

博士論文

放射線ストレスによるメチオニン転移 RNA の顆粒形成の解析

片野 厚人

## 内容

1 略語一覧 .....	4
2 要旨 .....	6
3 序文 .....	7
3-1 tRNA 概論 .....	14
3-2 tRNA のストレス応答 –細胞内局在 .....	20
3-3 メチオニン tRNA .....	22
3-4 細胞のストレス応答 –ストレス顆粒 .....	26
3-5 In Situ Hybridization (ISH) .....	29
3-6 先行研究 .....	32
4 目的 .....	34
5 方法 .....	35
5-1 RNA プローブの作成 .....	36
5-2 細胞培養へのエックス線照射 .....	38
5-3 染色 .....	39
5-4 撮像及び計測 .....	44
6 結果 .....	46
6-1 エックス線照射後の H1299 における tRNA 顆粒の形成 .....	46
6-2 エックス線照射後の wt p53-H1299 における tRNA 顆粒の形成 .....	49
6-3 ストレスマーカータンパク質との共染色 .....	52
6-4 非小細胞肺がん A549 における tRNA 顆粒の形成 .....	56

7 考察 .....	59
7-1 tRNA のストレス応答 .....	61
7-2 共染色の結果に関して .....	67
7-3 Meti と Mete の相違 .....	70
7-4 Limitation と今後の展望 .....	74
8 結論 .....	77
9 謝辞 .....	78
10 参考文献 .....	79

# 1 略語一覽

略語	名称
AARS	aminoacyl-tRNA synthetase
ANG	angiogenin
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindole
DCP1A	mRNA-decapping enzyme 1A
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
DSB	double strand break
eIF	eukaryotic Initiation Factor
FISH	fluorescence in situ hybridization
GTP	guanosine triphosphate
HSF1	heat shock factor 1
IF	immuno fluorescence
IRES	internal ribosomal entry site
ISH	in situ hybridization
Mete	elongator Methionine tRNA
Meti	initiator Methionine tRNA
mRNA	messenger RNA
ncRNA	non-coding RNA
nSB	nuclear stress body
PABP1	polyadenylate binding protein 1
PB	processing body

PCR	polymerase chain reaction
PIC	pre-initiation complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNP	ribonucleoprotein
rRNA	ribosomal RNA
SG	stress granule
TC	ternary complex
TIA1	T-cell intracellular antigen 1
tiRNA	tRNA-derived stress-induced RNA
tRNA	transfer RNA

## 2 要旨

ストレスに起因する遺伝子発現の変化は真核生物細胞の生存にとって重要であり、翻訳レベルでの調節は細胞活性およびタンパク質レベルの即時変化に必要な可塑性を提供する。本研究ではヒト非小細胞肺癌の培養細胞株を用いて、電離放射線ストレスによるメチオニン tRNA ( $\text{tRNA}^{\text{Met}}$ ) の細胞内分布の変化を解析した。照射後の培養細胞株において initiator  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$  は明らかな顆粒形成を示さなかったが、elongator  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$  は細胞質に顆粒を形成した。さらに、この顆粒がストレスマーカータンパク質である TIA1 と共局在することを明らかにした。ヒト由来細胞株において放射線による tRNA の細胞内動態に着目をした研究はこれまでになく、新たな知見をもたらさう。将来的には、同現象に立脚した分子マーカー等の応用技術への展開が期待される。

### 3 序文

癌治療および健康への放射線被ばくの影響を検討するに際して、個々の細胞が電離放射線にどのように生物学的に反応するかは非常に重要である。電離放射線照射の直接・間接作用による deoxyribonucleic acid (DNA) への影響は最もよく知られた反応であり、塩基損傷、一本鎖切断、二本鎖切断が誘発される[1]。1 Gy の放射線に細胞を暴露すると約 3,500 個の DNA 損傷が生じ、その内訳は 1,500~2,500 個の損傷塩基、1,000 個の一本鎖切断、40 個の二本鎖切断といわれている[2]。

二本鎖のうち一方の鎖のみが障害を有する場合は、他方の鎖を鋳型として DNA 修復をする多数の修復機構が存在する。単一のベースの損傷を修復するベース切除修復 (base excision repair)、大規模なヌクレオチド鎖損傷が起きた際に機能するヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair)、DNA 複製時の塩基異常を修正するミスマッチ修復システム (mismatch repair) の3つは特徴的な反応として広く知られており、2015年に Tomas Lindahl, Paul Modrich, Aziz Sancar がノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい[3-5]。

一方、DNA 二本鎖切断 (double strand break : DSB) は DNA 損傷のより有毒な形態であり、細胞毒性効果は一本鎖 DNA 切断のおよそ 300 倍であるとの報告もある[6]。このため、真核細胞では二本鎖切断を迅速に検出する機構を有する。Ku70 / Ku80 ヘテロ二量体 (KU) は二本鎖切断部位を認識し、DNA 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit : DNA-PKcs) を補充して、DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-

dependent protein kinase : DNA-PK) を構成する [図 1]。DNA-PK は自己リン酸化すると共に XRCC4 や Artemis 等の DNA 修復タンパク質をリン酸化し、非相同末端結合 (non-homologous end joining) を誘導し、DNA 修復を行う [7, 8]。また、Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex により認識された二本鎖損傷 [9] は、phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases (PIKK) ファミリーに属する Ataxia telangiectasia mutated (ATM) シグナル伝達の活性化を導き [10]、細胞障害の程度に応じてアポトーシス、細胞周期停止、DNA 修復等の細胞反応に至る [1, 11]。G1/S チェックポイントを媒介する p53 [12]、および CDC25 ホスファターゼを阻害することによって G2/M チェックポイントを活性化する CHK2 は細胞周期コントロールの代表例である [13]。また、ATM 基質の一つにはヒストン変異体 H2AX があり、この C 末端側の Serine 139 残基が ATM kinase により速やかにリン酸化される [14, 15]。この反応を利用して、 $\gamma$ -H2AX (Serine リン酸化 H2AX) フォーカスや損傷修復タンパク質 (53BP1 等) は DNA 損傷を検出する際に有益な分子マーカーとして利用されてきた [16, 17]。



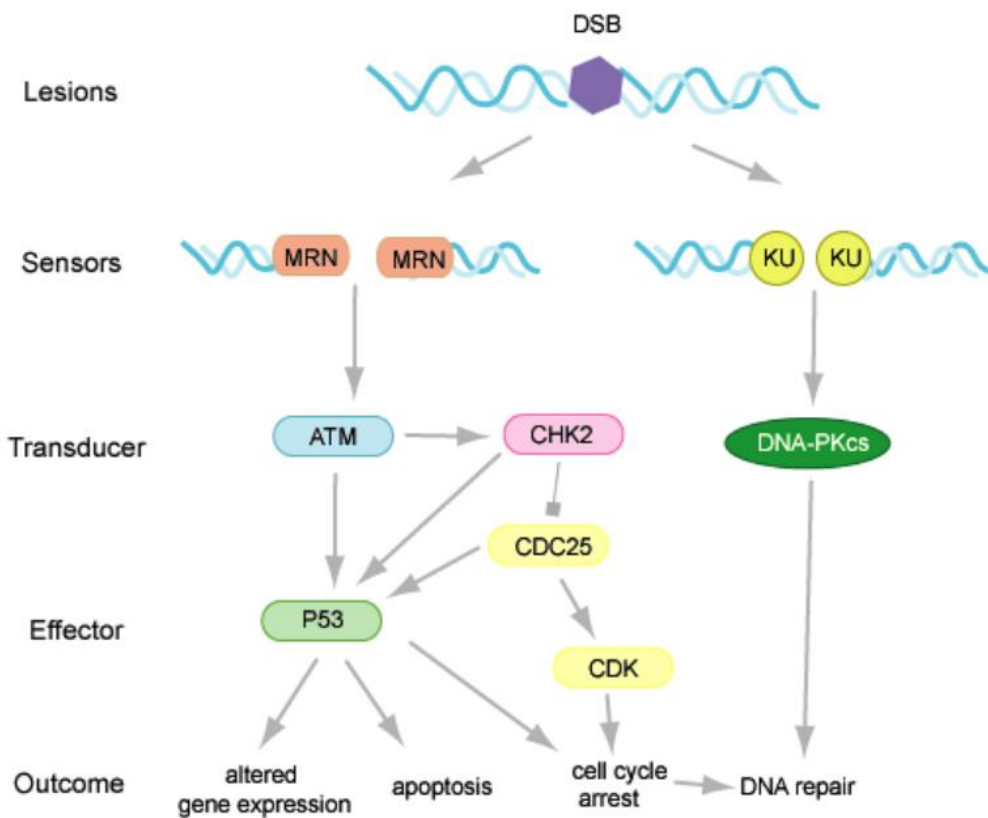


図1 DNA 損傷によって引き起こされる細胞内応答のシェーマ ([18]より改編)。哺乳類においては相同組換え (右列) および非相同末端結合 (左列) の2つの多段階による経路が特徴的である。DNA 損傷 (Lesion) の異常をセンサー (Sensor) が検知し、トランスデューサー (Transducer) により媒介され、直接作用を発揮するエフェクター (Effector) へと細胞内シグナルが伝達され最終的に作用 (Outcome) する。

一方、古典的生物観においては、DNA の転写産物である Ribonucleic acid (RNA) は DNA 情報をタンパク質に変換する中間産物として役割を果たすとの認識が中心であった [図 2]。しかしながら、近年になりタンパク質を直接コードしないゲノム DNA 領域からの非コード RNA (non-coding RNA : ncRNA) が機能性 RNA として遺伝子調節過程に積極的に働いていることが分かるに従い、外因性ストレスに対する RNA 応答も研究対象として積極的にとり入れられるようになってきた[19, 20]。ストレス応答において中心的な役割を果たす遺伝子発現の調節は、転写および翻訳レベルといった多段階のプロセスにおいて ncRNA により厳密な制御を受けていることが明らかにされてきている[21]。

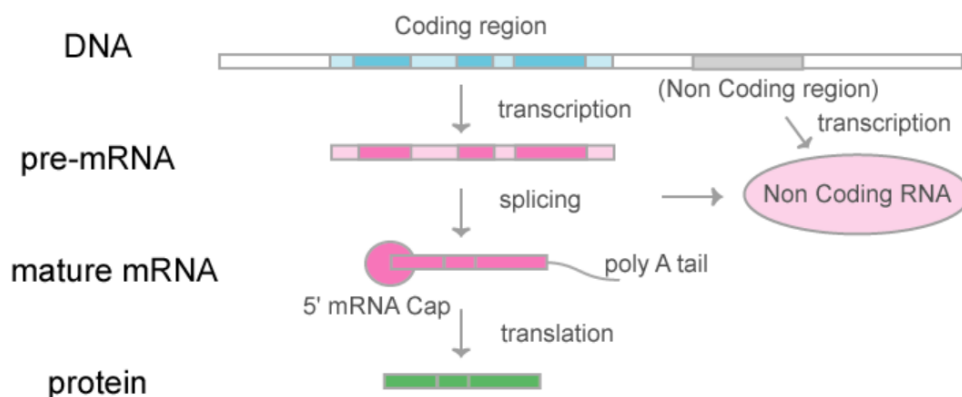


図2 セントラルドグマと非コード鎖 RNA のシェーマ。遺伝情報は DNA から messenger RNA に転写された後にスプライシング処理、5'末端にメチルグアノシンキャップ構造の付加、3'末端へのポリアデニル化を経て成熟 mRNA となる。成熟 mRNA はタンパク質に翻訳されることで機能するが、それ以外の非コード RNA による転写・翻訳制御機も重要であり、生物細胞における複雑で多様な表現系を規定していることが判明してきた。

1990年代初頭に Brockdorff と Brown が同時期に報告した XIST (X-inactive specific transcript) によるエピジェネティックなサイレンシングは、ncRNA の哺乳類において最初に同定された遺伝子調節プロセスの1つであった[22, 23]。X染色体上にある XIST というタンパク質をコードしない遺伝子は RNA を最終生成物とし、X染色体上の X不活性化中心 (X inactivation center) と呼ばれる塩基配列に作用して片方 X染色体の活性を制御していることが分かった。1998年になると、Fire、Mello らにより RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) が報告された[24]。RNAi は短鎖 RNA が内因性・外因性導入されることにより相補的な塩基配列を持つ RNA が分解される現象であり、短鎖 RNA によって制御される遺伝子発現調節機構と合わせて RNA サイレncシングと総称される[25, 26]。これらの研究が更なる後押しとなり、2000年代以降には 20塩基程度の低分子 RNA (micro RNA) を中心とした ncRNA による転写翻訳制御機構の解明が飛躍的に進んだといえる。

2001年にヒトゲノムが解読された結果、2万を超えるタンパク質として翻訳される遺伝子はゲノム全体のわずか2%以下であることが判明した[27, 28]。タンパク質をコードする遺伝子数が高等生物になるにつれて増加する一方、全ゲノムに対する割合が高等生物になるにつれて低下することは現代生物学の大きな驚きの1つであった[29][図3]。その後のトランスクリプトーム解析により、タンパク質をコードしていない領域からも転写産物として多くの ncRNA が発現し、翻訳調整などの機能を果たしていることが明らかとなってきた[30, 31]。すなわち、非コード領域のゲノム情報は機能性 RNA として転写されるこ

とで、発生段階を通じた変化や環境ストレスへの応答などの遺伝子発現調整に重要な役割を果たしているのである。

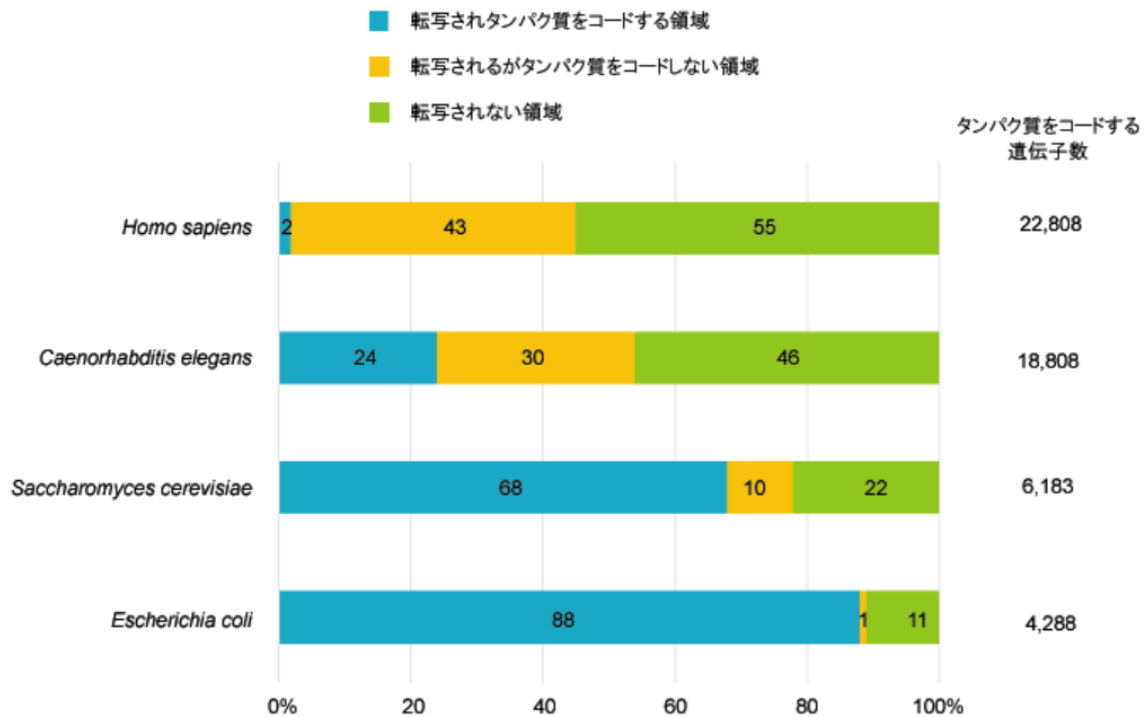


図3 全ゲノムに対するタンパク質コード領域の割合 ([32]より改編)。生物は複雑になるほど多くの遺伝子が必要になるため、遺伝子数、ゲノムサイズは大きくなる。その一方で全ゲノム領域に対するタンパク質をコードする遺伝子がコードされる領域の割合は低下する。これは非タンパク質コード領域が生物の複雑性に関与している可能性を示唆する。

2000年代後半からは200塩基から数万塩基におよぶ長鎖 ncRNA (long non-coding RNA) の研究が隆盛となった。長鎖 ncRNA は、発達および組織特異的発現パターン、および癌を含む様々な疾患において包括的な遺伝子調節を示すことが分かってきた。例えば MALAT-1 (metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1) と呼ばれる RNA をノックダウンすると細胞運動性が抑制され、p53 の発現促進を介して細胞増殖が抑えられるといったことが分

かってきている[33]。現在では生命活動における ncRNA の多様な遺伝子制御機能が次々と報告され、今後の更なる研究が期待される領域である。

	Non coding RNA の種類	略称	塩基長	特徴的な機能
Housekeeping RNA	transfer RNA	tRNA	70-100	ポリペプチド鎖への アミノ酸転移
	ribosomal RNA	rRNA	120-4700	リボソームユニットの 主要な構成成分
Regulatory RNA	micro RNA	miRNA	21-25	遺伝子発現の制御
	small nuclear RNA	snRNA	70-350	テロメア維持 RNA スプライシング
	small nucleolar RNA	snoRNA	70-300	リボソーム RNA の 化学修飾
	small interfering RNA	siRNA	21-23	配列特異的な遺伝子 発現の抑制
	piwi-interacting RNA	piRNA	24-30	トランスポゾンの抑制 機能
	long non coding RNA	lncRNA	200 以上	200 塩基以上の ncRNA の一般総称

表 1 代表的な nc-RNA の種類 ([34, 35]より改編)。Housekeeping RNA は、基本的な細胞機能の維持に必要な構成的遺伝子であり、生物の全ての細胞に発現される。Regulatory RNA は、細胞発達・分化の特定の段階または外部刺激に応答して産生される。これらは、遺伝子発現調節因子、タンパク質の活性のモジュレーター、転写後調節因子など多くの細胞プロセスに関与していることが判明してきているが、その作用機序に関して明らかにされているものは一部のみである。

### 3-1 tRNA 概論

最も古くより知られておりかつ細胞内含量の多い ncRNA は転移 RNA (transfer RNA : tRNA) とリボソーム RNA (ribosomal RNA : rRNA) であり、翻訳過程で中心的な役割を果たしていることは古くから知られてきた[36][図 4]。

1956 年、Zamecnik と Hoagland はラット肝臓細胞実験にて、放射線標識したアミノ酸をリボソームに運ぶ小分子として tRNA を発見した[37]。その後、酵母のアラニン tRNA を用いて、77 のヌクレオチド配列が 1965 年に Robert W. Holley によって明らかにされ[38]、1970 年代に入ると特徴的な L 字型の立体構造が、エックス線結晶学の研究を通じて同定されるようになった[39]。

