

審査の結果の要旨

氏名 池内 与志穂

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。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、タンパク質との相互作用、遺伝情報の解読などが制御されることが知られている。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。修飾によってコドン認識が決まるため、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。しかし、多くの修飾遺伝子が不明であったので、本研究では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。また、新規に同定したRNA修飾酵素の解析を行った。本論文は5章から構成されている。

1章では、tRNA修飾遺伝子群の探索を行った。大腸菌の遺伝子を破壊した株からRNAを抽出し、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。大腸菌ゲノムの約半分に当たる約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, 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章では、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を行った。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)コドンを読む。しかも、未修飾のイソロイシンtRNA前駆体はメチオニルトRNA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り、正常な暗号解読が保障される。lysidine修飾遺伝子の候補遺伝子として、大腸菌、枯草菌、マイコプラズマに共通に存在する機能未知かつ必須の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、*tIS*と名づけた。TiIS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修飾することを明らかにした。修飾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が形成されることが明らかになった。また、TiISによるtRNAの識別部位・機構を明らかにした(立教大学関根靖彦博士らとの共同研究)。

3章では、メチオニルトRNA ac⁴C合成酵素の機能解析を行った。メチオニルトRNA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はメチオニルトRNAの正確なコドン認識を助ける働きがある。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ルトRNA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。また、TmcAによるtRNAの識別機構を明らかにした。

4章では、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を行った。バクテリアと同様に古細菌でもAUA(イソロイシン)コドンを読むtRNAは未修飾ではCAUアンチコドンを有する。しかし、古細菌はバクテリアのlysidine修飾遺伝子*tIS*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、単離古細菌イソロイシンtRNAの修飾を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(岐阜大学横川隆志博士らと共同研究)。精密質量測定や重水置換解析などを行った結果、新規修飾塩基はアグマチンがシチジンの2位に付加した構造であると考えられた。これを化学合成したところ、古細菌由来物と同一物質であることが確かめられた(当専攻西郷研究室との共同研究)。

5章では、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を行った。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5つ見つけ、これらを*tusABCDE*と名づけた。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。さらに、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を用い、tRNAのウリジン2位をアデニル化し、硫黄原子を導入する。

なお、以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。