

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440003

研究課題名(和文) 逆転および分断化 tRNA 遺伝子の成立におけるイントロンスプライシング機構の役割

研究課題名(英文) Contribution of tRNA-splicing machinery in development of permuted and intronic tRNA genes.

研究代表者

相馬 亜希子 (Akiko, Soma)

千葉大学・園芸学研究科・助教

研究者番号：70350329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：C. merolaeの核ゲノムには、分断化tRNA遺伝子に加え逆転tRNA 遺伝子が多数存在する。両tRNAの前駆体はBHBモチーフというtRNAイントロンスプライシング酵素が認識部位する高次構造を形成することから、当該酵素によって成熟化し、進化的にも関連性も高いと考えられる。本研究は、C. merolaeの細胞内で、重複する分断化tRNA遺伝子から逆転tRNAが形成されることを実験的に示した。

研究成果の概要(英文)：C. merolae nuclear genome contains number of intronic tRNA genes and circularly permuted tRNA genes. Precursors derived from both tRNA genes contain the BHB motif, which is the primal recognition site for the tRNA-splicing enzyme. Therefore, both tRNAs are considered to be processed by tRNA-splicing machinery and be evolutionarily correlated each other. This study showed that the permuted tRNA can be developed from tandemly repeated intronic tRNA genes in C. merolae cells. We also found that variously disrupted tRNA genes can be expressed in C. merolae cells probably because of the noncanonical tRNA maturation pathway.

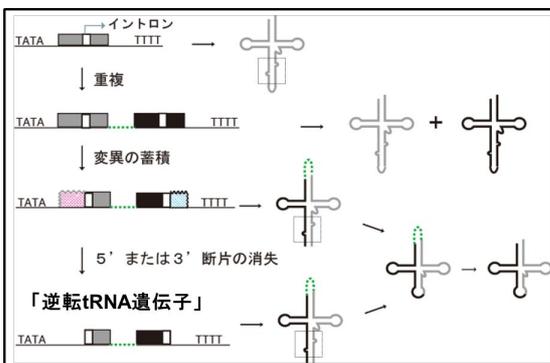
研究分野：分子生物学

キーワード：RNAプロセッシング 翻訳

1. 研究開始当初の背景

Cyanidioschyzon merolae 10D は酸性の温泉という極限環境 (pH2-4, 40-50) に生息する単細胞紅藻であり、葉緑体やミトコンドリアを細胞当たり一つずつしか持たないなど、真核生物としてきわめて単純な細胞構造を有するモデル微生物である。核ゲノムは約 16.4Mbp と非常に小さく、遺伝子の数やコピー数も非常に少ないことから、比較的原始的な特徴を維持しながら、またゲノムを縮小する方向に進化してきたと考えられる。一方、*C. merolae* の核ゲノムには、イントロンによって分断されたシスプライシング tRNA (*cis*-splicing tRNA; intronic tRNA) に加え、逆転構造によって tRNA 遺伝子 (逆転 tRNA ; permuted tRNA) といった特殊な分断構造をもつ tRNA 遺伝子が多数存在する。このように余分な配列を含む tRNA 遺伝子群が *C. merolae* の核ゲノムにコードされる全 tRNA 遺伝子の 75% を占めていることを我々は見出しているが、その生物学的意義と起源は解明されていない。

C. merolae から同定されたシスプライシング tRNA も逆転 tRNA も、その前駆体のプロセシング部位はステム・ループからなる Bulge-Helix-Bulge (BHB) モチーフという特徴的な RNA 構造を形成すると予想される。BHB 構造は tRNA のイントロンスプライシング酵素による主要な認識部位であることから、いずれの tRNA も当該酵素に依存して成熟化すると考えられる。また、両 tRNA 遺伝子は進化的にも関連性が高く、逆転 tRNA は、遺伝子重複によりタンデムに並んだシスプライシング tRNA 遺伝子に由来し、その形成過程には、BHB モチーフを含むイントロン配列とそれを認識するスプライシング酵素が特に重要な役割を果たしたと考えられているが、実験的な証明はなされていない (下図参照)。



