

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08442

研究課題名(和文) 寄生性真核生物に見られる原核生物型転移RNAスプライシング関連酵素の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of enzymes for transfer RNA precursor splicing in parasitic protozoa

研究代表者

渡邊 洋一 (Watanabe, Yoh-ichi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：90323568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子中の介在配列であるイントロンを取り除くRNAスプライシングの過程は、遺伝子から機能する分子を生み出すのに必須の過程である。アミノ酸をタンパク質合成の場であるリボソームに運ぶ転移RNA (transfer RNA, tRNA) にはその遺伝子にイントロンを持つものがある。真核生物のtRNA前駆体のスプライシングに関わる酵素は、ごく一部の生物種でのみ解析されており、その全貌は明らかでない。私は寄生性真核生物であるトリパノゾーマ類に注目し、そのRNA連結酵素の解析を行った。その結果、トリパノゾーマ類の持つRNA連結酵素は細菌から遺伝子の水平伝播によって獲得されたものであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：RNA splicing, which removes intron, intervening sequence in the gene, is essential to produce functional molecule from the genes. Some genes for transfer RNAs (tRNAs), which carry amino acid to ribosome, protein synthesis machinery, have intron(s). Eukaryotic tRNA splicing enzymes have been analyzed from a very few organisms, and the entire characterization is remained to be solved. I analyzed RNA splicing enzymes in parasitic kinetoplastid protozoa. As a results, I elucidated that an RNA ligase in kinetoplastid protozoa had been acquired from a bacterial lineage via lateral horizontal gene transfer.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：RNAスプライシング

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上で、一部の遺伝子情報は必ずしも連続していない。このため、ゲノムの転写物である RNA には、転写の後、不要部分であるイントロンを捨て去り、残った断片であるエクソン同士を連結するスプライシングの過程が必要な場合がある。転移 RNA (transfer RNA, tRNA) は、タンパク質の元になるアミノ酸をタンパク質合成の場であるリボソームへ運ぶ。一部の tRNA 遺伝子はその中にイントロンを持ち、この遺伝子が機能するためにはスプライシングが必要になる。真核生物の核ゲノムにコードされるイントロン入り tRNA 前駆体のスプライシングには、イントロンとエクソンとの境界領域で切断を起こすスプライシングエンドヌクレアーゼと、エクソン断片同士を連結する tRNA リガーゼが必要である。しかし、これらの酵素は、酵母やヒトなど非常に限られた生物種由来のものしか研究されておらず、その全貌はあきらかではない。

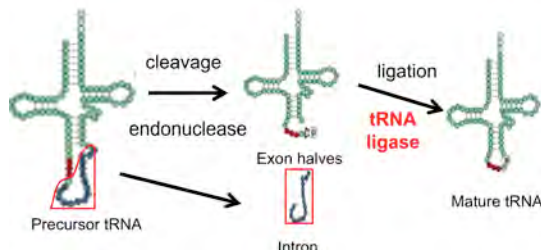


図1 イントロン入り tRNA 前駆体のスプライシング (Phizicky EM & Hopper AK, Genes Dev, 2010 より改変)

2. 研究の目的

私は、全てのチロシン tRNA 遺伝子がイントロンを持つ寄生性真核生物であるトリパノソーマ類に注目し、その tRNA スプライシング酵素の一つ、tRNA リガーゼの性状を明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

ヒトの tRNA リガーゼである RtcB を用いて BLAST による検索を行い、相同タンパク質を収集し、最尤法による分子系統樹を作成した。

トリパノソーマ類である *Leishmania tarentolae* より RNA を調製し、そこからオリゴ dT をプライマーとして相補 DNA を逆転写により合成し、これを鋳型として、スプライスリーダー配列に特異的なプライマーと RtcB ホモログ遺伝子のコーディング領域の 3' 末端に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で精製後、クローニングし、塩基配列の解析を行った。

L. tarentolae の外来遺伝子発現系である LEXSY システム (Jena Bioscience、誘導型) を用いて、エピトープタグ付き RtcB ホモログ (*L. tarentolae* 由来) 遺伝子を *L. tarentolae* ゲノムに導入し、テトラサイクリンにより、導入遺伝子の発現を誘導した。

その後、組換え *L. tarentolae* の細胞抽出液からエピトープタグに対する抗体を用いた免疫沈殿を行った。

RNA リガーゼの酵素活性の検出には、*L. tarentolae* のチロシン tRNA 人工前駆体を好熱性アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来の組換えスプライシングヌクレアーゼで切断して調製したエクソン断片を用いた。リガーゼ反応の生成物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および RT-PCR による cDNA の塩基配列決定により解析した。

4. 研究成果

作成した RtcB tRNA リガーゼの分子系統樹において、トリパノソーマ類のホモログは、真核生物の RtcB とは姉妹群を作らず、バクテリアのホモログと姉妹群を形成した。

