

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝暗号の解読に関わるtRNA修飾の生合成機構と機能解析
Biogenesis and function of tRNA modification involved in the decoding process

氏名 酒井 雄介

【背景と目的】

転移RNA(tRNA)は遺伝子発現の翻訳において、mRNA上の遺伝暗号を解読し、対応するアミノ酸を導入するアダプター分子として働く。tRNAは前駆体としてDNAから転写されたのち、成熟の過程で多彩な化学修飾を受け、構造や機能が微調整されている(tRNA修飾)。特にtRNAのアンチコドン1字目(wobble位)はtRNA修飾が集中しており、アミノアシルtRNA合成酵素によるtRNAの識別や翻訳フレームの維持、コドン認識の制御に寄与している(wobble修飾)。バクテリアにおけるウリジンのwobble修飾は、ウラシル環5位に炭素原子を介して修飾側鎖が結合しているxm⁵U系と、酸素原子を介して側鎖が結合したxo⁵U系に大別することができ、いずれもwobble塩基対形成に寄与している。特にxo⁵U系はファミリーコドンボックスに対応するtRNAに用いられ、コドン3字目にどの塩基が来ても解読できるよう、暗号解読能を拡張する役割を担っている。

先行研究から、大腸菌においてはAla、Leu、Pro、Ser、Thr、Valの6つのファミリーコドンボックスに対応するtRNAが、5-カルボキシメトキシウリジン(cmo⁵U)とそのメチルエステル誘導体である5-メトキシカルボニルメトキシウリジン(mcmo⁵U)を用いる事が知られている。cmo⁵Uおよびmcmo⁵Uの生合成機構については、中間体5-ヒドロキシウリジン(ho⁵U)を経由する多段階の反応機構である事が明らかになっている(Fig. 1)が、ho⁵Uの生合成機構とcmo⁵Uからmcmo⁵Uへのメチル化機構はわかっていない。私は、大腸菌tRNAのcmo⁵Uとmcmo⁵Uに着目し、xo⁵U系修飾の生合成機構の全容解明とこれらのwobble修飾の生理的意義を明らかにする事を目的に研究を行った。

【方法と結果】

1. tRNAヒドロキシル化機構の解析

この章ではcmo⁵U生合成の最初のヒドロキシル化機構について、当研究室の先行研究によって発見された遺伝子 $trhA$ 及び $trhO$ を解析した結果を論じた。

1.1 大腸菌において $trhA$ はcmo⁵U生合成のヒドロキシル化に関わっている

まず、大腸菌の野生株及び $trhA$ 欠損株からcmo⁵U/mcmo⁵Uを持つ6種類のtRNAを取得し、それらのwobble修飾をLC/MSによって解析した。その結果、 $trhA$ 欠損株のtRNA^{Leu3}及びtRNA^{Pro3}においてwobble修飾がほとんど失われ、未修飾のウリジンが蓄積しており、 $trhA$ がcmo⁵U生合成の最初のヒドロキシル化に寄与していることが明らかとなった。一方、他の4種類のtRNAにおいては、 $trhA$ 欠損株でも未修飾のウリジンと共に1-3割程度の修飾率でcmo⁵U/mcmo⁵Uが認められたため、 $trhA$ 以外にヒドロキシ

ル化を行っている因子の存在が示唆された。

1.2 比較ゲノム解析によって *trhA* と独立に tRNA のヒドロキシル化を行う *trhO* が見つかった

当研究室の共同研究者によって、これまでに見つかった xo^5U を合成する遺伝子群を手がかりとした比較ゲノム解析が行われ、*trhA* と独立にヒドロキシル化に寄与すると思われる候補遺伝子 *trhO* が発見された。

そこで私は、*trhA* と *trhO* の二重欠損株を構築し、単離した tRNA の wobble 修飾を解析した。その結果、*trhA*/*trhO* 二重欠損株においては wobble 位が完全に未修飾ウリジンになっていることが判明した。したがって、 ho^5U 合成は *trhA* と *trhO* のそれぞれが関与する独立した経路によって担われていることが明らかとなった。

