

機関番号：15201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510186

研究課題名 (和文) オルガネラに局在する植物核 tRNA スプライシング酵素の新規機能の探索

研究課題名 (英文) Investigation of novel function of plant nuclear tRNA splicing enzymes that are localized in organelle

研究代表者

赤間 一仁 (AKAMA KAZUHITO)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50252896

研究成果の概要 (和文)：植物が持つ核 tRNA 遺伝子の中にはイントロンを持つものがある。前駆体 tRNA 分子のスプライシングは核内で進行するが、エキソンの連結反応に関わる tRNA リガーゼは核以外に葉緑体にも局在する。tRNA リガーゼが葉緑体 tRNA の修復に関与する可能性を検討するために、tRNA リガーゼのリガーゼドメインに置換を導入した変異遺伝子を作製し、タバコで過剰発現させたドミナントネガティブ変異体を作成した。野生型と変異植物に対して酸化的ストレスを与えて、細胞質と葉緑体 tRNA を抽出して特異プローブを用いたノーザン法で intact な tRNA とその分解物の割合を求めた。この結果、10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた酸化的ストレス条件では幾つかの細胞質 tRNA 分子種において分断が観察されるものの、葉緑体 RNA は野生型、変異体いずれでも intact なものと分断されたものに差異は見られなかった。

研究成果の概要 (英文)： Plant nuclear genes encoding tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Met-e</sup> are interrupted by introns. Splicing of precursor tRNAs is occurred in nucleus. However, tRNA ligase involved in ligation of 5'- and 3'- half of tRNA is localized in chloroplast as well. In order to evaluate the possibility that tRNA ligase plays as a role of repair on chloroplast tRNAs, dominant-negative tobacco mutant where a mutated tRNA ligase gene with amino acid substitution in the ligase domain is over-expressed. Wild-type and mutant plants were both subjected to oxidative stress and total tRNAs were extracted from these plants. Ratios of intact to cleaved tRNAs from cytoplasm and chloroplast were determined with northern analysis using specific tRNA probes. Results showed that several of cytosolic tRNAs are cleaved with the condition of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but there no significant difference of ratios of intact to degrading chloroplast tRNAs between wild-type and mutated plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：遺伝子, tRNA, イントロン, スプライシング, オルガネラ, tRNA リガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) tRNA スプライシング：遺伝情報のアミノ酸配列への翻訳過程で中心的な役割を果たす tRNA は 80 スクレオチド程度の低分子 RNA にも関わらず、それをコードする核遺伝子の中にはイントロンを含むものが存在する。出芽酵母を用いた研究から、イントロンを含む前駆体 tRNA のスプライシング様式は mRNA のそれともグループ I や II 型のものとも大きく異なり、3 つの特別な酵素タンパク質による連続した反応による。すなわち、エキソン/イントロンの境界部位を切断する tRNA スプライシング・エンドヌクレアーゼ (Sen)、二つのエキソン同士を連結する tRNA リガーゼ (RL)、2' 末端に残ったリン酸基を取り去るフォスフォトランスフェラーゼ (Pt) による。tRNA のスプライシング機構ではイントロンを含む前駆体 tRNA 境界配列に切断のための信号はなく、イントロンが形作る高次構造がこの特殊なスプライシング反応に要求される。植物では核コードの植物 tRNA 遺伝子の中でイントロンにより分断されているのは tRNA<sup>Tyr</sup> 遺伝子と tRNA<sup>Met</sup> 遺伝子のみである。また、様々な変異体を用いた試験管内スプライシング解析から、前駆体 tRNA<sup>Met</sup> のイントロンが参加した高度に保存された高次構造が Sen の認識と切断に要求される。