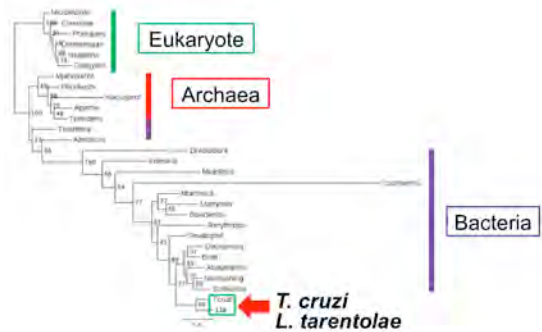


図2 最尤法による RtcB tRNA リガーゼの分子系統樹。トリパノソーマ類 (*T. cruzi*, *L. tarentolae*) の配列はバクテリアの配列と姉妹群をつくる。

また、アミノ酸配列のアラインメント中で、バクテリアのホモログと真核生物/アーキアのホモログの間には、それぞれ特徴的な挿入欠失部位が見られたが、トリパノソーマ類のホモログは、バクテリアのホモログの特徴を有していた。これらの結果は、トリパノソーマ類の RtcB ホモログが真核生物起源ではなく、バクテリアが持っていた遺伝子の水平伝播によって獲得されたものであることを示唆する。



図3 RtcB tRNA リガーゼのアミノ酸配列のアラインメント (一部)

このバクテリア起源の遺伝子が偽遺伝子であるかどうかを確認するため、トリパノソーマ類の一種 *Leishmania tarentolae* の RNA を用いて、RT-PCR を行った。その際、プライマーの一つに、トリパノソーマ類の成熟型

mRNA の 5' 末端に特異的に存在するスプライスリーダー配列に特異的なものを用いた。その結果、この遺伝子の転写産物は成熟型 mRNA となることがわかった。

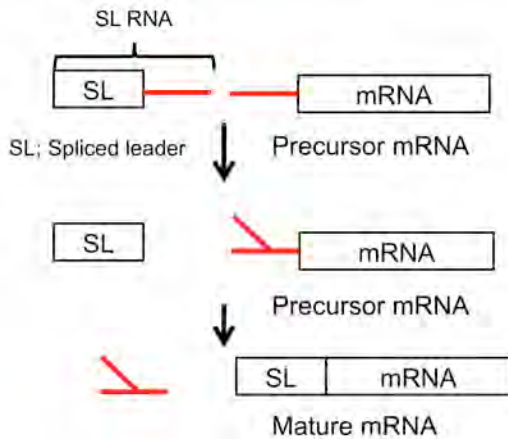


図4 トリパノソーマ類に見られる mRNA 前駆体のトランススプライシング



図5 スプライスリーダー特異的配列を用いた *L. tarentolae* RtcB ホモログ mRNA の RT-PCR による検出。レーン1、サイズマーカー、レーン2、逆転写酵素入反応産物を鋳型にした反応、レーン3、逆転写酵素を加えなかった反応産物を鋳型にした反応。

次に、この原虫の外来遺伝子発現系を用いて、自身のもつ RtcB ホモログを、エピトープタグを持つ形で発現させた。これを免疫沈殿により濃縮した。この画分の RNA リガーゼ活性を、*L. tarentolae* のチロシン tRNA エクソン断片を基質として検討した。その結果、この画分はエクソン同士を連結する活性を持ち、

この遺伝子が酵素活性のあるタンパク質をコードしていることが示された。

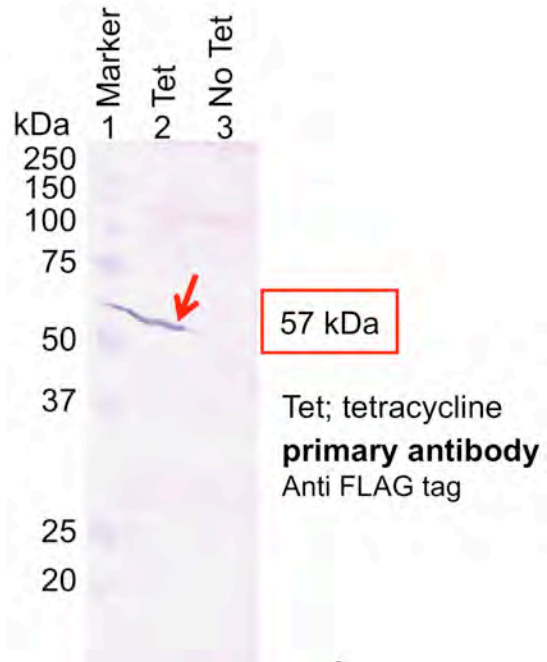


図6 組換え *L. tarentolae* における、エピトープタグ付き RtcB ホモログの発現。レーン1、サイズマーカー、レーン2、テトラサイクリン入り培地で培養した原虫の細胞抽出液、レーン3、テトラサイクリンを加えなかった培地で培養した原虫の細胞抽出液。タンパク質の検出には抗 FLAG 抗体を用いた。



