



tRNA 型スプライシングの新展開

1. はじめに

tRNA は、塩基配列とアミノ酸配列をつなぐアダプターとして、翻訳に必須の機能 RNA である。tRNA は 5'側のリーダー配列と 3'側のトレーラー配列を含む前駆体として転写され、これら延長配列のトリミングや、3'末端 CCA 配列の付加、ヌクレオチドの修飾等を受けて成熟化する。tRNA の成熟体は約 76 ヌクレオチド (nt) と短い RNA ながら、その遺伝子の一部はイントロンを含む。古細菌と真核生物の tRNA のイントロンには共通した特徴が見られ、そのスプライシングは mRNA のそれと違い、全てタンパク質性の酵素によって触媒される。真正細菌のゲノムにごく少数見られる tRNA のイントロンは、前者と異なり、自己スプライス型イントロンである。本稿では、古細菌や真核生物に見られるイントロンとそのスプライシング機構、さらに tRNA の細胞内動態を巡る最近の話題を取り上げる。

2. tRNA 遺伝子に含まれるイントロン

古細菌や真核生物の tRNA 遺伝子中に見られるイントロンは、通常、アンチコドンの 1 塩基 3'側に挿入されている¹⁾。古細菌のイントロンは 16~44 nt 程度で、典型的なものは、4 nt の二重鎖を挟んでスプライス部位を含む 3 nt のバルジが二つ存在する BHB モチーフという構造を持ち、この局所構造がスプライス因子に認識される。一部の古細菌では、イントロンの挿入位置が D アームや T ψ C アームを含めた広い範囲に及び (図 1)、三つのイントロンが含まれる tRNA 遺伝子すら存在する。他方、真核生物のイントロンの長さは 12~104 nt で、ほとんどがアンチコドンの 1 塩基 3'側に挿入されている。真核生物は、イントロンの局所構造の認識だけではなく、アクセプターアーム

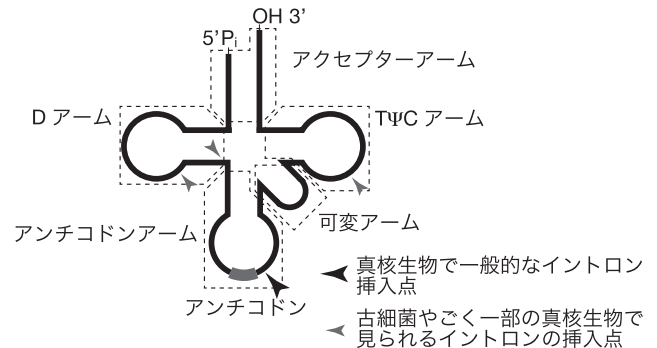


図 1 tRNA の二次構造とイントロン挿入点

ム (図 1) 以外の部分を指標に二つのスプライス部位間の距離を測ることで基質を識別するとされている。例外として、*Cyanidioschyzon merolae* には円循環変異*によって D アームに両末端ができた tRNA 遺伝子が存在し、ここに生じた延長配列の切断と結合による D アームの形成をスプライシング機構が司る²⁾。

mRNA のような選択的スプライシングが基本的に存在しない tRNA にとって、こうしたイントロンは除かれるだけの配列である。ただ、一部の tRNA 修飾酵素はイントロンを基質認識に用いることが知られている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、tRNA-Ile_{UAI} の 34 位と 36 位の U は、シュドウリジン (ψ) 合成酵素 Pus1 によって ψ に変換されるが、*in vitro* で Pus1 はイントロンを含む前駆体のみを基質とする³⁾。しかし、こうした修飾酵素は酵母の生育にとって必須ではなく、イントロンが tRNA 遺伝子に保持される理由はよくわかっていない。

tRNA のイントロンが真核生物に必須であるかの遺伝学的検討は、ほとんどのイソアクセプター tRNA (同じアンチコドンを持つ tRNA) が多数の重複遺伝子でコードされるために困難である。例えば、*S. cerevisiae* では全 47 種のイソアクセプター tRNA のうち 10 種の遺伝子がイントロンを持ち、このうち 1 種以外は最大 10 個の重複遺伝子にコードされる。我々は、この酵母に逐次的相同組換えを適用し、イントロンを含んだ前駆体 tRNA として転写されるイソアクセプター tRNA ごとに、全ての重複遺伝子からイントロンを除いた酵母株の構築を進めている。例えば、UGG コドンを Trp にデコードする唯一の tRNA である tRNA-Trp_{CCA} は、イントロンを含めて配列が同一の六つの

