

研究課題名

tRNA スプライシングを補完する因子の同定と進化

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

tRNA は 70-100 塩基程度の小さい RNA 分子であるが、特定のアミノ酸と結合し、mRNA に内在された遺伝暗号を蛋白質に変換するステップにおいて極めて根源的な役割を担う。また、酵母菌の tRNA 前駆体のスプライシングが、DNA の損傷と細胞周期におけるチェックポイントとリンクしているとの報告がなされたり (Ghavidel ら *Cell* 2007)、分断化された tRNA エキシソンの連結に必要な RNA キナーゼであるヒト Clp1 酵素の変異が、運動ニューロンの欠損につながる重篤な遺伝病と関連する(Hanada ら *Nature* 2013; Karaca ら *Cell* 2014)との報告がなされている。すなわち、tRNA 前駆体のプロセッシングは tRNA そのものを生成することに加えて、より高次の機能や疾病とカップルしていることが類推される。

さらに、近年、様々な形状で分断された tRNA 遺伝子が発見された。まず、米エール大の Dieter Söll 教授らの研究グループが、寄生性のナノアーキアでは tRNA 遺伝子がゲノム上の異なる領域に断片としてコードされていることを見出し、これを Split tRNA と名付けた (Randau ら *Nature* 2005)。我々のグループは、原始的な真核生物であるシゾンや、緑藻のゲノムにおいて、tRNA の前半部と後半部が入れ替わってコードされている tRNA 遺伝子を見出し、これを Permuted tRNA と命名した (Soma ら *Science* 2007; Maruyama ら *Mol. Biol. Evol.* 2010)。さらにアーキアにおいて 3 つに分断された tRNA 遺伝子 (Fujishima ら *PNAS* 2009) やイントロンを複数もつ tRNA 遺伝子 (Sugahara ら *Mol. Biol. Evol.* 2008)を見出している。米カルフォルニア大の Todd Lowe 博士のグループは、アーキアにおいても Permuted tRNA の存在を報告した (Chan ら *Genome Biology* 2011)。我々の研究グループを含め、以上の 3 つのグループが新しい形状の tRNA

研究で世界をリードして来たと思われる。また、これらの分断型 tRNA 遺伝子が機能を有するためにも、tRNA プロセシングの正確な理解が必須になる。

さて、tRNA スプライシングは大きく二つの過程で遂行される。一つは tRNA 前駆体上のイントロンを切り出す過程であり。もう一つが分断された tRNA 断片を連結する過程である。ここで、前者の過程を tRNA スプライシング エンドヌクレアーゼが、後者の過程を、tRNA リガーゼを主とした酵素群が遂行することになる。我々は約 5 年をかけて、超好熱性アーキアであるパイロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) をモデル系に tRNA プロセシングに関与すると考えられる因子を大腸菌での組換え体として収集、解析し、様々な試験管内の再構成系を構築してきた。本研究の目的は、これまでに構築してきた試験管内反応系を駆使しながら、最終的には、tRNA 前駆体イントロンの切断から、エキソンの連結までを効率良く行うに必要な因子の探索と同定を行うことである。また、その結果として世界で最初の例となる効率の良い試験管内プロセシング系を提供できることになる。

2. 研究成果

2-1. 試験管内 tRNA スプライシング系の開発

ヒト及びアーキアでは、tRNA イントロンの除去は、tRNA スプライシング エンドヌクレアーゼにより、比較的シンプルなメカニズムで遂行されることが分かっているが、イントロンが除去された tRNA 断片の連結には、反応機構が全く異なる少なくとも 2 つの独立した過程が示唆されている (Yoshihisa ら *Frontiers in Genetics* 2014)。一つは 2011 年にヒト及びアーキアで報告された RtcB 型の酵素による経路であり (Popow ら *Science* 2011; Englert ら *PNAS* 2011)、もう一つはその全体像は不明ながら tRNA 断片の 5' 末端をリン酸化する酵素である Clp1 に依存した経路である (Weitzer ら *Nature* 2007)。本研究では RtcB 型の酵素によって遂行される経路に関して、tRNA 前駆体のイントロンを切断してから、断片化された tRNA エキソンを連結するまでの試験管内再構成系の構築を行った。

