

「tRNA イントロンと多彩な細胞機能を繋ぐ因子の同定」

兵庫県立大学 理学研究科

林 紗千子

1 研究の背景と目的

tRNA は、全ての生物のタンパク質合成に必須の RNA 分子である。酵母では一代あたり 300 万分子にも及ぶ tRNA が産生され、ゲノム上に散在する多数の tRNA 遺伝子 (酵母は 275 個、ヒトは 429 個) からの活発な転写により賄われている [1]。この tRNA 遺伝子の一部には、イントロンが存在する。イントロンを含む tRNA 遺伝子から転写される、イントロン含有 tRNA (intron-containing tRNA; ic-tRNA) は、前駆体 tRNA として、ほとんどの真核生物で常時、発現している。そのため、tRNA スプライシングに関わる因子の異常は、酵母では致死であり、マウスやヒトでは、運動ニューロンにおける軸索の変性及び神経筋接合部の変性を伴う運動ニューロン疾患や橋小脳低形成症等を引き起こす [2,3]。これまで tRNA スプライシングにまつわる研究は数多く行われてきたが、スプライシングにより切り出され、最終的には不要となるイントロンについての研究成果は乏しかった。ところが近年、後生生物ではスプライシングにより切り出されたイントロンが環状化し、tracRNA として機能すること [4,5]、出芽酵母でもストレス時に切り出された tRNA イントロンが microRNA 様に機能し、標的 mRNA の発現を抑制すること [6] 等が報告され、tRNA イントロンは単なる前駆体 tRNA の一部ではなく、独立した役割を持つ機能分子であることが次第に明らかとなりつつある。申請者らも、*in vivo* での tRNA イントロンの生理的役割を探るため、出芽酵母で同一アンチコドンを持つ tRNA (isoacceptor tRNA) 種毎にゲノム上からイントロンを削除した株を構築 [7]、表現型解析を進めてきた。その結果、イントロン削除により、該当 tRNA 遺伝子に由来する成熟 tRNA の修飾異常等に加え、核小体の形態異常やリボソーム生合成関連を含む一見、tRNA イントロンとは無縁に思える細胞機能にも影響が生じることを見出した [7, 8]。一方、こうした影響の作用機序の理解には至っていない。そこで、本研究では詳細な分子機構解明の足掛かりとして、生化学的手法による ic-tRNA と直接相互作用する因子の探索と同定を試みた。ic-tRNA は、成熟 tRNA 同様、強固な高次構造を持ち、塩基修飾等が存在する。そのため、まずは ic-tRNA に特化した手法の確立を主として行いつつ、確立した手法を用いて新規相互作用因子の同定を目指した。

2 研究方法・研究内容

主な研究手法としては、一般に RNA 結合タンパク質の探索および同定に用いられる RNA プルダウンと質量分析を組み合わせた方法を採用した。特に ic-tRNA とタンパク質の複合体形成においては、cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) を基にした手法を取った。bait として用いた RNA は、ic-tRNA の高次構造を考慮し (通常、tRNA イントロン配列の一部はアンチコドンとの塩基対合を形成している)、イントロン部分を含む ic-tRNA の一部でなく、ic-tRNA 全体を選択した。なお、出芽酵母には 10 種類の ic-tRNA が存在する [1,7]。この内、本研究では、これまでの解析からリボソーム関連を中心に多様な細胞機能との関連が強く示唆される ic-tRNA^{Leu_{CAA}} に焦点を絞り、解析を進めた。ただし、ic-tRNA^{Leu_{CAA}} にも高い相同性を有するものの、イントロン配列の違いにより、厳密には 5 種類が存在する [1]。そのため、5 種類の ic-tRNA^{Leu_{CAA}} 中で最もメジャーな配列を持つ *tL(CAA)N* を *in vitro* 転写用プラスミドへとクローニングし、RNA bait として使用した。一方、*tL(CAA)N* からイントロン部分のみを削除した *tl(caa)nΔint* も同様に *in vitro* 転写用プラスミドへとクローニングし、

