

# 研 究 報 告 書(公開)

## 「細胞質の機能 RNA・RNP の品質管理機構」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：吉久 徹

### 1. 研究のねらい

細胞内には、rRNA、tRNA や miRNA など、多様な機能をもった non-coding RNA が存在する。また、多くの機能性 RNA はタンパク質との複合体(RNP)として機能単位を形成する。こうした RNA の誕生から死までは、厳密に制御されなくてはならない。我々は近年、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、古典的 non-coding RNA の一つ tRNA のスプライシングが核内ではなく細胞質で起こること、そして、それまで細胞質に留まって働くとされてきた tRNA が核と細胞質間を往復しつつ機能していることを明らかにし、tRNA の一生におけるそれまでの細胞内動態像を大きく書き換えた。一方、tRNA は生合成時に加え、こうした細胞内動態の各局面で適切に品質管理を受けることが示唆されている。本課題では、tRNA を中心に細胞質の non-coding RNA の一生の様々な段階における細胞内動態のメカニズムと、品質管理の仕組みを明らかにすることをねらう。

本研究では、翻訳関連のタンパク質因子と相互作用しつつ、単独の分子としても存在する tRNA、細胞質スプライシングで切り出された後に速やかに分解される tRNA 等のイントロンといった安定性、存在状態の異なる種類の RNA を取り上げた。そして、それらが一生の間にどのような細胞内動態を示し、これに伴って細胞の各所でどのように品質管理・分解を受けるかを明らかにすることを主眼に、tRNA の核内輸送システムおよび不安定な tRNA や不要な tRNA のイントロンを処理するシステムの解明を目指した。同時に、こうした細胞内動態解析に必要なとされるあらたな低分子 RNA の検出・可視化技術に関しても取り組んだ。

### 2. 研究成果

#### § 1 tRNA 核内輸送システムの解析

tRNA の核-細胞質間ダイナミクスに関わる因子を同定し、その tRNA の品質管理への関与を明らかにする目的で、酵母サイトゾルに存在する新規 tRNA 結合タンパク質を同定し、さらにその中から tRNA 核内輸送関連因子を抽出する作業の中で、サイトゾルの主要な Hsp70 の一つである Ssa2p を同定した。Hsp70 は、アンフォールドしたタンパク質に結合、ATP 依存にこれを解離することによって、そのようなタンパク質の凝集を防ぎ、フォルディングやオルガネラ膜の膜透過を助ける分子シャペロンである。

出芽酵母には Ssa サブファミリーに属する Hsp70 として Ssa1p～Ssa4p の 4 種類が存在し、このうち恒常的に発現している Ssa1p と Ssa2p はアミノ酸配列の相同性も高く、機能的には大きな差が無いと予想されていた。そこで、これら SSA 遺伝子欠失変異の tRNA の細胞内局在に対する影響を Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で解析した。核内輸送への影響は、アミノ酸等の栄養源飢餓下で見られる tRNA の核内輸送亢進が低減するという表現形で解析できる。FISH 解析により、アミノ酸飢餓条件下で見られる tRNA の核内輸送の亢進が、野生型に比べ、*ssa1Δ* 株と *ssa2Δ* 株、特に後者では顕著に低下することを見出し、酵母では、主に Ssa2p がこの条件下 tRNA の核内輸送に関わることが示された。

米国の Anita Hopper らのグループは、この経路に関わる因子として importin β ファミリーに属する Mtr10p を同定していた。我々の明らかにした Ssa2p が Mtr10p と同じ経路で機能するのか、並行した経路で機能するのかを検討するため、染色体上の *MTR10* 遺伝子のプロモーターを抑制可能な *GAL7* プロモーターに置き換えた knockdown (KD) 株を構築し、SSA2 単独欠失株、*mtr10-KD* 株、*ssa2Δ mtr10-KD* 二重変異株の栄養飢餓条件下での tRNA の挙動を解析した。その結果、二重変異株では明らかに他の単独変異株より強い tRNA の蓄積障害を示し、Ssa2p が Mtr10p と並行した経路の因子であることが示唆された。

前述のようにtRNAの核内輸送を担う因子として、Mtr10pに加えて、新たに、Ssa2pが同定されたが、これらの因子が直接tRNAを結合してtRNAの輸送担体として機能しているかに関しては、直接の証拠は得られていなかった。そこで、我々はSsa1pおよびSsa2pの組換えタンパク質がtRNAの結合能を有するかをラベル転位アッセイで検討し、Ssa2pそしてSsa1pがtRNAと直接結合することを明らかにした。この結合はATPに感受性である一方、Hsp70の本来の基質である変性タンパク質とは競合しなかった。Ssa2pをはじめとするHsp70ファミリーのタンパク質は、一次構造上、N末端から、ヌクレオチド結合領域(NBD)、基質結合領域(SBD)、C末端可変領域(CVD)からなるが、上記の結果は、tRNAがSBDではなくNBDで認識される可能性を示唆している。