*円循環変異：遺伝子の 5', 3'両末端が結合して生じた環状配列が、任意の一箇所が開裂することで新たな 5', 3'末端を持つようになる変異。

重複遺伝子から転写される。これら全ての tRNA-Trp_{CCA} 遺伝子からイントロンを欠失させた株は構築可能で、その株の生育は野生株とほぼ同じだった⁴⁾。ゲノムからの完全なイントロンの除去は tRNA-Trp_{CCA} の現存量やアミノアシル化だけでなく、バルクのタンパク質の合成速度やタンパク質組成にもほとんど影響を与えなかった。他のイソアクセプター tRNA についても全重複遺伝子からのイントロン除去株の構築は可能で、tRNA のイントロンは生育に必須の機能を持たないことがわかった (未発表)。イントロン欠失株の多くは野生株と同等の生育を示したが、tRNA-Tyr_{GUA} や tRNA-Leu_{CAA} のイントロン欠失株は明らかに生育が遅くなった。現在、なぜ特定のイントロンの欠失が酵母の生育に影響するかの解明を進めている。

3. スプライシング酵素群

前述のように、古細菌や真核生物の前駆体 tRNA のスプライシングは、基質の認識とスプライス部位の切断を司るスプライシングエンドヌクレアーゼ (Sen), 切り出されたエキソンをつなぐ tRNA リガーゼ等によって触媒される。古細菌の Sen は、 α_1 型、 α_2 型、 $(\alpha\beta)_2$ 型等のサブユニット構成を取る。結晶構造解析より、 α_1 型の場合も含め、二つのサブユニットのみが触媒機能を担い、残り二つは構造サブユニットとして働くことがわかった。他方、真核生物の Sen は、Sen2, Sen15, Sen34, Sen54 から成るヘテロ 4 量体である。古細菌の Sen と配列の相同性を持つ Sen2 と Sen34 がそれぞれ、5', 3' のスプライス部位の切断を担い、5'-エキソンとイントロンの 3' 末端には 2', 3'-環状ホスホジエステル基、イントロンと 3'-エキソンの 5' 末端には 5'-

OH 基を形成する (図 2 左端)。

Sen が切り出した tRNA エキシソンの結合反応は、エキソン間を結ぶリン酸基が ATP や GTP の γ 位のリン酸に由来する 5'-リン酸ライゲーションと、5'-エキソンの 2', 3'-環状ホスホジエステル中のリン酸基に由来する 3'-リン酸ライゲーションに大別される。前者を司る酵素としては、出芽酵母の Trl1 (Rlg1) が最も早く同定された⁵⁾。高等植物も類似のリガーゼを持つが、配列の相同性は高くない。この酵素は、5'-エキソンの 2', 3'-環状ホスホジエステル基を開裂する環状ホスホジエステラーゼ (CPDase), 3'-エキソンの 5'-OH 基を ATP や GTP を用いてリン酸化するポリヌクレオチドキナーゼ (PNKase), この 5'-リン酸基に ATP から AMP を転移させ、これを脱離基として 5'-エキソンの 3'-OH との間にホスホジエステルを形成するアデニル酸合成酵素 (ASTase) の三つの酵素活性ドメインを持つ (図 2 上段)。

HeLa 細胞抽出液中には 5'-リン酸ライゲーション, 3'-リン酸ライゲーション両活性が存在するが、配列上、前者を担う上記三つの活性ドメイン全てを持つ遺伝子はヒトゲノム上に存在しない。近年、脊索動物ナメクジウオで ASTase が、PNKase や CPDase とは別の遺伝子にコードされている 5'-リン酸リガーゼ系が見つかった⁶⁾。ヒトにも Trl1 やナメクジウオの CPDase に近い酵素 (2H CPDase) が存在すること、3'-エキソンの 5'-OH 基のリン酸化は、mRNA の 3' 末端形成因子の一つ hClp1 が触媒することがわかった⁷⁾。ヒトの hClp1 は ASTase 活性や CPDase 活性を持つポリペプチドではなく、Sen 複合体に結合しており、tRNA のスプライシング反応のどこまでを一つの複合体で処理す

