

# 逆転または分断化 tRNA のプロセッシング機構を利用した環状 mRNA の形成と高効率タンパク質発現系の構築

相馬 亜希子

千葉大学大学院 園芸学研究科

## 研究の目的

環状 mRNA はリボヌクレアーゼによる分解に対する耐性が比較的高く、また、翻訳開始のステップの一部が省略されることで、その翻訳活性が向上すると期待されている。これまでに様々な試みがなされ、特にバクテリアのタンパク質合成系における環状 RNA の有用性が報告されている<sup>1), 2)</sup>。一方、環状 mRNA からの翻訳活性は十分ではなく、バクテリアの翻訳開始過程には mRNA の末端が重要であると考えられるが、その詳細は不明である。環状 mRNA を用いた翻訳系の構築と解析は、生産性の高いタンパク質合成系の開発に加え、バクテリアの翻訳開始機構の理解につながると期待される。高温の酸性温泉に生息する単細胞始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 10D をはじめとする微細藻類や古細菌に存在する permuted tRNA (逆転 tRNA) は、転写後プロセッシングにより、環状 RNA 中間体を経て成熟化する<sup>3)</sup>。当該遺伝子では tRNA の配列をコードする領域が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る。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 (図1)。そこから転写された tRNA 前駆体は、末端同士の結合と再切断を介してクローバーリーフ様構造を有する成熟体 tRNA となり、この一連の反応は tRNA のイントロンスプライシング酵素をはじめとするプロセッシング装置に依存すると考えられている。本研究では、この逆転 tRNA のプロセッシング機構に加え、バクテリアのリボザイム型スプライシング機構に依存して環状 mRNA を合成し、それを鋳型にした翻訳反応によるタンパク質合成系の構築を試みた。また、我々はバクテリア tRNA のアンチコドンの変異が翻訳能を促進する現象を見出しており、いくつかの変異を組み合わせることで、より高い翻訳活性をもつ宿主株の

探索を行った。

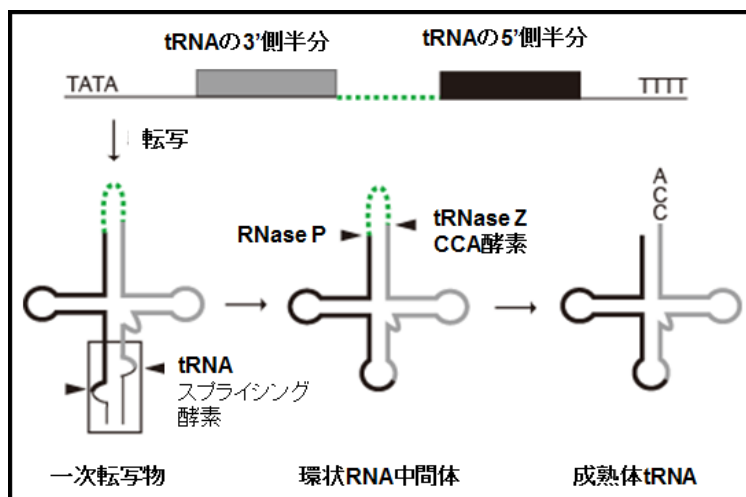


図1 permuted tRNA (逆転 tRNA) の成熟化

環状 RNA 中間体を経ることで RNA の 5'側領域と 3'側領域が入れ替わる。各反応には tRNA プロセッシング酵素群が関与すると予想される。

## 方法

2つのメカニズムを利用して環状 mRNA の形成を試みた。(1) 逆転 tRNA の環状化を司る tRNA イントロンスプライシング酵素は、特定の RNA モチーフをもつ RNA 分子であれば、クローバーリーフ様構造を形成しない RNA 分子でも基質として認識すると考えられている。その RNA モチーフを付加したマーカー遺伝子 (図 2 A) と、*C. merolae* のスプライシング酵素遺伝子を大腸菌に導入した。(2) 自己切断型リボザイムであるグループ I イントロンの配列を付加したマーカー遺伝子を構築した (図 2 B)。その際、イントロンの配列を2つに分断し、位置を入れ替えることで、マーカー遺伝子のコード領域を含む転写産物が環状化すると期待される。(1) または (2) の遺伝子セットを大腸菌細胞および大腸菌由来無細胞タンパク質合成系に導入し、mRNA の発現と環状化 (図 2 C) の確認を逆転写 PCR 法により行った。その後、環状 mRNA からのマーカータンパク質の合成の有無をウェスタンブロッティングにより検出した。また、大腸菌および枯草菌の tRNA 遺伝子や tRNA のアンチコドンの塩基修飾酵素遺伝子の変異株を用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定を行い、翻訳活性を促進または抑制する遺伝子を同定した。特に枯草菌では翻訳活性を促進する変異が複数見出された。そのような変異を組み合わせた株を作製し、より高いタンパク質合成能を示す株の探索を行った。

