

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 大学院生研究
 2008 年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院		理学 研究科	生命理学 専攻
指導教員	所属・職名		氏 名	
	理学研究科・准教授		関根 靖彦 印	
自然・人文の別	○自然・人文		個人・共同の別	○個人・共同 名
研究課題名	<i>C. merolae</i> の tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼの機能解析			
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏 名	
	理学研究科・生命理学専攻・博士課程後期課程 1 年		小野寺 瑛宣 印	
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏 名	
	理学研究科・生命理学専攻・博士課程後期課程 1 年		小野寺 瑛宣	
研究期間	2008 年度			
研究経費	480634 円			

研究の概要 (200~300 字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

申請者は紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の核ゲノムに存在する tRNA 遺伝子が、permuted tRNA 遺伝子と命名した新規の遺伝子構造を持つこと、および、真核生物ではじめてアンチコドンループ以外の位置にイントロンが存在することを見出した。

本研究では、シゾンで初めて見いだされたこれらの遺伝子構造が真核生物の進化・成達の過程でどのように進化してきたのかを明らかにするため、*C. merolae* の tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼのイントロン認識機構、およびシゾンで見出した特徴的な構造を持つ tRNA 遺伝子が他の真核生物にも存在するかどうか、の 2 点についての解析を行った。

キーワード (研究内容をよく表しているものを 3 項目以内で記入。)

{ tRNA } { splicing } { C. merolae }

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

真核生物と古細菌の tRNA 遺伝子の一部にはエンドヌクレアーゼによる切断とリガーゼによる再結合を特徴とするイントロンが存在する。真核生物ではイントロンは tRNA 二次構造上のアンチコドンループの 1ヶ所にのみ存在する。一方、古細菌ではイントロンはアンチコドンループ以外の位置にも存在し、切断部位の周辺配列が bulge-helix-bulge(BHB)モチーフと呼ばれる二次構造モチーフを形成する。

申請者は紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*(以下シゾンと記す)の核ゲノムに存在する tRNA 遺伝子が、他の真核生物では見られない特徴的な構造を持つことを見出している。具体的には、(1)5'断片の上流に 3'断片が存在する新規の構造を持つ tRNA 遺伝子(permuted tRNA 遺伝子と命名した)が存在している。これらの遺伝子は、発現の際に環状の中間体を経ることで配列の順序を入れ替え、通常の tRNA の構造にプロセッシングされる(Soma *et al.* 2007)、(2)アンチコドンループ以外の位置に存在し、古細菌のイントロンに共通に存在する二次構造モチーフである BHBモチーフを形成するイントロンが存在する。一方で、シゾンには酵母などの真核生物に近い特徴を示すイントロンも存在している。という 2点である。

シゾンと他の真核生物の間に見られる tRNA 遺伝子の構造の違いには、どのような要因が関わっているのだろうか。また、これらの tRNA 遺伝子の構造は、真核生物の祖先の姿を残したもののなのか、それとも独自の進化により生じたものののだろうか。

本研究では、以上の疑問を解決し、tRNA という遺伝子情報発現の根幹を担う分子の遺伝子構造が真核生物においてどのように進化してきたのかを明らかにするため、イントロンの切断を行うエンドヌクレアーゼの機能解析、およびシゾンで見出した特徴的な構造を持つ tRNA 遺伝子が他の真核生物にも存在するかどうか、の 2点について検証を行った。

1、シゾン tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼの解析**< 遺伝子の同定 >**

シゾンゲノムデータベース(<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>)を利用し、シゾンの tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ遺伝子の同定を行った。一般的に、真核生物の tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼは 4 種のサブユニット(Sen2, Sen15, Sen34, Sen54)で構成されている(C. R. Trotta *et al.* 1997)。一方、古細菌ではホモダイマー型、ホモテトラマー型、ヘテロテトラマー型の 3 タイプの存在が知られている(G. D. Tocchini-Valentini *et al.* 2005)。

