

令和元年9月5日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18493

研究課題名(和文) グリシンを結合するイソロイシンtRNAは翻訳以外で機能するか？

研究課題名(英文) Function of glycine charged tRNA outside translation

研究代表者

富川 千恵 (Tomikawa, Chie)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・特任講師

研究者番号：60527696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌*Lactobacillus plantarum*には、イソロイシンではなくグリシンを受容する tRNA^{Ile}(UAU)様分子が存在する。第一の目的として、当該RNAが翻訳に利用されているのか明らかにするため解析を進めた。当該RNAは、AUAコドンのみとリボソーム上で結合するが、翻訳伸長因子EF-Tuとの結合性を確認することができていない。tRNA^{Ile}(UAU)様分子の翻訳外機能を調査するため、当該RNA親和性を示すタンパク質を複数同定した。また、乳酸菌に2つ存在するtRNA^{Ile}(UAU)遺伝子の二重遺伝子破壊株が得られないことから、両遺伝子の欠損は致死的であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のところ、少なくとも栄養十分な条件下ではtRNA^{Ile}様のRNAが翻訳に使われていないことが示された。しかし、初歩実験の結果ではあるが、貧栄養な条件下でわずかに翻訳に利用されることが検出できている。当該RNAは、栄養条件次第では、タンパク質制御に関わっている可能性がある。本研究を進展させることで、新たなRNA機能を提示できると考える。

研究成果の概要(英文)： *Lactobacillus plantarum* possess tRNA^{Ile}(UAU)-like molecules. As the first aim, the RNA was analyzed to clarify its use for translation. The RNA binds to AUA codon on the ribosome. However its binding with translation factor EF-Tu has not been confirmed. In order to investigate the extra translational function of tRNA^{Ile}(UAU)-like molecule, some affinity proteins of the RNA were identified. In addition, a deletion mutant of both two tRNA^{Ile}(UAU) genes is considered to be lethal since the double deletion mutant has not been obtained.

研究分野：生化学

キーワード：RNA 非コードRNA 翻訳 タンパク質合成 乳酸菌 プロバイオティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成過程では、mRNA 上のコドンに対応するアミノアシル tRNA が、リボソームに正しく選択される必要がある。同じコドンボックスにおいて、コドン 3 文字目が A と G のコドンは、基本的に同一のアミノ酸を指定するが、例外的に AUA、AUG コドンではこの法則が成立せず、AUA は Ile を、AUG は Met を指定する。仮に、AUA コドンに相補的なアンチコドン UAU の tRNA^{Ile} があると、G・U ゆらぎ塩基対をとり、Met コドン AUG も Ile として翻訳してしまう。この“誤読”を防ぐためか、ほとんどの真正細菌は、tRNA^{Ile}(CAU)のアンチコドン文字目 C に、リジンを含んだ C 誘導体のライシジン(L)が導入された tRNA^{Ile}(LAU)が AUA コドンの翻訳を行い、AUG コドンと対合可能な tRNA^{Ile}(UAU)遺伝子をそもそも持たない。そのため、L 修飾を生合成する tRNA^{Ile} ライシジン合成酵素(TilS)が欠損すると、生育することができない。例外的に、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* のゲノムには、tRNA^{Ile}(UAU)、tRNA^{Ile}(CAU)、tilS 遺伝子が同時にコードされていた。また、当該 tRNA^{Ile}(UAU)は、通常の tRNA^{Ile} と比較しバリエーション領域が異様に長いという特徴を有している。もし、*L. plantarum* の tRNA^{Ile}(UAU)が翻訳に利用されるのなら、リボソーム自身が曖昧なシステムに対応し正確なコドン認識を行っている可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

