

PROCESSING PATHWAY OF DISRUPTED TRNAS IN A PRIMITIVE RED ALGA *CYANIDIOSCHYZON MEROLAE*.

Saori Hiromoto¹ and Akiko Soma^{1*}

¹Graduate School of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271-8510, Japan.
soma@chiba-u.jp

(Received: 27, July, 2017 Accepted: 1, November, 2017)

Abstract

Processing of precursors of nuclear *cis*-splicing tRNA has been considered to start with the end maturation at the acceptor stem, followed by the intron splicing. The sequences around the intron-exon junctions in pre-tRNAs generally form a bulge-helix-bulge (BHB) motif, which is specifically recognized by the tRNA-splicing endonuclease. In a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, we have found that the maturation of circularly permuted pre-tRNAs, in which the 3'-half of the tRNA coding sequence lies upstream of the 5'-half starts with the processing of the BHB motif at the junctions of termini to form a circular RNA intermediate. This suggested that the processing of BHB motifs precedes that of the acceptor stem in *C. merolae*. Here, we performed sequencing analyses for processing intermediates of various types of intronic tRNAs by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by the sequencing of the PCR products to clarify maturation pathway. Results showed that the removal of introns occurred before the maturation of acceptor stem. Such non-canonical processing pathway may have been prerequisite for the development of permuted tRNA genes in *C. merolae* because permuted pre-tRNAs can be processed via a continuous RNA string, but not fragments, during maturation.

(Keywords) tRNA processing; intron; BHB motif

始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における 分断化 tRNA のプロセッシング機構

271-8510 千葉県松戸市松戸 648

千葉大学園芸学研究所

廣本 沙織¹、相馬 亜希子^{1*}

Fax: +81-47-308-8871

Email: soma@chiba-u.jp

1. 緒言

tRNA は様々な転写後プロセッシングを受けて成熟体となり、高度に保存されたクローバーリーフ様の 2 次構造を形成する。そのため、ゲノム配列からの tRNA 遺伝子の予測においては、検索対象の配列がクローバーリーフ様構造を形成しうるかどうかに基づく解析方法が長らく採用されてきた。近年、*Trans*-splicing tRNA や Non-canonical *cis*-splicing tRNA および Circularly permuted tRNA が発見され (Fig. 1)、これをきっかけに特殊な分断化 tRNA 遺伝子に対応した検索プログラムも用いら

れるようになった [1-5]。また、そのような遺伝子群の発現機構の解析から、新奇プロセッシング経路の存在が明らかとなり、機能性 RNA の遺伝子構造と転写後プロセッシングの多様性が注目されている。

Permuted tRNA 遺伝子は、始原紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 10D の核ゲノムから初めて同定され、その後、単細胞藻類 6 種と古細菌 1 種のゲノムにもその存在が確認された [3,6]。Permuted tRNA 遺伝子では tRNA をコードする領域が 2 つの断片に分かれており、tRNA の 5' 側半分と 3' 側半分をコードする領域が入れ替わっている (Fig. 2)。この遺伝子から転写された前駆体 tRNA は、環状 RNA 中間体を介した RNA 断片の「入れ換え反応」により、通常のクローバーリーフ様構造を取りうる成熟体 tRNA となる [3]。Permuted tRNA の前駆体の末端は 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する (Fig. 3A)。BHB モチーフは tRNA のイントロン-エキソンの境界にも見られ、tRNA-splicing endonuclease (Sen) の認識部位となっていることから [7]、前駆体 Permuted tRNA の BHB モチーフがまず Sen に切断され、その末端を RNA ligase が結合することで環状化すると考えられる。次に、環状 RNA 中間体のアクセプターシステムが RNase P や tRNase Z といった一般的な Endonuclease によるプロセッシングを受け、新たに生じた 3' 末端に CCA 配列が付加されることで成熟体 tRNA となる [3,6]。あたかも一本の鎖をつなげて輪にし、別の部位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。

環状 RNA 中間体を介したプロセッシングの生物学的意義は不明であるが、当該成熟化経路が *C. merolae* の特異な tRNA 遺伝子の成立と維持に関与した可能性は高い。*C. merolae* の *Cis*-splicing tRNA のプロセッシング経路は明らかになっていないが、Permuted tRNA の成熟化を考慮すると、BHB モチーフ、すなわちイントロンのスプライシングが先行すると予想される。一方、酵母の *Cis*-splicing tRNA の成熟化過程においては、アクセプターシステムのプロセッシングがイントロン (BHB モチーフ) のスプライシングに先行することが分かっている (Fig. 4A) [8,9]。*C. merolae* の特異な tRNA プロセッシングの全体像を解明するため、本研究では、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) とシーケンシングにより *Cis*-splicing tRNA のプロセッシング中間体の配列を解析し、成熟化経路の同定を試みた。