BLAST を用いたアミノ酸配列の相同性検索の結果、シゾンでは Sen2, Sen34, Sen54 に類似性のある遺伝子の存在が見出された。この結果から、エンドヌクレアーゼのサブユニット構成は古細菌より真核生物に近いことが示唆された。

< Yeast Two Hybrid 法による解析 >

東京農業大学の渡辺博士らの協力により、各遺伝子に対して Yeast Two Hybrid 法による解析を行った。その結果、Sen2-Sen54 間の相互作用の存在が示唆された。これは酵母での知見と一致する結果である。一方、Sen34 についてはポジティブなクローンが得られなかった。これらの結果から、シゾンのエンドヌクレアーゼは 3 量体で機能していることが示唆された。

< シゾン sen 遺伝子の発現ベクターへのクローニング >

シゾンゲノムから *sen2*, *sen34*, *sen54* 遺伝子をそれぞれ PCR 法により増幅し、大腸菌内でのタンパク質産生に用いるベクターに *sen* 遺伝子を導入したプラスミドを構築した。

研究成果の概要 つづき**<大腸菌でのタンパク質発現>**

タンパク質産生用プラスミドを IPTG により遺伝子の発現誘導ができる菌株に形質転換した後、培養および発現誘導を行った。培養した大腸菌は SDS-PAGE 法によりタンパク質の発現状態の確認を行った。その結果、タンパク質の発現は確認できたが、発現させたタンパク質の大部分は不溶化してしまい、活性のある目的のタンパク質を得ることはできなかった。

<今後の展望>

他生物での報告を調査したところ、古細菌ではスプライシング装置は 2 種のタンパク質サブユニットで構成されている例があり、大腸菌内での生産を行う場合は 2 種のタンパク質を同時に発現させることが活性のあるタンパク質を得るために有効であることが報告されていた。そこでシゾンの 3 種のサブユニットを大腸菌内で同時に発現させるため、3 種の遺伝子を同一のプラスミド上に組み込んで同時に発現させる系の構築を現在行っている。

2、シゾンに近縁な紅藻の tRNA 遺伝子の解析

シゾン tRNA 遺伝子がどのように進化してきたかを論じるためには、シゾンに類似した特徴をもつ tRNA 遺伝子を持つ生物との比較を行う必要がある。しかし、これまでにそのような真核生物の存在は報告されていない。そこで、まずはシゾンに近縁である原始紅藻の核ゲノムにシゾンに類似した tRNA 遺伝子が存在するかについての調査を行うことにした。

なお、以下の結果は未発表のデータを含むため、本報告書では詳細についての記述は避ける。

<tRNA 遺伝子の同定>

当研究室の堀の協力により、tRNAscan-SE(Lowe, T.M. and Eddy, S.R. 1997) SPLITS,SPLITSX(Sugahara *et al.* 2006, 2007)をもちいて紅藻ゲノム配列から tRNA 遺伝子の予測を行った。その結果予測された tRNA 遺伝子候補配列について、tRNA の保存配列、クローバーリーフ構造の形成、イントロン周辺の配列が共通に形成する二次構造の存在などを考慮し、tRNA の配列を決定した。その結果、すべてのコドンの翻訳を行うために十分な種類の tRNA 遺伝子を同定することに成功した。

<同定した tRNA 遺伝子の遺伝子構造>

これらの tRNA 遺伝子には、アンチコドン領域以外の位置に BHB モチーフを形成するイントロンが存在する tRNA 遺伝子が含まれていた。イントロンの存在位置、イントロンを持つ tRNA の種類についてはシゾンとの明確な類似性は見られなかった。また、permuted tRNA 遺伝子については存在が確認されなかった。

以上の結果から、アンチコドン領域以外のイントロンの存在はシゾンに特有の特徴ではなく、紅藻類に共通した特徴である可能性が示唆された。