

[招待論文]

21世紀の生命科学における RNA研究のインパクト

Impact of RNA Biology on Life Science in the 21st Century

金井 昭夫

慶應義塾大学環境情報学部教授

Akio Kanai

Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Abstract: 20世紀末から様々な生物種でゲノムの全塩基配列が決定された。各研究分野において、その影響力は凄まじく、人類はこれら生物種の設計図を手に入れたと考えられる。一方、21世紀になってから、設計図の「解説」の途中経過として明らかにされたのは、想像だにできなかった膨大なノンコーディング RNA がゲノムにコードされていたことである。これらの RNA はタンパク質に翻訳されることなく、RNA のままで多様な生命現象に関わっている。さらに近年、古典的なノンコーディング RNA である tRNA (転移 RNA) の研究などにも新しい潮流がおしよせている。

Since the end of the last century, the complete genomic sequences of many organisms have been determined. The impact of these genome projects on the various fields of science has been enormous. It could be said that we now have in our hands “the blueprints of life” for these organisms. At the beginning of the 21st century, it became apparent that large numbers of noncoding RNAs are, unexpectedly, encoded in these genomes. These RNAs are not translated into proteins but act as riboregulators, and have had another huge impact on the life sciences. More recently still, a new tide of research into the classical noncoding RNAs, such as the transfer RNAs (tRNAs), has arrived.

Keywords: ノンコーディング RNA、RNA 結合タンパク質、tRNA、RNA プロセッシング、マイクロ RNA

non-coding RNA, RNA-binding protein, tRNA, RNA processing, microRNA

1 はじめに

東京都臨床医学総合研究所（現東京都医学総合研究所）にて、当時ゲノムが同定されて間もない C 型肝炎ウイルスの研究プロジェクトが開始されるというので、故野本明男先生から手紙を頂いたのを機会に、米国 NIH（米国国立衛生研究所）の留学生生活をきりあげ 1992 年の秋に帰国した。C 型肝炎ウイルスは重篤な病気を引き起こすウイルスであるのに加え、そのゲノムは一本鎖の RNA であったので、本ウイルス遺伝子の制御機構を考えることが、そのまま RNA 研究への扉を開くことにつながった。時代はゲノムプロジェクトが盛んになる数年前であったが、RNA の世界にふれるにつれ、この研究は特定のウイルスだけでなく多様な生物のゲノムレベルで行うべきだと思えるようになっていった。縁あって 1996 年の春から、科学技術振興機構（JST）の戦略的創造研究推進事業（ERATO）のプロジェクトにグループリーダーとして赴任することができた。ここでは生命情報科学（バイオインフォマティクス）と実験科学の両方から、生命をゲノムレベルで考えるとのことだったからである。当時は何も気にならなかったが、東京都臨床医学総合研究所ではパーマネントの研究者であったので、これを辞して 5 年の ERATO のプロジェクトに参加するというと、何人かの友人は本当に心配してくれた。実際、プロジェクトの研究期間においても、特定の微生物や線虫等の完全長ゲノムが解析された（ゲノムプロジェクトと総称される）ばかりで、一般的には、次はプロテオームと機能未知タンパク質の機能解析だと考えられていた。RNA 研究は、出はじめたマイクロアレイ技術が花形であった。さらに、プロジェクトリーダーが情報解析を請け負うベンチャー会社設立に主眼を置いたこともあって、論文発表は特許の次というような空気が流れていた。それでも、本プロジェクト中に後に慶應義塾大学で行った研究のコアの部分を考えておくことができた。

2000 年の年末、ERATO のプロジェクトが終わる少し前に、とある学術雑誌で慶應義塾大学の新しい研究所のスタッフ募集広告を見た。「網羅的な解析技術の開発」「マイクロアレイ解析」などと謳う言葉に惹かれて応募したところ、当時は情報科学と実験科学を両方行っていた研究者など極めて少なかったこともあってか、一度、模擬授業をやってくださいとの依頼を受けた。

SFC での授業の後に、新しい研究所の所長に就任予定の富田勝氏の部屋で以下のような会話をもった。「RNA 研究をやりたいということですが、どのような RNA を考えているのでしょうか？」と富田氏。「そうですね。まあ、全部ですね」と私。「それはよいですね」と富田氏。この会話の意味するものは、我々の行う研究において選択すべき手法は、いわゆる「システム生物学」であるとのコンセンサスを得たことに他ならない。かくして 2001 年の春から、慶應義塾大学としては首都圏以外にはじめてキャンパスを構えた山形県鶴岡市に、先端生命科学研究所 (IAB) の助教授として赴任した。本稿では、紙面の都合もあり IAB の RNA 研究グループで活躍してくれ、ともに学術論文を発表することができた皆さんを中心にご紹介したい。

2 マウスの膨大な長鎖ノンコーディング RNA の発見

慶應義塾大学に赴任してから幾つかのプロジェクトを立ち上げ RNA 研究に従事することになったが、時代の背景を理解するためにも、まず日本の果たした高等真核生物の cDNA のプロジェクトに関して若干の説明をしておきたい。1990 年代末から 2000 年代はじめになると、欧米の大学や研究所を中心にマウスやヒト等の高等真核生物のゲノムプロジェクトも推進されていた。一方、日本ではゲノムだけでなく、そこにコードされるタンパク質の一覧(プロテオーム)を明らかにするために、mRNA の配列を読み解くことに焦点を合わせていた。ゲノム上では、特に高等真核生物であるマウスやヒトでは、タンパク質をコードする多くの遺伝子が長いイントロンで分断されることが知られていたからである。すなわち、ゲノムの塩基配列の情報のみでは正確なタンパク質の読み枠を判定することが困難である。ここで、マウスの完全長 cDNA プロジェクトを率いたのが理化学研究所の林崎良英博士のグループであり、ヒトのそれは東京大学の菅野純夫教授のグループを中心に解析が行われていた。

