

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570208

研究課題名(和文) tRNAスプライシング機構の特徴点抽出

研究課題名(英文) The differential analyses of tRNA splicing processes among the three domains of life

研究代表者

横川 隆志 (Yokogawa, Takashi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：90242304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物や古細菌では、タンパク質の生合成で主要な働きをするtRNAの遺伝子にイントロンが含まれている場合がある。このイントロンが除去され、成熟したtRNAが生成されるためには、RtcBという酵素がイントロンが除去された後のRNA断片を結合すると考えられるが、その際、イントロンを環状化していることが確かめられた。環状イントロンの働きは未知数であるが、環状イントロンはメタン生成古細菌 *Methanosarcina acetivorans* の細胞内で安定に存在することがわかった、またイントロンを持たないバクテリアにもRtcBは存在するので、このような環状RNAの機能についてさらに理解を深めたい。

研究成果の概要(英文)：In Archaea and Eucarya, some tRNA genes contain introns. Since the precursor tRNA (pre-tRNA) is not functional in protein biosynthesis, exact removal of introns must be essential. Recently, it was found that the RtcB catalyzes the ligation of exons derived from the pre-tRNA. RtcB also seems to catalyze the circularization of intron from pre-tRNA. In fact, we found the circularized intron in methanogenic archaeon, *Methanosarcina acetivorans*, cells. Whereas the circularized intron has any function or not, we believe it would be functional because of the following facts. First, the circularized intron was stable in *M. acetivorans* cells. Second, RtcB even exists in bacterial cells that any tRNA gene does not contain intron. In future, we would like to discover the functions of small circularized RNAs.

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 tRNAリガーゼ スプライシング 古細菌 EndA RtcB イントロン 低分子環状RNA

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の生合成において重要な働きをする tRNA は、前駆体 RNA として転写された後、多段階のステップを経て成熟 tRNA となる。真核生物の tRNA 遺伝子の中にはイントロンを持つものが存在するが、tRNA のスプライシングが正しく行われなければ正常な成熟 tRNA が生じないため、タンパク質合成が正しく進行せず細胞の生育に大きなダメージを与える。したがって tRNA スプライシング機構を完全に理解することは、重要な研究課題の一つだと考えられる。

研究開始当初、酵母においてのみ tRNA のスプライシング機構が解明されていた。まずスプライシングエンドヌクレアーゼによりイントロンが切り出された後、tRNA リガーゼによってエキソンが連結される。当初、問題とされたのは、真核生物全体でスプライシングエンドヌクレアーゼ遺伝子は保存されているのに、酵母 tRNA リガーゼ遺伝子のオルソログがヒトを含む動物には見つからないことであった。酵母の tRNA スプライシング機構が解明されて以降 30 年、おそらく多くの研究者が動物の tRNA スプライシング機構の解明を試みていたと推測されるが、なかなか伸展しなかったことを鑑みると、おそらく菌類・植物と動物で tRNA のスプライシング機構がかなり異なっているものと予想していた。そこで、我々は動物 tRNA リガーゼ遺伝子を同定するためには、おそらくバイオインフォマティクスのようなアプローチは効果的でなく、生化学的なアプローチを用いることが必須であると考えた。そのために単純なモデル生物として、遺伝子数が約 4,000 と少ないメタン生成古細菌 (*M. acetivorans*) を動物細胞のミニマムモデルとして用いることにした。

古細菌は第 3 の生物ドメインを構成する原核生物であるが、複製、転写、翻訳などのメカニズムは真核生物と共通するものが多いことが知られている。実際、tRNA 遺伝子の一部には、真核生物同様のイントロンが存在し、スプライシングエンドヌクレアーゼ遺伝子のオルソログ (*endA*) も見つかる。しかし酵母 tRNA リガーゼ遺伝子のホモログは、やはり存在せず、tRNA スプライシング機構も当時、明らかとなっていなかった。したがって、我々は、*M. acetivorans* の tRNA スプライシング機構を解明することで、ヒトを含む動物の tRNA スプライシング機構の解明に繋がれると期待して研究を開始した。

2. 研究の目的

前述のように、古細菌の tRNA 遺伝子の一部には、真核生物同様のイントロンが存在するが、そのスプライシング機構は明らかとなっていなかった。我々は、試行錯誤の上、*M. acetivorans* のリットルスケールの培養を確立しており、当時より、そのフレッシュな細胞抽出液中に強いスプライシングエンドヌクレアーゼの活性と微弱な連結 tRNA 連結活性を

見出ししていたので、その活性をたよりに tRNA リガーゼを精製し、質量分析を利用して、tRNA リガーゼ遺伝子を同定することで動物の tRNA スプライシング機構の解明にアプローチすることを目的としていた。

