

論文の内容の要旨

出芽酵母 tRNA における序列的な転写後修飾の形成と細胞内輸送に伴う成熟化機構

大平 高之

【序論】

遺伝子情報をタンパク質へと変換する際にアダプター分子としてはたらく Transfer RNA

(tRNA) には転写後に導入された様々な RNA 修飾がみられる。これら RNA 修飾は、tRNA の立体構造の安定化や、精確なコドン認識、コドン・アンチコドン対合の安定化や翻訳時のフレームシフトの防止、更にはアミノアシル tRNA 合成酵素による認識に必要であるなど、様々な働きが知られている。RNA 修飾は tRNA の成熟過程において形成されることが知られているが、その詳細な順序や細胞内のどこで形成されるかといったことについては不明瞭な点が多い。tRNA の成熟化は未知の因子を含め多くのタンパク質が関わる複雑な反応であり、tRNA の生合成を解明することは生命の基本原則を理解するための重要な命題である。このような背景から、私は本研究において、出芽酵母 tRNA 前駆体における RNA 修飾や末端構造についての詳細な解析を行い、細胞内において tRNA がどのような経路で成熟化するかを明らかにすることを目的とした。

出芽酵母において tRNA 前駆体 (pri-tRNA) は、核内において RNA ポリメラーゼ III によって転写される (Fig.1)。pri-tRNA の 5' 末端 leader 配列および 3' 末端 trailer 配列は、それぞれ RNase P および Trz1p によりトリミングされる。次いで Cca1p により、CCA 配列が 3' 末端に付加され末端が形成される。また、この過程において多数の RNA 修飾が導入される。その後、tRNA 前駆体は細胞質へと輸送され、細胞質に局在するいくつかの修飾酵素によりさらに修飾が導入される。tRNA のスプライシングはスプライシング装置がミトコンドリア外膜上にあるため、細胞質へ輸送された後に行われる。

tRNA のアンチコドン一字目 (34 位) とその 3' 隣接塩基 (37 位) には遺伝暗号の解釈に重要な修飾塩基が存在しているが、イントロンは 37 位と 38 位の間に挿入されており、これらの修飾が導入されるためには、イントロンが除去さ

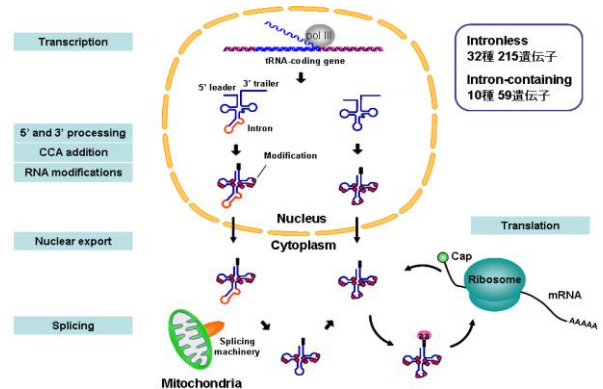


Fig. 1 出芽酵母における tRNA の成熟化の概略図。出芽酵母の tRNA は細胞内を移動しながら段階的に成熟する。

れる必要がある。したがって、アンチコドンと近傍の修飾塩基は細胞質でイントロンが除去された後に導入される。このように tRNA は細胞内を移動しながら成熟し、最終的に翻訳装置に用いられると考えられるが、細胞内のどこでどのような順序で修飾が導入されるかについてはほとんど解析がなされていないのが現状である。また、修飾が不完全な前駆体 tRNA が翻訳に参加することは翻訳精度の低下を招くことから、最終的に何を以って tRNA の成熟を認識するかという本質的な問題が残されている。

【本論】

tRNA 一次転写産物 (pri-tRNA) の解析

RNA 修飾についてこれまでに解析された出芽酵母の tRNA 前駆体は既に末端が成熟したものに限られ、このとき多くの修飾が形成されていることが示されている。そこで、一次転写産物にあたる pri-tRNA について、修飾状態の詳細な解析を行った。解析の対象として、イントロンを有する Isoleucine-tRNA (tRNA^{Ile}UAU) を選択した (Fig.2)。出芽酵母の野生株から全 RNA を抽出した後、そこから tRNA^{Ile}UAU に対し相補的な配列を持つ DNA プローブを用い、往復循環クロマトグラフィーによる単離を行った。また、pri-tRNA の 3' 末端に結合することが知られている Lhp1p をエピトープタグ融合タンパク質として過剰発現し、Lhp1p-pri-tRNA

