

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840010

研究課題名(和文)熱ストレス下でのtRNA輸送機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of tRNA transport mechanism under heat stress

研究代表者

渡邊 和則 (WATANABE, Kazunori)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：70602027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：伸長tRNA (eMet)を細胞内でリアルタイムに観察するために次のことを行った。RNaseHに切断されることで効率良く蛍光を発するDNA/RNAハイブリッドの配列を明らかにした。また、eMetのターゲット部位を最適化することでモレキュラービーコンを用いて成熟したeMetの検出ができた。

tRNA顆粒と共同在する核内ストレス構造体を形成しているタンパク質をノックダウンすることでtRNA顆粒の形成が抑制されることが明らかになった。また、mammalian target of rapamycinがeMetの核内蓄積に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To investigate elongator tRNA (eMet) localization, we tried things written below. We revealed sequence of DNA/RNA hybrid which fluoresces by RNaseH digestion. Furthermore, molecular beacon (MB) optimized target site on eMet could detect mature eMet effectively. Formation of tRNA granules was inhibited by knockdown of proteins forming nuclear stress bodies. Nuclear stress bodies colocalized with tRNA granules. In addition, mammalian target of rapamycin is important to nuclear accumulation of eMet.

研究分野：生物学

キーワード：伸長tRNA tRNA顆粒 nuclear stress bodies リアルタイムイメージング

1. 研究開始当初の背景

生物は日常的に熱や紫外線といった様々なストレスに曝されている。これらストレスに対して生物はストレス応答を示すことで生存することができる。これまでに我々は新規の熱ストレス応答機構を明らかにしている。細胞を熱ストレスに曝すことで、伸長 tRNA^{Met} (eMet)は核内蓄積後に tRNA granules を形成し nuclear stress bodies (nSBs)と共局在する。しかしながら、eMet の核内蓄積及び、nSBs への局在が細胞質から核内移行によるものか明らかになっていない。また熱ストレスによる核内・nSBs へ tRNA を輸送するタンパク質も明らかになっていない。

2. 研究の目的

本課題では、熱ストレスによる tRNA の核内蓄積機構を明らかにするために【eMet の細胞内での動きをリアルタイムに観察するための手法を開発し、eMet の核内、nSBs への移行を追跡する】、【tRNA の核内・nSBs への輸送タンパク質を同定する】ことを目的とした。

3. 研究の方法

eMet の局在をリアルタイムに観察するために、蛍光基と消光基を持った DNA/RNA ハリブリッド(DRhetero)を調製し、RNaseH による切断で DRhetero が効率良く蛍光を発する DRhetero の配列の同定を試みた。また、DRhetero の解析と並行してモレキュラービーコンを用いて eMet のターゲット部位を変化させていくことで eMet を検出することができるか蛍光スペクトルメーターを用いて試験管内で実験を行った。

核内・nSBs への tRNA の輸送タンパク質を同定するために、nSBs 構成タンパク

質をノックダウンすることで、tRNA の核内蓄積及び、tRNA 顆粒の形成が抑制されるか蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法と免疫染色法を用いて明らかにしようとした。また、nSBs 構成タンパク質をノックダウンすることで細胞毒性への影響を LDH アッセイを用いて検討した。

4. 研究成果

様々な配列のDRheteroを調製し、どの配列のDRheteroがRNaseHに切断されることで蛍光の上昇率が高いのか検討したところ、末端構造が突出しており、DNA-RNA領域が6塩基以上あれば良いことが明らかになった。また、効率良く切断する配列も明らかになった。

モレキュラービーコンを用いてeMetを検出するために、eMetのターゲット部位を検討した。その結果、eMetの3'端をモレキュラービーコンのターゲット部位にすることで、eMetを効率良く検出することができた。また、細胞から抽出してきた成熟eMetの検出も可能であることが明らかになった。このことから、モレキュラービーコンを用いることで細胞内のeMetの局在変化を追跡することができると考えられる。

tRNA顆粒と共局在するnSBs構成タンパク質をノックダウンしていくことで、tRNA顆粒の形成及びnSBsの形成が抑制されることが明らかになった。また、mammalian target of rapamycinをノックダウンすることでtRNAの核内蓄積及びtRNA顆粒の形成が抑制されることから、mammalian target of rapamycinが熱ストレスによるtRNAの核内移行、及び顆粒形成に重要であることが明らかになった。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

(1) 岡田真実、渡邊和則、大槻高史
tRNA granules 形成因子の同定の試み”
RNA フロンティアミーティング、2015
年 12 月、山形県・山形市

(2) 三好祐一、渡邊和則、樫田啓、浅沼
浩之、大槻高史
“Molecular Beacon による tRNA の検出”
日本化学会中四国支部大会、2015 年 11
月、岡山県・岡山市

(3) 三好祐一、渡邊和則、樫田啓、浅沼
浩之、大槻高史
“DNA/RNA ハイブリッドを用いた低分子
RNA 追跡法の開発”
バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9
月、熊本県・熊本市

(4) 梅本裕介、高橋昭久、井尻憲一、大槻
高史、渡邊和則
“温熱による細胞周期に依存した翻訳抑
制機構の解明”
ハイパーサーミア学会、2015 年 9 月、大
阪府・大阪市

(5) 渡邊和則、梅本裕介、高橋昭久、井
尻憲一、大槻高史
“熱ストレスによる開始 tRNA^{Met} は細胞周
期に依存して分解促進している”
日本 RNA 学会、2015 年 7 月、北海道・
札幌市

(6) 三好祐一、渡邊和則、樫田啓、浅沼
浩之、大槻高史
“Molecular Beacon を用いた tRNA 検出法
の設計”
日本 RNA 学会、2015 年 7 月、北海道・
札幌市

(7) 山本理紗子、大槻高史、渡邊和則
“tRNA 顆粒形成要因タンパク質同定の
試み”

日本分子生物学会、2014 年 11 月、神奈
川県・横浜市

(8) 渡邊和則、井尻憲一、大槻高史
“熱ストレス下では、mTOR は Xrn2 の核
小体から核質への拡散を介して開始
tRNA^{Met} の分解促進を制御している。”
日本分子生物学会、2014 年 11 月、神奈
川県・横浜市

(9) 渡邊和則、三好祐一、佐藤奈央子、
森本一弘、樫田啓、浅沼浩之、大槻高史
“細胞内で蛍光を発する低分子 RNA 追跡
ツールの設計”
バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9
月、岡山県・岡山市

(10) 渡邊和則、井尻憲一、大槻高史
“mTOR が熱ストレスによる開始 tRNA^{Met}
の分解促進を制御している”
日本 RNA 学会、2014 年 7 月、愛知県・
名古屋市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 和則 (WATANABE, Kazunori)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：70602027

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：