

## 論文内容の要旨

### 論文題目

### 高度好熱菌翻訳系の耐熱化機構

– tRNA の修飾塩基 s<sup>2</sup>T の生合成とその機能 –

氏名 嶋 直樹

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は 48°C から 85°C という広範な温度領域で生育できるが、その温度適応性と高温耐性が翻訳システムに依存しており、その中でもとくに tRNA の転写後の化学修飾と密接に関連している (Watanabe K., et. Al., 1976)。常温菌では tRNA の 54 位にリボチミジン(rT)をもつが、高度好熱菌においてはこの位置にリボチミジン(rT)とその 2 位が硫黄化された 2-チオリボチミジン(s<sup>2</sup>T) が共存する。54 位は tRNA の立体構造の安定性に影響を与える位置であり、s<sup>2</sup>T をもつ tRNA は、rT をもつ tRNA よりも融解温度が 3-5°C 高い。そして翻訳反応では、s<sup>2</sup>T をもつ tRNA は高温域で高い活性をもつ。実際培養温度を高くするにつれ、s<sup>2</sup>T をもつ tRNA の割合が高くなり、その融解温度も上昇する。一方リボソームやその他の翻訳因子は培養温度によって性質が変化しないことが示されており、高度好熱菌翻訳系の温度適応性は tRNA の 54 位に存在する rT と s<sup>2</sup>T という修飾塩基の含量によって支配されていると考えられる。しかし現在までのところこの s<sup>2</sup>T(54)2-チオ化酵素(以下 2-チオ化酵素とする)は未同定であり、また硫黄の基質も知られていない。私は 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構、s<sup>2</sup>T の生合成系の解析、高温環境における s<sup>2</sup>T の意義について研究を行った。

#### 1. 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構

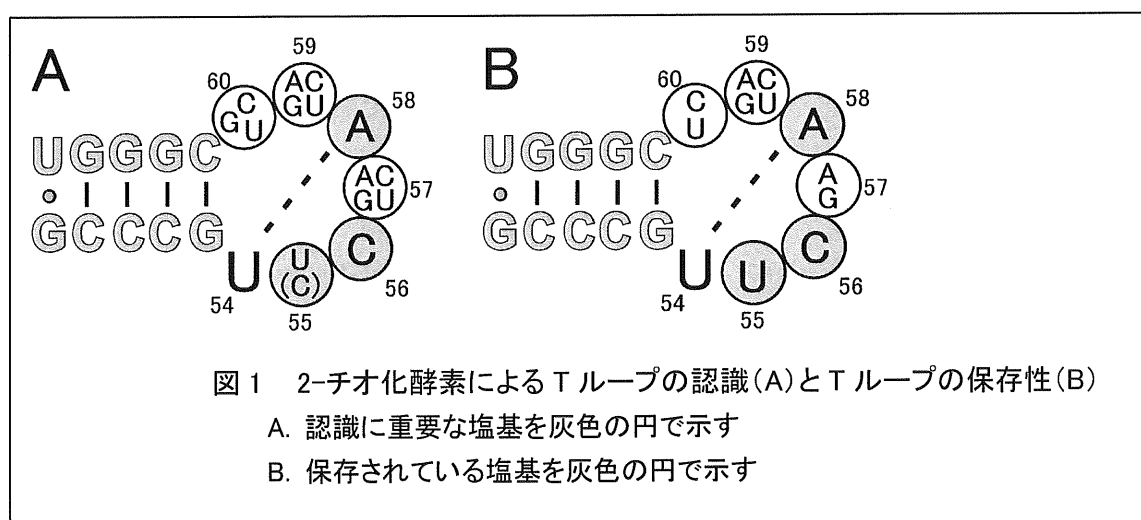
*T. thermophilus* を 80°C で培養するとその tRNA には 1 分子あたり 0.7 個の s<sup>2</sup>T が含まれる。つまり、様々な配列を持つ tRNA に s<sup>2</sup>T が存在する。このことは 2-チオ化酵素が tRNA の共通構造を認識している可能性を示唆している。そこで in vivo で 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構の解析を行った。

*T. thermophilus* で複製可能なベクターに人工 tRNA 遺伝子を組み込み、tRNA 発現プラスミドを構築した。このプラスミドを用いて、*T. thermophilus* を形質転換し、RNA を抽出し、発現を確認した。次にこの発現した tRNA を単離し、配列を塩基特異的 RNases による切断により決定し、また、ポストラベル法および LC/MS をもちいて修飾塩基の同定した。その結果、発現した tRNA はその 5' 端と 3' 端が正しくプロセシングされており、54 位の s<sup>2</sup>T の存在も確認された。