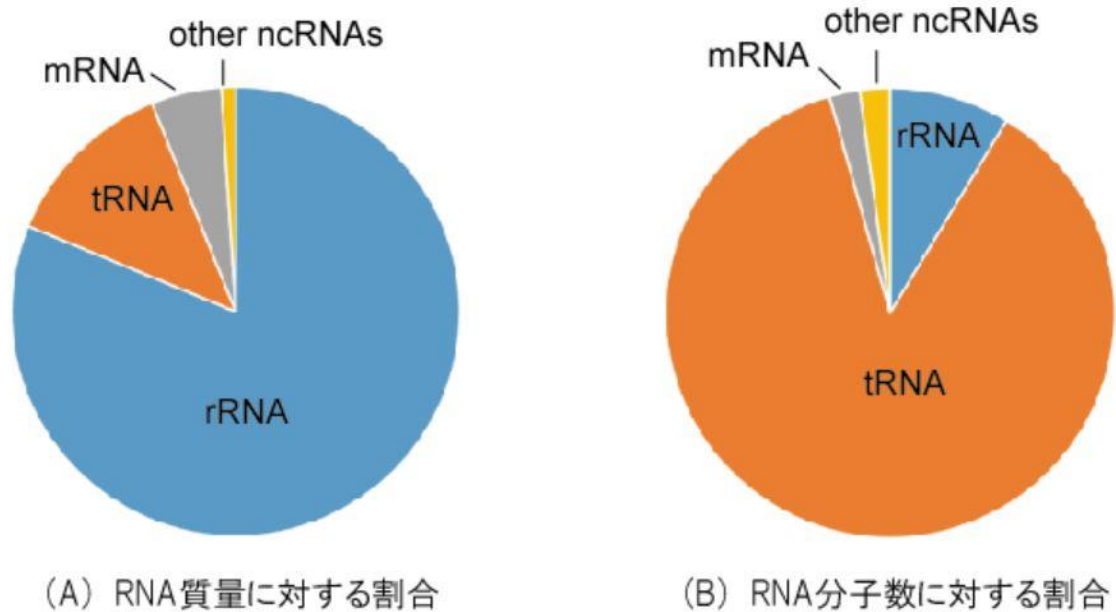


図4 培養細胞中の質量 (A) および分子数 (B) による RNA 分子の割合 ([20]より改編)。RNA 分子の総数は細胞あたり約  $10^7$  であると推定されている。質量ベースで比較するとその 80-90% の RNA は rRNA から構成される。tRNA は分子量が小さいため、全 RNA 質量に対する割合は 10-15% 程度であるが、モル濃度換算では rRNA の 10 倍程度の割合で存在する。図中の「other ncRNAs」には、snRNA、snoRNA および miRNA 等が含まれる。

現在、tRNAは76~90塩基長の生体内でL字型の立体構造を形成する小分子であることはよく知られている[40]。二次構造はクローバーリーフと呼ばれる3つのアーム(D・アンチコドン・T)とアクセプターシステムを持ち、これが折りたたまれて立体構造を構成する[41][図5]。

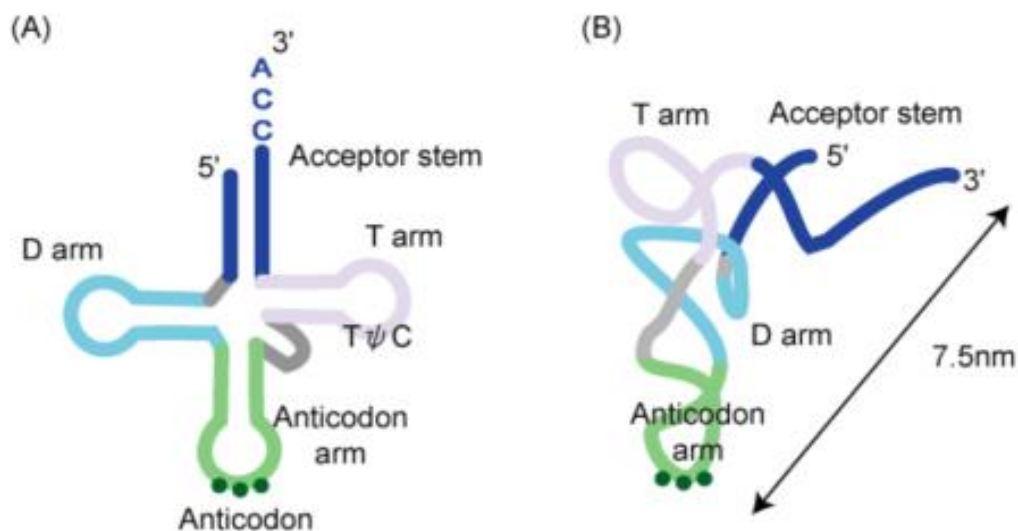


図5 (A) tRNAのクローバーリーフ状の二次構造. (B) L型に折り畳まれた立体構造 ([42]より改編)

アクセプターシステムはL字短腕側に相当する。5'および3'末端が互いに近接して7-9塩基長の二本鎖構造を形成し、3'末端はCCA (cytosine - cytosine - adenine) tailで終結する構造を持つ[43, 44]。アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase : AARS)によってCCA tail上の3'ヒドロキシル基に特定のアミノ酸が共有結合することで、アミノアシル tRNA を形成しポリペプチド鎖へアミノ酸を運搬する。Dアームは修飾塩基ジヒドロウリジン (Dihydrouridine) を含みL字長腕側の基部に相当し、tRNA前駆体から余剰配列を分解する際のリボヌクレアーゼPの認識部位である[45]。TアームはL字型の関節部に位置し、

T $\psi$ C (thymine-pseudouridine-cytosine) 配列を高率に含むことが知られている [46]。L字の長腕側の先端には、アンチコドンアームが位置し、リボソーム上で messenger RNA (mRNA) のコドンと対合する。アンチコドンの1文字目には、イノシンまたはシュードウリジン等の様々な修飾塩基がみられ、3文字目のコドン認識に冗長性 (redundancy) を持たせている。tRNA はリボソーム上のタンパク質合成部位で対応するアミノ酸を合成中のポリペプチド鎖に転移させるアダプター分子と考えられ、古典的細胞観では tRNA は核内で合成され、その役割をリボソーム上で終結するとの認識であった。

近年になり tRNA の成熟過程は核から細胞質への一方的な経路ではなく、細胞質-核内での移行を積極的に利用していることが明らかとなってきた。真核生物の tRNA 生成過程は、DNA から RNA ポリメラーゼ III によって転写されることで開始される。転写開始には2つのタンパク質因子 (transcription factor III B および III C) および tRNA 遺伝子内の2つの領域 A ボックス (5'-internal control region) および B-ボックス (3'-internal control region) を必要とする [47]。真核生物では、mRNA が RNA ポリメラーゼ II により転写されるのに対し、tRNA は RNA ポリメラーゼ III により核において転写される [48]。転写された tRNA の成熟化には、5'リーダー配列と3'トレーラー配列の除去、イントロンを除くスプライシング、官能基を塩基に導入する tRNA 修飾、CCA 配列及びアミノ酸の付加と数多くのステップを要する。

5'末端及び3'末端の tRNA トリミングにおけるリボヌクレアーゼ (RNase P、RNase Z) の関与は、原核生物だけでなく真核生物においても保存された反応である。一般的に3'-CCA 配列は tRNA 遺伝子自体にコードされておらず、真核生



物においてはクラス II-CCA 付加酵素により別個に添加される。生成された tRNA 前駆体は数十塩基のイントロンを有し、多くの場合にアンチコドンの第一塩基の 3'側に挿入されている。tRNA 核外輸送担体 Los1 を欠失した酵母株においては、前駆体 tRNA の強い核内蓄積及びスプライシング欠損を示し[49]、イントロンの除去過程は核ではなく細胞質で行われることが分かっている。すなわち、tRNA の成熟化には核と細胞質の協調が必要であり、更には、成熟化した tRNA は細胞質に留まり続けるのではなく、核と細胞質を往来しつつその機能を果たすことが近年になり報告されている[50]。

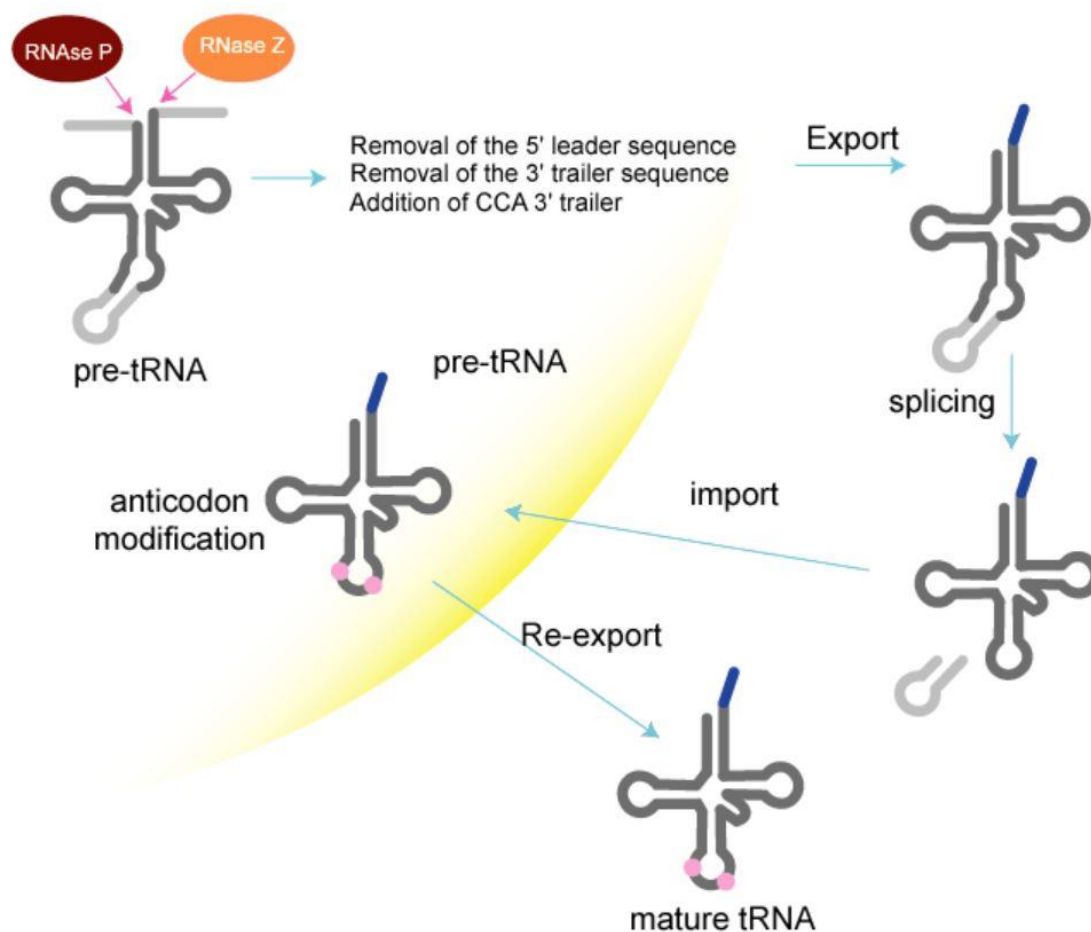


図6 tRNAの成熟過程の概要 ([51]より改編)。転写された直後の前駆体 tRNA には、その 5'末端や 3'末端、アンチコドンループに成熟 tRNA には見られない伸長配列およびイントロンが存在する。前駆体 tRNA が機能を持った成熟 tRNA になるためにはこのイントロン配列の除去を含めて、塩基配列修飾等の様々なプロセッシングを受ける。このスプライシング機構が細胞質におけるミトコンドリア外膜において活性化することが明らかにされている。

tRNA は構成的発現を呈する Housekeeping 遺伝子として知られていたが、発現量と悪性疾患の関わりも指摘され始めている。2009 年、Pavon-Eternod らは乳癌細胞株におけるミトコンドリア及び核由来の tRNA 分子の発現レベルが正常細胞と比較して 10 倍以上高いことを報告した[52]。この発現上昇は非特異的ではなく、tRNA<sup>Arg</sup>、tRNA<sup>Thr</sup>、tRNA<sup>Ser</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup> の上昇が同報告内の 6 種の乳がん細胞株で共通しており系統的な発現変化を呈することが明らかとなった。また、tRNA 発現レベルの上昇は、子宮頸癌[53]および卵巣癌[54]、多発性骨髄腫でも確認されており、多発性骨髄腫では分子標的薬 Bortezomib の投与による、発現プロファイルの改善に関しても言及されている[55]。これらの現象を臨床的有用性の高いツール (疾病早期発見のバイオマーカー、治療反応マーカーや癌治療のターゲット) とするにはまだまだ先が長いと思われるが、tRNA の分子生物学的研究は更なる知見の蓄積が期待される分野とも言える。

### 3-2 tRNA のストレス応答 —細胞内局在

mRNA とタンパク質との間の連結分子である tRNA が翻訳において中心的な役割を果たすことは古くから知られていたが、ストレス状況下における適応反応に関する報告は 2000 年代以降に活発となる。tRNA のストレス応答に関しては転写経路及び分解経路の活性・抑制による総発現量変化、修飾塩基の導入・欠損、3次元高次構造の変化、細胞内局在の変化などの経路が指摘されている[56][図 7]。

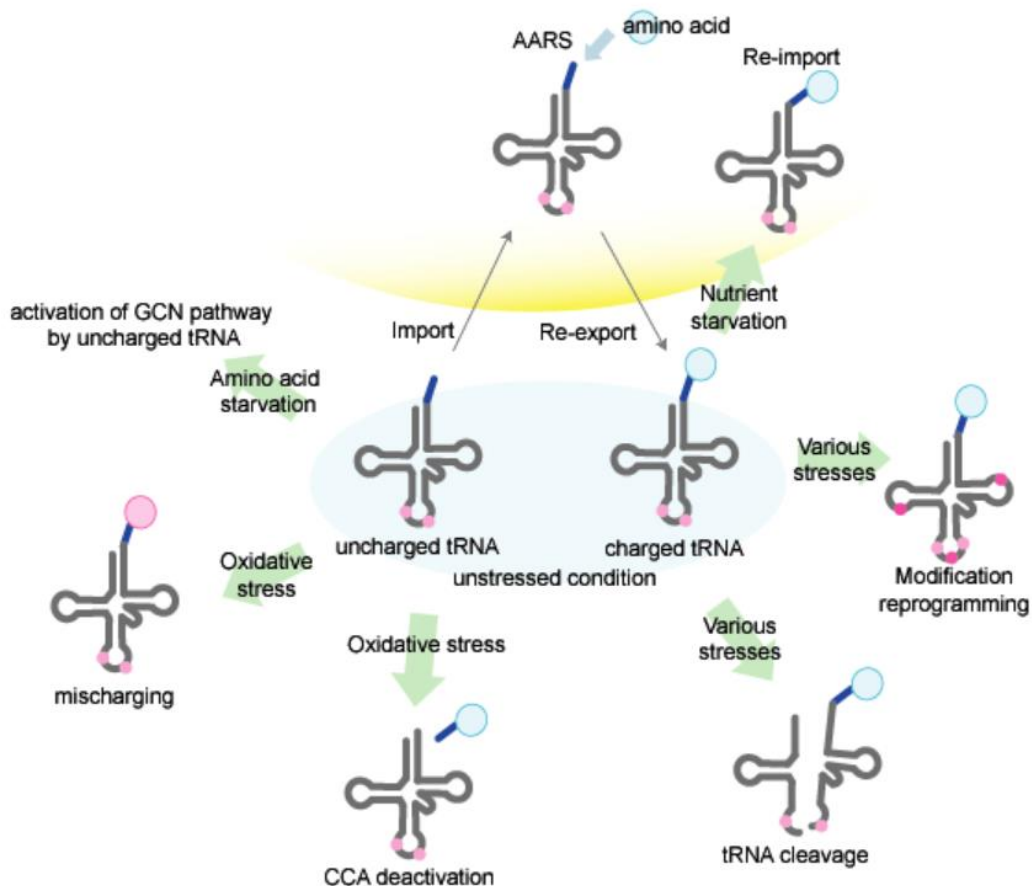


図 7 真核細胞における tRNA の外的ストレスに関するシエーマ ([56]から改編)。様々なストレスにより tRNA の応答は多様な経路を活性化する。アミノアシル tRNA 合成酵素はアミノ酸と対応する tRNA の対応づけを行う酵素であり、核内でその役割を担う。

2005年、Shaheenらは酵母を用いた実験で飢餓状況下の tRNA の核内蓄積を指摘し、成熟化後の tRNA の細胞内動態がストレス応答機能に関わる可能性が示唆された。彼らはこの核内輸送因子に関して importin- $\beta$  ファミリーに属す Mtr10 が関わりと報告している[57]。Takano らは tRNA 結合タンパク質の解析を通じ、熱ストレス状況下での HSP70 ファミリーに属する分子シャペロン (Ssa2p) が tRNA の核内輸送に関わることを報告している[58]。しかしながら、これらの輸送因子がどのように tRNA を認識・選別しているか等に関して明らかとなっているのは一部であり、細胞質核間の輸送系に関しては、今後より一層の研究成果が待たれるところである。

脊椎動物に関しても細胞質-核内輸送系は保存された系と考えられているが、HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞)、Hela 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) などのヒト由来の細胞株においては飢餓状態における tRNA 核内集積は明らかでないとされている[59]。すなわち、単純に酵母におけるストレス反応の結果をヒトへと適応することは容易ではない。ストレス状況下における tRNA の分子動態メカニズムは未だ十分に解明のされていない領域であり、今後重要な分子生物学的知見を提供し得る可能性がある。

### 3-3 メチオニン tRNA

mRNA 塩基配列がタンパク質のアミノ酸配列に翻訳される際に、最初に認識されるのは多くの場合 mRNA の 5'末端から最初の AUG コドンである。この配列は開始コドンとよばれ、メチオニンをコードしている。この際に用いられるメチオニン tRNA (initiator Methionine tRNA: Meti) は、機能的に他の elongator tRNA と区別され伸長型メチオニン tRNA (elongator Methionine tRNA: Mete) と配列が異なる。Meti の特徴的な塩基配列として、(i) アクセプターステムの末端の A1 : U72 塩基対の存在、(ii) アンチコドンステム中の 3 つの連続した G : C 塩基対 (G29G30G31 : C39C40C41) の配列の存在、および (iii) T $\psi$ C ループにおける A54 および A60 塩基の存在が挙げられる[60]。

翻訳開始時にアミノアシル化された Meti はグアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate : GTP) 及び真核生物翻訳開始因子 2 (eukaryotic initiation factor :eIF2) と共に三者複合体 (ternary complex: TC) を形成する[61]。リボソームの P 部位に送達された TC は、小 (40S) リボソームサブユニットに結合し、43S 開始前複合体 (pre-initiation complex : PIC ) を形成する。同複合体は mRNA 上の 5'末端非翻訳領域を、5'→3'方向に開始コドンを探検し開始コドン認識する。一方、翻訳される mRNA は 5'末端にはメチルグアノシンキャップ構造、3'末端へのポリアデニル鎖が存在し、それぞれ eIF4F のサブユニット eIF4E 及びポリアデニル酸結合タンパク質 (polyadenylate binding protein-1: PABP1 ) と結合している。更に、PABP1 は同じく eIF4F のサブユニット eIF4G と結合することで環状 mRNA を構成し、eIF4G は eIF3 を介して PIC と結合することで 48S 開始複合体が形成され

