

平成 16 年 3 月 10 日

氏名 鳴 直樹



## 21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科  
応用化学専攻、化学システム工学専攻、  
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成15年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	しぎ なおき 鳴 直樹	生年月日
所属機関名	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻	
所在地	〒277-8562 千葉県柏市柏の葉5-1-5	
申請時点での 学年	博士課程 3年	
研究題目	高度好熱菌の温度適応性を支配する RNA 転写後修飾の生合成系の解明	
指導教官の所属・氏名	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 同 工学系研究科 教授 渡辺 公綱	

## I 研究の成果 (1000 字程度)

常温菌では tRNA の 54 位は通常リボチミジン(rT)であるが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* では培養温度が高くなるにつれて更にこの rT 残基の 2 位の O が S で置換された 2-チオリボチミジン(s2T)に変換されることにより tRNA が耐熱化される。しかしながら s2T(54)の生合成経路に関しては、その硫黄の供給体および合成酵素は未だ同定されていない。大腸菌 tRNA には硫黄を含む修飾塩基が 5 種類存在するが、それらの生合成にシステインデスルフラゼ IscS タンパクが関与していることが知られている。*T. thermophilus* の IscS のホモログ遺伝子を破壊した株を作成し、その tRNA の修飾塩基を LC/MS を用いて解析した結果、s2T 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 s2T の生合成は他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。35S-システイン、メチオニン、硫酸イオンを用いた *in vivo* 標識の実験により、s2T の硫黄原子は培地中のシステインおよび硫酸イオン由来であることが、tRNA 分解物の HPLC 解析により明らかになった。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* 再構成を試みたところ、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。この反応は、強い温度依存性を示したことから、*in vivo* での s2T 含量の変化が 2-チオ化酵素の性質によるものであることをはじめて明らかにした(下図)。また、*in vitro* の再構成系を用いた実験により s2T 合成には tRNA の 58 位に存在する 1-メチルアデノシン(m1A)が必要であることが示された。そこで、*T. thermophilus* の m1A58 合成酵素の候補遺伝子を破壊したところ、m1A の欠損と s2T 含量の顕著な低下(野生型の約 15%に減少)が観測された。また、この株は高温感受性を示し、tRNA の Tm 値も野生型に比べて約 2°C 減少していた。m1A 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、s2T の高温環境での役割が明確に示された。

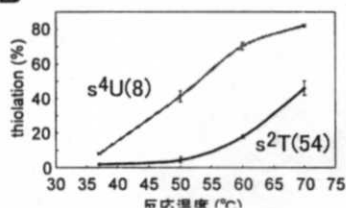
A

培養温度 (°C)	ヌクレオチド含量 (mol/tRNA)	
	s <sup>4</sup> Up	s <sup>2</sup> Tp
50	0.8±0.04	0.2±0.05
55	0.8	0.25
60	0.8	0.29
68	0.9	0.30
75	1.0	0.49
80	0.9	0.52

A. *in vivo* での培養温度に応じた  
s<sup>2</sup>T 含量の増加

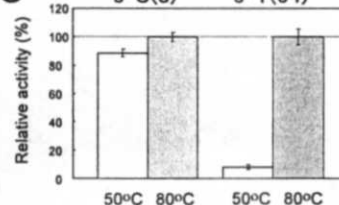
(Watanabe K., et al., 1976)

B



B. *in vitro* での反応温度による  
2-チオ化活性の上昇

C



C. 培養温度と 2-チオ化酵素活性

氏 名 鳴 直樹

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

ありません

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文  
(共同研究者(全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

**[口頭発表]**

鳴直樹<sup>1</sup>、鈴木勉<sup>1</sup>、寺田貴帆<sup>2,3</sup>、白水美香子<sup>2,3</sup>、横山茂之<sup>2,3,4</sup>、渡辺公綱<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東大院・新領域、<sup>2</sup>理研 GSC・タンパク質、<sup>3</sup>理研播磨、<sup>4</sup>東大院・理)

高度好熱菌 tRNA に特異に存在する修飾塩基 s<sup>2</sup>T の生合成機構

第 26 回日本分子生物学会 (平成 15 年 12 月 12 日)、神戸

**[ポスター発表]**

Naoki Shigi<sup>1</sup>, Tsutomu Suzuki<sup>1</sup>, Masatada Tamakoshi<sup>2</sup>, Tairo Oshima<sup>2</sup>, and Kimitsuna Watanabe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Tokyo University of Pharmacy and Life Science  
Biosynthetic mechanism and characterization of the thermophile-specific  
2-thiouridylation reaction of tRNA

COE international symposium at Tokyo, Japan (平成 15 年 8 月 28 日)、東京

Naoki Shigi<sup>1</sup>, Tsutomu Suzuki<sup>1</sup>, Masatada Tamakoshi<sup>2</sup>, Tairo Oshima<sup>2</sup>, and Kimitsuna Watanabe<sup>1</sup>

Biosynthesis and characterization of thermophile-specific 2-thiouridylation of tRNA

<sup>1</sup>Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

20<sup>th</sup> tRNA International work shop in Banz, (平成 15 年 10 月 3 日)、ドイツ