

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06491

研究課題名(和文)tRNA様small RNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of tRNA-like small RNA

研究代表者

富川 千恵 (Tomikawa, Chie)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・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)：本研究は、*L. plantarum* イソロイシルtRNA合成酵素(IleRS)およびグリシルtRNA合成酵素(GlyRS)の基質特異性を明らかにすることを旨とした。

IleRSに関しては、*L. plantarum*と同族の*L. casei* IleRSとのキメラ酵素を用い生化学解析により、*L. casei* tRNA^{Ile}(UAU)の認識にはIleRSのGly18Asn19が重要であることを明らかにした。以上の成果を、FEBS Journal誌に掲載することができた。*L. plantarum* GlyRSに関しては、生化学解析に加え、GlyRS単独のX線結晶構造解析データを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチコドンがUAUであるtRNA^{Ile}を持つ生物種は限定されている。本研究において、当該tRNAにイソロイシンを結合することのできるイソロイシルtRNA合成酵素の特異性に関与するアミノ酸残基を特定した。また、アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)についてはこれまで数多くの報告がなされてきたなか、2²ヘテロ四量体タイプのグリシルtRNA合成酵素(GlyRS)の構造は明らかにされていなかったが、本研究によりヘテロ四量体型GlyRSの全体構造が明らかとなった。以上の乳酸菌由来アミノアシルtRNA合成酵素に関する情報は、ARSの起源および分類を議論する上で非常に有用な情報であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the substrate specificity of isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) and glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) derived from lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*.

We performed biochemical analysis using chimera IleRS proteins with IleRS from *L. casei* in the same family as *L. plantarum*, and found that Gly18Asn19 of IleRS is important for the recognition of *L. casei* tRNA^{Ile}(UAU). The result was published in the FEBS Journal. We also succeeded in acquiring the X-ray crystal structure analysis data of full length GlyRS from *L. plantarum*, in addition to the biochemical analysis data.

研究分野：生化学

キーワード：RNA アミノアシルtRNA合成酵素 翻訳 非コードRNA タンパク質合成 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が合成される際、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。同一コドンボックス内で、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。しかしながら、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 をというように異なるアミノ酸を指定する。仮に、AUA コドンに相補であるアンチコドン UAU の tRNA^{Ile}があると、G・U ゆらぎ塩基対を形成し、Met コドン AUG も Ile として翻訳する。この“誤読”を防ぐためか、ほとんどの真正細菌には、AUG コドンと対合可能な tRNA^{Ile}(UAU) が存在しない。代わりに、tRNA^{Ile} ライシジン合成酵素(TilS)によって、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 コドンを翻訳する。ところが、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* のゲノムには、tRNA^{Ile}(CAU)、*tilS* 遺伝子に加え、tRNA^{Ile}(UAU)様 small RNA (以降 LptRNA^{Ile}(UAU)と表記)遺伝子がコードされている。LptRNA^{Ile}(UAU)が翻訳に利用されているのなら、Met、Ile の両コドンと対合し、翻訳を攪乱する可能性が生じる。通常、tRNA^{Ile}は、パリアブル領域が短い class I tRNA に分類されるが、LptRNA^{Ile}(UAU)は、パリアブル領域が長い class II tRNA に分類される。また、当該 RNA にはイソロイシル tRNA 合成酵素(IleRS)の tRNA 認識塩基がほとんど保存されていない。これまで、我々は、LptRNA^{Ile}(UAU)の tRNA としての機能について着目し、LptRNA^{Ile}(UAU)には Ile ではなく Gly が結合することを明らかにした。また、*in vivo* および *in vitro* の実験により、少なくとも栄養十分で、なおかつストレスのない条件では、当該 RNA が翻訳に利用される可能性は非常に低いことを示した。一方、LptRNA^{Ile}(UAU)が細胞内で他 tRNA と同程度に発現していることから、当該 RNA は翻訳以外の場所で機能している可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの我々の研究成果をさらに発展・継続しようというものである。我々は、乳酸菌 *L. plantarum* の LptRNA^{Ile}(UAU)を単離精製後にヌクレオシド解析を行い、LptRNA^{Ile}(UAU)が IleRS の基質とならないということを明らかにした。また、LptRNA^{Ile}(UAU)には Gly が結合するが、Gly-tRNA^{Ile}(UAU)は翻訳伸長因子 EF-Tu と結合しないということも示した。さらに、少なくとも栄養十分な環境下で、LptRNA^{Ile}(UAU)はイソロイシル AUA コドンを翻訳しない、ということを明らかにした。これらの研究成果をもとに、グリシル tRNA 合成酵素がどのような機構で当該 RNA をアミノアシル化されているのか、また、イソロイシル tRNA 合成酵素がなぜ当該 RNA を基質としないのか明らかにし、さらに、LptRNA^{Ile}(UAU)の機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) GlyRS の基質 tRNA 認識機構