L. plantarum の tRNA^{Ile}(UAU)が翻訳に利用されるのなら、これまで常識とされていたコドン-アンチコドン対合論とは異なる新たな翻訳制御機構を提唱する事ができるのではないかと本研究に着手した。tRNA がリボソーム上でコドン翻訳に利用されるには、まず tRNA の 3' CCA 末端に tRNA アンチコドンに対応したアミノ酸が結合しアミノアシル tRNA となり、翻訳伸長因子 EF-Tu と結合してリボソームに運ばなければならない。研究代表者とフランスのグループとの共同研究により、*L. plantarum* の tRNA^{Ile}(UAU) には、Ile ではなく Gly が結合し、EF-Tu の代わりにあるタンパク質 X が結合していることが明らかになっていた。さらに、tRNA^{Ile}(UAU)の中には、5'-3'が連結した環状化 tRNA を確認できていた。これは、RNA スプライシングで生成するイントロンの環状化や、permuted tRNA の中間体環状化 tRNA と明らかに異なる新規な発見であった。以上の研究成果をさらに発展させ、tRNA^{Ile}(UAU)の存在意義を提示し、生体への影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アミノアシル tRNA 合成酵素 GlyRS および IleRS の認識機構の比較解析

GlyRS および IleRS の組換えタンパク質を調製し、tRNA^{Ile}(UAU)に対する反応速度の比較解析を行った。GlyRS は、真核生物、アーキアの場合、 α サブユニット 2 つの α_2 ホモ二量体を構成し、真正細菌では α_2 二量体と $\alpha_2\beta_2$ のヘテロ四量体の両方が存在する。 α_2 ホモダイマー酵素については X 線結晶解析が完了し、基質認識機構の詳細な解析も行われているが、当該乳酸菌 GlyRS が属す $\alpha_2\beta_2$ タイプについては、四量体構造はおろか、生化学解析もほとんどなされていない。本酵素の生化学解析を進めることができれば、 α_2 タイプをもつ生物、 $\alpha_2\beta_2$ タイプをもつ生物の分子進化系統解析が可能になると考えられる。

(2) tRNA^{Ile}(UAU)の翻訳利用

GlyRS の tRNA^{Ile}(UAU)に対するグリシル化効率は非常に低いため、フレキシザイムを用いて Gly-tRNA^{Ile}(UAU)を調製し、本当に EF-Tu と結合しないのか確認した。また、tilS および tRNA^{Ile}(UAU)遺伝子破壊株を作成し、当該遺伝子不在で乳酸菌が生存できるのか観察を行うことを試みた。これら遺伝子破壊株の観察結果と、EF-Tu 結合実験の結果を合わせ、tRNA^{Ile}(UAU)の翻訳利用を明らかにすることを目指した。

(3) tRNA^{Ile}(UAU)と結合タンパク質との関係

細胞抽出液でグリシル化した tRNA^{Ile}(UAU)は、あるタンパク質が結合することが分かっていた。一部のアミノアシル tRNA は、翻訳時に利用されず、ペプチドグリカン合成に必要なアミノ酸供給の役割を担っているものがあり、そのような生体反応に携わっているのではないかと考えられるが、もしかすると全く別の新たな機能を担っているのかもしれない。tRNA^{Ile}(UAU)と関連するタンパク質を同定し、tRNA との関係性と機能を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1) GlyRS は tRNA^{Ile}(UAU)をわずかにグリシル化する。tRNA^{Gly}の変異 tRNA を調製し GlyRS の基質特異性を調べたところ、アンチコドン領域の変異体に対して GlyRS の活性を確認することができなかった。このことから、tRNA^{Ile}(UAU)は、バリエーション領域が長いことで GlyRS の基質になり得ている可能性がある。また、GlyRS の結晶化を行ったところ板状結晶を得られたので(図1)、結晶構造解析を進めているところである。



