

55. RNA キナーゼの分子機構と生体内における役割

花田 俊勝

大分大学 医学部 細胞生物学講座

Key words : RNA 代謝, RNA キナーゼ, 神経変性疾患

緒言

哺乳類における高次機能システムは非常に複雑な制御を受けており、これらの破綻が様々な病態に関与すると考えられている。Messenger RNA (mRNA)、transfer RNA (tRNA)、ribosomal RNA (rRNA) の代謝機構や、近年注目されている non coding RNA は様々なストレス環境に応じて高度に調節され、遺伝子発現やタンパク質の生合成調節に関与している。またこれらの分子機構が神経変性疾患や発癌等の疾患に関与しているという報告が相次いでおり、新たな病態機構の解明と治療への応用が期待される。我々は、2007 年に哺乳類で初めて報告された RNA キナーゼ CLP1 に着目し、その機能解析を進めてきた¹⁾。その結果、CLP1 は tRNA 前駆体スプライシング酵素複合体中で分子間をつなぐアダプターとしての役割を持ち、そのキナーゼ活性は tRNA 前駆体の成熟化に重要であることが判明した。さらに生体内における RNA キナーゼ活性の役割について解析するため CLP1 キナーゼ活性欠損ノックインマウスを樹立したところ、このマウスは進行性の神経変性病を発症した。このマウスでは異常な tRNA 断片が細胞内に蓄積しており、これにより神経細胞の酸化ストレスに脆弱となり神経細胞死に至ることが示唆された²⁾。しかしながら、その病態分子機構については未だ不明な点が多い。これまでの研究から、細胞ストレスを惹起して神経細胞死の原因となる細胞内に蓄積する tRNA 断片種の可能性として、tRNA 前駆体から生じる Tyrosine tRNA 前駆体の 5'exon 断片と 3'exon 断片、さらに Isoleucine tRNA 前駆体の intron 断片の 3 種の RNA 断片が報告されたが、実際に生体内で神経細胞ストレスを惹起するかは不明であった²⁻⁴⁾。本研究において、マウス胎児線維芽細胞およびヒト神経芽細胞腫細胞株に各 tRNA 断片を導入して酸化ストレスまたは神経分化における各 RNA の作用を解析し、その結果 5'exon 断片が p53 の活性化を増強して細胞の生存に影響を与えることが判明した。

方法

1. マウス線維芽細胞 MEF とヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y への核酸導入

in vitro transcription 法 (MEGAscript RNA kit) で各 tRNA 断片を合成した。tRNA 断片の細胞内導入には、リポフェクション法 (Lipofectamine RNAiMAX) を用いた。リポフェクション試薬と各 tRNA 断片を混合して培養細胞中へ添加し、24 時間後に細胞を過酸化水素 (100 μ M) で 1 時間刺激した。その後継時的に p53 の活性化および生存細胞数を調べた。SH-SY5Y の分化については、tRNA 断片を細胞に導入して 24 時間後レチノイン酸 (15 μ M) で 48 時間刺激して神経分化を誘導した。CRISPR/Cas9 システムによる細胞株のゲノム編集には、pX459 プラスミド (addgene) に標的配列のガイド RNA を挿入し、エレクトロポレーションにて導入した。SH-SY5Y にプラスミドを導入した後、24 時間後にピューロマイシンで 2 日間薬剤選択を行った。その後、限界希釈法にて遺伝子改変細胞をクローニングした。

2. tRNA 断片結合タンパク質の同定

12C6 または、13C6 L-リジンと L-アルギニンを含む培地で培養した SH-SY5Y を破碎し (12C6 または 13C6 タンパク質破碎液を、それぞれ、light 破碎液、heavy 破碎液とする)、タンパク質濃度を調整した。Tyrosine tRNA 3'側断片と Tyrosine tRNA 5'側断片をそれぞれ light 破碎液と heavy 破碎液に添加し、プロテアーゼで消化した。それぞれの液を等量ずつ混合し、15% SDS-PAGE によって分離した。銀染色によりタンパク質断片を検出し、バンドを切り出

した。切り出したタンパク質断片は、還元アルキル化及びトリプシン消化して、Nano LC/MS/MS により分析を行った。軽いアミノ酸及び重いアミノ酸でラベルされたペプチドは化学的に同一であるので、逆相クロマトグラフィーにおいて同時に溶出され、同時に MS 分析される。得られた MS スペクトルにおける両タンパク質に由来するペプチドのピーク強度の比率から、実験試料中のタンパク質の発現量の変化を検出した。

