

バルジ大作戦：tRNA splicing

真核生物の mRNA のスプライシングは、group II intron という自己スプライシングを行うイントロンから進化して来たと考えられている。自己スプライシングイントロンには他に、group I intron というものが存在し、全く別の機構によって自身の RNA の切り出し、再結合を行なう。この2つは別の起源を持っている。スプライシングには他にも別の機構によるものがある。その代表例は tRNA のスプライシングである。tRNA のスプライシングは真核生物と古細菌に見られ、古細菌の機構の方がより単純であることから、古細菌から真核生物へと機構が複雑化してきたのだと考えられている。

tRNA 中のイントロンとエクソンの境界部分は、古細菌でも真核生物でも bulge-helix-bulge (BHB) と呼ばれる二次構造をとる。一般的な構造では、中央部 4 塩基が塩基対を形成し、その両側に塩基対を形成できない塩基が 3 塩基ずつ位置している。その更に外側は再び塩基対を形成しているため、3 塩基ははみ出してバルジ（出っ張り）の構造をとる。このバルジの外側がイントロンとエクソンの境界となっている。切断はエンドヌクレアーゼ活性を持つ蛋白質 tRNA splicing endonuclease によって触媒される。切断されたイントロン RNA は 5'末端が水酸基、3'末端は 2' と 3' の水酸基がリン酸によってつながれた 2'-3' 環状リン酸基となる。エクソン RNA も同様の構造となる。真核生物では続いて、エクソン RNA の 3'末端の 2'-3' 環状リン酸基がホスホジエステラーゼ活性により加水分解され、3'水酸基・2'リン酸基の構造に変化する。5'末端には、キナーゼ活性によりリン酸基が付加される。最後に 3'末端の 3'水酸基と 5'末端の 5'リン酸基との間が RNA リガーゼにより結合され、スプライシングが完了する。エステラーゼ、キナーゼ、リガーゼの 3つの活性は 3つの活性部位を持つ 1つの蛋白質によって触媒される。その後 2'リン酸基がフォスファターゼによって除去される。一度切断し、再結合するので、この反応にはエネルギーが必要となる。従って ATP が無ければ反応は進行しない。このように tRNA のスプライシングは RNA ではなく蛋白質によって触媒され、反応機構も切断後の再結合である。一方、古細菌では 2'-3'環状リン酸基のリン酸が 5'末端との結合に使われる。こちらはエステル転移反応なので、通常のスプライシングと同様にエネルギーを必要としないはずである。

ゲノム配列決定後のアノテーション作業では、tRNA の同定に tRNAscan-SE というソフトウェアが広く使われている。このソフトウェアは高速で精度も高いプログラムであるが、ゲノム配列が完全に決まっているにも関わらず、あるべき tRNA が見つからない場合があった。特に古細菌のゲノムで tRNA を探索した場合にそれは顕著であった。Sugahara らは、イントロンがあることによって

tRNAscan-SE が tRNA を見つけられないのではないかと考え、SPLITSX というソフトウェアを開発した (Sugahara et al. 2007)。SPLITSX は既知のイントロンの BHB モチーフを参考にして「BHB っぽい」配列を探索する。こうして予測されたイントロンを取り除いた配列について tRNAscan-SE をかけると、イントロンが挿入されている tRNA も予測できるはずである。著者らはこのような戦略で、古細菌 29 種のゲノム配列から tRNA の予測を試みた。合計で 75 個の tRNA が予測でき、その内、43 個は報告のないものであった。しかも、43 個の内、15 個ではイントロンが 2 カ所に挿入されており、3 つのイントロンを含んでいるものも 3 つ見つかった。イントロンの位置は tRNA の幅広い領域にわたり、長さもまちまちで、最長は 175 塩基であった。3 つのイントロンを含んでいる tRNA の 1 つでは 2 つのイントロンが抜けると新たに BHB モチーフが形成され、スプライシングを受けるというものも見つかった。イントロンが入れ子状になっているわけで、一つの RNA に対して連続して複数回スプライシングが起こることが示唆される結果である。

