

研究課題名

RNA プロセッシング過程に関わる複合体群の同定と解析

金井 昭夫

慶應義塾大学環境情報学部・教授/ 同・先端生命科学研究所・教授

1. 研究の背景と目的

21 世紀になって、塩基配列決定のテクノロジーが高度に発展したことにより、多様な生物種でゲノムの全塩基配列が解読された。このことにより、各生物種で、タンパク質をコードする領域のアミノ酸配列が推定され、プロテオーム(遺伝子の集合全体をゲノムと呼ぶのに対して、ある細胞に発現するタンパク質の全集合のこと)の基盤情報として公開されたが、どの生物種においても未だにその 1/3 から半数近くのタンパク質が機能未知であり、システムティックな機能同定法の開発が切望されている。本研究では個々のタンパク質の機能のみに注目するのではなく、その複合体とその構成成分を解析することで、遺伝子制御機構におけるシステムティックな生命現象の理解を目指す。遺伝子の制御に大きく関わるような分子(特定の遺伝子に特化したものではなく、複製、転写、翻訳などのレベルでの制御に関わるもの)は複合体を形成していることが多いと考えられるからである。

特定の現象に対応するようなトランスクリプトーム(ある細胞に発現する転写物の全集合のこと)やプロテオームなどを網羅的に解析していくシステム生物学的なアプローチはここ数年、益々盛んになっているが、真核生物を対象とした場合は原核生物に比べ、遺伝子の数で 10 倍以上の差があり、例えば、2 種のタンパク質の全相互作用等を考えるだけで、大雑把に見積もっても約 100 倍の組み合わせを計算、実験することになる。

ここで、我々が研究対象とするアーキア(古細菌)のピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*)はゲノム全体で約 2,000 のタンパク質をコードするばかりである。さらに、同アーキアは 100 に及ぶ高熱環境で生息していることから、由来するタンパク質が耐熱性を有することより、生化学的な解析に適している。また、これまでの多くのプロテオーム解析は特定の現象に特化した形で行なわれ、本申請研究のように複合体を系統的に分画するような観点では遂行されていない。現在まで、全プロテオームがどのような複合体クラスをもって具体的に存在しているのかについては、断片的な知見しかない。本研究では、同アーキアをモデル系にして、全タンパク質をゲル濾過解析し、その複合体の数を見積もと共に、様々な複合体に対応した「生理的機能」を明らかにするための基盤を構築することを主たる目的に掲げた。

一方、同アーキアにおいて全ての複合体の機能を単一のグループが実験的に検証することは、無理があるので、将来的には遺伝子制御に関する機能研究を、日本の主たる研究グループに割り振り、遂行して行きたい(既に、九州大学、京都大学、新潟大学などの担当者と共同研究を模索している)。本研究では、近年その重要性が益々指摘されているRNAのプロセッシング過程(RNA分子がその機能遂行のために、切断、連結、分解、化学修飾などを受ける過程)に焦点を絞り、上記の実験生物学に加え、情報科学的な解析を併用する形で、研究を遂行した。

2. 研究成果と展望

2-1. *P. furiosus* タンパク質複合体の解析

図は超好熱性アーキア *P. furiosus* 全細胞抽出タンパク質をゲル濾過カラムで分子量に従って分画した後、そのフラクションを(A)変性条件及び (B)非変性条件で電気泳動したものである。変性条件では、フラクションは大まかには、分子量の大きさ順にタンパク質が溶出されているが、どのフラクションもいろいろな大きさのタンパク質を含んでいる。一方で、非変性条件ではゲル濾過カラムのサイズマーカーと良く呼応する複合体が検出されている。小さな分子が集合することで、ゲル濾過のマーカーに対応する複合体を作り上げていると考えられる。前述のように、同アーキアゲノムは約 2,000 種のタンパク質をコードするが、全細胞抽出液中には、予備的なプロテオーム解析から 1,000 ~ 1,500 種のタンパク質が同定され则认为している。本研究の結果、非変性条件において、電気泳動上で確認出来る主な複合体バンドは約 50 種であることが明らかとなった。この 50 種の複合体に対して、将来的に様々な遺伝子制御に関わ

