

## 論文の内容の要旨

## 論文題目

AUGコドンの正確な解読に寄与する $N^4$ -アセチルシチジンの生合成と機能Biogenesis and function of  $N^4$ -acetylcytidine in tRNA

responsible for accurate AUG decoding

氏名 谷口 貴昭

## 【緒言】

あらゆる生物において、遺伝情報を正確に翻訳することは、正常な機能を持つタンパク質を合成する上で必須である。タンパク質合成においてアダプター分子として働く tRNA には、転写後にさまざまな化学修飾が施されている。中でも、アンチコドン 1 文字目 (wobble 位) の修飾は翻訳精度の維持に重要な役割を担っている。一般に、一種類の tRNA は wobble 対合を用いて、隣り合う複数のコドンを読み解する事が多く、同じコドンボックス内においてプリンで終わるコドンは通常、同一種の tRNA によって解読される。AUN (N は A,U,G,C) コドンボックスは、唯一プリンで終わるコドンが異なるアミノ酸を指定している。

すなわち、AUA はイソロイシン(Ile)を指定し、AUG はメチオニン(Met)を指定している。しかし、AUA と AUG コドンの読み分けは難しく、バクテリアはこの二つのコドンを読み分けるために特別な機構を有している。

AUA コドンは、ライシジン(L)修飾を持つ tRNA<sup>Ile2</sup>によって解読されている(Fig. 1)。L 修飾は、シチジンの 2 位にリジンの  $\epsilon$ -位が共有結合した修飾塩基であり、CAU アンチコドンを持つ tRNA<sup>Ile</sup> 前駆体に、当研究室で同定された修飾酵素 TilS (tRNA<sup>Ile</sup> lysidine synthetase)によって導入される。この修飾が導入されることにより、tRNA のコドン認識能は AUG から AUA へと変化し、アミノ酸受容能は Met から Ile へと変化することで、AUA コドンを Ile として解読できるようになる。一方、AUG コドンは、大腸菌においては  $N^4$ -アセチルシチジン(ac<sup>4</sup>C)を wobble 位を持つ伸長 tRNA<sup>Met</sup>によって解読されている(Fig. 1)。ac<sup>4</sup>C 修飾はシチジンの 4 位のアミノ基がアセチル化された修飾塩基であり、バクテリア、真核生物、古細菌の tRNA と rRNA に幅広く存在する事が知られている。当研究室の先行研究において、ac<sup>4</sup>C 修飾酵素である TmcA (tRNA<sup>Met</sup> cytidine acetyltransferase)が同定されている。TmcA は GNAT ファミリーに属するアセチルトランスフェラーゼであり、アセチル CoA と ATP を基質として、tRNA に ac<sup>4</sup>C を導入する。TmcA のホモログは真核生物と古細菌に広く分布するが、バクテリアでは  $\gamma$ -プロテオバクテリアの一部にのみ見られる。枯草菌が属するファーミキューテス門は TmcA ホモログを有さず、tRNA<sup>Met</sup> に ac<sup>4</sup>C 修飾も見つかっていなかった。ところが、枯草菌から伸長 tRNA<sup>Met</sup> を単離し、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いて解析したところ、wobble 位に ac<sup>4</sup>C が存在する事を見出した(Fig. 2)。この事は、枯草菌には新規 tRNA アセチル化酵素が存在する事を示唆している。そこで、この新規 tRNA 修飾酵素を同定し、ac<sup>4</sup>C 修

