

機関番号：33101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780063

研究課題名 (和文) 大腸菌および酵母 tRNase Z の細胞内における機能の解明

研究課題名 (英文) In Vivo Function of tRNase Z in *Escherichia coli* and Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

高久 洋暁 (TAKAKU HIROAKI)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：70350717

研究成果の概要 (和文)：

tRNA の 3' プロセッシングに関与する tRNaseZ は、大腸菌において、他種の tRNase Z と異なり、成熟 tRNA の 3' 末端 CCA 配列を分解した。また、大腸菌 tRNase ZS は、アミノアシル tRNA の 3' 末端を切断し、その切断により生育を制御している可能性も考えられた。ドメイン構造が大腸菌と異なる酵母 tRNase ZL は、成熟 tRNA を基質とせず、前駆体 tRNA をディスクリミネーター塩基で切断した。ドメイン構造の違いが、基質認識及び切断に関与するかもしれない。

研究成果の概要 (英文)：

In most organisms, tRNase Z is thought to be essential for 3' processing of tRNA molecules. The *Escherichia coli* tRNase ZS gene, however, appears to be dispensable under normal growth conditions. Here we intensively examined various (pre-)tRNAs for good substrates of *E. coli* tRNase ZS *in vitro*, and found that the enzyme can nibble off the 3' terminal CCA residues from mature tRNAs. Furthermore, we discovered that *E. coli* tRNase ZS, when sufficiently expressed in the cell, shuts down growth by removing amino acids from aminoacyl-tRNAs. The current data suggest that tRNase ZS may help modulate a cell growth rate by repressing translation under some stressful conditions. We also examined 3' processing activity of recombinant yeast tRNase ZL against various yeast pre-tRNAs *in vitro*. The recombinant yeast tRNase ZL was able to cleavage yeast pre-tRNAs efficiently after the discriminator nucleotide. Taken together, we speculate the difference of tRNase Z domain structure between *E. coli* and yeast might lead to the specificity of substrate recognition and cleavage site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素

## 1. 研究開始当初の背景

tRNA 分子は翻訳において mRNA と蛋白質を繋ぐアダプター分子として中心的な役割を担っている。一般的に tRNA は 5' と 3' 端に伸長配列を持つ長い RNA として転写される。前駆体 tRNA の 5' 伸長配列の除去の反応は、真核生物、古細菌、真正細菌で共通であり、endoribonuclease の RNase P によって行われるが、前駆体 tRNA の 3' 端プロセッシングは、真核生物、古細菌、真正細菌の間で、さらには生物種によって異なることが多いため不明な点が多い。tRNase Z は真核生物、古細菌、一部の真正細菌において tRNA の 3' 端プロセッシングに関与する endoribonuclease で、前駆体 tRNA の 3' 伸長配列を discriminator 塩基で切断する酵素である。tRNase Z は大きさにより tRNase ZL (800-900 アミノ酸) と tRNase ZS (280-360 アミノ酸) に分けられ、tRNase ZL は真核生物のみに存在し、tRNase ZS は真正細菌、古細菌、ヒト、植物に存在する。tRNase Z をコードする遺伝子が 2002 年に初めて取得されてから、様々な生物種の tRNase Z 活性が *in vitro* で証明されたが、*in vivo* 解析はほとんど行われておらず、tRNase Z の生理学的意義、機能を正確に把握するためには *in vivo* 解析も必須課題である。現在まで、我々は大腸菌以外の真正細菌及び古細菌の 3' 端プロセッシングについて研究を重ね、原核生物の tRNase ZS が前駆体 tRNA の 3' 端プロセッシングを行うことを明らかにしてきた。*Bacillus subtilis* などの tRNase SZ は真核生物の tRNase ZL と同様に、CCA 配列を持たない前駆体 tRNA を discriminator の直後で切断したが、*Thermotoga maritima* の tRNase ZS は例外的に CCA 配列を持つ前駆体 tRNA を CCA 配列の直後で切断した。また、現在まで我々を含めた 3 つのグループが *B. subtilis*, *T. maritima*, *Escherichia coli* それぞれの tRNase ZS の結晶構造を明らかにしている。*B. subtilis*, *E. coli* tRNase ZS の結晶構造は非常によく似ているが、*in vitro* 前駆体 tRNA 切断活性は *B. subtilis* tRNase ZS が非常に高いにもかかわらず、*E. coli* tRNase ZS はほとんど前駆体 tRNA を切断しない。また、*B. subtilis* で tRNase ZS は生育に必須であるにも関わらず、*E. coli* の tRNase ZS は生育に必須ではない。すなわち、*E. coli* tRNase ZS はどのような基質を切断することができるのか、さらには細胞内ではどのような働きをしているかは不明なまま残されている。また、真核生物特有の tRNase ZL は生育に必須な遺伝子であることもあり、細胞内の tRNase ZL の解析はアメリカのグループによるショウジョウバエの解析のみだけである。我々は、2003 年にいち早

く、真核生物のモデル微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の tRNase ZL をクローニングし、*in vitro* における前駆体 tRNA 切断活性を検出することに成功していることもあり、さらに細胞内における tRNase ZL の解析を通して tRNase ZL の生理学的意義を明らかにすることができると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、真核生物特有の tRNase ZL とその性質が異なることが予想され、遺伝子工学的研究の重要なモデル微生物大腸菌の tRNase ZS を *in vitro*, *in vivo* における解析により細胞内における機能を明らかにする。また、真核生物である酵母の tRNase ZL の C 末側半分は tRNase ZS 全体と高い相同性を持つが、N 末側半分は tRNase ZS に相当する部分ではなく、tRNase ZL に特徴的な部分である。真核生物のモデル微生物酵母 tRNase ZL の tRNase ZL の N 末側半分のドメインの役割及び tRNase ZS の性質との違いに注目し、tRNase ZL の機能を明確化する。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌 tRNase ZS の細胞内における機能解析

### ①大腸菌 tRNase ZS の発現及び精製

大腸菌発現用プラスミド pQE80L (QIAGEN) のクローニングサイトに大腸菌 tRNase ZS をコードする遺伝子 *elaC* を PCR で増幅後、導入し pQE/*elaC* (HIS) を構築した。大腸菌 DH5  $\alpha$  に pQE/*elaC* (HIS) を形質転換した株を培養し、IPTG により *elaC* を発現誘導させ、ELAC を大量に細胞内に生産させた。その ELAC に付加されている His-tag を利用して、アフィニティーカラム (nickel-agarose beads) で精製を行った。

### ②大腸菌 tRNase ZS の基質となる各種 tRNA の作製

基質の tRNA 及び前駆体 tRNA の作製は、化学合成 RNA を鋳型にして T7 RNA polymerase による *in vitro* 転写で作製した。これらの tRNA の 5' 末端側をフルオレセイン蛍光ラベルし、ゲル精製を行い、基質調製を行った。

### ③大腸菌 tRNase ZS の *in vitro* RNA 切断アッセイ

大腸菌 tRNase ZS と蛍光ラベルした tRNA を反応させ、切断活性を調べた。0.2 pmol 基質 tRNA と大腸菌 tRNase ZS (10 pmol) を反応溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM DTT, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) に加え、50 °C で 10 min 反応を行った。切断部位は、8M 尿素-10% ポリアクリルアミドシークエンスゲルを用い、端に RNA アルカリ分解ラダーをサンプル

と同時に流し、5' 側切断断片の長さを測定することにより決定した。

#### ④RNA の回収

大腸菌からの totalRNA の回収は、RNeasy kit (QIAGEN) を用いて行った。また、アミノアシル tRNA の回収は、集菌した菌体を buffer (0.3 M CH<sub>3</sub>COONa (pH 4.5), 10 mM EDTA) で懸濁し、同じ buffer で平衡化されたフェノールを用いて、totalRNA を抽出した。その後、エタノール沈殿によりアミノアシル tRNA を調製した。

#### ⑤ノーザン解析

非アミノアシル化 tRNA の分析においては、低分子画分の RNA 解析用の 8M 尿素-15%ポリアクリルアミドゲルで tRNA を分離し、Hybond N+ membrane (GE Healthcare) に転写後、FITC ラベルされたそれぞれの tRNA に相補的な DNA をハイブリダイズさせ、CDP-star detection system (GE Healthcare) により、検出を行った。

アミノアシル tRNA と非アミノアシル tRNA を含む画分の分析においては、8M 尿素-15%ポリアクリルアミドシーケンスゲルを用いて分離した。その後の転写及び検出は、上記システムと同じであった。

tRNase ZS mRNA の分析においては、totalRNA を 1%ホルムアルデヒドアガロースゲルで分離し、Hybond N+ membrane (GE Healthcare) に転写後、DIG ラベルされた tRNase ZS に相補的な DNA をハイブリダイズさせ、DIG system (Roche Applied Science) を利用して、検出した。

#### ⑥ウエスタン解析

Buffer (50 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 100 mM DTT) で溶解した細胞抽出液を 12%SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し、Hybond ECL membrane (GE Healthcare) に転写後、抗 His-tag 抗体を用いて、大腸菌 tRNase ZS の検出を行った。

#### (2) 酵母 tRNase ZL の細胞内における機能解析

##### ①酵母 tRNase ZL の発現及び精製

大腸菌発現用プラスミド pGEX-6P-1 (GE Healthcare) のクローニングサイトに酵母 tRNase ZL をコードする遺伝子 TRZ1 を PCR で増幅後、導入し、pGEX-6P-1/TRZ1 を構築した。大腸菌 DH5 $\alpha$  に pGEX-6P-1/TRZ1 を形質転換した株を培養し、IPTG により TRZ1 を発現誘導させ、Trz1p を大量に細胞内に生産させた。その Trz1p に付加されている GST を利用してアフィニティーカラム (Glutathione Sepharose 4B) に結合させた後、Prescission protease を一晩作用させ、GST-tag を除去して、精製を行った。

##### ②酵母 tRNase ZL の基質となる各種 tRNA の作製

基質の前駆体 tRNA の作製は、化学合成 RNA を鋳型にし、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP 存在下で、T7 RNA polymerase による *in vitro* 転写で作製した。転写された前駆体 tRNA は、ゲル精製を行った。

##### ③酵母 tRNase ZL の *in vitro* RNA 切断アッセイ

大腸菌の場合と同様に行った。

##### ④RNA シーケンシング

非ラベル前駆体 tRNA を酵母 tRNase ZL で反応させたサンプルをフェノール/クロロホルム抽出により、RNA 画分を抽出した。抽出した RNA の 3' 末端を [5' -<sup>32</sup>P]pCp と T4 RNA ligase で標識した。標識したサンプルを chemical RNA シーケンシング法で解析することにより、切断部位の同定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸菌 tRNase ZS の細胞内における機能解析

##### ①大腸菌 tRNase ZS は、成熟 tRNA の 3' 末端 CCA 配列を少しずつ除去する

大腸菌由来の前駆体 tRNA が、大腸菌 tRNase ZS の直接の基質となるかどうかについて、大腸菌前駆体 tRNA<sup>Ph<sup>e</sup></sup>、前駆体 tRNA<sup>Arg</sup> を利用して、大腸菌 tRNase ZS の *in vitro* 切断活性を調べた。その結果、大腸菌前駆体 tRNA<sup>Ph<sup>e</sup></sup>、前駆体 tRNA<sup>Arg</sup> は、大腸菌 tRNase ZS の直接の基質であり、その切断効率、前駆体 tRNA の 3' トレーラーの長さが短ければ短いほど上昇した (図 1)。さらに、3' 末端が CCA で

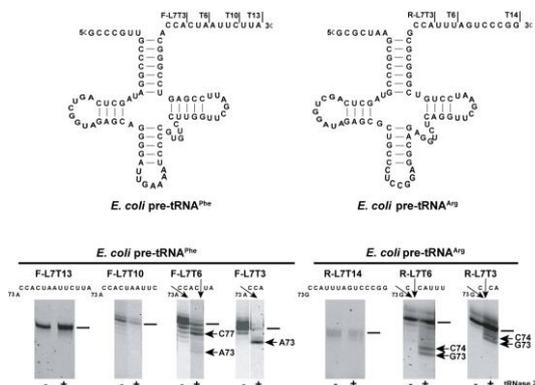


図 1 大腸菌 tRNase ZS による大腸菌前駆体 tRNA の切断終わっている tRNA F-L7T3, R-L7T3 に対して大腸菌 tRNase ZS を作用させたとところ、驚くことに 3' 末端 CCA 配列が除去された (図 1)。次にこの 3' 末端 CCA 配列が、その切断効率に必要なかどうかについて、3' 末端 CCA 配列が異なる変異型 tRNA を作製して調べたところ、この CCA 配列は、その切断効率に必須ではないことが明らかとなった。さらに 5' リーダー配列のない成熟 tRNA に大腸菌 tRNase ZS を作用させたとところ、大腸菌 tRNase ZS は、成熟 tRNA の 3' 末端 CCA 配列を少しずつ除去することが明らかとなった (図 2)。

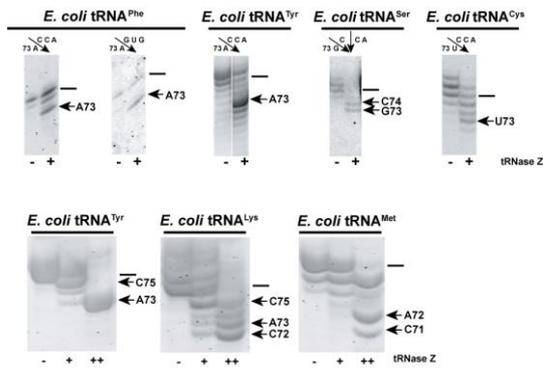


図2 大腸菌 tRNase ZS の大腸菌成熟 tRNA の切断

## ② tRNA プロセッシングにおける tRNase ZS の関与

細胞内において tRNase ZS が、成熟 tRNA の 3' 末端配列 CCA を除去しているのなら、tRNase ZS 欠失株においては成熟 tRNA が増加することが予想された。そこで tRNase ZS 欠失株を作製し、野生株と成熟 tRNA の発現レベルをノーザン解析により調べた。その結果、野生株と tRNase ZS 欠失株の間で顕著な成熟 tRNA の発現レベルの差は見られなかった。野生株において、tRNase ZS の発現がウエスタン解析で検出できなかったことから、一般的な生理条件下における tRNase ZS の細胞内発現が非常に少なかったため、tRNA プロセッシングに効果が見られなかったと推測される。

## ③ tRNase ZS 過剰発現大腸菌は、成熟 tRNA の CCA 末端を除去することにより、生育阻害を起こす

大腸菌 tRNase ZS が細胞内で過剰に発現すると何が起こるかを調べるため、IPTG 誘導型遺伝子発現システムを利用して、大腸菌 tRNase ZS の誘導発現を行った。その結果、大腸菌 tRNase ZS が細胞内で過剰に誘導発現すると、その大腸菌の生育は、ほとんど停止

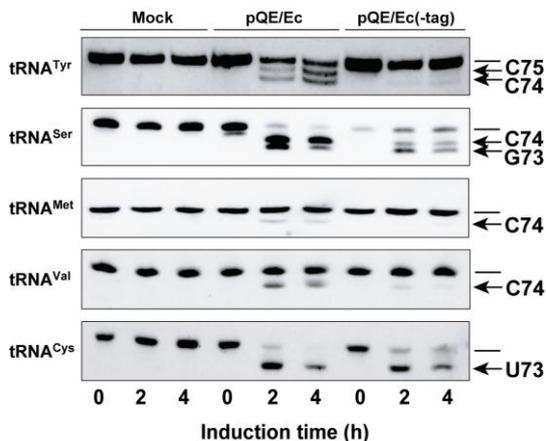


図3 tRNase ZS過剰発現株の成熟tRNAの変化

した。これは、細胞内で過剰発現した tRNase ZS が、成熟 tRNA の 3' 末端 CCA 配列を除去し、成熟 tRNA のレベルが減少したことが推測された。そこで発現誘導後の株について、5種類の tRNA 種のレベルをノーザン解析した結果、調べた全ての種の tRNA の 3' 末端は欠けていた (図3)。その 3' CCA 末端の除去程度及びタイプは、それぞれの tRNA 種ごとに異なっていた (図3)。これらの結果は、大腸菌 tRNase ZS が成熟 tRNA の CCA 末端を除去することにより、成熟 tRNA のレベルが減少し、生育を停止させたことを示唆している。

## ④ 大腸菌 tRNase ZS は、アミノアシル tRNA からアミノ酸を除去する。

対数増殖期の大腸菌細胞内の成熟 tRNA はのほとんどは、アミノアシル化され、アミノアシル tRNA として細胞内に存在している。すなわち、tRNase ZS は、アミノアシル tRNA の 3' 末端 CCA 配列を除去することにより、アミノ酸をアミノアシル tRNA から除去している可能性が考えられた。そこで大腸菌 tRNase ZS を過剰発現させた株におけるアミノアシル tRNA 及び tRNA のノーザン解析を行った結果、3' CCA 末端が短くなり、アミノ酸が除去された tRNA が検出された。また、アミノアシル tRNA を作製し、大腸菌 tRNase ZS を作用させたところ、細胞内の場合と同様に 3' CCA 末端が短くなり、アミノ酸が除去された tRNA が検出された。すなわち、大腸菌 tRNase ZS は、アミノアシル tRNA の 3' 末端 CCA 配列を切断することにより、アミノ酸を除去することが可能であることが分かった。

アミノアシル tRNA 及び成熟 tRNA を切断するために十分量まで tRNase ZS の発現が上昇する条件を見つけようとして、様々な抗生物質添加後の tRNase ZS の mRNA レベルを解析した結果、蛋白質合成阻害剤のカスガマイシンとクロラムフェニコール添加後に mRNA レベルの上昇が見られたが、tRNase ZS の蛋白質量の増加は見られなかった。栄養飢餓や温度、pH、浸透圧、UV などのストレスなどの何かの条件下で十分量の tRNase ZS の発現が誘導され、アミノアシル tRNA からアミノ酸を除去して、生育を調整する可能性があるかもしれない。

## (2) 酵母 tRNase ZL の細胞内における機能解析

大腸菌の場合と同様に、酵母由来の前駆体 tRNA が、酵母 tRNase ZL の直接の基質となるかどうかについて、酵母前駆体 tRNA<sup>Phe</sup>、前駆体 tRNA<sup>Ser</sup>、前駆体 tRNA<sup>Leu</sup>、前駆体 tRNA<sup>Trp</sup>、前駆体 tRNA<sup>Pro</sup> を利用して、酵母 tRNase ZL の

*in vitro*切断活性を調べた。その結果、どの種の前駆体 tRNA に対しても酵母 tRNase ZL は切断活性を持ち、discriminator 塩基で切断した。また、成熟 tRNA は基質としなかった。

大腸菌の tRNase ZS は、成熟 tRNA を基質として認識し、その切断様式からエンドヌクレアーゼ活性のみでなく、エキソヌクレアーゼ活性を持つことが考えられたが、酵母の tRNase ZL は、前駆体 tRNA を基質とするが、成熟 tRNA は基質でなく、さらにその切断様式からエンドヌクレアーゼ活性のみを持つと考えられた。すなわち、酵母 tRNase ZL の N 末端部分は、認識基質及びその切断部位の特異性を厳格に行うのに必要な領域でないかと推測される。

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Takaku H, Nashimoto M. “Escherichia coli tRNase Z can shut down growth probably by removing amino acids from aminoacyl-tRNAs.” **Genes Cells** 13(11):1087-97 (2008) (査読有り)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高久 洋暁 (TAKAKU HIROAKI)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授  
研究者番号：70350717

### (2) 研究協力者

梨本 正之 (NASHIMOTO MASAYUKI)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授  
研究者番号：30228069

### (3) 研究協力者

高木 正道 (TAKAGI MASAMICHI)  
新潟薬科大学・学長  
研究者番号：50018339