る活性(DNA 複製や修復、転写、RNA プロセッシング、翻訳、核酸の分解や品質管理)とシステムティックに対応をつけていきたい。

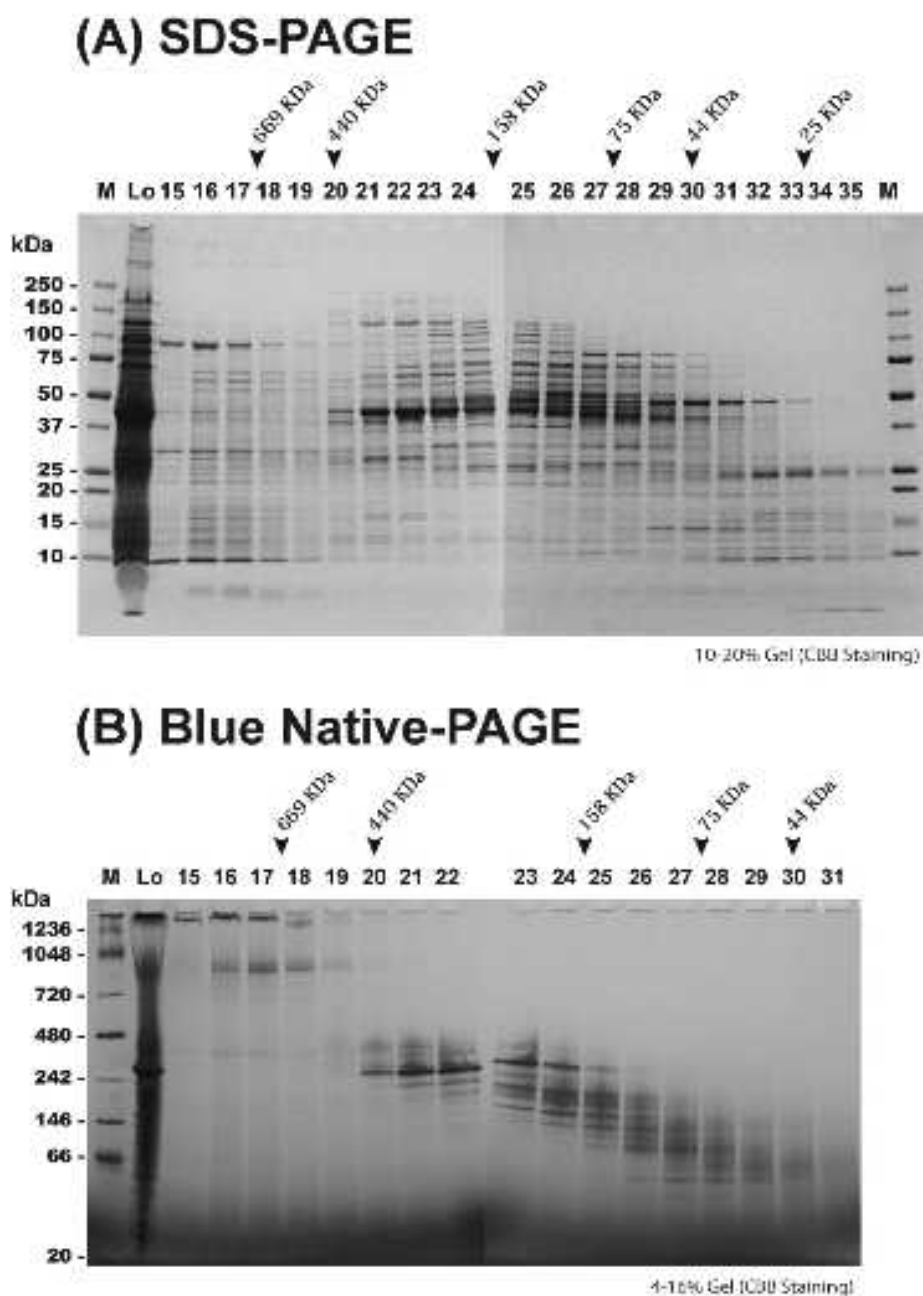


図 超好熱性アーキア *P. furiosus* 全細胞抽出タンパク質のゲル濾過解析。(A)変性条件 (SDS 存在下)での電気泳動図。(B)非変性条件 (Native 条件)での電気泳動。