(2) tRNA スプライシング酵素の局在：従来酵母やアフリカツメガエルを用いた tRNA スプライシングの研究結果から、スプライシング装置は核膜の内膜、あるいは核質に局在するものとされている。ところが出芽酵母において Sen の局在が再調査され、驚いたことにミトコンドリアの外膜に局在することが判明した。これに加えて、酵母 RL は細胞質に局在することも報告されている。これら酵母を用いた近年の報告は、tRNA スプライシング装置の局在が従来の説と大きく対立するものであり、細胞質での tRNA スプライシングの可能性を強く示唆している。これは細胞内でのダイナミックな tRNA 輸送系の存在の可能性をも示唆している。

一方、我々が単離同定した植物 RL と Pt は N 末端側にオルガネラに輸送されるためのシグナル配列を持っており、これらをコードする cDNA の ORF と GFP との融合遺伝子を構築し、タマネギ表皮細胞とソラマメ孔辺細胞に導入してその局在を調べた結果、いずれも核局在の他に、オルガネラの葉緑体 (プラスチド) でも主に検出された。植物 Sen が核局在を示した結果を含めて、植物においては tRNA スプライシングは核内で行われる。しかし、植物 RL と Pt はオルガネラにおいて何らかの機能 (損傷を受けた tRNA の修復やグループ II イント

ロンのスプライシングへの関与) を持つものと推察される。

(3) 研究の独創性と波及性：真核生物において、核内スプライシングはドグマであり疑う余地はなかった。しかし近年、酵母において細胞質での tRNA スプライシングの可能性が指摘されている。また、tRNA そのものも細胞質から核内への輸送ルートが発見されるなど、tRNA そのものもダイナミックな挙動を示すことが発見された。このプラスチドへの局在を合わせて考慮すると未知機能を担う可能性もあり、不明な点が多い葉緑体 RNA プロセシング機構を解明する上での重要な知見を提供することも期待される。

## 2. 研究の目的

生物ゲノムの遺伝情報の発現において、前駆体 RNA からのイントロンの除去反応である「スプライシング」は最も重要な過程の一つである。真核生物では染色体 DNA が核膜により細胞質から隔離されているために、RNA 転写と翻訳の場が必然的に隔てられており、転写された前駆体 RNA は、まず核内での加工 (RNA プロセシング/スプライシング) を受け、成熟 RNA のみが細胞質に輸送されるシステムが構築されている。我々は tRNA スプライシング酵素がオルガネラにも局在する事実を見出した。このことから、オルガネラに輸送されたスプライシング酵素は何らかの役割を担っているものと推察される。特に、近年種々のストレスが tRNA の特異的な切断を引き起こすこと、酵母内で発現させたシロイヌナズナ tRNA リガーゼは切断された tRNA の修復に関与することが報告されている。本研究は種々の実験手法を駆使して、植物前駆体 tRNA 分子のスプライシング装置を構成する酵素タンパク質の新規機能を探索・解明することを目的として進めた。

## 3. 研究の方法

1) シロイヌナズナ tRNA リガーゼ (AtRL) への変異導入と組換えタバコの作出：酵母やシロイヌナズナ tRNA リガーゼはその N 末端側にリガーゼドメインを持ち、covalent adenylation motif (KxxG) や metal-binding motif (EGxx) は高度に保存されており、変異導入によりリガーゼ活性の喪失が報告されている。AtRL のドミナントネガティブ変異遺伝子を作成するために、前者の Lys (K) と後者の Glu (E) を Ala (A) に置換した変異遺伝子を試験管内部位突然変異導入法により構築した (AtRL-K152A と AtRL-E326A)。また、これら変異遺伝子の葉緑体での特異的な発現を誘導するために N 末端側の核移行シグナル (NLS) を欠失させたものをそれぞれ作出した (AtRL ΔNLS-K152A と AtRL ΔNLS-E326A)。野生型 AtRL とこれら 4 種の変異遺伝子はカリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター (35S pro) とノパリン合成酵素遺伝子の

ターミネーター (Ter) を含む発現カセットに組み込み、Ti プラスミドに導入した (図1)。これに加えて、*AtRL* の C 末端側に in-frame で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させたプラスミドも構築した。

