

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650009

研究課題名(和文)古いtRNAの分解と修飾ヌクレオチドの代謝

研究課題名(英文) Degradation of old tRNA and metabolism of modified nucleotides

研究代表者

吉久 徹 (Yoshihisa, Tohru)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60212312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、寿命の長いRNAであるtRNAを取り上げ、タンパク質に見られるような傷害分子の非対称細胞分裂に従った非対称分配が見られるのか、分解の際に修飾ヌクレオチドがどう処理されるのか、の解析系を、出芽酵母を用いて構築した。この中で、分裂寿命の進んだ細胞を濃縮してtRNAの細胞内分布を調べたが、若い細胞との大きな差は見られなかった。他方、一過的なtRNA分解亢進状態を作り出して修飾ヌクレオチドの動態を調べるための温度感受性tRNA変異を単離した。また、傷害tRNAを含めたtRNAの核内輸送機構の解析から、酵母細胞質Hsp70の一つSsa2pが、tRNAの核内輸送担体であることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：I picked up tRNA, a long-lived class of RNAs, to examine whether eukaryotic cells performing asymmetric cell division deliver 'wounded' tRNA molecules asymmetrically like aggregated proteins, and how modified nucleotides derived from degraded tRNA are processed, and tried to establish experimental systems in yeast. I found that 'old' yeast cells from the view of the replicative life span do not show significant difference from young cells in their tRNA localization. I also isolated temperature-sensitive tRNA mutants that lead transient increase of modified nucleotides in amount by degradation of the tRNA molecules and allow analysis of dynamics of the modified nucleotides. Finally, I analyzed molecular mechanism of nuclear import of tRNA, which strongly affects intracellular localization of tRNA, and found that one of the yeast cytosolic Hsp70s, Ssa2p, is a transport carrier of tRNA in the nuclear import.

研究分野：分子生物学・細胞生物学

キーワード：tRNA 分解 非対称分裂

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の様な非対称分裂を行う真核生物は、傷害を受けたタンパク質を古い細胞に留める仕組みを持つことが近年明らかになっている[1,2]。こうした仕組みは、細胞の老化に伴う障害(老化)分子の蓄積と密接に関係している。例えば、酵母の母細胞(古い細胞)のみに見られる JUNQ 等のタンパク質凝集体は、異常タンパク質を核等のオルガネラ近傍に集積することで、娘細胞(新しい細胞)から排除する[3,4]。これに対し、細胞質の重要な構成成分である RNA のうち、mRNA は半減期が 10~30 分間と短く、細胞周期(野生型で 90~120 分間)をまたぐ現象を考える必要は無い。他方、酵母の細胞周期以上の安定性を持つ tRNA はこうした非対称分配を考慮すべき可能性がある。tRNA は、転写後、多様なヌクレオチド修飾を施されて機能化する[5]。生合成過程の問題で生じた不安定な tRNA を排除するため、真核生物は幾つかの品質管理機構を有する[5~7]。一方、成熟化後、どのような異常 tRNA が老化に伴って蓄積するのか、そうした tRNA が既知の品質管理機構で分解されるかについて、今まで報告はない。

加えて、tRNA の分解には、分解で生じたヌクレオチドの処理の問題がある。酸化等の傷害を受けたヌクレオチドだけでなく、そもそも多様な修飾を受けている tRNA からは様々なヌクレオチドが生じる。tRNA でよく見られる修飾ヌクレオチドでも、転写や翻訳、ヌクレオチド代謝等、様々な過程を阻害するものがある。従って、傷害 tRNA の処理の理解には、tRNA の分解機構と、分解産物である傷害・修飾ヌクレオチドの代謝の両面を、並行して解析する必要がある。

[1] Longo *et al.* (2012) *Cell Metab.* **16**:18.
 [2] Smeal *et al.* (1996) *Cell* **84**:633. [3] Aguilaniu *et al.* (2003) *Science* **299**:1751.
 [4] Spokoini *et al.* (2012) *Cell Rep.* **2**:738.
 [5] Phizicky & Hopper (2010) *Genes Dev.* **24**:1823. [6] Kabada *et al.* (2004) *Genes Dev.* **18**:1227. [7] Alexandrov *et al.* (2006) *Mol. Cell* **21**:87.