すなわち、アンチコドン部分にイントロンを一つ有する tRNA^{Met}(CAU) 前駆体を用いて、下記 (a)~(c) の 3 種の組換え体酵素と、Mn イオン及び GTP 存在下にインキュベート (70°C、30 分) した。

<< 用いた 3 種の酵素 >>

- (a) *Pf-EndA* (PF0266 タンパク質) : tRNA スプライシングエンドヌクラーゼ
- (b) *Pf-RtcB* (PF1615 タンパク質) : tRNA リガーゼ
- (c) *Pf-Archease* (PF1552 タンパク質) : tRNA リガーゼ活性化タンパク質

まず、tRNA スプライシングエンドヌクラーゼである *Pf-EndA* により、前駆体 tRNA は同じ長さのエキソン 2 つと、イントロン 1 つに分断された。ここに tRNA リガーゼである *Pf-RtcB* とその促進因子である *Pf-Archease* が作用した結果、イントロンは効率よく環状化される一方で、分断化されたエキソンはごく僅かしか連結されなかった。tRNA のエキソン断片のみをアニールさせ、50°C で *Pf-Archease* 存在下に *Pf-RtcB* で反応させると、多くの tRNA エキソンが連結することを確かめているので、高温下 (70°C) での tRNA エキシソンの連結には、いまだ同定されていない (おそらくは、tRNA 断片間のハイブリッドを安定させるような) 新規の因子が必要であることが示唆された。

2-2. 試験管内 tRNA スプライシングを補完する因子の探索

2-1 で構築した試験管内アッセイ系に、既知の因子の組換え体や部分精製したパイロコッカスの抽出液を加えることで tRNA スプライシングを補完する因子の探索を試みた。その結果、以下の知見を得た。

(i) ヒトにおいて、tRNA スプライシングエンドヌクラーゼと tRNA 前駆体との結合を安定化すると報告されている Clp1 であるが、パイロコッカスの Clp1 ホモログである *Pf-Clp1* は、本試験管内アッセイ系に関して、なんらの効果をもたらさないか、むしろ阻害的に働いた。

(ii) tRNA の 54 番目のウラシルをメチル化する酵素と知られるメチル基転移酵素が tRNA スプライシングエンドヌクラーゼの活性を促進することを見出した。この促進には、メチル基転移酵素の基質である AdoMet の依存性がなかったことより、メチル基転移酵素が tRNA 前駆体に結合することが、tRNA 前駆体の構造を安定化させ、イントロンの除去を促進している可能性が考えられた。一方で、本促進反応が生体内で実際に起きている保証は得られていない。

(iii) 部分精製したパイロコッカスの抽出液には上記(a)~(c)と異なる、分断化された tRNA エキシソンの連結を高温下(70°C)で促進する活性が存在することが明らかとなったが、分子同定にまでは至らなかった。

3. 本研究と関連した成果の発表

3-1. 学術論文、総説等

1. 金井昭夫 (2016) ncRNA の種特異性と進化 (DOJIN BIOSCIENCE シリーズ ノンコーディング RNA --- RNA 分子の全体像を俯瞰する 廣瀬哲郎・泊幸秀 共編) pp. 156-166 化学同人
2. 金井昭夫 (2017) アーキアの non-coding RNA (アーキア生物学 石野良純・跡見晴幸 共編) 共立出版 印刷中
3. Sato, A., Mori, M., Masuda, T., Itoh, T. and Kanai, A. Pyrolysin specifically cleaves RtcB RNA ligase, repressing its tRNA ligation activity. 投稿中
4. Tamaki, S., Tomita, M., Suzuki, H. and Kanai, A. Systematic analysis of the binding surfaces between tRNAs and their respective aminoacyl-tRNA synthetases based on the structural data. 投稿中