真核生物の Sen は tRNA の特定の部位のイント

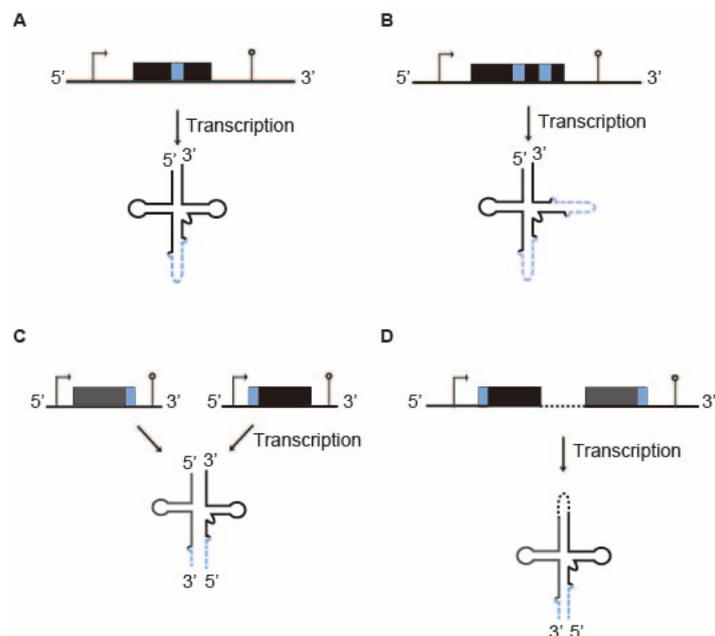


Fig. 1. The BHB-mediated disruption of tRNA. (A) Canonical *cis*-splicing tRNAs contain a single intron exclusively at the canonical position (positions between 37 and 38) 3' adjacent to the anticodon. The intron-exon junctions in the precursor tRNAs comprise a bulge-helix-bulge (BHB) motif, which is the determinant for the tRNA-splicing endonuclease. (B) Non-canonical *cis*-splicing tRNAs contain a single or multiple introns at various positions in the cloverleaf structure. (C) *Trans*-splicing tRNAs are composed of two or three RNA fragments and found only in archaea. (D) Circularly permuted tRNAs are found in six unicellular algae and one archaea. The termini of the pre-tRNA comprise the BHB motif.

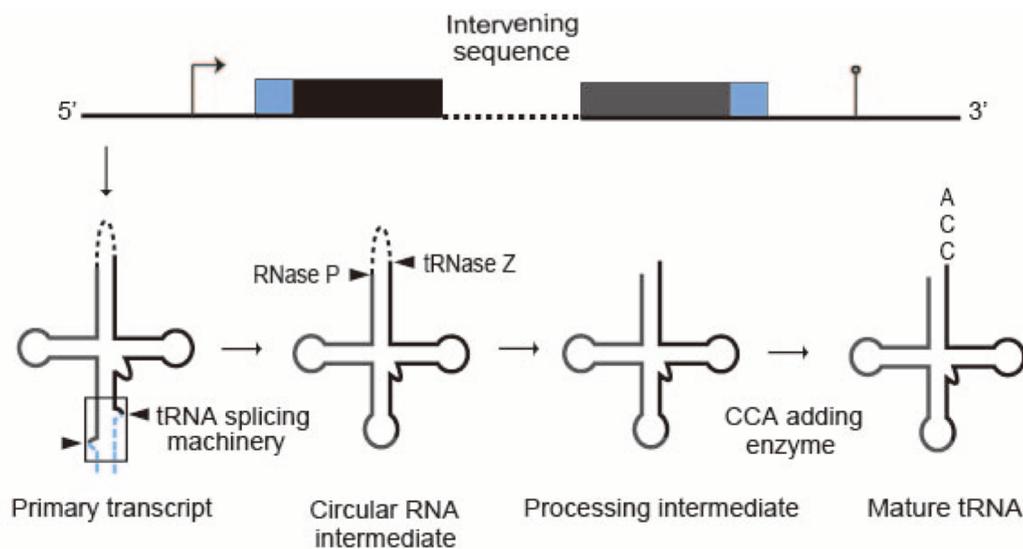


Fig. 2. A model for the maturation of the permuted pre-tRNAs. Maturation of the permuted pre-tRNA starts with processing of the BHB motif (boxed) by the tRNA-splicing machinery, resulting in formation of a circular RNA intermediate. The intervening sequence is removed by RNase P and tRNase Z, followed by the CCA-addition. Fig. 3F from Reference 3 was arranged.