これまでの我々の研究成果から、細胞内で LptRNA^{Ile}(UAU)に Gly が結合することは明らかになっているが、Gly の結合を GlyRS が行なっているという決定的証拠が得られていなかった。そこで、リコンビナント *L. plantarum* GlyRS を調製し、LptRNA^{Ile}(UAU)に対するアミノアシル化能を調べるとともに、GlyRS の基質特異性の解析を試みた。*L. plantarum* の GlyRS は $\alpha_2\beta_2$ タイプに属している。 $\alpha_2\beta_2$ タイプ GlyRS に関してはそのヘテロ四量体構造は明らかになっておらず、精製酵素を用いた生化学解析もされていなかった。構造解析、生化学解析の両面から、 α_2 タイプ GlyRS と比較し、 $\alpha_2\beta_2$ タイプ酵素の基質認識機構を明らかにすることで、生物の分子進化系統解析が可能になると考えられる。

(2) IleRS の基質 tRNA 認識機構

L. plantarum の IleRS は LptRNA^{Ile}(UAU)をアミノアシル化しない。一方、tRNA^{Ile}(UAU)をもち *L. plantarum* と同族である *L. casei* の IleRS は、*L. casei* tRNA^{Ile}(UAU)をアミノアシル化する。この 2 種の IleRS を比較解析することにより、アンチコドンが UAU の tRNA^{Ile}を基質とするしないを決定する要因を探ることを目指した。

(3) *L. plantarum* tRNA^{Ile}(UAU)結合タンパク質との関係

LptRNA^{Ile}(UAU)と相互作用しうる結合タンパク質候補を、質量分析により同定を試みた。得られた候補タンパク質と LptRNA^{Ile}(UAU)の結合活性をゲルシフトアッセイにより解析し、相互作用を確認する。相互作用を確認できたタンパク質について、該当タンパク質の既知機能にとらわれることなく相互作用解析を進める。

4. 研究成果

(1) 大腸菌発現系により、リコンビナント His-tag 融合 *L. plantarum* GlyRS を調製し、ゲルろ過カ

ラムクロマトグラフィーによりヘテロ四量体 GlyRS を得た。精製 GlyRS の Lp tRNA^{Ile}(UAU) に対するアミノアシル化活性測定を行なったところ、わずかではあるが Gly が結合していることを確認した。また、野生型 tRNA^{Gly} および変異 tRNA^{Gly} に対するアミノアシル化活性を測定し、その基質特異性を評価した。その結果、tRNA の G1-C72 塩基対、C35、C36、A73 に変異を導入した変異体を基質として用いた場合、著しく GlyRS の活性が低下した (図 1) ことから、これらの塩基および塩基対が基質認識に重要であることが明らかになった。さらに、*L. plantarum* GlyRS の X 線結晶構造解析に関しては、セレノメチオニン標識した GlyRS を調製し、東京大学・富田研究室にて結晶化を行い板状結晶から 3.6Å の X 線回折データを取得することに成功した。

