

## コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系における RNA

愛媛大学ベンチャービジネスラボラトリー

牧野 伸一

### 1.1 生物における mRNA の役割

細胞内におけるタンパク質合成では、セントラルドグマとして知られている通り、遺伝情報は DNA から RNA、そしてタンパク質へと変換される。この情報の流れ自体は単純なものに見える、これではまだ生物の複雑さを十分にイメージできないものと思う。実際、一見単純なこれらの反応を積み重ねて生物として存在するために、数多くの種類のタンパク質が必要に応じた量やタイミングで合成される必要がある。この制御こそが、生物の複雑さをよく表しているとも考えられる。こうした制御は主として、多くの遺伝子が存在するゲノム DNA から、特定の領域が選ばれ、その遺伝情報を持った mRNA が転写される段階で行われていると考えられている。つまり、ある時にタンパク質合成が必要な遺伝子があったとすると、そこから mRNA が合成され、タンパク質に翻訳される。そして、別のタンパク質を合成する時には、また別の mRNA が合成され、タンパク質に翻訳される。別のタンパク質を合成する時に、前のタンパク質の合成がもう必要でない場合、前の mRNA は邪魔になってしまう。それを避けるために、それぞれの mRNA は使用後に迅速に分解される仕組みが、細胞内には存在している。このように細胞内では、mRNA は特定のタンパク質合成のためにだけ転写され、それ自体は残らない、言わば「使い捨て」のものである。

一方、無細胞タンパク質合成系では、どうなっているだろうか。通常、合成したいタンパク質は1種類で、その遺伝子から、*in vitro* transcription により、特定の mRNA だけを合成する。その mRNA 溶液を細胞抽出液と混ぜて、目的のタンパク質のみを翻訳反応により合成する。この場合、別のタンパク質を同じ溶液中で合成する必要は無いので、使用後の mRNA を分解する必要は無い。しかし、細胞抽出液とは、細胞内同様の反応を起こさせるために、基本的には細胞をすり潰しただけの溶液である。そのため、ここでは翻訳反応だけを起こしたいが、それと同時に細胞内同様に mRNA 分解反応も起こってしまう。この mRNA 分解を抑えることが出来れば、効率良くタンパク質合成が出来るようになるかもしれないと考えた。

### 1.2 タンパク質合成反応液中での RNA 分解

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系において、加えた mRNA の安定性を調べた。32P で RI ラベルした mRNA をタンパク質合成反応液と混ぜ、そこから RNA を精製し、その中に含まれる RI 残存量を測定した。その結果、大部分の mRNA は短時間のうちに分解されていることがわかった。

RNA 分解酵素は、その活性から大きく分けて2種類、endoribonuclease と exoribonuclease とがある。endoribonuclease は RNA 鎖の途中で切断し、exoribonuclease は RNA 鎖の末端から分解する。通常、細胞内には両方の酵素が存在している。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系において、RNA 分解がどのように起こっているのかということを考えたとき、次に挙げるようなヒントになる実験事実があった。

タンパク質合成に用いる mRNA は、タンパク質をコードしている ORF と、その上流である 5'側に翻訳促進配列、下流 3'側にはある程度の長さの非翻訳領域 (UTR; untranslated region) が必要である。この 3'-UTR の長さが、短いとタンパク合成量が少なく、長くするにつれて、ある程度までタンパク合成量が増加することが知られている。このことより、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系において、末端からの exoribonuclease による分解が、タンパク質合成量を左右するほどの影響を及ぼしているのではないかと考えた。

### 1.3 環状 RNA

RNA の末端からの分解を抑える一つの方法として、末端をなくしてしまえばいいのではないかと考えた。RNA は 3', 5'間にリン酸を介して鎖状につながっている分子である。それゆえ、3'末端と 5'末端を、通常の RNA 鎖と同様につないで環状にしてしまえば、末端の無い RNA が作れる。このような RNA であれば、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系において安定に存在させることができるかもしれない。そこで、環状 RNA を合成し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に加えてみることにした。

