

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16204

研究課題名（和文）kissing-loopを有する分割型tRNAの創製

研究課題名（英文）Split-tRNAs coalesce to form a functional tRNA via kissing-loop interaction

研究代表者

無津呂 裕美（青木裕美）（Mutsuro, Hiromi）

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・助教

研究者番号：00794570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能を持たないRNAを相互作用によって、機能を持つRNAに変換することに成功した。二対の短鎖RNAと、RNA間相互作用の一つであるkissing-loopを用いて分割型tRNAを構築した。単体では機能のないRNAを、相互作用した時のみ機能のあるRNAへと変換したものである。また、RNAの二量体化を利用して、PTCの構築にも成功した。PTCは、ペプチド結合を担う活性中心であり、短く機能のないRNAから、PTCの機能を持つRNAへと変換することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAは、遺伝情報の保持伝達および、触媒機能を有するので、進化の過程において、まずRNAが誕生したと考えられる。原初のRNAは短いものであり、その後長鎖化し、機能を獲得したと思われる。本研究ではこのRNAが長鎖化する過程を提案し、実験結果よりそれが起こりうることを示した（学術的意義）。また、2種のRNAは相互作用により、形態変化し、機能を獲得することも示した。これは任意のタイミングでRNAの機能を変化させることができないため、様々な分野に応用できると考えられる（社会的意義）。

研究成果の概要（英文）：This study proved the conversion of non-functional RNA to functional tRNA via kissing-loop interaction. I constructed a split tRNA which consisted of two pairs of short RNAs. Single RNA has not function but complex of split-tRNA can gain of function. I also constructed PTC-like RNA complex by dimerization of RNA. Non-functional short RNAs obtain function of PTC which is Peptidyl Transferase Center.

研究分野：RNA科学

キーワード：RNA kissing-loop RNA相互作用 進化

ル tRNA 合成酵素 (AlaRS) を用いた。AlaRS は、tRNA^{Ala} のアクセプターシステムに存在する 3 塩基目のグアニンと 70 塩基目のウラシルの G:U ペアを認識し、tRNA^{Ala} の 3' の ACCA 末端にアラニン を付与する酵素である。mini-G3 と mini-U70 は、どちらもそれ単体では G:U ペアを持たないが、コンフォメーション変化した時のみ、G:U ペアが形成される。すなわち、AlaRS の認識部位という機能の獲得である。この検出を、AlaRS と放射性同位体 ¹⁴C を含むアラニンを用いて検出した。

(2) 二量体型 PTC

ペプチジルトランスフェラーゼセンター (PTC) は、リボソームのペプチド転移反応の活性中心であり、Ribozyme である。放射線耐性菌 *D. radiodurans* の PTC は、tRNA と似た二次構造を有している。PTC も、tRNA のように RNA 同士が相互作用することによって、進化したのではないかと考え、*D. radiodurans* の PTC 参考に、P1c2 と P1c2^{UGGU} という 2 つの RNA を作製した (図 3)。これらの RNA は、自己二量体を形成し、PTC 様構造を形成する。P1c2^{UGGU} は、Minihelix 末端の ACCA 配列と結合する UGGU 配列を 3' 末端に付加した RNA である。Minihelix は、tRNA の部分配列から構成されている、tRNA の原始型だと考えられる RNA である。P1c2 および P1c2^{UGGU} と、アラニル化 minihelix (Ala-MH) を混合し、アミノ酸の転移反応が起こるかを調べた。アミノ酸転移反応によるアラニルアラニン (Ala-Ala) の検出は、LC-MS を使って行った。

4. 研究成果

(1) 分割型 tRNA

前述の mini-G3 と mini-U70 の他に、Negative control として「mini-C70」と「mini-U70-ACAAUAA」を用意した (図 1)。mini-C70 はコンフォメーション変化後も G:U ペアを形成しない RNA、mini-U70-ACAAUAA は kissing-loop 相互作用を形成しない RNA である。これら RNA と AlaRS および、放射性同位体を含むアラニンを用いて、放射線量を測定することにより、アミノアシル化量を測定した。G:U ペアを形成した時のみ AlaRS に認識され、アラニンが付加されるので、アミノアシル化量は G:U ペアの形成率に比例するためである。その結果、mini-G3 と mini-U70 の組み合わせの時のみ、アミノアシル化を検出することができた (図 2A)。これは、kissing-loop によるコンフォメーション変化により、G:U ペアが形成され、AlaRS に認識されたことを示す。すなわち、非機能性の RNA をコンフォメーション変化により、AlaRS の認識部位という機能性 RNA に変換することに成功した。