ロンのみを認識するため、藻類以外の真核生物のイントロン挿入部位は一か所に限定される[10,11]。また、真核生物ではイントロンを含む tRNA はそれほど多くなく、酵母では全 tRNA 遺伝子 (286 コピー) のうち *Cis*-splicing tRNA 遺伝子 (59 コピ

ー) が占める割合は 20%程度である。一方、*C. merolae* の核ゲノムでは tRNA 遺伝子全体の約 60% がイントロンを持ち、かつ、挿入位置が限定されていない[4]。さらに、複数のイントロンをもつ tRNA や、Permuted 構造をもつ *Cis*-splicing tRNA も

存在する (Fig. 3B)。特殊な *Cis*-splicing tRNA のプロセシングの解明により、最小クラスのゲノムを持つ *C. merolae* に大規模な tRNA 遺伝子の分断化が生じた背景の理解につながると期待される。本実験では、1, 2 または 3 つのイントロンを含む tRNA^{Leu}(CAA), tRNA^{Phe}(GAA), および tRNA^{Leu}(UAU) について解析を行った。

2. 方法

実験方法は引用文献 [3] にしたがった。

2.1 *C. merolae* 細胞からの粗画分 RNA の抽出

42°C、連続光下で対数増殖期まで培養した *C. merolae* の細胞から、ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて粗画分 RNA を得た。

2.2 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.1 の粗画分 RNA と解析対象の tRNA に対応する Reverse primer (3'-p) を用いて、ReverTraAce (TOYOBO) による逆転写反応を行った。得られた cDNA に対し、対応する Reverse primer (3'-p) と Forward primer (5'-p) を用いて、Blend Taq (TOYOBO) による PCR 反応を行った。増幅された

DNA 断片を 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

L(CAA)3'-p1: 5'-CGACTTGCCACCGTCTTGTG-3'

L(CAA)5'-p1: 5'-GCTTGACACCCCTCGCACAG-3'

F(GAA)3'-p1: 5'-TTGCCATCGCGCGGGATC-3'

F(GAA)5'-p1:

5'-TGCAATCGATATCACATGAATGTTGC-3'

I(UAU)3'-p1: 5'-TATATCCGTGCGCGTACTCCC-3'

I(UAU)3'-p2: 5'-TACTCCCGGCGAGGCTC-3'

I(UAU)5'-p1:

5'-GCGACGCTTGTCCGTTTTCGACGCAC-3'

2.3 DNA 断片のクローニングと配列解析

pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を用いて 2.1 の DNA 断片をクローニングし、Big Dye Cycle sequencing Mix (ABI) によるシーケンシングおよび配列解析を行った。各 DNA 断片に対し、5 個以上のクローンの解析を行った。

3. 結果

3.1 tRNA^{Leu}(CAA)

前駆体 tRNA^{Leu}(CAA) のアクセプターステムに隣接する 3'-トレーラー配列と 5'-リーダー配列にそれぞれ相補的な L(CAA)3'-p1 と L(CAA)5'-p1 を