2001 年当時、SFC 二期生の斎藤輪太郎博士 (現カルフォルニア大学) が林崎研究室の研究員であったこともあり、マウスのいろいろな組織や発生ステージに由来する新規のノンコーディング RNA を見出すべく、マウス完全長 cDNA の注釈づけプロジェクト (FANTOM 2) に参加することになった。斎藤博士とはこの後、幾つかのプロジェクトで共同研究を行う機会があり、直

接に情報科学的な解析のノウハウを教えていただいた。慶應より一緒にプロジェクトに参加した、当時は修士の学生であった沼田興治君 (2007 年博士卒) がノンコーディング RNA 研究の中心的な役割を果たした。といっても、研究開始当初はノンコーディング RNA の明確な定義が存在しないこともあり、その定義を作るところから研究をはじめなくてはならなかった。さらにはその定義に従って、情報学的に塩基配列を如何に分類するかということが問われた。驚いたことに、ふたを開けてみると、理化学研究所が集めた 6 万種以上の cDNA のうち 1 万種以上がノンコーディング RNA であると推定された。そこで、我々が採択したのは、アーティファクトと考えられるような配列をできるだけ排除するというフィルタリングのアプローチであった。例えば、得られた塩基配列をどのフレームで翻訳しても、明確な読み枠が得られないことや、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列が、当時のデータベースに登録されたいかなるタンパク質にもヒットしないこと、一方で、得られた配列が、きちんとゲノム配列にマッピングできることなどを指標にした。その結果、このようなかなり厳しい条件下でも、少なくとも 4,000 種のノンコーディング RNA の存在が見積もられ、2002 年の FANTOM 2 の研究報告では、これをノンコーディング RNA 最強セットとして発表した (Okazaki *et al.*, 2002)。さらに、2003 年の Genome Research 誌の FANTOM 2 特集号では沼田君を第一著者として、その解析の詳細を発表することができた (Numata *et al.*, 2003)。これらの論文は高等真核細胞のトランスクリプトームに mRNA と同じ長さのノンコーディング RNA が大量に存在する最初の報告となった。FANTOM プロジェクトで明らかにしたノンコーディング RNA は、当時は mRNA 様ノンコーディング RNA と、現在は長鎖ノンコーディング RNA とよばれている (表 1)。一方、慶應では研究の情報部分のみを扱っていたことや IAB にマウスの研究施設を作ることが困難であったことで、これを世界に売る成果として展開していくことに限界があった。また、当時は助教授であったこともあり、学生が第一著者の論文の最終著者にはなり難く、この意味でその後は、ノンコーディング RNA の研究が自分の研究グループでプライオリティのとれるバクテリア (真正細菌) やアーキア (古細菌) など微生物を対象にしたものになっていった。

表 1 代表的なノンコーディング RNA とその機能

(a) 21 世紀になってからゲノムレベルで見出された主なノンコーディング RNA			
名称	長さ	由来する生物	代表的な機能
長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)	0.5 ～数十キロ塩基	真核生物	遺伝子発現制御、クロマチンの制御
低分子 RNA (sRNA)	50-500 塩基	バクテリア、アーキア、真核生物	遺伝子発現制御、mRNA の翻訳阻害、分解、RNA 修飾
マイクロ RNA (miRNA)	22 塩基程度	真核生物	mRNA の翻訳阻害、分解
(b) 古典的なノンコーディング RNA			
名称	長さ	由来する生物	代表的な機能
tRNA	70 ～ 100 塩基	バクテリア、アーキア、真核生物	リボソームにアミノ酸を運ぶ、翻訳、遺伝子発現制御
rRNA	100 ～数千塩基	バクテリア、アーキア、真核生物	リボソームの構成成分、翻訳

3 アーキアのプロテオームを機能で分類する、あるいは特定の RNA 関連酵素に注目する

研究所に来たばかりの時点に話を戻そう。RNA の研究というと RNA 分子ばかりを探索しているように思われがちだが、慶應に来る以前から RNA 分子の制御に関わるようなタンパク質をゲノムレベルで同定すべきであると考えていた。このために、そのタンパク質の生物学的な機能がわからないままでも、RNA に結合するものを系統的に同定する方法として超好熱性アーキアを用いた発現クローニング法を考案した。方法の詳細は既に発表しているので参照してほしいが (Kanai *et al.*, 2003)、簡潔に述べれば、以下になる。(a) パイロコッカス・フリオサスのような 100℃ に及ぶ超高温環境で生息する超好熱性アーキアのゲノムには極めて耐熱性の高いタンパク質がコードされている。(b) ゲノムの塩基配列は既知であり、このアーキアの場合、全 2,000 種程度のタンパク質をコードする遺伝子がある。しかも遺伝情報制御系に関与するタンパク質はバクテリアのものより真核生物のそれに似ている。言い換えれば、真核生物の該当分子の原型を知れる可能性につながる。(c) ここで、