3. 研究の方法

古典的な方法ではあるが、我々は *M. acetivorans* のフレッシュな細胞抽出液を調製することが可能なので、スプライシングエンドヌクレアーゼで得られる tRNA 断片を基質として観察される tRNA リガーゼ活性 (図 1) を頼りに、tRNA リガーゼを濃縮し、その遺伝子を同定することを試みた。

平行して、イントロンを含む tRNA 前駆体に結合するタンパク質を *M. acetivorans* の細胞抽出液から釣り上げる実験を行い、得られたタンパク質から tRNA リガーゼの候補となるタンパク質を探索する実験も行った。

tRNA リガーゼの候補遺伝子が得られた場合は、その遺伝子のオルソログが一般的に動物にも見られるかデータベースを検索する。

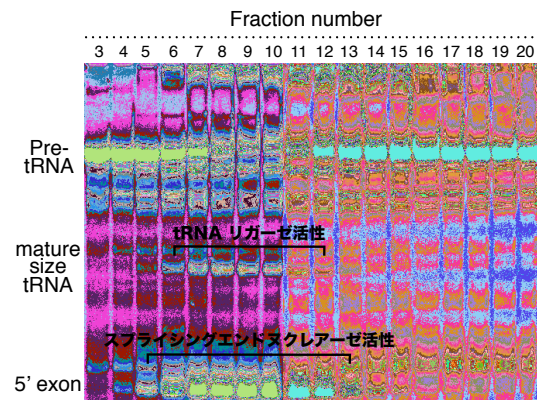


図 1 : *M. acetivorans* の細胞抽出液にはスプライシングエンドヌクレアーゼ活性も tRNA リガーゼ活性も存在する

4. 研究成果

(1) *M. acetivorans* の細胞抽出液からの tRNA リガーゼの調製

M. acetivorans の細胞抽出液を種々のカラムクロマトグラフィー用の担体を用いて分画することを試みたが、いずれの樹脂を用いても tRNA リガーゼ活性はブロードに溶出され、その活性を濃縮することができなかった。また、スプライシングエンドヌクレアーゼ活性に比して微弱な tRNA リガーゼ活性を高めるために、ATP や GTP を加えたり、金属イオンにより活性化されないか等の条件検討も行ったが、活性を高める条件を見いだすことはできなかった。

一方、細胞抽出液から tRNA 前駆体に結合するタンパク質を探索した結果、tRNA の 15 位を archaeosine に修飾する最初のステップを触媒する ArcTGT と 55 位をプソイドウリジンに修飾する Pus10 という tRNA 修飾酵素が得られたが、tRNA リガーゼの候補と思わ

れるタンパク質を得ることはできなかった。

こうした実験を行っているさなか、HeLa細胞抽出液から RNA を環状化する活性を持つ画分に見いだされるタンパク質のうち、その発現を RNA 干渉により不活化すると RNA リガーゼ活性が失われる遺伝子として RtcB というタンパク質が同定された (Popow, J. *et al.*, *Science*, **331**, 760-764, 2011)。またメタン生成古細菌 *M. kandleri* 細胞抽出液から、tRNA リガーゼとして、そのオルソログである RtcB が同定された (Englert, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1290-1295, 2011)。古細菌の tRNA リガーゼを同定することで動物の tRNA リガーゼに迫るといふ我々の戦略は間違っていないただけに、非常に残念なことである。しかしながら上記の論文では、*in vitro* で効率的な tRNA 連結反応を十分に再現できていなかったため、ここからは RtcB による tRNA の成熟反応を再構築することにした。

(2) *M. acetivorans* RtcB の大腸菌による過剰発現

我々が培養することが可能な *M. acetivorans* でも RtcB 遺伝子は存在していたので、大腸菌で過剰発現させることにした。しかしながら RtcB は発現はするものの、いかなる発現ベクターを用いても、いかなる発現条件でも完全に不溶化し、可溶性画分に得ることはできなかった。不溶性画分のリフォールディングも試みたが、可溶性の RtcB を得ることはできなかった。マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として RtcB を発現させた場合は、一部の融合タンパク質が可溶性に得られたが、融合タンパク質には tRNA リガーゼの活性はなく、MBP を除去すると RtcB は不溶化してしまい、活性評価を行うことはできなかった。*M. acetivorans* の RtcB は非常に不溶化しやすいタンパク質か、または未知のサブユニットを必要とするためであると考えられる。

(3) 環状イントロンの存在証明

RtcB は、真核生物、古細菌ばかりかバクテリアにも普遍的に存在している。バクテリアの tRNA 遺伝子にはイントロンが存在しないため RtcB の主たる機能が、スプライシングの際、エクソンを連結する tRNA リガーゼとして働くことであると結論するのは早すぎると考えている。スプライシングの際、切り出されたイントロン由来の RNA は環状化されると報告されているが、環状化された RNA は末端がないのでエキソヌクレアーゼの作用を受けず通常の RNA よりも安定に存在できると考えられる。もし細胞内に環状 RNA が存在しなければ、環状 RNA を選択的に分解する経路が存在するのであろうし、安定に存在するならば、何らかの機能を持つことも有り得る。そこで、*M. acetivorans* の tRNA のイントロンに由来する RNA が環状で存在するか調べることにした。