この成果は第 44 回日本分子生物学会年会および、BioSystems 誌にて報告した。

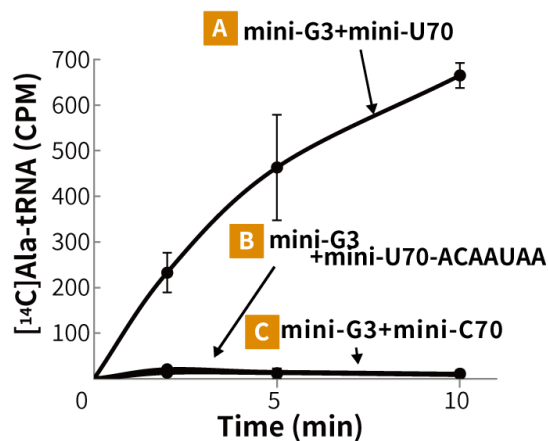


図 2. 分割型 tRNA のアミノアシル化反応

(2) 二量体型 PTC

まず作製した、P1c2 および P1c2^{UGGU} が二量体化および Minihelix と結合するかどうかを、Native-Page を用いて検討した。その結果、両 RNA とも二量体化したが、P1c2^{UGGU} のみが Minihelix と相互作用した。次に、Ala-Ala の検出を、LC-MS を用いて行った。P1c2^{UGGU} と Ala-MH を混合すると、Ala-Ala の形成を検出することができたが、P1c2 と混合したものでは、検出量が大幅に減少した (図 3)。これは P1c2^{UGGU} が PTC として機能し、Ala-MH のアラニンに別の Ala-MH のアラニンが転移・結合したことを示す。これに対して、P1c2 は Ala-Ala の検出量が少なく、PTC 機能が不十分であるように見える。これは P1c2 および P1c2^{UGGU} は、PTC としての機能は持つが、P1c2 は Minihelix と結合できないため、Ala-Ala の形成量が少ないためだと考えられる。この実験結果から、PTC の機能を RNA の相互作用によって再現することに成功した。また、tRNA を通して保存されている ACCA は、PTC との相互作用のために保存されたため、現在のような形へと進化した可能性も示唆された。

この成果は、Life 誌にて報告した。

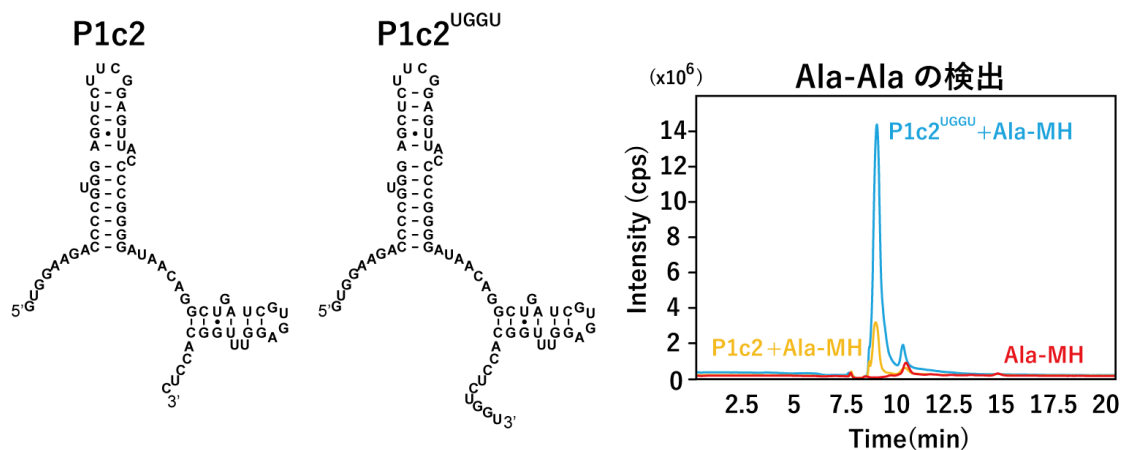


図 3. P1c2 と P1c2^{UGGU} によるペプチド転移反応

(3) 本研究成果における総括

本研究では、短い非機能性の RNA を kissing-loop および相同配列によって相互作用させ、機能性 RNA へと変換することに成功した。これにより、単一の RNA では機能を持ち得なくとも、相互作用により機能を獲得しうることを実験的に証明することができた。分割型 tRNA を用いた実験では、tRNA 原始型 Minihelix の誕生と機能獲得を、PTC を用いた実験では tRNA と PTC の起源を提言することができた。これらは今後の進化生物学の発展に貢献すると考えられる。

また、本実験では、短鎖 RNA を組み合わせることによって、機能を付加することに成功した。これは任意のタイミングで、RNA を添加することにより、RNA の機能変化を引き起こすことができるということである。これは RNA 創薬など、様々な場面で応用可能であると考えている。今後は、応用面についても研究していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hamachi Kokoro, Mutsuro-Aoki Hiromi, Tanizawa Kana, Hirasawa Ito, Umehara Takuya, Tamura Koji	4. 巻 177
2. 論文標題 Effects of complementary loop composition in truncated R3C ligase ribozymes on kiss switch activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosystems	6. 最初と最後の頁 9~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biosystems.2019.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mutsuro-Aoki Hiromi, Hamachi Kokoro, Kurihara Ryodai, Tamura Koji	4. 巻 197
2. 論文標題 Aminoacylation of short hairpin RNAs through kissing-loop interactions indicates evolutionary trend of RNA molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosystems	6. 最初と最後の頁 104206~104206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biosystems.2020.104206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawabata Mai, Kawashima Kentaro, Mutsuro-Aoki Hiromi, Ando Tadashi, Umehara Takuya, Tamura Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Peptide Bond Formation between Aminoacyl-Minihelices by a Scaffold Derived from the Peptidyl Transferase Center	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 573~573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12040573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱地 心、無津呂（青木） 裕美、平澤 以冬、谷澤 佳奈、榎原 琢哉、田村 浩二
2. 発表標題 R3Cリガーゼリボザイムの再活性化に及ぼすkissing-loop組成の影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 無津呂（青木）裕美、瀧地 心、栗原 遼大、田村 浩二
2. 発表標題 Kissing-Loop相互作用を介した非機能性RNAの機能性tRNAへの変換
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------