



## Tri-split tRNA：超好酸好熱性アーキアから発見された三つの遺伝子に分断された tRNA

### 1. はじめに

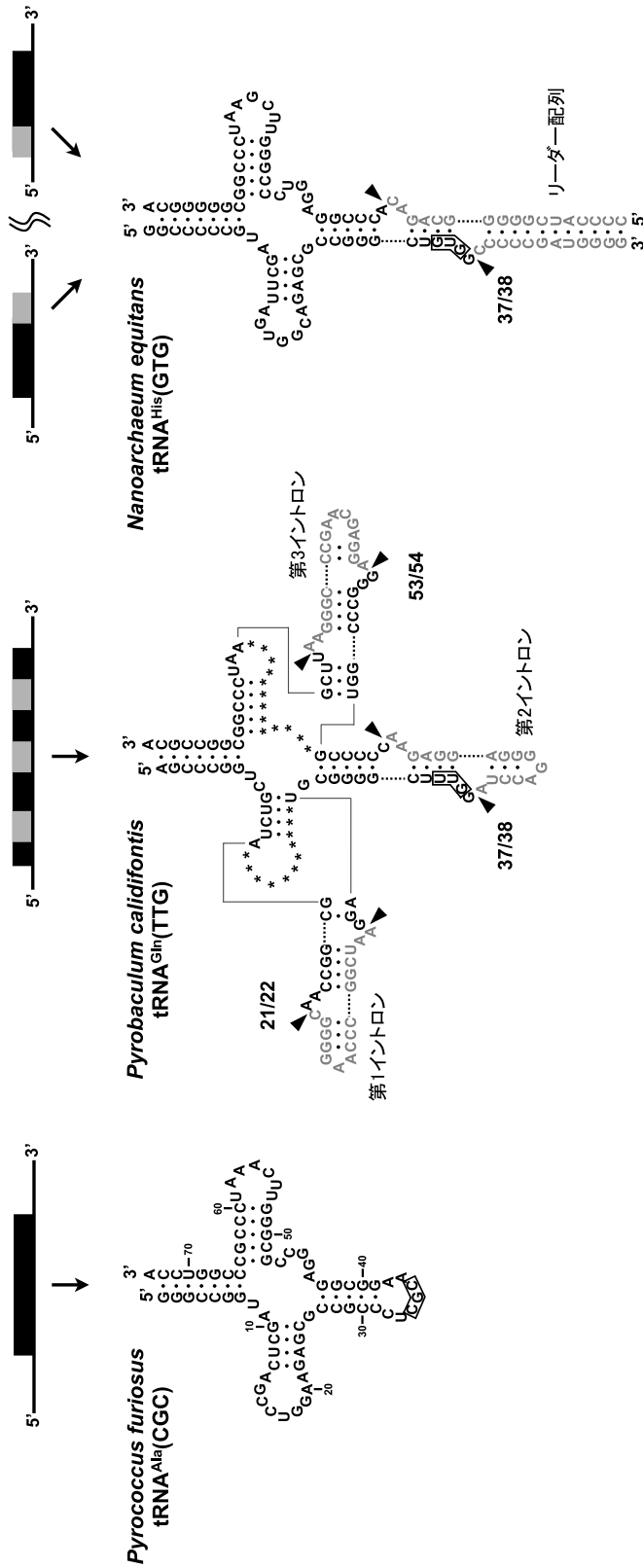
転移 RNA (tRNA) は約 70 塩基の小さな RNA で、遺伝情報発現の流れであるセントラルドグマにおいて (特にタンパク質の翻訳過程において)、その制御系の基軸となる重要な分子である。すなわち、生物界の三つのドメインである細菌、アーキア (古細菌) 及び真核生物に属する全ての生命体が普遍的に有している因子の一つになっている。従って、tRNA の成り立ちを研究することは、遺伝情報発現系の原型、ひいてはその進化を考える上で避けては通れない研究であると考えられる。進化的に生命の起源に近い生物種の一つと考えられ、遺伝子発現系においても原始的な分子機構を有すると想定されているアーキアにおいて、最近、極めてユニークな tRNA 遺伝子が相次いで発見された。例えば、寄生性のナノアーキア *Nanoarchaeum equitans* において、一つの tRNA がゲノム上の 2 箇所の領域に、それぞれ 5'断片、3'断片として半分ずつコードされている事象が報告され、split tRNA と名付けられた<sup>1)</sup>。また、筆者らのグループでは最大で三つのイントロン配列を含むようなイントロン介在型 tRNA 遺伝子をサーモプロテウス目に属するアーキア群から数多く同定した (図 1)<sup>2)</sup>。さらに、本稿では世界初の例となる三つの断片に分断された tRNA 分子の発見に関してその最新情報をまとめた。

