

「出芽酵母を用いた tRNA 機能におけるイントロンの生理的意義の解析」

兵庫県立大学生命理学研究科

吉久 徹

1 研究の背景と目的

真核生物では、タンパク質合成に必要な tRNA を供給するため、多数の同義 tRNA 遺伝子がゲノム上に散在する。tRNA 遺伝子の一部はイントロンを持つが、選択的スプライシングの無い tRNA では、イントロンが特定の tRNA 遺伝子内に維持される理由は不明である。我々は、tRNA のイントロンが真核生物に必須かを問う目的で、出芽酵母が有する含イントロン遺伝子にコードされた 10 種類の isodecoder tRNA (同じアンチコドンを持つ tRNA) のうち、tRNA-Trp^{CCA} (アンチコドンが CCA で、Trp をデコードする tRNA) の全同義遺伝子からイントロンを除いた酵母株を構築し、これらが生育可能であることを見出した (Mori *et al.*, 2011, *RNA*, 17:1760)。我々はこれをさらに推し進め、上記 10 種類全てに関して isodecoder tRNA 毎に全同義遺伝子からイントロンを除いた株を構築することに成功した。前述の tRNA-Trp^{CCA} 等多くのイントロン欠失株は野生株同様の生育を示したが、tRNA-Tyr^{GUA}、tRNA-Leu^{CAA}、tRNA-Phe^{GAA} の 3 つのイントロン欠失株では生育が悪化し、tRNA の発現やタンパク質合成に影響が出ている可能性が示された。本計画では、イントロン欠失酵母における tRNA の量的解析とその機能である翻訳の解析を通じ、真核ゲノムが tRNA のイントロンを保持する意義の解明を目指す。tRNA は以前より詳しく解析されてきたが、前述の様に真核生物の tRNA は多数の同義遺伝子にコードされるため、逆遺伝学による *in vivo* 機能解析例は限られていた。本計画は、我々が進めてきた酵母ゲノムの逐次多重改変による tRNA イントロン欠失化プロジェクトの成果を利用し、tRNA 遺伝子に含まれるイントロンの生理的意義を正面から調べようという、オーソドックスだが今まで誰も挑まなかった計画である。

2 研究方法・研究内容

tRNA 等の検出法) tRNA-Tyr^{GUA}、tRNA-Leu^{CAA}、tRNA-Phe^{GAA} 等もともとイントロンを含む isodecoder tRNA の全イントロン欠失株中でのこれら tRNA の存在状態について発現量、アミノアシル化修飾状態をノザンプロットティングによって解析した。通常は 4 M チオシアン酸グアニジンを用いた熱フェノール法で粗低分子 RNA 画分を酵母から回収し、Tris-ホウ酸系バッファーを用いた urea-PAGE で低分子 RNA を展開したが、アミノアシル化状態の解析では、tRNA のアミノアシル基を維持するため、pH 4.5 の酸性フェノールを用いた RNA 調製法、および、0.10 N NaOAc, pH 5.0 の酸性条件下の urea-PAGE 法を採用した。urea-PAGE で展開した低分子 RNA は荷電性ナイロン膜に電気泳動的に転写後、DIG 標識プローブを用いたノザンハイブリダイゼーションで特定の isodecoder tRNA や 5.8S rRNA を検出した。

新規 tRNA 検出法の開発) 同じアミノ酸をチャージするが認識するコドンが異なる tRNA (isoacceptor tRNA) 間の tRNA 量比の解析のため、tRNA の絶対定量法の開発を行った。tRNA の 3'末端部分に特異的 DNA プローブをハイブリダイズさせ、DNA ポリメラーゼ (exonuclease 欠損 Klenow fragment) を用いて DNA プローブを鋳型に tRNA をプライマーにして tRNA の 3'末端よりの伸長反応を行わせ、蛍光標識ヌクレオチド (tetramethylrhodamine-dUTP) を取り込ませることで、特定の tRNA 種を蛍光標識する条件を至適化した。標識 tRNA の検出は urea-PAGE 後の蛍光イメージスキャナーで、標識効率の確認は tRNA にその対するプローブを用いたノザンプロットティングで行った。核小体の観察) 核小体の観察は、核小体マーカータンパク質である Nop1 に対する抗体を

用いた蛍光抗体法で行った。YPD 中で対数増殖期まで培養した野生株およびイントロン欠失株をホルムアルデヒドで固定し、細胞壁を Zymolyase 100T 処理で消化後、Triton-X100 により生体膜の透過障壁を破壊し、抗 Nop1 抗体および ER・核膜マーカーである抗 Kar2 抗体で染色した。Alexa488 および Cy3 標識 2 次抗体で各 1 次抗体を可視化すると共に、DAPI 染色で染色体 DNA を染色、CSU-10 共焦点システム用いて z 軸に沿った光学切片を取得、核の染色体領域および核小体領域の形態を解析した。