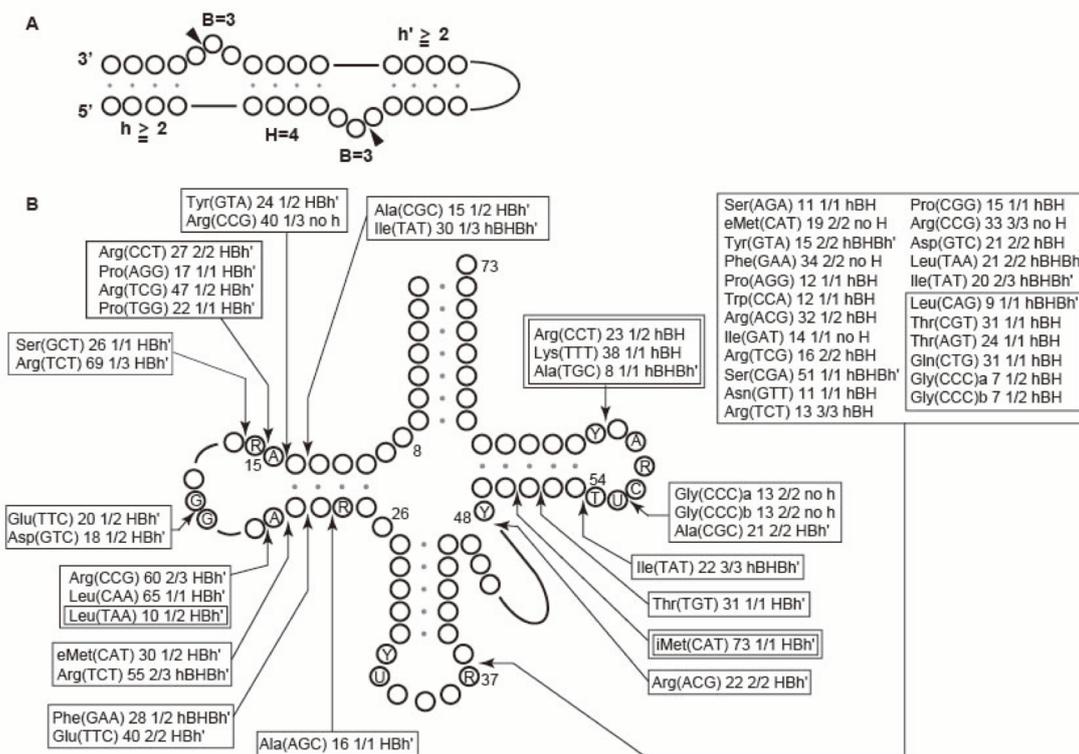


Fig. 3. Distribution of BHB motifs in intronic and/or permuted tRNAs in *C. merolae*. (A) The BHB motif is classified by one or two 3-nt-bulges (denoted as B=3) separated by a central 4-bp-helix (denoted as H=4) and flanked by two helices (denoted as h or h'), each with more than two base-pairings. (B) Arrows indicate the positions of the BHB motifs. The length of the intron, number and type of BHB motifs is indicated for each tRNA. For example, "Ile(TAT) 22 3/3 hBHBh'" at the position between 53 and 54 means that the BHB is from tRNA^{Leu}(UAU), is 22 nt long, and is the third of three BHB motifs. BHB motifs at the termini of the permuted pre-tRNAs are shown in double squares. The numbering of the tRNA positions follows that outlined in Reference 16. Fig. 2 from Reference 4 was arranged.

用いて、RT-PCR およびその DNA 配列の解析を行ったところ (Fig. 5A)、(i) 5'-リーダー配列、3'-トレーラー配列およびイントロンを含む前駆体 tRNA (Pre-tRNA^{Leu}) に加え、(ii) 5'-リーダー配列と 3'-トレーラー配列を残したままイントロンが除去されたプロセッシング中間体 (Pre-tRNA^{Leu}Δintron1) に由来する PCR 産物が検出された (Fig. 5B, Fig. 6A)。以上の結果から、tRNA^{Leu}(CAA)のイントロンのスプライシングは、アクセプターシステムのプロセッシングに先行することが分かった。

3.2 tRNA^{Phe}(GAA)

ターミネーター配列の位置を考えると、2 つのイントロンを有する tRNA^{Phe}(GAA)の 3'-トレーラー配列は非常に短いと予想される (Fig. 5C)。そこで、前駆体 tRNA^{Phe}(GAA)の 3'側領域に相補的な F(GAA)3'-p1 と 5'-リーダー配列に相補的な F(GAA)5'-p1 を用いて RT-PCR を行った。PCR 産物の配列解析の結果、(i) 5'-リーダー配列とイントロン 1,2 を含む前駆体 tRNA (Pre-tRNA^{Phe})、(ii) イントロン 1 が除去された中間体 (Pre-tRNA^{Phe}Δintron1)、および (iii) イントロン 1 と 2 が除去され

た中間体 (Pre-tRNA^{Phe}Δintron1,2) が検出された (Fig. 5D, Fig. 6B)。以上の結果は、tRNA^{Phe}(GAA)のイントロンのスプライシングが 5'-リーダー配列のプロセッシングに先行すること、また、イントロン 1 がイントロン 2 より先に除去されることを示唆する。

RT-PCR により、期待される前駆体や中間体とは異なるサイズのパンドが増幅された (Fig. 5D)。回収可能な PCR 産物の配列解析の結果、イントロンやエキソンが途中で切断された tRNA^{Phe}(GAA)の配列に一致した。逆転写の際に鋳型となった tRNA 分子の高次構造の変性が不完全なために合成された cDNA に由来する PCR 産物や、既定の位置でスプライシングされず生じた tRNA^{Phe} に由来する PCR 産物と推測される。

3.3 tRNA^{Ile}(UAU)

3 つのイントロンを持つ前駆体 tRNA^{Ile}(UAU)の 3'-トレーラー配列と 5'-リーダー配列に相補的な I(UAU)3'-p1 と I(UAU)5'-p1 を用いて RT-PCR を行い (Fig. 5E)、その DNA 配列を解析した。その結果、(i) 3 つのイントロンすべてが除去された中間体