2. 研究の目的

C. merolae の特殊かつ多数のシスプライシング tRNA 遺伝子および逆転 tRNA 遺伝子の形成過程とゲノム上での維持にはイントロン配列 (および BHB モチーフ) と tRNA スプライシング機構が寄与したとするモデルの検証を目的として in vivo および in

vitro での実験を行った。また、*C. merolae* の tRNA のプロセシング経路の全容を理解し、どのような分断構造の tRNA 遺伝子の発現 (転写およびプロセシング) が可能かを解析する。tRNA 遺伝子とそのプロセシング酵素群との共進化について考察することで、当該 tRNA 遺伝子群の成立過程とその生物学的意義の解明を試みた。

3. 研究の方法

C. merolae の tRNA プロセシング酵素群の前駆体 tRNA に対する基質認識機構の生化学的解析、および結晶構造解析を行い、tRNA のプロセシング経路の全容を解明するために、大腸菌発現系、および各種無細胞タンパク質合成系を用いて、当該酵素群のリコンビナントタンパク質の調製を試みた。調製したリコンビナントタンパク質と、様々な tRNA の in vitro 転写物を用いて、プロセシングアッセイを行い、各プロセシング酵素の基質特異性を解析した。また、*C. merolae* プロセシング機構の全体像を理解するため、様々な変異体 tRNA 遺伝子を *C. merolae* 細胞に導入し、その発現を、*C. merolae* 細胞から抽出した RNA を用いたノザン法、逆転写 PCR 法およびその産物のシーケンシングにより解析した。導入した変異型 tRNA の各種条件での生育への影響を解析した。以上の結果から、*C. merolae* の tRNA 成熟化機構のどのような特性が、シスプライシング tRNA および逆転 tRNA の形成に具体的にどのように貢献したかを考察した。

