

論文題目 遺伝暗号の解読に関わる新規 tRNA 修飾遺伝子群の同定と生合成機構の研究

氏名 池内 与志穂

序論

近年、機能性 RNA が生体内で多様な役割を担っていることが明らかになりつつある。機能性 RNA の大部分はゲノムから転写された後にさまざまなプロセッシングを受けるが、その中でも RNA 修飾は重要なイベントである。RNA 修飾は古くから研究されており、これまでに 100 種類を超える修飾ヌクレオシドが同定されている。RNA は修飾によって質的な情報が付加され、RNA の細胞内局在の決定、立体構造の安定化、RNA 結合タンパク質との相互作用、遺伝情報の解読などが正しく制御されることが知られている。

数ある機能性 RNA の中でも tRNA は修飾を多く含み、修飾の機能が古くからよく研究されてきた。特に tRNA のアンチコドン 1 字目には様々な RNA 修飾が存在し、コドンの認識を制限、拡張、変化することで正確なコドン認識と翻訳精度の維持を担う(図 1)。修飾によってコドン認識が決まるため、すべての生物のコドン表は tRNA の修飾なしでは成り立たない。したがって、RNA 修飾および修飾酵素は翻訳システムの一部であるといっても過言ではない。

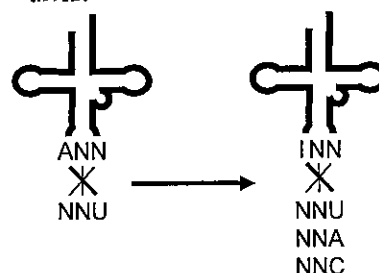
当然それぞれの修飾を行っている修飾酵素が存在するはずであるが、多くの修飾酵素遺伝子が機能未知遺伝子群の中に埋もれている状況である。そこで、大腸菌を対象として RNA 修飾遺伝子を逆遺伝学的かつ網羅的に探索した。新規に同定した RNA 修飾酵素の解析から、RNA 修飾の機能および生合成メカニズムを明らかにすることを目指した。

結果と考察

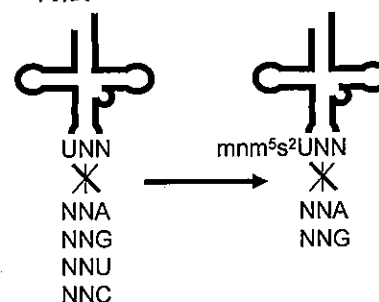
1) リボヌクレオーム解析による tRNA 修飾遺伝子群の探索

大腸菌の遺伝子を破壊した株から RNA を抽出・分解し、液体クロマトグラフィー・質量分析法(LC/MS)で RNA 修飾の有無を判定することで RNA 修飾遺伝子を探索した(図 2B, C)。大腸菌 RNA に含まれる修飾ヌクレオシドのうち 25 種類を LC/MS によって一度に検出できる。ヌクレオシド調製のハイスループット化と LC/MS の自動化により、1 ヶ月に 700 サンプルを解析できるシステムを構築した。大腸菌ゲノムの約半分当たる約 2000 遺伝子の探索の結果、9 つの RNA 修飾遺伝子を同定した[ac⁴C (N4 アセチルシチジン)合成遺伝子、m⁶t⁶A (N⁶-メチル-N⁶-スレオニルカルバモイルアデノシン)メチル化遺伝子、m⁷G (N7 メチルグアノシン)メチル化遺伝子、Q (キューオシン) 修飾に必須なビタミン B₁₂ 取り込みに関与する遺伝子、

