている。レポーターとして *ADHI* プロモータから構成的に発現する EGFP を標的とすることで、tDNA のプロモータ活性に関して、用いる tDNA の違いや生理的条件の変化による転写制御の検出を試みた。shRNA は成熟体 tRNA のコード領域の 3' 末端に、Pol III の転写集結シグナルとして働く T7 配列を付加された状態で挿入されており、tRNA-shRNA として転写される。転写後は tRNA の 3' trailer 配列の切除に働く RNase Z により tRNA 部分と切り離される。EGFP ORF の 5' 末端 90 bp 領域の shRNA を融合すると効率の良い EGFP の発現抑制が見られることが確認できているので、この shRNA を、tRNA^{Thr_{CGU}} 遺伝子 *tT(CGU)K*、tRNA^{Tyr_{GUA}} 遺伝子 *tY(GUA)J2*、tRNA^{Arg_{UCU}} 遺伝子 *tR(UCU)K*、延長用 tRNA^{Met_{elongator}} 遺伝子 *tM(CUA)J1*、tRNA^{Cys_{GCA}} 遺伝子 *tC(GCA)B* に挿入した融合遺伝子をプラスミド上に構築し、*S. castellii* の Ago1、Dcr1、そしてレポーターの EGFP を恒常的に発現する酵母株に導入した。これらの tRNA は、それぞれ tRNA の 1 遺伝子あたりの現存量が高いもの (tRNA^{Thr_{CGU}}、0.080 pmol/ μ g RNA/gene)、比較的平均に近いもの (tRNA^{Arg_{UCU}}、0.034 pmol/ μ g RNA/gene : tRNA^{Tyr_{GUA}}、0.035 pmol/ μ g RNA/gene)、低いもの (tRNA^{Cys_{GCA}}、0.016 pmol/ μ g RNA/gene : tRNA^{Met_{elongator}}、0.021 pmol/ μ g RNA/gene) としてピックアップした。

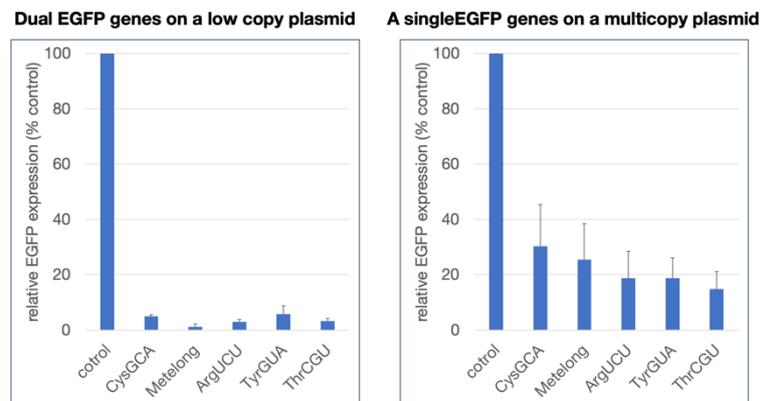
他方、本系では、EGFP の発現の抑制の強さで shRNA の発現量、さらには、tDNA プロモータの強さを定量するため、EGFP mRNA の発現量とレポーターに対する shRNA を含む RISC の比率が重要となる。そこで、レポーター側は、発現量を確保するために、*ADHIp::EGFP* ユニットの 2 つ持つ低コピープラスミド、あるいは、*ADHIp::EGFP* ユニットの 1 つもつ多コピープラスミドの 2 種類のレポーター発現系を用いた。

EGFP の発現状態を、抗 GFP 抗体を用いた

western blotting で定量した結果を図 3 に示す。低コピーベクターに 2 つの *ADHIp::EGFP* ユニットを載せたレポータープラスミドが導入された宿主を用いた場合、全ての tDNA プロモータで極めて強い EGFP の発現抑制が見られ、shRNA を発現していないコントロール株の 6% 以下の EGFP しか検出されず、定量的な実験をするには EGFP mRNA と shRNA との比率が不適切である事が判った。次に、より多くの EGFP mRNA の発現量が期待できる、多コピーベクターに *ADHIp::EGFP* ユニットを載せたレポータープラスミドが導入された株を用いて実験を行った。すると残存 EGFP 量はコントロールの 15~30% であり、抑制効果の違いを図るダイナミックレンジに近づくことができたが、tRNA の現存量に対応したレポーターの発現抑制を定量的に見る条件の確立には至らなかった。