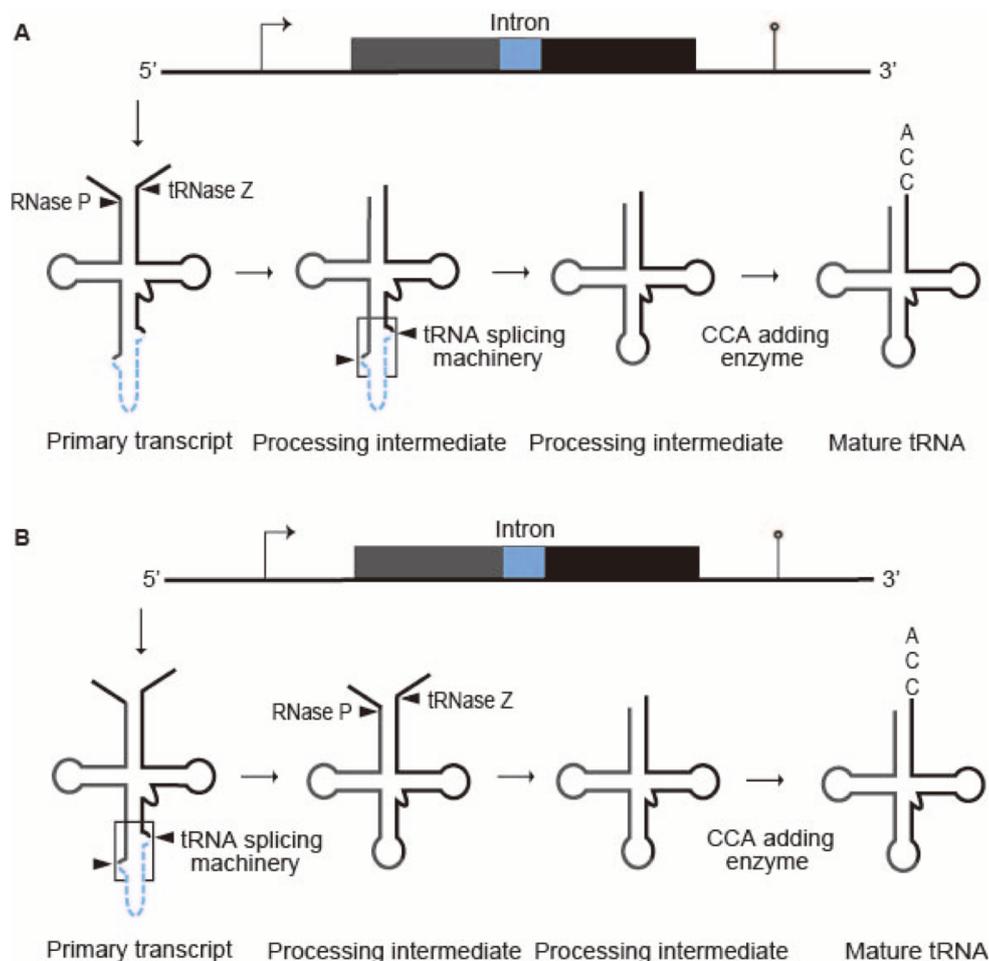


Fig. 4. Comparison of the processing pathways for cis-splicing pre-tRNAs in (A) yeast and (B) *C. merolae*.