A. 拡張



B. 制限



C. 変化

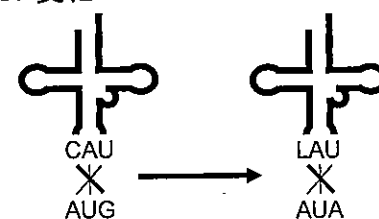


図1 アンチコドン1字目修飾による遺伝暗号解読能の変化

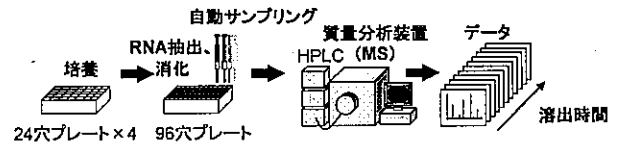
mnm⁵s²U (5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン)の2チオ化を行う5遺伝子]。また、必須遺伝子の解析から Lysidine 修飾遺伝子を同定した。

2) tRNA のアンチコドン 1 字目シチジンの修飾に関わる遺伝子の同定と機能解析

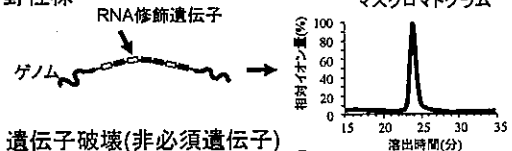
シチジンの修飾塩基である Lysidine はバクテリアの AUA コドンを翻訳するイソロイシン tRNA のアンチコドン 1 字目に存在する。未修飾ではアンチコドンが CAU であり、AUG(メチオニン)コドンを読んでしまう。しかも、未修飾のイソロイシン tRNA 前駆体はメチオニル tRNA 合成酵素に認識されてメチオニンを受容する。Lysidine 化を受けることによって AUA コドンを認識するようになり、イソロイシル tRNA 合成酵素に認識されてイソロイシンを受容するようになることで正常な暗号解読が保障される。

まず、候補遺伝子を絞り込むため、遺伝子データベースを用いて大腸菌、枯草菌、マイコプラズマに共通な遺伝子 373 遺伝子を抽出し、さらに機能未知の遺伝子(48)、さらに必須遺伝子を選び出すと、候補遺伝子は 5 つに絞り込まれた。これら 5 遺伝子の枯草菌および大腸菌の条件致死変異株を解析することにより、致死条件下で Lysidine が減少する遺伝子を同定し、*tilS* と名づけた。TilS タンパク質はイソロイシン tRNA と特異的に結合し、リジンと ATP を基質として Lysidine を合成することが示された。この反応機構を詳細に検討した結果、まず 1 段階目の反応として ATP が tRNA に付加してアデニレート中間体が生じ、次に第 2 段階目の反応としてリジンの ε アミノ基が中間体を求核置換攻撃することで Lysidine が形成されることを明らかにした。また、*in vitro* Lysidine 修飾によって tRNA が受容するアミノ酸がメチオニンからイソロイシンに変化することを実証した。また、イソロイシンとメチオニンの tRNA の変異体を作成して Lysidine 化の活性を測定した結果、TilS による識別部位を同定した(図 4 左、立教大学関根研究室との共同研究)。

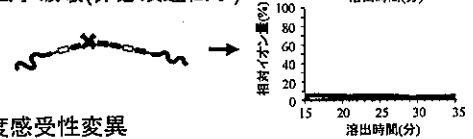
A 解析システムの概要



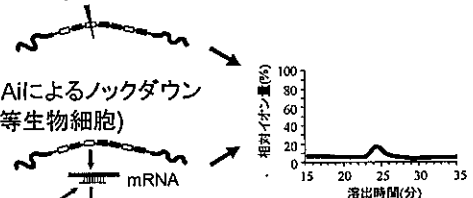
B 野生株



C 遺伝子破壊(非必須遺伝子)



D 温度感受性変異発現制御(必須遺伝子)



E RNAiによるノックダウン(高等生物細胞)