さて、ゲル濾過にて分画した数フラクションを選び、Nano-LC-MS/MS にて、その中に

存在するタンパク質の同定を試みた。その結果、例えば、約 500 kDa の複合体に対応するフラクションには、DNA ポリメラーゼ、DNA ヘリカーゼ、GINS などの DNA 複製関連タンパク質と共に、数多くの機能未知タンパク質が検出された。これは、複合体を解析することで、その複合体に存在する機能未知タンパク質の機能を推定していける可能性を示唆している。現状では、ゲル濾過のフラクションをそのままプロテオーム解析の対象としているが、将来的には、非変性条件の電気泳動で得られた複合体のバンドと、それを構成するタンパク質との対応をつけていくことが必要である。

また、前駆体 rRNA (16S-23S rRNA) をプローブに用いて、ゲル濾過で分画したフラクションとともにインキュベートすることで、本 RNA 前駆体をプロセスする活性と、分解する活性を検出することに成功した。これらの活性は、別々のフラクションにピークをもって現れた。特に 16S rRNA へのプロセッシングを担うと考えられる活性は、700 kDa 以上の巨大な複合体に存在していることが示唆され、その分子同定が急がれる。

さらに、これまでに研究蓄積のある tRNA プロセッシングに関わる、様々な因子 (tRNA リガーゼ、tRNA リガーゼ C 末端特異的プロテアーゼ、RNA 5'リン酸化酵素等) について、上記のゲル濾過分画に対しウエスタン解析や、生化学的な活性を検出することで、これらのタンパク質が複合体を形成している可能性を示唆した。その詳細については、今後の解析が必要である。

2-2. 原核生物の RNA 及び RNA 関連タンパク質に関する情報科学的な解析

前述の実験科学的な解析と平行しながら、情報科学的に原核生物の RNA や RNA 関連タンパク質をシステムティックに解析していくための基礎的な解析をおこなった。具体的には、(a) ゲノム情報が既知なアーキア 146 種を用いて、rRNA 遺伝子クラスターを対象に、クラスターを形成する rRNA の種類、ゲノム上の位置関係等を解析した。その結果、進化過程における、rRNA のクラスター化や、その倍化現象を明らかにした (小林ら、未発表)。(b) RNA のプロセッシング過程に深く関わる Ribonuclease (RNA 分解酵素) に関して、これもバクテリアやアーキアの約 250 種のゲノム情報から、同酵素に保存されている配列を抽出し、それが新規 Ribonuclease を予測するための識別配列となるかを検討した (今井ら、未発表)。さらに、(c) 大腸菌で見出された機能性の低分子 RNA (sRNA) が進化的にどのように保存されているのかを解析した。この際、ゲノムのシntenニー情報を活用することで、保存性の低い sRNA を効率よく、

検出できることを見出した(牧野ら、未発表)。

2-3. 展望

本研究を推進していけば、生命を司る物質が分子単体の集合(ここでは、全 2,000 種)という概念から、より階層的に一段高いグループ(メジャーなもので約 50 グループ)の集合体として解釈される。

複合体の内実に関しては、今回に研究対象とした RNA プロセッシングに関わるものから、同様の手法を用いて、少なくとも DNA 複製、修復、転写、翻訳などの理解の基盤を因子の集合体として提供することになりえる。

また、本研究は基礎生物学のみならず、将来的に新規の機能を有した有用微生物の創生や合成生物学的研究において、必須の知見を提供するものになりえる。

3. 本研究と関連した成果の発表

3-1. 学術論文

Kanai, A. (2013) Molecular evolution of disrupted transfer RNA genes and their introns in archaea. in “*Evolutionary Biology: Exobiology and Evolutionary Mechanisms*” Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. pp. 181-193.

Soma, A., Sugahara, J., Onodera, A., Yachie, N., Kanai, A., Watanabe, S., Yoshikawa, H., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Sekine, Y. (2013) Identification of highly-disrupted tRNA genes in nuclear genome of the red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Scientific Reports* 3: 2321.