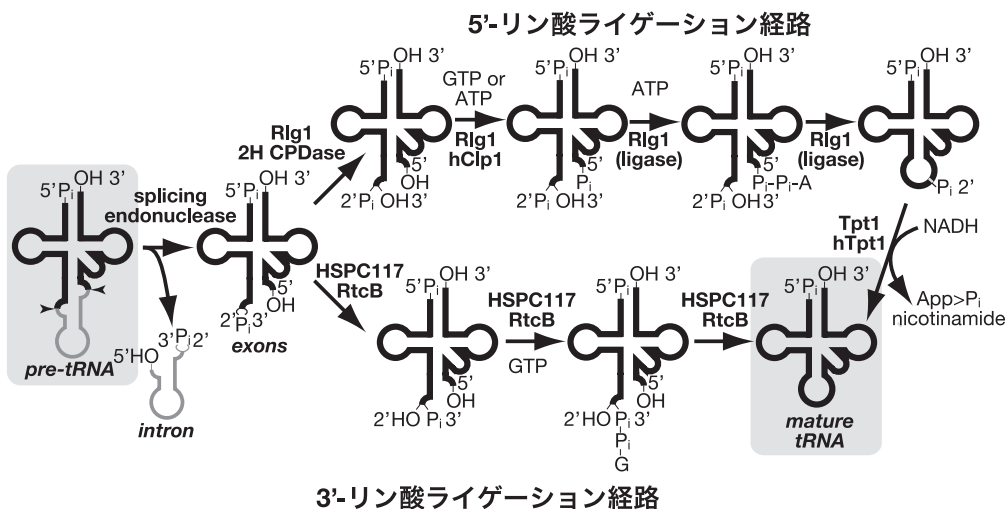


図 2 tRNA 型スプライシングの反応機構

るかすら、生物種間では異なっている。なお、ヒトの ASTase 活性を担うタンパク質は未同定のままである。

HeLa 細胞中の 3'-リン酸ライゲーション活性を司る酵素の素性も、長年謎であった。古細菌でも、ゲノム上、酵母や植物の 5'-リン酸リガーゼと相同な遺伝子は見つからず、tRNA リガーゼの同定は遅れていた。2011 年、ついにヒト 3'-リン酸リガーゼが、生化学的に同定された⁸⁾。これは HSPC117 と呼ばれるタンパク質で、古細菌のみならず、自己スプライス型の tRNA イントロンしか持たない真正細菌にも存在する RtcB のホモログだった。培養細胞中で HSPC117 をノックダウンすると前駆体 tRNA のスプライシング能が低下することから、本酵素は *in vivo* で機能していることが示された。HSPC117/RtcB は CPDase 活性も持つため、5'-エクソンの 3'末端を 2'-OH・3'-リン酸の形に開裂し、自身と共有結合している GMP をこの 3'-リン酸基に転移して活性化し、3'-エクソンの 5'-OH とのライゲーションを促すと考えられている(図 2 下段)。HSPC117 は、DDX1, CGI-99, FAM96B, ASW といったタンパク質と複合体を形成するが、RNA ヘリカーゼである DDX1 を含め、HSPC117 以外のサブユニットをノックダウンしても tRNA のスプライシングには影響がなく、これらタンパク質との相互作用の生理的意義はわかっていない⁹⁾。

3'-リン酸ライゲーションと異なり、5'-リン酸ライゲーションではエクソン結合部位に残った 2'-リン酸基の除去が必要である。これは、NADH を受容体として、ADP-リボース 1'-2'環状ホスホジエステルとニコチンアミドを生成するリン酸転移反応で除かれる(図 2 右端)。この反応を触媒する 2'-リン酸転移酵素 Tpt1 は酵母からヒトまで保存されており、酵母の *tpt1Δ* 株の致死性はヒトの遺伝子で相補される。しかし、マウスで *TPT1* を欠失させてもイントロンを含む tRNA の機能にはほとんど影響しない⁹⁾。おそらく、哺乳類における前駆体 tRNA のスプライシングは 3'-リン酸ライゲーションが主で、5'-リン酸ライゲーションはバックアップだと考えられている。