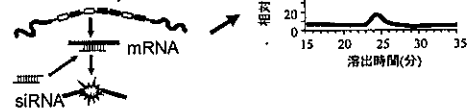


図2 リボヌクレオーム解析の概要

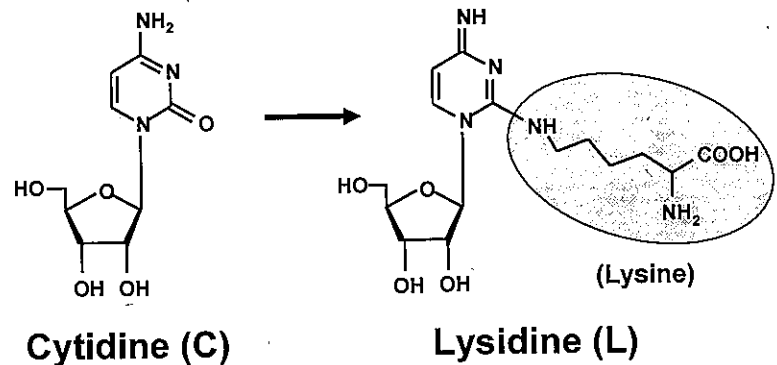


図3 Lysidineはシチジンの2位にリジンを持つ

3) メチオニン tRNA ac⁴C 合成酵素の機能解析

メチオニン tRNA のアンチコドン 1 字目シチジンはアセチル化されて ac⁴C になる。ac⁴C はメチオニン tRNA の正確なコドン認識を助ける働きがあることが知られている。リボヌクレオーム解析によってアセチル化酵素を同定し、TmcA と名づけた。TmcA はアセチル化ドメインに加えて ATP に結合する Walker A motif を持つ。アセチル CoA と ATP と転写合成メチオニン tRNA を基質として反応を行ったところ、アンチコド

ン1字目シチジンが特異的にアセチル化されて ac⁴C になった。一般的なアセチル化酵素はアセチル CoA 以外に ATP などのエネルギー源を必要としないため、TmcA が ATP を反応に必要とすることは特徴的であり、TmcA による ATP の加水分解はアセチル化反応そのものではなく、TmcA の構造変化に寄与すると考えられる。また、メチオニン tRNA とイソロイシン tRNA の変異体を作成し、TmcA による tRNA の識別機構を明らかにした(図4右)。TilS と TmcA の tRNA 認識部位を考え合わせると、メチオニン tRNA とイソロイシン tRNA の異なっている塩基のほとんどは TilS または TmcA による認識が必要であると言え、進化的に興味深い。