図1:GlyRS の結晶

(2) *L. plantarum* IleRS は試験管内 tRNA^{Ile}(UAU)転写産物をイソロイシル化しない。細胞内 tRNA は修飾ヌクレオシドが存在し、それら修飾がアミノアシル tRNA 合成酵素の基質認識に影響することもあるため、細胞から tRNA^{Ile}(UAU)を単離し解析を行った。質量分析により tRNA^{Ile}(UAU)のヌクレオシド分析を行ったところ、ほとんど修飾が導入されていないことが判明した。また、逆転写反応を利用し修飾ヌクレオシドの同定を試みたところ、アンチコドン領域にも修飾ヌクレオシドが存在しないことが明らかになった(図2)。また、細胞内から単離精製した tRNA^{Ile}(UAU)に対しても、IleRS は活性を示さなかった。乳酸菌 *Lactobacillus casei* にも tRNA^{Ile}(UAU)が存在するが、IleRS は tRNA^{Ile}(UAU)をイソロイシル化することができることが分かった。これら IleRS アミノ酸配列の相同性は非常に高く、何が理由で基質特異性の違いが生じているのか不明であるため、現在、変異酵素を用いその理由を探っている。

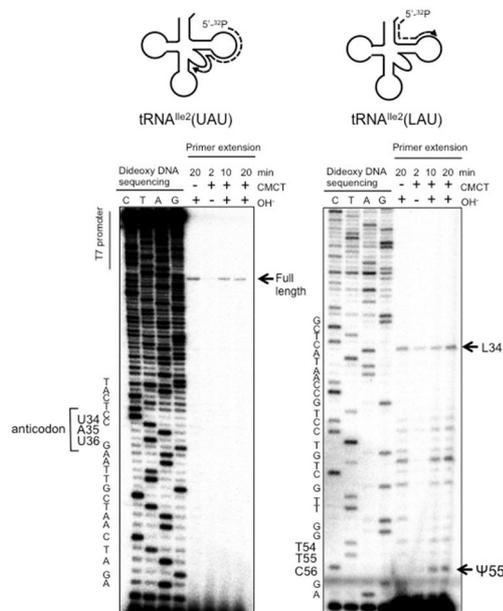
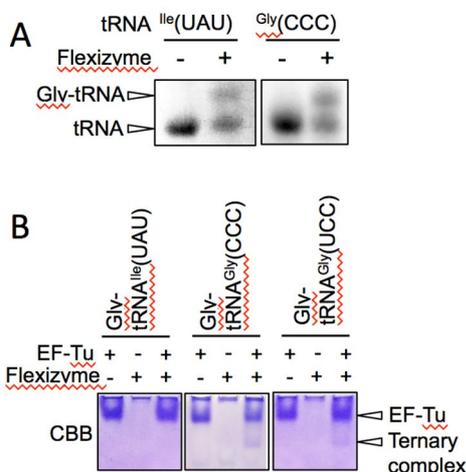


図2:逆転写反応を用いた修飾ヌクレオシドの分析結果

(3) 我々の実験では、Gly-tRNA^{Ile}(UAU)と EF-Tuとの結合を検出できていない(図3)。また、AUAコドンの翻訳に tRNA^{Ile}(UAU)が利用されているという結果も未だ得られていないため、当該 RNA が翻訳に利用されている可能性は非常に低いと考えている。これまでに *tilS* 遺伝子破壊株が得られていないことから、AUA コドンの翻訳には tRNA^{Ile}(LAU)が利用され、tRNA^{Ile}(UAU)ではその機能を補うことはできないと考えられる。一方、二つある tRNA^{Ile}(UAU)遺伝子の破壊株については、各々の遺伝子破壊株を得ることができたものの、二重遺伝子破壊株を得ることができていない。この状況から、tRNA^{Ile}(UAU)は翻訳には使われていないものの、その他の重要な機能を担っているものと考えられる。



(4) tRNA^{Ile}(UAU)が翻訳で利用されていない可能性が高いと考えられたため、tRNA^{Ile}(UAU)が tRNA 二次構造(クローバーリーフ構造)を維持していない可能性を考慮し、RNase を用いて二次構造の解析を行った。その結果、tRNA^{Ile}(UAU)はクローバーリーフ構造以外の構造を取り得ることが明らかになった。