実際に、ドメイン毎にGST融合タンパク質として単離し、ラベル転位アッセイを行ったところ、Ssa1pおよびSsa2pのNBDのみでtRNAと直接結合することが明らかとなった。Ssaタンパク質のATPase活性はYdj1pやSis1pといったDnaJ/Hsp40タイプのコシャペロンで活性化されることが知られているが、この活性化を受けにくくなるLys<sup>69</sup>Gln変異あるいはGly<sup>199</sup>Asp変異をもつSsa2p-NBDのうち、後者のみでtRNAの結合能が下がることがわかった。以上のことから、Ssa2pによるtRNAの認識は、Ssa2pのNBD、とくに、ATP認識溝が関わることを示された。

このように、コシャペロンの影響を左右するSsaタンパク質上のアミノ酸残基がtRNAの結合にも関わっていたことから、サイトゾルのDnaJ/Hsp40タイプのコシャペロンが*in vivo*でtRNAの核内輸送に関わるかを検討した。前述のYdj1pの欠失変異、および、Sis1pの温度感受性変異を栄養飢餓条件に曝した際のtRNAの細胞内局在をFISH法で解析したところ、tRNAの核内蓄積がほとんど見られなかった。これらのことから、tRNAの核内への輸送には、SsaタイプのHsp70に加え、そのHsp40型コシャペロンであるYdj1p、Sis1pも関わることを明らかとなった。

## §2 tRNAの細胞内動態と品質管理との関係

異常もしくは不良tRNAの品質管理には、核内の複数のRNA分解システムが関わることを報告されている。特に、成熟化途上のtRNAについては核内の3'-5' exonuclease複合体であるexosomeが、既に成熟化の終了したtRNAに関してはRat1pやRex1pといったやはり核内にあるexonucleaseの関与が知られている。そこで、異常tRNAとtRNAの輸送システムとの間の関係について遺伝学的な解析を行った。

まず我々は、tRNA-Met<sub>initiator</sub>のA<sup>58</sup>位のメチル化不全によりこのtRNAが不安定化するCCGの高次構造形成異常を引き起こす塩基置換変異los1Δ)と合成生育阻害を示すことを見出した。実際、*trm6-504 LOS1-KD*株を構築してLos1pの発現を抑えるとtRNA-Met<sub>initiator</sub>の量がlos1Δ二重変異を抑圧せず、生合成初期の品質管理をエスケープできたA<sup>58</sup>未修飾tRNA-Met<sub>initiator</sub>は、核内に再度入っても先の品質管理システムに認識されない可能性が示唆された。

## §3 tRNAイントロンの分解システムの解析

出芽酵母においては、イントロンを含む前駆体tRNAは細胞質に運ばれてからスプライシングを受ける。スプライシング部位はミトコンドリア外膜のサイトゾル表面に存在するtRNA splicing endonuclease複合体によって切断され、エクソン同士がtRNA ligaseによって結合さ

れると安定な成熟体 tRNA 分子へと導かれるが、切り出されたイントロンは速やかに分解される。そこで、この効率的なイントロン分解を担う因子の同定を目指した。

現在、酵母のゲノム上には RNA 分解に関わると考えられるタンパク質をコードする遺伝子として 65 の遺伝子がデータベース上に登録されている。我々は、これらの遺伝子の欠失株または KD 株中で tRNA のイントロンが蓄積するかを網羅的にノザンプロットングで解析したが、tRNA のイントロンが蓄積する株は見出せなかった。しかし、次に述べるように、tRNA のイントロン自身ではないが、同様に細胞質スプライシングを受ける mRNA より切り出されるイントロンの挙動に関して偶然得られた情報から、tRNA のイントロンの分解に関わる RNA 分解系を推定するきっかけを得ることができた。

小胞体ストレス応答の鍵転写因子である Hac1p は、イントロンを含んだ前駆体 mRNA (*HAC1<sup>p</sup>* mRNA) の状態で細胞質に運ばれ、小胞体ストレスがあるときのみスプライシングと共役してタンパク質が合成される。通常、*HAC1<sup>p</sup>* mRNA はポリソーム上で休眠状態にあり、この翻訳停止には *HAC1<sup>p</sup>* mRNA の 5' UTR とイントロンとの間の相補対形成が関わることで、翻訳再開にはスプライシングが必要であり、そのスプライシングは tRNA ligase が関わるということがわかってきた。しかし、その翻訳再開機構の詳細や、切り出されたイントロンの速やかな分解機構は明らかでなかった。