パイロコッカスのゲノムを適当な長さ (数キロベース程度) に切断して、大腸菌で発現させるとともに、発現させたタンパク質の抽出液を熱処理すると、大腸菌に由来するほとんどのタンパク質は変性して不溶化するのだが、パイロコッカスのタンパク質は耐熱性であるので活性を保持したままである。(d) 従って DNA 断片と抽出液の対応をつけて、抽出液の方に何らかの生化学的な活性 (例えば RNA 分子に結合するなど) を見出せば、すぐにその活性に対応した DNA 断片 (= 遺伝子) に行き着くことになる。この研究のため、2001 年に遺伝子工学実習の技術員として採用された曾我 (佐藤) 朝子さん (農学修士) と、実習がない夏休み期間などを利用して、数十日で 1,000 種類以上の抽出液とクローン化した DNA 断片のセットを用意した。曾我 (佐藤) さんには、この時より 1 年弱の産休、育児休暇をはさんで現在までの約 14 年間で主にアーキアの RNA 制御タンパク質の研究を支えていただいている。さて、結果の一部は前職からの引き継ぎであるが、様々な RNA で 1,000 種のライゼットをスクリーニングしたところ、まず RNA の AU 配列に結合する新規のタンパク質を見つけ FAU-1 と命名した (Kanai *et al.*, 2003)。また、ステムループ構造に結合する RNA 結合タンパク質が、当時見出されたばかりの新しいチミジン合成酵素であることを明らかにした (Kanai *et al.*, 2006)。さらに、RNA の 3' 末端にある環状型のリン酸を開裂させる活性 (CPDase 活性) を見出し、その本体は GTP 依存性の RNA 連結活性を有したタンパク質であることを明らかにした (Kanai *et al.*, 2009)。この最後の研究は偶然にも、新しく立ち上げていた tRNA プロセッシングに関与する因子の探索を系統的に遂行することに繋がっていった。

以上はプロテオームを実験的に機能で分類するというやり方である。SFC の学生には情報解析に長けた学生が多くいたので、パイロコッカスのプロテオームから情報科学的にも RNA 結合タンパク質を選り分ける手法も開発することができた。この研究の中心になって成果をあげてくれたのが、研究を開始した 2003 年当時は学部学生であった藤島皓介君 (2009 年博士卒業) である。アミノ酸配列に現れるいろいろな指標を使ってタンパク質の機能分類を試みたが、最終的には特定のアミノ酸の種類と周期的な現れ方を機械学習する方法で効率良く新規の RNA タンパク質を予測できるようになった

(Fujishima *et al.*, 2007)。また、一つ学年が下の小正瑞季君 (2008 年修士卒業) と一緒になって、予測したタンパク質の大腸菌での組換え体タンパク質を産生、精製し、RNA 結合性を実験的にも確認した。藤島君はとても面倒見がよく、その後、沢山の学生が RNA グループに参加してくれることになった。

網羅的な解析に加えて、個別の RNA 関連酵素を詳細に (主に生化学的に) 解析することも行った。対象は RNA に関する酵素なら何でもよかったのであるが、2001 年の研究所設立当時は三菱化学生命科学研究所の研究員で、2006 年から同僚の教授となった板谷光泰氏の強いサポートを受け、リボヌクレアーゼ H (RNase H) に決めた。これは周知のように RNA-DNA ハイブリッドのうちの RNA 鎖側を分解する酵素である。板谷氏とは、2002 年と 2008 の二回の RNase H 国際会議を研究所がある鶴岡市にて開催することができた。2002 年の国際会議では、曾我 (佐藤) 朝子さんがパイロコッカスの耐熱性 RNase H の解析で (Sato *et al.*, 2003)、修士の学生であった篠田 (小知和) 裕美さん (2006 年博士卒) が線虫の多様な RNase H 遺伝子の解析 (Kochiwa *et al.*, 2006) で、それぞれ口頭発表を行った。篠田 (小知和) さんは博士課程で、原核生物に存在する RNase H の進化学的な情報解析を行い (Kochiwa *et al.*, 2007)、IAB の目指す、同じ個人が実験と情報の論文のそれぞれで第一著者になることをいち早く実践した。また、戸谷 (北村) さや香さん (2008 年修士卒) は RNase H と立体構造が酷似していながらアミノ酸配列では保存性の少ない AGO タンパク質 (マイクロ RNA の制御や RNA 干渉に関係する) に注目し、その進化情報を勘案しながら、RNase H の基質認識に関係する酵素上のアミノ酸残基を実験的に検証した (Kitamura *et al.*, 2010)。またこの研究過程でパイロコッカスの RNase H は 2 本鎖の RNA も切断できることを見出した。

4 真核生物のマイクロ RNA とバクテリアの低分子 RNA

第 2 章にて真核生物の有する長鎖ノンコーディング RNA 研究にふれたが、真核生物ではマイクロ RNA と呼ばれる 22 塩基程度のノンコーディング RNA が存在する (表 1)。RNA 研究グループにて、マイクロ RNA の研究を切り開いてくれたのが岩崎 (渡邊) 由香さん (2011 年博士卒) である。岩崎 (渡邊) さんは学部生の頃から研究に対する意識が高く、SFC の授業がない週