る。eIF5 媒介性の eIF2 結合 GTP の加水分解、その他の eIF (eIF1、eIF3、eIF4B、eIF4F および eIF5) の放出、および 60S サブユニットの結合を経て 80S 開始複合体を形成し、実際の翻訳の開始段階に進む。一方、メチオニンの伸長においては Mete が GTP 結合真核細胞伸長因子 1A (eukaryotic elongation factor 1A: eEF1A) と複合体を形成し、リボソーム A 部位に送達されペプチド鎖の伸長が行われ生体内で機能をしている。

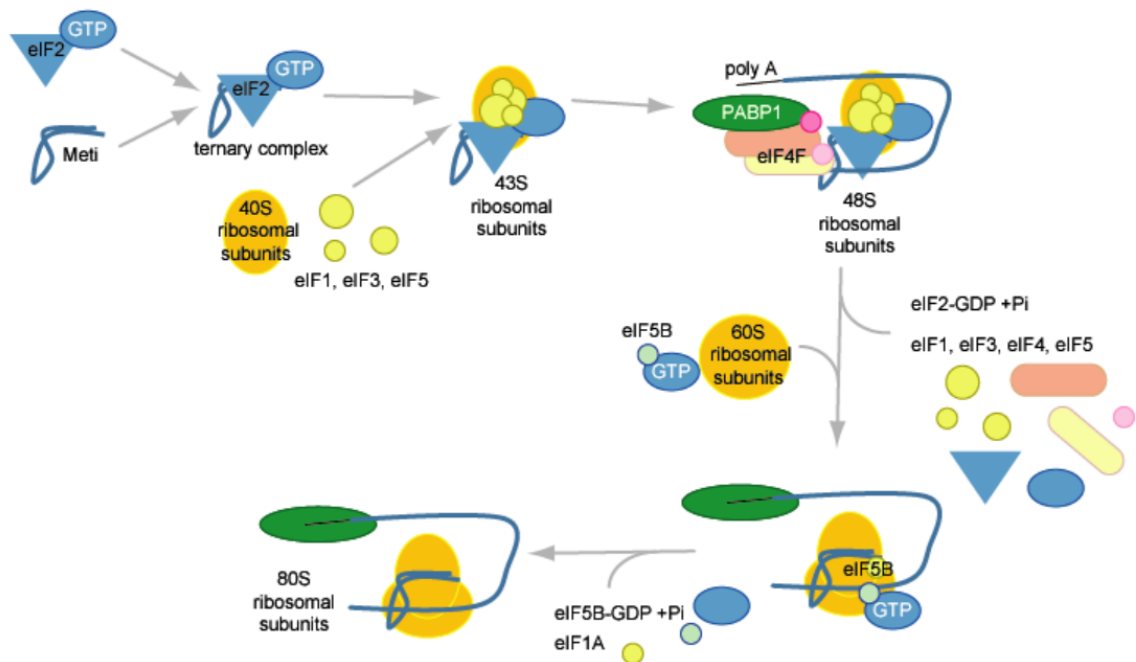


図 8 真核生物における翻訳開始プロセスのシエーマ ([62, 63]より改編)。真核生物開始因子 (eIF) は、真核生物翻訳の開始段階に関与するタンパク質である。これらのタンパク質は、開始コドン周辺の機能的リボソームの形成を安定化するのを助け、翻訳開始調節の役割も果たす。特に eIF2 は、GTP および initiator methionine tRNA との三者複合体を形成するタンパク質合成のための必須因子である。

近年においては **Metc** と **Meti** の発現が表現型に与える影響に関しても指摘がなされている。前項において指摘したように、癌細胞株においては tRNA 発現プロファイルの変更を認めることが知られているが、特にメチオニンに関しては翻訳開始の役割を担うこともあり比較的多くの報告が見られる。2014年に **Gingold** らは癌細胞と分化・停止細胞におけるメチオニン tRNA の発現を比較した[64]。 **Meti** は癌細胞において分化・停止細胞と比較して発現亢進を認めるのに対して、 **Metc** においては明らかではないと報告している。この結果は、 **Meti** の過剰発現を誘導した際に、ヒト上皮細胞が細胞増殖を上昇させることを示す研究と矛盾しないものである[65]。これらの報告は、活発化した癌細胞増殖に導かれた翻訳開始及びタンパク質合成のアップレギュレーションによる AUG コドン使用の増加を反映することを考えれば直観的に受け入れ易い研究結果である。更には、2016年に **Clarke** らは間質線維芽細胞において **Meti** の過剰発現が腫瘍増殖に関連すると共に血管新生を駆動するための細胞外マトリックス、特に II 型コラーゲンの分泌に影響を及ぼすことを示した[66]。同時期の **Birch** らの報告ではメラノーマ細胞を用い、 **Meti** の過剰発現が細胞表面の原形質膜にある細胞接着分子  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現を調整して転移および浸潤を引き起こすことを報告している[67]。これらの報告は **Housekeeping** な役割を果たすと考えられてきた tRNA の発現が、細胞の表現型にまで影響を及ぼすとした興味深い報告である。更には、細胞系の相違によりその表現型の影響が異なること、血管新生や転移・浸潤といった癌細胞に特徴的な表現型に関わることなど、注目に値する点も多く今後の研究成果が期待される。メチオニン tRNA 自体は古くから知られている分子にもかかわらず、ここ数年で臨床的重要性が再



検討されており、更なるメカニズムの解明が重要な知見となりうる可能性を有する。

### 3-4 細胞のストレス応答 — ストレス顆粒

細胞は外界からの様々なストレス刺激に対して生き残るため適応メカニズムを保有している。ストレス細胞において細胞死を積極的に誘導するシグナル伝達機構を有する一方、一時的な翻訳抑制機構を働かせることにより細胞の重篤な損傷を回避するストレス適応機構を有することも知られている。ストレス適応機構に関する細胞質構造体としてプロセシングボディ (Processing body : PB) とストレス顆粒 (Stress granule : SG) が広く知られている。PB は、非ストレス条件下でも存在する一方、SG は種々のストレス刺激に応答して形成される非膜性細胞質顆粒である。両者はリボ核酸とタンパク質の複合体であるリボヌクレオタンパク質 (Ribonucleoprotein : RNP) から構成される。

SG の形成はストレスによる翻訳抑制機構により誘導される。通常の SG 形成は、HRI、PERK、PKR、および GCN2 等の eIF2 $\alpha$  キナーゼを介した eIF2 $\alpha$  のストレス誘導リン酸化がトリガーとなる[68][表 2]。

略称	名称	原因となるストレス
PKR	protein kinase RNA-activated	ウイルス感染
GCN2	general control nonderepressible 2	飢餓ストレス、紫外線照射
PEK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase	小胞体ストレス
HRI	heme-regulated inhibitor	ヘム欠乏時

表 2 各種ストレスと翻訳開始を制御する eIF2 $\alpha$  キナーゼファミリー ([68]より改編)。哺乳動物細胞においては、異なる外部ストレスに応答して Ser-51 で eIF2 の  $\alpha$  サブユニットをリン酸化する 4 つの異なるキナーゼが同定されている。eIF2 のリン酸化は一般的な翻訳を低下させ、細胞がストレス損傷を補正するのに十分な時間を与え、ストレス修復に重要な遺伝子特異的翻訳を選択的に増強すると考えられている。

eIF2 $\alpha$ は、eIF2 $\beta$ 、 $\gamma$ とともに翻訳開始因子である eIF2 を構成するサブユニットである。Ser51 上の eIF2 $\alpha$  のストレス誘発リン酸化は、キャップ依存性翻訳開始に必要とされる TC のレベルを低下させることによってタンパク質翻訳を阻害する。翻訳開始が停滞することで翻訳過程下流の RNP が凝集し、これらに含まれる翻訳開始因子および RNA 結合タンパク質が SG の構成成分となる。一方、内部リボソーム侵入部位 (internal ribosomal entry site : IRES) エlementで開始されたキャップ非依存性翻訳は、eIF2 $\alpha$  のリン酸化により阻害されにくいため、ストレス細胞では IRES 含有 mRNA の一部が選択的に翻訳されることになる[69]。更に SG は DNA 損傷などによって活性化されるストレス応答 MAP キナーゼ (p38 および JNK) 経路を抑制し、アポトーシス誘導から保護的に機能することも知られている[70]。

PB は mRNA の分解やタンパク質およびマイクロ RNA による一時的な RNP 貯蔵の役割を担っている[71]。PB の主要な役割の一つは mRNA の分解であり、これにより mRNA 代謝が影響を受けるため、遺伝子発現を制御する上で重要な役割を果たすと言える。mRNA 分解の開始ステップは、脱アデニル化と呼ばれる 3'末端の poly (A) tail の短縮である。これを脱キャップ化酵素 (mRNA-decapping enzyme 1A : Dcp1a) が認識し、5'→3'方向へとエキソヌクレアーゼ Xrn1 によって分解されていくことで mRNA の分解を行う[72]。PB を示唆するマーカーとしては、これらの分解プロセスに含まれるタンパク質が知られている。

SG および PB はいくつかのタンパク質および mRNA 成分を共有するが、それぞれに固有なマーカーも存在する。免疫染色によりこれらを標識することで

目に見えない細胞レベルのストレスを可視化できるため、**SG・PB**の可視化は  
ストレス評価の指標として広く用いられている。

### 3 - 5 In Situ Hybridization (ISH)

In Situ Hybridization (ISH) は、固定された組織及び細胞における標的核酸を検出する非常に強力な技術である。

RNA はアデニン、グアニン、ウラシル、シトシンの四塩基から構成され、各々相補的な核酸塩基間において二本又は三本の水素結合を形成する。ISH の原理は、標的核酸とその相補的配列を有する一本鎖核酸分子 (プローブ) 間の特異的結合を利用している。プローブ分子は合成時に何らかの形で標識が為され、これを検出することで標的核酸の局在が明らかとなる。標識方法としては放射性同位体 (放射性標識プローブ) もしくは、ジゴキシゲニン (digoxigenin : DIG)、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) などの分子を取り込ませることで免疫組織化学的に検出する方法が知られている[図 9]。

ISH の幕開けは 1969 年に Gall/Pardue がショウジョウバエ唾液腺染色体を使用し放射性標識した 5S、18S および 28S rRNA を染色体にハイブリダイズさせて検出したことから始まった[73]。しかしながらこの時点では、分子生物学的手法も限られていたことから、その適応は非常に限られたものであった。1970 年代半ばから後半にかけて、Southern による DNA [74] および Alwine による RNA[75] のブロットニングハイブリダイゼーション法が、特定の核酸配列の存在を検出するために開発された。電気泳動的に分離された核酸抽出物をニトロセルロースフィルターまたはナイロン膜に移し、続いて標識された特異的プローブをハイブリダイゼーションさせることで核酸配列の検出を行っていた。同

時期までは、トリチウム放射標識プローブによるオートラジオグラフィーを用いたハイブリダイゼーションの検出が主流であった。1980年代に蛍光標識が出現した当時は感度において放射性標識に劣ると指摘されてきたが、その後の顕微鏡分析の感度の向上、処理条件の最適化により、安全性、ハイブリダイゼーション時間の減少、複数のラベル使用による多重染色など、同位体標識に比べていくつかの明確な利点を有することが分かり、現在では蛍光に基づくハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization : FISH) が一般的になっている。また、細胞内タンパク質の免疫蛍光 (Immuno-fluorescence : IF) 分析と組み合わせることにより、タンパク質と RNA の共局在化に関する情報も得られるようになった。

ISHによるRNA細胞内局在の研究は、ウイルス感染下において、ウイルス由来RNAの検出や局在変化を同定するための有用な手法として用いられてきた。また、発生段階における細胞極性の形成機構や神経細胞における樹状突起での翻訳制御などにRNA局在が中心的役割を果たすことが知られている[76]。これらの過程においては遺伝子発現の空間 - 時間的翻訳制御が肝要とされており、FISH/IFによるRNA局在解析は細胞内輸送機構および局所的翻訳調節などに関して非常に有用な知見を我々にもたらしている。

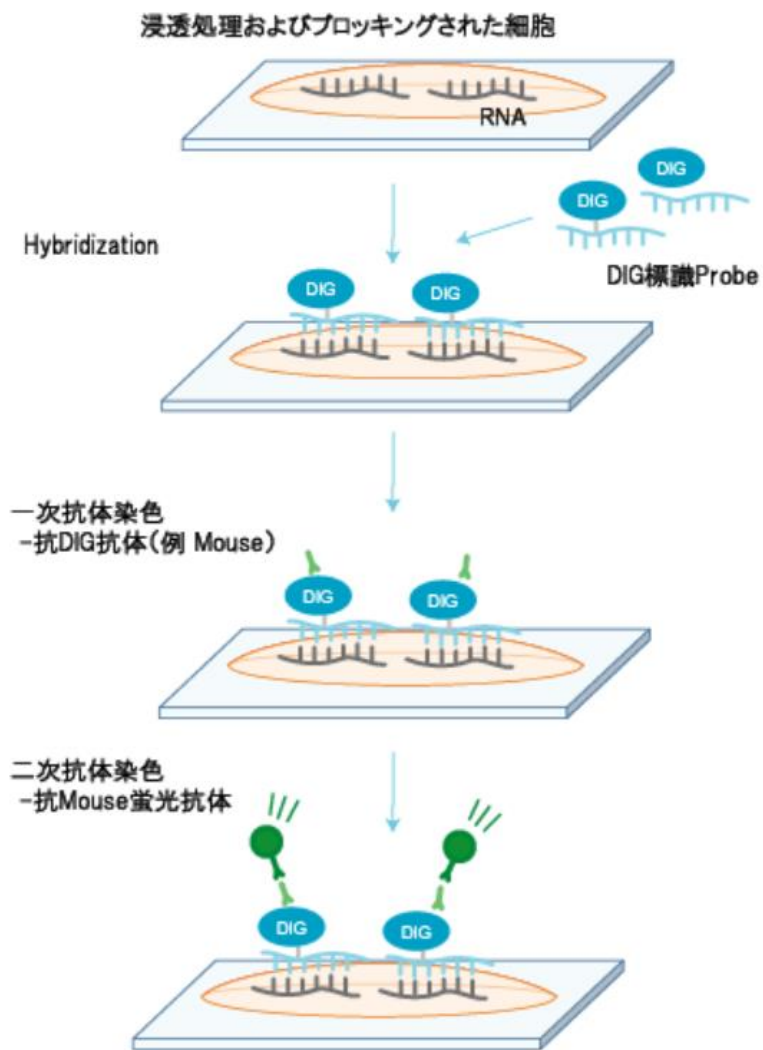


図9 二次抗体を用いた蛍光免疫染色プロトコルの概要。ジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) ラベルされた RNA プロブを用い細胞内 RNA の局在を検出する。

### 3-6 先行研究

2012年、Miyagawaらは熱ストレスをヒトの培養細胞にかけることでメチオニン tRNA が積極的に核へ移行し、それに伴い核内で顆粒を形成する現象を IF および FISH 実験によって観察した[77]。HeLa 細胞を 43°C で 1~6 時間培養した状況下で、Meti 及び Mete の核移行および顆粒の形成を確認した。更に、これらの顆粒は熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP) の発現制御に関わる転写因子群の一つである熱ショック転写因子 1 (heat shock factor 1 : HSF1) と共局在を示した。時系列では、熱処理直後に HSF1 顆粒が形成された後に、Mete (1 時間後) および Meti 顆粒 (3 時間後) が生成され、両顆粒と HSF1 顆粒が重複を示した。HSF1 は核ストレスボディ (nuclear stress body : nSB) のマーカータンパク質として知られているため、熱ストレス時にメチオニン tRNA が nSB の構成成分である可能性を示唆している。また、同顆粒形成現象は tRNA の転写因子であるポリメラーゼ III を阻害した状態でも確認された。過去に tRNA の核内への移行を早めることが報告されていた Rapamycin 添加時には時間的にはやや早期 (~1 時間) に顆粒形成が認められた。これらの結果は、新規に産出された tRNA が顆粒形成をなしているのではなく、細胞内分布変化によって顆粒形成を起こしている可能性を後押ししている。

tRNA の核内蓄積は飢餓状態下の出芽酵母では起こることが確認されてきてはいたが、哺乳動物細胞では明らかとされてこなかった。ヒト培養細胞を用いて熱ストレス下での Meti、Mete の細胞内動態を IF/FISH を用いて可視化した点は非常に興味深い。しかしながら、同反応がメチオニン以外の tRNA に関する



影響や、他のストレス (酸化、飢餓、低酸素、放射線等) に対しても保存された反応であるかは不明である。

## 4 目的

細胞への多くのストレスはそれ単独では明確な表現型をもたらさない低レベルのストレスであるが、その蓄積が老化や発がんなどの原因となると考えられている。放射線ストレスに関しても短期的・長期的な面から多くの研究がなされてきたが、現在でも細胞レベルにおける放射線照射の影響については未知の部分も多い。放射線による医療分野への利用の一つに放射線治療があり、外科療法、化学療法とともにがん治療の重要な地位を占めている。一般的な根治的放射線治療のスケジュールは1日1回2Gyのエックス線照射を週5回、合計6-8週間で照射するのが標準的である。電離放射線等の外部ストレスがDNAに与える影響に関しては古くより知られているが、RNA、特にncRNAにおけるストレス応答に関してはmiRNA、lncRNAを中心に1990年代以降に報告が盛んになってきた領域である。最も古くより知られているncRNAの一つであるtRNAに関しては熱ストレス[58]や飢餓ストレス[57]に対する細胞内局在変化が報告されているが、放射線ストレス状況下におけるtRNAの動態メカニズムは未だ十分に解明のされていない領域である。近年では、ストレスによるtRNAの細胞内局在変化がtRNAの分解と相関していることが指摘される[78]など、tRNAのストレス応答は非常に興味深い分野である。

本研究は、放射線ストレスによる癌細胞への影響をtRNAの観点から理解するために、ヒト由来培養細胞株においてエックス線照射時のtRNAの細胞内局在を明らかにすることを目的とした。ターゲットとするtRNAとしては翻訳開始時に重要と思われるメチオニンtRNA (Meti、Mete) を選択した。

## 5 方法

本研究に用いる細胞株としては、ヒト非小細胞肺癌由来細胞株 (H1299)、p53-発現 H1299 株 (wt p53 H1299) 及びヒト非小細胞肺癌由来細胞株 A549 細胞を使用した。使用細胞に関しては群馬大学重粒子線医学研究センターの高橋昭久博士より譲渡を受けたものである。細胞質顆粒の検討においては Kedersha らの報告をもとに 3 種のマーカータンパク質 (PABP1・TIA1・Dcp1a) において共染色を行った[79]。

1. ヒト非小細胞肺癌由来細胞株 H1299 における Mete 及び Meti の顆粒形成
  - ・ 有顆粒細胞の割合、顆粒の局在を検討  
(コントロール群- 0.5 Gy 群 - 1.0Gy 群 - 4.0Gy 群)
2. wt-p53 H1299 に関して同様の検討
3. ストレスマーカータンパク質との共局在の観測 (PABP1・TIA1・Dcp1a)
4. 他細胞種 (A549) における Mete 及び Meti の顆粒形成及びストレスタンパク質との共局在 (コントロール群- 0.5 Gy 群)