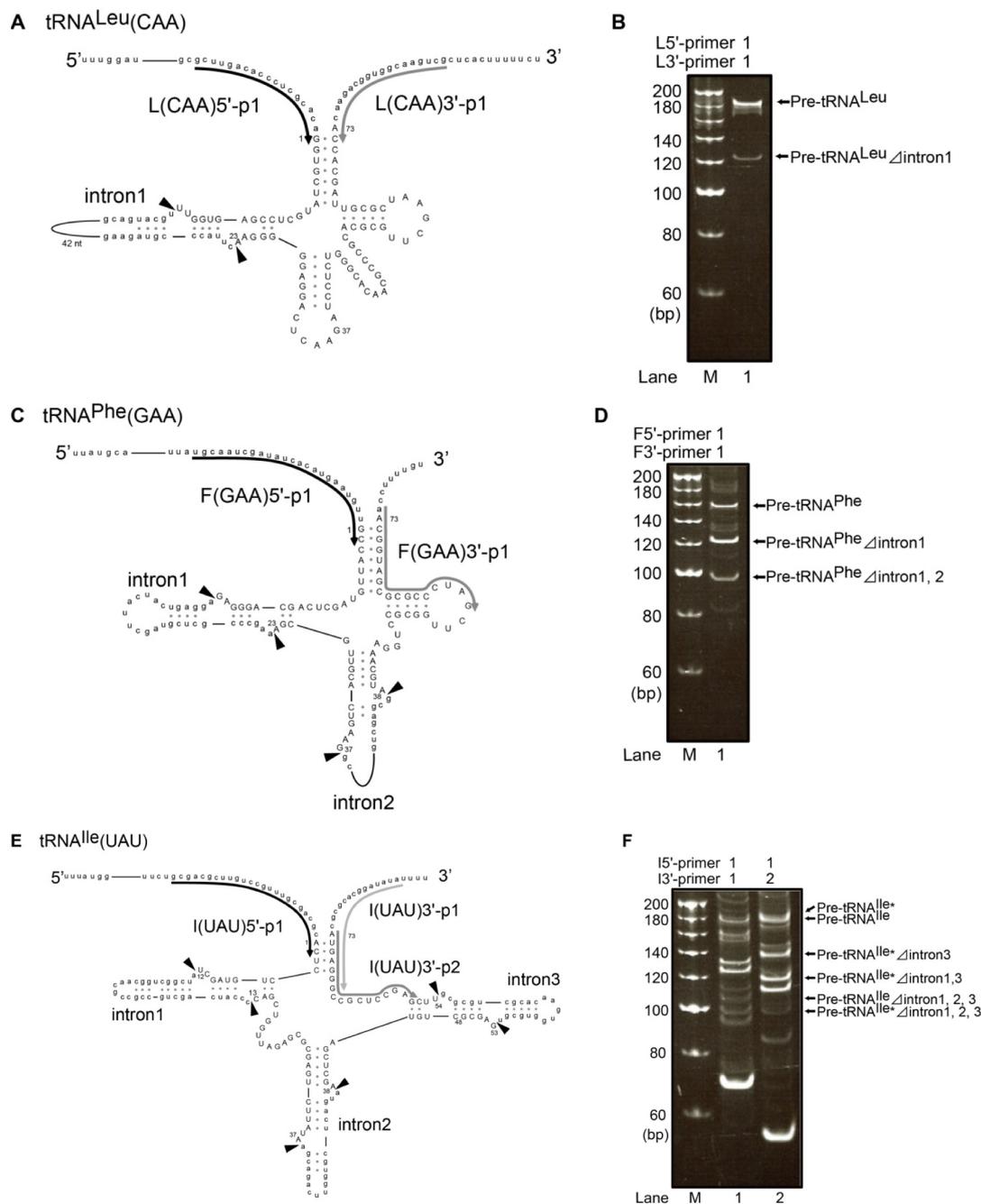


Fig. 5. RT-PCR amplification of precursors and processing intermediates of *C. merolae* cis-splicing tRNAs. Inferred secondary structures of three pre-tRNAs are shown. (A) tRNA^{Leu}(CAA) with a single intron at the canonical position 37/38. (C) tRNA^{Phe}(GAA) with two introns, one in the D-stem (intron 1) and the other at 37/38 (intron 2). (E) tRNA^{Ile}(UAU) with three introns, one in the D-stem (intron 1), one at 37/38 (intron 2), and the third in the TΨC-loop (intron 3). Pre-tRNA^{Ile} was amplified with 5'-p1 and 3'-p1, while Pre-tRNA^{Ile*} with 5'-p1 and 3'-p2. 5'- and 3'-primers for RT-PCR are indicated. Arrowheads indicate the positions to be processed. Intron sequences are shown in lower case. The numbering of the tRNA positions follows Reference 16. (B, D and F) PCR products amplified from the cDNA of precursors and processing intermediates are indicated. Annotation of each PCR product was based on gel purification of the bands, cloning and sequencing analysis. Lane M: DNA molecular marker (20 bp Ladder).

(Pre-tRNA^{Ile} Δintron1,2,3) が検出された (Fig. 5F, Fig. 6C)。5'-リーダー配列および3'-トレーラー配列を残したままイントロンが除去された中間体の存在は、tRNA^{Leu}(CAA)や tRNA^{Phe}(GAA)と同様、

tRNA^{Ile}(UAU)のイントロンのスプライシングがアクセプターシステムのプロセッシングに先行することを示唆する。

I(UAU)3'-p1 と I(UAU)5'-p1 を用いた RT-PCR に

より、1 つまたは 2 つのイントロンが除去されたプロセシング中間体と予想されるバンドも増幅されたが、その DNA 断片の配列解析により、イントロンやエキソンが途中で切断された配列のクローンが検出された。逆転写の際に鋳型 tRNA の高次構造の不完全な変性により合成された cDNA に由来する PCR 産物や、tRNA^{Ile}(UAU)内の類似配列へのプライマーの非特異的な結合により生じた PCR 産物と予想される。または、既定の位置でスプライシングされなかった tRNA に由来する PCR 産物の可能性も考えられる。そこで、I(UAU)3^{p2} と I(UAU)5^{p1} を用いて RT-PCR を行った (Fig. 5E)。PCR 産物の配列解析の結果、(ii) 5'-リーダー配列と 3 つ全てのイントロンを含む前駆体 tRNA (Pre-tRNA^{Ile*})、(iii) イントロン 3 が除去された中間体 (Pre-tRNA^{Ile*} Δintron3)、(iv) イントロン 1 と 3 が除去された中間体 (Pre-tRNA^{Ile*} Δintron1, 3)、および (v) 3 つのイントロン全てが除去された中間体 (Pre-tRNA^{Ile*} Δintron1,2,3) が検出された (Fig. 5F, Fig. 6D)。以上の結果から、イントロン 3 が最初に除去され、続いてイントロン 1 が、最後にイントロン 2 が除去されると予想される。