(5) tRNA^{Ile}(UAU)と結合すると考えられるタンパク質を複数同定することができている。現在これらタンパク質と tRNA^{Ile}(UAU)の関係性を明らかにするため、フランス国立科学研究センターのチームと共同で解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Chie Tomikawa

“7-Methylguanosine Modification in Transfer RNA (tRNA)”

International Journal of Molecular Sciences, **19**(12) (2018) doi: 10.3390/ijms19124080

Hiroyuki Hori, Takuya Kawamura, Takako Awai, Anna Ochi, Ryota Yamagami, Chie Tomikawa and Akira Hirata

“Transfer RNA Modification Enzymes from Thermophiles and Their Modified Nucleosides in tRNA”

Microorganisms, **6**(4), 110 (2018) doi: 10.3390/microorganisms6040110

Chie Tomikawa, Kazuyuki Takai, Hiroyuki Hori

“Kinetic characterization of substrate-binding sites of thermostable tRNA methyltransferase (TrmB).”

The Journal of Biochemistry, **163** (2), 133-142(2018)

Misa Nakashima, Ryota Yamagami, Chie Tomikawa, Yuki Ochi, Toshiyuki Moriya, Haruichi Asahara, Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Tairo Oshima, Hiroyuki Hori.

“Long and branched polyamines are required for maintenance of the ribosome, tRNA^{His} and tRNA^{Tyr} in *Thermus thermophilus* cells at high temperatures”

Genes to Cells, **22**(7), 628-645(2017)

Ryota Yamagami, Chie Tomikawa, Naoki Shigi, Ai Kazayama, Shinichi Asai, Hiroyuki Takuma, Akira Hirata, Dominique Fourmy, Haruichi Asahara, Kimitsuna Watanabe, Satoko Yoshizawa, Hiroyuki Hori.

“Folate-/FAD-dependent tRNA methyltransferase from *Thermus thermophilus* regulates other modifications in tRNA at low temperatures.”

Genes to Cells, **21**(7), 740-754(2016)

[学会発表](計19件)

加藤凌平、富川千恵、高井和幸

“大腸菌タンパク質合成系への導入に向けたコムギ由来シャペロニンの調製”

第41回日本分子生物学会年会, 2018年

榊原健吾、富川千恵、吉澤聡子、高井和幸

“乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* に存在する tRNA^{Ile}(UAU)-like small RNA の機能解明に向けて”

第41回日本分子生物学会年会, 2018年

Chie Tomikawa, Sylvie Auxilien, Vincent Guerineau, Yuya Yoshioka, Kiyo Miyoshi, Hiroyuki Hori, Dominique Fourmy, Kazuyuki Takai, and Satoko Yoshizawa

“Characterization of tRNA^{Ile}(UAU)-like small RNAs in *Lactobacillus plantarum*”

11th Structure Integration Function and Reactivity of RNA (フランス国内学会), 2018年

加藤凌平、富川千恵、高井和幸

“コムギ CCT を組み合わせた大腸菌無細胞タンパク質合成系の調製”

第13回無細胞生命科学研究会, 2018年

加藤凌平、富川千恵、高井和幸

“コムギ由来 CCT は動物由来 CCT と異なる性質を持つ”

「細胞を創る」研究会 11.0, 2018年

Misa Nakashima, Ryota Yamagami, Chie Tomikawa, Yuki Ochi, Toshiyuki Moriya, Haruichi Asahara, Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Tairo Oshima and Hiroyuki Hori

“Long and branched polyamines are required for maintenance of the ribosome, tRNA^{His}, and tRNA^{Tyr} in *Thermus thermophilus* cells at high temperatures”

27th tRNA conference (国際学会), 2018年

Chie Tomikawa, Sylvie Auxilien, Vincent Guerineau, Kengo Sakakibara, Gakuto Uesugi, Hiroyuki Hori, Dominique Fourmy, Kazuyuki Takai, Satoko Yoshizawa