ところで、tRNA のスプライシングでは BHB モチーフに対して対称な位置で RNA の切断が起こる。mRNA のスプライシングと異なり、末端の形状はイントロンもエクソンも同じである。実際、イントロンとエクソンが逆転したような tRNA 遺伝子が見ついている。

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* ではゲノム配列が完全に明らかにされたにも関わらず、tRNA が 30 個しか見つからず、それだけでは 61 個全部のコドン埋めることができないことが報告されていた。そこで、Soma らは *C. merolae* のゲノム配列に対して SPLITSX を試し、加えて BLAST によって tRNA に保存されている配列の探索も行なった (Soma et al. 2007)。予測された tRNA 遺伝子の内、11 個では、tRNA の 3' 側の配列が 5' 側の配列よりも前にコードされていた。これらの tRNA 遺伝子では、3' 側部分の前側と 5' 側部分の後ろ側とで BHB モチーフを作ることが予測された。もし、この BHB モチーフが tRNA スプライシング機構によって切断、再結合されるとすると、最終的に tRNA は環状 RNA になる。この BHB モチーフが形成される位置は、tRNA 上で D ループ、アンチコドンループ、T ψ C ループ、T ψ C ステムと様々であった。真核生物では通常アンチコドンループにのみイントロンは存在するので、*C. merolae* の tRNA のイントロンは古細菌のものに近いと言える。

Soma らはまず、これらの遺伝子が機能する tRNA をコードしているのかどうかを確かめた。転写とアミノアシル化が観察されたので、正常に機能する tRNA であることがわかった。そして実際に環状化が起こっているかを RT-PCR によって確認した。5' 側半分の内部の前側に前向きプライマーを、後ろ側に後ろ向きプライマーを設計し、RT-PCR を行なうと、PCR 産物が増幅された。その配

列を決定すると、BHBモチーフで環状化が起こっていることが確かめられた。また、中には3'側半分と5'側半分との間に挟まれた非コード配列が挿入されたままのものが見つかった。この非コード配列がその後削られ、tRNA末端のCCAが付加されることは、RT-PCRの際にT4 RNA ligaseを混ぜた解析でそのような配列が見つかったことから示された。

環状化tRNAの形成反応は、イントロン内にコードされたtRNAがエクソンから切り出される反応と考えることができる。通常のtRNAは内在性のプロモータにより転写が制御されているので、tRNAの順序が入れ替わると転写がうまく行かない。しかし、*C. merolae*では環状化するtRNAも通常のtRNAも上流にTATA boxを持つので、たとえ順序が逆になってもtRNAの転写が正常に行なわれる。おそらく環状化するtRNA遺伝子はこのようにTATA boxの存在する条件下でイントロンによって分断されたtRNAの部分配列の順序が入れ替わって生じたのであろう。このような現象がいつ、どのようにして起こったのかは大変興味深い問題である。また、環状化tRNAはtRNAイントロンの進化についても興味深い話題を提供してくれる。遺伝子がイントロンとして切り出されても正常に機能するのならば、tRNAスプライシングに関わる遺伝子がイントロン内にコードされ、切り出されても問題ないはずである。イントロン内にスプライシングに必要な遺伝子をコードすれば、他の自己スプライシングイントロンと同様に自分自身を切り出すことが可能となる。RNA自身が触媒活性を持つgroup I intron、group II intronでも内部にコードされた蛋白質が触媒活性を補助することが知られている。tRNAイントロンも蛋白質をコードした自己スプライシングイントロンから派生したのかもしれない。

Sugahara J, Yachie N, Arakawa K, Tomita M.

In silico screening of archaeal tRNA-encoding genes having multiple introns with bulge-helix-bulge splicing motifs.

RNA. 2007 May;13(5):671-81.

Soma A, Onodera A, Sugahara J, Kanai A, Yachie N, Tomita M, Kawamura F, Sekine Y.

Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*.

Science. 2007 Oct 19;318(5849):450-3.

2008/02/08

小島 健司 著
禁 無断複写転載