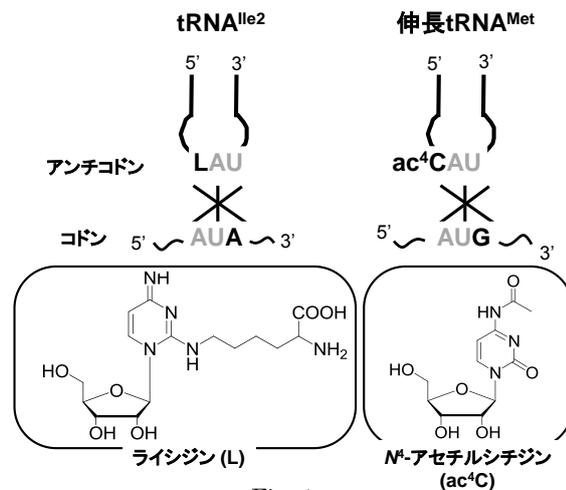


Fig. 1 バクテリア AUA/AUG コドン解読システム

飾の持つ役割を解明する事を目的に本研究を行った。

## 【実験と結果】

### (1) 枯草菌新規 ac<sup>4</sup>C 修飾酵素の同定

まず初めに、枯草菌 tRNA<sup>Met</sup>における ac<sup>4</sup>C 修飾酵素遺伝子を探索するために比較ゲノムの手法を用いた。比較ゲノムとは、ゲノム配列が決定された複数の生物種に対して、共通に存在する遺伝子を抽出する事により、目的の遺伝子を絞り込む手法である。ファーミキューテス門と近縁関係にあるマイコプラズマ数種を培養し、伸長 tRNA<sup>Met</sup>を相補的な DNA プロブを用いて単離した。LC/MS を用いて修飾塩基の解析を行ったところ、*Mycoplasma arthritidis*、*Mycoplasma hyorhinis*、*Mycoplasma mobile*、*Mycoplasma pulmonis* に ac<sup>4</sup>C 修飾が検出されたのに対して、*Mycoplasma gallisepticum* には ac<sup>4</sup>C が検出されなかった。また、大腸菌には TmcA が存在するため新規 ac<sup>4</sup>C 修飾酵素遺伝子は存在しないと考えた。これらの結果に *Mycoplasma capricolum* には ac<sup>4</sup>C が存在しないという報告を加えた条件で、比較ゲノムを用いて候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、*tmcAL* が最も信頼された候補遺伝子として見出された。そこで、枯草菌 *tmcAL* 欠損株を作製し ac<sup>4</sup>C が欠失しているかを調べた。作製した *tmcAL* 欠損株は低温感受性を示した。*tmcAL* 欠損株から tRNA<sup>Met</sup>を単離し、RNase T<sub>1</sub>を用いて G 特異的に切断した後に、LC/MS を用いて解析を行ったところ、野生株(WT)で見られていた ac<sup>4</sup>C 修飾は *tmcAL* 欠損株では完全に欠失していた。これにより、*tmcAL* を枯草菌 tRNA<sup>Met</sup> 新規 ac<sup>4</sup>C 修飾酵素遺伝子として同定する事に成功した。