4. 討論

C. merolae の Cis-splicing tRNA のプロセシング中間体の配列解析から、イントロン (BHB モチーフ) のスプライシングがアクセプターシステムのプロセシングに先行することが示された (Fig. 4B)。既知の真核生物に見られるようなアクセプターシステムのプロセシングが先行する経路の存在を完全には否定できないが、tRNA の末端を人為的に結合さ

せて RT-PCR を行った場合にも、イントロンを残したままアクセプターシステムがプロセシングされた中間体の検出には至っていないことから[4]、本研究結果が *C. merolae* での主たる経路であると考えられる。

真核生物の tRNA プロセシング経路は酵母においてよく研究されており、前駆体 tRNA は、核内に局在する RNase P、tRNase Z および CCA 付加酵素によりアクセプターシステムがプロセスされ、核外に輸送された後、ミトコンドリア外膜表面に存在する Sen によってイントロンが除去されることが分かっている[8]。このように、tRNA プロセシング経路はプロセシング酵素の局在場所に依存する。*C. merolae* の tRNA プロセシング酵素の細胞内局在は不明であるが、予測プログラムを用いた解析から、RNase P や tRNase Z が細胞質に存在する可能性が示唆された (Sugita, *et al.*, unpublished)。また、*C. merolae* の Sen にはオルガネラへの輸送を指示するシグナル配列は見出されない。したがって、*C. merolae* の前駆体 tRNA は BHB モチーフ (イントロン) のプロセシングを受けた後に、細胞質でアクセプターシステムがプロセシングされると予想される。5'-リーダー配列と 3'-トレーラー配列のプロセシングの順番に関わる LA タンパク質遺伝子 [8]が *C. merolae* ゲノムには見当たらないことから、5'-リーダー配列と 3'-トレーラー配列の切断の順番は無作為であるかもしれない。

2 つのイントロンを有する tRNA^{Phe}(GAA)では、イントロン 1 が除去された後にイントロン 2 が除去されることが分かった。イントロン 1 は典型的な BHB モチーフ (hBHBh')を形成し、イントロン

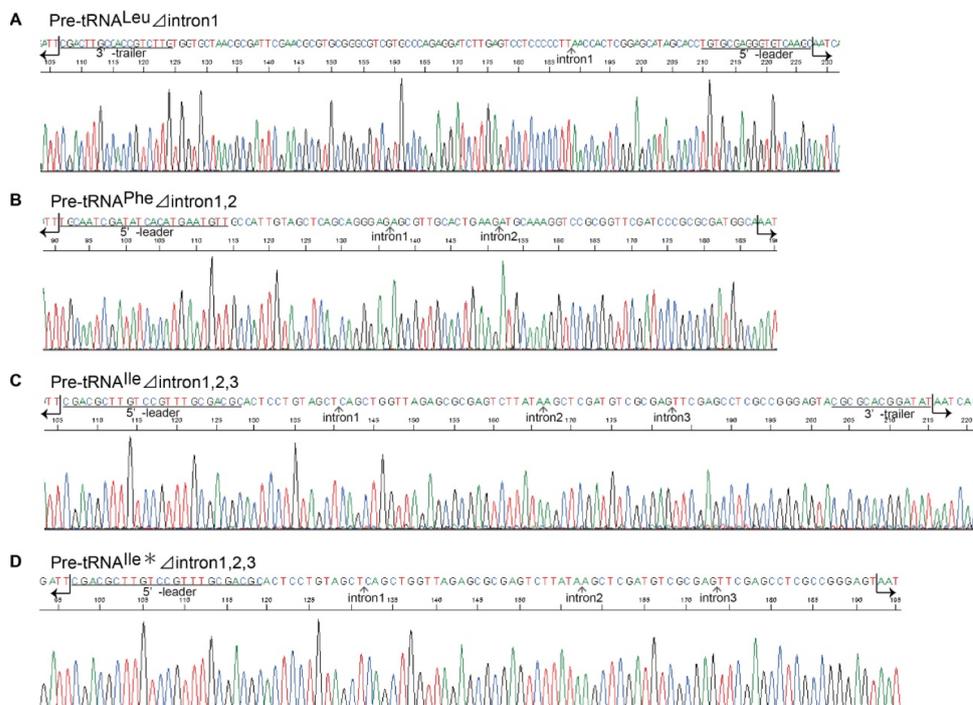


Fig. 6. DNA sequencing analysis of RT-PCR products of (A) Pre-tRNA^{Leu}(Δintron1), (B) Pre-tRNA^{Phe}(Δintron1,2), (C) Pre-tRNA^{Ile}(Δintron1,2,3) and (D) Pre-tRNA^{Ile*}(Δintron1,2,3).