## 5-1 RNA プローブの作成

### 1) プライマー配列決定

tRNA をコードする DNA に関する配列情報は、Genomic tRNA Database (<http://gtrnadb2009.ucsc.edu/>), tRNADB (<http://trna.bioinf.uni-leipzig.de/DataOutput/>) を参考とし、Meti, Mete ともにそれらをコードする DNA 全長を増殖できるようなプライマーを設計した。データベースより取得した配列を確認し、適切な融解温度値、長さとなるように計算しながら各々のプライマーに用いる配列を下記のように決めた (Meti forward primer: 5'-AGC AGA GTG GCG CAG CGG-3', Meti reverse primer: 5'-CCA AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC AGA GGA TGG TTT CGA TCC-3'; Mete forward primer: 5'-GCC TCG TTA GCG CAG TAG GT-3', Mete reverse primer: 5'-CCA AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGC CCG TGT GAG GAT CGA ACT C-3')。

### 2) Polymerase chain reaction (PCR)

FISH 法に使用した RNA プローブの作成は下記の通りである。ヒト培養細胞溶解液 (lysate) と設計したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応には、高い正確性と優れた伸長性の二つを兼ね備えた PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa Bio, Osaka, Japan) を用いて 95°C の初期熱変性後、(1) 95°C/1 分、(2) 55°C/1 分、(3) 72°C/1 分の条件で (1) - (3) の過程を 30 回繰り返した。

### 3) in vitro 転写反応

得られた PCR 反応液をエタノール沈殿により精製し、超純水に溶解した。合わせてポリアクリルアミド電気泳動により一本鎖であることを確認した。これをテンプレートにして、in vitro 転写反応により RNA プローブを合成した。DIG

RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) を用いて、Roche 社のプロトコルに従いジゴキシゲニン (DIG) にラベルされた RNA プローブの合成反応を行った。その後エタノール沈殿により精製し、超純水に懸濁した。ここでも作成したプローブを尿素含有のポリアクリルアミド変性ゲルを用いた電気泳動により一本鎖であることを確認した。

## 5-2 培養細胞へのエックス線照射

### 1) 細胞培養

細胞は 37 度、5%二酸化炭素条件下で 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) に抗生物質/抗真菌剤 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) を加えた RPMI-1640 培地 (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan) を用いて培養した。

### 2) 放射線照射

照射前日に細胞を  $1 \times 10^5$  cells の細胞濃度でガラス基板上 (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に播種し培養した。エックス線照射には東京大学医学部 3 号館地下一階のエックス線発生装置 SHT-250M-3 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いた。0.5 Gy 照射群に対しては 0.35 Gy/min, 1 Gy, 4 Gy 照射群に対しては 2.0 Gy/min の各々の線量率になるように装置間距離、フィルターを設定した。

### 3) 細胞固定および透過処理

照射の 2 時間後、細胞を室温で 20 分間、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline : PBS) (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan) で固定した。固定した細胞をカルシウム・マグネシウム不含 1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) で 3 回すすぎ、0.5%Triton X-100/ PBS 溶液を用いて氷上で 10 分間透過処理した。

## 5-3 染色

### 1) プレハイブリダイゼーション

透過処理後の細胞を PBS (-) で 3 回すすぎ、各ウェル内に Prehybridization buffer 300ml を配置し 55°C で 2 時間培養した。プレハイブリダイゼーションで使用したウェルには残存液を吸引し、蒸留水洗浄を行った上で保管した。

<Prehybridization buffer> [final concentration]

Deionized formamide [50%]

Denhardt's solution (50X) [1X]

Standard saline citrate (SSC) buffer (20X) [2X]

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.5M) [10mM]

Tween 20 (10%) [0.01%]

Yeast tRNA (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) [100  $\mu$ g/ml]

### 2) ハイブリダイゼーション

RNA プローブ溶液を 2X Hybridization buffer で 1:1 希釈し、80°C で 10 分間加熱した後 3 分程度、氷上冷却した。パラフィルム上に希釈した RNA プローブ液を滴下し、カバーガラスをドロップ液に対して細胞面が下になるようにしてかぶせ、トレイを食品用ラップフィルムで包み 55 °C 静置オーバーナイトで培養した。

<2X Hybridization buffer> [final concentration]

dextran sulfate [10%]

Denhardt's solution (50X) [2X]

SSC buffer (20X) [4X]

EDTA (0.5uM) [20mM]

Tween 20 (10%) [0.02%]

### 3) 余剰プローブの除去

前日使用したウェル内に 55°Cに予熱した Wash buffer A を充填しておき、ここに細胞接着しているガラスプレートを浸し、55°Cで 15 分間 2 回洗浄した。

300ml の 10  $\mu$ g/ mL RNase A buffer で 37°C、30 分間処理した後、過剰のプローブを NTET 緩衝液で洗浄した。細胞を Wash buffer B で 2 回、55°Cで 1 時間洗浄した。

<Wash buffer A> [final concentration]

Deionized formamide [50%]

SSC buffer (20X) [2X]

Tween 20 (10%) [0.01%]

<NTET buffer > [final concentration]

Tris-HCl pH8.0 [10mM]

EDTA (0.5uM) [1mM]

NaCl [500mM]

Tween 20 (10%) [0.01%]

<Wash buffer B> [final concentration]

SSC buffer (20X) [2X]

Tween 20 (10%) [0.01%]

### 4) Blocking

PBS (-) で 3 回洗浄した後、Blocking buffer を用いて室温で 1 時間振盪条件の下で反応させた。



< Blocking buffer > [final concentration]

FBS/PBS [10% in 1X PBS]

Tween 20 (10%) [0.01%]

#### 5) 一次抗体反応

抗 DIG 抗体 (またはマーカートンパク質抗体) を Blocking buffer で希釈することで一次抗体液を作成した。トレイに一次抗体液のドロップを用意し、ドロップ上にカバーガラスを細胞面が下になるようにかぶせ、室温で 1.5 時間放置した。結合していない抗体を、0.2% Tween-20/PBS 中で 3 回 5 分間洗浄することによって除去した。

< 一次抗体 >

Anti-Digoxigenin sheep antibody (Roche, Basel, Switzerland)

Anti-Dcp1a rabbit antibody (Abcam, Cambridge, UK)

Anti-PABP1 rabbit antibody (Abcam, Cambridge, UK)

Anti-TIA1 mouse antibody (Abcam, Cambridge, UK)

#### 6) 二次抗体反応

抗 sheep 抗体 (または rabbit、mouse) を Blocking buffer で希釈することで 2 次抗体液を作成し、細胞を二次抗体液と共に 1 時間培養した。その後、0.2% Tween-20/PBS 中で 3 回 5 分間洗浄することによって除去した後、PBS で置換した。

< 2 次抗体 >

Anti-sheep secondary antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

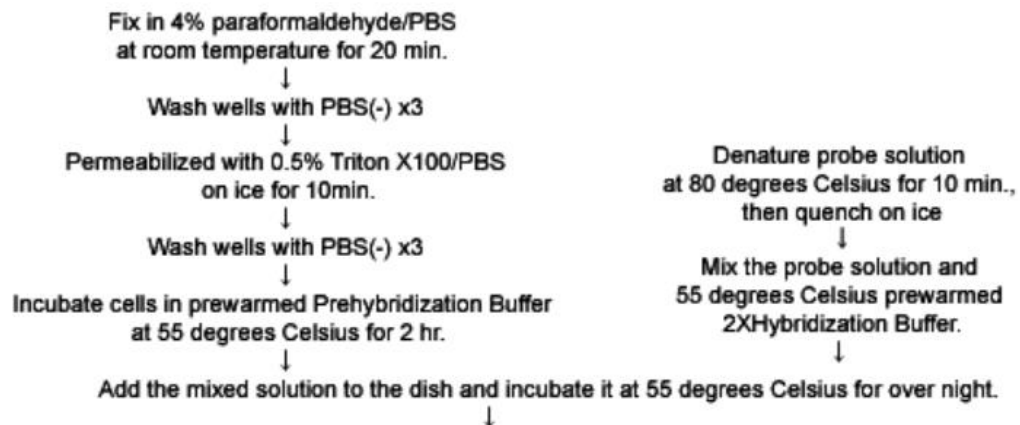
Anti-mouse secondary antibody, Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

Anti-rabbit secondary antibody, Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

## 7) 核染色と封入

核を染めるための試薬である 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を含んだ PBS で置換し、室温で 5 分間培養した後、PBS および超純水で洗浄した。退色防止剤を含んだ封入剤である PloLong Gold (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) をスライドガラスに一滴垂らし、その上から細胞面を下向きにしてかぶせ、顕微鏡で観察するまでの間は遮光して 4°C に保存しておいた。

Day 1



Day 2

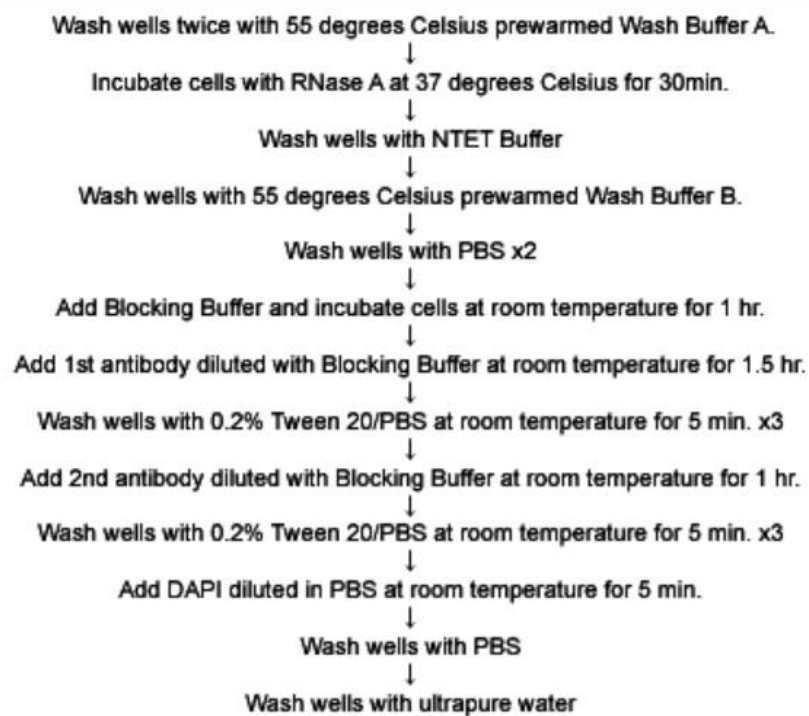


図 10 FISH プロトコルのフローチャート。バッファの略称等は本文内のものを使用した。

## 5-4 撮像及び計測

全てのイメージング実験は、生物用共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV1200 および FV-OSR システム (Olympus, Tokyo, Japan) で実施した。焦点を合わせた後に、各レーザーチャンネルの検出器電圧、オフセット、ゲインの最適化を行った。染色検体に対して褪色防止剤は使用しているが、時系列による褪色の影響及びレーザーの安定性の影響により同一の設定で画像取得することは困難であったため、細胞内での tRNA 分布が十分に描出されかつ背景濃度が上昇しないことを基準として調整を行った。観測された顆粒の輝度が高く、周辺構造の確認が困難な場合にも適宜レーザー光調整を行った。画像を取得する際には、スキャンスピードを 2.0 [microsecond/Pixel] に設定し、12 回のスキャン画像のカルマン平均を行った。取得された画像については色調、コントラスト調整、ガンマ補正等の一切の画像処理は行わずに著者（片野）が目視にて有顆粒細胞のカウントを行った。取得画像の解像度は 0.207 [micrometer/Pixel] であり、短径 3 Pixel (= 0.621 micrometer) 以上の背景 tRNA 濃度に対して高輝度の構造体を細胞内に有するものを有顆粒細胞としてカウントした。画像のマージには Image J (Image J version 1.51k on Windows OS, National Institute of Health, USA) を使用した (図 12, 15)。実験後半の主にストレスマーカーの多重染色に関しては FV1200 上で合成されたマージ画像を取得することができるようになった (図 17-19, 21)。有顆粒細胞割合の評価等の統計的処理に関しては R (R version 3.3.1) を用いて有意水準は  $p < 0.05$  とした。

<顕微鏡仕様>

Objective Lens: UPLSAPO60XO  
Objective Magnitude: 60X  
Objective NA 1.35  
Scan Mode: XY  
Sampling Speed: 2.0 [microsecond/Pixel]  
Sequential Mode: Frame  
Integration Type: Frame Kalman  
Integration Count: 12  
Excitation Wavelength (4ch): 405/473/559/635[nm]

## 6 結果

### 6-1 エックス線照射後の H1299 における tRNA 顆粒の形成

FISH によるエックス線照射後の *Mete* および *Meti* の細胞内分布 FISH を用いて観察を行った。*Mete* に関しては顆粒の形成が検出された一方、*Meti* では明らかな顆粒形成は確認できなかった [図 11]。

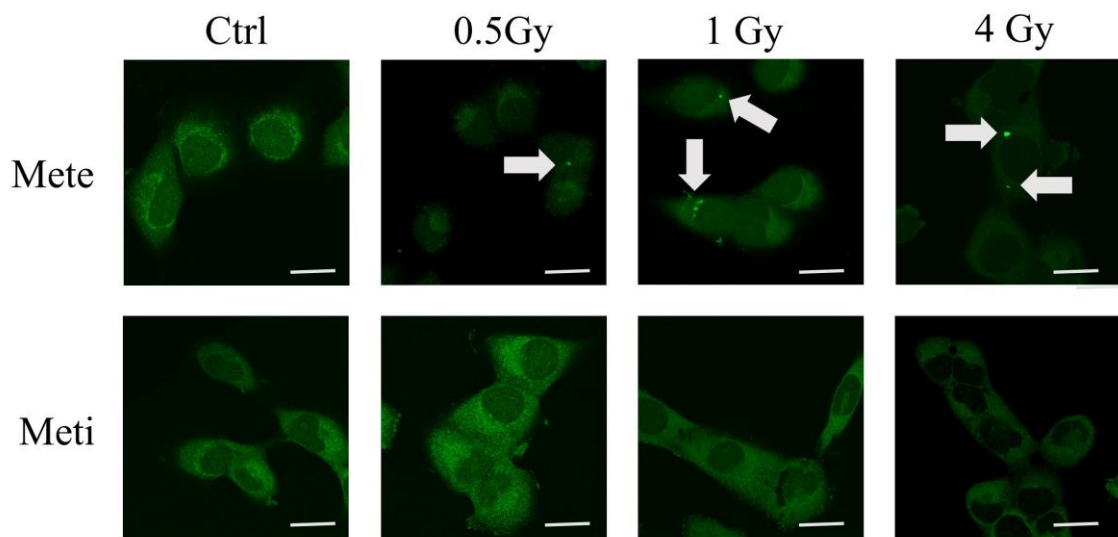


図 11 各線量照射後における *Mete* および *Meti* の FISH の結果。上段は *Mete*、下段は *Meti* の結果である。顆粒形成を灰色の矢印で示した。Scale bar は 20  $\mu\text{m}$  を表す。

次に DAPI との共染色において Mete 顆粒の細胞内局在を確認した。線量群、顆粒大小を問わず、全 237 顆粒のうち 235 顆粒 (検出された顆粒の 99%) において細胞質に検出された [図 12]。

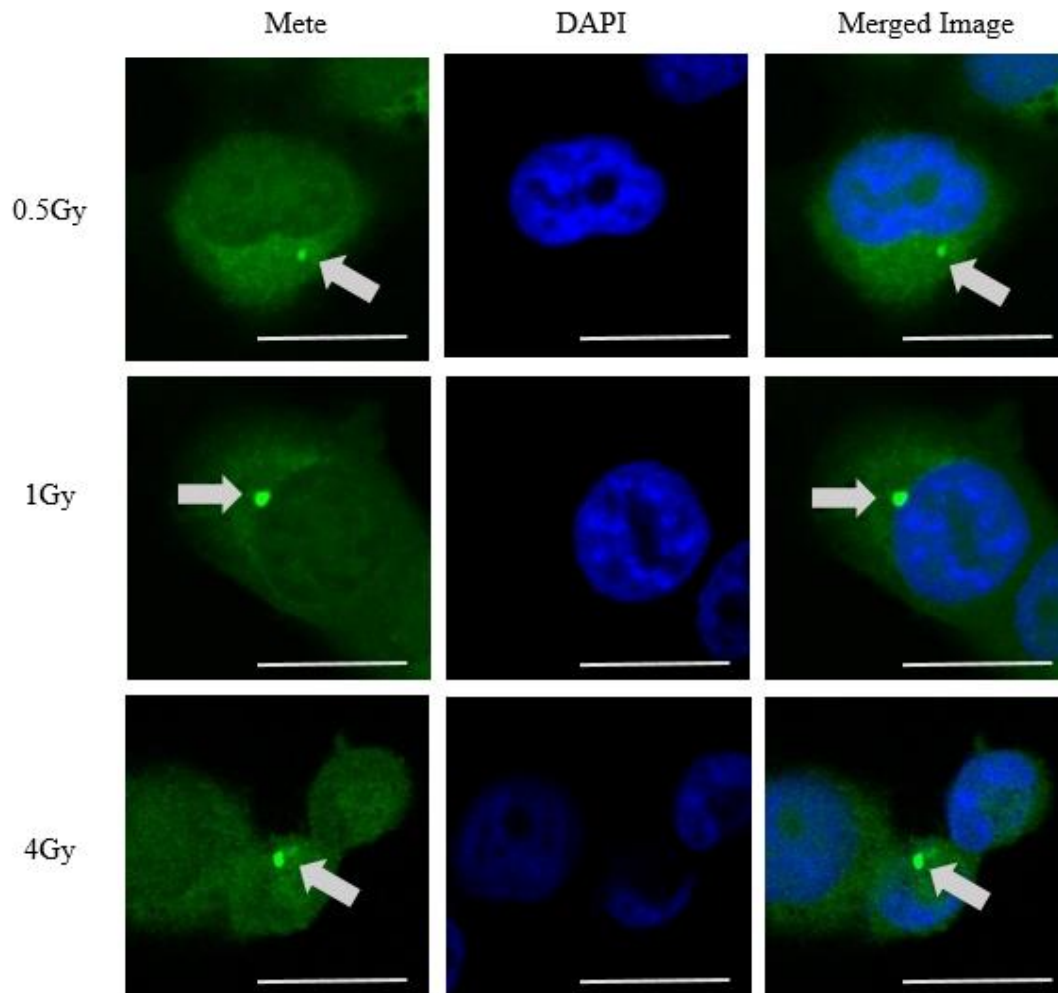


図 12 各線量照射後における Mete 顆粒近傍における Mete-DAPI での共染色の結果。上段は 0.5 Gy, 中段は 1 Gy, 下段は 4 Gy 照射時の結果である。Mete 顆粒の位置は細胞質に存在することが確認できる。Scale bar は 20  $\mu\text{m}$  を表す。