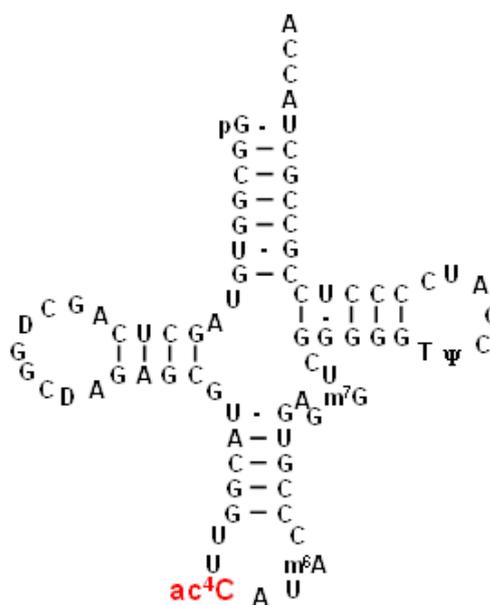


Fig. 2 枯草菌伸長 tRNA<sup>Met</sup>の二次構造

### (2) TmcALによる tRNA アセチル化の反応機構

続いて、大腸菌を用いて組み換え TmcAL を作製し、*in vitro* ac<sup>4</sup>C 修飾再構成反応を行った(Fig. 3)。基質には *tmcAL* 欠損株から単離した tRNA<sup>Met</sup>を用いた。酵素や ATP 非存在下では ac<sup>4</sup>C は検出されなかったが、ATP を加えたところ ac<sup>4</sup>C 修飾が一部検出された。しかし、通常、アセチル化反応の基質として用いられるアセチル CoA を加えても ac<sup>4</sup>C 修飾の割合は増加しなかった。驚いたことに、酢酸イオンを反応溶液に加えたところ、ac<sup>4</sup>C 修飾率の顕著な増加が見られた。また、安定同位体標識された酢酸イオンを用いて修飾再構成実験を行った結果、安定同位体標識された分だけ質量が増加したマススペクトルが観察された。これにより、TmcAL はアセチル CoA ではなく、酢酸イオンと ATP を用いて tRNA のアセチル化を触媒している事が明らかになった。酢酸イオンを加えていない条件でも ac<sup>4</sup>C 修飾が観察されたのは、酢酸イオンが反応溶液に混入していたためと思われる。TmcAL ホモログはファーミキューテス門、フソバクテリア、サーモトガ、半数程度のマイコプラズマ、メタン生成古細菌の一部に分布していた。また、TmcAL はクラス I アミノアシル tRNA 合成酵素と同じ HIGH モチーフを持つヌクレオチジル

トランスフェラーゼスーパーファミリーに属しており、Rossmann fold 様ドメインを持っている。アミノアシル tRNA 合成酵素は反応中間体としてアミノアシルアデニレートを合成する。したがって、アミノアシル化の反応機構から TmcAL による触媒機構を予想した (Fig. 3)。TmcAL は、まず酢酸イオンと ATP からアセチルアデニレート (Ac-AMP) を反応中間体として合成する。その後、Ac-AMP のアセチル基が tRNA 34 位のシジン 4 位のアミノ基に転移し、その際に AMP が放出されるという機構である。この反応機構を証明するため AMP と無水酢酸からアセチルアデニレートを有機合成し、修飾再構成反応を行った。その結果、アセチルアデニレートを加えた所、ATP 非存在下でも ac<sup>4</sup>C 修飾が再構成された。また、ATP の加水分解物を薄層クロマトグラフィーを用いて解析したところ、tRNA 依存的に AMP と PPi が生成された。これにより TmcAL によるアセチル化は、Fig. 3 の反応機構によって行われていることが証明された。また、この結果から、同定した酵素を TmcAL (tRNA<sup>Met</sup> cytidine acetate ligase) と命名した。

