

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657160

研究課題名(和文)アロステリック・リボスイッチの起源と進化

研究課題名(英文)Origin and evolution of allosteric riboswitches

研究代表者

田村 浩二(Tamura, Koji)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：30271547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：タンデムに繋がったグリシンを結合するアプタマーを有する枯草菌のグリシンリボスイッチは、グリシンの有無に応じて、転写を制御し、1つのアプタマーへのグリシンの結合がアロステリック効果を生み出す。本研究で、グリシンリボスイッチのグリシン依存性は、ポリエチレングリコールやエチレングリコールの存在によって失われることを明らかにし、スイッチのON/OFFがターミネータ構造の存在形態によってのみ変調することを示した。ターミネータ構造を含む共通プラットフォームが先に生み出され、そこに多様なアプタマー部分が付け加わったというリボスイッチの進化とアロステリシティ獲得に関する知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The *Bacillus subtilis* glycine riboswitch comprises tandem glycine-binding aptamers and regulates transcription via the sensing of glycine. And it shows allosteric effect by binding of one glycine to one aptamer. Here, I found that the riboswitch behaves in a "glycine-independent" manner in the presence of polyethylene glycol and ethylene glycol. The effect is related to the formation of a terminator or stem within the expression platform under such conditions. This provided new perspective about the evolution of riboswitch and acquisition of allostericity that molecule-specific functions of riboswitches would have come later, after the formation of less specific domain in riboswitches.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：機能進化 RNA リボスイッチ アロステリック

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌、植物、菌類などでリボスイッチの存在が明らかになってきており、ヒトにもその存在が報告されるなど、リボスイッチは生物に広く保存された存在である可能性が指摘されている。

(2) オン型リボスイッチのうち、グリシンを認識する「グリシン-リボスイッチ」は、天然のリボスイッチであり、アロステリック制御を示す特徴を有することが報告されている。約 100 スクレオチドからなる類似構造のアプタマーが、2つタンデムにつながることで構成され、グリシンはアプタマーのそれぞれに 1 分子ずつ結合し、アロステリックに制御効率を著しく上げている。

2. 研究の目的

本研究では、最小のアミノ酸であるグリシンを認識することにより、遺伝子発現をオンにし、かつ、天然のリボスイッチの中で、唯一、アロステリック制御を示す「グリシン-リボスイッチ」に焦点を当て、以下の 2 つの観点から研究を推進する。

(1) グリシン-リボスイッチの構成要素を同定し、グリシン依存性の役割を明らかにする

(2) グリシン-リボスイッチの構成要素とリボスイッチの進化、および、アロステリック制御について考察する

これらを基に、アロステリック・リボスイッチの起源と進化に迫る。

3. 研究の方法

(1) 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のグリシン-リボスイッチの作用を GFP の発現でモニターする実験系を改良する試みを行うと同時に、*in vitro* での転写産物量を解析する。

(2) 転写量の違いと、グリシン-リボスイッチの構造と機能の相関について調べる。

(3) グリシン-リボスイッチの部分構造と転写の関係性について、溶媒の組成との関係を明らかにする。また、部分構造を構成する構造的役割を解明するために、分光学的な解析も行っていく。

4. 研究成果

(1) 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) のグリシン-リボスイッチを eGFP 遺伝子の 5' 上流に組み込み、eGFP の発現によって、このリボスイッチの機能を *in vivo* でモニターする系を立ち上げた (図 1)。ただし、まだグリシンによる ON/OFF の発現の、*in vivo* での最適なモニター系とはなっておらず、現在、プラスミドの構築を改良している。

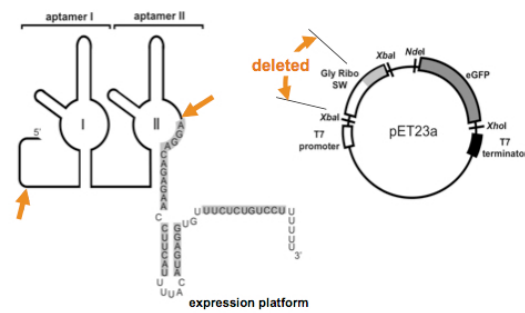


図 1 グリシン-リボスイッチ発現系

(2) 一方、*in vitro* での転写量の測定に関しては、十分な検討を行うことができた。T7 プロモーターをリボスイッチ上流に配置し、T7RNA ポリメラーゼによる転写を行ったところ、グリシンがない時には、転写がストップしたのに対し、グリシンを 0.1mM の条件で存在させると、転写がグリシン-リボスイッチの部分を超えて、下流の鑄型部分まで行われることが明らかになった。T7 プロモーターを有する系において、グリシンリボスイッチの、このような明らかな転写の ON/OFF が観測された例はなく、本研究において、転写条件を検討することによって、これが成し遂げられた。