2. 研究の目的

本計画では、過去の RNA 研究では欠けていた分裂可能寿命(replicative life span: RLS)と言う新たな視点を加え、老化 tRNA の傷害の実体、分裂時における tRNA の非対称分配、tRNA の分解産物である修飾ヌクレオチドの処理、の 3 点に関し、以下 4 つの具体的目標を設定する。

【1】ストレスによって tRNA にどのような化学的傷害が蓄積するか検討する。

【2】温度感受性 tRNA 変異を分離し、不安定 tRNA の分解に基づく傷害・修飾ヌクレオチド代謝や、安定な機能不全 tRNA の翻訳系

からの隔離機構の解明のための解析系を構築する。

【3】古い母細胞と若い娘細胞で tRNA の細胞内分布に差があるか、即ち、tRNA の非対称分布があるかを検討する。

【4】tRNA の代謝に関わると考えられる tRNA の核-細胞質間輸送の機構について理解を深める。

3. 研究の方法

1) 酸化ストレス等で異常な tRNA 修飾が蓄積するか検討する目的で、8-oxoguanosine (8-oxo-G) を取り上げた[8]。8-oxo-G については、特異抗体が入手可能である。野生型酵母を、H₂O₂ 等の投与による酸化ストレス下で 0~4 時間培養し、各時間に採取した酵母より hot-phenol 法で RNA を回収した。この RNA 画分中の tRNA が酸化障害を受け、8-oxo-G を持つようになるかを North-Western blotting 解析で検討した。

2) 温度感受性(ts) tRNA 変異を取得し、一過的に tRNA 分解が起こる状況を作り出す。当初は tRNA-Trp^{CCA} の ts 株の取得を計画したが、より特徴的な修飾ヌクレオチドである 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine や N6-threonylcarbamoyladenine を含む tRNA-Lys^{UUU} も対象とする。まず、逐次的遺伝子欠失法によって、染色体上の tRNA-Trp^{CCA} もしくは tRNA-Lys^{UUU} 遺伝子を全て欠失し、その致死性がプラスミド上の各 tRNA 遺伝子で相補された株を構築した。error-prone PCR で構築した各 tRNA 遺伝子の変異ライブラリと plasmid shuffling を用いて ts 変異の単離を行った。Northern blotting 解析で、温度感受性に tRNA 量の低下した変異を選別した。

3) RLS 的に見て「古い」母細胞の分取法を至適化し、FISH 法等を用い、古い母細胞と新しい娘細胞の間で tRNA の分布に相違があるか調べるため、細胞表面をビオチン化した酵母の培養・回収法[9]と、娘細胞特異的な条件致死性変異を示す「MEP」株の 2 つの方法を試みた[10]。前者では、NHS-ビオチンによって酵母細胞壁表面に結合した mannoprotein を標識後、この細胞を YPD 中で 100 倍になるまで培養し、アビジン磁気ビーズを用いて標識酵母細胞を分取した。同じ操作を繰り返すことで、初期の細胞がおおよそ 16 世代分裂を繰り返した細胞を濃縮した。後者は、HO プロモータ依存に発現する変異型エストロゲン受容体-Cre recombinase 融合タンパク質が、娘細胞でかつ β-estradiol 存在下でのみ核に局在し、必須遺伝子中に挿入された loxP site を切断することでその娘細胞を殺し、母細胞のみの生存を可能にするというシステムである。MEP 株 UCC8773 または UCC8774 を YPD で培養後、様々な濃度の