M. acetivorans の tRNA の中では tRNA^{Trp}, tRNA^{Met}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Arg} の 4 種類の tRNA 遺伝子中にイントロンが見られる。このうち tRNA^{Trp} のイントロンは 118 nt と最も鎖長が長く、ノーザンハイブリダイゼーションで検出できると思われた。そこで *M. acetivorans* の未分画 RNA を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで分画し、イントロン由来の RNA が存在しないか調べたところ、tRNA^{Trp} の存在量に比べて、少なからず存在していること、電気泳動での移動度が、線状の RNA と比べて大きく遅れていること、アルカリ加水分解を行うと線状 RNA と同じ鎖長の RNA が現れること (図 2) から、すべて環状の RNA として存在していることがわかった。

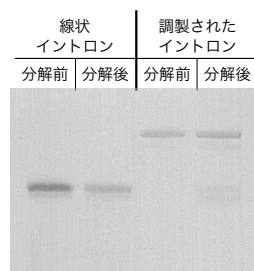


図 2: *M. acetivorans* の RNA 画分から得られた tRNA^{Trp} のイントロン由来の RNA は環状である

次に最も鎖長の短い (20 nt) tRNA^{Arg} のイントロンが存在するか調べるため、T4 RNA リガーゼを用いて tRNA^{Arg} のイントロンと同じ配列の RNA を環状化し、ハイブリダイゼーションで検出できるか検討した。予想通り 20 nt の環状 RNA では、構造に無理がありハイブリダイゼーションしないことが示された (図 3)。



図 3: 短鎖の環状 RNA はハイブリダイゼーションでは検出できない

そこで、ゲル濾過クロマトグラフィーで RNA を分画し、人工的に作製した環状 RNA と同じ溶出画分を回収し、質量分析装置によっ

て、その画分に含まれる RNA を分析したところ、環状となった tRNA^{Arg} のイントロン由来の RNA の質量と一致するピークを見いだすことができた。今後、配列が不明な環状 RNA を分析するためには、環状 RNA を濃縮する手法を確立する必要があるだろう。バクテリアにも環状 RNA が存在しないか調べてみたいと考えている。

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 3 件)

① Ikeda-Boku, A., Kondo, K., Ohno, S., Yoshida, E., Yokogawa, T., Hayashi, N. and Nishikawa, K. Protein fishing using magnetic nanobeads containing calmodulin site-specifically immobilized via an azido group.

J. Biochem., **154**, 159-65, 2013. 査読有

DOI:10.1093/jb/mvs153

② Ikeda-Boku, A., Ohno, S., Hibino, Y., Yokogawa, T., Hayashi, N. and Nishikawa, K.

A simple system for expression of proteins containing 3-azidotyrosine at a pre-determined site in *Escherichia coli*.

J. Biochem., **153**, 317-326, 2013. 査読有

DOI:10.1093/jb/mvt038

③ Nomura, Y., Onda, Y., Ohno, S., Taniguchi, H., Ando, K., Oka, N., Nishikawa, K. and Yokogawa, T.

Purification and comparison of native and recombinant tRNA-guanine transglycosylases from *Methanosarcina acetivorans*.

Protein Expr. Purif., **88**, 13-19, 2013. 査読有

DOI:10.1016/j.pep.2012.11.009

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 能村 友一朗,

Methanosarcina acetivorans 由来 tRNA-guanine transglycosylase における天然型および組換え型酵素の精製とその比較,
第15回 日本 RNA 学会年会,
2013 年 7 月 24 日~7 月 26 日,
松山市

② 久野 美由紀,

tRNA のスプライシングによって生じる環状 RNA は *M. acetivorans* 細胞内で安定に存在している,
第15回 日本 RNA 学会年会,
2013 年 7 月 24 日~7 月 26 日,
松山市

③ 横川 隆志,

Methanosarcina acetivorans のイントロン含有

tRNA 前駆体と結合するタンパク質群の解析,
24回Archaea研究会,
2011 年 9 月 3 日,
鶴岡市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

横川 隆志 (YOKOGAWA, Takashi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：90242304

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

大野 敏 (OHNO, Satoshi)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：10345796

(4)研究協力者

能村 友一朗 (NOMURA, Yuichiro)

岐阜大学・大学院工学研究科・大学院生

久野 美由紀 (KUNO, Miyuki)

岐阜大学・大学院工学研究科・大学院生