本研究は、出芽酵母の tRNA ligase 遺伝子 (*RLG1*) を他の生物種の *RLG1* で代替する実験を行う中で、シロイヌナズナ由来の *RLG1* (*AtRLG1*) で代替すると、小胞体ストレス下における *HAC1<sup>p</sup>* mRNA のスプライシングは正常に起こるが、その翻訳再開ができなくなることを見出した。詳細な解析の結果、この株では *HAC1* のイントロンが蓄積していること、*HAC1* イントロンはポリソームから遊離せず、切断後も *HAC1* 成熟体 mRNA の翻訳抑制状態を保つことが示された。おもしろいことに、*AtRLG1* 発現株では、蓄積したイントロンは環化しており、これが分解を妨げている原因の一つであった。これらのことから、tRNA ligase は *HAC1* イントロンの分解機構への引き渡しに関わることが示唆され、このイントロンの分解は主として exonuclease が担うことが明らかとなった。

この結果は、tRNA のイントロンが同様に Rlg1p 依存に分解系に引き渡され、exonucleolytic に分解されることを示唆している。事実、我々は、*AtRLG1* 株では tRNA のイントロンが蓄積しており、少なくとも、最も長い tRNA イントロンである tRNA-Ile<sub>U<sup>U</sup>AU</sub> のイントロンはこの株中で環化していることを見出した。また、出芽酵母自身の *RLG1* 遺伝子の温度感受性変異を多数取得したところ、allele によって tRNA イントロンの蓄積するものが見られ、tRNA ligase の特定の領域がイントロン分解に関与することが示唆された。

さらに、細胞質のメジャーな exonuclease に着目して解析を進めたところ、各々単独の欠失では tRNA のイントロンの蓄積を示さなかったサイトゾルの 3'-5' exonuclease 複合体 exosome の機能欠損変異 *ski2* と 5'-3' exonuclease の変異 *xrn1* の二重変異 (*ski2Δ xrn1-KD*) では、tRNA イントロンの蓄積が見られることがわかった。

以上のことから、現在、スプライシングで切り出された tRNA のイントロンは、5'-3'、3'-5' 両方の exonuclease によって分解されるものの、そうした分解系への橋渡しにはスプライシング酵素である Rlg1p が関与するといったモデルを考えている。ただし、tRNA イントロンの分解に関しては、*ski2Δ xrn1-KD* 二重変異の効果は必ずしも大きくなく、他の exonuclease が関与する可能性が十分あり、さらに検討を続けている。

#### § 4 Malachite Green aptamer の RNA 検出・可視化タグとしての検討

tRNA の前駆体やイントロンのような低分子 RNA の検出法としては、一般に相補的なオリゴヌクレオチドを利用したハイブリダイゼーション法が用いられるが、タンパク質における GFP のように、より簡便、かつ、できれば生細胞中でも使うことのできる検出法が望まれている。部位特異的な分子不活性化手段として開発された Malachite Green (MG) / malachite green aptamer 複合体は、その元となる MG および MG aptamer が非蛍光であるにも関わらず、蛍光を発することが知られていた。そこで、このシステムが生体内で発現する RNA に適応可能か検討した。



まず、酵母tRNA-Ile<sub>UAU</sub>のイントロンが長いことを利用し、その一部をMG aptamerと入れ替えた変異tRNA遺伝子を構築した。*in vitro*で転写した変異tRNA-Ile<sub>UAU</sub>前駆体は、urea-PAGE・MG染色後に蛍光スキャナーを用いて特異的に検出できることがわかった。この遺伝子を酵母に導入し、生細胞をMG存在下で培養、tRNA前駆体の可視化が可能かを検討したが、残念ながら他のDNAやRNAなどの核酸への弱いintercalation活性によって生じるとされるバックグラウンドのため、特異的可視化には至らなかった。

他方、先のゲル電気泳動と蛍光スキャナーによる検出法を用いると、全 RNA 画分を泳動しても当該の変異 tRNA 前駆体の特異的に検出されること、また、イントロンの切り出しに異常を来す *sen2* 変異株やイントロンの蓄積が見られる *AtRLG1* 発現株より調整した RNA 画分では、MG aptamer を融合した tRNA の前駆体やイントロンが予想通り蓄積しており、本 aptamer が生体内での RNA の成熟化過程を容易に解析するためのタグとしては利用可能であることがわかった。

### 3. 今後の展開

本研究で、tRNA の細胞内動態に関して新たな因子(Ssa2p)を発見し、また、核-細胞質間の特定のtRNA輸送活性がtRNAの品質管理に影響を及ぼするという事を明らかにすることができたが、まだ、その詳細な分子機構に関しては不明な点が多い。特に Ssa2p と tRNA がどのような様式で結合しているかに関しては、構造生物学的な解析が必要である。他方、核-細胞質間輸送において、新規に合成された tRNA と細胞質から輸送され再び核外へ輸送される tRNA がどのように仕分けられているのか、細胞質において tRNA の異常を直接見分けている分子は何で、どのような tRNA の性質が〈正常〉と〈異常〉の識別点となっているのかなど、明らかにするべき点は残っており、今後明らかにしていきたい。