末に自費で鶴岡の研究所にゲリラ的にやってきては研究に没頭していた。彼女とは個別の研究よりも幾つかの総説を書き、一般的な啓蒙に貢献できたことも忘れがたい (Watanabe *et al.*, 2007b; Watanabe and Kanai, 2011)。また、現在も行っているウイルスとマイクロ RNA 研究に関する下地を作ってくれた (Watanabe *et al.*, 2007a)。ちなみに、ウイルス論文の第一共著者は藤島夫人の藤島 (岸) 温子さん (2006 年学部卒) である。さらに、マイクロ RNA の研究では池田 (高根) 香織さん (2015 年博士卒) が、左右対称生物で進化的に保存されたマイクロ RNA とその標的 mRNA の予測に関して研究を行った (Takane *et al.*, 2010)。予測した標的 mRNA とマイクロ RNA のペアの中から幾つかの例に関しては実験的な検証を行った。その後、生きた化石といわれているカプトエビを研究対象として、そのゲノム解析やマイクロ RNA の発現変動解析を、後輩の広瀬友香さん (2014 年修士卒) と共に次世代シーケンサーのデーターをもつてなしとげた (Ikeda *et al.*, 2015)。ちなみに、池田 (高根) さんは、私が受け入れ教員である初めての学振の研究員であり、彼女の採択時には自分も認められたような心持ちがして嬉しかったことを記憶している。また、カプトエビはもともと RNA グループの技術員であった平岡桐子さんがもたらしてくれたものである。我々のグループにいるうちに、平岡さん自身も研究生活に身を置きたい気持ちが高まり、職を辞した後に自宅から通える千葉大学医学部の大学院に進学した (博士課程在学中)。これも嬉しいことである。

2007 年に発表された IAB での大腸菌のシステムバイオロジー研究 (Ishii *et al.*, 2007) に参加したことも手伝って、大腸菌の新規ノンコーディング RNA も研究の対象にしていた。これは、約 50 ～ 500 塩基のノンコーディング RNA で、一般に低分子 RNA (sRNA) と総称されている (表 1)。研究は池田 (新原) 温子さん (2011 年修士卒) と松井求君 (2014 年博士卒) が中心になって進めた。また、大腸菌のシステム生物学の生物学の第一人者である奈良先端科学技術大学院大学の森浩禎教授に大変お世話になった。研究を開始した 2008 年くらいには、森教授を介して、タイリングアレイと呼ばれるゲノムレベルでのマイクロアレイ解析により新たな sRNA を探索していたが、小さな RNA 分子のハイブリダイゼーションを介したスクリーニングでは非特異的

なシグナルが多く検出され、なかなか全体像がつかめなかった。面白いもので、そのような状況になると技術の革新があり、当時出たばかりの次世代シーケンサー解析をいち早く導入し、「大腸菌にもまだまだ知られていない sRNA がある」という論文をまとめるとともに (Shinhara *et al.*, 2011)、大腸菌の sRNA 情報をまとめたデータベースを公開することができた。この研究の最終段階で IAB の中東憲治准教授に大変にお世話になった。彼是我々が見出した新しい大腸菌 sRNA の欠失変異株に増殖抑制がおこることが頻繁すぎると気づき、該当する遺伝子のノックアウト株を作り直してそれを正してくれた。さすがであると感じ入った。

多くの大腸菌 sRNA はその近縁種でしか保存されていないので、その進化速度が速いとも考えられる。そこで、人工的な sRNA を用いて大腸菌に何か機能を付け加えられないかと考えた。この系を立ち上げてくれたのが、先に紹介した小正瑞季君である。彼はランダムな sRNA を大腸菌内で発現誘導することで、その増殖をコントロールできる sRNA を同定した (Komasa *et al.*, 2011)。現在、この研究は北海道大学で修士をとって技術員として研究に参加してくれた野呂絵美子さんに引き継がれ、増殖が抑制された大腸菌内では、人工 sRNA があたかも内在的な sRNA と同じように働くことを見出している(論文投稿準備中)。これらの研究は RNA の合成生物学とも捉えることができる研究で、これから益々その重要性が高まるだろう。また、松井君はその後、バクテリアの転写因子の研究を開始し、ネットワーク解析などを駆使しながら、1,000 種以上の転写因子の相同性を可視化するとともに、その進化に関するモデルを提唱した (Matsui *et al.*, 2013)。

5 分断化された tRNA 遺伝子、普遍暗号表に従わない tRNA

幾つかの研究テーマを並行して走らせているので、項目別に話を進めると多少前後関係がぎくしゃくするが、2006 年春に先端生命科学研究所の教授となって自分が直接に関わった研究論文は最終著者として発表できるようになった。一方で、研究所ではメタボローム研究に関わるスタッフが中心に雇用されるために、自分である程度のお金を取らない限り、直接のスタッフは望めなかった。また、研究所では研究室を名乗ることはできないという方針で

あったので、グループのリーダーとして、世界に立ち向かうべく考えた。もっとも、これは、教授になる以前からの方針でもあったが、そのためには、一緒に研究に従事する技術員や学生の研究が第一線級の結果となるように（世界的なレベルの発表ができるように）することに他ならないと考えた。具体的には、国際 RNA 学会での年会発表に標準をあわせ、きちんとしたレベルが達成されれば積極的に海外での発表をサポートした。幸いにして、鶴岡に来てくれる学生は、首都圏から山形県に来るという時点で研究に対する意識が高く、自分の方針に共感してくれ、修士課程、博士課程へと進学してくれた。また、国際 RNA 学会に参加して 7～8 年もすると各国の著名な研究者とも自然に話すようになっていった。ちなみに、2012 年に開催された米ミシガンでの同会議において、私は日本への年会招致プレゼンテーションを行ない、これを成功させた（2016 年京都開催）。