同現象を独立した3回の実験にて再現性を確認した。コントロール群に比する各線量群の有顆粒細胞の割合を、順序関係を有する多重比較としてDunnett検定を用いて解析した。Metcに関しては0.5 Gy、1 Gy、4 Gy照射群においてコントロール群に比してMetc顆粒の形成増加が確認された( $p=0.004$ )。一方、Metiに関してはコントロール群に比して明らかな顆粒数増加は認められなかった( $p=0.543$ ) [図13]。

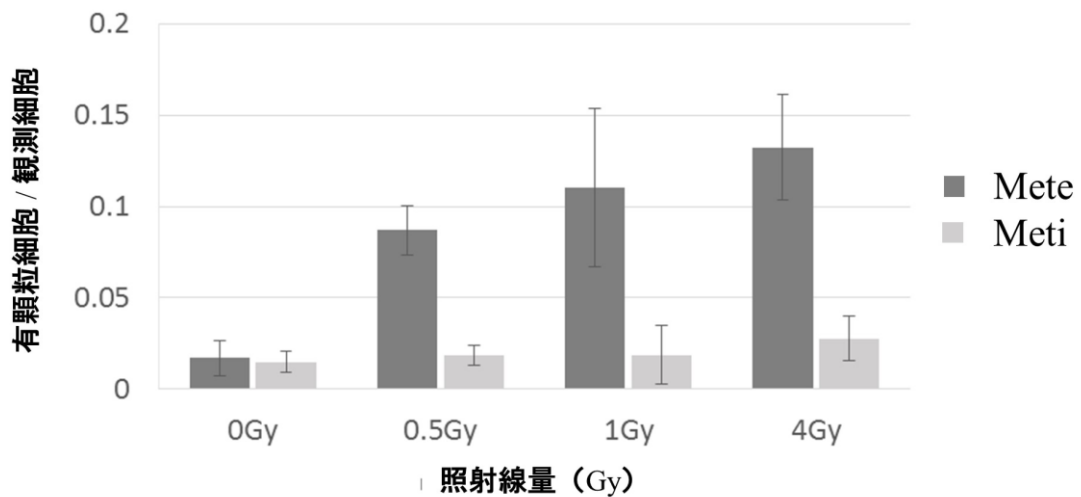


図13 観測細胞数に対するH1299細胞の有顆粒細胞数の割合。



## 6-2 エックス線照射後の wt p53-H1299 における tRNA

### 顆粒の形成

我々が今回使用した H1299 細胞株は p53 を欠損している。p53 は guardian of the genome と呼ばれ、DNA 損傷やストレスを受けた細胞を適切に細胞周期停止やアポトーシスに導き、遺伝子情報の保持に働き放射線ストレス応答を検討する際に肝要である。前項での結果が p53 欠損株に特異的な反応かを確認するため、野生型 p53 (wild type p53: wt p53) を発現した細胞株 wt p53 H1299 株でも同様の照射実験をおこなった。

wt p53 H1299 においても Mete に関しては顆粒の形成が検出された。一方、Meti では明らかな顆粒形成は確認できなかった [図 14]。

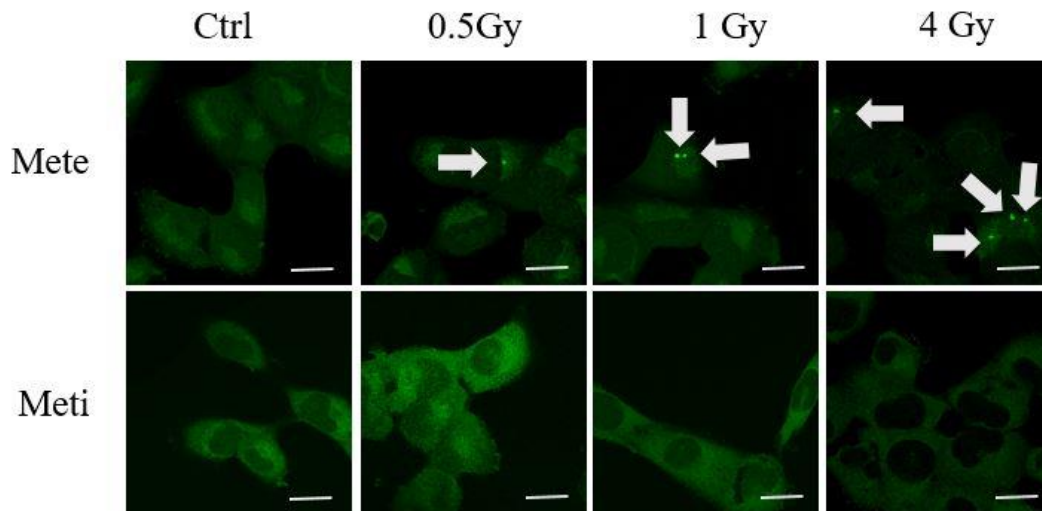


図 14 wt p53-H1299 における各線量照射後の Mete および Meti の FISH の結果。上段は Mete、下段は Meti の結果である。顆粒形成を灰色の矢印で示した。Scale bar は 20  $\mu$ m を表す。

次に DAPI との共染色において Mete 顆粒の細胞内局在を確認した。線量群、顆粒大小を問わず、全 323 顆粒のうち 321 顆粒 (検出された顆粒の 99%) において細胞質に検出された [図 15]。

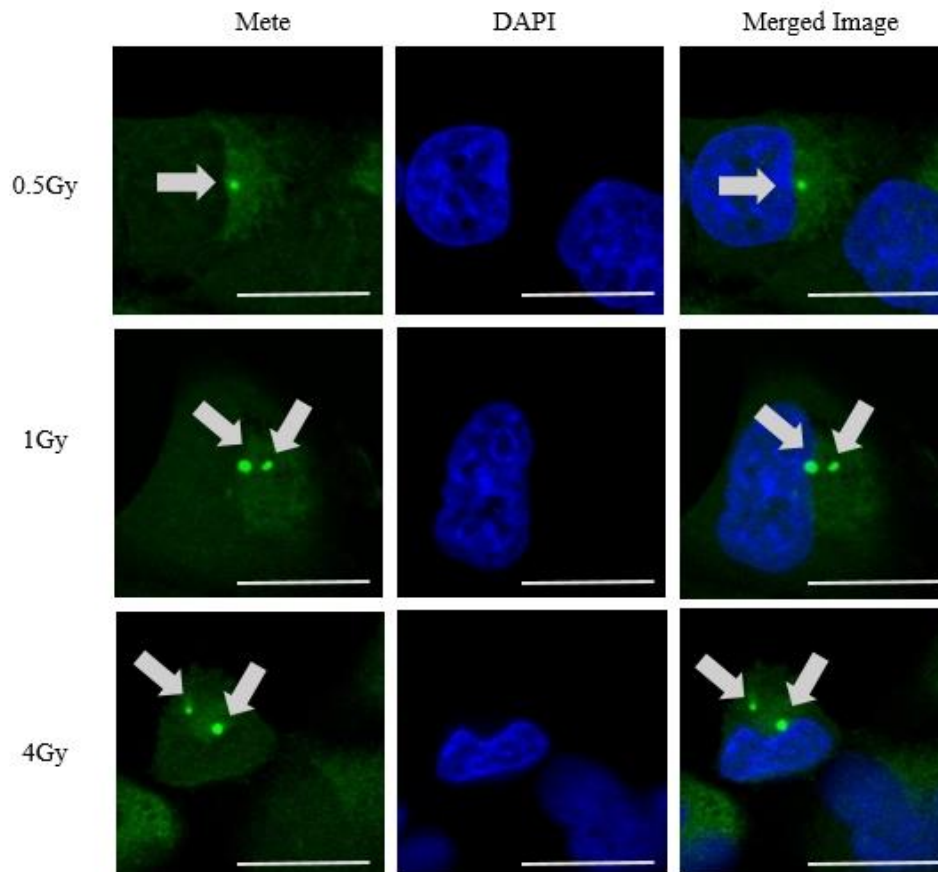


図 15 wt p53 H1299 での各線量照射後における Mete 顆粒近傍における Mete-DAPI での共染色の結果。上段は 0.5 Gy, 中段は 1 Gy, 下段は 4 Gy 照射時の結果である。Mete 顆粒の位置は細胞質に存在することが確認できる。Scale bar は 20  $\mu\text{m}$ を表す。

H1299 の時と同様に同現象を独立した 3 回の実験にて再現性を確認した。コントロール群に比する各線量群の有顆粒細胞の割合を **Dunnett** の多重比較にて検討した。**Metc** に関しては各照射群においてコントロール群に比して **Metc** 顆粒の形成増加が確認された ( $p < 0.001$ )。一方、**Meti** に関してはコントロール群に比して明らかな増加は認められなかった ( $p = 0.137$ )。これらの傾向は H1299 の時と比較しても大きな変化は認めなかった [図 16]。

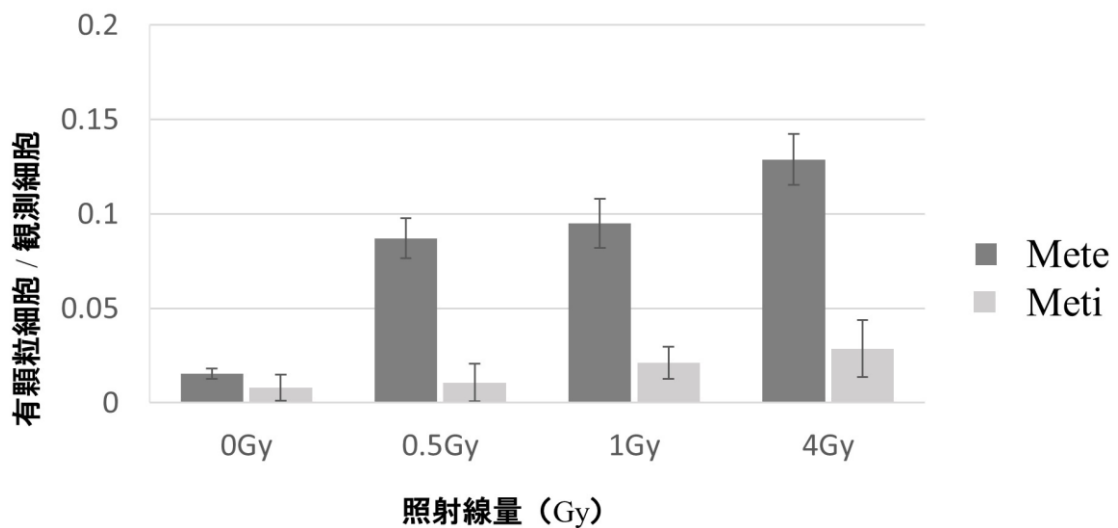


図 16 観測細胞数に対する wt p53 H1299 細胞の有顆粒細胞数の割合。

### 6-3 ストレスマーカータンパク質との共染色

前項までにおいて、エックス線照射群の細胞に関しては細胞質に **Mete** の顆粒が形成されることが分かった。

序章にて検討した通りストレス応答に関わる細胞質顆粒としてプロセッシングボディ (**Processing body : PB**) とストレス顆粒 (**Stress granule : SG**) が知られている。両者はリボ核酸とタンパク質の複合体であるリボヌクレオタンパク質 (**Ribonucleoprotein : RNP**) から構成されることが知られており、**SG** および **PB** はいくつかのタンパク質および mRNA 成分を共有するが、それぞれに固有なマーカーも存在する。我々は **Kedersha** らの報告[79]をもとに3種のマーカータンパク質、**PABP1**、**TIA1**、**Dcp1a** の3つを選択し共染色を行った [表 3]。

検出される顆粒	マーカータンパク質
<b>SG</b>	p-eIF2 $\alpha$ , eIF3, eIF4A1, eIF4B, eIF4G, FXR1, G3BP-1, PABP1
<b>SG&gt;&gt;PB</b>	HuR, TIA1, TIAR
<b>PB</b>	Dcp1a, 4E-T, GE-1/hedls, P54/RCK, Xrn1/2

表 3 検出可能な細胞質顆粒とそのマーカータンパク質 ([79]より改編)。**"SG >> PB"** は **SG** において高頻度に検出されるが、一部の **PB** においても認められることを表す。

- Dcp1a

我々は PB 特異的マーカーである mRNA デキャップ酵素 1A (Dcp1a) を選択し、各線量における共染色の様子を調べた。結果は、コントロール群および照射細胞 (0.5 Gy, 1 Gy, 4 Gy) の両方で PB を示唆する Dcp1a の顆粒が観察されたが、Metz 顆粒と PB の局在との共局在は示されなかった。PB を示唆する Dcp1a 顆粒は Metz 顆粒の位置と一致しないことが Merged Image より確認される [図 17]。

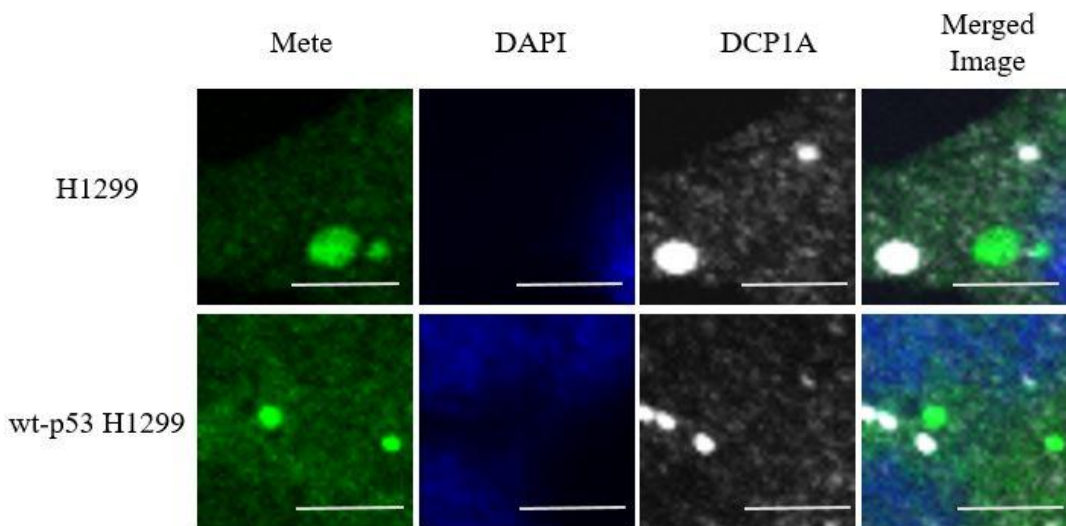


図 17 1 Gy 照射後における Metz 顆粒近傍での Metz-DAPI-Dcp1a での共染色の結果。上段は H1299, 下段は wt-p53 H1299 細胞での結果を示す。図は 1 Gy 照射後における Metz 顆粒近傍での Merged Image である。Scale bar は 5  $\mu$ m を表す。

- TIA1

次に我々は TIA1 について染色を行った。TIA1 は SG を示す一般的なマーカーであるが、一部、PB にも含まれることが知られている。TIA 顆粒は照射細胞 (0.5 Gy, 1 Gy, 4 Gy) 群において認められ、Metz 顆粒との共局在が示唆された。TIA1 顆粒は Metz 顆粒の位置と一致していることが Merged Image にて確認される [図 18]。

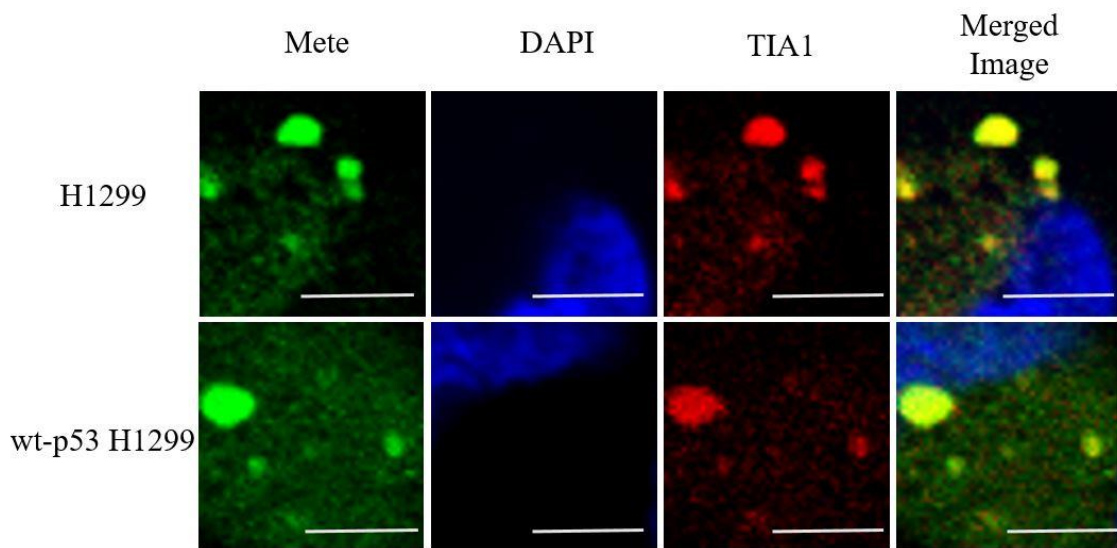


図 18 1 Gy 照射後における Metz 顆粒近傍での Metz-DAPI-TIA1 での共染色の結果。上段は H1299, 下段は wt-p53 H1299 細胞での結果を示す。図は 1 Gy 照射後における Metz 顆粒近傍での Merged Image である。Scale bar は 5  $\mu$ m を表す。

- PABP1

最後に、SGに固有のストレスマーカーであるPABP1について染色を行なった。当実験はTIA1にて共染色が認められたことから、Mete-DAPI-PABP1-TIA1を同時染色することで観測を行った。PABP1は明らかな顆粒形成を示さず、Mete顆粒との共局在は否定的であった。下記は1 Gy照射後におけるMete顆粒近傍でのMerged Imageである [図 19]。

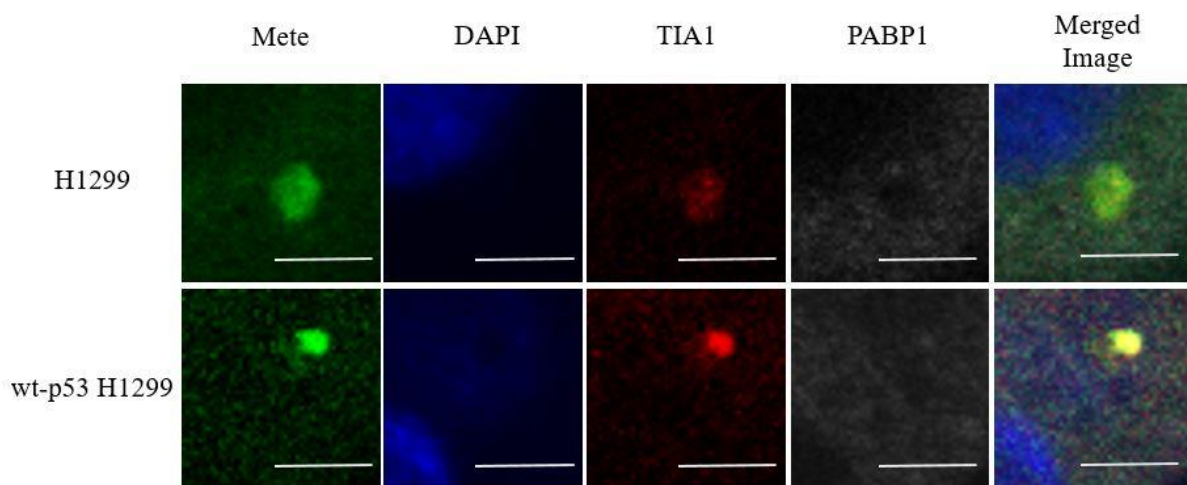


図 19 1 Gy 照射後における Mete 顆粒近傍での Mete-DAPI-TIA1-PABP1 での共染色の結果。上段は H1299, 下段は wt-p53 H1299 細胞での結果を示す。明らかな PABP1 顆粒の形成は認めなかった。Scale bar は 5  $\mu$ m を表す。