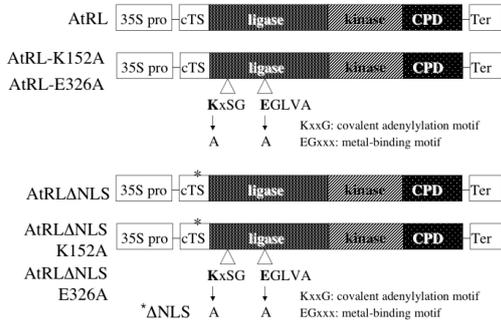


図1 シロイヌナズナ tRNA リガーゼ遺伝子 (*AtRL*) への変異導入と発現遺伝子カセットの構築

これら植物発現ベクターのアグロバクテリウム株 EHA105 への導入と形質転換タバコの作出は定法に従って行った。作出した形質転換タバコはシュート培養によりテトラポットで維持し、DNA (ゲノミック PCR), RNA (RT-PCR), タンパク質レベル (抗 GFP 抗体) での発現を確認した。

## 2) 酸化的ストレスの暴露と tRNA 分析

①BY-2 細胞: 対数増殖期のタバコ BY-2 細胞に対して最終濃度 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加して 0, 1, 2, 4 時間置いた。改変 AGPC 法により全 tRNA を抽出した。tRNA は 10% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画しナイロン膜に転写した。細胞質 tRNA に対する特異的なプローブを用いて intact な tRNA 量, 分解を受けた tRNA 量を調査した。

②タバコ葉: シュート培養で維持しているタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xhanti) の緑葉をサンプリングし, 0, 2, 4 時間 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理を行い, ①と同様にして tRNA を調査した (プローブとしてタバコの葉緑体 tRNA 28 種を用いた)。

③ドミナント・ネガティブ変異体: 野生型タバコ, *AtRL-E326A*, *AtRL-K152A*, *AtRL ΔNLS-E326A* をシュート培養で維持したもののから緑葉を調整して, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 8 時間処理したものを, RNA を抽出しノーザン法により RNA 解析を行った。用いた遺伝子プローブは: tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>His</sup> (いずれも細胞質), 18S rRNA (ミトコンドリア), 26S rRNA と 5S rRNA, 4.5S rRNA, 23S rRNA (いずれも葉緑体), そして 26S rRNA (核由来)。

3) シロイヌナズナの T-DNA タグラインの解析: ソーク研究所 (米国) から入手した tRNA リガーゼの T-DNA タグライン (SALK\_126293, SALK\_037164, SALK\_041294, SALK\_059581) を元にして解析を行った。後代の植物体から DNA を抽出してゲノミック PCR により T-DNA ホモ系統株を検出した。同定したホモ系統株の芽

生えの形態観察, 芽生えから抽出した RNA を用いた RNA レベルでの発現解析を行った。

## 4. 研究成果

1) 酸化ストレスと RNA 切断: 植物の tRNA リガーゼは酵母と同様に環状ホスホジエステラーゼ活性, キナーゼ活性, リガーゼ活性の 3 つのドメインから構成される。酵母 tRNA リガーゼは tRNA スプライシング反応の他に, 細胞質で ER ストレスにตอบสนองした *HAC1* mRNA の nonconventional mRNA splicing にも関与することが分かっている。また, 最近様々な生物種においてストレス (酸化, 紫外線, 炭素・窒素源飢餓など) により特定の tRNA 分子種の切断が起こることが報告されている。以上の知見から, 葉緑体内に局在する tRNA リガーゼはその機能として, ストレスにより切断などの傷害を受けた tRNA を修復することが考えられる。本研究では主にこの仮説を様々な観点から検証した。

シロイヌナズナでは酸化的ストレスにより特定の tRNA 分子種 (tRNA<sup>His</sup> (GTG), tRNA<sup>Arg</sup> (CCT), tRNA<sup>Trp</sup> (CCA)) がアンチコドンループの位置で切断されることがすでに報告されている。これを検証するためにタバコ培養細胞 BY-2 に対して 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた酸化ストレスで暴露しノーザン法により調べた。この結果, 図2に示すように tRNA<sup>His</sup> は BY-2 細胞において同様の切断パターンが見られた。興味深いことに, tRNA<sup>Asp</sup> (GTC) は酸化ストレスに非依存的に切断が観察された。