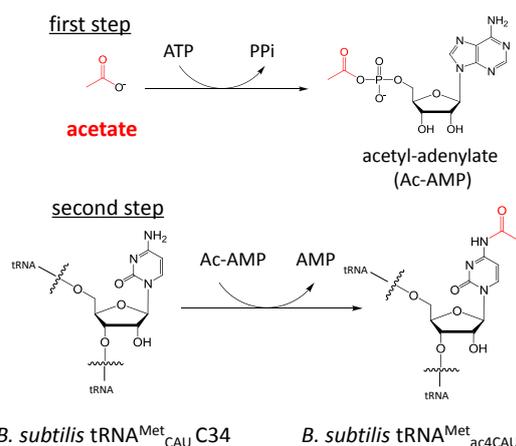


Fig. 3 TmcAL による tRNA アセチル化反応機構

### (3) TmcAL による tRNA 基質識別機構

枯草菌において、CAU アンチコドンを持つ tRNA として、伸長 tRNA<sup>Met</sup> の他にも、開始 tRNA<sup>Met</sup> と tRNA<sup>Ile2</sup> 前駆体が存在する。しかしながら、ac<sup>4</sup>C 修飾は伸長 tRNA<sup>Met</sup> にのみ導入されている。TmcAL がどのような仕組みでこれらの tRNA を識別しているのかを調べるために、tRNA の変異体解析を行った。T7 プロモーターを用いた *in vitro* 転写反応によって、tRNA 変異体を取得した。これらの tRNA 変異体を用いて *in vitro* ac<sup>4</sup>C 修飾再構成反応を行った。伸長 tRNA<sup>Met</sup> の変異体に関しては、アンチコドンループの塩基を一塩基置換しても、ac<sup>4</sup>C 修飾率にそれほど影響は見られなかった。しかし、U32C/C38A 変異体において全く ac<sup>4</sup>C 修飾が導入されなくなった。逆に、開始 tRNA<sup>Met</sup> と tRNA<sup>Ile</sup> においては野生型の配列では全く ac<sup>4</sup>C 修飾は導入されなかったが、これらの tRNA に C32U/A38C 変異を導入すると ac<sup>4</sup>C の修飾能を獲得することがわかった。これらの結果により、TmcAL は、主として tRNA 32 位と 38 位の塩基を識別する事が判明した。大腸菌 tRNA<sup>Met</sup> は C32 と A38 を持つので、TmcA と TmcAL は基質認識においても異なる機構をとっている。

### (4) ac<sup>4</sup>C は AUA コドンの誤翻訳を防止する

これまでに *in vitro* の実験により ac<sup>4</sup>C の役割は AUA コドンの誤翻訳の防止であると考えられてきた。そこで、まず、tmcAL と AUA コドンの翻訳に必須な tils との間に遺伝学的相互作用が存在するかを調べた。tilS は必須遺伝子であるため欠損できない。そこで、IPTG 依存的に tils を発現する株を用いて生育を調べた。その結果、tmcAL 欠損株では tils の発現を抑制すると野生株に比べ、顕著な生育阻害が見られた。これにより、tmcAL と tils との間の遺伝学的相互作用を見出す事が出来た。次に、*in vivo* において実際に ac<sup>4</sup>C が AUA コドンの誤翻訳防止に寄与しているかを調べた。枯草菌野生株、tmcAL 単独欠損株、tilS 発現抑制株、tilS 発現抑制株/tmcAL 欠損株を培養し、それぞれの菌体からタンパク質を抽出した。SDS-PAGE でタンパク

質を分離後にバンドを短冊状に切り出し、トリプシン消化後、LC/MSを用いて、IleのコードンであるAUAコードンが誤ってMetに翻訳されたペプチド断片が存在するかを解析した。野生株や*tmcAL*単独欠損株では誤翻訳されたペプチド断片は全く観測されなかった。一方で、AUAコードンの翻訳に必須な*tisS*の発現を抑制した株においては、誤翻訳断片がわずかに検出された。ところが、驚くべきことに、*tmcAL*欠損株において*tisS*の発現を抑制すると、誤翻訳断片の著しい増加が観察された。また、誤翻訳はAUAコードンのみにおいて起こっており、他のIleのコードン(AUCとAUU)では起こっていないこともCIDスペクトルの解析から判明した。これまでに16種類のペプチド断片において、AUAコードンにおけるIleからMetへの誤翻訳を観測している。

#### 【結言】

通常、生体内におけるアセチル化反応にはアセチル CoA が基質として用いられる。しかしながら、本研究において同定する事に成功した新規 tRNA アセチル化修飾酵素は、酢酸イオンを基質としていた。大腸菌と枯草菌では、全く異なる機構で、同じ tRNA の同一部位に ac<sup>4</sup>C 修飾を導入していることを明らかにした。このことは、バクテリアにおいて ac<sup>4</sup>C 修飾の機構が収斂進化したことを示している。また、*tmcAL* 欠損株において、AUA コードンの解読に必須な遺伝子である *tisS* の発現を抑制すると、AUA コードンに Met が導入される誤翻訳が頻繁に起こることを見出した。この事は、tRNA<sup>Ile2</sup> の L 修飾と tRNA<sup>Met</sup> の ac<sup>4</sup>C 修飾が協同的に AUA コードンの誤翻訳を防止していることを示している。すなわち、本研究において *in vivo* における ac<sup>4</sup>C 修飾の持つ生理学的意義を明らかにすることができた。