β-estradiol で処理し、細胞の増殖をトレースすると共に、細胞当たりの出芽痕数を蛍光標識 WGA 染色で検討した。

4) tRNA の代謝に関わると考えられる tRNA の核—細胞質間輸送の機構について理解を深める目的で、既に tRNA の核内輸送に関わる事が判っていた Hsp70 型分子シャペロン Ssa2p について、tRNA と核膜孔タンパク質 (Nup) との同時相互作用の可能性を、「low affinity binding assay」 [11]を用いて検討した。Nsp1p、Nup100p および Nup116 の FG リピート領域を glutathione-S-transferase (GST) に融合した融合タンパク質、Ssa2p-His₆ は大腸菌 BL21(DE3)系株で発現させ、それぞれ glutathione-Sepharose または Ni-NTA- agarose で生成した。蛍光標識 tRNA は *in vitro* 転写した tRNA-ProUGG の 3'末端を Alexa488 hydrazide で標識した。glutathione-Sepharose に GST または GST-Nup を結合し、洗浄後、Alexa488 標識 tRNA-ProUGG を Ssa2p 存在下もしくは非存在下でインキュベート後、溶液およびビーズ表面の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した [12... 発表論文②]。

[8] Li *et al.* (2006) *IUBMB Life* **58**:581. [9] Smeal *et al.* (1996) *Cell* **84**:633. [10] Lindstorm & Gottschling (2009) *Genet.* **183**:413. [11] Patel & Rexach (2007) *Cell* **129**:83. [12] Takano *et al.* (2015) *eLife* **4**:e04659.

4. 研究成果

§1 酸化ストレス下で亢進する tRNA の 8-oxoguanosine 化

傷害 tRNA の動態を解析するには、そのような tRNA を人為的に蓄積し、かつ、それを簡便に検出する系が必要である。そこで本研究では、8-oxoguanosine (8-oxo-G) という核酸の酸化傷害修飾に着目した。過酸化水素で酵母の酸化ストレスを与えた時、8-oxo-G を持つ tRNA が蓄積するかを抗 8-oxo-G 抗体を用いた North-Western blotting での検出を試みたところ、シグナルとしては弱いながら、H₂O₂ 処理後時間依存に 8-oxo-G を含む

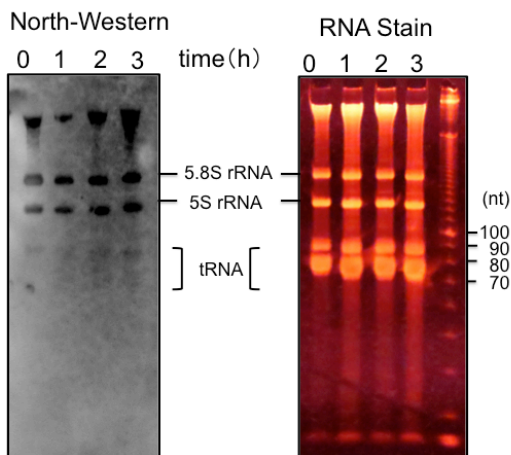


図1 8-oxo-G を含む tRNA の検出
tRNA が増えることが判った。また、泳動度

から主に傷害を受けている tRNA は、可変ループが他の isoacceptor より長い tRNA-Ser もしくは tRNA-Leu であることが示唆された (図1)。この際、低分子 rRNA である 5S rRNA や 5.8S rRNA には、通常の生育状態でも非常に多くの 8-oxo-G が含まれることも判った。そもそも、tRNA や rRNA 等には積極的に 8-oxo-G を形成する修飾化過程は知られておらず、通常時でも酸化障害を受けた低分子 RNA、特に rRNA が蓄積している事は以外であった。現在、この傷害 tRNA が何れの isodecoder に属す tRNA であるか、検討を進めている。