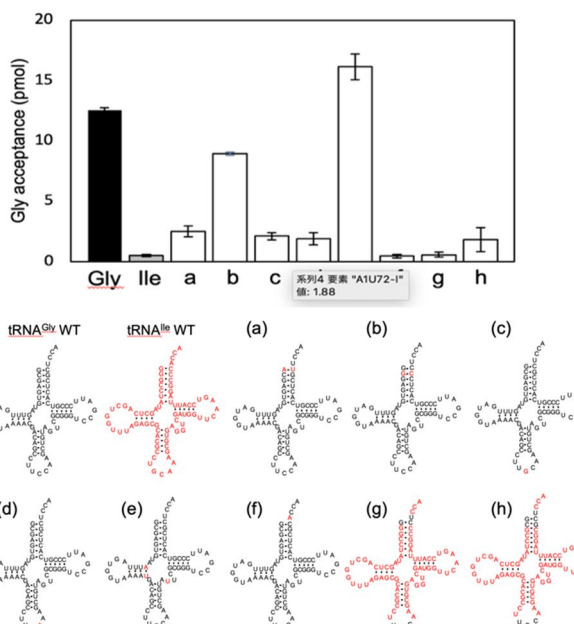


図 1: tRNA^{Gly} 変異体に対する GlyRS のアミノアシル化活性

(2) *L. casei* および *L. plantarum* のリコンビナント IleRS を調製し、*L. casei* tRNA^{Ile}(UAU) (LpIleRS) と異なり、IleRS の認識塩基を備えている。) に対するアミノアシル化活性を測定したところ、*L. casei* IleRS (LcIleRS) が十分なアミノアシル化活性を示したのとは反対に、*L. plantarum* IleRS (LpIleRS) はほとんど活性を示さなかった。これら 2 つの IleRS は 60% 以上アミノ酸配列が一致している。LcIleRS と LpIleRS のアミノ酸配列は非常によく似ているにも関わらず、なぜ LpIleRS は *L. casei* tRNA^{Ile}(UAU) に対するアミノアシル化能が低いのか。このことを明らかにするため、まず LcIleRS と LpIleRS のキメラタンパク質を調製し、IleRS のどの領域が *L. casei* tRNA^{Ile}(UAU) に重要であるか解析を進めた。キメラタンパク質の解析から、tRNA^{Ile}(UAU) の認識には N 末端領域が関与することが示唆された。さらに、LcIleRS の N 末端領域において、LpIleRS と異なるアミノ酸残基に点変異を加えた酵素を 6 種作成した。その中でも、A18G 変異体は、*L. casei* tRNA^{Ile}(UAU) のみならず tRNA^{Ile}(GAU) に対しても著しく活性が低下した (図 2, 3)。また、A18G と G19N の二重変異体では、tRNA^{Ile}(GAU) に対しては活性が回復した (図 3)。つまり、LpIleRS が tRNA^{Ile}(GAU) に Ile を結合し、*L. casei* tRNA^{Ile}(UAU) にはほとんど Ile を結合しないのは、Gly18Asn19 配列が関与していると言える。一方、LcIleRS が tRNA^{Ile}(UAU) と tRNA^{Ile}(GAU) の両方に Ile を結合できることには、Ala18Gly19 配列が関与していることが明らかになった。以上の成果は FEBS J 誌に報告した。