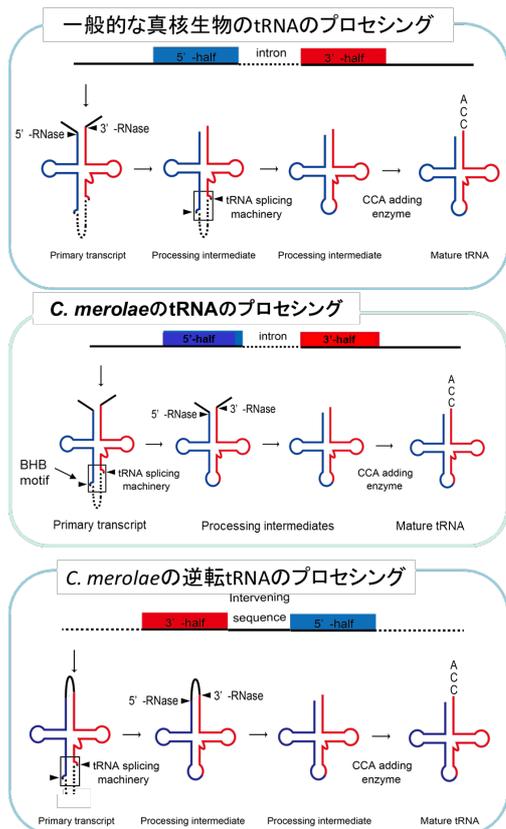
4. 研究成果

tRNA のイントロンスプライシング酵素を含む *C. merolae* の 3 種のプロセシング酵素について、リコンビナントタンパク質の調製を行った結果、2 種類の酵素について調整に成功した。このうち 1 種の酵素のリコンビナントタンパク質を用いて、変異体 tRNA の転写物を基質とした in vitro プロセシング反応を行った結果、直鎖状 RNA しか認識しないという当該酵素の基質特異性が明らかとなった。もう 1 種の酵素タンパク質は触媒活性をまったく示さなかった。そこで、DNA およびアミノ酸配列を再度検討した結果、データベースおよび文献に登録された遺伝子情報が誤りである可能性が高いことが分かった。これについては、他大学研究グループの同分野の RNA 研究者と共同研究を行い、真の該当酵素およびその遺伝子を探索することとなった。残り 1 種の酵素については大腸菌または無細胞系いずれを用いても、活性型のタンパク質が調製できなかった。特に大腸菌細胞内でこの酵素を発現させると、宿主である大腸菌に著しい生育阻害を引き起こしたことから、この酵素が大腸菌にとって毒性が高いことが示唆された。異生物種由来の RNA 切断酵素を発現させたことで、大腸菌細胞内の RNA を非特異的に切断した可能性が考え

られる。本研究課題において、この酵素の結晶構造解析が大きな目標の一つでもあったが、達成できなかった。現在、異なるタンパク質発現系を用いたタンパク質調製方法を進めている。

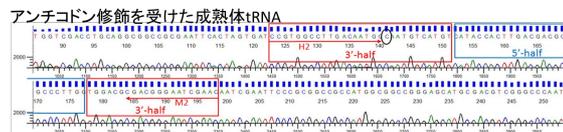
様々な変異体 tRNA 遺伝子を *C. merolae* 細胞に導入し、その発現の有無、プロセシング中間体および成熟体の配列解析を行ったところ、*C. merolae* 細胞内では多様な分断化遺伝子が発現可能であることが分かった。例えば、逆転構造へと変異を導入した tRNA 遺伝子からも、正しくプロセシングを受けた機能的な成熟体 tRNA が形成された。一方で、生育への影響を解析した結果、一部の变異体を導入した *C. merolae* 細胞株で興味深い生育促進がみられた。今後はその分子メカニズムを解析する。

また、*C. merolae* の様々な種々の逆転 tRNA およびシスプライシング tRNA のプロセシング中間体の配列を解析した結果、イントロンや末端配列のプロセシングの順番が明らかとなった。リコンビナントタンパク質が調製不可能だった酵素のプロセシングについて分らなかったことが、細胞を用いた *in vivo* 実験により明らかとなった。一般的に、真核生物の前駆体 tRNA は、イントロン（すなわち BHB モチーフ）よりも先に、5' および 3' 末端がプロセシングされることが分かっている（下図参照）。しかし、本研究の解析結果から、*C. merolae* の前駆体 tRNA は、先にイントロン（すなわち BHB モチーフ）がプロセシングを受け、そのあとに 5' および 3' 末端がプロセシングされることが示された（下図参照）。



つまり、多くの真核生物と *C. merolae* では BHB 構造と 5',3'末端のプロセシングの順番が全く逆であることが分かった。これにより、逆転 tRNA の前駆体はまず BHB モチーフのプロセシングを受けることで環状中間体を形成し、その結果として 2 本のばらばらの RNA 断片とならないため、細胞内で効率的に成熟体 tRNA を形成できるのかもしれない。

本研究ではさらに、タンデムに並んだシスプライシング tRNA 遺伝子およびその変異体を構築し、*C. merolae* 細胞に導入した。それらの遺伝子からの RNA 発現の有無とプロセシング中間体および成熟体のシーケンシング解析の結果、導入されたタンデム tRNA 遺伝子からは、通常のシスプライシング tRNA としての成熟体 tRNA に加え、逆転構造としての tRNA 断片の組み合わせからも成熟体 tRNA が形成され、tRNA としての機能に必須の転写後修飾を受けていることも分かった。（下図参照）。



したがって、*C. merolae* 細胞内では、様々な構造の tRNA 遺伝子が転写され、BHB 構造や末端配列が正しくプロセスされ、さらに転写後修飾を受けて成熟化し、機能的な tRNA 分子が形成可能であることが明らかとなった。このような特徴により、タンデムに並んだシスプライシング tRNA から 2 種類の tRNA が形成可能であると考えられる。この結果は、「逆転 tRNA は、遺伝子重複によりタンデムに並んだシスプライシング tRNA 遺伝子に由来する」というモデル（「1. 研究開始当初の背景」内の図参照）を支持するものである。