RNA bait のネガティブコントロールとして使用した。図 1 に、研究手法の概要を示す。

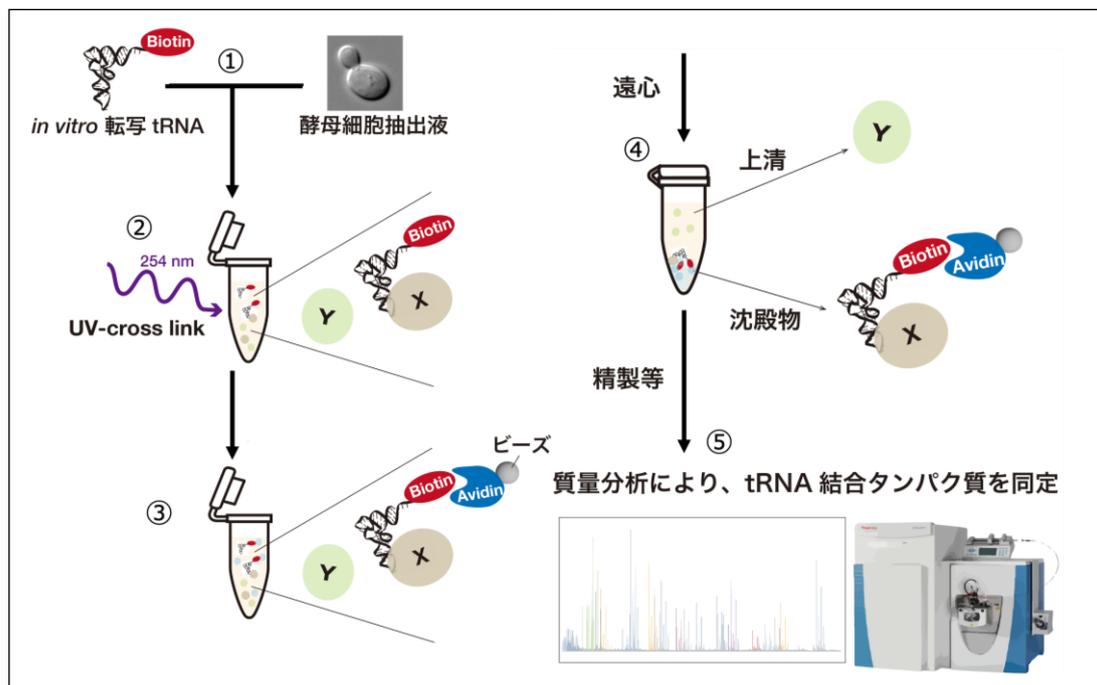


図 1: 研究手法の概要 *in vitro* 転写により合成した ic-tRNA^{Leu}_{CAA} および tRNA^{Leu}_{CAA} の 3'末端を Biotin hydrazide を用いてビオチン化し、対数増殖期の酵母野生株より調製した全細胞抽出液と混合させた。その後、UV 照射により RNA-タンパク質の複合体を安定化し、ストレプトアビジンビーズを用いたプルダウンを行った。プルダウンにより得られた画分は、NaCl や SDS、尿素などを用いた洗いによる精製を行い、7.5%または 12.5% SDS-polyacrylamide gel を用いた電気泳動へと進めた。電気泳動後のゲルは銀染色によりタンパク質成分を染色、ネガティブコントロールと比較してバンドの差が生じている部分を切り出し、LC-MS へとまわした。LC-MS による分析は、熊本大学・発生医学研究所 中村輝教授との共同研究として実施した。

3 研究成果

§ 1. tRNA(ic-tRNA)に特化した RNA プルダウン手法の確立

まず ic-tRNA・tRNA でのプルダウン手法を確立するため、一般に RNA・タンパク質複合体の免疫沈降に使用される CLIP (ただし CLIP では RNA ではなく、タンパク質でプルダウンを行う) を参考としつつ、以下の点について主な改良を行なった。

1) tRNA のビオチン化効率

ic-tRNA およびイントロンを欠失した tRNA を bait とし、アビジンビーズでのプルダウンを行うにあたり、tRNA の 3'末端に Biotin hydrazide を用いてビオチンを付加する必要がある。この過程において、研究開始当初は、約 20~24 μg の tRNA に対し、Biotin hydrazide を 0.07 μmol 加え 23°C で 1 時間反応させていた。しかし、ビオチン化効率が不十分であったため (図 2、左)、10 倍量の 0.7 μmol まで Biotin hydrazide 量を増やし (図 2、右)、ビオチン化効率の改善を図った。