ポリソーム解析) 出芽酵母を YPD 中、30°C または 23°C で対数増殖期まで培養し、細胞を液体窒素中で乳鉢と乳棒で粉碎した。これを Lysis Buffer で抽出し、10,000 rpm、4°C、10 min の遠心の上清を 10-50%w/v ショ糖密度勾配に上層し、100,000×g、4°C、3.0 h の遠心で分離、A₂₆₀ をモニタしながら画分を分取した。

3 研究成果

3-1 イントロン欠失株の tRNA

まずは、各イントロン欠失株で遺伝子改変を施した tRNA の発現量をノザンブロットティングで検討した。定量分析によって、tRNA-Ile^{UAU}、tRNA-Tyr^{GUA}、tRNA-Leu^{CAA}、tRNA-Pro^{UGG} のイントロン欠失株では野生型より 20~35%程度、各々の tRNA が減っていることが分かった。tRNA-Tyr^{GUA}、tRNA-Leu^{CAA} の生育悪化は tRNA 量の減少による可能性もある。他方、tRNA は 3'末端のアミノアシル基として対応するアミノ酸をリボソームのペプチド転移中心に提示するが、このアミノアシル化状態を酸性 urea-PAGE で検討した。基本的にイントロン欠失遺伝子から転写された tRNA は 10 種類とも、野生型並のアミノアシル化状態であった (図 1)。すなわち tRNA 遺伝子中のイントロンは tRNA の発現レベルに影響する事はあるが、機能上重要なアミノアシル化レベルには大きな影響を与えないことが分かった。tRNA-Ile^{UAU} や tRNA-Leu^{CAA} では、コドンの認識に重要なアンチコドン部分に pseudouridine (Ψ) 化や 2'-O-methyl 化を施す酵素がイントロンを含んだ前駆体 tRNA のみを認識することが知られている。事実、我々は東京大学大学院工学系研究科・鈴木勉博士の研究室との共同研究で、tRNA-Ile^{UAU} の Ψ 化がイントロン欠失株では起きていないことを突き止めている。しかしながら、上記の結果から、こうした修飾はおそらくそれら tRNA の定常状態でのアミノアシル化には大きな影響を与えないと考えられる。他方、tRNA の発現量に影響がでるものがあったことは、tRNA が内在性のプロモーターエレメント (A box および B box) を持つが、イントロンはその間の距離を変えることから、転写レベルの影響である可能性が考えられる。ただし、この点に関しては今後、ChIP 解析などで実際の転写レベルを検討する必要がある。

3-2 5.8S rRNA の現象と核小体異常

こうした解析の中で、我々は tRNA-Leu^{CAA} と tRNA-Phe^{GAA} とでは、5.8S rRNA の量が野生株や他のイントロン欠失株に比べ約 20%低下していることを見出した。rRNA の転写、成熟化、新生リボソームの組立は核小体で

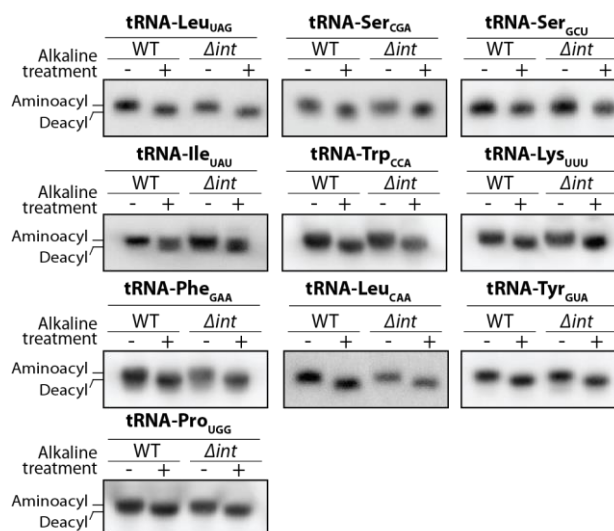


図 1 イントロン欠失株中での各tRNAのアミノアシル化状態

進行するが出芽酵母では、tRNA 遺伝子も核小体近傍に集積しており、さらには、初期の tRNA 前駆体成熟化因子 RNase P が核小体に局在することも報告されている。こうしたことから、比較的同義遺伝子数の多い tRNA-Leu_{CAA} や tRNA-Phe_{GAA} のイントロン欠失が、直接核小体の機能や形態に影響を与えている可能性が示唆された。これを検討するために野生型および各イントロン欠失株の核小体形態を、核小体マーカータンパク質である Nop1 の蛍光抗体法を用いて検討した (図 2A)。興味深いことに、tRNA-Leu_{CAA} イントロン欠失株では、図 2 に示すように通常は丸い核の片側約 1/3 程度をお椀状に占めている核小体が、むしろ核からはみ出すような異常な形態の核小体が顕著に増え