(3) このグリシン-リボスイッチは、外部環境 (溶媒) の違いによって、グリシンの有無に関わらず、転写の振舞いが規定されることを明らかにした。水を基盤とした溶液中では、グリシンによるスイッチ機構が働くが、ポリエチレングリコール (PEG) の存在下 (10wt%程度) では、グリシンの有無に関係なく、転写はストップするということが分かった。これに対し、エチレングリコール (EG) の存在下 (10wt%程度) では、グリシンの有無に関係なく、転写は止まらなくなるということが明らかになった。

(4) (3) の現象の理由に迫るために、グリシン-リボスイッチの部分構造単位に注目した。枯草菌のグリシン-リボスイッチはステムとループから構成されるグリシンアプタマーがタンデムにつながり、さらに、これが仮想的なステム構造を持つ発現プラットフォームに結合した構成を有している。グリシン-リボスイッチから、タンデムなグリシンアプタマー部分を 2 つとも欠失させた鑄型を調製し、T7RNA ポリメラーゼによる転写を試みたところ、グリシンの有無に関係なく、転写がリボスイッチ部分を超えて進むことが判明した。また、この構造体は、完全長のグリシン-リボスイッチの場合と同様に、ポリエチレングリコール (PEG) の存在下 (10wt%程度) では、グリシンの存在に無関係に、転写はストップし、エチレングリコール (EG) の存在下 (10wt%程度) では、転写は止まらなくなるということが明らかになった。これらの事実から、グリシン-リボスイッチの ON/OFF の

切り替えの本質は、仮想的なステム構造を持つ発現プラットフォームの存在形態に依存する可能性が示唆された。

(5) 発現プラットフォーム領域が、ポリエチレングリコール (PEG)、あるいは、エチレングリコール (EG) の存在によって、どのような構造変化をするのか、また、それらが、T7RNAポリメラーゼによる転写活性と、どのような関係があるのかを明らかにするために、仮想的なステム構造部分に絞った。この仮想的なステム構造には、2箇所のバルジアウトした部分が見られるが、このバルジのないものも同時に調製し、融解温度 (T_m) の測定を行った。天然型の仮想的ステムの水溶液中での T_m は 52.5°C、バルジなしの仮想的ステムの水溶液中の T_m は 61.5°C であった。これらに、ポリエチレングリコール (PEG)、あるいは、エチレングリコール (EG) を加えたところ、前者では、 T_m が上昇し、後者では T_m が下降することが分かった (図2)。

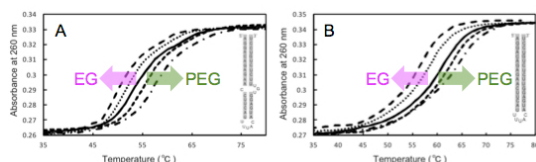


図2 PEGとEGが T_m に与える効果

(6) 天然型の仮想的ステムの 5' 末端にフルオレセインを、3' 末端にダブルシルを結合させ、490 nm の光によって、フルオレセインを励起させ、FRET 現象の観測を試みた。その結果、水溶液中に比べ、ポリエチレングリコール (PEG) 中では、蛍光強度が低下し、エチレングリコール (EG) 中では、蛍光強度が上昇した。

(7) (5)、(6)の結果は、発現プラットフォーム上の仮想的ステム構造が、ポリエチレングリコール (PEG) 中においては堅く (よりステム構造が取り易く) なり、エチレングリコール (EG) 中においては柔らかく (ステムが構造変化をしやすく) なることを示している。仮想的ステム構造を堅くすることで、RNA ポリメラーゼの対するターミネータとして機能し、転写をストップさせるのに対し、仮想的ステム構造を柔らかくすることで、RNA ポリメラーゼによる転写を促進させることを、矛盾なく説明できることが分かった。

(8) これらの結果は、グリシン-リボスイッチが、最初からそのような構造形態を有していた訳ではなく、まず、アプタマー部位の有無とは無関係に、スイッチの ON/OFF が発現プラットフォームのターミネータ構造の存在形態によって変調することを示している。リボスイッチの形成において、ターミネータ構造を含む共通プラットフォームが先に生み出され、そこに、アロステシティーや多様なア