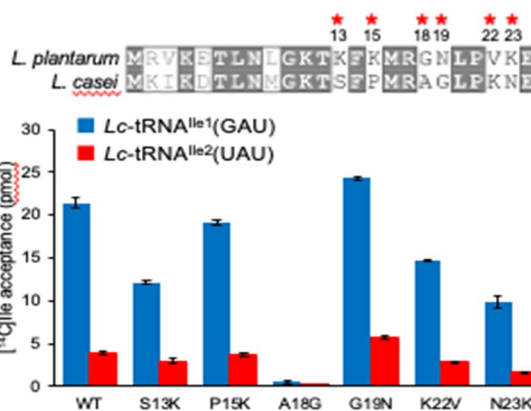


図 2: LcIleRS 変異体のアミノアシル化活性

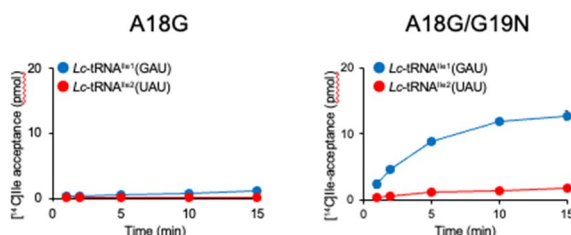


図 3: LcIleRS A18G 変異体および A18G/G19N 変異体のアミノアシル化活性

(3) *L. plantarum* tRNA^{Ile}(UAU) と相互作用しうる結合タンパク質候補を、質量分析により同定することができた。これらリコンビナントタンパク質と tRNA^{Ile}(UAU) の相互作用をゲルシフトにより解析を行なったが有為な結合活性を確認することができなかった。該当タンパク質が複数のタンパク質と相互作用して機能することが知られているため、さらに、それら相互作用タンパク質と複合的に tRNA^{Ile}(UAU) の相互作用について確認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1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uesugi Gakuto, Fukuba Yuho, Yamamoto Takayuki, Inaba Nozomi, Furukawa Haruyuki, Yoshizawa Satoko, Tomikawa Chie, Takai Kazuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Recognition of tRNA ^{Ile} with a UAU anticodon by isoleucyl tRNA synthetase in lactic acid bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Gakuto Uesugi, Yuho Fukuba, Takayuki Yamamoto, Nozomi Inaba, Satoko Yoshizawa, Chie Tomikawa, Kazuyuki Takai
2. 発表標題 乳酸菌IleRSのtRNAIle2(UAU)認識
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土田皓大, 富川千恵, 高井和幸
2. 発表標題 乳酸菌 Lactobacillus casei 由来tRNAIle(UAU)のコドン認識の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上杉 岳人, 富川 千恵, 福場 憂歩, 稲葉 希, 吉澤 聡子, 高井 和幸
2. 発表標題 乳酸菌イソロイシルtRNA合成酵素におけるtRNAIle(UAU)の認識機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上杉岳人, 富川千恵, 稲葉希, 福場憂歩, 吉澤聡子, 高井和幸
2. 発表標題 tRNA ^{Ile} (UAU)に対する乳酸菌イソロイシルtRNA合成酵素の基質認識の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富川 千恵, 榊原 健吾, 永戸 彬葉, 上杉 岳人, Sylvie Auxilien, Vincent Guerineau, Dominique Fourmy, 吉澤 聡子, 高井 和幸
2. 発表標題 乳酸菌にあるtRNA様small RNAの機能解明に向けて
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田康弘, 富川千恵, 相馬亜希子, 吉澤聡子, 高井和幸
2. 発表標題 乳酸菌Lactobacillus plantarum由来tRNA ^{Ile} (UAU)様small RNAの枯草菌内発現による生育への影響
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永戸 彬葉, 富川 千恵, 大橋 梓, 吉澤 聡子, 高井 和幸
2. 発表標題 乳酸菌 Lactobacillus plantarum由来グリシルtRNA合成酵素の基質認識機構の解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 H. Hori, A. Hirata, T. Ueda, K. Watanabe, C. Tomikawa, K. Tomita	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Blackwell, England	5. 総ページ数 x
3. 書名 eLS (Encyclopedia in Life Sciences) , Transfer RNA Synthesis and Regulation	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉澤 聡子 (Yoshizawa Satoko)		
研究協力者	高井 和幸 (Takai Kazuyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	フランス国立科学研究センター		