結果および考察

CLP1 の RNA キナーゼ活性欠損マウスは神経変性病を発症するが、そのマウスの細胞内には Tyrosine tRNA 5'側断片が主に蓄積しており、その結果、酸化ストレスによる p53 の活性化が増強されると報告されている²⁾。また、トルコで発見されたヒト CLP1 変異の患者では、マウス同様、進行性の先天性神経変性疾患である橋小脳低形成を発症し、細胞内には Isoleucine tRNA intron 断片が多く蓄積していた³⁾。一方、Schaffer らは Tyrosine tRNA 3'側断片の細胞内蓄積が神経変性疾患を惹起する主な原因であると報告した⁴⁾。これらの報告から、実際にはどの tRNA 断片が最も p53 を活性化するか、またどの tRNA 分子が最も病態発症に関与するのかを検証するため、まずマウス胎児線維芽細胞 (MEF) に tRNA 断片を導入し、酸化ストレスに対する細胞反応について解析した。その結果、Tyrosine tRNA 5'側断片を導入した細胞において酸化ストレスによる p53 の活性化が増強した。

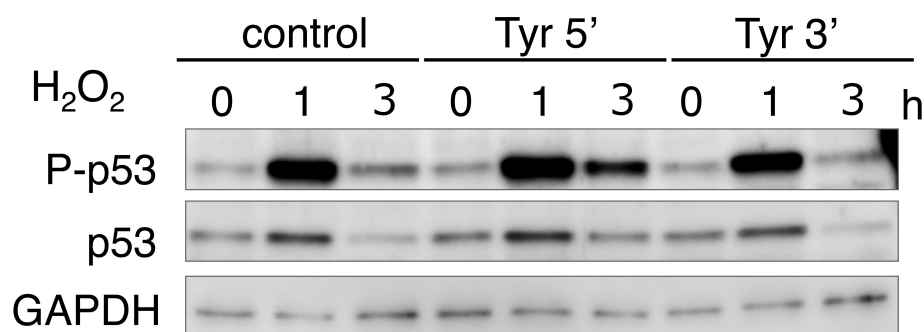


図 1. tRNA 断片を導入した MEF 細胞における酸化ストレス応答

マウス胎児線維芽細胞株 (MEF) に、Arginine tRNA 5'側断片 (Control)、Tyrosine tRNA 5'側断片 (Tyr 5')、Tyrosine tRNA 3'側断片 (Tyr 3') の各 RNA を導入し、24 時間後に過酸化水素 (100 μ M) で刺激した。ウエスタンブロットにて経時的に p53 のリン酸化 (S18) を解析した。

この tRNA 断片の細胞内蓄積が、神経の分化の際に細胞ストレスを惹起するか確認するため、SH-SY5Y に tRNA 断片を導入し、レチノイン酸で分化を誘導した。ウエスタンブロットにて経時的に p53 の活性化を調べたところ、Tyrosine tRNA 5'側断片を導入した細胞において p53 の活性化増強を認めた。

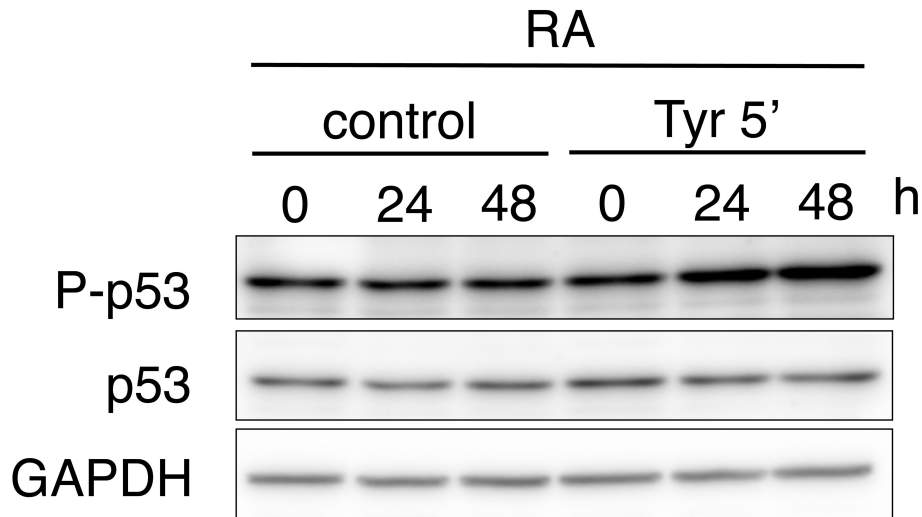


図2. tRNA 断片を導入した神経細胞株の分化誘導に伴う p53 の活性化

SH-SY5Y に、Arginine tRNA 5'側断片 (Control)、Tyrosine tRNA 5'側断片 (Tyr5') の各 RNA を導入し、24 時間後にレチノイン酸 (15 μ M) で分化を誘導した。その後、ウェスタンブロットにて経時的に p53 のリン酸化 (S15) を解析した。