§2 温度感受性 tRNA-Lys_{UUU} 変異の取得

tRNA の急激な分解によってサイトゾルの修飾ヌクレオチドレベルが上昇することが引き起こす生理的影響や、その様な修飾ヌクレオチドの処理過程についての解析系を構築する目的で、比較的遺伝子数の多い isodecoder tRNA の温度感受性変異の取得を試みた。本研究でゲノム上に 6 つの重複遺伝子を持つ tRNA-Trp_{CCA} と、7 つの重複遺伝子をもつ tRNA-Lys_{UUU} を対象とした。前者は、1-methylguanosine や N²-methylguanosine 等の修飾ヌクレオチドを、後者はより特徴的な修飾ヌクレオチドである 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine や N⁶-threonylcarbamoyladenosine 等を含む [13]。前者についてはゲノム上の全ての遺伝子が欠失し、プラスミド上の野生型遺伝子で相補されている株を入手済みだが [14]、後者に関しては逐次的な遺伝子破壊によって同様の株を構築した。酵母の生育には、最低でも 1 つの tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子をゲノム上に要求するのに対し、tRNA-Lys_{UUU} では、2 つ以上の遺伝子が必要であることが判った。plasmid shuffling を利用したスクリーニングにより、tRNA-Lys_{UUU} のライブラリからは温度感受性変異が 2 種 (*ts1* [C7U]、*ts2* [A72U]) 単離された (図2)。両者とも許容

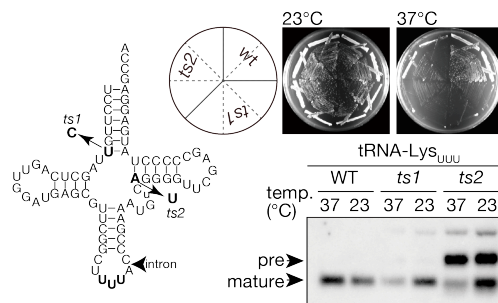


図2 温度感受性 tRNA-Lys_{UUU} 変異の単離

温度の 23°C では野生型並の成熟体 tRNA-Lys_{UUU} 量を示したが、37°C、2 時間の処理で野生株では tRNA-Lys_{UUU} の量が増加するのに、2 つの変異では極端に tRNA 量の低下が見られた。*ts2* 変異ではさらに、培養温度によらずイントロンを含んだ前駆体の顕著な蓄積が見られ、スプライシングにも欠損を示すことが判った。tRNA が一般に 2 時間以上の半減期を持つ事を考慮すると、*ts1*

変異を用いれば、制限温度へのシフトにより tRNA の分解が亢進した結果、tRNA-Lys^{UUU} 由来の修飾ヌクレオチドレベルの上昇した状態を作り出せると期待出来る。

§3 「老いた」酵母細胞の濃縮と tRNA 分布の FISH 解析

出芽酵母では細胞壁は娘細胞が成長する時期に形成されると基本的に更新されないことを利用し、細胞壁表面に結合した mannoprotein を NHS-ビオチンで標識した細胞を 10 世代以上培養したのち、アビジン結合磁気ビーズを用いて回収する方法が報告されている[9]。これを用いて、約 16 世代培養を行った細胞の回収を試みた。表面ビオチン化酵母のアビジンビーズによる回収効率に関してかなり詳細な条件検討を行い、全体で 0.1% 程度以下しか存在しない 10 回以上分裂を経た母細胞の比率を 10% 以上まで高めることができたものの、それ以上の濃縮はできなかった。また、娘細胞特異的に転写誘導される *HO* プロモーターを用いて毒性のあるタンパク質を発現する母細胞濃縮酵母株 [10] を用いた検討も行ったが、tRNA の FISH 観察に適した培地条件では報告されている娘細胞特異的な細胞死誘導効率が得られなかった。これらに加え、必要なビオチン化試薬や固定化アビジンの費用面からも、異常修飾等の tRNA の化学的構造に関する生化学的解析は断念せざるを得なかった。

他方、表面ビオチン化法によって回収した酵母についての FISH 解析では、出芽痕の数によって明らかに分裂寿命の進んだ酵母をより分けて観察することが可能であった。tRNA-ProuGG の分布比較では、こうした細胞と分裂直後の細胞が多数を占める通常の培養状態と大きな違いは見られなかった。現時点では、分裂寿命の若い細胞と寿命の進んだ細胞でははっきりと違いが検出できなかったが、後者の細胞が明らかに肥大していることなどから、翻訳に弱いストレスをかけ続けて分裂寿命を進めた場合などで tRNA 分布の違いが見られるか検討する必要があると考えられる。