### 2. 超好熱好酸性アーキア *Caldivirga maquilingsis* と新しい split tRNA

21 世紀になってからも数多くの生物種でゲノム解析が行われ、アーキアにおいても 2008 年時点で約 60 種の完全ゲノム配列情報がデータベースから利用できた。にもか

わらず、非常に不思議なことであるが、tRNA のような良く調べられている分子についても、アーキアゲノムにおいては全ての分子を同定するのは困難であった<sup>3)</sup>。今から考えるとその理由は、アーキアの tRNA では、分子の中に複数のイントロンが挿入されていたり、遺伝子が独立した別の遺伝子に分断されていたりして見つけようがなかったからである。ここで、筆者らは 2008 年春に公開された超好酸好熱性のアーキア *Caldivirga maquilingsis* のゲノムに着目した。公開されたゲノムでは六つの tRNA 遺伝子 (アンチコドンがグリシンに対応するものが三つ (CCC/TCC/GCC)、アラニンに対応するものが二つ (CGC/TGC)、そしてグルタミン酸に対応するものが一つ (TTC)) が未発見であったからである。*C. maquilingsis* は 1999 年、理化学研究所の伊藤 隆博士らによってフィリピンのマキリン山に湧く高温酸性の泥温泉から単離された棒状のアーキアで、その生育における至適温度が 85℃、至適 pH が 3.7-4.2 と報告されている<sup>4)</sup>。また tRNA を用いた系統解析から、このアーキアは、サーモプロテウス目に属し、その中でも進化的に深い位置で分岐することが明らかとなっていた。サーモプロテウス目がイントロン介在型 tRNA を非常に多く有するユニークな系統であることから、未知のタイプの tRNA 遺伝子の発見に期待が高まった。

一方、それまでに我々は、未知の tRNA 遺伝子の同定を目的として、tRNA 予測ソフトウェア SPLITS を開発していた<sup>5)</sup>。SPLITS はあらかじめ tRNA のイントロンとなるような領域を推定し、その配列をゲノムから取り除くことで正確に tRNA 領域を予測できる。実際、数多くのイントロン介在型 tRNA の発見に寄与しており、本ソフトウェアを活用することで、アーキアゲノムで未知であった tRNA の数は激減した<sup>6)</sup>。また、SPLITS は異なる 2 箇所のゲノム領域を入力することで split tRNA の探索も可能である。解析の結果、*C. maquilingsis* のゲノム中には、この未発見の六つの tRNA に対応するようなイントロン介在型 tRNA 遺伝子は一つも見つからず、そのかわり tRNA の 5'側と 3'側に対応する tRNA 断片をコードする遺伝子を七つ同定することができた。またリーダー配列 (split tRNA 同士をハイブリダイズさせるための配列) の相補性解析から、これらの tRNA 断片をコードする遺伝子は計四つの split tRNA (グリシン (CCC)、アラニン (CGC/TGC)、グルタミン酸 (TTC)) に対応することが予測された (図 2A)。特にアラニンに対応する 2 種の split tRNA に関しては 5'断片に相当する遺伝子が一つしかなく、逆に 3'側に対応する遺伝子は二つ存在することから、3'側の tRNA 断片を差し替え



通常型  
イントロン介在型 (最大三つのイントロンを含む)  
split型

図1 アーキアでこれまでに知られている tRNA 遺伝子のタイプ (型)  
 アーキアで現在確認されている三つのタイプの tRNA 遺伝子の模式図と、発現する tRNA (tRNA 前駆体) の二次構造を示す。遺伝子の図ではエキソンを黒、それ以外の配列を灰色で示してある。通常型はアーキアだけでなくバクテリアや真核生物でも普遍的に見られる tRNA 遺伝子のタイプである。イントロン介在型は 1-3 個のイントロン配列を含む tRNA 遺伝子で、クレンアーキオータ門ではその割合が高くなっている。split 型は寄生性のナノアーキアで発見され、tRNA の 5'側半分と 3'側半分の二つの断片がそれぞれ異なる遺伝子にコードされている。通常型 tRNA 上に 10 塩基ごとのホジションを数字で示す。イントロン介在型及び split 型 tRNA 前駆体のプロセシングの異なる RNA 二次構造であるバルジ-ヘリックス-バルジ (BHB) 構造の切断位置を黒矢印にて示す。