プタマー部分が付け加わったというような、新たな見方を提示することができた。

(9) 現在の tRNA は L 字型の構造を有しているが、「ミニヘリックス」と呼ばれる片方の腕に相当する部分が先にでき、その後、アンチコドンを含むもう片方の腕に相当する部分が付け加わったものと考えられている。リボスイッチの発見は、天然の RNA アプタマーの発見という、ドラマティックな事象であるが、リボスイッチの形成において、ターミネータ構造を含む共通プラットフォームが先に生み出され、そこに、アロステシティーや多様なアプタマー部分が付け加わったというような、tRNA の進化と類似した見方をすることができる (図3)。また、エチレングリコール (EG) は隕石中にも検出されており、本研究が、RNA の進化と、今後のアストロバイオロジー研究へ寄与する可能性も考えられる。

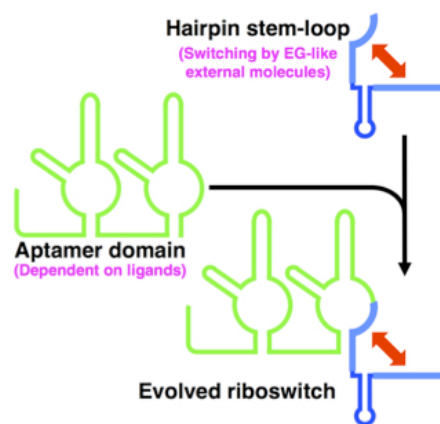


図3 リボスイッチの進化

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5件)

- ① Tamura, K. RNA evolution conjectured from tRNA and riboswitches, Hypothesis, 査読有, 2014, in press.
<http://www.hypothesisjournal.com>
- ② Hamachi, K., Hayashi, H., Shimamura, M., Yamaji, Y., Kaneko, A., Fujisawa, A., Umehara, T. and Tamura, K. Glycols modulate terminator stem stability and ligand-dependency of a glycine riboswitch, BioSystems, 査読有, 2013, 113, 59-65
doi:10.1016/j.biosystems.2013.05.004
- ③ Umehara, T., Kitagawa, T., Nakazawa, Y., Yoshino, H., Nemoto, R. and Tamura, K. RNA tetraplex as a primordial peptide synthesis scaffold, BioSystems, 査読有, 2012, 109, 145-150
doi:10.1016/j.biosystems.2012.03.003
- ④ Tamura, K. Ribosome evolution:

Emergence of peptide synthesis machinery, J. Biosci., 査読有, 2011, 36, 921-928
<http://www.ias.ac.in/jbiosci/dec2011/921.pdf>

- ⑤ Tamura, K. Molecular basis for chiral selection in RNA aminoacylation, Int. J. Mol. Sci., 査読有, 2011, 12, 4745-4757
doi:10.3390/ijms12074745

[学会発表] (計5件)

- ① 浜地 心、榎原琢哉、田村浩二、tRNA とリボスイッチから見た RNA の進化、生命の起原および進化学会第 39 回学術講演会、2014 年 3 月 15 日、広島修道大学
- ② Kokoro Hamachi, Takuya Umehara, Koji Tamura, Domain structures and evolution of tRNA, aminoacyl tRNA synthetases, and riboswitches, AARS2013 2013 9th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 2013 年 10 月 6 日, The Prince Hakone
- ③ Kokoro Hamachi, Takuya Umehara, Koji Tamura, Evolution of riboswitches conjectured from a glycine-independent glycine riboswitch, 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜
- ④ 浜地 心、榎原琢哉、田村浩二、グリコールがグリシンリボスイッチのグリシン依存性を変調する、東京理科大学総合研究機構・RNA 科学総合研究センター公開シンポジウム「RNA world への階梯」、2013 年 7 月 17 日、東京理科大学・葛飾キャンパス
- ⑤ 濱地 心、榎原琢哉、田村浩二、グリシンリボスイッチの発現調節部位と RNA ワールド、生命の起原および進化学会第 38 回学術講演会、2013 年 3 月 15 日、九州大学箱崎キャンパス

[図書] (計1件)

- ① 田村浩二、羊土社、生命分子を統合する RNA—その秘められた役割と制御機構、2013 年、23-29

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://kojitamura.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 浩二 (TAMURA, Koji)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号：30271547

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：