“Characterization of tRNA^{Ile}(UAU)-like small RNAs in *Lactobacillus plantarum*”

27th tRNA conference (国際学会), 2018年

富川千恵、堀田康弘、Sylvie Auxilien、Vincent Guerineau、林 実、堀 弘幸、Dominique Fourmy、高井和幸、吉澤聡子

“Functional analysis of tRNA-like small RNA through gene disruptants in *L. plantarum*”

第20回日本RNA学会年会, 2018年

中嶋美沙、山上龍太、富川千恵、越智裕貴、森屋利幸、朝原治一、Dominique Fourmy、吉澤聡子、大島泰郎、堀 弘幸

“高度好熱菌の長鎖・分岐鎖ポリアミンは、高温環境下でのリボソーム、tRNA^{His}、tRNA^{Tyr}の維持に必要である”

第20回日本RNA学会年会, 2018年

堀田康弘、富川千恵、相馬亜希子、榊原健吾、稲葉 希、上杉岳人、谷本奈那、吉澤聡子、高井和幸

“乳酸菌由来 tRNA^{Ile}(UAU)様 small RNA を導入した枯草菌の表現型観察”

第20回日本RNA学会年会，2018年

11 中嶋美沙、山上龍太、富川千恵、越智裕貴、森屋利幸、朝原治一、Dominique Fourmy、吉澤聡子、大島泰郎、堀 弘幸

“*Thermus thermophilus* の長鎖・分岐鎖ポリアミンは、高温環境下でのリボソーム、tRNA^{His}、tRNA^{Tyr} の維持に必要である”

日本ポリアミン学会第9回年会，2017年

12 富川千恵、Sylvie Auxilien、Vincent Guerineau、吉岡裕也、三好規代、林 実、堀 弘幸、Dominique Fourmy、高井 和幸、吉澤 聡子

“乳酸菌 Gly-tRNA^{Ile}(UAU)の機能解析”

ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会，2017年

13 加藤凌平、富川千恵、高井和幸

“大腸菌無細胞タンパク質合成系への導入のためのコムギ由来シャペロニンの調製”

「細胞を創る」研究会 10.0，2017年

14 富川千恵、Sylvie Auxilien、Vincent Guerineau、吉岡裕也、三好規代、林 実、堀 弘幸、Dominique Fourmy、高井 和幸、吉澤 聡子

“乳酸菌にある tRNA 様分子の解析”

グラム陽性菌ゲノム機能会議，2017年

15 富川千恵、Sylvie Auxilien、Vincent Guerineau、吉岡裕也、三好規代、林 実、堀 弘幸、Dominique Fourmy、高井 和幸、吉澤 聡子

“乳酸菌に存在する異様な tRNA^{Ile}(UAU)の解析”

第19回日本RNA学会年会，2017年

16 榊原健吾、富川千恵、吉澤聡子、高井和幸

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の tRNA^{Ile}(UAU)に対して親和性を持つ因子は存在するか

第19回日本RNA学会年会，2017年

17 Misa Nakashima, Ryota Yamagami, Yuki Ochi, Chie Tomikawa, Toshiyuki Moriya, Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Tairo Oshima, and Hiroyuki Hori

“高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の長鎖・分岐鎖ポリアミンは主に高温環境下でのリボソームの維持に必要である”

第39回日本分子生物学会年会，2016年

18 阿賀健、久松啓伍、富川千恵、高井和幸

“コムギ由来ペプチド鎖解離因子複合体の調製”

「細胞を創る」研究会 9.0，2016年

19 加藤凌平、富川千恵、高井和幸

“コムギ胚芽からのシャペロニンを含む画分の調製”

「細胞を創る」研究会 9.0, 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/7000014879/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉澤 聡子

ローマ字氏名：YOSHIKAWA Satoko

研究協力者氏名：高井 和幸

ローマ字氏名：TAKAI Kazuyuki

研究協力者氏名：堀 弘幸

ローマ字氏名：HORI Hiroyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。