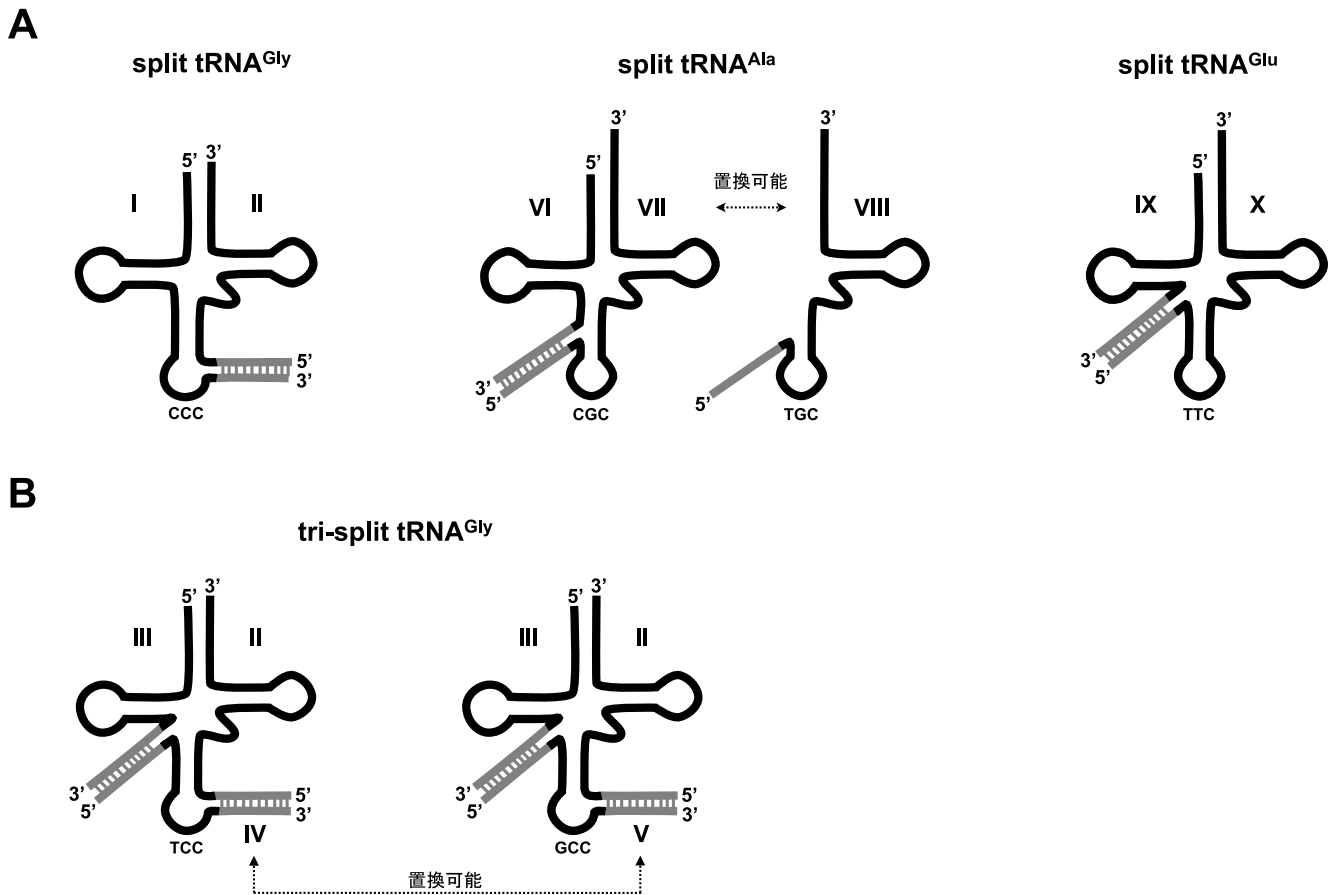


図2 *C. maquilingensis* において発見された split 及び tri-split tRNA

超好熱好酸性古細菌 *C. maquilingensis* 由来の(A) split tRNA と(B) tri-split tRNA の模式図。I-X は異なる遺伝子から転写された tRNA の断片 (10 種類) を示す。この組み合わせにより合計 6 種類の成熟 tRNA が創成される。

ること異なるアンチコドン有する tRNA<sup>Ala</sup> 分子を合成していることが示唆された。従来の *N. equitans* における split tRNA についても同様に tRNA 断片を共有する現象が確認されているが<sup>1)</sup>、これはすなわちオルタナティブなトランススプライシングということになる。他方、従来の split tRNA の断片化がすべてアンチコドンループ内で生じていたのに対し *C. maquilingensis* では tRNA の塩基ポジションの 25/26 あるいは 29/30 のように、5' 側の途中の領域で断片化していた。重要なこととして後述するが、これらのポジションは、近縁のサーモプロテウス目の tRNA 遺伝子においてイントロンが頻繁に見受けられるポジションと一致していた<sup>2)</sup>。