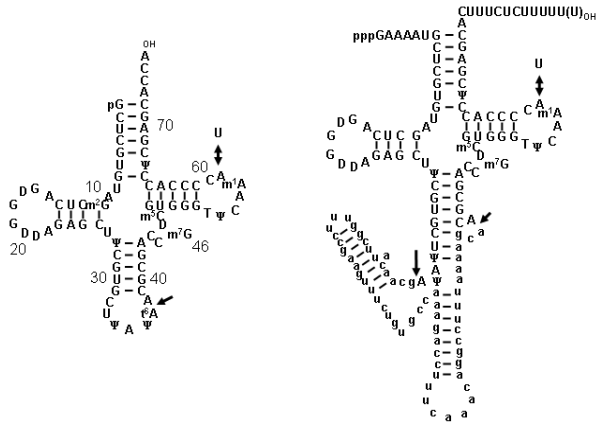


Fig. 2 出芽酵母tRNA^{Ile}UAUの成熟体(左)とpri-tRNA^{Ile}UAU(右)の二次構造。矢印はスプライシングサイトを示す。イントロンは小文字で表した。

複合体を免疫沈降法で単離した。精製した pri-tRNA は RNase A あるいは RNase T1 で断片化した後、キャピラリー液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)により解析した。修飾断片と未修飾断片のそれぞれのシグナルの強度の和を 100 とし、それに対する修飾断片の割合から、個々の RNA 修飾の導入率を求めたところ、直接精製した pri-tRNA と Lhp1p と共沈した pri-tRNA のいずれの場合においても、同様の修飾導入率を示した (Table 1)。10 位の N²-methylguanosine (m²G) と 37 位の N⁶-threonylcarbamoyladenosine (t⁶A) を除き、他の修飾塩基は検出されたが、修飾導入率は 10%程度から 99%とばらつきが見られた。47 位の dihydrouridine (D) の導入率が最も高く (99%)、次いで 54 位の 5-methyluridine (T)(78.5-83.3%)で、これに対し 58 位の 1-methyladenosine (m¹A)は 11-14% と低い導入率であった。この結果は、tRNA 修飾が転写とカップルして導入されるものと、転写後に導入されるものに分類できることを示している。

Table 1 tRNA^{Ile}UAUにおけるRNA修飾の導入率 (%)
修飾断片 / (修飾断片 + 未修飾断片)

Modifications	Fragments	Mature	Pri-tRNA	Lhp1p
m ² G10*	Am ² G Cp	77.5	unmodified	unmodified
D16*	AGDp	62.4	34.2	29.9
D20, D20A	DDAGp	98.3	39.7	69.7
	DUAGp or UDAGp	1.0	34.2	6.3
t ⁶ A37	t ⁶ AA Cp	99<	unmodified	unmodified
m ⁷ G46	ACCm ⁷ G Dm ⁵ C Gp	98.8	50.7	73.5
D47	ACCm ⁷ G Dm ⁵ C Gp	96.2	99<	99<
m ⁵ C48	ACCm ⁷ G Dm ⁵ C Gp	96.7	45.7	44.2
T54	GGGTp	99<	83.3	78.5
m ¹ A58	Am ¹ AA Cp	99<	14.0	11.3

*他の領域に由来するRNA断片の影響で導入率が低くなっている。

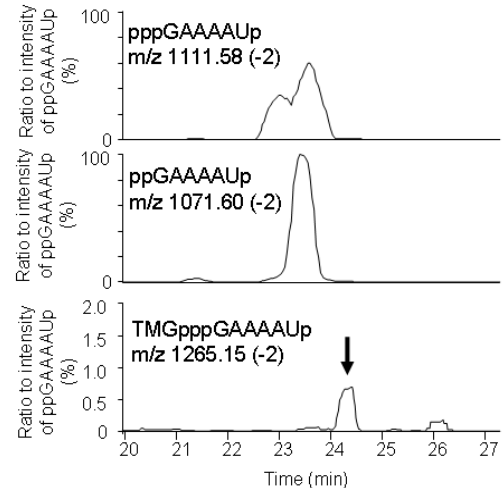


Fig. 3 pri-tRNA^{Ile}UAU の5' 末端の解析。上から5' 末端が三リン酸(pppGAAAAUp)、二リン酸(ppGAAAAUp)、TMG (TMGpppGAAAAUp)のRNA断片についてのマスクロマトグラムを示す。それぞれのグラフの縦軸は5' 末端が二リン酸のRNA断片の強度を100とし、それに対する割合で表している。TMGキャップを持つ断片は矢印で示した位置に検出された。

tRNA 修飾は高次構造を安定化する役割を持つことから、転写中あるいは直後の修飾は、pri-tRNA を安定化し、プロセッシング効率を上げている、あるいは分解から保護していることが考えられる。