また、細胞質スプライシングで切り出されるイントロンの分解系が、endonuclease 活性をそれほど必要とせず、複数の exonuclease に依存していることを明らかにすることが出来たが、その分解が全て細胞質で行われているのか、核に逆輸送されて分解されるようなプールは無いのか、といった点での疑問には、現在進めている網羅的な多重 RNase 欠損変異の解析で答えていく必要があるだろう。

さらに、本研究で tRNA 前駆体の特異的に検出するためのタグとしての MG aptamer の有効性は明らかとなったが、生細胞中での可視化には不向きであることがわかった。今後は、有機化学の専門家と協力することで、MGの誘導体の中で通常の核酸二重鎖に intercalation することなく、それを特異的に結合する aptamer 中では蛍光を発するコンフォーメーションを取り得るような化合物の合成と、それに対応した aptamer の開発を通じて生細胞中での可視化タグの実現に向けて取り組む必要がある。

### 4. 自己評価

現時点で、tRNA の核内輸送に関する研究については、所期の成果は得られたものと思われる。細胞質スプライシングで生じるイントロンの分解システムについては、tRNA のイントロンの分解システムの一部を明らかにすることはできたものの、多数の因子が共同して働く可能性が示され、その全体像に迫るためには前述のようにシステマティックな多重変異解析を進めていく必要がある。新規な RNA の可視化技術の開発に関しては、結果としては可視化にはいたらなかったが、特定の RNA を簡便に検出する手法として応用可能な技術であることを実証し得た点は、一定の評価ができると思われる。本研究で実験事実としては明らかになったが、現在、論文を投稿中または執筆中のものがある。今後速やかに論文が発表されるように努めると共に、その成果をもとに、さらに細胞質の機能性 RNA の品質管理へのより深い理解につなげていくべきと考える。

### 5. 研究総括の見解

細胞質に留まると考えられてきた tRNA が、実は核と細胞質の間を行き来しており、こうした細胞内動態の各局面で適切に品質管理を受けることが示唆されている。本研究では、tRNAを中心に細胞質 non-coding RNA の細胞内動態メカニズムと品質管理の仕組みの解明を目指した。tRNA の核内輸送に、Ssa タイプの Hsp70 と Hsp40 型コシャペロンである Ydj1p, Sis1p が関わることを明らかにし、また、細胞質スプライシングで生じるイントロンの分解システムには多数の因子が共同して働く可能性を示した。細胞質の機能性 RNA の品質管理に対するより深い理解に繋がる成果である。今後は、これまでの結果を踏まえ、これらの過程の全体像を明らかにすることが望まれる。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Mori, T., Ogasawara, C., Inada, T., Englert, M., Beier, H., Takezawa, M., Endo, T., and <u>Yoshihisa, T.</u> Dual Functions of Yeast tRNA Ligase in the Unfolded Protein Response: Unconventional Cytoplasmic Splicing of HAC1 Pre-mRNA Is Not Sufficient to Release Translational Attenuation. <i>Mol. Biol. Cell</i> , <b>21</b> , 3722–3734 (2010)
2. Yamamoto, H., Fukui, K., Takahashi, H., Kitamura, S., Shiota, H., Terao, K., Uchida, M., Esaki, M., Nishikawa, S., <u>Yoshihisa, T.</u> , Yamano, Y., and Endo, T. Roles of TOM70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins. <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>284</b> , 31635–31646 (2009)

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Endo, T., Yamano, K., and <u>Yoshihisa, T.</u> Mitochondria matrix reloaded with RNA. <i>Cell</i> , <b>142</b> , 362–363 (2010)
2. <u>吉久 徹</u> : tRNAの「ダイナミクス」、蛋白質核酸酵素増刊号vol. 54, 「mRNAプログラム-多様性と非対称性の獲得戦略」(稲田利文, 大野睦人編), pp. 2121–2126, 共立出版 (2009)
3. <u>吉久徹</u> : RNAの取扱い方-電気泳動, pp. 47–53, RNA実験ノート(稲田利文, 塩見春彦編), 羊土社 (2008)
4. <u>吉久徹</u> : RNAの解析-whole mount <i>in situ</i> hybridization 3) 酵母, pp. 89–95, RNA実験ノート(稲田利文, 塩見春彦編), 羊土社 (2008)
5. <u>Yoshihisa, T.</u> , Mori, T., Ogasawara, C., Takezawa, M., Englert, M., Beier, H., Inada, T. and Endo, T. Translational regulation of <i>HAC1</i> mRNA, of which translational stall is essential for its unconventional cytoplasmic splicing in budding yeast. The 19th CDM Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology. 神戸(2010年5月10日～12日)