さて、新しい分断型の tRNA 遺伝子の研究とその展開について触れておきたい。tRNA や rRNA は古典的なノンコーディング RNA と呼ばれ（表 1）、これまでに述べてきたようなノンコーディング RNA より 30～40 年も前から詳細に解析されてきた。そのために、10 年前までは、tRNA や rRNA の研究からそうそう新しいことなど出てこないのではないかと考えられていた。2005 年に米エール大のグループがナノアーキアという寄生性のアーキアでは特定の tRNA 遺伝子が 2 分断されており、細胞内で tRNA の 5' 側と 3' 側に対応する転写産物がハイブリッドを形成してから成熟型の tRNA にプロセッシングされるという報告を行った。スプリット tRNA の発見である (Randau *et al.*, 2005)。そのようなものがアーキアにあるのかということで、完全長ゲノムが決まったアーキアを見てみると幾つかの重要な tRNA が未発見である場合があることに気がついた。さらには、立教大学の相馬亜希子博士（現千葉大学）たちが研究している単細胞性の紅藻であるシズンでもなかなか tRNA が見つからない。というわけで、共同研究を含みながらこの問題に立ち向かったのが、菅原潤一君（2011 年博士卒）であり、そのアドバイザーとしての谷内江望君（2009 年博士卒）であった。最初に種を明かすが、なぜ tRNA 遺伝子が見つからなかったかという、アーキアなどのゲノムでは tRNA 遺伝子がいろいろな形で分断されていたからであり（図 1）、そのため、当時の tRNA 予

測プログラムでは同定できなかったのである。

菅原君はまず tRNA 遺伝子に介在しているイントロン等の特異的な RNA の 2 次構造に目をつけ、それをコンピューター上でゲノム配列から抜き取った (コンピューター内でのスプライシングである)。こうしておけば、イントロンがなくなるので、あとは通常の tRNA 予測プログラムにかければよい。その結果、様々な新しい tRNA が見つかったが、先のシゾンで見出した tRNA 遺伝子は特筆すべきものだった。ゲノム上で成熟 tRNA の 5' 側に対応する領域と 3' 側に対応する領域が逆位していたからである。そのため転写後に、一度環状型になってから再度切断されることで成熟 tRNA となり、逆位

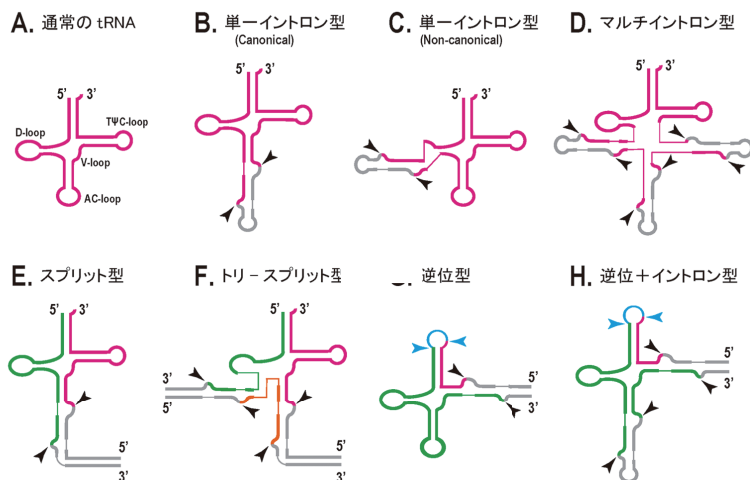


図1 分断された tRNA 分子種の模式図

(A) 通常の tRNA と各ループ構造の名称。(B ～ D) イントロン型 tRNA。tRNA 前駆体のうちエクソンを赤でイントロンを灰色で示す。矢頭は tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼで切断される箇所を示している。(E ～ F) スプリット型 tRNA。tRNA 前駆体のうちイントロンを灰色で示す。その他の色は互いに別の転写産物上に存在するエクソンに対応している。矢頭は tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼで切断される箇所を示している。(G ～ H) 逆位型 tRNA。tRNA 前駆体のうちイントロンを灰色で示す。成熟した tRNA 上で 3' 側 (の一部) に相当する領域を赤で、介在配列を青で、5' 側に対応する領域を緑で示している。矢頭 (黒) は tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼで、矢頭 (青) は未同定の酵素で切断される箇所を示している。

(Permuted) tRNA と命名した (Soma *et al.*, 2007; Soma *et al.*, 2013)。その後、permuted tRNA は東京大学の丸山真一郎博士との共同研究を通じて光合成真核生物に (Maruyama *et al.*, 2010)、また、米カルフォルニア大学サンタクルーズ校の Todd M. Lowe 教授のグループによりアーキアゲノムにも見出された (Chan *et al.*, 2011)。菅原君は共同研究だけでなく特にアーキアゲノムに特化して tRNA 遺伝子の詳細を解析し、様々な箇所にイントロンが入った tRNA を見出すと共にその情報をまとめあげたデータベース SPLITSdb を構築した (Sugahara *et al.*, 2008; Sugahara *et al.*, 2009)。後に夫人となる菅原 (喜久田) 薫さん (2011 年修士卒) はこのような tRNA の中で短い tRNA 断片に 3 個ものイントロンが入った tRNA のスプライシングについて研究した。さらに、藤島君がこの研究に参加することで分断化された tRNA 遺伝子の研究は加速していった。まず、好熱好酸性のアーキアであるカルディヴィルガ マキリンジェンシスのゲノム解析により 3 つの RNA 断片からなる tRNA を見出し、トリ-スプリット tRNA と命名した (Fujishima *et al.*, 2009)。カルディヴィルガはナノアーキアと異なり自由生活性のアーキアであるので、スプリット tRNA がゲノムの縮小に伴う副産物ではないことが明らかとなった。さらに藤島君は、完全長のアーキアゲノムから情報学的に tRNA イントロンを抽出して、その配列、由来した tRNA の種類、及びイントロンの挿入されていた位置等を詳細に解析していった。その結果、特定のイントロンはある tRNA から別の tRNA へと転位していく可能性を見出し、このような「転位性 tRNA イントロン」が少なくとも 16 種あることを報告した (Fujishima *et al.*, 2010)。