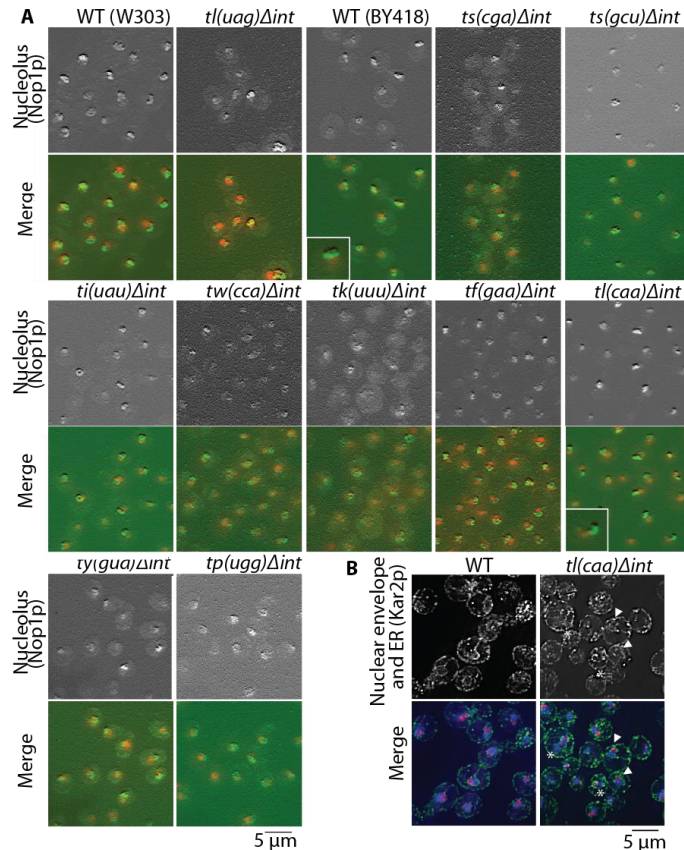


図2 イントロン欠失の核小体形態への影響

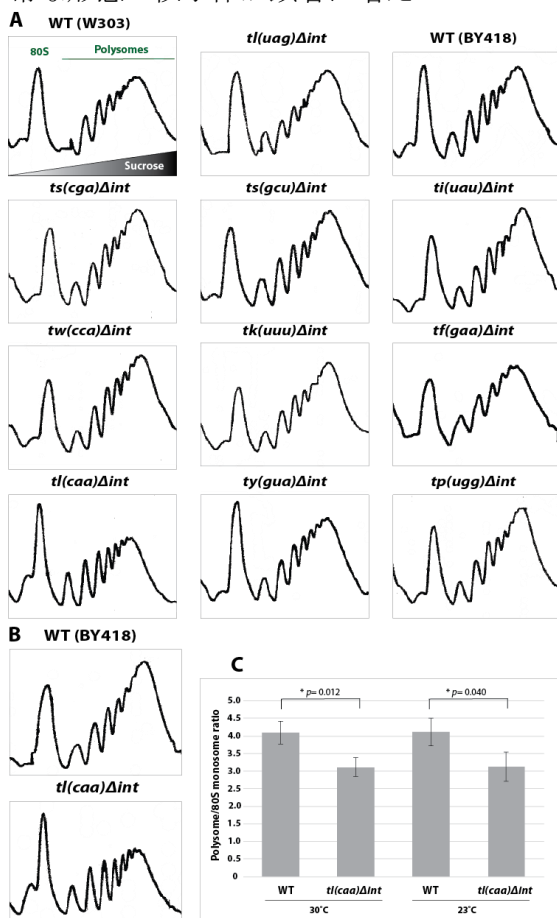


図3 イントロン欠失株のポリソーム解析

ていた (図 2B)。tRNA 遺伝子のイントロンの有無によってそれらの存在するクロマチン領域が影響され、結果として核小体の構造に影響が出ている可能性があり、その原因に関して現在、研究を進めている。