### 3. 三つの遺伝子に分断された tri-split tRNA の発見

この段階で残る二つのグリシン (TCC/GCC) に対応す

る tRNA は依然見つけることができなかった。そこで、我々は近縁のサーモプロテウス目のグリシンに対応する tRNA 配列をクエリーとしてゲノムから類似配列を網羅的に探しだすことにした。その結果、tRNA<sup>Gly</sup> の前半 1/3 だけにマッチする遺伝子領域が見つかった (図 2B, tRNA 断片 III)。この領域の上流には他の tRNA と共通するプロモーター配列があり、単独の遺伝子として tRNA の 1/3 をコードする断片を転写していることが示唆された。ということは、未発見のグリシンに対応する tRNA は、実は二つではなく三つ (以上) の断片からなる新型の split tRNA であると考えられた。前述したように split tRNA は断片同士が細胞内で互いに出会い結合するためのリーダー配列と呼ばれる相補性の高い配列をエクソンの末端に有することが知られている。そこで tRNA の前半部 1/3 の後ろに続く配列をリーダー配列と仮定し、相補性を示す領域をさらにゲ

ノムから探すことを試みた結果、未発見だったグリシンの二つのアンチコドンに対応する小さな tRNA 断片が同定された。驚くべきことに、これらの二つの断片は tRNA のエキソンに対応する領域をわずか 12 塩基しかコードしておらず、両端のリーダー配列に tRNA エキソンが挟まれた構造をとっていた (図 2B, tRNA 断片 I および V)。ここで 3' 末端のリーダー配列は唯一見つかった split tRNA<sup>Gly</sup> の 3' 断片 (図 2B, tRNA 断片 II) のリーダー配列と相補性を示したことから、三つの独立した転写産物から成る tRNA 遺伝子として、このグリシンに対応する二つの tRNA を tri-split tRNA と命名した<sup>7)</sup> (図 2B)。以上の結果を総合すると、我々は合計 10 の独立した tRNA 断片をコードする遺伝子を発見したことになる。この 10 種の tRNA

断片が適切にプロセシングされることで未発見であった六つの tRNA ができることになる。特に五つの断片の異なる組み合わせが 3 種類のグリシンに対応する同義 tRNA を合成する様は、まさに分子の“ジグソーパズル”のようである。

#### 4. split tRNA 及び tri-split tRNA の遺伝子発現とそのプロセシング

さて、これまでの結果はあくまでバイオインフォマティクスの解析に基づいた予測の域を出ていない。次に明らかにしなければならないことは、実際にこのような現象が細胞内でおこっているのか否か、またこのようなプロセスを経て構築された tRNA 分子がはたして機能的かどうかということである。

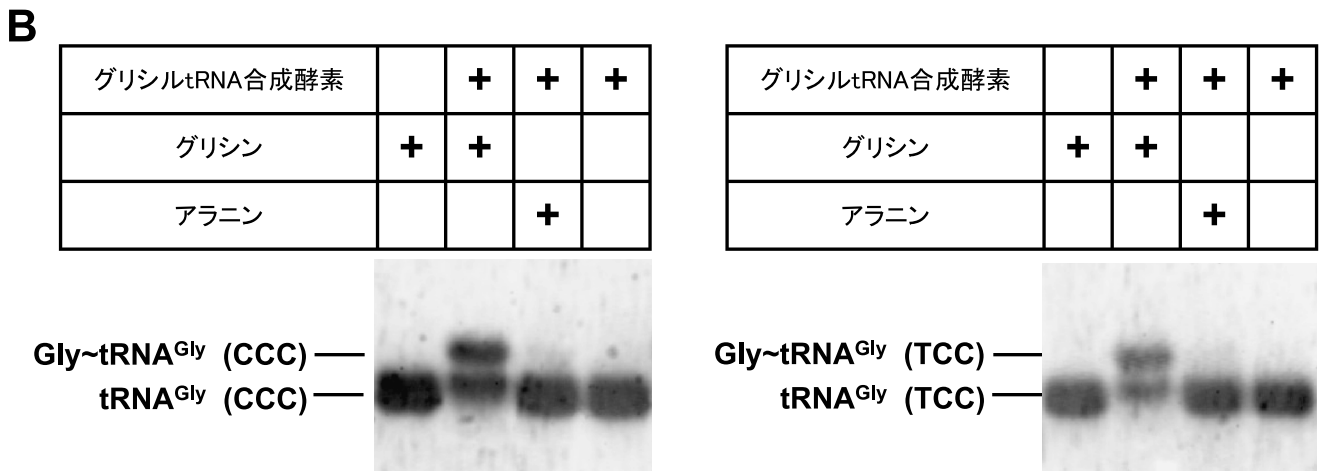
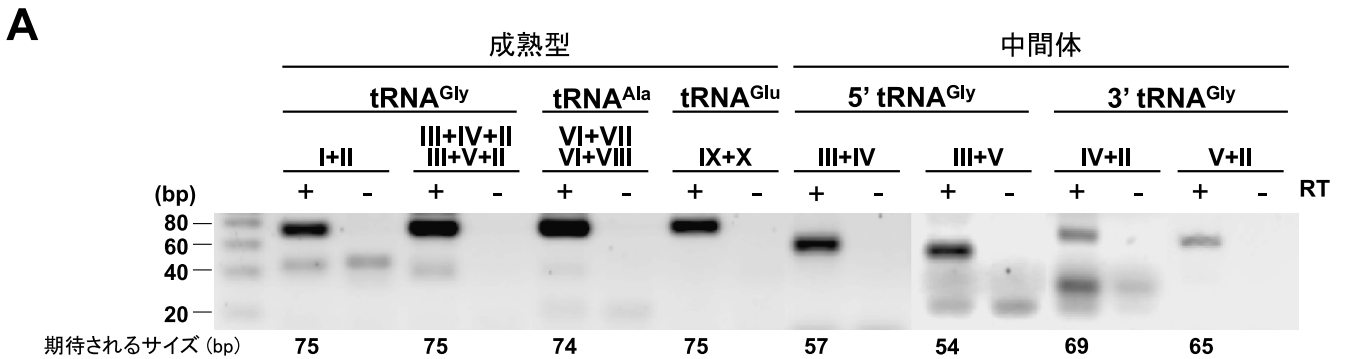


