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

Department of Life Science, College of Science, Rikkyo (St. Paul's) University, 3-34-1, Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-8501, Japan

Corresponding author: Akiko Soma, soma@rikkyo.ne.jp
Phone & Fax: 03-3985-3408

Received: May 18, 2009 / Accepted: May 25, 2009

始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の新しい tRNA 遺伝子と RNA プロセシング経路の発見

立教大学 理学部 生命理学科 相馬亜希子

始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* は、強酸性の温泉という極限環境に生息し、非常にシンプルな体制をもつ真核生物である。我々は *C. merolae* の核ゲノム配列の解析から、tRNA の 3'側半分と 5'側半분을コードする配列が逆転した構造をもつ遺伝子を発見し、"permuted tRNA genes"と命名した。生化学的な解析から、この遺伝子から転写された前駆体 tRNA は、環状の RNA 中間体を経由する新しいタイプの RNA プロセシング経路により、成熟体 tRNA へプロセスされることが分かった。

新規プログラムを用いた *C. merolae* の tRNA 遺伝子の検索

タンパク質合成において、tRNA は遺伝暗号をアミノ酸に変換するために必須の分子であり、したがって、全ての生物には、約 20 種類のアミノ酸をそれぞれの遺伝暗号に対応させるのに十分な数と種類の tRNA 遺伝子の存在が不可欠である。しかし、2004 年、立教大学・黒岩常祥博士らのプロジェクトによりゲノム配列が解読された「最小の真核生物」といわれる始原紅藻 *C. merolae* の核ゲノムからは、十分な数の tRNA 遺伝子が見つからず、どのように遺伝暗号をアミノ酸に変換するのが謎であった^{3,7,8)}。*C. merolae* は約 16.4Mbp という小さな核ゲノムを持ち、遺伝子の数やコピー数も非常に少なく、真核生物としてきわめて単純な生物である。普遍的な遺伝

暗号を用いている一方で、ゲノムが決定された時点では核ゲノムの tRNA 遺伝子が 30 コピーしか見つからず、これは 61 個全ての遺伝暗号をアミノ酸に変換するには全く不十分であった。

これまで、ゲノム配列からの tRNA 遺伝子の予測には、クローバーリーフ構造を形成できるかどうかという、いわゆる"tRNA らしさ"に基づく検出プログラム tRNAScan-SE が用いられてきた⁴⁾。しかし、近年、様々なタイプのイントロンを含む tRNA や、tRNA の 5'側半分と 3'側半分がゲノム上の離れた領域に別々にコードされており、それらがトランススプライシングにより結合することで、一つの機能的な tRNA 分子が形成されるという現象が古細菌で発見された⁵⁻⁷⁾。tRNAScan-SE ではそのような tRNA 遺伝子を検出することができず、古細菌以外の生物でも特殊な tRNA 遺伝子に対応できる新たな検索プログラムの構築が必要であった。

C. merolae のゲノム配列が決定された際に tRNAScan-SE を用いて同定された 30 コピーの tRNA 遺伝子のうちの多くが、既知の真核生物とは異なる特徴をもったイントロンをもつことが示唆されていた。このことから、*C. merolae* では特殊なイントロンを標的にすることが、未知の tRNA 遺伝子を検索する重要な手がかりになると考えた。tRNA のイントロンは、Bulge-Helix-Bulge (BHB)モチーフとよばれる特徴的なステム構造を形成し、それがス

プライミング装置のエンドヌクレアーゼによる認識部位となっている¹⁾。したがって、イントロンの検索には、BHBモチーフが最も重要な目印となる。そこで我々は、慶応大学・金井昭夫博士らのグループが開発した、BHBモチーフをもつ tRNA 遺伝子をより精密に検出できるソフトウェア SPLITS/SPLITSX^{11,12)}を用いて、*C. merolae* の核ゲノムから tRNA 遺伝子の網羅的な再検索を試みた。解析の結果、全ての遺伝暗号を翻訳するのに十分な 42 種のアンチコドンに相当する合計 43 コピーの tRNA 遺伝子セットを同定した (表 1)¹⁰⁾。

表 1 *C. merolae* のアンチコドン表

	A	G	U	C	
A	Phe GAA	Ser IGA	Tyr GUA	Cys GCA	A
G	Leu UAA	stop CGA	stop	stop CCA	A
U	Lcu IAG	Pro IGG	His GUG	Arg ICG	G
C	CAG	UGG CGG	Gln CUG	UCG CCG	G
A	Ile GAU	Thr IGU	Asn GUU	Ser GCU	U
G	iMet UAU	UGU	Lys UUU	Arg UCU	U
U	eMet CAU	CGU	CUU	CCU	U
C	AAC	Ala IGC	Asp GUC	Gly GCC	C
A	Val UAC	UGC	Glu UUC	UGC	C
G	CAC	CGC		CCC	C