§4 tRNA の細胞内分布に大きく寄与する tRNA 核内輸送機構の解析

成熟化後の tRNA はサイトゾルに留まって機能するのではなく、核と細胞質間を行き来すること、また、核内外の輸送のバランスは栄養状態などの生理条件で制御されていることが判っている[15, 16]。また、CCA 配列の欠失した tRNA などが積極的に核内に輸送されていること[15]、末端トリミングが異常となった tRNA 種の分解に核内輸送が関与すること[17]から、本研究の目的である傷害 tRNA の非対称分配の可能性の検討過程においても、その輸送機構の解明は重要な意味を持つ。既に、我々は新規 tRNA 結合タンパク質で、かつ、栄養飢餓時の tRNA の核内蓄積に関わる因子として酵母細胞質のメジャーな Hsp70 である Ssa2p[18] を同定、その

tRNA 結合様式に関して研究を進めていた。ここでは、Ssa2p が tRNA の核内輸送により直接的に関わるかについての生化学的解析を進めた。即ち、核—細胞質間輸送で必須となる tRNA の Nup との相互作用を Ssa2p が媒介するかを検討するため、蛍光標識 tRNA が Nup-GST 融合タンパク質を固定化したビーズに Ssa2p 依存に結合するかを蛍光顕微鏡下で観察する「low affinity binding assay」[11]を用いて解析した。その結果、まず Ssa2p は Nup116p といった特定の Nup と相互作用すること、この Nup116p を固定化したビーズに対して、蛍光標識 tRNA は Ssa2p の存在下でのみ結合することが明らかとなった(図 3)。以上の事から、Ssa2p は tRNA の核内輸

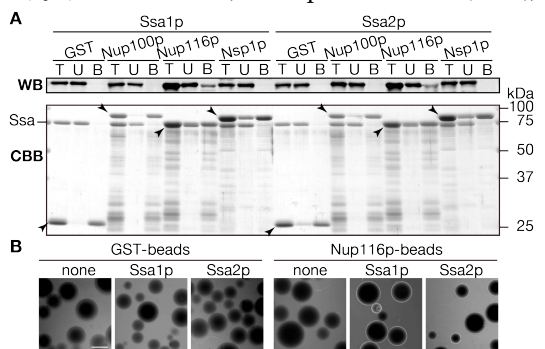


図 3 Ssa2p は、tRNA と Nup116p との 3 者複合体を形成する

送において輸送担体として機能することが明らかとなった。核内輸送の輸送担体として明らかになったのは Ssa2p が初めてであり、この発見によって tRNA の核外輸送 (Los1p や Msn5p といった輸送担体依存) と核内輸送 (Ssa2p 依存) の両方を総合して、tRNA の細胞内動態を理解する状況が整ったといえる。また、Ssa2p 依存の核内輸送経路は、アミノ酸飢餓時などストレス条件での tRNA の核内輸送亢進に貢献することも明らかとなった[15, 19...発表論文①]。現時点では、tRNA の娘細胞—母細胞間の不均等分配をサポートする直接的なデータは得られていない。tRNA の局在化因子の欠損変異において各種ストレス時の tRNA 分布を詳細に解析することで、期待された tRNA の非対称分配に繋がる糸口が見つかる可能性がある。

[13] Modomics, a database of RNA modification pathways. <http://modomics.genesilico.pl/> [14] Mori *et al.* (2011) *RNA* 17:1760. [15] Takano *et al.* (2015) *Science* 309:140. [16] Phizicky & Hopper (2015) *RNA* 21:483. [17] Kramer & Hopper (2013) *PNAS* 110:21042. [18] Werner-Washburne *et al.* (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:2568. [19] Yoshihisa (2015) *Nucleus* 6:339.