3-3 イントロン欠失の翻訳への影響

さらにイントロン欠失が tRNA-Leu_{CAA} 等の生育に及ぼす影響は、直接 tRNA の機能を介すにせよ、rRNA の成熟過程を介すにせよグローバルな翻訳への影響から来ると考えられる。これを検討するために、細胞内でリボソームがどれほど mRNA に結合しているかをショ糖密度勾配遠心で調べるポリソーム解析を行った。図 3A にその典型例を示すが、tRNA-Leu_{CAA} と tRNA-Tyr_{GUA} の二つのイントロン欠失株のみ、ポリソームに対する 80S モノソームの比率の低下が見られた。A₂₆₀ の沈降パターンを野生型と tRNA-Leu_{CAA} イントロン欠失株で直接比べられるように並べたのが図 3B だが、このイントロン欠失株ではモノソームが多いことに加えて、ポリソーム画分を見てもリボソームの結合数の少ない mRNA が相対的に多いことが

分かる。比較的にも生育の良い 30°C でも、生育の悪化が顕著な 23°C でも同じ傾向で、ポリソーム対モノソーム比を定量した結果からも、再現性良くこのイントロン欠失株でモノソームの増加、すなわち翻訳の低下が確認出来た (図 3 C)。

これらを総合すると、生育が悪化していた tRNA-Leu_{CAA} イントロン欠失株では、tRNA-Leu_{CAA} 自身の量の低下に加え、5.8S rRNA 量の低下、核小体の形態異常、これらに基づくと思われるグローバルな翻訳活性の低下といった多面的な欠損が見られることが分かった。こうしたことから、特定の isodecoder tRNA をコードする同義遺伝子群からのイントロンの除去は生じる tRNA 自身に影響を与えるだけでなく、その変異が協調するかたちでクロマチンの高次構造に影響を与え、最終的には核小体の形態や機能を左右することでリボソームの機能にも影響を与えるという意外な働きが示唆された。現在、これらの成果に関する論文を執筆中である。

3-4 新規 tRNA 定量法の開発

イントロン欠失株の解析をする中で、同じ isoacceptor に属す isodecoder tRNA 量比を比較する必要が生じた。これを可能にするために、対象の isodecoder tRNA の 3'末端に特異的に蛍光標識を導入する手法を開発した。これにより tRNA の絶対定量が可能になり、異種の tRNA 間の量比を正確に見積もることが可能になった。本研究期間では tRNA-Pro_{UGG} と tRNA-Pro_{AGG} を用いたモデル実験によって、この手法で低分子 RNA 画分中に含まれる各 tRNA 種の定量条件を確立し、実際、tRNA-Pro_{UGG} と tRNA-Pro_{AGG} の RNA あたりの絶対量は、発酵培地中で培養した酵母では 0.68±0.02 pmol/μg RNA と 0.16±0.01 pmol/μg RNA (量比は 1:4.2) であるのに対して、呼吸培地中では 1.12±0.06 pmol/μg RNA と 0.33±0.03 pmol/μg RNA (量比は 1:3.3) と異なっていた。今まで tRNA の発現量は各 tRNA 種をコードする同義遺伝子の数で決まり変化しないと思われてきたが、生育環境によって tRNA の全体量、isodecoder 種毎に細かな発現調節が行われていることが示唆された。本成果に関しては 2016 年の日本分子生物学会のワークショップや Nascent Chain Biology 国際会議で評価されており、現在論文発表の準備を進めている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究では、生命の維持に必要なタンパク質の翻訳に必須な因子である tRNA の遺伝情報の「記述の仕方」についての研究である。特に、一見除かれるためだけに存在するように見られる tRNA のイントロンの生理的な意義に関して出芽酵母というモデル生物を用いて解析した点で、純粋に学術的問題意識のもとでの研究であり、直接の生活や産業への貢献や波及効果を目指したものでは無い。ただし、現在、医学を含めた広範な生命科学において、生体内におけるタンパク質の機能化が翻訳のレベルで管理されているのみならず、そのわずかな変調が一群のタンパク質機能の欠損を介して細胞や組織、ひいては個体レベルで異常を引き起こすことが理解されつつある。実際にこれまで想定されていなかった tRNA というハウスキーピングな因子の異常でヒト神経系の遺伝疾患に至る例が複数報告されている。とりわけ数年前に tRNA のイントロンの除去に関わる RNA 切断酵素の変異がヒトで橋小脳の発生異常を特異的に引き起こすことが報告されており、tRNA 前駆体のスプライシングの変調に極めて敏感な生体機能があることが明らかとなった。本研究で tRNA のイントロンが tRNA の成熟化過程に関わるだけでなく、恐らく遺伝子のレベルで核小体の構造や機能制御を介してリボソームのアセンブリーにも関わる可能性が示されたことは、このような tRNA 遺伝子や前駆体の未知の機能の理解への鍵の一つとなるであろう。本研究で得られた tRNA の機能化に関する理解の伸展は、長い目では、学術的な知見の蓄積を通じて応用まで含めた生命科学分野に影響を与えることが期待される。