この結果より、Tyrosine tRNA 5'側断片の細胞内蓄積が神経の分化の際に p53 を活性化することにより細胞死を惹起している可能性が示唆された。さらに tRNA 断片を導入した SH-SY5Y に対し、レチノイン酸による神経分化を誘導して 48 時間後に生存細胞数を計測したところ、Tyrosine tRNA 5'側断片を導入した細胞のみ時間経過とともに有意に細胞数が減少した。また、p53 遺伝子をノックアウトした SH-SY5Y 細胞においては Tyrosine tRNA 5'側断片の細胞分化および生存に対する影響は認めなかったため、p53 経路が関与しているものと考えられた。

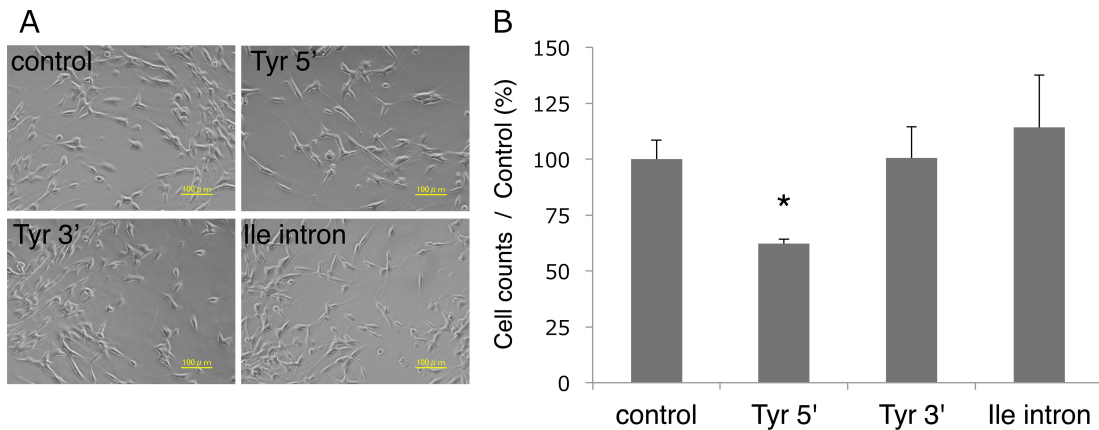


図3. tRNA 断片を導入した神経細胞株における分化誘導と細胞死

SH-SY5Y に、Arginine tRNA 5'側断片 (Control)、Tyrosine tRNA 5'側断片 (Tyr5')、Tyrosine tRNA 3'側断片 (Tyr3')、Isoleucine tRNA intron の各 RNA を導入し、24 時間後にレチノイン酸 (15 μ M) で分化を誘導した。48 時間後、細胞数を計測し、Control に対する割合を算定した。Error bar: SD. *: $P=0.004$ (ANOVA)

これらの結果より、細胞ストレスを惹起する可能性が示唆されていた Tyrosine tRNA 5'側断片、Tyrosine tRNA 3'側断片、Isoleucine tRNA intron 断片のうち、実際に p53 の活性化を増強し細胞死に影響を及ぼす tRNA 断片は Tyrosine tRNA 5'側断片であることが明らかになった。

次に、Tyrosine tRNA 5'側断片がどのような分子機構によって細胞ストレスを増強するのかを明らかにするため、直接結合するタンパク質の探索を行った。Tyrosine tRNA 5'側断片と SH-SY5Y の細胞破砕液を混合し、プロテアーゼ処理した試料を SDS page で電気泳動した。その結果、Tyrosine tRNA 5'側断片に量依存的に結合するタンパク質を認めため現在プロテオーム解析を施行している。