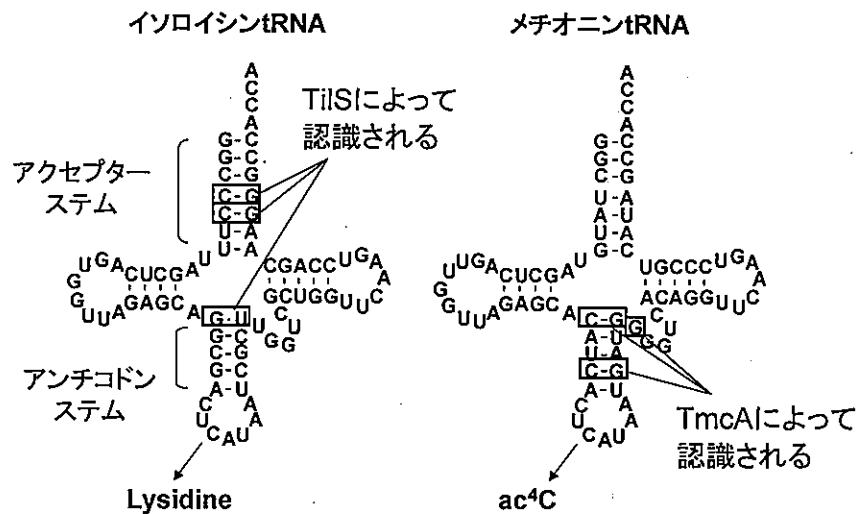


図4 TilSとTmcAによるイソロイシントRNAとメチオニントRNAの識別
2つのtRNA間で互いに異なっている塩基を灰色で示した。

4)古細菌イソロイシン tRNA のアンチコドン1字目シチジンの新規修飾塩基の同定

古細菌でも AUA(イソロイシン)コドンを読む tRNA は未修飾では CAU アンチコドンを持つ。しかし、古細菌はバクテリアの Lysidine 合成遺伝子 *tilS* のホモログを持たないことから、古細菌イソロイシン tRNA には未知の修飾が存在すると考えられた。これを同定するため、*H. marismortui* からイソロイシン tRNA を単離し(岐阜大、横川隆志博士と共同研究)、修飾を LC/MS によって解析した結果、分子量が 355 の新規ヌクレオシドが見出された。リボース(分子量 132)を除いた塩基部分の精密質量を測定すると、224.16176 だったため、修飾塩基の化学式は C₉H₁₈N₇(理論分子量 224.16182)と考えられた。さらに重水置換解析などを行い、アグマチンがシチジンの2位に付加していると考えられた。これを化学合成したところ(当専攻西郷研の和田猛先生および緒方氏との共同研究)、古細菌由来物と同一物質であった。古細菌のイソロイシンコドンの翻訳に必須な新規修飾塩基を同定したことによって、全生物界における AUA コドンの暗号解読機構が解明できたことになる。

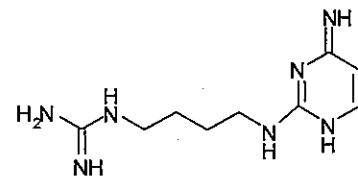


図5 古細菌イソロイシントRNA アンチコドン1字目シチジンの新規修飾塩基

5) tRNA のアンチコドン1字目ウリジンの2チオ化に関わる硫黄リレータンパク質群の同定と機能解析

リジン、グルタミン、グルタミン酸の tRNA アンチコドン1字目に存在する mnm⁵s²U の2チオ化(ウリジン2位の酸素の硫黄への置換)を行う新規遺伝子をリボヌクレオーム解析によって5つ見つけることに成功し、これらを *tusABCDE* と名づけた(図6A)。これらの欠損株は顕著な育成阻害を示した。TusB、TusC、TusD は 2:2:2 のヘテロ6量体を形成していた。TusA、TusBCD 複合体、TusE および、すでに2チオ化への関与が知られていた IscS と MnmA を用い、[³⁵S] システイン、ATP 及び転写合成 tRNA を基質にして、*in vitro* 2チオ化反応の再構成に成功した(図6B)。さらに、*in vitro* での解析により IscS→TusA→TusD→TusE→tRNA の順番で硫黄原子が運搬されることが判明し、TusABCDE は IscS から MnmA まで硫黄原子

を受け渡すリレーシステムを形成していることが明らかとなった。MnmA は ATP を使い、tRNA のウリジン 2 位をアデニル化することで活性化し、硫黄原子を導入することで反応が終結する (図 7)。IscS は他にも鉄硫黄クラスターをはじめとするさまざまな代謝経路や RNA 修飾に硫黄を供給する酵素であり、TusA のようなパートナータンパク質を経路ごとに使い分けることによって硫黄を振り分けていると考えられる。また、硫黄リレーは mnm^5s^2U の生合成だけでなく他の代謝経路にも硫黄を供給している可能性が考えられる。

まとめ

- 逆遺伝学的な RNA 修飾遺伝子の探索法(リボヌクレオーム解析)を確立した。
- 大腸菌 9 つの非必須と 1 つの必須の RNA 修飾遺伝子を同定した。
- Lysidine 修飾機構を明らかにし、遺伝暗号の解読機構における役割を解明した。
- ac4C アセチル化機構を明らかにした。
- 古細菌でイソロイシン翻訳に必須な新規修飾を同定した。
- tRNA アンチコドン 1 字目ウリジンのチオ化に関わる TusABCDE による硫黄リレーシステムを見出した。

