

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06483

研究課題名(和文)植物オルガネラの限定的なtRNA-アミノアシル化酵素セットによる翻訳機構の解明

研究課題名(英文) Translation mechanism with restricted repertoire of tRNA and ARS in plant organelles.

研究代表者

相馬 亜希子 (Soma, Akiko)

千葉大学・大学院園芸学研究院・講師

研究者番号：70350329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：tRNAはタンパク質合成反応に必須の分子であり、その転写後プロセッシングやアミノアシル化に関する知見は学術的にも工業的にも重要である。植物オルガネラにおけるタンパク質合成反応には不明な点も多く残されており、一揃いのtRNAやアミノアシル化酵素の遺伝子セットがオルガネラゲノムにコードされていない場合が多い。本研究では微細藻類を材料として解析を行い、オルガネラのtRNA遺伝子やアミノアシル化酵素遺伝子の不足がtRNAの転写後修飾や細胞質からのtRNAおよびアミノアシル化酵素の輸送によって補われていることを明らかにした。本研究からオルガネラのタンパク質合成反応機構の多様性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から植物オルガネラのtRNA遺伝子やアミノアシル化酵素遺伝子の不足がどのように補われているのか、その一端が明らかとなった。本研究は遺伝暗号の認識機構の新たな一例を示したものであり、生物種やオルガネラなどタンパク質合成系における違いや多様性を明らかにした。以上が本研究の学術的意義が高い点である。オルガネラのタンパク質合成は植物の物質生産において中心的な役割を果たす。その分子機構の解明は応用研究においても重要な知見であり、本研究の社会的意義が高い点である。

研究成果の概要(英文)：Transfer RNAs function as adaptor molecules to link the genetic code and amino acids, and analysis of their post-transcriptional processing and aminoacylation is important to understand gene expression. Plant organelles have their own translation system, but the organelle genomes do not always encode a complete gene set of tRNA repertoire nor aminoacylation enzymes. In this study, the genome and tRNA sequences of algae were analyzed to identify the complete set of tRNA and aminoacylation enzymes in organelles. Results indicated that the lack of tRNA and aminoacylation enzymes is possibly supplemented by post-transcriptional modification of organelle tRNAs and transport of aminoacylation enzymes from cytoplasm to organelles.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質合成 tRNA 転写後修飾

1. 研究開始当初の背景

オルガネラは独自の遺伝子発現系を有し、tRNA も各オルガネラゲノムにコードされているが、一般的に、コドンの数に対して tRNA 遺伝子の数や種類が圧倒的に足りない。動物や酵母では、細胞質 tRNA のオルガネラへの輸送によりこの問題を解決しており、その分子メカニズムもよく解析されている (Reviewed in Chatterjee, *et al.*, 2017)。植物のオルガネラでも動物と同様に tRNA が足りないが、これに対する戦略は生物種によって異なることが示唆されており、また、研究例が少ないため、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。

申請者らは単細胞藻類 *C. merolae* の核ゲノムから逆転 tRNA 遺伝子を発見し、その前駆体 tRNA は「環状 RNA 中間体」を介したプロセッシング経路により成熟化することを明らかにした (Soma *et al.*, 2007; Soma *et al.*, 2013; Soma, 2014)。また、高度分断化 tRNA を同定し、その成熟化経路の特殊性も明らかにした (Hiromoto & Soma, 2017)。一方、*C. merolae* のオルガネラゲノムには上述のような特殊な tRNA 遺伝子群は見当たらず、未同定の tRNA が存在する可能性は非常に低い。そこで申請者は転写後修飾に着目し、*C. merolae* のオルガネラ tRNA の修飾塩基を解析したところ、修飾を受けるものと未修飾のものが混在していることを見出した。修飾 tRNA と未修飾 tRNA が混在することでそのコドン認識能が拡張し、tRNA の不足が補填されているという可能性が想定された。この可能性を検討するため、本研究に着手した。

tRNA に加えて、*C. merolae* ではオルガネラで機能するアミノアシル化酵素についても十分な数の遺伝子が見当たらない。申請者は、単一の遺伝子由来のアミノアシル化酵素が細胞質とオルガネラ(ミトコンドリアおよび葉緑体)のタンパク質合成系で共用されている可能性を予想した。本研究ではその可能性の検討とメカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では *C. merolae* のオルガネラ tRNA の転写後修飾およびアミノアシル化酵素に着目して、限定的な tRNA およびアミノアシル化酵素のレパートリーに依存した遺伝暗号翻訳機構の解明を目的として分子生物学的・生化学的実験を行った。さらに、ナズナなどモデル植物に加え、種々の植物との比較から、*C. merolae* の特殊性、あるいは植物オルガネラにおけるコドン認識戦略の普遍性に関する考察を行った。

3. 研究の方法

本研究では *C. merolae* のオルガネラ tRNA とその修飾塩基、およびアミノアシル化酵素に着目して分子生物学的・生化学的手法を用いて次の実験を行った。

細胞質からオルガネラへの tRNA 輸送の可能性の検討、および tRNA 修飾によるコドン認識能の調節の可能性の検討

：単離したオルガネラから RNA を抽出し、RT-PCR やシーケンシング、電気泳動、ノザンプロットングによってその塩基配列の決定と修飾塩基の有無を解析した。また、修飾酵素遺伝子の同定とそのノックダウン株の構築を行い、その生育などへの影響の解析を試みた。