3-2. 学会、シンポジウム発表等

1. 金井昭夫 (2016) tRNA 遺伝子の進化と遺伝子制御系に関する一考察 新学術領域研究「冥王代生命学の創成」ワークショップ 東京 口頭発表 招待講演
2. A. Sato, M. Mori and A. Kanai (2016) Characterization of archaeal pre-tRNA splicing using purified heat-stable recombinant proteins. RNA2016: The 21th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan.
3. J. Imai, A. Sato, E. Noro, M. Tomita and A. Kanai (2016) Cooperative regulation of pre-16rRNA processing by archaeal proteins, *Pf-Nob1* and *Pf-Dim2*. RNA2016: The 21th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan.
4. 金井昭夫 (2016) RNA 分子とその進化に関わる幾つかの事象と遺伝暗号について シンポジウム「RNA と進化」日本進化学会 第 18 回大会 東京 口頭発表 招待講演
5. A. Kanai (2016) tRNA gene diversity in Archaea and expansion of non-canonical V-arm-containing tRNAs in Eukaryotes. tRNA 26th conference, Jeju, Korea. 口頭

発表 招待講演

6. 金井昭夫 (2016) 実験生物学者は生命情報科学者に何を求めるだろうか？
第5回生命医薬情報学連合大会 東京 口頭発表 招待講演
7. 金井昭夫 (2016) セントラルドグマの新しい様相とその進化解析について
第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「RNA研究から再考する遺伝情報のセントラルドグマ」横浜 口頭発表
8. 佐藤朝子、森大、金井昭夫 (2016) 超好熱性アーキアの組換え体タンパク質を用いた前駆体 tRNA スプライシング再構成系の構築とその性状解析 第39回日本分子生物学会年会 横浜
9. 齋藤元文、富田勝、鈴木治夫、金井昭夫 (2016) tRNA 前駆体のプロセシングに関わる Clp1 キナーゼ及び関連因子の分子進化解析 第39回日本分子生物学会年会 横浜
10. 玉木聡志、富田勝、金井昭夫 (2016) tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素複合体における結合領域の性状及び進化解析 第39回日本分子生物学会年会 横浜
11. 今井淳之介、佐藤朝子、野呂絵美子、富田勝、金井昭夫 (2016) 超好熱性アーキア由来 *Pf-Nob1* 及び *Pf-Dim2* による 16S rRNA 前駆体の協調的プロセシング制御 第39回日本分子生物学会年会 横浜
12. 金井昭夫 (2016) アーキア及び真核生物における変則型 tRNA 遺伝子の発見とその進化 首都大学東京「第14回教室セミナー」東京 口頭発表 招待講演
13. 金井昭夫 (2017) アーキア及び真核生物における変則型 tRNA 遺伝子の発見とその進化 九州大学大学院 生物資源環境科学府 生命機能科学専攻 「生物機能分子化学セミナー」福岡 口頭発表 招待講演
14. 今井淳之介、佐藤朝子、野呂絵美子、金井昭夫 (2017) 超好熱性アーキア由来 *Pf-Nob1* 及び *Pf-Dim2* による 16S rRNA 前駆体切断部位の制御 第11回日本ゲノム微生物学会年会 藤沢 神奈川 口頭発表

3-3. 本研究と関連したワークショップ、研究費の採択

1. 2016年12月2日 第39回日本分子生物学会年会（横浜）に於いて、シンポジウム「RNA研究から再考する遺伝情報のセントラルドグマ」を兵庫県立大学の吉久 徹 教授と共にオーガナイズした。

2. 本研究内容の一部を基軸として、新学術領域研究（研究領域提案型）冥王代生命学の創成（A02 班：冥王代化学進化（代表 H. Cleaves 博士））に、2016 年秋より遺伝暗号系の進化に関する研究が採択された。

4. 謝辞

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取得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。