図3 split 及び tri-split tRNA の遺伝子発現とアミノアシル化

(A) 図2で示した計6種の成熟 split 及び tri-split tRNA の遺伝子発現。RT-PCR 法にて各転写産物を検出した。tri-split tRNA については二つの断片のみが連結したプロセシング中間型も検出された。各バンドは逆転写酵素依存 (RT+) に増幅されている。黒点は期待される転写産物の位置を示す。(B) 成熟 split tRNA<sup>Gly</sup> (CCC) 及び成熟 tri-split tRNA<sup>Gly</sup> (TCC) のアミノアシル化実験。in vitro 転写した2種の成熟型 tRNA<sup>Gly</sup> に対して *C. maquilingensis* 由来のグリシル tRNA 合成酵素を用いることでアミノアシル化を行った。Acid-Urea ゲルにてアミノアシル化された tRNA<sup>Gly</sup> (シフトしたバンド) を同定できる。ゲルを GelRed により染色。

まず、予測された10種のtRNA断片をコードする遺伝子が細胞で発現しているかどうかを調べるために、各転写産物を特異的に認識できるプライマーを設計し、逆転写PCR (RT-PCR) を行った。その結果、逆転写酵素依存的に各tRNA断片の長さに対応するバンドの増幅を確認することができ、またPCR産物の塩基配列を決定することにより、各々の断片化したtRNA遺伝子に対応する転写産物が発現していることが明らかとなった。そこで、これらのtRNA断片に対応するパートナーと出会い、プロセッシング (スプライシング) を受け成熟型のtRNAになるか否かを検討した。アーキア及び真核生物における前駆体tRNAのスプライシングではtRNAスプライシングエンドヌクレアーゼという特異的な酵素がtRNAのエキソン/イントロンあるいはエキソン/リーダー配列の境界に形成されるバルジ-ヘリックス-バルジ (BHB) というRNA二次構造を認識して切断することで進むことが知られている<sup>8)</sup>。また切断されたtRNA断片は特異的なtRNAリガーゼによって連結されることが酵母やシロイヌナズナで解析されているが、アーキアやヒトを含むほとんどの生物では連結に関わる因子は同定されていない<sup>9)</sup>。我々が予測したtRNA断片の組み合わせはすべてBHB構造を形成することがコンピュータによる解析で予測されていたので、実際に予測した箇所までtRNA断片同士が切断-連結することで成熟tRNA分子を合成しているかが焦点となった。

そこで今度も、プロセッシングを受け成熟型となったtRNAやその中間型を特異的に増幅できるようなプライマーを用いてRT-PCRを行い、PCR産物の塩基配列を決定することにより、グリシン、アラニン、グルタミン酸に対応する6種の成熟tRNA分子を、さらにtri-split tRNAに関しては、三つの断片 (例: III-IV-II) のうち二つが結合した2種類の間体 (III-IVとIV-II) をすべて同定することができた (図3A)。すなわち、実際に細胞内でtRNA断片が様々な組み合わせでプロセッシングされ、成熟tRNA分子を合成していることが明らかとなった。

次に問題となるのは、これらのtRNAが実際にアミノ酸の付加を受け、翻訳分子として機能的かどうかである。この問題は少なくとも試験管内で成熟型のtRNAが*C. maquilingsensis*由来のアミノアシルtRNA合成酵素によってアミノ酸を付加されれば良いと考えられた。そこで、split型のtRNA<sup>Gly</sup> (CCC) とtri-split型のtRNA<sup>Gly</sup> (TCC)の成熟tRNAに着目し、*C. maquilingsensis*が持つグリシルtRNA合成酵素の組換え体タンパク質を用いることで、これらtRNAにグリシンが付加するかどうかを検討した。そ