図7 組換え原虫抽出液の分画と免疫沈殿。レーン1、サイズマーカー、レーン2、20000g 遠心後の沈殿、レーン3、20000g 遠心後の上澄、レーン4から6、遠心上澄の免疫沈殿時

の未吸着画分、レーン7、免疫沈殿時の洗浄液、レーン8、FLAG ペプチドによる洗浄液、レーン9、洗浄後のゲル

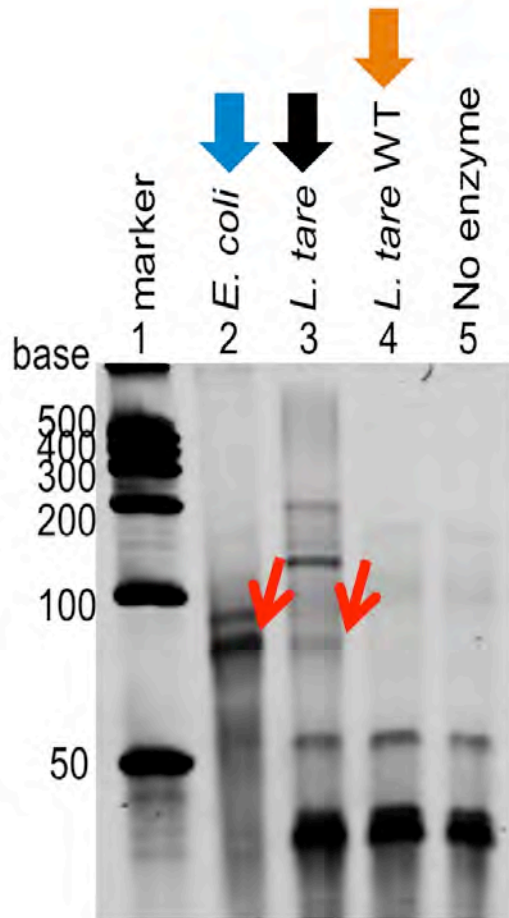


図8 ポリアクリルアミド変性ゲルを用いた、tRNA エクソン断片連結反応液の分析。レーン1、サイズマーカー、レーン2、大腸菌 RtcB を用いた反応液、レーン3、免疫沈殿によって濃縮した組換え原虫由来の画分を用いた反応液、レーン4、野生型原虫由来の画分を用いた反応液、レーン5、酵素を加えなかった反応液。

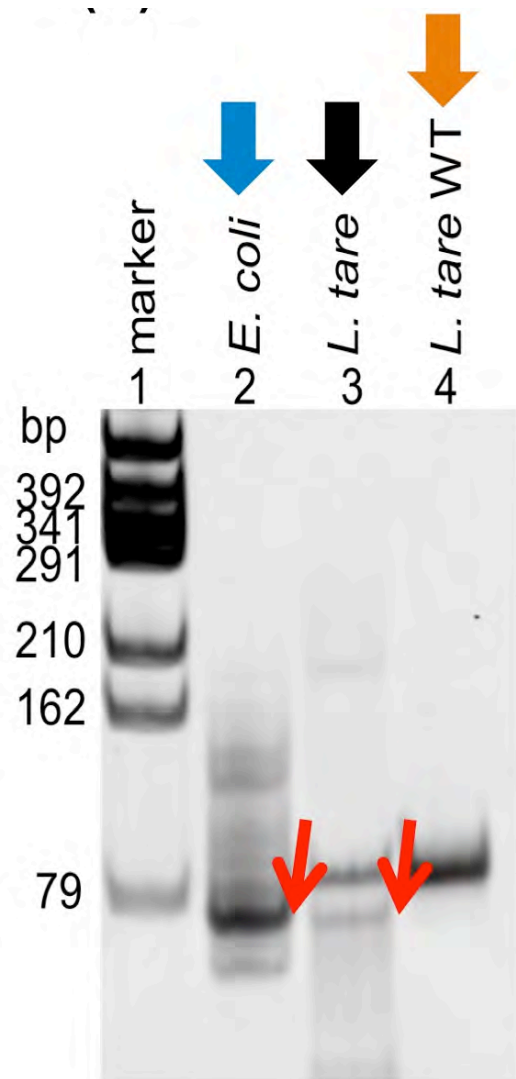


図9 RT-PCR による tRNA エクソン断片連結反応の分析。レーン1、サイズマーカー、レーン2、大腸菌 RtcB を用いた反応液、レーン3、免疫沈殿によって濃縮した組換え原虫由来の画分を用いた反応液、レーン4、野生型原虫由来の画分を用いた反応液。

以上の結果は、真核生物とバクテリアとの間での tRNA スプライシング関連酵素の遺伝子の水平伝播の初めての例を示している。

5. 主な発表論文等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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