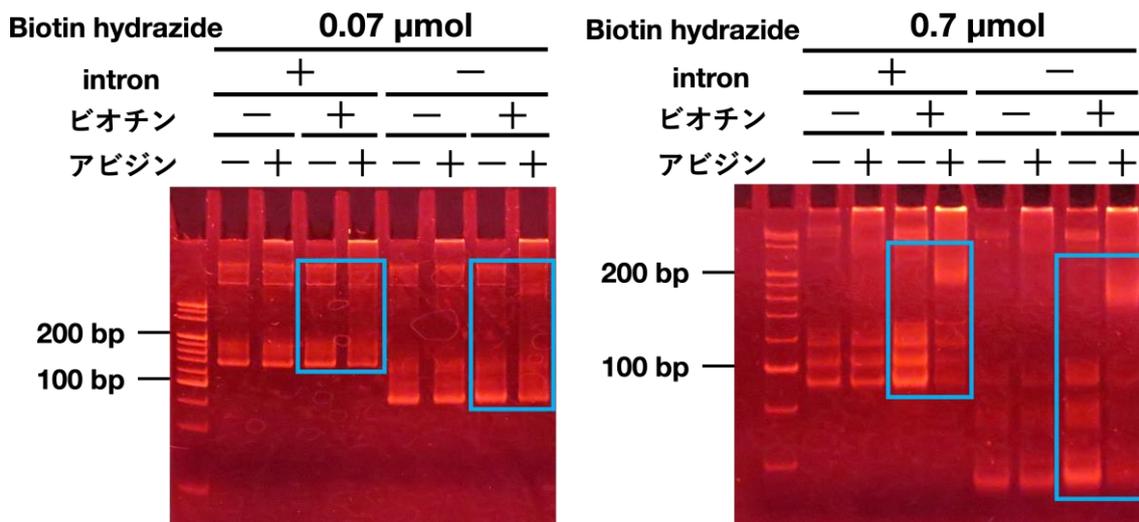


図 2: ビオチン化効率の検証 約 20~24 μg の精製した ic-tRNA^{Leu}_{CAA}(イントロン有り) および tRNA^{Leu}_{CAA}(イントロン無し)に、Biotin hydrazide を終濃度 0.07 μmol (左)または 0.7 μmol (右)になるように加え 23°C で 1 時間反応後、エタノール沈殿による精製を行った。その後、それぞれのサンプルに、ビオチン特異的結合性を持つアビジンを加え、10% polyacrylamide gel での電気泳動によるゲルシフトアッセイにより、ビオチン化効率を検証した。青枠で示すように、基質のビオチン化効率の改善に伴い、(ic-)tRNA・アビジン複合体が効率よく形成され、上部へのバンドシフトが生じるようになった。

2) 複合体形成における RNA bait の量比と UV 架橋

RNA 基質とタンパク質との複合体形成においては、その量比も重要な要素となる。過剰な RNA またはタンパク質が存在する場合、逆に不足した場合にも、効率よい複合体形成が行われない。また UV 架橋の条件によっても複合体の安定性が左右される。そこで文献等も参考としながら検討を行い、最終的な最適条件を以下の手順で決定した。全タンパク質量 30 μg の酵母抽出液に対し、ビオチン化 ic-tRNA^{Leu}_{CAA} または tRNA^{Leu}_{CAA} を、それぞれ終濃度 0 μg 、2 μg 、3 μg になるよう加えて混合した。氷上で 30 min 静置後、積算光量 3 J/cm² の UV を照射することで、(ic-)tRNA・タンパク質の複合体を安定化させた。その後、10% polyacrylamide gel での電気泳動後、tRNA イントロンおよび成熟 tRNA に対する DIG 標識プローブを用いたノザンブロットにより、架橋産物の有無を確認した。その結果、RNA 基質を 3 μg 加えた場合に、架橋産物の強いシグナルが得られ、複合体が効率的に形成されることが確認された。よって、全タンパク質量 30 μg の酵母抽出液に対し、3 μg の RNA bait を加え、氷上で 30 min 静置後、積算光量 3 J/cm² の UV を照射することが、(ic-)tRNA とタンパク質との複合体形成に適当であることが分かった。