次いで 2-チオ化酵素のより簡便な活性評価系を構築した。有機水銀 ([*N*-Acryloylamino)phenyl]mercuric Chloride、APM) を含むアクリルアミドゲル中で電気泳動を行うことによって、チオカルボニル基を含む修飾塩基をもつ tRNA は水銀原子との相互作用によって泳動度が遅れることが知られており (Igloi GL, 1988)、この系を応用した。tRNA 発現株の全 RNA を APM ゲル電気泳動で分画し、ノーザンハイブリダイゼーションで人工 tRNA を検出し発現 tRNA の 54 位の s<sup>2</sup>T の有無を高感度で分析することに成功した。

以上の s<sup>2</sup>T 検出系をもちいて、転写された直後の tRNA 前駆体分子にすでに 2-チオ化が起こることが観察された。このことは 2-チオ化が成熟 tRNA のみならず前駆体分子の高温環境での耐熱化に貢献していることを示唆している。

次いで tRNA の全体構造が 2-チオ化に重要かどうかを調べた。3 次元構造を壊すような変異を持つ tRNA の 2-チオ化を評価したところ、これらの変異は、2-チオ化には影響を与えなかった。すなわち、2-チオ化酵素は tRNA のより局所的な構造を認識していることが示唆されたので、T ループの各塩基が 2-チオ化に必要なかどうかを評価した。その結果、C56 および A58 は 2-チオ化反応に必須であることが明らかになった (図 1A)。なかでも A58 は 2-チオ化部位である U54 と塩基対を形成することが知られており、この塩基対は標準的な T ループの構造をとるのに寄与している。また 60 位は A 変異のみ 2-チオ化されなかったが、このことは U54 と A60 が塩基対を形成し T ステムを延長し T ループの形を大きく変えてしまうことが原因だと考えられる。以上のことから 2-チオ化酵素は保存された T ループの塩基によって形成される局所的な構造を認識していることが示唆された。*T. thermophilus* の tRNA の T ループの配列の保存性を図 1B に示すが、このように 2-チオ化に必要な配列は保存されていることから *T. thermophilus* で約 7 割の tRNA が in vivo で 2-チオ化される理由が説明できる。