tRNA 研究の新展開はメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析からも得られた。これらは難培養性の微生物サンプルから直接に DNA や RNA を抽出して、塩基配列の決定をすることで、そのサンプルに存在した微生物のゲノムを再構築したり、転写物の情報を得たりする手法である。まず、米カルフォルニア大学バークレイ校の Jill Banfield 教授らとの共同研究を通して、彼女らが見出した極小のアーキアである ARMAN の再構成ゲノムの中に、新しいタイプ (ϵ_2) の tRNA スプライシング酵素を見出した (Fujishima *et al.*, 2011)。アミノ酸配列上、この ϵ_2 酵素は 3 つの構造ユニットから構成されることが予想されたが、これは、愛媛大学の平田章博士らとの共同研究を通し

て、同酵素の X 線構造解析を行い、その構造ユニットの存在を原子レベルで実証した (Hirata *et al.*, 2012)。さらに、海洋開発機構の布浦拓郎博士らとは、深海底熱水環境に生息する未培養性アーキアのゲノムをメタゲノムの手法を用いて再構築し、カルディアルカエウム・スプテッラーネウムと命名した (Nunoura *et al.*, 2011)。ここで、菅原君が再構成に使ったコスミド断片を詳細に調べてみると、イントロンの増加と特定のトランスポゾン様因子との関連が示唆されたので、tRNA のイントロン獲得とゲノムの進化に関する新知見として報告した (Sugahara *et al.*, 2012)。これに加えて、当時は、学部の学生であった村上慎之介君 (博士課程在学中) と研究所近くの湯野浜温泉源泉から取得したサンプルのメタトランスクリプトーム解析を行い、環境サンプルに由来する数多くの tRNA 断片を見出した (Murakami *et al.*, 2012)。これまで tRNA 断片は単なる分解産物と思われていたが、tRNA のアンチコドンの種類に依存して分解のパターンが異なることから、少なくとも特異的な酵素によって切断されることが示唆された。現在 tRNA 断片は tRF と総称され、様々な新しい機能が報告されはじめている (Raina and Ibba, 2014; Kanai, 2015)。また、全く異なる路線の研究であった、先のカプトエビの低分子 RNA の解析からも、特定の tRF が発生ステージ特異的に発現することを見出している (広瀬友香, 論文投稿準備中)。

学会などでアーキアの有するユニークな tRNA 遺伝子群について話していると、「それでは真核生物ではどうなのか？」というような質問を受けることがある。これに答えをもたらしてくれたのが浜島聖文君 (2015 年博士卒) である。彼はグリシンやイソロイシンに対応するアンチコドンを持ちながら、ロイシンをチャージするような tRNA を自由生活性の線虫より見出した (Hamashima *et al.*, 2012)。この tRNA には通常グリシンやイソロイシンの tRNA には存在しない長い V-アームという構造がある。昆虫の無細胞翻訳系を用いて調べてみると、この tRNA はきちんとリボソームには入りこみ、mRNA でグリシンに相当する箇所をロイシンに変えた。すなわち、普遍暗号表に従わないことになる。そこで、線虫のプロテオームを IAB のプロテオームグループの森大氏の協力の下に解析してみると、プロテオーム中にはこの tRNA によりアミノ酸が変わったと思われるタンパク質は一つとして同定さ

れなかった。ということで、本 tRNA の機能は謎のままだが、この tRNA の研究を通じて遺伝暗号の厳格さ、曖昧さについて考察した (Hamashima *et al.*, 2015)。

以上の研究は tRNA 遺伝子の多様性に関して新しい境地を開き、またその進化に関しても一石を投じる研究となったと自負している (Kanai, 2013; Fujishima and Kanai, 2014; Kanai, 2015)。

6 おわりに

慶應義塾大学に赴任してからの RNA 研究の展開を我々のグループの研究を中心に据えて紹介してきた。研究を続けてこられたのも、多分に時代や、偶然に生まれた新技術に後押ししてもらった感は否めない。最初にお話したように紙面の都合で紹介仕切れなかった研究やメンバーも数多いが、お許しいただきたい。機会があれば順にご紹介していく予定でいる。