## 6 - 4 非小細胞肺癌 A549 における tRNA 顆粒の形成

我々は、他の非小細胞肺癌系列細胞 A549 においても同様の実験を行った。

FISH によるエックス線照射後の Mete および Meti の細胞内分布 FISH を用いて観察を行った。H1299、wt-p53 H1299 と同様に Mete に関しては顆粒の形成が検出された一方、Meti では明らかな顆粒形成は確認できなかった [図 20]。

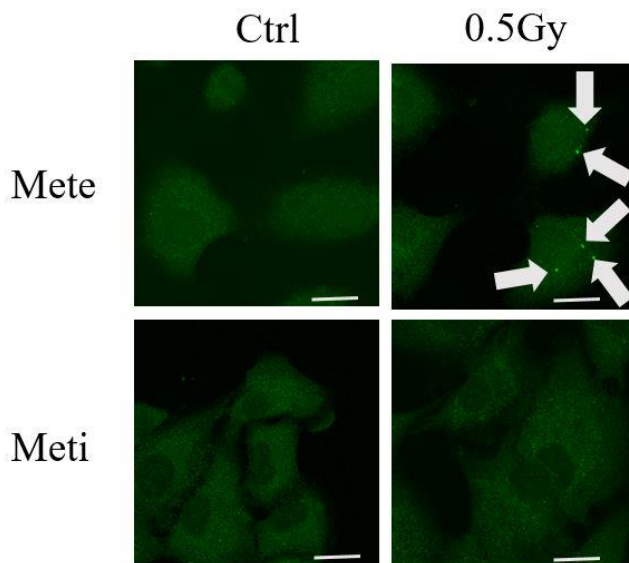


図 20 A549 細胞での各線量照射後における Mete および Meti の FISH の結果。上段は Mete、下段は Meti の結果である。顆粒形成を灰色の矢印で示した。Scale bar は 20  $\mu\text{m}$  を表す。



コントロール群に比する各線量群の有顆粒細胞の割合を t 検定で比較した。コントロール群に対して照射群では有意に Mete 顆粒の増加を認めた ( $p=0.0465$ )。一方、Meti に関してはコントロール群に比して明らかな増加は認められなかった。同傾向は H1299 と同様であった [図 21]。

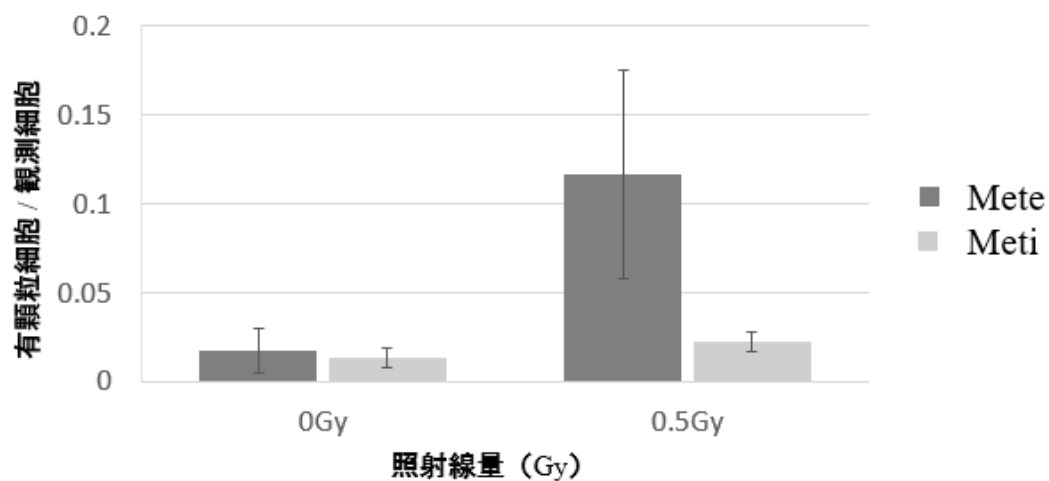


図 21 観測細胞数に対する A549 細胞の有顆粒細胞数の割合。

<共染色の結果>

生成された Mete 顆粒の局在を調べるため、Dcp1a、TIA1、PABP1 について染色を行った。H1299 の時と同様に、Mete 顆粒の位置は Dcp1a、PABP1 とは一致せず、TIA1 と共局在を認めた。下記は 0.5 Gy 照射後における各染色における Mete 顆粒近傍での Merged Image である [図 22]。

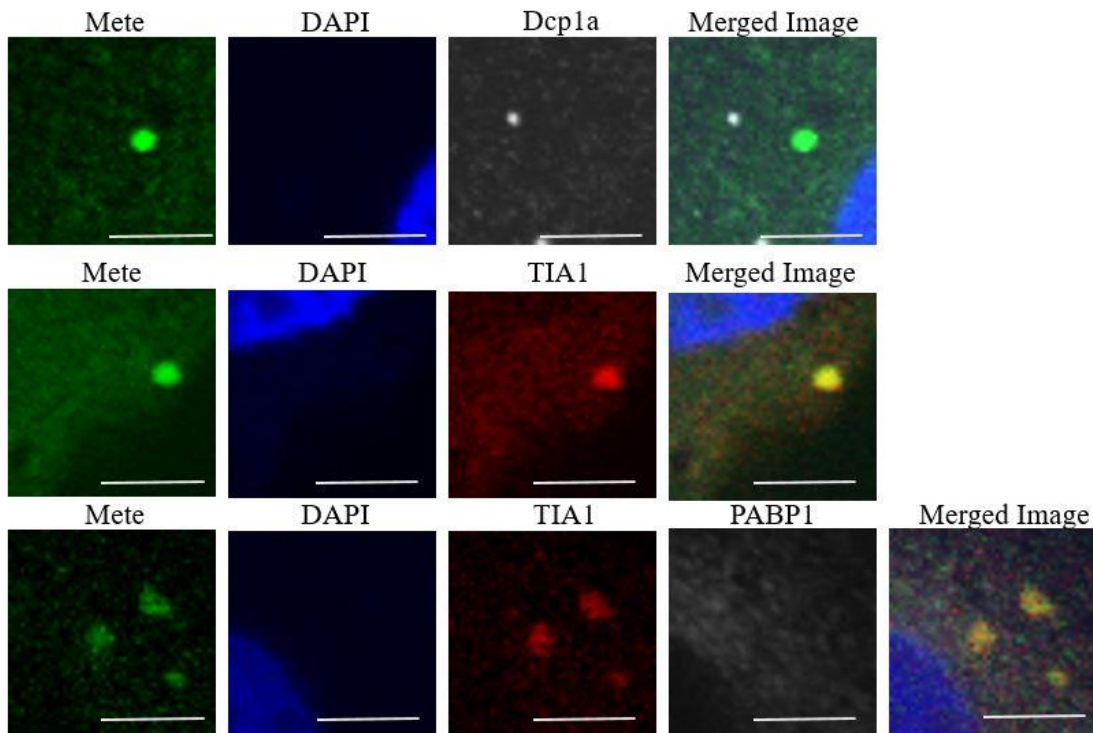


図 22 0.5 Gy 照射後における Mete 顆粒近傍での共染色の結果。上段は Mete-DAPI-TIA1、中段は Mete-DAPI-Dcp1a、下段は Mete-DAPI-TIA1-PABP1 との共染色の結果である。TIA1 顆粒は Mete 顆粒の位置と一致していることが Merged Image にて確認される。下段画像より PABP1 の顆粒位置での濃度低下が確認される。Scale bar は 5  $\mu$ m を表す。

## 7 考察

ヒト非小細胞肺癌由来細胞株 (H1299)、p53-発現 H1299 株 (wt p53 H1299) 及びヒト非小細胞肺癌由来細胞株 A549 細胞において、放射線照射により **Metc** 顆粒の形成が認められた。同じメチオニン tRNA である **Meti** ではコントロール群との間に明らかな有意差を認めず、顆粒形成現象は **Metc** に特異的であることを明らかにした。この **Metc** 顆粒は細胞質に認められ、SG を示唆する TIA1 と共局在を認めた。

今回検出された **Metc** 顆粒は放射線照射による細胞内 tRNA の局在の変化を示唆するものである。共局在を認めた TIA1 は SG の成分であり、TIA1 の凝集は SG の形成を促進するとの報告がある[80]。SG の形成はストレスにより誘導され、外部ストレスの結果に生じた非翻訳 mRNA の貯蔵庫としての役割を果たすことが知られている[81]。tRNA は mRNA 上の塩基配列を元にタンパク質合成に働くことから、一つの可能性として、非翻訳 mRNA の周囲に **Metc** の凝集が認められたのではないかと考えられる。しかしながら、典型的な SG のマーカータンパク質(PABP1)とは局在しなかったこと、時系列による検証が不十分であったこと等の不明点は残る。

この一方で **Meti** に関しては顆粒形成を認めなかった。**Meti** に関してはストレス付加時の分解促進や核内移行等が報告されており[82]、細胞質濃度低下に起因して顆粒形成を認めなかった可能性がある。細胞質の tRNA 濃度は tRNA 新規産出、核内-細胞質輸送因子、tRNA 成熟過程、tRNA 代謝により厳密に調整を受けているため、これら検討が今後の課題である。

本章では諸家の報告と比較し、これらの顆粒形成のメカニズムや、共染色の結果に関して、および **Meti・Met**e での顆粒形成の相違に関して考察する。

また、今回の実験においては、実際の翻訳抑制や細胞周期といった表現型との関連の有無に関して言及することはできなかった。このため、今回の結果の解釈に関しては限定的な内容しか言及することができないが、応用の可能性に関して「**Limitation** と今後の展望」において検討を行った。

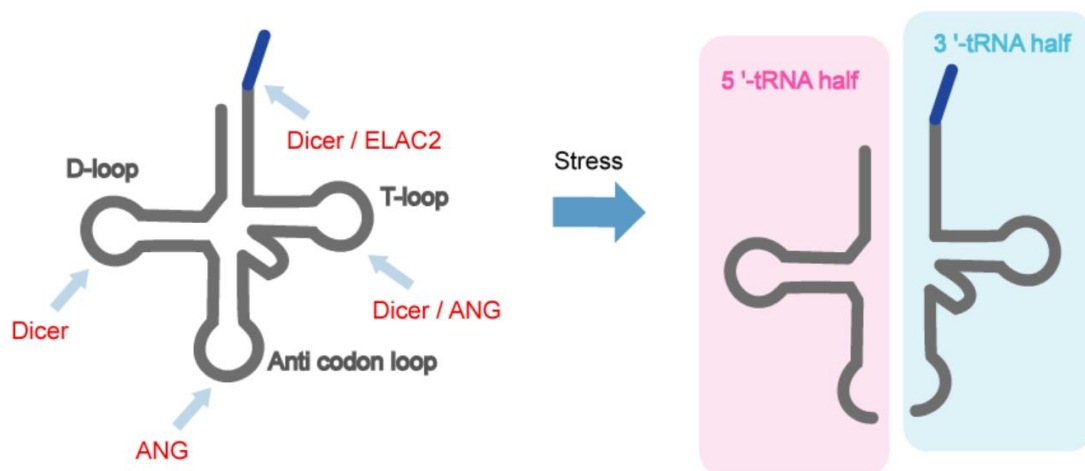
## 7-1 tRNA のストレス応答

近年、虚血、酸化、飢餓、および放射線を含む外部ストレスに対する細胞内 tRNA 応答が報告されているが、tRNA cleavage は外部ストレスに応答する一般的な事象の 1 つである[83]。今回使用したプローブは完全長 tRNA であり、断裂をした tRNA との affinity は確認していないため、検出した顆粒状の tRNA において総長が保存されたものでない可能性も有する。文献調査でエックス線照射が tRNA cleavage 反応を誘発するという報告はみられなかった。エックス線照射による細胞への影響がフリーラジカルに起因する部分が大いとするならば、真核生物において酸化ストレスに対しては tRNA cleavage 反応は保存されていると言われている[84]。一方で、エックス線より長波長の電磁波である紫外線ストレスにおいては tRNA cleavage は認めないとする報告もあり、どちらの可能性に関しても否定しきれない。

tRNA cleavage の最初の報告は、1990 年、大腸菌がバクテリオファージ感染に応答して完全長ロイシン tRNA が Colicin によりアンチコドンループで切断されるという報告であった[85]。現在、アンチコドンループ内の tRNA の切断はヒトにおいても確認された応答[86]であり様々なストレス反応に保存されている。また、Haiser らは放線菌において tRNA 断片の産生と菌糸形成といった細胞表現型との関わりについても指摘をしている[87]。

2009 年、Fu らは哺乳類細胞において RNase A スーパーファミリーのストレス活性化リボヌクレアーゼであるアンギオゲニン (angiogenin : ANG) がストレス下の tRNA cleavage の活性を有することを明らかにした[88]。細胞が正常な状

態にある時には ANG の大部分は核に局在し、わずかに存在する細胞質の ANG も Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 (RNH1) により不活化されている[89]。外部ストレスにより核から細胞質への局在シフトが誘起され、更に細胞質では RNH1 から ANG が解放されることで細胞質の tRNA を切断する。多くの場合、tRNA 分子の midpoint に当たるアンチコドンループを標的として非特異的切断反応が誘起されるため、30-35 塩基長程度の切断 tRNA 分子 (tRNA halves) が形成される。この他、tRNA 特異的な Endonuclease として pre-tRNA<sup>Ser</sup> に対する ELAC2[90]、tRNA<sup>GLU</sup>/pre-tRNA<sup>ILE</sup> に対する Dicer [91, 92] などによる切断が報告されている[図 23]。ANG による tRNA cleavage は非特異的な切断と考えられており、今回使用したメチオニン tRNA に関しても断裂反応を生じている可能性はある。



酵素名	tRNA 特異性	切断部位
ELAC2	pre-tRNA <sup>Ser</sup>	3'末端
Dicer	tRNA <sup>Glu</sup>	D loop
	tRNA <sup>Glu</sup>	T loop
Angiogenin	pre-tRNA <sup>Ile</sup>	3'末端
	なし	Anticodon loop

図 23 哺乳類における tRNA cleavage のシエーマ及び代表的なエンドヌクレアーゼ ([93]より改編)。tRNA はストレス因子に応答してアンチコドンループにおいて切断される。アンジオゲニンによる tRNA cleavage は、高等真核生物における保存された特徴であり、これにより 2つの断片的 tRNA (5'-および 3'-tiRNA half) が生成される。

また、興味深いことに、tRNA 由来のストレス誘発 RNA フラグメント (tRNA-derived stress-induced RNA: tiRNA) と呼ばれるこれらの切断 tRNA が生物活性を有する機能性 RNA として働くことが近年頻繁に報告されている[94-96]。ストレス条件下では、tRNA cleavage 産物の形成は完全長 tRNA のプールを有意に変化させず、むしろこれらの断片は成熟 tRNA プールの 5%以下であることが示されている[86, 88, 97]。これはストレスによる tRNA への影響は切断されることによる絶対量の減少よりも代謝産物の生理活性による翻訳制御機構が大きい可能性を示唆する。

ストレスによって生じた 5'-tiRNA は SG 形成を誘導し、翻訳抑制に働くことが知られている。Emara らはトランスフェクション試薬を使用し tRNA halves をヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に導入した実験を行うことで、この反応が 5'-terminal oligoguanine motif を有する 5'-tiRNA halves に限られることを報告した[98]。すなわち、アラニンおよびシステイン由来の 5'-tiRNA(5'-tiRNA<sup>Ala</sup>、5'-tiRNA<sup>Cys</sup>)以外の 5'-tiRNA halves 又は 3'-tRNA halves の導入では翻訳抑制を認めなかった。また、同実験にて生じた有顆粒細胞の割合はコントロール群<1%以下に対して 5'-tiRNA<sup>Ala</sup> および 5'-tiRNA<sup>Cys</sup> 共に 10%程度であった。

この報告によれば 5'-tiRNA<sup>Ala</sup> と 5'-tiRNA<sup>Cys</sup> のみが顆粒形成を起こすとのことであるが、ANG により非特異的に分断された tRNA halves が tRNA<sup>Met</sup> も含めて同一の SG 等の Cytoplasmic ribonucleoprotein complex (CRC) に帰結すると仮定するならば、本研究の成果の説明がある程度は可能である。すなわち、エクソ線ストレスにより非特異的に tRNA 断裂が生じ、tRNA<sup>Met</sup> halves が 5'-tiRNA<sup>Ala</sup> と 5'-tiRNA<sup>Cys</sup> と共に細胞質の特定の CRC に回収される。FISH において得られた



結果は tRNA<sup>Met</sup> halves の顆粒形成を検出するとともに、5'-tiRNA<sup>Ala</sup> 等による SG の顆粒形成を反映したものと解釈可能である。

しかしながら、冒頭で述べた様に全てのストレス条件下で tRNA cleavage が起きるわけではないことは留意しなければいけない。一例として Fu らはヒト細胞において各種ストレス下での tRNA のノーザンブロットィングで断裂の有無を検討した[88]。飢餓ストレス、熱、寒冷ストレスでは明らかに half band が検出されるのに比して紫外線照射ではバンドを認めなかった。このほか、エトポシド処理、またはカフェイン処理においても tRNA cleavage は誘発されなかった[86]。

tRNA cleavage 以外のストレス反応としては、アミノアシル末端の不活性化、tRNA の核内移行による翻訳抑制、未装着 tRNA (uncharged tRNA) による生理活性、修飾塩基の reprogramming 等が報告されている[56]。真核細胞は、可逆性を有するこれらのメカニズムを介して、低い代謝コストで翻訳を動的に抑制し再活性化する機能を有する。本研究の成果がストレス性の tRNA 動態として未知の経路である可能性に関しても否定はしきれない。

総括すると、ストレス応答の理解の一助とするためにも、ノーザンブロットィングで tRNA cleavage が起きているかの確認は有用であると思われる。tiRNA と我々が今回使用した probe との間の affinity に関しても検証をしておく必要があった。細胞種やストレス条件も異なるため一概な比較は難しいが、tRNA cleavage を仮定するという立場からは、Emara らの結果から SG の形成に関しては本研究の一部の成果と矛盾しない。しかしながら、我々の結果は SG の一成分 (TIA1) のみの顆粒形成であり、これに関しては更なる検討が必要である。更

には、他の tRNA (特に 5'-tiRNA<sup>Ala</sup> や 5'-tiRNA<sup>Cys</sup>) の細胞内動態や cleavage の有無、に関しても検証されなければならない。一方で、tRNA cleavage ではなく完全長が保存されている可能性も否定はしきれない。この場合は、TIA1 との共局在がどのようなメカニズムを介して得られているかについては興味深いと思われる。