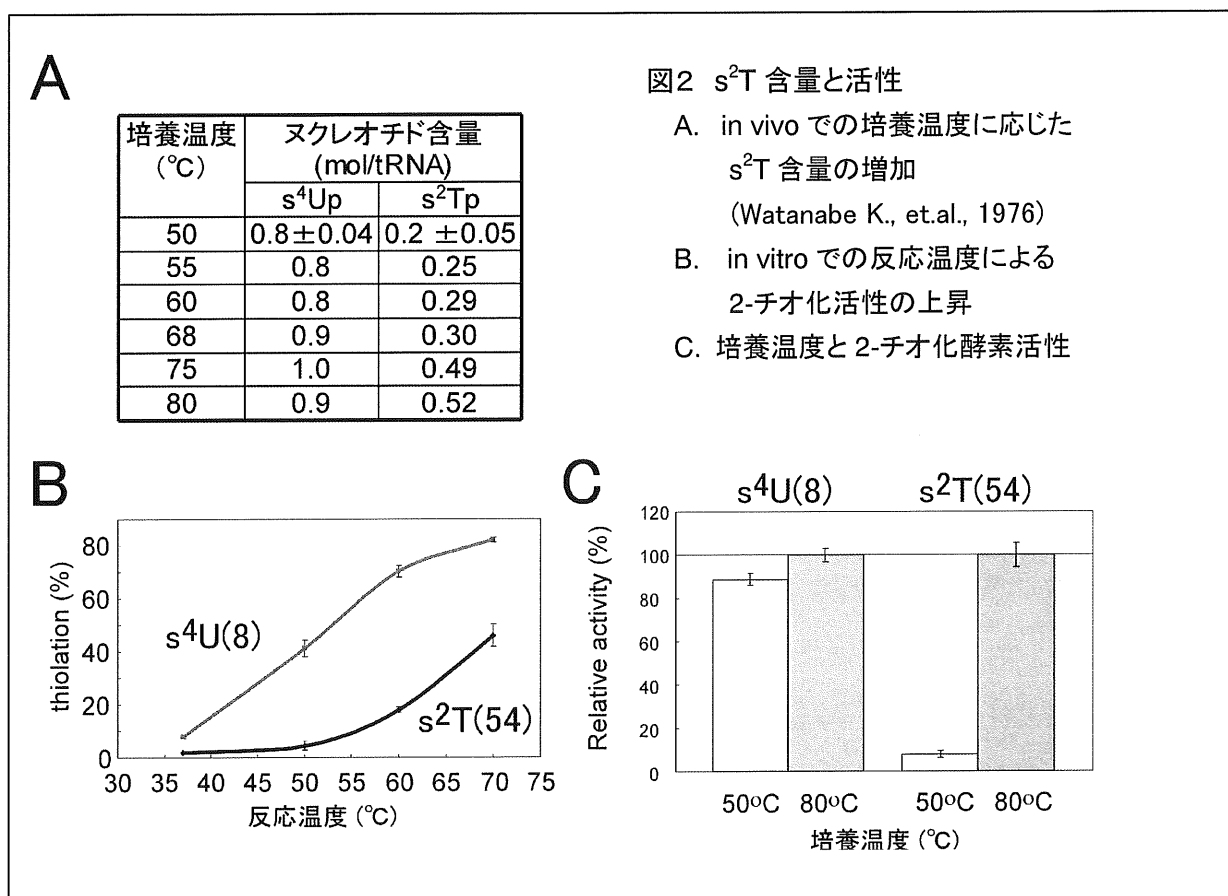


## 2. s<sup>2</sup>T の生合成系の解析

これまで、s<sup>2</sup>T の硫黄源は明らかにされていないため、in vivo tRNA 標識実験により s<sup>2</sup>T の硫黄原子の供与体を明らかにした。<sup>35</sup>S-標識体のシステイン、メチオニン、硫酸イオンをそれぞれ含む培地で培養し tRNA への標識体の取り込みを調べた。tRNA 分解物の HPLC 解析によりシステインおよび硫酸イオンの硫黄が s<sup>2</sup>T に取り込まれることが明らかになった。

大腸菌 tRNA には硫黄を含む修飾塩基が 4 種類存在するが、それらの生合成すべてに IscS タンパクが関与している (Lauhon CT., 2003)。IscS はシステインの硫黄原子を転移させる活性をもつ。*T. thermophilus* の場合上記の実験から s<sup>2</sup>T はシステインから合成されることが明らかとなったため、*iscS* 遺伝子が s<sup>2</sup>T の生合成に関与している可能性が示唆された。*T. thermophilus* において 2 つの *iscS* ホモログ遺伝子を破壊した株をそれぞれ作成し、その tRNA の修飾塩基を LC/MS を用いて解析した結果、どちらの破壊株でも s<sup>2</sup>T 含量は野生型と同等であることがわかった。これにより s<sup>2</sup>T の生合成は既知の硫黄を含む修飾塩基の生合成とは別経路であることが示唆された。

次に、*T. thermophilus* の細胞抽出液をもちいて tRNA の 2-チオ化反応の in vitro 再構成を試みた。APM ゲル電気泳動法を用いて解析し、ATP の存在下で 54 位に特異的な 2-チオ化が検出された。この系を用いて反応温度と活性の相関を調べ、2-チオ化活性の強い温度依存性が示され (図 2B)、80°C で培養したときに 50°C で培養したときよりも発現量が約 10 倍になることが明らかになった (図 2C)。in vivo で高温にすると s<sup>2</sup>T 含量が増加するという現象 (図 2A) は 2-チオ化酵素の発現量の増大と活性の高温依存性で説明できる。



### 3. s<sup>2</sup>T の高温での役割

in vitro の再構成系を用いた実験により s<sup>2</sup>T 合成には tRNA の 58 位に存在する 1-メチルアデニン (m<sup>1</sup>A) が必要であることが示唆された。そこで、*T. thermophilus* の m<sup>1</sup>A 58 合成酵素遺伝子 *trmI* を破壊したところ、m<sup>1</sup>A の欠損と s<sup>2</sup>T 含量の顕著な低下 (野生型の約 15% に減少) が観測された (図3A)。このことから s<sup>2</sup>T54 の近傍に位置する 58 位の A のメチル基が効率的な 54 位の 2-チオ化に必要であることが明らかになった。また、この株は高温感受性を示し (図3B)、tRNA の T<sub>m</sub> 値も約 2°C 減少していた。m<sup>1</sup>A は tRNA の熱安定性には寄与しないことがすでに示されているので、s<sup>2</sup>T 含量の減少により tRNA の融解温度が低下し高温感受性になる可能性が示され、s<sup>2</sup>T による tRNA の耐熱化が高温環境での生育に重要な意味をもっているということを改めて明らかにしたといえる。

