

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590425

研究課題名 (和文) 寄生性線虫ミトコンドリアのタンパク質合成系研究の新展開

研究課題名 (英文) New development in study of mitochondrial translation system of the parasitic nematode

研究代表者

吉成 茂夫 (YOSHINARI SHIGEO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70253317

研究成果の概要：動物ミトコンドリア(mt)のタンパク質合成系は、より短い機能性 RNA を用いる。我々は、短縮化した mt tRNA を持つ種と持たない種が混在する節足動物で、短縮化した tRNA を持たない昆虫の 2 つの EF-Tu のうちの 1 つが、短縮化した tRNA と結合できることを示した。また、植物寄生性線虫ミトコンドリアで遺伝子が未同定だった tRNA のうち 1 種の発現を同定した。この tRNA は発現が確認された中で最も短い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：寄生虫、ミトコンドリア、タンパク質合成系、tRNA、EF-Tu、線形動物、節足動物

1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成系で働く転移 RNA (tRNA) は、従来、種を通じて保存性が高いと考えられていた。一方、多細胞動物ミトコンドリア(mt)内の tRNA は、種の間でその構造に大きな多様性がある。その中で、クロマドレア綱線虫(寄生性線虫ブタ回虫、線虫 *C. elegans* など)ではすべての tRNA の鎖長は著しく短く、その二次構造も単純化している。我々は、アミノアシル tRNA と結合し、これをリボソームに運ぶ必須のタンパク質であるペプチド伸長因子 EF-Tu に注目した。我々は線虫などが二つの異なる EF-Tu を持つこと、二種の EF-Tu は二次構造の異なる二つのタイプの

tRNA のどちらか一方のみと結合すること、二種の EF-Tu は C 末端にバクテリアの因子には無い新たな延長配列を獲得し、これらが、従来知られていたバクテリア EF-Tu とは異なる様式で tRNA を認識し複合体を形成することを示した。一方、線虫類の中でも、エノプレア綱に属する寄生性旋毛虫 mt は T アームのない tRNA、D アームのない tRNA に加えて、一般的なクローバーリーフ型の tRNA も持っている。我々は、旋毛虫も 2 種の EF-Tu を持つことを示した。しかし、ブタ回虫などと異なり、旋毛虫の EF-Tu1 は 3 つの二次構造の異なるタイプの tRNA すべてと結合できた。もう一方の EF-Tu2 は D アームのない tRNA と

のみ結合した。これらの性質は、他の多細胞動物からブタ回虫などの状態に至る、進化的な中間段階に相当すると考えられた。以上の結果は、進化の過程で mt DNA にコードされていた機能性 RNA が縮小していくのに伴い、核ゲノムにコードされているタンパク質合成に関わるタンパク質因子が RNA の機能や構造を補っていった例と考えられた。

2. 研究の目的

(1) 動物 mt tRNA の T アームの欠失を促した要因は何かを探るため、線形動物とは異なり、T アーム欠失型 tRNA を持つ生物種と T アーム欠失型 tRNA を持たない生物種が混在する節足動物において、mt EF-Tu の T アーム欠失型 tRNA への結合能を解析する。

(2) 植物寄生性線虫 *Xiphinema americanum* ミトコンドリア DNA では、タンパク質合成に最低限必要な tRNA 種のうち、3 種の遺伝子が未同定である。これらの未同定 tRNA 遺伝子を推定し、その発現を確認する。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ mt EF-Tu のアミノアシル tRNA への結合能の解析

組換えショウジョウバエ mt EF-Tu、旋毛虫 mt EF-Tu およびアミノアシル tRNA 合成酵素は大腸菌で発現させ、金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。mt tRNA は試験管内転写法により調製した。アミノアシル tRNA は、放射性標識したアミノ酸と tRNA から、アミノアシル tRNA 合成酵素により調製した。EF-Tu のアミノアシル tRNA への結合能は、アミノアシル tRNA の弱アルカリ性条件下でのアミノアシル基の加水分解速度の、EF-Tu の有無による速度変化を観測する加水分解保護実験により評価した。