読み返してみると、RNA に関することを生物種をとわずに、攻めたなと思うが、新しいノンコーディング RNA などを発見する現場にしながら、興味の対象は古典的な tRNA や rRNA の制御にも向かっていった。実際、今回はほとんど紹介できないでいたが、これら古典的なノンコーディング RNA の前駆体プロセッシングに関与するアーキアの遺伝子をすでに数十個単離し、その組換え体などを得ている。佐藤 (曾我) 朝子さんの発見した GTP 依存性の RNA サイクラゼ (RNA 鎖の 3' 末端に存在するリン酸基を環状化する酵素) の論文 (Sato *et al.* 2011) を除けばほとんどが未発表ということになるが、これらを順次形のあるものとした。その際に重要な決め手となるのは酵素の複合体であろうかと思われる。この問題には今、プロテオームグループの森大氏などの協力を得ながら進めているところである。欧米の著名な研究者たちとの共同研究も模索中である。さらに言えば、基礎サイエンス分野への世界レベルでの貢献についても検討している。まずは、その一環として、昨年 *Frontiers in Genetics* 誌において「tRNA の分子生物学再訪」と題した特集号を編集した。この特集号は eBook にもなり、私は巻頭言に「新しい tRNA ワールドによこそ」と題した解説を載せている (Kanai, 2014)。

http://www.frontiersin.org/news/New_Frontiers_Ebook_Molecular_Biology_of_the_Transfer_RNA_Revisited/1038

機会があればご覧いただきたい。

引用文献

- Chan P.P., Cozen A.E., Lowe T.M., “Discovery of permuted and recently split transfer RNAs in Archaea.” *Genome biology*, 12(4), 2011, p.R38.
- Fujishima K., Kanai A., “tRNA gene diversity in the three domains of life.” *Frontiers in genetics*, 5, 2014, p.142.
- Fujishima K., Komasa M., Kitamura S., Suzuki H., Tomita M., Kanai A., “Proteome-wide prediction of novel DNA/RNA-binding proteins using amino acid composition and periodicity in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*.” *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 14(3), 2007, pp.91-102.
- Fujishima K., Sugahara J., Kikuta K., Hirano R., Sato A., Tomita M., Kanai A., “Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2009, pp.2683-2687.
- Fujishima K., Sugahara J., Miller C.S., Baker B.J., Di Giulio M., Takesue K., Sato A., Tomita M., Banfield J.F., Kanai A., “A novel three-unit tRNA splicing endonuclease found in ultrasmall Archaea possesses broad substrate specificity.” *Nucleic acids research*, 39(22), 2011, pp.9695-9704.
- Fujishima K., Sugahara J., Tomita M., Kanai A., “Large-scale tRNA intron transposition in the archaeal order Thermoproteales represents a novel mechanism of intron gain.” *Molecular biology and evolution*, 27(10), 2010, pp.2233-2243.
- Hamashima K., Fujishima K., Masuda T., Sugahara J., Tomita M., Kanai A., “Nematode-specific tRNAs that decode an alternative genetic code for leucine.” *Nucleic acids research*, 40(8), 2012, pp.3653-3662.
- Hamashima K., Mori M., Andachi Y., Tomita M., Kohara Y., Kanai A., “Analysis of Genetic Code Ambiguity Arising from Nematode-Specific Misacylated tRNAs.” *PLoS one*, 10(1), 2015, p.e0116981.
- Hirata A., Fujishima K., Yamagami R., Kawamura T., Banfield J.F., Kanai A., Hori H., “X-ray structure of the fourth type of archaeal tRNA splicing endonuclease: insights into the evolution of a novel three-unit composition and a unique loop involved in broad substrate specificity.” *Nucleic acids research*, 40(20), 2012, pp.10554-10566.
- Ikeda K.T., Hirose Y., Hiraoka K., Noro E., Fujishima K., Tomita M., Kanai A., “Identification, expression, and molecular evolution of microRNAs in the “living fossil” *Triops cancriformis* (tadpole shrimp).” *RNA*, 21(2), 2015, pp.230-242.
- Ishii N., Nakahigashi K., Baba T., Robert M., Soga T., Kanai A., Hirasawa T., Naba