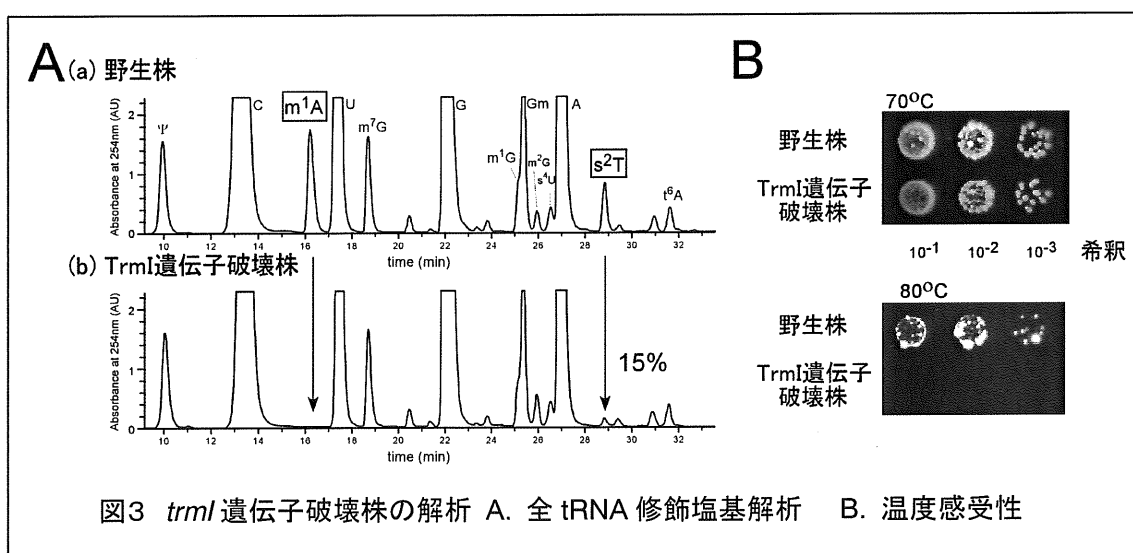


図3 *trmI* 遺伝子破壊株の解析 A. 全 tRNA 修飾塩基解析 B. 温度感受性

#### [結論]

*T. thermophilus* の tRNA で C56 と A58 は高度に保存されており、また高温下では A58 は通常メチル化されて m<sup>1</sup>A となっている。本研究で 2-チオ化酵素は T ループにある C56 と A58 によって形成される局所的構造を認識していることが示唆された。また A58 のメチル基が認識に重要であるということも示唆された。この 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構により、*T. thermophilus* で約 7 割の tRNA が in vivo で 2-チオ化される機構が説明できる。

s<sup>2</sup>T の生合成に関して調べた結果、硫黄の供与体はシステインか硫酸イオンであることが示唆された。システインから硫黄を転移する酵素 IscS は s<sup>2</sup>T の生合成に関与していないことが示されたので、s<sup>2</sup>T 合成系は大腸菌で知られている硫黄の修飾塩基の生合成系とは別経路であることが示唆された。

in vivo で高温にすると s<sup>2</sup>T 含量が増加するという現象は 2-チオ化酵素が①温度により大きく活性が増加することと②温度により発現量が増加することの両方の性質をもっていることにより説明でき、s<sup>2</sup>T 含量が減少した株 (*trmI* 遺伝子破壊株) は高温感受性を示すことから、高温環境での s<sup>2</sup>T による tRNA の耐熱化が高温環境での生育に重要な意味をもっているということ明らかにした。

#### [発表論文]

Conserved bases in the TΨC loop of tRNA are determinants for thermophile-specific 2-thiouridylation at position 54

Naoki Shigi, Tsutomu Suzuki, Masatada Tamakoshi, Tairo Oshima, and Kimitsuna Watanabe  
*Journal of Biological Chemistry*, 2002, Vol. 277, No. 42, pp. 39128–39135