(2) 植物寄生性線虫の tRNA 発現解析

未同定 tRNA 遺伝子の予測は、アンチコドンアーム候補領域の周辺の推定二次構造に基づき行った。tRNA 発現解析は、未同定 tRNA の末端領域の配列が遺伝子配列と異なっている可能性が推定されたため、RNA リガーゼによる tRNA の自己環状化、および環状化 RNA の逆転写、cDNA の PCR 増幅により tRNA 末端領域の配列決定(同時に発現確認)を試みた。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ mt EF-Tu の、T アーム欠失型アミノアシル tRNA への結合能の解析
T アーム欠失型 tRNA のモデル基質として旋毛虫 mt tRNA^{Cys} を用いた。対照としてとして、旋毛虫 mt EF-Tu1 (T アーム欠失型 tRNA、および短い T アームを持つクローバーリーフ型 tRNA に結合可能)と、EF-Tu2 (D アーム欠失

型セリル tRNA のみに結合可能)を用いた。その結果、ショウジョウバエ mt EF-Tu1 は、旋毛虫 mt EF-Tu1 と同程度に旋毛虫 mt システイニル tRNA^{Cys} に結合できることが示された。これは、T アーム欠失型 mt tRNA を持たない生物由来の EF-Tu が、T アーム欠失型アミノアシル tRNA と結合できることを示した最初の例である。ショウジョウバエ mt EF-Tu2 は T アーム欠失型 tRNA と結合できなかった。T アーム欠失型 mt tRNA を持つ節足動物には、少なくとも T アーム欠失型アミノアシル tRNA に結合できる EF-Tu が必要である。これらの結果は、節足動物の共通祖先において、すでに mt EF-Tu1 は T アーム欠失型アミノアシル tRNA への結合能を獲得していたことを示唆する。従来は、tRNA の構造と EF-Tu の tRNA 結合能の共進化が推定されていたが、この結果は、tRNA の構造変化の前に、EF-Tu の tRNA 結合能があらかじめ変化していたことを示唆する。

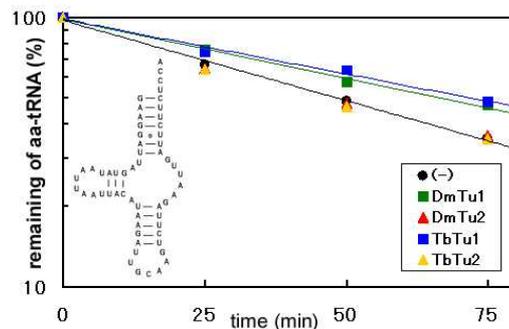


図1 旋毛虫 mt システイニル tRNA^{Cys} を用いた、各種 EF-Tu の加水分解保護実験。Dm; ショウジョウバエ、Tb; 旋毛虫

(2) 自己環状化 tRNA 検出条件の最適化
共同研究者から入手した植物寄生性線虫由来の RNA は総 RNA 画分として µg オーダーであった。一方、報告されている自己環状化 tRNA の検出には、最低 10 µg の低分子 RNA 画分(総 RNA 画分 100 µg に相当)が発芽材料として用いられていた。そこで、培養可能な自由生活性線虫 *C. briggsae* の総 RNA 画分をモデル材料として、環状化条件のスケールダウンを試みた。その結果、総 RNA 画分を直接環状化に用いて、出発材料を 100 分の 1 まで減らせた。さらに、逆転写条件を検討することにより、鋳型 RNA の量を従来の 20000 分の 1 相当まで減らせた。これらの結果、最低 1 mg の総 RNA を環状化に用い、このうち最低 500 pg を逆転写に用いて、自由生活性線虫の環状化 mt tRNA 由来の cDNA を検出できた。

(3) 植物寄生性線虫の未同定遺伝子由来の mt tRNA の検出

上記(2)の結果を元に、植物寄生性線虫の総 RNA の自己環状化を行い、この RNA 中の mt

tRNA の検出を試みた。その結果、従来はタンパク質コード領域と重なっていたため未特定だった tRNA^{Ser} (UCN) 遺伝子産物由来の cDNA を検出できた。この tRNA は鎖長が 51 ヌクレオチドと推定され、従来発現が確認された tRNA としては最も短い。