どちらの過程でストレス応答をしているとしても、共局在をした TIA1 の性質及び tRNA の代謝経路に関して考察を進めることは必要であると考え、次項以降で検討を進めた。

## 7-2 共染色の結果に関して

本研究では Mete 顆粒と TIA1 の共局在が確認できた。TIA1 は、3つの N 末端 RNA 認識モチーフ (RRM) および C 末端グルタミンが豊富なプリオン関連ドメイン (PRD) を含む約 375 アミノ酸から構成される[99]。TIA1 は遺伝子発現の転写後調節因子として機能し[43]、核 RNA スプライシングおよび mRNA 翻訳の調節を含むいくつかの RNA 代謝経路において役割を果たしている[100]。TIA1 は SG の主要成分としても知られており主に SG に見出されるが、わずかながら PB でも検出される [101]。SG と PB は独立した構造ではなく、幾つかの RNA 結合タンパク質を共有し TIA1 はその一種である。

我々の結果の特徴としては、TIA1-Mete 顆粒が SG 特異的マーカー (PABP1) または PB 特異的マーカー (Dcp1a) と共局在しないことが挙げられる。我々の観察結果と同様の他の SG を規定する成分を含まない細胞質 TIA1 単独陽性顆粒は、2011 年に James らがポリオウイルス感染のもとで報告している[102]。この報告の詳細を検討すると共に本研究との対比を行う。

ポリオウイルス感染直後には通常のマーカータンパク質を含む典型的 SG を呈し、TIA1 と他のマーカーが共局在する。しかしながら、顆粒を時系列で観測すると、翻訳開始因子マーカー (eIF3、eIF4E および eIF4B) が 2 時間後から急速に低下し、RNA 結合タンパク質マーカー (G3BP, YB1 および PABP1) の濃度も 4 時間経過時でほぼ完全に消失する。この結果、6 時間後の状態においては TIA1 のみが顆粒形成し、他の SG マーカータンパク質は含まない状態が生まれる。

通常の SG アセンブリは eIF2 $\alpha$  キナーゼを介した eIF2 $\alpha$  のストレス誘導リン酸化がトリガーとなる[図 24]。TC の合成が阻害されることで、翻訳開始機構が停滞し、下流の翻訳開始因子、RNA 結合タンパク質が SG のマーカーとなる。しかし、この SG アセンブリにおける eIF2 $\alpha$  リン酸化の要件は、RNA ヘリカーゼ eIF4A を標的とすることによって翻訳開始を阻害するパテアミン A やヒプリストアノールを使用してバイパスすることが可能であること知られている [30]。eIF4A は、eIF4E および足場タンパク質 eIF4G と共にヘテロ三量体複合体 eIF4F を構成する。eIF4F は eIF4B との協同作用で mRNA の 5' キャップ近位領域を巻き戻しに関わっており、翻訳開始のためのリボソーム結合に極めて重要な役割を果たしている。

ポリオウイルス感染中に生じる翻訳抑制は、ウイルス 2A プロテアーゼによる eIF4G の切断による eIF2 $\alpha$  非依存性の反応である。前項でも検討した通り、tRNA cleavage に関しては明らかな結論は得られていないが、生理作用を持つ 5'-tiRNA halves は eIF4F complex 合成を阻害して翻訳抑制を抑制することが明らかにされており、SG の形成メカニズムとしては相似性が指摘できる。しかし、ポリオウイルス感染早期では PABP1 も含まれると報告されており、時系列等での検証、および他のストレスマーカーの局在の確認が今後の検討課題である。一方において、エックス線照射によるストレスはストレス応答 MAP キナーゼ (p38 および JNK) 経路を介してアポトーシスを強く誘導するため、SG の形成を誘発しないとしている報告もある[70, 103]。Metc と TIA1 の共局在からなる新規の顆粒形成である可能性についても今後の検討課題である。

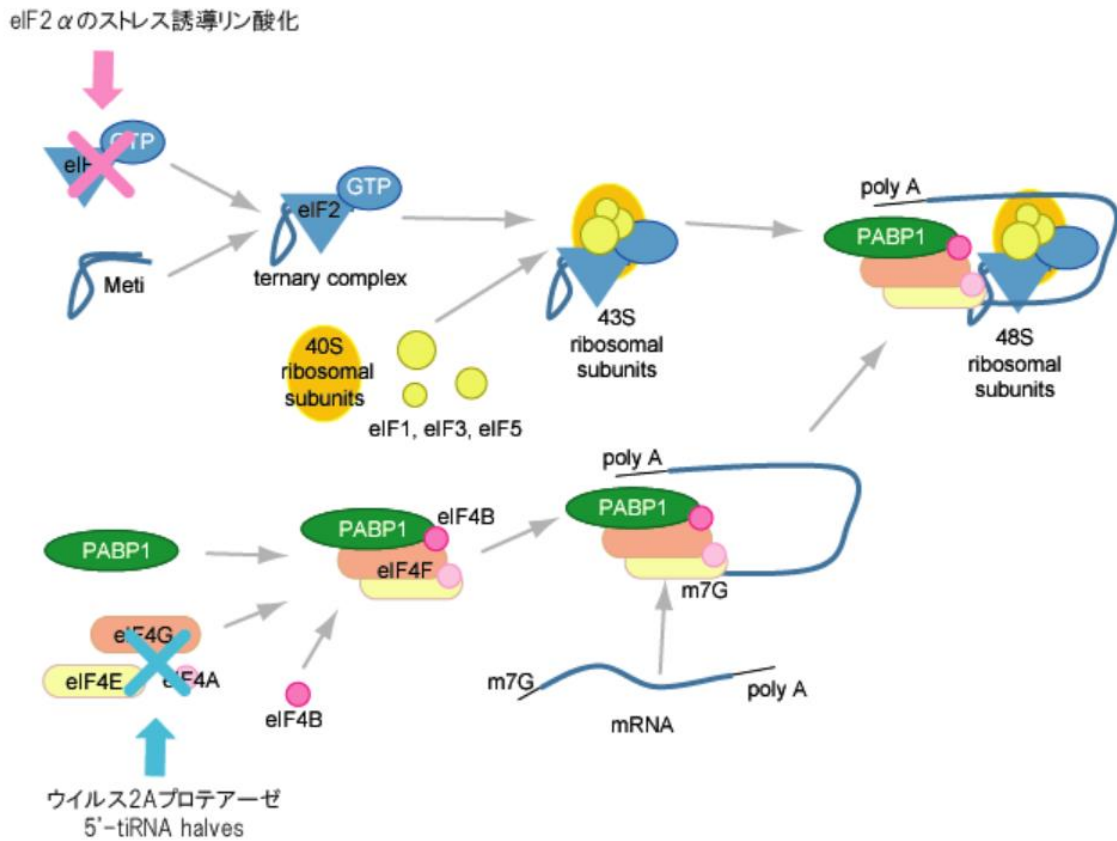


図 24 翻訳開始機構における各種ストレスによる翻訳制御のシェーマ ([104]より改編)。通常の SG 形成は、HRI、PERK、PKR、および GCN2 等の eIF2 $\alpha$  キナーゼを介した eIF2 $\alpha$  のストレス誘導リン酸化がトリガーとなる (図中のピンクの矢印)。この一方で、eIF2 $\alpha$  非依存性の SG 形成機構も存在することが知られている (図中の水色の矢印)。ポリオウイルスによるウイルス 2A プロテアーゼによる eIF4G 切断、5'-tiRNA halves による eIF4F complex 合成阻害等は eIF2 $\alpha$  非依存性の SG 形成機構である。

### 7 - 3 Meti と Mete の相違

本研究において Meti は顆粒形成を認めず、Mete のみが細胞質 TIA1 と共局在化した顆粒形成することを示した。このように tRNA のサブクラスにおける反応の違いが起きる可能性に関して検討を行った。

真核生物の tRNA 代謝においては 2 つの主要な経路が明らかにされている [93]。tRNA の分解は、プレ-tRNA または成熟 tRNA 種のレベルで起こり、第一の経路は、未成熟な tRNA が核内の TRAMP (Trf4 (トポイソメラーゼ 1 関連 4) / Air2 (アルギニン RING フィンガータンパク質 2) / Mtr4p (mRNA 輸送調節因子 4 タンパク質) ポリアデニル化) Complex へ回収される NSP (Nuclear surveillance pathway) である。第 2 の tRNA 分解経路は、RTD (Rapid tRNA Decay) と呼ばれる迅速な tRNA 崩壊のための経路である [図 25]。

NSP は修飾異常を呈する pre-tRNA を対象とし、TRAMP complex による tRNA 3' 末端のポリアデニル化後に、核内エキソソームの構成成分である 3'-5' エキソリボヌクレアーゼ Rrp6 により分解される経路である [105-107]。転写後プロセシング途中の Meti の場合、メチル化修飾 (m1A58) の欠損により Trf4 によるポリアデニル化が引き起こされる [108]。このほか、スプライシングされていないイントロン含有プレ-tRNA も、TRAMP Complex の標的であることが知られている [109] が、どのように pre-tRNA がポリアデニル化および分解される基質として認識されるか否かは、ほとんど知られていない [93]。

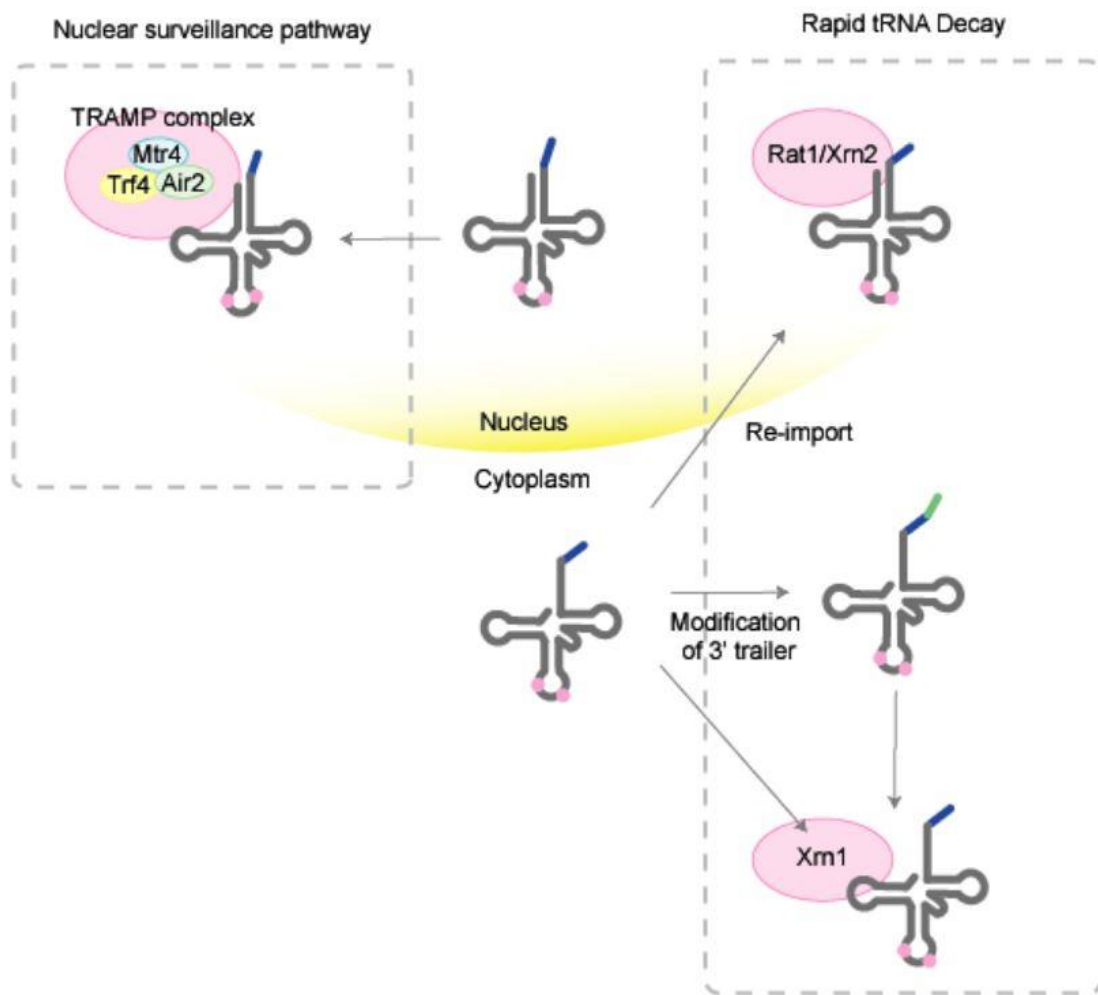


図 25 一般的に知られている真核生物における tRNA の代謝経路 ([93]より改編)。未成熟な tRNA は TRAMP complex による核内監視機構により、塩基修飾不良の tRNA が選択的に分解される。一方で成熟 tRNA による代謝機構は細胞質におけるヌクレアーゼ Xrn1 及び核内における Rat1 が知られている。Xrn1 経路が選択される理由として、tRNA 分子の 5'末端を露出させる受容体ステムの不安定性等が挙げられているが、どのような認識機構になっているかに関しては十分に分かっていない。Rat1/Xrn2 は核内に局在しており、このエンドヌクレアーゼによる分解を可能にするために成熟 tRNA をこの区画に再輸入する機構を有することを示唆している。

NSPは主に pre-tRNA に作用するが、成熟 tRNA は RTD 経路により管理されている。Xrn1 による細胞質における分解は、tRNA 分子の 5'末端を露出させる Acceptor ステムの不安定性のためであると考えられている[110]。この作用を利用し、tRNAヌクレオチジルトランスフェラーゼは、修飾されていない tRNA および異常な 3 次構造を有する tRNA に 3'CCACCA 末端を付加することで、Xrn1 分解の標識として分解することができる[111, 112]。この一方、核における分解を担う Rat1/Xrn2 は細胞質における Xrn1 と同様に、RNA 代謝に関する役割を担う重要なヌクレアーゼであり、転写産物の伸長および終結、5'-末端の成熟化、ならび異常配列の除去に働くことが知られている[113]。

Watanabe らは Hela 細胞における熱ストレス下による tRNA 動態を報告している[82]。同報告においては、Met<sup>e</sup> の相対発現量は保存されるのに対して、Met<sup>i</sup> のみが時系列に沿って相対発現量は減少することを示している。すなわち、メチオニンのサブクラスに対してストレス応答が異なることを報告している。熱ストレスに対する翻訳抑制機構としては、開始に必須である Met<sup>i</sup> のみが減少することは効率的であり、興味深い現象であると思われる。更に、彼らは RNA 干渉の技術を用いて Met<sup>i</sup> の分解が細胞質及び核の Xrn1/2 の双方によることを突き止めている。

本研究においては、Met<sup>e</sup> のみが顆粒形成を呈した。上述の報告から検討すると、Met<sup>e</sup> と Met<sup>i</sup> で分解の時系列が異なる可能性はある。Met<sup>i</sup> のみが選択的に分解されることで、急激な濃度減少を引き起こし顆粒形成に至らなかったとする仮説は可能である。一方、彼らの研究は熱ストレス下での報告であり、放射線によるストレス時に同様であるとは限らない。過去の報告においては熱スト



レスにおいて H1299 細胞株は核内に Meti および Mete の両者において tRNA 顆粒の形成を示している [77]。放射線によるストレスによる本研究結果との相違は、直接的には何らかの核内移行因子の修飾によるものではないかと考える。しかしながら、細胞質の Meti 濃度は tRNA 新規産出、核内-細胞質輸送因子、tRNA 成熟過程、tRNA 代謝により厳密に調整を受けているため、これら一つ一つのチェックが今後の検討課題である。

## 7 - 4 Limitation と今後の展望

前述の通り本研究には Limitation 及び今後検討すべき課題が存在する。

第一に FISH による解析は共局在化を示唆するものであり分子間相互作用の直接的な証明にはならないため、他の生化学的または生物物理学的試験による RNA-タンパク質相互作用を検討していく必要がある。すなわち、Metz 顆粒と TIA1 との共局在は確認できたが、これが実際に直接作用しているのか、mRNA 等を介して二次的に凝集をしているかなどは検討すべき点である。

免疫染色の結果に関しても Dcp1a, PABP1 に対してのみ検討を行ったのみであり、顆粒内成分のストレスマーカーの追加による成分検討も進めなければならぬ。SG 等であれば時系列にその顆粒成分が変化することは前項で記載の通りであり、時系列における観測も必須である。メチオニン以外の tRNA の細胞内動態や、他のストレス刺激との比較、他細胞種での汎用性の検討なども必要である。

顆粒の形成過程に関しても不明な点は多く残る。本研究においては細胞質に顆粒が形成されたが、これを単に細胞質における局在変化によるものと結論づけしてはならない。tRNA の転写亢進、細胞質-核内移行因子の影響、細胞質における分解抑制などの影響により細胞質内の tRNA 濃度上昇が起きており、顆粒形成に促進的に働いている可能性も否定しきれない。

Hela 細胞における熱ストレス付加の先行研究との間には、細胞種による違い

も否定しきれないことは大きな問題である。また、熱ストレス時に **Mete** 顆粒と共局在をしていた **HSF1** に関しても免疫染色をおこなったが、今回検出された **Mete** 顆粒に共局在を示すことはなかった。この現象に関しては再現実験も不十分であり、データ保存も十分でないため実験結果として記載できなかった。このことにより明示的な実験結果の解釈が狭まることとなったため、このような否定的データの真摯な蓄積の姿勢が欠如していたことは大きな反省点であった。

また、顆粒の観測については取得画像からの目視にて行った。顆粒数の解析ソフトウェア等による客観的なカウントも検討したが、多くの画像を処理するに際して取得画像の背景及び細胞質の輝度が異なることが大きな問題となった。これにより、結局は恣意的な顆粒定義の閾値を設定せざるを得ない結果となったため、使用によるメリットは乏しいと判断した。同理由より、細胞質-核間での **tRNA** 分布の濃度比較も困難であった。今後においてはデータの均質性を得られるような画像収集を目指していかねばならないと考える。

これらの多くの問題を克服できた際には、それに立脚する分子マーカー等の応用技術への展開が期待される。

現状で放射線ストレスマーカーとして最も確立されたものとして、 $\gamma$ -**H2AX**、**53BP1** が挙げられる。これらは、放射線により誘発された **DNA** 二本鎖切断の修復過程における損傷センサーや修復タンパク質を検出したものである。これらの分子マーカーは **DNA** 損傷修復機構における役割も確立している反面、あくまで **DNA** 損傷を検出しているマーカーである。**DNA** 損傷とは独立

に、もしくはそれに近い形で tRNA による顆粒形成が発生するとすれば、DNA 損傷を介さずに放射線の影響を検出することが可能になるかもしれない。所謂、エピジェネティックなストレス応答機構の一つとして細胞にこのような機構が備わっている可能性を本研究は示唆している。p53 の有無に関わらず顆粒検出が認められたことから、この可能性を支持する。今後、これを確認するためには既存の DNA マーカー ( $\gamma$ -H2AX 等) との共染色を行って、tRNA 顆粒形成との DNA 損傷との相関を検討する必要がある。更には  $\gamma$ -H2AX、53BP1 は DNA 損傷過程における役割が明確化しているが、tRNA 顆粒が細胞内代謝における役割は不明であり、今後知見を集めていかねばならない。