の結果、コントロールとして用いたアラニンはほとんど付加されず、グリシルtRNA合成酵素依存的にグリシンの付加が検出された (図3B)。さらに、*C. maquilingsensis*のゲノムにおいては、見いだされたsplit及びtri-split tRNAのアンチコドンに対応するtRNA遺伝子が他に見つからないことから、これらの断片から創成されるtRNAは機能を持ったtRNA分子としてタンパク質合成に用いられていると考えられた。

## 5. tRNA遺伝子の進化とそのシナリオ

それではなぜ二つないし三つの断片に分断されたtRNA遺伝子が存在するのだろうか？ これまで寄生性の*N. equitans*でのみ発見されていたsplit tRNAは、寄生に伴う大規模なゲノム縮小による副次的な産物との見解が強かった<sup>10)</sup>。一方で*C. maquilingsensis*は単離培養可能なアーキアであり、ゲノムも約2MBと近縁種とほぼ同等のサイズを保っていることから、今回の発見によりtRNA進化におけるsplit tRNAの起源や存在理由があらためて見直される形となった。興味深いことにsplit tRNAが断片化しているtRNA上のポジションは近縁のサーモプロテウス目でイントロンが挿入されているポジションと完全に一致している。また、tri-split tRNAのリーダー配列と近縁の種由来のイントロン型tRNAのイントロンの配列を比較した結果、90%という非常に高い類似性を示すことが明らかとなった (図4A)。この事実は断片型tRNAがイントロン介在型tRNAから生じた、あるいはその逆の現象が生じたことを直接的に示す重要な証拠である。すなわち、現在のところ、どちらからどちらが生じたかは明確ではないが、両タイプのtRNAには進化的に強い関わりがあることが類推される (図4B)。

split tRNAに関しては異なるアーキアの門に属している*N. equitans*及び*C. maquilingsensis*の2種で発見されたことから、アーキアの共通祖先がすでに有していた可能性が指摘できる。実際、tRNA遺伝子の起源に関しては諸説あるが、その多くが初期のtRNAは短いステムループであったことを主張している<sup>11-13)</sup>。これが正しいとするとsplit tRNAがtRNA遺伝子の原型で、その組み合わせによりtRNAの多様性が生まれた可能性につながっていく<sup>14)</sup>。その一方、tRNA遺伝子の分断は後天的に生じた可能性も指摘されている。それは、アーキアで知られているDNAウイルスの一部がtRNA遺伝子を標的として相同組換えを起こしてゲノムに侵入することに起因している。すなわち、これらのウイルスからの攻撃に対する防御機構として選択