また、pri-tRNA の5'末端について解析を行ったところ、興味深いことに、5'末端が二リン酸のものが最も多く、次いで三リン酸、極微量のトリメチルグアノシン (TMG) キャップ構造を有するものの存在が確認された (Fig.3)。これまでに tRNA 前駆体の5'末端が二リン酸体、あるいはキャップ構造を持つといった報告はない。キャップ構造は分解酵素からの保護や細胞内局在の制御に関わることから、成熟過程の tRNA 前駆体を分解から保護している、あるいは未知の局在制御機構が成熟化に関与している可能性が考えられる。

tRNA スプライシング中間体の解析

序論で述べたようにスプライシング直後の tRNA のアンチコドン領域は未修飾であると考えられる。スプライシング後にどのような順序で RNA 修飾が形成されるかを調べるため、スプライシング中間体を蓄積する出芽酵母 SC893 株を用いた。この株は TPT1 遺伝子を、Gal10 プロモーターで発現制御したものである。

Tpt1p は tRNA スプライシング反応の最終段階である 37 位のリボース 2'OH 基に生じたリン酸基の脱リン酸を触媒する酵素である。この株

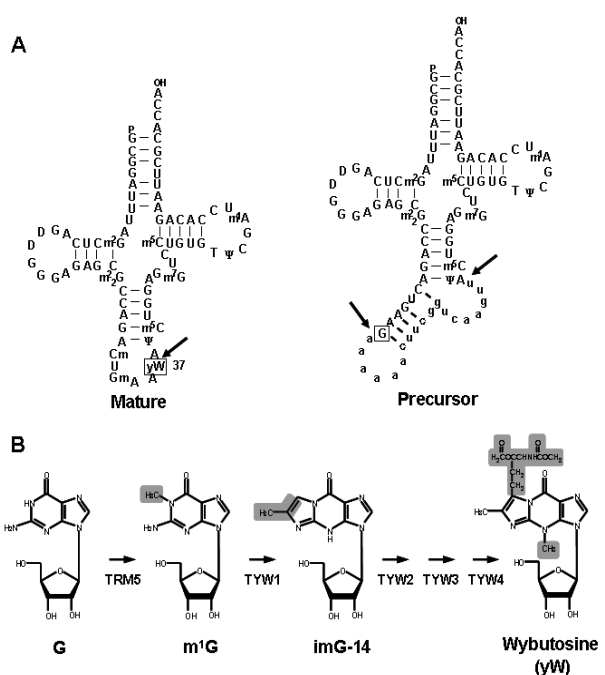


Fig. 4 (A)出芽酵母tRNA^{Phe}の成熟体(左)と核外移行を阻害したときに蓄積する前駆体(右)の二次構造。37位は四角で囲った。矢印はスプライシングサイトを示す。イントロンは小文字で表した。(B) yWの生合成。G、m¹G、imG-14及びyWの構造式を示す。反応を触媒する酵素の遺伝子名を矢印の下に示した。

をグルコース含有培地で培養し、スプライシング中間体を蓄積させた後、全 RNA を抽出した。そこからイントロンを有する tRNA 前駆体を全 10 種類単離した後、LC/MS による解析を行った。その結果、8 か所の RNA 修飾 [32 位の 3-methylcytidine (m³C)、34 位の 2'-O-methylcytidine (Cm) 及び 2'-O-methylguanosine (Gm)、37 位の t⁶A、N⁶-isopentenyladenosine (i⁶A)、N¹-methylguanosine (m¹G)、wybutosine (yW)、

44 位の 2'-O-methyluridine (Um)] が未形成であることが判明した。この結果は、これら RNA 修飾はスプライシング後に形成されること、37 位の 2'リン酸基により形成を阻害されていることを示す。

核移行を必要とする yW の形成

Phenylalanine-tRNA (tRNA^{Phe}) の 37 位に存在する yW は非常に高い RNA 修飾で、コドン解読において正確な読み枠の維持に関与する (Fig.4A)。その生合成は核局在のメチレーズである Trm5p による m¹G の形成に始まり、引き続き細胞質に局在する TYW タンパク質群 (Tyw1p, Tyw2p, Tyw3p, Tyw4p) による連続的な反応によって形成されることが当研究室の先行研究により明らかになっている (Fig.4B)。