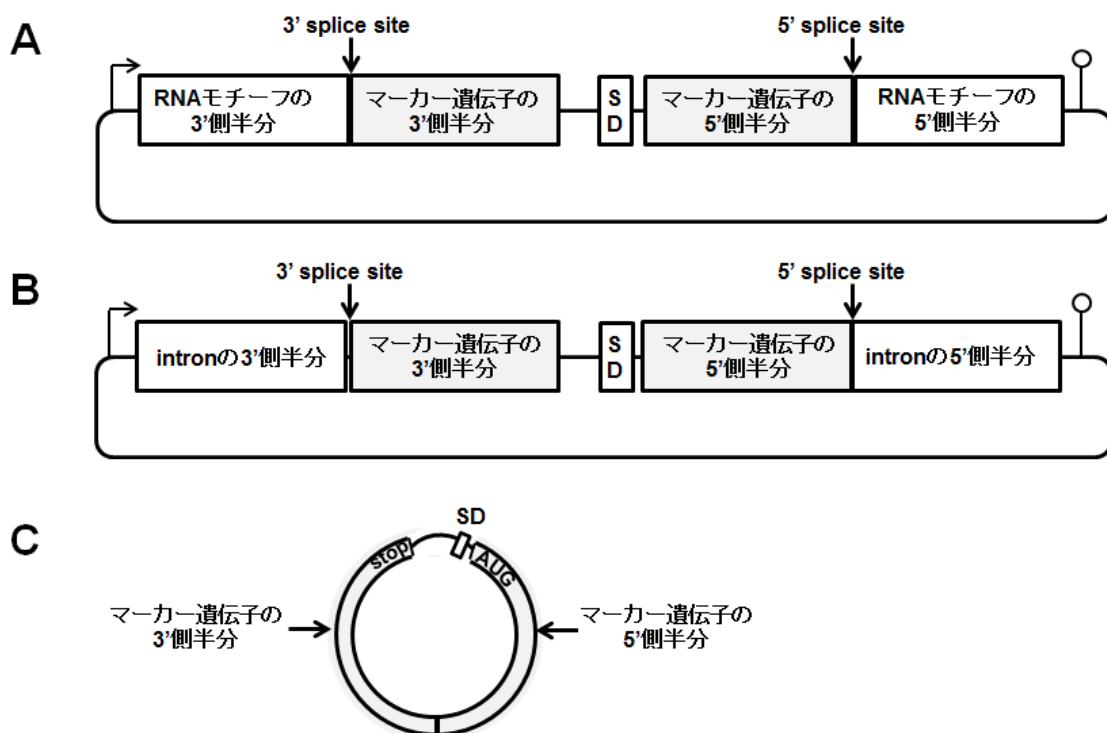


図2 (A) tRNA イントロンスプライシング装置および (B) 変異型グループ I イントロンに依存した (C) 環状 mRNA の形成。

## 結果

*C. merolae* の tRNA スプライシング酵素遺伝子を大腸菌に導入したが、活性型の酵素の発現は見られず、発現を誘導した大腸菌細胞には生育阻害を引き起こした。当該酵素は複数のサブユニットからなり、特定のサブユニットの発現が見られないことから、活性型のホロ酵素を形成できなかったと考えられる。一方、変異型グループ I イントロンの配列を付加したマーカー遺伝子を大腸菌細胞および大腸菌由来無細胞タンパク質合成系に導入したところ、環状 mRNA の形成および環状 mRNA にコードされたマーカータンパク質の発現が確認された。

tRNA やアンチコドン修飾の欠損が翻訳活性に与える影響を解析したところ、枯草菌の、特に4つのコドンが一つのアミノ酸を指定する four-codon-box では、対応する tRNA のアンチコドンの種類が少ない方がそのコドンボックスの翻訳効率が高いことが分かった。また、それらを組み合わせた多重変異株では翻訳活性がさらに上昇した。一方、大腸菌ではそのような現象は観察されず、対応する tRNA 遺伝子やアンチコドン修飾酵素遺伝子は枯草菌の生育に必須であり、それらの発現を抑制した変異株ではタンパク質合成活性が著しく低下し、生育が阻害された。大腸菌と枯草菌のコドン認識機構の根本的な違いが明らかとなった。

## 結論

tRNA スプライシング酵素に依存した環状 mRNA の合成には至らなかった。本研究で用いた *C. merolae* のリボヌクレアーゼは、大腸菌細胞内では適切にフォールディングされなかったか、大腸菌細胞内の非特異的な RNA 切断を引き起こしたのかもしれない。今後は、古細菌由来のスプライシング酵素を用いた系の構築を試みる。一方、グループ I イントロンの自己切断能に依存した環状 mRNA によるタンパク質合成が *in vivo* および *in vitro* で確認されたことから、この反応系が今後の解析に有用であることが分かった。現在、翻訳開始を促進する配列因子を導入した mRNA の作製を進めている。

大腸菌では tRNA 遺伝子の多くが生育に必須であり、非必須な tRNA でも欠損させるとその翻訳活性が大きく低下する。tRNA、すなわちアンチコドンの種類が減少すると翻訳活性が低下するという同様の現象は、これまで解析された他のバクテリアでも知られており<sup>4)</sup>、tRNA の種類や発現量を増やすことで翻訳量が増加すると考えられていた。本研究のように、アンチコドンの種類を減らすことで翻訳活性が上昇した結果は、あらゆる生物において初めての報告であり、枯草菌の特殊な遺伝暗号翻訳機構が明らかとなった。今後は、環状 mRNA の合成系を当該の枯草菌株や枯草菌の無細胞タンパク質合成系に導入し、より高いタンパク質合成能を有するタンパク質合成系の構築を試みるとともに、特に枯草菌の翻訳活性の特殊性の解明を目指す。

## 文献

- 1) Perriman R and Ares M Jr. (1998) Circular mRNA can direct translation of extremely long repeating-sequence proteins *in vivo*. *RNA* **4**: 1047–1054.
- 2) Abe N, Hiroshima M, Maruyama H, Nakashima Y, Nakano Y, Matsuda A, Sako Y, Ito Y, and Abe H (2013) Rolling Circle Amplification in a Prokaryotic Translation System Using Small Circular RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**: 7004 –7008.
- 3) Soma A (2014) Circularly permuted tRNA genes: their expression and implications for their physiological relevance and development. *Front Genet.* **5**:63. eCollection.
- 4) Näsvalld JS, Chen P and Björk GR (2007) The wobble hypothesis revisited: Uridine-5-oxyacetic acid is critical for reading of G-ending codons. *RNA* **13**: 2151-64.