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. Yoshihisa. Nucleocytoplasmic shuttling of tRNAs and implication of the cytosolic Hsp70 system in tRNA import. **Nucleus**, 査読有, **6**, 2015, 339-343.
DOI: 10.1080/19491034.2015.1082696.
- ② A. Takano, T. Kajita, M. Mochizuki, T. Endo, T. Yoshihisa. Cytosolic Hsp70 and co-chaperones constitute a novel system for tRNA import into the nucleus. **eLife**, 査読有, **4**, 2015, e04659.
DOI: 10.7554/eLife.04659
- ③ T. Tsuboi, R. Yamazaki, R. Nobuta, K. Ikeuchi, S. Makino, Y. Ohtaki, Y. Suzuki, T. Yoshihisa, C. Trotta, T. Inada. The tRNA splicing endonuclease complex cleaves the mitochondria-located *CBP1* mRNA. **J. Biol. Chem.**, 査読有, **290**, 2015, 16021-16030.
DOI: 10.1074/jbc.M114.634592
- ④ N. Yamaoka, Y. Suemoto, T. Yoshihisa, S. Sonobe. Motion analysis and ultrastructural study of a colonial diatom, *Bacillaria paxillifer*. **Microscopy**, 査読有, **65**, 2016, in press.
DOI: 10.1093/jmicro/dfv375
- ⑤ T. Yoshihisa. Handling tRNA introns, archaeal way and eukaryotic way. **Frontiers Genet.**, 査読有, **5**, 2014, e00213.
DOI: 10.3389/fgene.2014.00213
- ⑥ J. Song, Y. Tamura, T. Yoshihisa, T. Endo. A novel route or an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex. **EMBO Rep.**, 査読有, **15**, 2014, 670-677.
DOI: 10.1002/embr.201338142

〔学会発表〕(計10件)

- ① 高野 晃、梶田 拓弥、望月 誠、遠藤 斗志也、吉久 徹：出芽酵母の主要な細胞質 Hsp70 である Ssa2p は、tRNA の核内輸送担体として働く：日本生化学会・日本分子生物学会合同大会：2015年12月1日～12月4日：神戸ポートアイランド(神戸市)
- ② Jiyao Song、田村 康、吉久 徹、遠藤 斗志也：Analysis of outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial protein：日本生化学会・日本分子生物学会合同大会：2015年12月1日～12月4日：神戸ポートアイランド(神戸市)
- ③ 姜 公秀、吉久 徹、阪口 雅郎：翻訳共役型タンパク質膜透過における翻訳後膜透過因子 Sec71 及び Sec72 の寄与：日本生化学会・日本分子生物学会合同大会：2015年12月1日～12月4日：神戸ポートアイランド(神戸市)
- ④ 吉久 徹、小林 小夏、佐藤 大典、稲田利文、遠藤 斗志也：酵母 *HAC1* mRNA の特異な翻訳制御と RNA 品質管理回避：日本

- 細胞生物学会：2015年6月30日～7月2日：タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- ⑤ 姜 公秀、吉久 徹、阪口 雅郎：翻訳共役型タンパク質膜透過における翻訳後膜透過因子 Sec71 及び Sec72 の寄与：日本細胞生物学会：2015年6月30日～7月2日：タワーホール船堀(東京都江戸川区)
 - ⑥ 山岡 望海、末友 靖隆、吉久 徹、園部 誠司：ケイソウの滑走運動：日本細胞生物学会：2015年6月30日～7月2日：タワーホール船堀(東京都江戸川区)
 - ⑦ 吉久 徹：tRNA の成熟化と細胞内動態：さきがけ「RNA と生体機能」第3回懇話会：2014年10月25日～10月26日：ラフォーレ倶楽部伊東温泉(伊東市)
 - ⑧ Jiyao Song、Yasushi Tamura、Tohru Yoshihisa、Toshiya Endo：A novel route or an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex.：日本生化学会第78回大会：2014年10月15日～10月18日：国立京都国際会館(京都市)
 - ⑨ 吉久 徹：出芽酵母における tRNA の細胞内動態とイントロン：酵母研究会第78回講演会(招待講演)：2014年8月7日：アサヒビール吹田工場(吹田市)
 - ⑩ 吉久 徹：私はどうやって tRNA の一生にたどり着いたか：シンポジウム「分子から生命へ」：2014年7月26日：京都大学(京都市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/bio/mecha/MolBioMech_Top/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉久 徹 (YOSHIHISA, Tohru)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：60212312

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし