

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770211

研究課題名（和文） 逆転または高度に分断されたtRNA遺伝子の成り立ちと進化の解明

研究課題名（英文） Analysis of the development of permuted or disrupted tRNA genes.

研究代表者

相馬 亜希子 (SOMA AKIKO)

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：70350329

研究成果の概要（和文）：始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 10D の核ゲノムから、新奇 tRNA 遺伝子を発見した。その前駆体 tRNA は、RNA モチーフの安定性にしがたってプロセッシングを受けられる可能性が高いことが分かった。また、様々な分断構造を有する tRNA 遺伝子を同定し、*C. merolae* 細胞内では様々なタイプの遺伝子が発現することが分かった。本研究結果は、真核生物の tRNA 遺伝子構造やその RNA プロセッシング機構のバリエーションの大きさを、初めて示したものである。

研究成果の概要（英文）：Our analysis of the nuclear genome of *Cyanidioschyzon merolae* 10D demonstrated the first evidence of permuted and ectopic intronic tRNA genes. These highly-disrupted tRNA genes were shown to be expressed via the sequential processing based on the stability of specific RNA motif found at the processing sites. Results revealed a greater diversity in eukaryal tRNA genes properties and the processing mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：tRNA、non-coding RNA、RNA プロセッシング、イントロン、始原紅藻

1. 研究開始当初の背景

酸性の温泉という極限環境に生息する始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 10D の核ゲノムの網羅的解析から、逆転 tRNA 遺伝子 (permuted tRNA genes) とよばれる新奇 tRNA 遺伝子を発見した。これまでの分子生物学的な解析から、当該遺伝子から転写された前駆体 tRNA は、新奇の RNA プロセッシング機構により環状 RNA を介して、機能的な構造をもつ成熟体 tRNA となることが明らかになった。この RNA プロセッシング機構は、「RNA 配列の前後を入れ換える」という、それまででない新しい概念に基づくメカニズムであった。当該 RNA 遺伝子の構造やその転写物の成熟化過程は、RNA の研究分野だけでなく、ゲノム動態の分野でも興味

深い研究対象である。また、我々の発見をきっかけに、既存のゲノムデータベースが再解析され、様々な生物において、あらたに tRNA 遺伝子が数多く発見され、それまで不明であった遺伝暗号の翻訳機構が明らかとなった。したがって、当該遺伝子群の発現機構や形成過程、生物学的意義など、より詳細な解析が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、特に環状 RNA 中間体を介した RNA プロセッシング機構、また、その生物学的意義や成立過程を解明し、転写やプロセッシングなど、発現機構との共進化について考察する。さらに、未同定のオルガネラ tRNA が細胞質から輸送されている可能性を検討する

ことを目的とした。

これまでの解析から、逆転 tRNA の前駆体は、既知の tRNA プロセッシング機構に関わる酵素群に依存する可能性が高い。そこで本研究では、*in vitro* プロセッシングアッセイ系の構築を行い、様々な基質 tRNA に対する活性を測定し、その基質認識機構の解明を試みた。また、様々な変異体 tRNA 遺伝子を *C. merolae* に導入し、その影響を調べることで、生物学的意義の解明を試みた。また、逆転 tRNA 前駆体のプロセッシング部位には、イントロンのプロセッシングに関わる酵素が認識する RNA モチーフが見られることから、当該 RNA と、tRNA イントロンの関連性は非常に高いことが予想された。そこで本研究では、両 tRNA 前駆体のプロセッシング過程を調べ、その規則性を探った。

3. 研究の方法

予想されるプロセッシング酵素リコンビナントタンパク質と、人工的に合成した基質 tRNA を用いた *in vitro* tRNA プロセッシング反応を行い、その酵素活性を解析した。また、*C. merolae* における逆転 tRNA のプロセッシング経路を明らかにするため、逆転写 PCR 法により tRNA のプロセッシング中間体を増幅し、その配列をシーケンシングにより同定した。各中間体の予想される RNA 二次構造のステム・ループ構造の安定性を熱エネルギー計算から推測した。また、*C. merolae* 細胞に、人工的に構築した様々な RNA 遺伝子を導入し、そこから発現した RNA 分子の配列を解析した。以上の結果をもとに、*C. merolae* における様々な tRNA のプロセッシング機構の解明を試みた。また、以上の結果をもとに、tRNA 遺伝子の形成と、RNA プロセッシングを含めた RNA 遺伝子の発現機構の関連性について、進化的考察を試みた。

4. 研究成果

特に逆転 tRNA 遺伝子から転写された前駆体 tRNA のプロセッシング機構の詳細を明らかにするため、予想されるプロセッシング酵素群のリコンビナントタンパク質を調製し、*in vitro* で人工的に調製した基質 tRNA 前駆体に対する切断活性を調べた。様々な変異体 tRNA 前駆体を用いた *in vitro* プロセッシングアッセイの結果、いくつかの酵素の基質認識機構が分かってきた。逆転 tRNA の成熟化において特徴的な環状 RNA 中間体のプロセッシングには、さらに未知の酵素が関与する可能性も示唆された。現在、さらに解析を進めている。本研究結果は論文にまとめ、学術雑誌に投稿する予定である。

C. merolae に存在する逆転 tRNA およびイントロンを含む tRNA には共通の RNA モチーフが見られることから、両者は共通の RNA プ

ロセッシング装置で成熟化している可能性が高いと予想される。そこで、*C. merolae* の全 RNA を用いた逆転写 PCR 法により、様々な tRNA のプロセッシング中間体を検出し、さらにその配列をシーケンシングにより解析した。以上の解析結果をもとに、各 tRNA のプロセッシングがどのような順番で起きているかを推察した。その結果、いずれの前駆体のプロセッシング部位(酵素が認識する RNA モチーフ)も、構造の安定性に基づく順番でプロセスされている可能性が示唆された。本研究結果は論文にまとめ、海外の学術雑誌への投稿を行った。また、国内外の学術会議において口頭およびポスター発表を行い、一定の評価を得た。また、学会では情報収集のほか、RNA プロセッシングや RNA 遺伝子の研究者たちとのディスカッションを行うことで、今後の研究を進めていく上で、有用な意見をもらうことができた。

また、*C. merolae* 細胞内では特殊な tRNA 遺伝子群がどのようにプロセッシングされ、なぜゲノム上に存在しうるかについて知見を得るため、*C. merolae* の細胞に人工的にデザイン・構築した様々なタイプの tRNA 遺伝子を導入し、その産物の解析を行った。その結果、*C. merolae* では、これまで真核生物では報告されていないような、様々な分断構造をもつ tRNA 遺伝子からでも機能的な tRNA が発現しうることが分かった。このことは、*C. merolae* が特殊な遺伝子群の形成および維持してきたことを裏付けている。さらに、当該遺伝子がゲノムに存在しえた理由として、上述の特徴的なプロセッシング機構の存在が挙げられる。それに加え、よりシンプルな転写機構が必要であったと予想される。*C. merolae* の核ゲノムの配列解析の結果、転写装置遺伝子群のレパートリーは非常に少なく、これまで知られている真核生物に比べて、非常に単純なシステムを利用している可能性が示唆されている。以上の研究結果についてさらに詳細な解析を進めながら、論文作成を行っている。

オルガネラの tRNA の解析から、細胞質からのオルガネラへの RNA 輸送の可能性を検討するため、*C. merolae* のオルガネラの単離を試みた。しかし、オルガネラの完全な単離が困難であり、さらに生化学的解析に必要な両の RNA サンプルが調製できなかった。オルガネラの単離、および十分な量の RNA サンプルの調製方法の構築が今後の課題である。得られた知見を生かし、解析を進めていく予定である。

以上の結果から、tRNA 遺伝子の発現機構・プロセッシング機構が、tRNA 遺伝子の進化におけるバリエーションに大きな影響を与えてきた可能性が示唆された。今後は *C. merolae* の細胞を用いた *in vivo* の実験を行い、この

可能性をより直接的に検討し、進化的考察を行っていききたい。

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2件)

- ① 相馬亜希子 「非典型的 tRNA スプライシング」 (2013) 生化学、印刷中、査読なし
- ② Akiko Soma, Junichi Sugahara, Akinori Onodera, Nozomu Yachie, Akio Kanai, Satoru Watanabe, Hirofumi Yoshikawa, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa, and Yasuhiko Sekine Identification of highly-disrupted tRNAs in an early-diverged eukaryote, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. (revised, 2013)、*Scientific reports*, 査読あり

[学会発表] (計11件)

- ① 相馬亜希子、菅原潤一、小野寺瑛宣、谷内江望、金井昭夫、関根靖彦 「始原紅藻 *C. merolae* の逆転または高度分断化 tRNA 遺伝子の解析」日本ゲノム微生物学会、口頭発表、2013年3月9日、滋賀県長浜市長浜バイオ大
- ② 相馬亜希子 「始原紅藻の tRNA 遺伝子の同定と、逆転および高度断片化遺伝情報のプロセッシング機構の解析」遺伝研研究会、口頭発表、2013年3月29日、静岡県三島市遺伝研
- ③ Akiko Soma、Junichi Sugahara, Akinori Onodera, Nozomu Yachie, Akio Kanai, Yasuhiko Sekine. “Permuted and highly-disrupted tRNA genes in a primitive eukaryote, *Cyanidioschyzon merolae* 10D.” Cell Symposia

Functional RNAs, poster presentation, 2012, 3rd, Dec. Spain, Sitges

- ④ 杉田慶^o、門間美帆、相馬亜希子、泉厚志、野澤彰、戸澤譲、安藤昭一、関根靖彦 「*Cyanidioschyzon merolae* 10D の tRNA プロセッシングにおける tRNase Z の役割」第35回日本分子生物学会年会、ショートトーク、ポスター発表、2012年12月11日、福岡市、福岡国際会議場
- ⑤ 小原美紗子、相馬亜希子、安藤昭一 「始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 10D の permuted tRNA 遺伝子の生物学的意義の解明」第35回日本分子生物学会年会、ショートトーク、ポスター発表、2012年12月11日、福岡市、福岡国際会議場
- ⑥ 杉田慶^o、門間美帆、相馬亜希子、泉厚志、野澤彰、戸澤譲、安藤昭一、関根靖彦 「始原紅藻 *C. merolae* 10D の tRNA プロセッシングにおける tRNase Z の役割」第6回日本ゲノム微生物学会若手の会、口頭発表、2012年9月27日、静岡県、ろうきん研修所富士センター
- ⑦ 相馬亜希子、菅原潤一、小野寺瑛宣、谷内江望、金井昭夫、関根靖彦 「始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の逆転または高度分断化 tRNA 遺伝子の解析」日本 RNA 学会年会、口頭発表、2012年7月19日、仙台市、東北大
- ⑧ 相馬亜希子、菅原潤一、小野寺瑛宣、谷内江望、金井昭夫、関根靖彦 「原始的な植物 *C. merolae* の逆転または高度分断化 tRNA 遺伝子の解析」生命の起源および進

化学会夏の学校、口頭発表、2012年7月
15日、千葉県野田市、東京理科大

- ⑨ 相馬亜希子[○]、菅原潤一、小野寺瑛宣、谷内江望、金井昭夫、関根靖彦 「始原紅藻 *C. merolae* の逆転および高度断片化 tRNA 遺伝子の解析」東京理科大学総合研究機構公開シンポジウム、招待講演（口頭発表）、2012年6月18日、千葉県野田市、東京理科大
- ⑩ 杉田慶[○]、相馬亜希子、安藤昭一、関根靖彦 「*C. merolae* の tRNase Z による前駆体 tRNA の *in vitro* プロセッシングシステムの構築」第10回微生物研究会、ポスター発表、2011年11月、東京都、東京大
- ⑪ 杉田慶[○]、相馬亜希子、安藤昭一、関根靖彦 「*Cyanidioschyzon merolae* の tRNase Z による *in vitro* プロセッシングシステムの構築」第12回極限環境生物学会年会、ポスター発表、2011年11月27日、長崎市、長崎大

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相馬 亜希子 (SOMA AKIKO)
千葉大学・大学院園芸学研究科・助教
研究者番号：70350329