RNA の環状化の方法としては、いくつかあるが、T4 DNA ligase を用いる方法で行った。T4 DNA ligase は、2本鎖の DNA や RNA を基質とし、核酸の連結反応を触媒する酵素として知られている。RNA の両末端配列に相補的な 1本鎖の DNA を用いて、両末端を近接させた部分的 2本鎖を形成させることで、T4 DNA ligase による連結反応を行った。この反応による産物は、自己環状化した目的の RNA と、分子間で反応した RNA などが混ざっている。反応液を変性条件下で電気泳動すると、いくつかのバンドが見られた。どのバンドが目的の環状 RNA であるかを確認するために、末端 RI ラベル化反応を行ったところ、通常の RNA の染色では見えているが、RI ラベルは入らなかったバンドがあった。このバンドが環状 RNA であることは、電気泳動時に特異な移動度を示すことによっても確認された。この環状 RNA を電気泳動後のゲルから切り出して精製した。

環状 RNA をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に加えて、その RNA 安定性を調べた。その結果、予想通り、環状 RNA は同じ配列の直鎖状の RNA に比べて安定に存在していた。末端をなくしたことで、分解される速度を遅くすることが出来たと考えられる。この結果から、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系においては、endoribonuclease よりも、末端からの exoribonuclease による分解が RNA 分解の大部分を占めているのではないかと推測された。しかし、安定に存在させることができた環状 RNA からのタンパク合成は、ほとんど見られなかった。

mRNA が末端を持たないことと、タンパク合成が見られないこととの関係を調べるために、環状 RNA を切断して新たに末端を作り出した場合のタンパク合成能を調べた。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系において、DNA と RNA 間で形成された 2 本鎖部分の RNA を切断する活性である RNase H 様活性が知られている。この内在の活性を利用して、特定の配列に相補的な 1 本鎖 DNA を混ぜることで環状 RNA を配列特異的に切断し、タンパク合成が行われるかどうかを調べた。その結果、RNA の切断により、わずかにタンパク合成が見られた。以上のことから、タンパク合成においては、RNA の末端が重要であることが示唆された。

## 2.1 コムギ胚芽 RNA ligase

コムギ胚芽中には、RNA の末端をつなぐ酵素である RNA ligase が存在する。この酵素は、5'-水酸基末端、2',3'-サイクリックリン酸末端を基質とし、3'-5' リン酸ジエステル結合でつなぎ、2',3'-サイクリックリン酸由来の 2'-リン酸を残す。真核生物の tRNA にはイントロンを持つものがあり、その tRNA のイントロン除去とその後にできた末端をつなぐことは必須であるため、RNA ligase による反応は真核生物一般に保存された不可欠な反応であると考えられている。このように tRNA のイントロン除去後の連結反応に使われていることは確実と考えられているが、一方でコムギ胚芽中の RNA ligase は、基質特異性が広く、tRNA 以外の RNA をも基質とすることができることも知られている。そのことから、コムギ胚芽 RNA ligase は tRNA のイントロン除去後の連結反応以外にも、細胞内で他の何らかの RNA を基質にした反応に使われていることが予想される。mRNA の代謝回転などにも何らかの関与があるかもしれない。また、RNA の修飾酵素としても応用可能性がある。この酵素の存在は知られているが、そのアミノ酸配列は未知のである。そこで、コムギ胚芽無細胞翻訳系で酵素を合成して実験に用いるために、まずコムギ胚芽中からこの酵素を精製し、タンパク質の部分配列を決定し、その情報を用いて遺伝子をクローニングすることにした。

## 2.2 RNA ligase 活性検出用基質 RNA

酵素を精製する上で、活性検出法が簡便なほうが精製条件を検討しやすく、都合が良い。こ

れまで行われていた RNA ligase の活性検出法は、RI を使用し、さらに別の酵素も使用する手間のかかるものだった。前半の研究において、電気泳動での環状 RNA の挙動に関する知識や経験を生かし、環状 RNA を直接電気泳動で検出する方法を試みた。基質とする RNA は自己切断活性を持つ ribozyme が、この酵素の基質となる 5'-水酸基末端、2',3'-サイクリックリン酸末端を生成することを利用し、5'側と 3'側の両方にそれぞれ ribozyme 配列を組み込んだ RNA を in vitro 転写反応により合成したものを使用した。この基質 RNA を使用し、反応液の組成をある程度検討した結果、活性検出反応後に反応液をそのまま電気泳動するという比較的簡単な RNA ligase の活性検出法を確立した。