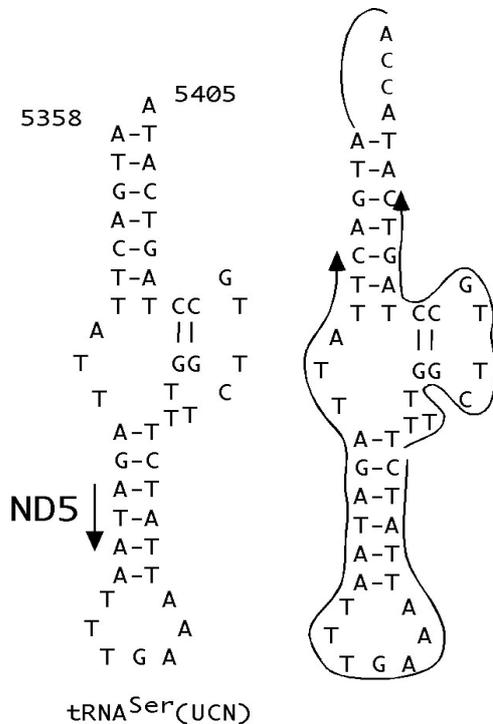


図2 tRNA^{Ser}(UCN) 遺伝子(左)と、cDNA(右)の配列。従来は、ND5 タンパク質遺伝子領域との重なりが推定されていた(左、矢印から先)。矢印をつけた領域はプライマー由来の配列(右) 3' 末端に、遺伝子配列には存在しない、全 tRNA の共通配列である CCA 配列が存在することが示唆された。

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10件)

Yoshinari, S., Shiba, T., Inaoka, D., Itoh, T., Kurisu, G., Harada, S., Kita, K., Watanabe, Y. Functional importance of Crenarchaea specific extra-loop revealed by an X-ray structure of a hetero-tetrameric crenarchaeal splicing endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, accepted (2009) 査読有

Hirose, M., Yokobori, S., Hirose, E. Potential speciation of morphotypes in the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan.

Coral Reefs, 28, pp119-126 (2009) 査読有

Yokobori, S., T. Iseto, S. Asakawa, T. Sasaki, N. Shimizu, A. Yamagishi, T. Oshima, & E. Hirose Complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes of two solitary entoprocts, *Loxocorone allax* and *Loxosomella aloxiata*: Implications for lophotrochozoan phylogeny. *Mol. Phylogen. Evol.*, 47, pp612-628 (2008) 査読有

Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K. Ramakrishnan, V. and Suzuki, T. Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U.G wobble pairing during decoding. *J. Biol. Chem.*, 283, pp18801-18811 (2008) 査読有

Ohtsuki, T., Fujimoto, T., Kamimukai, M., Kumano, C., Kitamatsu, M., Sisido, M. Isolation of small RNAs using biotinylated PNAs. *Journal of Biochemistry*, 114, pp415-418 (2008) 査読有

Kugimiya, A., Morii, M. and Ohtsuki, T. Amino acid sensing using aminoacyl-tRNA synthetase. *Analytical Biochemistry*, 378, pp90-92 (2008) 査読有

Yokobori, S. Lindsay DJ, Yoshida M, Tsuchiya K, Yamagishi A, Maruyama T, Oshima T. Mitochondrial genome structure and evolution in the living fossil vampire squid, *Vampyroteuthis infernalis*, and extant cephalopods. *Mol. Phylogen. Evol.*, 44, pp898-910 (2007), 査読有

Kobayashi T, Sato S, Takamiya S, Komaki-Yasuda K, Yano K, Hirata A, Onitsuka I, Hata M, Mi-ichi F, Tanaka T, Hase T, Miyajima A, Kawazu S, Watanabe Y. Kita K. Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. *Mitochondrion*, 7, pp125-132 (2007), 査読有

Ohtsuki T. Watanabe Y. T-armless tRNA and elongated elongation factor Tu. *IUBMB Life*, 59, pp68-75 (2007), 査読有

Doi Y, Ohtsuki T, Shimizu Y, Ueda T, Sisido M. EF-Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system. J. Am. Chem. Soc., 129, pp14458-14462 (2007), 査読有

[学会発表](計17件)

彦坂健児、渡邊洋一、辻尚利、北潔、五十嵐郁男、田邊和祐 ピロプラズマ類 (Babesia 及び Theileria) 原虫におけるミトコンドリアゲノムの多様性、第78回寄生虫学会、2009年3月28日、東京・法政大学市ヶ谷キャンパス

横堀伸一、大曾根祐、倉林敦、西川淳、広瀬裕一、山岸明彦、尾索動物ミトコンドリアゲノムの多様性とミトコンドリア遺伝子に基づく尾索動物の分子系統解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日、神戸ポートアイランド