4. tRNA の成熟化と細胞内動態

tRNA の成熟化は基本的に核内で起こると長年信じられてきた。しかし、我々は、前述の出芽酵母の Sen が核ではなくミトコンドリアの細胞質表面に結合し、そこで機能することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、tRNA リガーゼも出芽酵母では細胞質に局在することを確かめている¹¹⁾。しかし、脊椎動物の Sen は核内にいることが知られており、tRNA リガーゼも核に局在すると考えられている。酵母で

tRNA が細胞質スプライシングを受けるためには、前駆体 tRNA が核外に運ばれる必要がある。以前より、importin-β タイプの tRNA 核外輸送担体 Los1/exportin-t を欠失した酵母は、スプライシング欠損を示すことが知られていた。*los1Δ* 株は成熟体 tRNA より強い前駆体 tRNA の核内蓄積を示すことから、Los1 が前駆体 tRNA の核外輸送の一部を担っていると考えられる¹⁰⁾。最近、分裂酵母の Los1 と成熟体 tRNA の共結晶の構造が解かれたが¹²⁾、Los1 はアクセプターステムを認識し、アンチコドンループに触れないことから、前駆体 tRNA も認識しうる構造を持つことが示された。tRNA のもう一つの輸送担体である Msn5/exportin-5 は前駆体の核外輸送には関わらず、後述するように、核内に取り込まれた成熟体 tRNA の再核外輸送に特化した輸送体だと考えられている。

mRNA のうち酵母の *HAC1* や動物の *XBP1* の mRNA は小胞体ストレス応答 (UPR) に際し、例外的に tRNA 型のスプライシングを受ける。これら mRNA の前駆体は小胞体に異常タンパク質が蓄積すると、Ire1 という小胞体上の膜貫通型エンドヌクラーゼによってスプライス部位を切断される。従って、動物細胞を含め、このスプライシングは細胞質で進行する。酵母ではここで生じた *HAC1* エクソンを細胞質にある Trl1 が結合するが、動物細胞でも *XBP1* のエクソンをつなげる未同定の RNA リガーゼは細胞質に存在する必要がある。平常時、酵母の *HAC1* 前駆体 mRNA は翻訳停止状態で細胞質のポリソーム上に保持されている。我々は、最近、酵母 Trl1 が既にこの時期の *HAC1* 前駆体 mRNA と結合しており、スプライス後の *HAC1* 成熟体 mRNA の翻訳再開を促す機能も持つことを明らかにした¹¹⁾。おそらく、原始的な真核生物に近い生物群では tRNA のスプライシングが細胞質で進行しており、その時期に UPR システムが獲得されたために tRNA 型スプライシング系が UPR に採用されたのであろう。酵母の Trl1 は、その後に新たな翻訳制御機能まで獲得したものと思われる。

スプライシングの終了した tRNA は細胞質に留まって機能するのではない。我々と Hopper らのグループは、tRNA が核と細胞質を行き来しつつ機能することを明らかにした^{13,14)}。動物細胞でも同様の輸送が報告され、tRNA の核-細胞質間シャトルは種を超えた共通の現象であることがわかった。当初、シャトル機能は核内の異常 tRNA 分解システムを利用した成熟体 tRNA の品質管理や、細胞質の成熟体 tRNA 量を調整することによる翻訳制御に関わると考えられていた。2011 年、酵母 tRNA-Phe_{GAA} の 37 位の wybu-

tosine**化修飾で、細胞質でスプライスされた tRNA が一度核内に戻った後、この修飾に必要な多段階の反応が始まることを報告された¹⁵⁾。すなわち、ある種の tRNA の成熟化には複数回の tRNA の核-細胞質間移動が必要だったのである。

この核内輸送因子に関して Hopper らは、栄養飢餓時に充進する tRNA の核内輸送には importin-β ファミリーに属す Mtr10 が関わると報告している¹⁴⁾。我々も新規 tRNA 結合タンパク質の解析を通じ、Hsp70 ファミリーに属す Ssa2 が tRNA の核内輸送に関わることをつかんでおり、現在解析を進めている (未発表)。近年、Mangroo のグループは栄養飢餓時の tRNA の核内蓄積充進がイントロンを含む遺伝子に由来する tRNA に特徴的であり、成熟化後の tRNA の核内輸送の性質がイントロンの有無で左右されるという魅力的な仮説を提唱した¹⁶⁾。しかし、Hopper らの過去の報告に加え、我々もイントロンを含まない遺伝子にコードされる開始 tRNA-Met_{CUA} や tRNA-Lys_{CUU} が栄養飢餓時に核に蓄積することを確認しており (未発表)、この仮説についてはより慎重な検証が必要だと思われる。