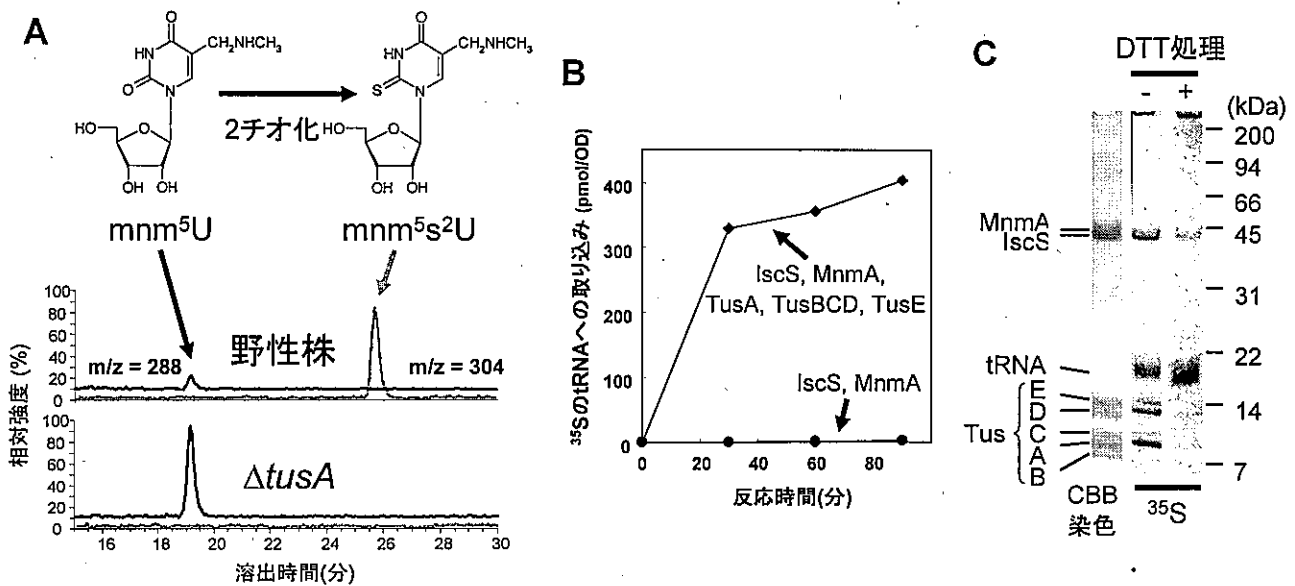


図6 mnm^5s^2U の2チオ化遺伝子の同定と機能解析

A. リボヌクレオーム解析による mnm^5s^2U の2チオ化遺伝子の同定

B. In vitroでのtRNAの2チオ化反応

反応に用いた酵素を示してある。

C. ^{35}S を用いたタンパク質間硫黄転移の解析

左、CBB染色。中央と右はオートラジオグラフィー。中央還元処理なし。右還元処理あり。

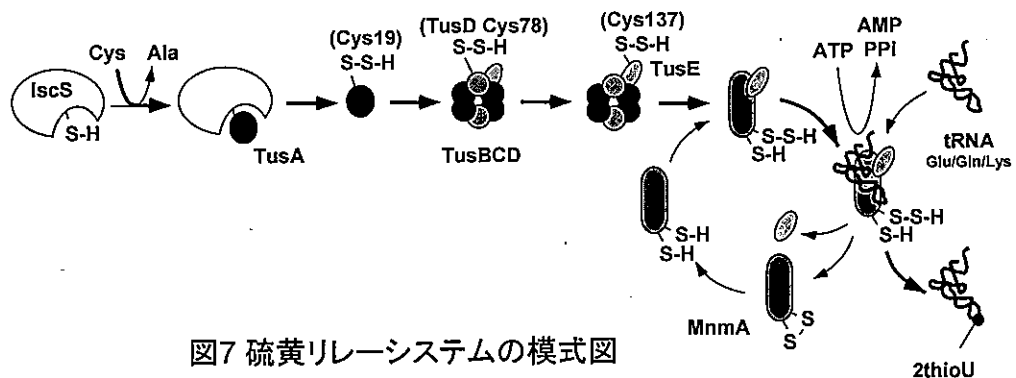


図7 硫黄リレーシステムの模式図