3) アビジンビーズを用いたプルダウン後の複合体画分の精製

プルダウン後の試料におけるバックグラウンドの低減や非特異的結合の除去を目的とした洗浄手順は、質量分析結果の精度に大きな影響を与える。当初は Wash Buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.4、20 mM Mg(OAc)₂、100 mM KOAc、1 mM DTT、1 mM PMSF、cComplete Protease Inhibitor) を使用して 3 回の洗浄を行っていた。しかし、精製分画を用いた SDS-PAGE の結果、バックグラウンドが非常に高かったことから、洗浄条件を厳しくする必要があると判断した。高濃度の変性剤を用いるなどの段階的な洗浄を試み、最終的には Wash Buffer_1 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.4、20 mM Mg(OAc)₂、100

mM KOAc, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, cOmplete Protease Inhibitor) で 2 回、Wash Buffer_2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS) で 1 回、Wash Buffer_3 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 0.1% SDS) で 3 回、Wash Buffer_4 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 2 M Urea) で 1 回という 4 種類の Wash Buffer を使用した段階的な洗浄へと変更し、精製条件を最適化した。

§ 2. LC-MS による新規 ic-tRNA 相互作用因子候補の同定

質量分析により、新規 ic-tRNA 相互作用因子候補として、核小体関連タンパク質 (3 つ)、細胞質の分子シャペロンタンパク質 (4 つ)、リボソームタンパク質 (17 つ) を同定した。これらの因子は、細胞内でのタンパク質の合成および品質管理に重要な役割を果たす。よって、この結果より、ic-tRNA^{Leu}_{CAA} が翻訳および、その後のタンパク質処理機構において積極的な役割を果たしている可能性が示唆された。実際、tRNA^{Leu}_{CAA} イントロン欠失株を用いたこれまでの解析からも、tRNA イントロン削除により、核小体の形態異常やリボソーム生合成経路に影響が生じることが明らかになっている [7]。加えて、翻訳異常や翻訳後のタンパク質の一部が凝集体形成傾向を示すことも確認している。従って、ic-tRNA^{Leu}_{CAA} は単なる前駆体 tRNA としてだけではなく、本研究で得られた新規候補因子と直接的に相互作用することにより、細胞内での翻訳およびその後の品質管理の過程において、独立した機能分子として働いている可能性がある。今後の進展が期待される。

4 生活や産業への貢献および波及効果

一般に、成熟 tRNA の機能異常は神経障害、がん、ミトコンドリア病をはじめとする多くの疾患の原因となることが広く知られる [9]。イントロンを取り除く tRNA スプライシング異常も疾患の原因となる [3]。現在、我々の研究からは、ゲノム上の tRNA イントロンの削除によっても翻訳を中心とした細胞機能に影響が生じ、アルツハイマー病などの神経疾患に関連する異常タンパク質の細胞内凝集が引き起こされることが明らかとなりつつある。本研究では、その tRNA イントロン削除により生じる表現型を引き起こす分子メカニズムを解明するため、ic-tRNA^{Leu}_{CAA} と直接相互作用する因子の同定に向けた生化学的手法を開発し、最終的に新規因子の同定に成功した。この成果は、これまで不明であった ic-tRNA が細胞内タンパク質処理機構にどのように関与するかについて分子レベルでの知見を提供するとともに、神経疾患などに関連する病態の新たな要因の一つを示した。同時に、異常タンパク質の凝集制御において「tRNA イントロン」に関連したアプローチが有効である可能性を新たに示唆するものであり、将来的な神経疾患等の治療戦略の開発等に貢献できる基礎生物学的・基礎医学的知見の一端を提供できたと考える。

参考文献

- [1] Chan and Lowe. (2016) *Nucleic Acids Res.*, 44:D184 [2] Hanada, *et al.* (2013) *Nature*, 495:474 [3] Budde, *et al.* (2008) *Nat. Genet.*, 40:1113 [4] Lu, *et al.* (2015) *RNA*, 21:1554 [5] Schmidt, *et al.* (2019) *Nucleic Acids Res.*, 47:6452 [6] Nostramo, *et al.* (2025) *Mol Cell*, 85:726 [7] Hayashi, *et al.* (2019) *Nucleic Acids Res.*, 47:5936 [8] 林紗千子. (2022) 月刊「細胞」, 54: 40 [9] Orellana, *et al.* (2022) *Nat. Rev. Genet.*, 23:651