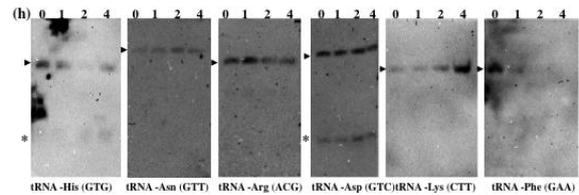


図2 タバコBY-2細胞の葉緑体tRNAに対する酸化的ストレスの効果。細胞は0,1,2,4時間10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に暴露した。→, intact tRNA; \*, ハーフサイズのtRNA

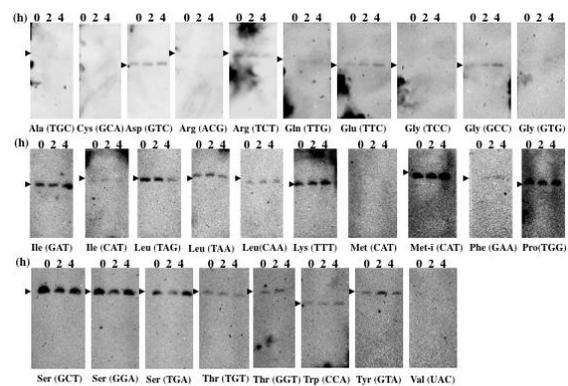
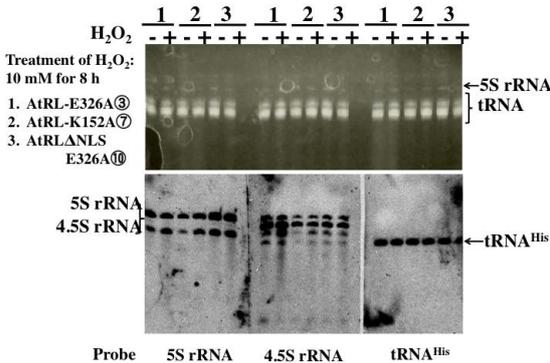


図3 葉緑体tRNAの発現に対する酸化的ストレスの効果。葉は0, 2, 4時間10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に暴露。矢印は完全長のtRNA

同様の酸化的ストレス条件下で葉緑体 tRNA の解析を網羅的に行った (図3)。このストレス条件において特定の葉緑体 tRNA の切断は観察されなかった。次に, 野生型タバコとシロイヌナズナ tRNA リガーゼのリガーゼドメインに変異を導入した変異遺伝子を過剰発現させたタバコ (*AtRL ΔNLS-E326A*) を 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ストレスに 8 時間暴露した場合, 調べた 3 種の tRNA と 5S rRNA において違いは見られなかった。葉緑体の 5S rRNA や 4.5S rRNA においても野生型タバコ, tRNA リガーゼの

変異体 (AtRL-E326A, AtRL-K152A, AtRL Δ NLS-E326A) で差異はなく、切断パターンは観察されなかった (図4)。

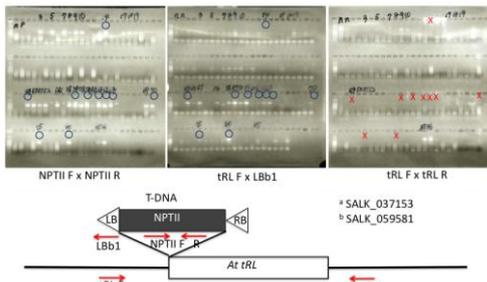
図4 酸化的ストレスによる低分子tRNAへの影響



### 3) シロイヌナズナの T-DNA タグラインの解析

植物 tRNA リガーゼの生体内機能解析を行うために、ソーク研究所 (米国) から T-DNA タグラインを入手して解析を行った。播種後に世代を進めて次世代の植物個体より DNA を抽出し、3種類の PCR プライマーの組み合わせから挿入された T-DNA についてホモ系統のものを選抜した (図5)。ホモ系統 (SALK\_037153 と SALK\_059581) の芽生え