3-2. 学会、シンポジウム発表等

金井昭夫 (2013) アーキアにおける tRNA 遺伝子の多様性と進化 シンポジウム 4SY21 アーキア研究から見える遺伝情報伝達系の保存性と多様性 日本農芸化学会 2013 年度大会 仙台 口頭発表、招待講演

平田 章、藤島皓介、山上龍太、河村卓哉、Jillina F. Banfield、金井昭夫、堀弘幸 (2013)極小アーキア(古細菌)における4番目のタイプtRNAスプライシング エンドヌクレアーゼの X 線結晶構造 第 13 回日本蛋白質科学会年会 鳥取

A. Sato, T. Masuda, M. Tomita, T. Itoh and A. Kanai (2013) A Protease that Cleaves the C-terminal Domain of the RtcB-type RNA Ligase in the

Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. RNA2013: The 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland.

Y. Ikeda, A. Sato, M. Tomita, A. Kanai (2013) Biochemical Characterization of Archaeal RNase E-like Protein, FAU-1 in *Pyrococcus furiosus*. RNA2013: The 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland.

A. Hirata, K. Fujishima, R. Yamagami, T. Kawamura, JF. Banfield, A. Kanai and H. Hori (2013) X-ray crystal structure of the fourth type of tRNA splicing endonuclease from an uncultivated archaeon Candidatus Micrarchaeum acidiphilum (ARMAN-2). Thermophiles 2013, 12th International Meeting at the University of Regensburg, Regensburg, Germany.

佐藤朝子、増田豪、富田勝、伊藤隆、金井昭夫 (2013) RtcB RNA リガーゼの C 末端領域を特異的に切断する超好熱性アーキア由来のプロテアーゼ 第 15 回日本 RNA 学会年会 愛媛 口頭発表

平田章、長野倫子、石丸雄基、金井保、鈴木健夫、佐藤朝子、金井昭夫、鈴木勉、堀弘幸 (2013) 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 2'-5' RNA リガーゼの機能解析 第 15 回日本 RNA 学会年会 愛媛

牧野岳都、池田幸樹、松井求、富田勝、金井昭夫 (2013) シンテニー情報を利用したバクテリア small RNA 相同配列の解析とその進化的な考察 RNA Frontier Meeting 2013 静岡 口頭発表

佐藤朝子、増田豪、富田勝、伊藤隆、金井昭夫 (2013) 超好熱性アーキア由来プロテアーゼによる RtcB RNA リガーゼの活性制御 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸

小林朝紀、浜島聖文、富田勝、金井昭夫 (2013) アーキアにおける rRNA 遺伝子クラスター進化の情報生物学的解析 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸

池田幸樹、岡田安弘、佐藤朝子、金井保、富田勝、跡見晴幸、金井昭夫 (2013) Archaea における RNase E 様タンパク質 FAU-1 の生化学的及び分子生物学的解析 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸

今井淳之介、松井求、池田幸樹、富田勝、金井昭夫 (2013) RNase DiCE : 新規リボヌクレアーゼ予測のための進化的に保存された識別配列 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸

牧野岳都、池田幸樹、松井求、富田勝、金井昭夫 (2013) シンテニー情報を利用したバクテリア small RNA の進化解析 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸

野呂絵美子、高井幸、富田勝、中東憲治、金井昭夫 (2013) 大腸菌の増殖を抑制する人工低分子 RNA の同定と解析 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸

3-3. 本研究と関連したワークショップ、研究費の申請

2013 年 12 月 4 日 第 36 回日本分子生物学会年会(神戸)に於いて、ワークショップ「セントラルドグマの基盤をなす古典的 non-coding RNA の新展開」を宮崎大学の剣持直哉教授と共にオーガナイズした。

本研究を基盤に、九州大学、京都大学、新潟大学の各教授と共に、平成 26 年度の科学研究費補助金、基盤研究 A 及び S の申請を行なった。

4. 謝辞

P. furiosus の大量培養に関して、理化学研究所、伊藤 隆 博士にお世話になりました。また、プロテオーム解析(Nano-LC-MS/MS 解析)は、慶應義塾大学先端生命科学研究所、増田 豪 博士(現 ハーバード大学)、森 大 博士にご協力頂きました。*P. furiosus* の全タンパク質の分画や RNA プロセシング活性の解析は佐藤(曾我)朝子さんによって行なわれました。最後になりましたが、慶應義塾大学先端生命科学研究所 RNA 研究グループの皆様には、有意義な議論や具体的なデータを通して本研究を支えて頂きました。ここに、感謝いたします。