喜久田薫、菅原潤一、藤島皓介、平野麗子、渡邊洋一、吉成茂夫、富田勝、金井昭夫、超好熱性古細菌における3つのイントロンを介する tRNA の段階的スプライシング機構、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日、神戸ポートアイランド

吉成茂夫、北潔、渡邊洋一、X線構造に基づいた Crenarchaea スプライシングエンドヌクレアーゼの改変、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9日、神戸ポートアイランド

佐藤文、末松卓真、大槻高史、渡邊洋一、tRNA 構造との対応関係を越えたショウジョウバエミトコンドリア EF-Tu の tRNA 認識能、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド

山本浩道、土井芳朗、大槻高史、宍戸昌彦、EF-Tu 変異体によるアミノアシル tRNA の精製・定量法、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド

山本浩道、土井芳朗、大槻高史、宍戸昌彦、EF-Tu 変異体を用いた非天然アミノアシル tRNA の精製と定量、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月19

日、横浜・東京工業大学すずかけ台キャンパス

渡邊洋一、ミトコンドリアタンパク質合成系の進化：線形動物を中心に、第10回日本進化学会、2008年8月22日、東京・東京大学駒場キャンパス

Yoh-ichi Watanabe, RNA structures and duplication of the protein-coding genes. Mitochondria, Ribosomes & Cells: A Symposium in honour of Mike Gray, 2008年7月4日、Halifax, Canada

彦坂健児、渡邊洋一、辻尚利、北潔、五十嵐郁男、田邊和祐、ピロプラズマ類原虫及びマラリア原虫ミトコンドリアのゲノム構造、2008年4月4日、長崎・ブリックホール

東正希、山岸明彦、横堀伸一、尾索動物 *Ciona intestinalis* ミトコンドリア特異的メチオニル tRNA 合成酵素の解析、第33回生命の起源および進化学会学術講演会、2008年3月18日、東京・東京薬科大学

大槻高史、土井芳朗、宍戸昌彦、改変 EF-Tu を用いた翻訳系の拡張、第22回生体機能関連化学シンポジウム 2007年9月29日、仙台・東北大学片平キャンパス

水澤圭吾、阿部健二、山東信介、土井芳朗、大槻高史、宍戸昌彦、青山安宏、リボソームを用いたペプチド合成に向けたアプローチ：主鎖伸長型基質導入に關与するファクター、第22回生体機能関連化学シンポジウム、2007年9月29日、仙台・東北大学片平キャンパス

横堀伸一、倉林敦、山岸明彦、広瀬裕一、ミトコンドリアゲノムに基づく腸性目ホヤ(尾索動物亜門ホヤ綱)の分子系統解析、第78回日本動物学会年会、2007年9月22日、弘前・弘前大学文京町キャンパス

大槻高史、非天然アミノ酸含有タンパク質の無細胞及び細胞モデル系での発現、特定領域『バイオ操作』若手研究者第2回ワークショップ、2007年7月21日、東京・東京農工大学小金井キャンパス

Yokobori, S. Molecular Phylogeny of Urochordata (Tunicata) inferred from 18S rRNA genes and mitochondrial genomes. The 4th International Tunicate Meeting, 2007年6月24日、Villefranche-sur-Mer, France

Yokobori, S., Hirose, E. Molecular phylogeny of Trididemnum species (Didemnidae: Ascidiacea) hosting Prochloron, non Prochloron cyanophytes, and no photosymbionts. 第21回太平洋学術会議、2007年6月14日、沖縄・宜野湾

〔図書〕(計2件)

Ohtsuki, T. and Sisido M. The central dogma: from DNA to RNA, and to protein. In "Automation in Proteomics and Genomics", eds by G. Alterovitz, R. Benson and M. Ramoni, Wiley (2009), pp3-20

穴戸昌彦、大槻高史(共著) 化学の指針シリーズ「生物有機化学—ケミカルバイオロジーへの展開—」, 裳華房(2008)、204ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉成 茂夫 (YOSHINARI SHIGEO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70253317

(2) 研究分担者

渡邊 洋一 (WATANABE YOH-ICHI)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90323568

大槻 高史 (OHTSUKI TAKASHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：80321735

横堀 伸一 (YOKOBORI SHIN-ICHI)
東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：40291702

(3) 連携研究者

なし