Trm5p が核局在であること、スプライシング直後の tRNA^{Phe} では yW は未形成であることから、yW の形成にはスプライシング後の tRNA^{Phe} が一度核移行する必要があると考えられる。近年、出芽酵母において成熟した tRNA が栄養飢餓ストレス状況下で核に蓄積することや、通常の培養条件で核・細胞質間を行き来していることが示された。私は、この核移行が tRNA 前駆体の輸送、つまり yW の生合成に関わっているのではないかと考え、これを実証することにした。まず、栄養飢餓ストレスを利用し、スプライシング後の tRNA を核に蓄積させることで、m¹G を持つ tRNA^{Phe} の量が増加するかどうかの解析を行った。出芽酵母野生株を SC 培地 (最少完全培地) で前培養を行い、対数増殖の初期段階でグルコースを含まない SC 培地に植え継

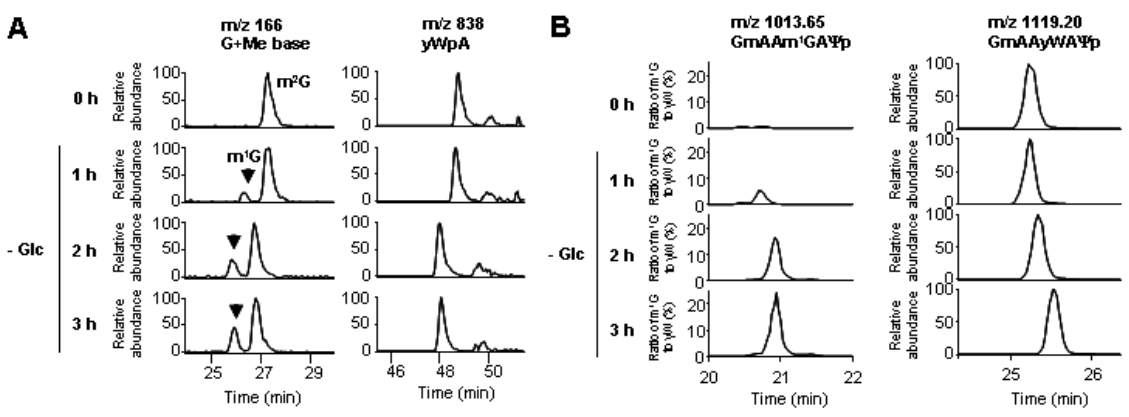


Fig. 5 グルコース欠乏による栄養飢餓ストレスを与えた時の tRNA^{Phe} の LC/MS による解析 tRNA^{Phe} のヌクレオシド解析 (A) と RNA フラグメント解析 (B)。(A) 単離した tRNA^{Phe} をヌクレアーゼ P1 と BAP で処理し LC/MS により解析を行った結果。左は m/z 166 について、右は m/z 838 についてのマスクロマトグラムを示しており、それぞれメチル化されたグアニンの塩基の分子量、yWpA の分子量に相当する。m¹G に由来するピークは矢印で示した。(B) 単離した tRNA^{Phe} を RNaseA で断片化し LC/MS により解析を行った結果。左は m¹G を、右は yW を 37 位に持つ RNA 断片に相当する分子量についてのマスクロマトグラム。左図の縦軸は右図の yW の値を 100 として表している。

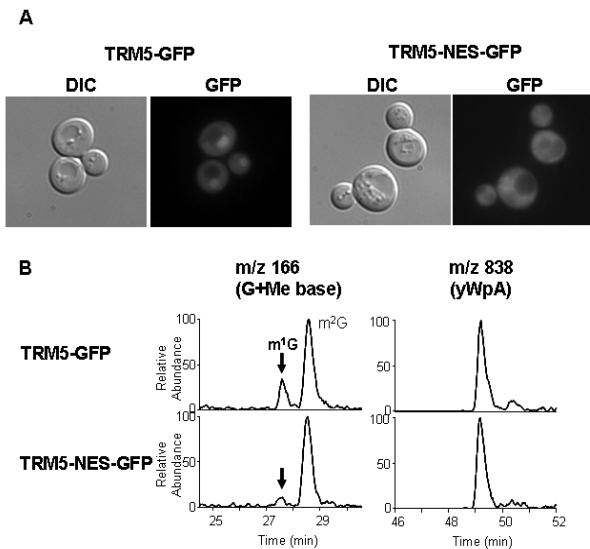


Fig. 6 Trm5pの細胞質局在化による影響
(A)TRM5-GFP株とTRM5-NES-GFP株におけるTrm5pの局在。(B) 4時間のグルコース欠乏による栄養飢餓ストレスを与えた時のTRM5-GFP株とTRM5-NES-GFP株から単離したそれぞれのtRNA^{Phe}についてヌクレオシド解析を行った結果。矢印はm¹Gのピークを示す。