NNN: newly found tRNA genes
 NNN: re-assigned tRNA genes

□: permuted tRNA genes

新しい構造をもった tRNA 遺伝子、“permuted tRNA genes”の発見

我々の解析により同定された 43 コピーの tRNA 遺伝子のうち、11 コピーの tRNA 遺伝子が新しいタイプの遺伝子構造をもっていた。通常、遺伝子に

書き込まれた DNA の配列と、そこから転写されてできる RNA の配列はほぼ一致している。しかし、本研究で発見された 11 コピーの遺伝子では、tRNA の配列がデザインされている領域が 2 つの断片に分かれており、さらにその断片の位置が逆転していた (図 1)。すなわち、tRNA の 3'側半分が 5'側半分の上流にコードされているのである。この特徴的な構造から、我々はこの遺伝子を、“permuted tRNA genes (逆転 tRNA 遺伝子)”と命名した¹⁰⁾。

これらの遺伝子の DNA 配列をみると、プロモーターと予想される TATA 様配列の下流に、tRNA の 3'側半分をコードする領域、介在配列 (intervening sequence)、tRNA の 5'側半分をコードする領域があり、その下流に、ターミネーターと予想される連続した dT が存在する (図 1)。tRNA の 3'側半分と 5'側半分をコードする領域の間にはプロモーターやターミネーターが存在しないことから、この遺伝子からの一次転写物は、一本鎖 RNA であると予想される。また、一次転写物の 5'末端と、3'末端は互いに相補的であり、既述の tRNA のイントロンに特徴的な BHBモチーフの形成が可能である。この BHBモチーフを形成する“つなぎ目”は、予想されるクローバーリーフ構造上の様々な位置にみられた。*C. merolae* の細胞から抽出した RNA を用いたノザン解析の結果、これらの tRNA は成熟体として適当なサイズをもつ一本鎖 RNA として細胞内に安定に存在し、それぞれ対応するアミノ酸の付加も受けていることが分かった。したがって、permuted tRNA 遺伝子から発現した tRNA は、一般的なクローバーリーフ構造をもつアダプター分子としてタンパク質合成に参加していると考えられる¹⁰⁾。

図 1 *C. merolae* の permuted tRNA genes と前駆体 tRNA の模式図

”permuted tRNA genes”の転写機構

一般に、真核生物の tRNA 遺伝子は RNA ポリメラーゼ III によって転写され、tRNA の保存配列に相当する A ボックスや B ボックスといった、いわゆる内部プロモーターに依存する²⁾。転写開始時には、A および B ボックスに、転写因子の複合体である TFIIC が結合し、続いて、TATA ボックス結合因子を含む TFIIB 複合体および RNA ポリメラーゼ III が結合し、転写を開始する。TFIIC の DNA への結合には、A および B ボックスの配列に加え、そこから転写開始点までの距離が重要であることが明らかにされている。しかし、permuted tRNA genes の場合、A ボックスと B ボックスの位置が逆転しており、更に、様々な長さのイントロンや intervening sequence が存在するため (図 1)、転写開始点からの距離が適当でないことから、これらの配列に TFIIC が結合するとは考えにくく、したがって、A および B ボックスが主要なプロモーターとして機能している可能性は低い。*C. merolae* では、permuted tRNA genes も含め、ほとんど全ての tRNA 遺伝子の upstream に TATA 様配列がみられる。また、*C. merolae* には、TFIIC 複合体を構成する因子のうち、A ボックスおよび B ボックスに結合する転写因子の明らかなホモログ遺伝子は見つかっていない。このことから、*C. merolae* の tRNA 遺伝子は、A ボックスや B ボックスといった内部プロモーターの代わりに、上流プロモーターである TATA ボックスに依存した転写開始機構を採用していると予想される。

”permuted tRNA genes”からの成熟体 tRNA の形成

permuted tRNA genes から転写された前駆体 tRNA から、どのようなプロセッシング経路により、通常のクローバーリーフ構造を持った tRNA 分子が作り出されるのだろうか？転写直後は、クローバーリーフの 5'側半分と 3'側半分の位置が逆転した一本鎖の前

駆体 RNA が形成される (図 1)。これが成熟体 tRNA になる過程で、①アクセプターステムをつなぐ intervening sequence が除去され、2 本の RNA からなる中間体を形成する場合と、②前駆体の“つなぎ目”が除去された後に再び結合され、環状の RNA 中間体を形成する場合の、2 つの可能性が考えられる。*C. merolae* の細胞から抽出した RNA を用いた逆転写 PCR と cDNA のシーケンシング解析を行った結果、環状の RNA 中間体が検出されたことから、少なくとも②の成熟化経路の存在が明らかとなった (図 2)。この反応には、通常の tRNA 前駆体のプロセッシング酵素群が関与していると予想される。