図5 T-DNAホモ系統の同定 (14<sup>h</sup>, 49<sup>h</sup>, 57<sup>h</sup>, 59<sup>h</sup>, 61<sup>h</sup>, 62<sup>h</sup>, 63<sup>h</sup>, 70<sup>h</sup>, 75<sup>h</sup>, 80<sup>h</sup>)



段階での表現型では野生型と有為な差異は認められなかった。また、RT-PCR で RNA レベルの発現を調べた結果、野生型と同程度の発現が見られた。これら T-DNA タグラインではいずれも tRNA リガーゼ遺伝子の翻訳開始点上流 500 bp 付近に T-DNA が挿入されており、T-DNA 挿入が転写阻害をもたらさなかったものと考えられる。

### 4) 今後の展望

1) ストレスと植物 tRNA の切断: 本研究では酸化的なストレスに絞り、ストレスと tRNA 切断との関連、及び植物 tRNA リガーゼの関与を調査した。従来の報告の通り、細胞質 tRNA<sup>His</sup> のように、ストレスに反応して特定の tRNA 分子の切断が確認されたために、この現象は広く植物で観察される現象と考えられる。しかし、葉緑体 tRNA では本研究のストレス条件では tRNA 切断は観察されなかった。このことは暴露した条件では葉緑体 tRNA の切断を誘導しなかったこと、或いは迅速な修復により検出されなかったものと考えられる。今後、温度、紫外線のようなストレスを検討すること、tRNA リ

ガーゼの反応を抑えるために、暗化、低温、リン酸バッファの検討が必要であろう。

2) tRNA リガーゼの生体内解析: 本研究で作出したドミナントネガティブ変異体は野生型タバコと比較して優位な差異を形態レベル、tRNA レベルでもたらさなかった。ストレス応答に伴う tRNA リガーゼの機能を知る上で、ストレスに反応した tRNA リガーゼの発現条件の確立、及び RNAi を介したノックダウンも今後検討すべきであろう。

3) tRNA リガーゼ研究の展開: つい最近、ヒトにおいて tRNA スプライシング・リガーゼが単離された。酵母や植物と異なり、酵素はリガーゼドメインのみからなり、反応には kinase, CDP が複合体を形成して進行すると推測される。動物と植物で tRNA リガーゼの構造が大きく異なることは単に前駆体 tRNA のスプライシング反応の違いを反映するだけでなく、植物 tRNA リガーゼが多様な機能を有することを強く示唆している。葉緑体にターゲットを絞った今後の研究の展開がその詳細な機能を明らかにしてくれるものと期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計4件)

- ① 赤間一仁, Hildburg Beier, 植物 tRNA リガーゼの機能解析, 2010年3月18日, 熊本
- ② 赤間一仁, Hildburg Beier, 葉緑体における tRNA リガーゼの機能解析, 第32回日本分子生物学会, 2009年12月10日, 横浜
- ③ Kazuhiro Akama, Hildburg Beier, Functional analysis of plant precursor tRNA splicing enzymes that are targeted to multiple cellular compartments, 9<sup>th</sup> International Congress on Plant Molecular Biology, 28 October 2009, St. Louis, Missouri, USA
- ④ 赤間一仁, Hildburg Beier, 植物の前駆体 tRNA スプライシング酵素は核以外にオルガネラにも局在する, 第50回日本植物生理学会年会, 2009年3月22日, 名古屋

[図書] (計1件)

- ① 第6章分断遺伝子の発見, 赤間一仁, ノーベル賞の生命科学入門 -RNA が拓く新世界-, 菊池洋編, 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 105-125 (2009年10月)

[その他]

- ① 研究室ホームページの公開 (2010年4月)  
<http://www.ipc.shimane-u.ac.jp/akama-lab/index.html>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤間 一仁 (AKAMA KAZUHITO)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 50252896