1.3 *trhA* は プレフェン酸 を基質として ヒドロキシル化を行う

trhA によるヒドロキシル化の機構を明らかにするため、先行研究から関与が指摘されていたコリスミ酸の代謝経路について遺伝子破壊実験と培地への代謝物の相補実験を行い、*trhA* によるヒドロキシル化に必要な代謝物の絞り込みを行った。その結果、*trhA* によるヒドロキシル化には、シキミ酸経路の下流の代謝物であるプレフェン酸が必要であることが明らかとなった。プレフェン酸は、その後の $ho^5U \rightarrow cmo^5U$ の過程でも利用されていることから、 $cmo^5U/mcmo^5U$ 修飾形成とプレフェン酸が関与する代謝経路との生理学的な関わりが示唆された。

1.4 TrhO は 酸素依存の tRNA ヒドロキシル化酵素である

TrhO の組換えタンパク質を取得し、TrhO が tRNA を修飾する酵素であることを生化学的実験によって調べた。まず、*in vitro* 転写で取得した tRNA との結合性を調べたところ、TrhO は $tRNA^{Ala1}$ と複合体を形成した一方で、 $tRNA^{Leu3}$ は認識しなかった。この基質特異性は *trhA* 欠損株において $tRNA^{Leu3}$ だけ顕著に wobble 修飾を失ったことと一致する。続いて、過剰量の TrhO と転写合成した tRNA を混合したところ、wobble 位に ho^5U を形成させることに成功した。以上の結果は TrhO が tRNA を認識し、直接ヒドロキシル化する酵素であることを示している。

また、嫌気環境下で培養した *trhA* 欠損株は cmo^5U 修飾を形成しなかったことから、*trhO* によるヒドロキシル化は酸素分子を直接の基質としている可能性が考えられた。実際に、 ^{18}O 標識した酸素分子を含む混合ガス環境下で培養した株の wobble 修飾を解析したところ、 ^{18}O が ho^5U に取り込まれたことから、TrhO が酸素分子をヒドロキシル基の基質として利用していることが明らかとなった。

2. cmo^5U メチル化機構の解析

当研究室の先行研究において、 $mcmo^5U$ のメチル化に関与する遺伝子 *cmoM* が見つかった。この章ではこの遺伝子の解析について論ずる。

2.1 *cmoM* は cmo^5U を $mcmo^5U$ に変換する AdoMet 依存メチル化酵素である

cmoM の遺伝子破壊及びベクターによる遺伝子相補実験により、*cmoM* が $mcmo^5U$ 合成の最後のメチル化を担う遺伝子であることを明らかにした。

また、CmoM の組換えタンパク質を取得し、*in vitro* 修飾再構成実験を行った結果、CmoM が AdoMet 依存的に cmo^5U から $mcmo^5U$ への反応を触媒している事が確かめられ、 cmo^5U メチル化酵素であることが判明した。

2.2 大腸菌tRNA^{Pro3}でみられる生育相依存的なmcmo⁵U修飾率の変動

大腸菌を培養し、経時的に菌体を回収することで、異なるgrowth phaseにおけるwobble修飾の変化を観測した。その結果、初期の対数増殖期において、wobble位にmcmo⁵Uを持つ4種類のtRNAのうちtRNA^{Pro3}のみが低い修飾率を示し、growth phaseが進行するにしたがって修飾率が上昇することが明らかとなった。この結果は、growth phaseの進行に伴い、tRNA^{Pro3}のwobble修飾をcmo⁵Uからmcmo⁵Uへ変化させることで、Proコドン特異的に翻訳調節をする機構の存在を示唆している。