まず、前駆体の両末端の BHB モチーフが、本来は tRNA のイントロンを切断するためのスプライシング装置のエンドヌクレアーゼで切断された後に、リガーゼにより再結合された結果、環状の RNA 中間体が形成される。次に、環状 RNA 中間体のアクセプターステムの 5'末端と 3'末端に相当する部位が RNase P や tRNase Z による切断を受け、tRNA の正しい位置に新たな末端が生じる。更に、アクセプターステムの 3'末端に CCA 付加酵素により CCA 配列が付加され、機能的な成熟体 tRNA 分子が形成されるのだろう。あたかも、一本の鎖をつなげて輪にし、別の場所で再び切り離すことで、遺伝子に書き込まれた元々のデザインとは異なる末端をもつ鎖を作り出す作業が、*C. merolae* の細胞内で行われているのである。RNA 分子の 5'側半分と 3'側半分が入れ換わるこの反応過程は、これまで知られているものとは異なる、新しいタイプの RNA プロセッシングである。現在、成熟化に関与すると予想されるプロセッシング酵素群のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* プロセッシング系の構築を行っている。これらの酵素が前駆体や環状の RNA 中間体をどのように認識しているかについて、今後の解析が必要である。

図 2 permuted tRNA genes の前駆体のプロセッシング経路のモデル

”permuted tRNA genes”の形成と起源

このように特異な tRNA 遺伝子の成立の詳細は不明であるが、遺伝子重複により生じたタンデムな tRNA 遺伝子の両端に変異が蓄積し、その結果、上流の tRNA 遺伝子の 3'側半分と、下流の tRNA 遺伝子の 5'側半分からなる、permuted tRNA genes が形成された可能性が考えられる。*C. merolae* にはこのような tRNA 遺伝子でも転写可能な TATA ボックスに依存した転写開始機構や、その前駆体 tRNA を認識して成熟体 tRNA を形成できるプロセッシング装置が備わっていたため、permuted tRNA genes は消失せずに、ゲノム上に残ることができたと予想される。この可能性について、実験的な検証を試みている。

現在までのところ、*C. merolae* 以外の生物には permuted tRNA genes は見つかっていないが、既に解読された生物のゲノムだけでなく、今後解読される生物のゲノムにおける permuted tRNA genes の検索など、ゲノムデータベースの整備への貢献が期待される。これまでの方法では発見できなかった”permuted tRNA genes”の発見、そして”RNA の配列の順番を入れ換える”RNA プロセッシング経路の発見、という2つの本研究成果は、tRNA の進化を考える上で重要な知見を与えるだけでなく、ゲノム上に、どのような遺伝情報が、どのように書き込まれているかを読み解く上で、新たな視点を与えることが期待される。

謝辞

栄誉ある極限環境微生物学会奨励賞受賞にあたり、選考委員の諸先生方、また、ご協力を賜りました全ての皆様に心より感謝致します。本研究は、立教大学理学部生命理学科関根研究室において遂行されました。今後もこの賞を励みに、日々の研究に勤しんで参りたいと思います。

References

- 1) Abelson, J., Trotta, CR., Li, H. 1998. tRNA splicing. J. Biol. Chem. 273: 12685-8
- 2) Galli, G., Hofstetter, H., Birnstiel, ML. 1981. Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. Nature 294: 626-631.
- 3) Kuroiwa, T. 1998. The primitive red algae: *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae* as model system for investigating the dividing apparatus of mitochondria and plastids. Bioessays 20: 344.
- 4) Lowe, T. M., Eddy, SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res. 25: 955-964.
- 5) Marck, C., Grosjean, H. 2002. tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. RNA 8: 1189-1232.
- 6) Marck, C., Grosjean, H. 2003. Identification of BHB splicing motifs in intron-containing tRNAs from 18 archaea: evolutionary implications. RNA 12: 1516-1531.
- 7) Matsuzaki M, Misumi O, Shin-I T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T. 2004 Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. Nature 428: 653-657.
- 8) Nozaki H, Takano H, Misumi O, Terasawa K, Matsuzaki M, Maruyama S, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, Takio S, Tamura K, Chung SJ, Nakamura S, Kuroiwa H, Tanaka K, Sato N, Kuroiwa T. 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. BMC Biol. 5: 28.
- 9) Randau L, Münch R, Hohn MJ, Jahn D, Söll D. 2005. *Nanoarchaeum equitans* creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. Nature 433: 537-541.
- 10) Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F. and Sekine, Y.. 2007. Novel permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. Science 318: 450-453.
- 11) Sugahara J., Yachie N., Sekine Y., Soma A., Matsui M., Tomita M., Kanai A. 2006. SPLITS: a new program for predicting split and intron-containing tRNA genes at the genome level. In Silico Biology 6: 411-418.
- 12) Sugahara, J., Yachie, N., Arakawa, K., Tomita, M. 2007. In silico screening of archaeal tRNA-encoding genes having multiple introns with bulge-helix-bulge splicing motifs. RNA 13: 671-681.