アミノアシル化酵素のオルガネラへの輸送の可能性の検討と、基質特異性の解析

：アミノアシル化酵素にエピトープを付加し、その細胞内局在を解析した。また、該当酵素のリコンビナントタンパク質を調製し、その基質認識機構を解析した。

植物オルガネラの tRNA-アミノアシル化酵素レパートリーの進化に関する考察

：と の結果に基づき、*C. merolae* のオルガネラにおける遺伝暗号の翻訳機構に関するモデルを予想した。また、他生物種のオルガネラやその祖先であるバクテリアの tRNA およびアミノアシル化酵素遺伝子との比較から、藻類・植物オルガネラにおける進化学的考察を行った。

4. 研究成果

C. merolae のオルガネラで不足していると考えられる tRNA について、細胞質からオルガネラへの輸送を示すデータは得られなかった。以上の結果は *C. merolae* オルガネラではオルガネラゲノムにコードされた限定的な tRNA のみで翻訳していると予想される。オルガネラ tRNA について、修飾された tRNA と未修飾のままの tRNA の割合を定量したところ、ミトコンドリアと葉緑体のいずれの場合でも、修飾された tRNA の割合が大きいことが分かった。*C. merolae* のオルガネラでは限定的な tRNA セットで翻訳できるようにアンチコドンの転写後修飾が調節されていると予想される。コントロールとして用いたバクテリアでは未修飾 tRNA はほとんど検出できなかった。以上の結果は、*C. merolae* オルガネラとバクテリアとでは修飾酵素の特性に違いがあることを示唆する。*C. merolae* ゲノムの配列解析から修飾酵素遺伝子を同定し、バクテリアの修飾酵素とのアミノ酸配列の比較から、修飾の割合が異なる原因となるモチーフの候補を見出した。この可能性を検討するため、現在はその遺伝子ノックダウン株の構築およびリコンビナントタンパク質の調製を進めている。また、本研究の過程で転写後修飾とスプライシングのタイミングに関する新たな知見が得られた。今後は修飾やスプライシングと環境応答との関連性についての解析を進める。

アミノアシル化酵素のリコンビナントタンパク質を用いた酵素速度論解析と細胞内局在解析から、同一のアミノアシル化酵素が細胞質とオルガネラで共用されている可能性が示唆された。本研究結果から *C. merolae* オルガネラの特異性があらためて明らかになった。一方で、他の植物種のオルガネラやバクテリアのアミノアシル化酵素遺伝子との配列比較から、*C. merolae* と同様のメカニズムが他の生物種にも存在する可能性が見出された。この可能性を検討するため、現在はそれらの生物種を用いた解析の準備を進めている。

と の結果に基づき、*C. merolae* のオルガネラにおける遺伝暗号の翻訳機構のモデルを構築した。コンパクトなゲノムを進化させた *C. merolae* では、限定的な tRNA およびアミノアシル化酵素に依存したタンパク質合成系が成立したと予想される。他生物種のオルガネラやその祖先であるバクテリアの tRNA およびアミノアシル化酵素遺伝子との比較から、同様なシステムを有する生物種の存在の可能性も見出し、今後はその検証が必要である。

以上の発見は遺伝子構造や RNA プロセッシング、遺伝暗号の翻訳機構の多様性をあらためて示すものであり、tRNA 遺伝子の検出やデータベース整備にも有用な知見をもたらすと期待される。一方で、未だ完全な tRNA レパートリーが同定できない生物種も残されており、tRNA 遺伝子とその同定方法において更なる基準や概念の理解が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Genki Akanuma, Fujio Kawamura, Satoru Watanabe, Masaki Watanabe, Fumiya Okawa, Yousuke Natori, Hideaki Nanamiya, Kei Asai, Taku Chibazakura, Hirofumi Yoshikawa, Akiko Soma, Takashi Hishida, Yasuyuki Kato-Yamada	4. 巻 1
2. 論文標題 The evolution of ribosomal protein S14 demonstrated by the reconstruction of chimeric ribosomes in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 00599-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00599-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muto Akira, Goto Simon, Kurita Daisuke, Ushida Chisato, Soma Akiko, Himeno Hyota	4. 巻 171
2. 論文標題 A leaderless mRNA including tRNA-like sequence encodes a small peptide that regulates the expression of GcvB small RNA in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 459-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saori Hiromoto, Misako Ohara, Akiko Soma
2. 発表標題 The removal of tRNA-introns precedes the maturation of the acceptor stem in a red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> .
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬亜希子
2. 発表標題 転写後プロセッシングによるtRNAの発現と機能の制御
3. 学会等名 微生物ウィーク「ゲノム微生物学と細菌学の研究最前線」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山川律穂、相馬亜希子
2. 発表標題 単細胞紅藻のtRNAレパートリーと発現マシナリの比較
3. 学会等名 生物環境イノベーション研究部門シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuha Nagato, Chie Tomikawa, Hideyuki Yamaji, Akiko Soma, Kazuyuki Takai
2. 発表標題 Effect of introns on tRNA pseudouridylation in Cyanidioschyzon merolae.
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川 律穂、相馬 亜希子
2. 発表標題 古細菌における逆転tRNAのプロセシング機構の解析
3. 学会等名 生物環境イノベーション研究部門 第1回シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野光、相馬亜希子
2. 発表標題 始原紅藻Cyanidioschyzon merolaeのtRNAArg(ACG)のイノシン修飾の解析
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------