2のように中央のヘリックスを形成しないBHBモチーフ (no H)よりも安定であるために、先にスプライシングされると予想される。tRNA^{le}(UAU)の3つのイントロンはいずれも安定な hBHBh' を形成しうが、イントロン2に比べてイントロン1と3の ΔG の値が小さい [4]。BHBモチーフの安定性にしたがってイントロンがスプライシングされるため、イントロン2の除去が最後になっていると考えられる。

C. merolae 以外の単細胞藻類においても Permuted tRNA は環状RNA中間体を介して成熟化することから、藻類ではBHBモチーフのプロセシングが先行する tRNA 成熟化経路が保存されている可能性が高い [12]。Permuted tRNA が環状RNA中間体を介して成熟化することで、プロセシングの途中で tRNA の断片同士が乖離するのを防ぎ、また、多様な生理活性を示す tRNA 由来の断片 (tRF; Transfer RNA-Related Fragments) [13]の生成を回避することが藻類の生育に有利に働いたのかもしれない。したがって、藻類における多数の Permuted tRNA 遺伝子群の成立は、このようなプロセシング機構と共進化したと推察される。今後は *C. merolae* の細胞に tRNA の断片を導入し、その影響を観察することで上述の可能性を検討することが必要である。*C. merolae* や藻類の tRNA プロセシング酵素の特性や細胞内局在の解明は、tRNA 遺伝子の進化の理解につながると考えられる。また、分断化 tRNA に結合するプロセシング酵素の解析により、ミニヘアピンに由来するとされるクローバーリーフ様構造の進化について、新たな知見が得られると期待される [14,15]。

5. 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 (25440003) および公益財団法人旭硝子財団の研究助成を受けて行われました。深く感謝いたします。また、*C. merolae* を用いた実験を行うにあたり、立教大学 黒岩常祥博士、および東京工業大学 田中寛博士にご協力を頂きましたのでお礼申し上げます。

引用文献

1. Randau, L., Münch, R., Hohn, M. J., Jahn, D. and Söll, D. Nanoarchaeum equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. *Nature* 433, 537-541 (2005).
2. Sugahara, J., Yachie, N., Sekine, Y., Soma, A., Matsui, M., Tomita, M. and Kanai, A. SPLITS: a new program for predicting split and intron-containing tRNA genes at the genome level. *In Silico Biology* 6, 411-418 (2006).
3. Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F. and Sekine, Y. Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science* 318, 450-453 (2007).
4. Soma, A., Sugahara, J., Onodera, A., Yachie, N., Kanai, A., Watanabe, S., Yoshikawa, H., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. and Sekine, Y. Identification of highly-disrupted tRNA genes in nuclear genome of the red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Sci. Rep.* 3, 2321 (2013).
5. Kanai, A. tRNA gene diversity in the three domains of life. *Front. Genet.* 5, 336 (2014).
6. Soma, A. Circularly permuted tRNA genes: their expression and implications for their physiological relevance and development. *Front. Genet.* 5, 63 (2014).
7. Abelson, J., Trotta, C. R. and Li, H. tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 273, 12685-12688 (1998).
8. Phizicky, E. M. and Hopper, A. K. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* 24, 1832-1860 (2010).
9. Hopper, A. K. Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 43-67 (2013).
10. Xue, S., Calvin, K., and Li, H. RNA recognition and cleavage by a splicing endonuclease. *Science* 312, 906-910 (2006).
11. Marck, C. and Grosjean, H. Identification of BHB splicing motifs in intron-containing tRNAs from 18 archaea: evolutionary implications. *RNA* 12, 1516-1531 (2003).
12. Maruyama, S., Sugahara, J., Kanai, A. and Nozaki, H. Permuted tRNA genes in the nuclear and nucleomorph genomes of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1070-1076 (2010).
13. Kumar, P., Kuscu, C. and Dutta A. Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends Biochem. Sci.* 41, 679-689 (2016).
14. Di Giulio, M. The origin of the tRNA molecule: Independent data favor a specific model of its evolution. *Biochimie* 94, 1464-1466. (2012).
15. Suzuki H., Kaneko A., Yamamoto, T., Nambo, M., Hirasawa, I., Umehara, T., Yoshida, H., Park, S-Y., and Tamura, K. Binding Properties of Split tRNA to the C-terminal Domain of Methionyl-tRNA Synthetase of Nanoarchaeum equitans. *J. Mol. Evol.* (2017).
16. Marck, C. and Grosjean, H. 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 (2002).