

論文審査の結果の要旨

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ことが知られている。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 s²T 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 s²T(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という状況であった。本論文ではこの 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構、s²T の生合成系の解析、高温環境における s²T の意義について以下のことを明らかにしている。

序章では高度好熱菌翻訳系の温度適応性は tRNA の 54 位の 2-チオ化によるものであることを示すこれまでの研究について概説している。

第 1 章では 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構について実験と考察を行っている。*T. thermophilus* ではさまざまな配列を持つ tRNA に s²T 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 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構の解析を行っている。まず in vivo での tRNA 発現・2-チオ化活性評価系を水銀化合物 APM を用いたゲル電気泳動法により構築している。この s²T 検出系をもちいて、転写された直後の tRNA 前駆体分子の 2-チオ化が起こることが観察され、この現象について考察し、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について言及している。次いで 2-チオ化酵素の tRNA 認識機構を調べている。変異体 tRNA 発現株を作成し、各塩基が 2-チオ化に必要などうかを評価している。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とし、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構造を認識していると考察している。さらに 2-チオ化に必要な配列は *T. thermophilus* において保存されているという事実を示し、このことにより *T. thermophilus* でほとんどの tRNA が in vivo で 2-チオ化される理由が説明できると考察している。

第 2 章では s²T の生合成系の解析と考察を行っている。in vivo での tRNA 標識の実験によりシステインおよび硫酸イオンの硫黄が s²T に取り込まれることが明らかにしている。上記の実験から IscS ホモログ遺伝子が s²T 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

株の修飾塩基解析により、どちらの破壊株でも s^2T 含量は野生型と同等であることがわかった。これにより *T. thermophilus* の s^2T 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ている。次に、抽出液をもちいて tRNA の 2-チオ化反応の in vitro 再構成をしている。反応産物を APM ゲル電気泳動法を用いて解析した結果、ATP の存在下において tRNA の 54 位に特異的な 2-チオ化が検出された。この系を用いた解析から、in vivo で高温にすると s^2T 含量が増加するという現象は 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としている。

第 3 章では s^2T の高温での役割について実験と考察を行っている。*T. thermophilus* の m^1A 58 合成酵素遺伝子 TrmI を破壊したところ、 m^1A の欠損と s^2T 含量の顕著な低下が観測された。このことから s^2T 54 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を明らかにしている。また、この株は高温感受性を示し、tRNA の T_m 値も野生型に比べて約 2°C 減少していた。 m^1A 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^2T 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た。このことは高温環境での s^2T 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初めて明らかにした成果である。

以上、高度好熱菌の tRNA の転写後修飾による翻訳系の温度適応性について、様々なアプローチから実験・検証をおこない、その成果は翻訳系研究における生命科学の進展に大きく貢献している。なお、本論文第 1 章は、鈴木 勉氏、玉腰 雅忠氏、大島 泰郎氏、渡辺 公綱氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。