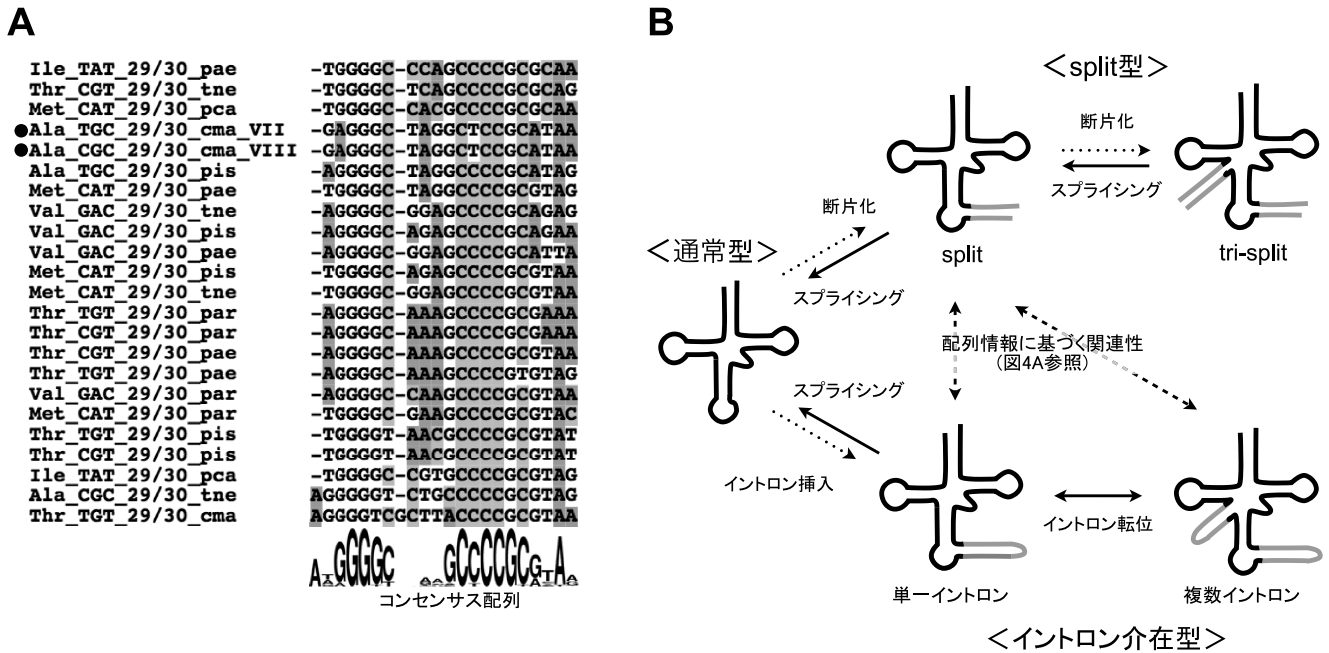


図4 各タイプのtRNA遺伝子には進化的な関係がある  
 (A) tRNAの塩基ポジション29/30で断片化したsplit tRNA<sup>Ala</sup>のリーダー配列2本(黒点)と同じポジションに挿入されているtRNAイントロン配列21本(近縁のサーモプロテウス目に由来)のアライメント結果. 各生物種名の略称を以下に示す. *C. maquilgensis* (Cma), *Pyrobaculum aerophilum* (Pae), *Pyrobaculum arsenaticum* (Par), *Pyrobaculum calidifontis* (Pca), *Pyrobaculum islandicum* (Pis), *Thermoproteus neutrophilus* (Tne). (B) アーキアにおける3タイプのtRNA遺伝子の関係性. エキソンを黒色, イントロンとリーダー配列を灰色で示す.

圧が働きtRNAが分断されたとする説である<sup>15)</sup>.

一方, イントロンの創成に関しても, これらtRNAは重要な問題を提起することになる. 実際, 図4Aでは進化的距離が比較的遠いtRNA遺伝子(例:tRNA<sup>Ala</sup>とtRNA<sup>Met</sup>)においても, 同一ポジションに酷似したイントロンが挿入されているケースが多数存在することを示している. これは異なるtRNA遺伝子間でイントロンが後天的に転位していることを強く示唆するものと考えられる<sup>16)</sup>.

## 6. おわりに

本稿では新しく見いだしたtri-split tRNAを中心に, アーキアにおけるユニークなtRNAについて紹介した. 一方, 分子進化の研究をしていく上では, そのサンプル数が圧倒的に不足している状況である(2009年11月現在のアーキアの完全ゲノム情報は71種で, 前年度に比べて10種ほどしか増えていない). 一方, このように限られた数のゲノム解析において, 多様性に富んだtRNA遺伝子が発見されたという事実から, アーキア界にはまだまだ新しいタイプのtRNA遺伝子が眠っていることが予想される. 最近, 我々は温泉などの環境サンプルから低分子RNAの

調製を行い, その配列を網羅的に決めるメタtRNA解析プロジェクトを立ち上げた. 特定のアーキアに対するゲノム情報が完全に得られない状況においても, 鍵となる分子に焦点をあてて次世代シーケンサー等による大規模解析により, その様相を明らかにできるのではないかとくろんでいる. そしてこれらの結果からは, 必ずや生命の起源や遺伝暗号の成立過程に関わる重要な知見が生み出されるはずである.

## 謝辞

本研究は慶應義塾大学先端生命科学研究所のRNA研究グループをはじめとして, 数多くの共同研究者の協力の下に行われたものです. 特に実験をサポートして下さった佐藤朝子講師, 平野麗子技術員に感謝の意を表したいと思います. また, 本研究内容により米国ウイスコンシン大学で行われたRNA2009にてThe Nature Reviews Molecular Cell Biology Awardをいただくことができました. 改めて関係者の皆様にお礼申し上げます.

1) Randau, L., Munch, R., Hohn, M.J., Jahn, D., & Soll, D.