3. xo⁵U修飾の機能解析

本研究により、Uからho⁵Uへのヒドロキシル化と、cmo⁵Uからmcmo⁵Uへのメチル化のそれぞれの経路を担う遺伝子が同定されたため、これらの修飾を失った株の形質を調べることが初めて可能となった。この章では、これら修飾欠損株の形質を調べる事でxo⁵U修飾の機能と生理的意義について論ずる。

3.1 アイソアクセプターの欠損と掛け合わせることによって

大腸菌において、*trhA/trhO* 二重欠損株で若干の生育低下が観測されたものの、修飾欠損による顕著な形質は見られなかった。そこで、Ser と Pro、Thr のコドンボックスにおいて cmo⁵U を持つ tRNA と独立してコドンを読解するアイソアクセプターを遺伝的に欠損させ、cmo⁵U 修飾の各遺伝子欠損と掛け合わせたところ、UCG コドンを読むアイソアクセプター遺伝子 *serU* または ACG コドンを読む *thrW* の欠損と、*trhA/trhO* の二重欠損を掛け合わせた株が顕著な高温感受性を示すことが判明した。

3.2 UCGコドンの効率的な解読にho⁵Uが必要

次に、xo⁵U 修飾のコドン認識への寄与を調べるために、レポーターアッセイを行った。大腸菌 RF-2 のリコーディングサイトを用い、テストコドンの翻訳活性によって、+1 フレームシフトの効率が変化することで、wobble 修飾の有無による暗号解読能の活性を間接的に調べる系を用いた。その結果、GCG コドンの認識に mcmo⁵U の末端のメチル基が寄与していること、及び、*serU* 欠損株において UCG コドンの認識に ho⁵U のヒドロキシル基が寄与していることが明らかとなった。

【総括と考察】

本研究によって、xo⁵U修飾生合成の第一段階であるヒドロキシル化に関与する二つの遺伝子(*trhA*と*trhO*)が見つかったことで、ヒドロキシル化修飾の機能を初めて解析することが可能になった。それぞれSer及びThrのコドンボックスにおけるアイソアクセプターである*serU*及び*thrW*と修飾欠損の間で遺伝的相互作用が観測され、更にレポーターアッセイにより、ヒドロキシル化修飾が欠損すると、UCGコドンの解読能が著しく低下するという結果を得た。これらの結果は、xo⁵U系wobble修飾のウラシル5位の水酸基が暗号解読能に直接かかわることを示した初めての知見であり、tRNA修飾による遺伝暗号解読メカニズムの理解に大きく貢献した成果であると考えている。リボソーム小サブユニットのAサイトにおけるコドン対合の結晶構造解析の報告によると、cmo⁵U34のウラシル5位の水酸基はU33の2'水酸基と水素結合していることが明らかとなっている。この相互作用により、アンチコドンの構造が安定化し、非ワトソンクリック型の塩基対合も可能になると考えられており、今回の結果と一致する。

ヒドロキシル化反応には、*trhA*と*trhO*が関与する二つの異なる経路が冗長に関与していることが明ら

かとなった。様々なバクテリアにおいて、*trhA*と*trhO*のホモログを探索すると、そのうちの一方しか持たないバクテリアも多く、大腸菌においては*trhO*の活性が低いことから、異なる生物種がそれぞれ*trhA*、*trhO*によるヒドロキシル化機構を独立に獲得し、水平伝播によって二重に持つ生物種が生まれた可能性が考えられる。TrhOは酸素依存的な水酸化酵素であることが明らかになった一方で、*trhA*による水酸化経路は芳香族アミノ酸や二次代謝物を合成するシキミ酸経路の下流に生じるプレフェン酸を必要とすることが判明した。この結果から、 xo^5U 系wobble修飾が、生育環境に応じて、気相の酸素濃度やシキミ酸経路をモニターすることで修飾率を変化させ、コドン特異的な翻訳調節を行っている可能性が示唆された。

Fig.1 大腸菌における cmo^5U / $mcmo^5U$ の生合成スキーム。本研究によって最初のヒドロキシル化反応と最後のメチル化反応が明らかとなった。