この他、CRISPRi[13]による EGFP レポーターの発現抑制の為の sgRNA の供給を、tDNA プロモータを用いて行う系などを試したが、良好な結果は得られていない。RNAi、CRISPRi 何れもレポーターの発現抑制の度合いを定量的に検出使用とする系であるのでレポーターと抑制用 non-coding RNA の発現比率を至適化する必要があり、系の構築の fine-tune が難しいということが明らかとなった。現在、tDNA をプロモータとして RNA だけで働く蛍光アプタマー[14]を発現

図 3 shRNA 発現系を利用した tDNA プロモータ強度解析



する系で、同様の系が構築できないか検討を進めている。

5. 文献

[1] Gingold *et al.* (2014) *Cell* 158:1281. [2] van Bortle *et al.* (2015) *RNA* 21:1807. [3] Torrent *et al.* (2018) *Sci Signal* 11:eaat6409. [4] Moir & Willis (2013) *BBA* 1829:361. [5] Shukla & Bhargava (2018) *BBA* 1861:295. [6] Turowski *et al.* (2016) *Genome Res* 26:933. [7] Lee *et al.* (2007) *Nat Genet* 39:1235. [8] Kumar & Bhargava (2013) *BMC Genomics* 14:402. [9] Whitney *et al.* (2007) *Mol Biol Cell* 18:2678. [10] Hayashi *et al.* (2022) *Biosci Biotech Bichem* 86:1398. [11] Roberts *et al.* (2003) *PNAS* 100:14695. [12] Drinnenberg *et al.* (2009) *Science* 326:544. [13] Qi *et al.* (2013) *Cell* 152:1173. [14] Zinskie *et al.* (2017) *FEMS Yeast Res* 18:foy093.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagai Akihisa, Mori Kohei, Shiomi Yuma, Yoshihisa Tohru	4. 巻 27
2. 論文標題 OTTER, a new method for quantifying absolute amounts of tRNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 628 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.076489.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuki Yasuko, Matsuo Yoshitaka, Nakano Yu, Iwasaki Shintaro, Yoko Hideyuki, Udagawa Tsuyoshi, Li Sihan, Saeki Yasushi, Yoshihisa Tohru, Tanaka Keiji, Ingolia Nicholas T., Inada Toshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Ribosomal protein S7 ubiquitination during ER stress in yeast is associated with selective mRNA translation and stress outcome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 e19669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76239-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Sachiko, Matsui Masaya, Ikeda Ayano, Yoshihisa Tohru	4. 巻 86
2. 論文標題 Six identical tRNATrpCCA genes express a similar amount of mature tRNATrpCCA but unequally contribute to yeast cell growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1398 ~ 1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac134	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 笹田 奈友子、入江 百香、谷脇 萌佳、永井 陽久、吉久 徹
2. 発表標題 Multiphasic regulation of tRNA repertoires in budding yeast
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉久 徹、笹田 奈友子、入江 百香
2. 発表標題 出芽酵母におけるtRNAのオートファジー：tRNautophagy
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nayuko Sasada, Momoka Irie, Moeka Taniwaki, Masaya Matsui, Ayano Ikeda, Sachiko Hayashi, Akihisa Nagai, Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Formation and Maintenance of tRNA Repertoires in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 The 30th Tokyo RNA Club (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林紗千子、松井将也、池田彩乃、吉久徹
2. 発表標題 酵母の6つの完全に相同なtRNATrpCCA遺伝子は、等しく成熟tRNATrpCCAを供給するものの、生育に遺伝子座固有の影響を持つ。
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nayuko Sasada, Momoka Irie, Akihisa Nagai, Moeka Taniwaki, Sachiko Hayashi, Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Regulation of tRNA repertoires in the budding yeast.
3. 学会等名 CSH Asia RNA Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sachiko Hayashi, Tohru Yoshihisa
2. 発表標題 Paralogue-specific regulation of RPS7/eS7 mRNAs via the 3' -UTR in budding yeast
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林紗千子、吉久徹
2. 発表標題 tL(CAA)遺伝子のイントロンの有無との奇妙な繋がり：出芽酵母でのRps7パラログ選択性と関連した細胞質及びミトコンドリアでの翻訳
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------