- M., Hirai K., Hoque A. *et al.*, "Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations." *Science*, 316(5824), 2007, pp.593-597.
- Kanai A., "Molecular evolution of disrupted transfer RNA genes and their introns in archaea." In *Evolutionary Biology: Exobiology and Evolutionary Mechanisms* (ed. P. Pontarotti), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp.181-193.
- Kanai A., "Welcome to the new tRNA world!" *Frontiers in genetics*, 5, 2014, p.336.
- Kanai A., "Disrupted tRNA Genes and tRNA Fragments: A Perspective on tRNA Gene Evolution." *Life*, 5(1), 2015, pp.321-331.
- Kanai A., Oida H., Matsuura N., Doi H., "Expression cloning and characterization of a novel gene that encodes the RNA-binding protein FAU-1 from *Pyrococcus furiosus*." *The Biochemical journal*, 372(Pt 1), 2003, pp.253-261.
- Kanai A., Sato A., Fukuda Y., Okada K., Matsuda T., Sakamoto T., Muto Y., Yokoyama S., Kawai G., Tomita M., "Characterization of a heat-stable enzyme possessing GTP-dependent RNA ligase activity from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*." *RNA*, 15(3), 2009, pp.420-431.
- Kanai A., Sato A., Imoto J., Tomita M., "Archaeal *Pyrococcus furiosus* thymidylate synthase 1 is an RNA-binding protein." *The Biochemical journal*, 393(Pt 1), 2006, pp.373-379.
- Kitamura S., Fujishima K., Sato A., Tsuchiya D., Tomita M., Kanai A., "Characterization of RNase HIII substrate recognition using RNase HIII-argonaute chimaeric enzymes from *Pyrococcus furiosus*." *The Biochemical journal*, 426(3), 2010, pp.337-344.
- Kochiwa H., Itaya M., Tomita M., Kanai A., "Stage-specific expression of *Caenorhabditis elegans* ribonuclease H1 enzymes with different substrate specificities and bivalent cation requirements." *The FEBS journal*, 273(2), 2006, pp.420-429.
- Kochiwa H., Tomita M., Kanai A., "Evolution of ribonuclease H genes in prokaryotes to avoid inheritance of redundant genes." *BMC evolutionary biology*, 7, 2007, p.128.
- Komasa M., Fujishima K., Hiraoka K., Shinhara A., Lee B.S., Tomita M., Kanai A., "A screening system for artificial small RNAs that inhibit the growth of *Escherichia coli*." *Journal of biochemistry*, 150(3), 2011, pp.289-294.
- Maruyama S., Sugahara J., Kanai A., Nozaki H., "Permuted tRNA genes in the nuclear and nucleomorph genomes of photosynthetic eukaryotes." *Molecular biology and evolution*, 27(5), 2010, pp.1070-1076.
- Matsui M., Tomita M., Kanai A., "Comprehensive computational analysis of bacterial CRP/FNR superfamily and its target motifs reveals stepwise evolution of transcriptional networks." *Genome biology and evolution*, 5(2), 2013, pp.267-282.
- Murakami S., Fujishima K., Tomita M., Kanai A., "Metatranscriptomic analysis of microbes in an Oceanfront deep-subsurface hot spring reveals novel small RNAs and type-specific tRNA degradation." *Applied and environmental microbiology*, 78(4), 2012, pp.1015-1022.
- Numata K., Kanai A., Saito R., Kondo S., Adachi J., Wilming L.G., Hume D.A., Hayashizaki Y., Tomita M., Group R.G., *et al.*, "Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection." *Genome research*, 13(6B), 2003, pp.1301-1306.
- Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H., Chee G.J., Hattori M., Kanai A., Atomi H. *et al.*, "Insights into the evolution of Archaea and

- eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group." *Nucleic acids research*, 39(8), 2011, pp.3204-3223.
- Okazaki Y., Furuno M., Kasukawa T., Adachi J., Bono H., Kondo S., Nikaido I., Osato N., Saito R., Suzuki H. *et al.*, "Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs." *Nature*, 420(6915), 2002, pp.563-573.
- Raina M., Ibba M., "tRNAs as regulators of biological processes." *Frontiers in genetics*, 5, 2014, p.171.
- Randau L., Munch R., Hohn M.J., Jahn D., Soll D., "Nanoarchaeum equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves." *Nature*, 433(7025), 2005, pp.537-541.
- Sato A., Kanai A., Itaya M., Tomita M., "Cooperative regulation for Okazaki fragment processing by RNase HII and FEN-1 purified from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*." *Biochemical and biophysical research communications*, 309(1), 2003, pp.247-252.
- Sato A., Soga T., Igarashi K., Takesue K., Tomita M., Kanai A., "GTP-dependent RNA 3'-terminal phosphate cyclase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 16(12), 2011, pp.1190-1199.
- Shinhara A., Matsui M., Hiraoka K., Nomura W., Hirano R., Nakahigashi K., Tomita M., Mori H., Kanai A., "Deep sequencing reveals as-yet-undiscovered small RNAs in *Escherichia coli*." *BMC genomics*, 12, 2011, p.428.
- 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*, 318(5849), 2007, pp.450-453.
- Soma A., Sugahara J., Onodera A., Yachie N., Kanai A., Watanabe S., Yoshikawa H., Ohnuma M., Kuroiwa H., Kuroiwa T. *et al.*, "Identification of highly-disrupted tRNA genes in nuclear genome of the red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D." *Scientific reports*, 3, 2013, p.2321.
- Sugahara J., Fujishima K., Morita K., Tomita M., Kanai A., "Disrupted tRNA gene diversity and possible evolutionary scenarios." *Journal of molecular evolution*, 69(5), 2009, pp.497-504.
- Sugahara J., Fujishima K., Nunoura T., Takaki Y., Takami H., Takai K., Tomita M., Kanai A., "Genomic heterogeneity in a natural archaeal population suggests a model of tRNA gene disruption." *PLoS one*, 7(3), 2012, p.e32504.
- Sugahara J., Kikuta K., Fujishima K., Yachie N., Tomita M., Kanai A., "Comprehensive analysis of archaeal tRNA genes reveals rapid increase of tRNA introns in the order thermoproteales." *Molecular biology and evolution*, 25(12), 2008, pp.2709-2716.
- Takane K., Fujishima K., Watanabe Y., Sato A., Saito N., Tomita M., Kanai A., "Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals." *BMC genomics*, 11, 2010, p.101.
- Watanabe Y., Kanai A., "Systems Biology Reveals MicroRNA-Mediated Gene Regulation." *Frontiers in genetics*, 2, 2011, p.29.
- Watanabe Y., Kishi A., Yachie N., Kanai A., Tomita M., "Computational analysis of microRNA-mediated antiviral defense in humans." *FEBS letters*, 581(24), 2007a, pp.4603-4610.

Watanabe Y., Tomita M., Kanai A., “Computational methods for microRNA target prediction.” *Methods in enzymology*, 427, 2007b, pp.65-86.

〔受付日 2015. 2. 26〕