- (2005) *Nature*, 433, 537–541.
- 2) Sugahara, J., Kikuta, K., Fujishima, K., Yachie, N., Tomita, M., & Kanai, A. (2008) *Mol. Biol. Evol.*, 25, 2709–2716.
  - 3) Marck, C. & Grosjean, H. (2002) *RNA*, 8, 1189–1232.
  - 4) Itoh, T., Suzuki, K., Sanchez, P.C., & Nakase, T. (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49 Pt 3, 1157–1163.
  - 5) Sugahara, J., Yachie, N., Sekine, Y., Soma, A., Matsui, M., Tomita, M., & Kanai, A. (2006) *In Silico Biol.*, 6, 411–418.
  - 6) Sugahara, J., Fujishima, K., Morita, K., Tomita, M., & Kanai, A. (2009) *J. Mol. Evol.*, 69, 497–504.
  - 7) Fujishima, K., Sugahara, J., Kikuta, K., Hirano, R., Sato, A., Tomita, M., & Kanai, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 106, 2683–2687.
  - 8) Lykke-Andersen, J., Aagaard, C., Semionov, M., & Garrett, R.A. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, 22, 326–331.
  - 9) Kanai, A., Sato, A., Fukuda, Y., Okada, K., Matsuda, T., Sakamoto, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Kawai, G., & Tomita, M. (2009) *RNA*, 15, 420–431.
  - 10) Randau, L. & Soll, D. (2008) *EMBO Rep.*, 9, 623–628.
  - 11) Di Giulio, M. (1992) *J. Theor. Biol.*, 159, 199–214.
  - 12) Maizels, N. & Weiner, A.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91, 6729–6734.
  - 13) Schimmel, P., Gige, R., Moras, D., & Yokoyama, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 90, 8763–8768.
  - 14) Fujishima, K., Sugahara, J., Tomita, M., & Kanai, A. (2008) *PLoS ONE*, 3, e1622.
  - 15) Heinemann, I.U., Soll, D., & Randau, L. (2009) *FEBS Lett.*, 584, 303–309.
  - 16) Fujishima, K., Sugahara, J., Tomita, M., & Kanai, A. (2010) *Mol. Biol. Evol.*, in press.

藤島 皓介, 菅原 潤一, 金井 昭夫  
(慶應義塾大学先端生命科学研究所)

Tri-split tRNA: a transfer RNA encoded on three separate genes found in hyperthermoacidophilic archaeon *Caldivirga maquilgensis*

Kosuke Fujishima, Junichi Sugahara, and Akio Kanai (Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Nipponkoku 403-1, Daihouji, Tsuruoka City, Yamagata 997-0017, Japan)

## ヤヌスの二つの顔：大腸菌シャペロニン GroEL の頂上ドメインに関する最近の研究

### はじめに

GroE は細胞内で変性したタンパク質の再生を促す、大腸菌のストレス応答に重要な働きをしているシャペロニンタンパク質である。GroE は2種類のサブユニット、

GroEL と GroES からなり、GroEL は疎水性相互作用を介して変性タンパク質を認識・結合し、GroES と併せて変性タンパク質を隔離する空間（セントラルキャビティー）を形成する。GroEL サブユニットの頂上ドメインは変性タンパク質の認識と結合が主な役割であるが、このドメインはセントラルキャビティーのふたである GroES と結合する役割も持つ。頂上ドメインにおいて変性タンパク質認識部位と GroES 結合部位は広くオーバーラップしてはいるが、興味深いことに、GroEL は ATP の結合をシグナルにして、この2種の結合能力を明確に切り替え、使い分けている。ローマ神話の出入り口・扉を司る、前後二つの顔を持つ神ヤヌスのように、ある状態では GroES を、別の状態では変性したタンパク質を認識する能力をダイナミックに使い分ける GroEL タンパク質とその頂上ドメインに関する最近の興味深い知見をまとめた。

### 1. GroEL のサブユニット構造と頂上ドメインの役割

シャペロニン GroE を構成する GroEL タンパク質（サブユニット分子量約 57 kDa）は、7分子のサブユニットがリング状に会合し、このリングが2個“背”をあわせた形で会合した十四量体として存在する（図1）。それぞれのリングの入り口には変性タンパク質と補助的な役割を担うシャペロニンの GroES（分子量 10 kDa のサブユニット7分子が作るリング構造）を認識し、結合する部位が存在する。変性タンパク質が GroEL のリングに結合する際は、変性に伴い分子の表面に露出した疎水性部位が GroEL により認識される。一方、GroES の結合は、リングを構成する七つの GroEL サブユニットにそれぞれヌクレオチド ATP が結合しなければ成立しない。対称な十四量体である GroEL<sub>14</sub> に GroES<sub>7</sub> が結合すると非対称な二十一量体が形成されるが、この複合体において GroES<sub>7</sub> が結合した側の GroEL 七量体を *cis* リング（図1, *cis*-GroEL<sub>7</sub>）、GroES が結合していない反対側の GroEL 七量体を *trans* リング（図1, *trans*-GroEL<sub>7</sub>）と呼び区別する。GroES が結合する GroEL *cis* リングにあらかじめ変性タンパク質が結合していた場合、このタンパク質分子は GroEL と GroES が形成する空間（セントラルキャビティー、図1斜線部）に一時的に格納され、溶媒から隔離される。この状態を GroE の「*cis* 複合体」と呼び、形成後およそ8秒間（GroEL に結合した ATP が加水分解されるために要する時間）維持される。その後、*trans* 側のリングに新たな変性タンパク質分子、ATP、GroES が結合して最初に格納された変性タンパク質は溶媒に再び放出される。同時に GroEL リングの *cis*,