ぎ、栄養飢餓ストレスを与えた。この細胞から単離した tRNA^{Phe} について LC/MS による解析を行ったところ、ストレスを1時間与えた時点でm¹Gに由来するピークが観測されるようになり、このピークはストレスを与えた時間とともに徐々に増大することが判明した(Fig.5)。また、私は研究の過程で偶然、核内で tRNA 前駆体の3'trailer 配列を切断する酵素 Trz1p と tRNA が強く相互作用することを見出し、核内で Trz1p に結合している tRNA^{Phe} を精製し解析したところ、m¹Gに由来するピークが観測された。これら結果は37位のm¹G化にはスプライシング後のtRNA^{Phe}の核移行が関与しているという本研究の仮説を強く支持する。

さらにTrm5pによるm¹Gの形成が核内で行われていることを実証するため、Trm5pにHIVのRevタンパク質の核外移行シグナル(NES)を付加し強制的に細胞質に局在化するように改変した株(TRM5-NES-GFP)を作成し(Fig.6A)、この株に栄養飢餓ストレスを与え、その時のtRNA^{Phe}について解析を行った。その結果、予想通りm¹Gを有するtRNA^{Phe}前駆体の蓄積は少なくなっていることが観察された(Fig.6B)。これはTrm5pが細胞質へと移ったことで、yWは核移行せずとも細胞質で形成されるようになったためと考えられる。以上の結果は、tRNAの成熟過程において、前駆体が核・細胞質間を輸送されることで、RNA修飾が形成されることを示した最初の知見である(Fig.7)。

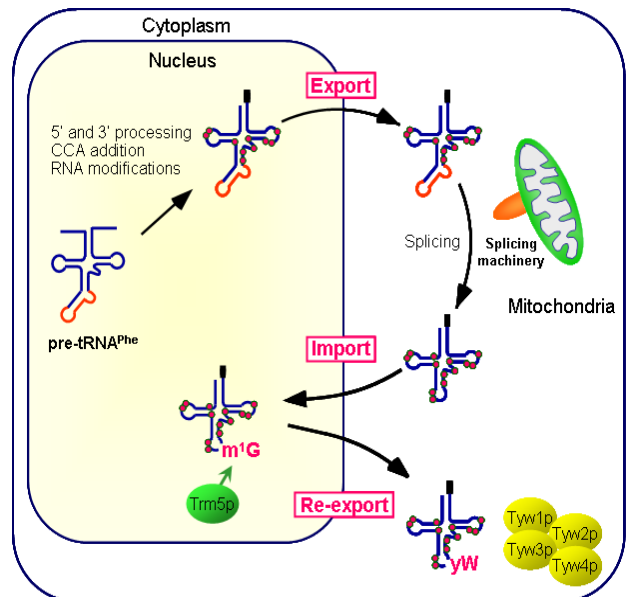


Fig.7 tRNA^{Phe}の成熟化モデル
tRNA^{Phe}前駆体は核内で末端が形成され、また多くのRNA修飾が導入される。その後細胞質へと輸送された後、スプライシングされる。その結果生じたアンチコドン領域が未修飾の前駆体は再び核へと移行し、Trm5pにより37位がm¹G化される。そして再び細胞質へと輸送され、細胞質に局在するTywタンパク質群によってyWが形成される。

【結論】

本研究による様々な成熟段階の tRNA 前駆体の解析から、RNA 修飾は tRNA の成熟過程初期からスプライシング後にかけて段階的に形成されていることが示された。これは tRNA の成熟化が細胞内局在と密接に関わりながら段階的に行われる厳密に制御された機構であることを示している。また、pri-tRNA がキャップ構造を有していたことや成熟過程の tRNA^{Phe} が核移行していたことから、tRNA の成熟化機構が、これまで考えられていたものに比べ、複雑かつ多様な因子が関与する機構である可能性が示唆された。

今後は、tRNA 成熟化において本研究により見出された現象がどれだけ重要なのかについて、そして、tRNA 成熟体と前駆体とを識別する機構があるのかといった点について解析を行い、より詳細な tRNA の動態を明らかにしたい。