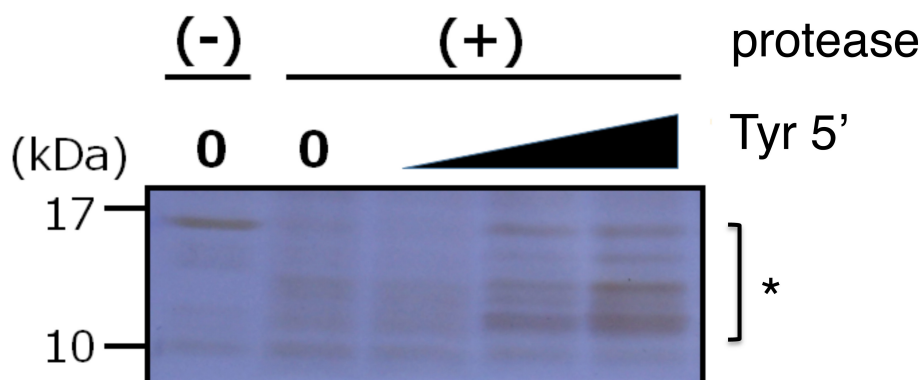


図 4. 5' tyrosine tRNA 断片に結合するタンパク質の同定

Tyrosine tRNA 5'側断片と SH-SY5Y の細胞抽出液を混合し、さらにプロテアーゼ処理を行い SDS-PAGE にてタンパク質を分離した。Asterisk: Tyrosine tRNA 5'側断片と反応させた試料において RNA 断片と結合していると思われる特異的なタンパク質を認めた。

近年、miRNA や lncRNA などタンパク質をコードしない様々な RNA の発見とその機能が注目されている。tRNA においても、次世代シーケンサーの技術革新により生体内には tRNA を由来とする小 RNA が大量に存在していることが知られており、その役割について関心が持たれている。Tyrosine tRNA 5'側断片は正常の細胞においても酸化ストレスにより細胞内に蓄積することを確認しており、細胞ストレス機構の一端を担っている可能性があると思われた。

本研究では、3種の tRNA 断片のうち最も細胞ストレスを惹起する RNA 種を同定するとともに、*in vivo*においても神経変性等の病態の原因となることを証明する予定である。現在、生体が透明であり卵ふ化後より発生段階が容易に追跡できるという利点を備えた小型魚類モデルを用いて解析を進めている。本モデルにより、Tyrosine tRNA 5'側断片が真の神経変性の原因であることを証明するとともに、他の RNA 代謝異常が原因となりうる疾患のモデルを作製し、これらの疾患の全容解明を目指したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学生体防御医学研究所の石谷太および松本雅記である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Weitzer S, Martinez J. The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature*. 2007;447(7141):222-6. PMID: 17495927
- 2) Hanada T, Weitzer S, Mair B, Bernreuther C, Wainger BJ, Ichida J, Hanada R, Orthofer M, Cronin SJ, Komnenovic V, Minis A, Sato F, Mimata H, Yoshimura A, Tamir I, Rainer J, Kofler R, Yaron A, Eggan KC, Woolf CJ, Glatzel M, Herbst R, Martinez J, Penninger JM. CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss. *Nature*. 2013;495(7442):474-80. doi: 10.1038/nature11923. PMID: 23474986
- 3) Karaca E, Weitzer S, Pehlivan D, Shiraishi H, Gogakos T, Hanada T, Jhangiani SN, Wiszniewski W, Withers M, Campbell IM, Erdin S, Isikay S, Franco LM, Gonzaga-Jauregui C, Gambin T, Gelowani V, Hunter JV, Yesil G, Koparir E, Yilmaz S, Brown M, Briskin D, Hafner M, Morozov P, Farazi TA, Bernreuther C, Glatzel M, Trattng S, Fricke J, Kronnerwetter C, Bainbridge MN, Gezdirici A, Seven M, Muzny DM,

Boerwinkle E, Ozen M; Baylor Hopkins Center for Mendelian Genomics., Clausen T, Tuschl T, Yuksel A, Hess A, Gibbs RA, Martinez J, Penninger JM, Lupski JR. Human CLP1 mutations alter tRNA biogenesis, affecting both peripheral and central nervous system function. *Cell*. 2014;157(3):636-50. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.058.PMID: 24766809

- 4) Schaffer AE, Eggens VR, Caglayan AO, Reuter MS, Scott E, Coufal NG, Silhavy JL, Xue Y, Kayserili H, Yasuno K, Rosti RO, Abdellateef M, Caglar C, Kasher PR, Cazemier JL, Weterman MA, Cantagrel V, Cai N, Zweier C, Altunoglu U, Satkin NB, Aktar F, Tuysuz B, Yalcinkaya C, Caksen H, Bilguvar K, Fu XD, Trotta CR, Gabriel S, Reis A, Gunel M, Baas F, Gleeson JG. CLP1 founder mutation links tRNA splicing and maturation to cerebellar development and neurodegeneration. *Cell*. 2014;157(3):651-63. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.049. PMID: 24766810