## 8 結論

本研究を通じて、放射線ストレス下のヒト由来細胞株を用いて得られた主な知見は以下の通りである。

エックス線照射後 2 時間の時点で非小細胞肺癌由来細胞株 (H1299) の細胞質に **Metc** 顆粒の形成が認められた。同現象は 0.5 Gy - 4 Gy 照射時に確認され、コントロール群との間に明らかな有意差をもって検出することができた。

同じメチオニン tRNA のサブクラスである **Meti** ではコントロール群との間に明らかな有意差を認めず、顆粒形成現象は **Metc** に特異的であることを明らかにした。ヒト細胞における tRNA の細胞内分布へのエックス線照射による影響を tRNA プローブを用いて直接可視化した点に新規性を有する。

また、検出された **Metc** 顆粒を既知の細胞質顆粒のマーカータンパク質と共染色を実施した。この結果より、RNA 結合タンパク質の **TIA1** と共局在を認める一方、典型的な **SG・PB** のマーカータンパク質とは共染色を認めなかった。

同現象は、p53-発現 H1299 株及びヒト非小細胞肺癌由来細胞株 A549 細胞においても同様に確認された。

検出された tRNA 顆粒が実際に細胞内で果たしている役割に関しては今後の検討課題である。応用の可能性としては DNA 損傷修復機構に独立した新規の分子マーカーとして利用可能である可能性も示唆される。しかしながら、時系列変化、顆粒内成分の検討、他刺激との比較、他細胞種での再現性、他分子マーカーとの比較等の面において更なる研究を積み重ねる必要がある。

## 9 謝辞

本論文は筆者が東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻医学博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同専攻 中川 恵一准教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。

東京大学医学部附属病院病理部 宮川 隆特任助教には本研究におけるアプローチの仕方など必要なことを多方面に渡って御指導いただきました。本当にありがとうございました。

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 人体病理学・病理診断学 深山 正久教授、森川 鉄平准教授には研究全期間にわたり、実験を遂行するにあたり必要な実験室使用の便宜および御指導を賜りました。ありがとうございました。

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 微生物学講座 微生物学研究室 畠山 昌則教授、紙谷 尚子講師には本研究を遂行するにあたり顕微鏡装置使用の便宜及び御指導を賜りました。ありがとうございました。

東京大学医学部附属病院放射線科放射線治療部門の各位には研究遂行にあたり日頃より有益な討論・助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

## 1 0 参考文献

1. Ward JF: **DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988, **35**:95-125.
2. Brady LW, Carlos A. Perez, and David E. Wazer.: **Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology**; 2013.
3. Lahue RS, Au KG, Modrich P: **DNA mismatch correction in a defined system.** *Science* 1989, **245**(4914):160-164.
4. Lindahl T: **An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974, **71**(9):3649-3653.
5. Sancar A, Rupp WD: **A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of Escherichia coli cuts a DNA strand on both sides of the damaged region.** *Cell* 1983, **33**(1):249-260.
6. Tounekti O, Kenani A, Foray N, Orłowski S, Mir LM: **The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway.** *Br J Cancer* 2001, **84**(9):1272-1279.
7. Fattah F, Lee EH, Weisensel N, Wang Y, Lichter N, Hendrickson EA: **Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells.** *PLoS Genet* 2010, **6**(2):e1000855.
8. Lieber MR: **The mechanism of human nonhomologous DNA end joining.** *J Biol Chem* 2008, **283**(1):1-5.

9. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y:  
**Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage.**  
*EMBO J* 2003, **22**(20):5612-5621.
10. Shiloh Y: **ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.**  
*Nat Rev Cancer* 2003, **3**(3):155-168.
11. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR: **p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(18):8493-8497.
12. Bartek J, Lukas J: **Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage.** *FEBS Lett* 2001, **490**(3):117-122.
13. Gogineni VR, Nalla AK, Gupta R, Dinh DH, Klopfenstein JD, Rao JS: **Chk2-mediated G2/M cell cycle arrest maintains radiation resistance in malignant meningioma cells.** *Cancer Lett* 2011, **313**(1):64-75.
14. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM: **DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.** *J Biol Chem* 1998, **273**(10):5858-5868.
15. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM: **A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.** *Curr Biol* 2000, **10**(15):886-895.
16. Lassmann M, Hänscheid H, Gassen D, Biko J, Meineke V, Reiners C, Scherthan H: **In vivo formation of gamma-H2AX and 53BP1 DNA repair foci in blood cells after radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer.** *J Nucl Med* 2010, **51**(8):1318-1325.



17. Sharma A, Singh K, Almasan A: **Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage.** *Methods Mol Biol* 2012, **920**:613-626.
18. Hühn D, Bolck HA, Sartori AA: **Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy.** *Swiss Med Wkly* 2013, **143**:w13837.
19. Wright MW, Bruford EA: **Naming 'junk': human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature.** *Hum Genomics* 2011, **5**(2):90-98.
20. Palazzo AF, Lee ES: **Non-coding RNA: what is functional and what is junk?** *Front Genet* 2015, **6**:2.
21. Amaral PP, Dinger ME, Mattick JS: **Non-coding RNAs in homeostasis, disease and stress responses: an evolutionary perspective.** *Brief Funct Genomics* 2013, **12**(3):254-278.
22. Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S, Rastan S: **The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus.** *Cell* 1992, **71**(3):515-526.
23. Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF: **The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus.** *Cell* 1992, **71**(3):527-542.
24. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**(6669):806-811.

25. Pickford AS, Cogoni C: **RNA-mediated gene silencing**. *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(5):871-882.
26. Meister G, Tuschl T: **Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA**. *Nature* 2004, **431**(7006):343-349.
27. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al*: **Initial sequencing and analysis of the human genome**. *Nature* 2001, **409**(6822):860-921.
28. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al*: **The sequence of the human genome**. *Science* 2001, **291**(5507):1304-1351.
29. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O: **Novel classes of non-coding RNAs and cancer**. *J Transl Med* 2012, **10**:103.
30. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C *et al*: **The transcriptional landscape of the mammalian genome**. *Science* 2005, **309**(5740):1559-1563.
31. Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J *et al*: **Antisense transcription in the mammalian transcriptome**. *Science* 2005, **309**(5740):1564-1566.
32. Shabalina SA, Spiridonov NA: **The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences**. *Genome Biol* 2004, **5**(4):105.
33. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y, Ijiri K, Akimitsu N: **MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes**. *FEBS Lett* 2010, **584**(22):4575-4580.

34. Inamura K: **Major Tumor Suppressor and Oncogenic Non-Coding RNAs: Clinical Relevance in Lung Cancer.** *Cells* 2017, **6**(2).
35. **An emerging interest in RNA world**  
(<http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/product/epigenetics/RNAworld.html>)[last access 08/08/2017]
36. Wang J, Song YX, Ma B, Wang JJ, Sun JX, Chen XW, Zhao JH, Yang YC, Wang ZN: **Regulatory Roles of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**(8):19886-19919.
37. HOAGLAND MB, STEPHENSON ML, SCOTT JF, HECHT LI, ZAMECNIK PC: **A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.** *J Biol Chem* 1958, **231**(1):241-257.
38. HOLLEY RW, APGAR J, EVERETT GA, MADISON JT, MARQUISEE M, MERRILL SH, PENSWICK JR, ZAMIR A: **STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID.** *Science* 1965, **147**(3664):1462-1465.
39. Kim SH, Quigley GJ, Suddath FL, McPherson A, Sneden D, Kim JJ, Weinzierl J, Rich A: **Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain.** *Science* 1973, **179**(4070):285-288.
40. Sharp SJ, Schaack J, Cooley L, Burke DJ, Söll D: **Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes.** *CRC Crit Rev Biochem* 1985, **19**(2):107-144.
41. Yang XL, Schimmel P: **Functional expansion of the tRNA world under stress.** *Mol Cell* 2011, **43**(4):500-502.
42. Tamura K: **Origins and Early Evolution of the tRNA Molecule.** *Life (Basel)* 2015, **5**(4):1687-1699.

43. Itoh Y, Sekine S, Suetsugu S, Yokoyama S: **Tertiary structure of bacterial selenocysteine tRNA**. *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(13):6729-6738.
44. Jahn M, Rogers MJ, Söll D: **Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA(Gln) are major recognition elements for E. coli glutamyl-tRNA synthetase**. *Nature* 1991, **352**(6332):258-260.
45. Hardt WD, Schlegl J, Erdmann VA, Hartmann RK: **Role of the D arm and the anticodon arm in tRNA recognition by eubacterial and eukaryotic RNase P enzymes**. *Biochemistry* 1993, **32**(48):13046-13053.
46. Krasilnikov AS, Mondragón A: **On the occurrence of the T-loop RNA folding motif in large RNA molecules**. *RNA* 2003, **9**(6):640-643.
47. White RJ: **Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought**. *Nat Rev Genet* 2011, **12**(7):459-463.
48. Dieci G, Fiorino G, Castelnuovo M, Teichmann M, Pagano A: **The expanding RNA polymerase III transcriptome**. *Trends Genet* 2007, **23**(12):614-622.
49. Yoshihisa T, Yunoki-Esaki K, Ohshima C, Tanaka N, Endo T: **Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria**. *Molecular biology of the cell* 2003, **14**(8):3266-3279.
50. Amois S: **Shuttle discovery**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005, **6**:514.
51. Hopper AK, Pai DA, Engelke DR: **Cellular dynamics of tRNAs and their genes**. *FEBS Lett* 2010, **584**(2):310-317.

52. Pavon-Eternod M, Gomes S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T: **tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(21):7268-7280.
53. Daly NL, Arvanitis DA, Fairley JA, Gomez-Roman N, Morton JP, Graham SV, Spandidos DA, White RJ: **Deregulation of RNA polymerase III transcription in cervical epithelium in response to high-risk human papillomavirus.** *Oncogene* 2005, **24**(5):880-888.
54. Winter AG, Sourvinos G, Allison SJ, Tosh K, Scott PH, Spandidos DA, White RJ: **RNA polymerase III transcription factor TFIIC2 is overexpressed in ovarian tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(23):12619-12624.
55. Zhou Y, Goodenbour JM, Godley LA, Wickrema A, Pan T: **High levels of tRNA abundance and alteration of tRNA charging by bortezomib in multiple myeloma.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **385**(2):160-164.
56. Kirchner S, Ignatova Z: **Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease.** *Nat Rev Genet* 2015, **16**(2):98-112.
57. Shaheen HH, Hopper AK: **Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(32):11290-11295.
58. Takano A, Kajita T, Mochizuki M, Endo T, Yoshihisa T: **Cytosolic Hsp70 and co-chaperones constitute a novel system for tRNA import into the nucleus.** *Elife* 2015, **4**.
59. Chafe SC, Pierce JB, Eswara MB, McGuire AT, Mangroo D: **Nutrient stress does not cause retrograde transport of cytoplasmic tRNA to the nucleus in evolutionarily diverse organisms.** *Mol Biol Cell* 2011, **22**(7):1091-1103.

60. Drabkin HJ, Estrella M, Rajbhandary UL: **Initiator-Elongator Discrimination in Vertebrate tRNAs for Protein Synthesis.** *Molecular and Cellular Biology* 1998, **18**(3):1459-1466.
61. Kolitz SE, Lorsch JR: **Eukaryotic Initiator tRNA: Finely Tuned and Ready for Action.** *FEBS letters* 2010, **584**(2):396-404.
62. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV: **The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**(2):113-127.
63. Holcik M, Sonenberg N: **Translational control in stress and apoptosis.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2005, **6**(4):318.
64. Gingold H, Tehler D, Christoffersen NR, Nielsen MM, Asmar F, Kooistra SM, Christophersen NS, Christensen LL, Borre M, Sørensen KD *et al*: **A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation.** *Cell* 2014, **158**(6):1281-1292.
65. Pavon-Eternod M, Gomes S, Rosner MR, Pan T: **Overexpression of initiator methionine tRNA leads to global reprogramming of tRNA expression and increased proliferation in human epithelial cells.** *RNA* 2013, **19**(4):461-466.
66. Clarke CJ, Berg TJ, Birch J, Ennis D, Mitchell L, Cloix C, Campbell A, Sumpton D, Nixon C, Campbell K *et al*: **The Initiator Methionine tRNA Drives Secretion of Type II Collagen from Stromal Fibroblasts to Promote Tumor Growth and Angiogenesis.** *Curr Biol* 2016, **26**(6):755-765.
67. Birch J, Clarke CJ, Campbell AD, Campbell K, Mitchell L, Liko D, Kalna G, Strathdee D, Sansom OJ, Neilson M *et al*: **The initiator methionine tRNA**

- drives cell migration and invasion leading to increased metastatic potential in melanoma.** *Biology Open* 2016, **5**(10):1371-1379.
68. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG: **Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.** In.: Portland Press Limited; 2006.
69. Komar AA, Hatzoglou M: **Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in pathophysiological states.** *Cell Cycle* 2011, **10**(2):229-240.
70. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M: **Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(11):1324-1332.
71. Parker R, Sheth U: **P bodies and the control of mRNA translation and degradation.** *Mol Cell* 2007, **25**(5):635-646.
72. Adjibade P, Mazroui R: **Control of mRNA turnover: implication of cytoplasmic RNA granules.** *Semin Cell Dev Biol* 2014, **34**:15-23.
73. Pardue ML, Gall JG: **MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO THE DNA OF CYTOLOGICAL PREPARATIONS.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1969, **64**(2):600-604.
74. Southern EM: **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J Mol Biol* 1975, **98**(3):503-517.
75. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR: **Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5350-5354.
76. Shav-Tal Y, Singer RH: **RNA localization.** *Journal of Cell Science* 2005, **118**(18):4077.

77. Miyagawa R, Mizuno R, Watanabe K, Ijiri K: **Formation of tRNA granules in the nucleus of heat-induced human cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2012, **418**(1):149-155.
78. Chatterjee K, Nostramo RT, Wan Y, Hopper AK: **tRNA dynamics between the nucleus, cytoplasm and mitochondrial surface: Location, location, location.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 2017.
79. Kedersha N, Anderson P: **Mammalian stress granules and processing bodies.** *Methods Enzymol* 2007, **431**:61-81.
80. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P: **Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**(12):5383-5398.
81. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P: **Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase?** *Trends Biochem Sci* 2013, **38**(10):494-506.
82. Watanabe K, Miyagawa R, Tomikawa C, Mizuno R, Takahashi A, Hori H, Ijiri K: **Degradation of initiator tRNA<sup>Met</sup> by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(8):4671-4685.
83. Thompson DM, Parker R: **Stressing out over tRNA cleavage.** *Cell* 2009, **138**(2):215-219.
84. Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R: **tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes.** *Rna* 2008, **14**(10):2095-2103.
85. Levitz R, Chapman D, Amitsur M, Green R, Snyder L, Kaufmann G: **The optional E. coli prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease.** *EMBO J* 1990, **9**(5):1383-1389.



86. Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P: **Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression.** *J Cell Biol* 2009, **185**(1):35-42.
87. Haiser HJ, Karginov FV, Hannon GJ, Elliot MA: **Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(3):732-741.
88. Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X: **Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells.** *FEBS letters* 2009, **583**(2):437-442.
89. Pizzo E, Sarcinelli C, Sheng J, Fusco S, Formiggini F, Netti P, Yu W, D'Alessio G, Hu GF: **Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival.** *J Cell Sci* 2013, **126**(Pt 18):4308-4319.
90. Brzezniak LK, Bijata M, Szczesny RJ, Stepien PP: **Involvement of human ELAC2 gene product in 3' end processing of mitochondrial tRNAs.** *RNA Biol* 2011, **8**(4):616-626.
91. Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA: **Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing.** *RNA* 2010, **16**(4):673-695.
92. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R: **Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs.** *Genes Dev* 2008, **22**(20):2773-2785.

93. Megel C, Morelle G, Lalande S, Duchêne AM, Small I, Maréchal-Drouard L: **Surveillance and cleavage of eukaryotic tRNAs.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**(1):1873-1893.
94. Saikia M, Hatzoglou M: **The Many Virtues of tRNA-derived Stress-induced RNAs (tiRNAs): Discovering Novel Mechanisms of Stress Response and Effect on Human Health.** *J Biol Chem* 2015, **290**(50):29761-29768.
95. Anderson P, Ivanov P: **tRNA fragments in human health and disease.** *FEBS Lett* 2014, **588**(23):4297-4304.
96. Li Y, Zhou H: **tRNAs as regulators in gene expression.** *Sci China C Life Sci* 2009, **52**(3):245-252.
97. Saikia M, Krokowski D, Guan BJ, Ivanov P, Parisien M, Hu GF, Anderson P, Pan T, Hatzoglou M: **Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress.** *J Biol Chem* 2012, **287**(51):42708-42725.
98. Emara MM, Ivanov P, Hickman T, Dawra N, Tisdale S, Kedersha N, Hu GF, Anderson P: **Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly.** *J Biol Chem* 2010, **285**(14):10959-10968.
99. Waris S, Wilce MC, Wilce JA: **RNA recognition and stress granule formation by TIA proteins.** *Int J Mol Sci* 2014, **15**(12):23377-23388.
100. Zhang T, Delestienne N, Huez G, Kruys V, Gueydan C: **Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins.** *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 23):5453-5463.

101. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E: **P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(1):9-22.
102. White JP, Lloyd RE: **Poliovirus unlinks TIA1 aggregation and mRNA stress granule formation.** *J Virol* 2011, **85**(23):12442-12454.
103. Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M: **Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production.** *Mol Cell Biol* 2013, **33**(4):815-829.
104. Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS: **4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle.** *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 2000, **279**(4):E715.
105. LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, Tollervey D: **RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex.** *Cell* 2005, **121**(5):713-724.
106. Houseley J, LaCava J, Tollervey D: **RNA-quality control by the exosome.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**(7):529-539.
107. Vanáčová S, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, Langen H, Keith G, Keller W: **A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control.** *PLoS Biol* 2005, **3**(6):e189.
108. Kadaba S, Krueger A, Trice T, Krecic AM, Hinnebusch AG, Anderson J: **Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*.** *Genes Dev* 2004, **18**(11):1227-1240.

109. Copela LA, Fernandez CF, Sherrer RL, Wolin SL: **Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation.** *RNA* 2008, **14**(6):1214-1227.
110. Whipple JM, Lane EA, Chernyakov I, D'Silva S, Phizicky EM: **The yeast rapid tRNA decay pathway primarily monitors the structural integrity of the acceptor and T-stems of mature tRNA.** *Genes Dev* 2011, **25**(11):1173-1184.
111. Wilusz JE, Whipple JM, Phizicky EM, Sharp PA: **tRNAs marked with CCACCA are targeted for degradation.** *Science* 2011, **334**(6057):817-821.
112. Kuhn CD, Wilusz JE, Zheng Y, Beal PA, Joshua-Tor L: **On-enzyme refolding permits small RNA and tRNA surveillance by the CCA-adding enzyme.** *Cell* 2015, **160**(4):644-658.
113. Krzyszton M, Zakrzewska-Placzek M, Koper M, Kufel J: **Rat1 and Xrn2: The Diverse Functions of the Nuclear Rat1/Xrn2 Exonuclease.** *Enzymes* 2012, **31**:131-163.