5. おわりに

tRNA の研究は、分子生物学の黎明期からずっと続けられているが、いまだにその一生の完全な理解からはほど遠い。どうして、たかだか数十 nt のイントロンを除くのに、これほど質の異なる手段を使うのだろうか。一見すると不要に見える tRNA のイントロンは、どうやってゲノム上に保持されているのだろうか。tRNA の核-細胞質間の出入りのバランスは、どのように計っているのだろうか。tRNA は、依然、興味深い現象を提供してくれる驚きの “small RNA world” である。

- 1) Heinemann, I.U., Söll, D., & Randau, L. (2010) *FEBS Lett.*, 584, 303–309.
- 2) Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F., & Sekine, Y. (2007) *Science*, 318, 450–453.
- 3) Szweykowska-Kulinska, Z., Senger, B., Keith, G., Fasiolo, F., & Grosjean, H. (1994) *EMBO J.*, 13, 4636–4644.
- 4) Mori, S., Kajita, K., Endo, T., & Yoshihisa, T. (2011) *RNA*, 9, 1760–1769.
- 5) Phizicky, E.M., Schwartz, R.C., & Abelson, J. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 2978–2986.

**wybutosine : グアノシンの六員環の隣に五員環が縮合した 5+6+5 の三環構造に、さらに分枝状構造の加わった複雑な構造を持つ修飾ヌクレオチド。

- 6) Englert, M., Sheppard, K., Gundllapalli, S., Beier, H., & Söll, D. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 16834–16839.
- 7) Weitzer, S. & Martinez, J. (2007) *Nature*, 447, 222–226.
- 8) Popow, J., Englert, M., Weitzer, S., Schleiffer, A., Mierzwa, B., Mechtler, K., Trowitzsch, S., Will, C.L., Lührmann, R., Söll, D., & Martinez, J. (2011) *Science*, 331, 760–764.
- 9) Harding, H.P., Lackey, J.G., Hsu, H.-C., Zhang, Y., Deng, J., Xu, R.-M., Damha, M.J., & Ron, D. (2008) *RNA*, 14, 225–232.
- 10) Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., & Endo, T. (2003) *Mol. Biol. Cell*, 14, 3266–3279.
- 11) Mori, T., Ogasawara, C., Inada, T., Englert, M., Beier, H., Takezawa, M., Endo, T., & Yoshihisa, T. (2010) *Mol. Biol. Cell*, 21, 3722–3734.
- 12) Cook, A.G., Fukuhara, N., Jinek, M., & Conti, E. (2009) *Nature*, 461, 60–65.
- 13) Takano, A., Endo, T., & Yoshihisa, T. (2005) *Science*, 309, 140–142.
- 14) Shaheen, H.H. & Hopper, A.K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11290–11295.
- 15) Ohira, T. & Suzuki, T. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 10502–10507.
- 16) Chafe, S.C., Pierce, J.B., Eswara, M.B., McGuire, A.T., & Mangroo, D. (2011) *Mol. Biol. Cell*, 22, 1091–1103.

吉久 徹

(名古屋大学物質科学国際研究センター)

New aspects on tRNA-type Splicing

Tohru Yoshihisa (Research Center for Materials Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

細胞内侵入性細菌と宿主のオートファジーを介した攻防

1. はじめに

細菌の多くは、ウイルスと異なりその増殖に宿主細胞を必要とせず、宿主細胞内に侵入せずに粘膜層や表皮などで増殖することができる。しかしながら、実は様々な細菌が宿主細胞内に多様な戦略により侵入し、増殖していることが知られている。細菌にとって宿主細胞内への侵入は、宿主の免疫を逃れ、宿主細胞内の栄養を享受できるという利点があるが、これに対し宿主側も、エンドソーム・リソソーム系という分解系を用いて対抗している。したがって、細胞内で増殖することのできる細菌は、宿主による分解系を逃れることを可能にするなんらかの機構を有している。宿主側は、こういった菌に対してさらに異なる自然免