### 2.3 RNA ligase 精製

コムギ胚芽抽出液から、超遠心分画、硫酸分画、疎水、イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせて、先ほどの基質 RNA を環状化する活性画分の精製を行った。

夾雑タンパク質と思われるものは完全には除けなかったが、カラムからの溶出画分で活性と対応するように見えるタンパク質の band が見られた。そのタンパク質の band は、マーカータンパク質との比較で約 110 kDa に位置し、精製した画分中では、SDS-PAGE 上で全タンパク質の約 50%を占めていた。

### 2.4 RNA ligase の遺伝子 cloning

SDS-PAGE 後に band を切り出し、lysylendopeptidase による反応で Lys 残基の C 末側のペプチド結合を切断し、得られたペプチド断片を逆相クロマトグラフィーにより分離分取した。そして、protein sequencer を用いてペプチド配列を決定した。

コムギ胚芽中の mRNA から cDNA を合成し、決定したペプチド配列から設計した DNA primer を用いた PCR により、遺伝子内部の断片を得た。それを元にして、RNA ligase の遺伝子を単離し、配列決定した。この過程で、コムギ胚芽中から相同性のかなり高い 3 種類の RNA ligase 遺伝子が単離された。データベースに対する検索で、シロイヌナズナ、イネの cDNA 配列の中に相同性の高いものが見つかった。ただし、これらの配列は、RNA ligase であるとは知られていなかった。酵母の tRNA ligase とは、データベース上での相同性検索によって相同性は拾い上げられなかったが、並べて比べるとある程度の相同性は見受けられた。決定した塩基配列から、アミノ酸残基数は 1116、推定 124 kDa で、精製酵素の SDS-PAGE によるサイズと違いがあった。

### 2.5 RNA ligase の N 末端 processing

得られた遺伝子を用いて、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系においてタンパク合成を行っ

た。その結果、合成後の SDS-PAGE では、全長のサイズ以外に約 110 kDa の位置にも band が見られた。全長サイズのタンパク質は溶解性が低かったが、約 110 kDa のタンパク質は溶解性が高かった。そこで、この酵素を C 末端 GST 融合タンパク質として精製し、切断されたと思われる N 末端配列を決定した。これらの結果から、この酵素は合成後に N 末端が切断される性質があることが推測された。

## 2.6 RNA ligase の部分タンパク合成と活性の分割

反応性から同じ種類の酵素と言われている酵母の tRNA ligase では、N 末端側から adenylyltransferase、5'-kinase、2',3'-cyclic phosphodiesterase の 3 つの機能ドメインからなる酵素であることが知られている。今回配列を決定したコムギ胚芽 RNA ligase では、酵母の tRNA ligase とかすかな相同性があるだけなので、同様のものかどうかを調べてみることにした。そのために、全長を含まない各種部分タンパクを、split-primer PCR 法で鋳型を合成し、コムギ胚芽無細胞タンパク合成系で合成した。

その結果、酵母の tRNA ligase と同様に C 末端側の部分タンパクから、5'-kinase、2',3'-cyclic phosphodiesterase などの活性を確認した。

## 3. まとめ

タンパク質合成中の mRNA 分解による影響を減らすために、環状 RNA を合成、精製し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に加えて、挙動を見たところ、比較的安定に存在させることが出来た。ただし、その環状 RNA からのタンパク合成は見られなかった。その結果から、タンパク合成には、RNA の末端が重要であることが示唆された。

コムギ胚芽 RNA ligase を精製し、その遺伝子塩基配列を決定した。そして、cloning した RNA ligase 遺伝子を用いて合成したタンパク質から RNA ligase 活性を検出した。さらに部分タンパクを合成することで、RNA 末端修飾活性を分離して検出できた。

以上の研究で得られた新たな知見や酵素は、今後 mRNA に関する研究に利用され、役立つことが期待される。