以上、本研究結果から、逆転 tRNA の起源の一つはシスプライシング tRNA 遺伝子であり、イントロンの保存配列・構造である BHB モチーフと tRNA イントロンスプライシング酵素によるそのプロセシング機構が重要な役割を果たしたことが示された。特に tRNA イントロンスプライシング酵素を含む *C. merolae* の tRNA プロセシング酵素群の比較的寛容な基質特異性により、さまざまな構造の tRNA 遺伝子から転写された前駆体 tRNA の成熟化が可能となったと考えられる。その結果として、種々の分断化 tRNA 遺伝子の成立とゲノム上での維持が可能となったのだろう。一方、多くの真核生物では BHB 構造よりも先に末端配列がプロセスされるため、逆転 tRNA 遺伝子が形成されたとしても、環状中間体ではなく 2 本の RNA 断片を生じてしまい、核外に輸送された際に分離してしまうために機能的な tRNA 分子が形成できず、その結果、ゲノム上には維持されなかったのだろう。また、酵母の tRNA イントロ

ンスプライシング酵素は BHB 構造以外にも tRNA の L 字型構造を認識するため、複数のイントロンを含む tRNA や逆転 tRNA の前駆体は基質として認識できないために、ゲノム上に維持できなくなったと考えられる。

本研究では *C. merolae* の tRNA イントロン スプライシング酵素の生化学的解析および構造解析が達成できなかった。当該酵素の解析は、*C. merolae* の tRNA 遺伝子の発現位の特殊性および BHB 構造とスプライシング装置を介した tRNA 遺伝子の進化を理解する上で必須である。今後も様々な方法を試行していく予定である。

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、査読有り)

1. Akiko Soma. Circularly permuted tRNA genes; their expression, processing, and development. (2014) *Frontiers in Genetics*, 5:36. eCollection. doi: 10.3389/fgene.2014.00063
2. Akiko Soma*, Junichi Sugahara*, Akinori Onodera, Nozomu Yachie, Akio Kanai, Satoru Watanabe, Hirofumi Yoshikawa, Mio Ohnuma, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa, and Yasuhiko Sekine (*equally contributed). Identification of highly-disrupted tRNAs in nuclear genome of the red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. (2013) *Scientific Reports*, 3, 2321-2329. doi: 10.1038/srep02321
3. 小原美紗子、相馬亜希子、安藤昭一「*Cyanidioschyzon merolae* 10D の permuted tRNA 遺伝子の生物学的意義の解明」第 7 回日本ゲノム微生物学会若手の会要旨集、29-30 頁 (2013)

[学会発表](計 4 件)

1. 相馬亜希子 「tRNA 遺伝子構造の多様性とその進化」The variation and evolution of tRNA gene structure. 第 9 回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2015 年 12 月 4 日、神戸、口頭発表
2. 廣本沙織、東牧恵、小原美紗子、松原瞳、安藤昭一、相馬亜希子 「*Cyanidioschyzon merolae* 10D の permuted tRNA 遺伝子の形成過程の解明」第 9 回ゲノム微生物学会若手の会、2015 年 9 月 29 日、静岡、ショートトーク、ポスター発表
3. 相馬亜希子 「逆転および高度分断化 tRNA 遺伝子の機能解析」第 14 回度極限環境微生物学会年会、2013 年 10 月 26 日、東京、口頭発表
4. 小原美紗子、相馬亜希子、安藤昭一「*Cyanidioschyzon merolae* 10D の permuted tRNA 遺伝子の生物学的意義の解明」第 7 回ゲノム微生物学会若手の

会、2013 年 9 月 19 日、静岡、口頭発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相馬 亜希子 (Soma Akiko)
千葉大学・園芸学研究科・助教
研究者番号：70350329