

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 谷 口 貴 昭

本研究は、枯草菌伸長 tRNA^{Met} のアンチコドン 1 字目 (wobble 位) に存在する *N*⁴-アセチルシチジン (ac⁴C) の修飾酵素遺伝子の同定およびその機能解析を行ったものであり、また、本研究を通して得られた知見に基づき、tRNA 修飾がコドン解読の正確性に与える影響を探索するものである。

一般に、同じコドンボックス内のプリンで終わる二つのコドンには、同一のアミノ酸が指定されており、どちらも U*NN (U*は U の修飾塩基) アンチコドンを持つ同じ tRNA によって解読されている。しかしながら、AUR (R=A または G) コドンでは、AUA コドンと AUG コドンはそれぞれ Ile と Met という異なるアミノ酸が指定されており、生物にとってその読み分けは難易度が高いことが知られている。tRNA には、様々な修飾塩基が存在し、翻訳精度の維持に大きな役割を果たしていることが知られている。大腸菌において、AUA コドンを解読する tRNA^{Ile} の wobble 位には、修飾酵素 TilS によってライシジン (L) 修飾が導入される。一方、AUG コドンを解読する伸長 tRNA^{Met} の wobble 位には ac⁴C 修飾が存在する。この ac⁴C 修飾は、修飾酵素である TmcA (tRNA^{Met} cytidine acetyltransferase) によって、ATP とアセチル CoA を基質として導入されている。しかしながら、枯草菌では TmcA のホモログが存在せず、ac⁴C 修飾は存在しないと考えられていた。

論文提出者である谷口貴昭君は、枯草菌から伸長 tRNA^{Met} を単離し、LC/MS 解析を行ったところ、伸長 tRNA^{Met} wobble 位にも ac⁴C 修飾が存在する事を見出した。枯草菌には TmcA のホモログが存在しないため、枯草菌において新規 ac⁴C 修飾酵素の存在が示唆された。新規 ac⁴C 修飾酵素を同定するために、様々なマイコプラズマの tRNA^{Met} を解析することで、ac⁴C の有無から比較ゲノムを用いて候補遺伝子を絞り込むことに成功した。実際に、枯草菌において候補遺伝子を欠損させると、ac⁴C 修飾が欠損することが明らかとなり、この遺伝子を TmcAL (tRNA^{Met} cytidine acetate ligase) と命名した。

次に、提出者は大腸菌において組み換え TmcAL を作製し、*in vitro* での ac⁴C 修飾再構成反応を行った。これにより、TmcAL が酢酸と ATP を基質としてアセチル化を触媒している事が明らかとなった。通常、アセチル基供与体として

アセチル CoA が使われるが、TmcAL は酢酸イオンを用いて RNA のアセチル化を行う初めての酵素である点で新規性のある結果である。また、TmcAL はクラス I のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) と同じスーパーファミリーに属している。aaRS の反応機構のアナロジーから、TmcAL の反応中間体をアセチルアデニレート (Ac-AMP) であると予想し、実際に Ac-AMP を有機合成し、酢酸と ATP の代わりに基質として用いたところ、ac⁴C 修飾が形成できたことから、Ac-AMP が反応中間体であることを証明した。

また、提出者は、TmcAL の基質認識についての解析を行った。これらの tRNA の中から伸長 tRNA^{Met} のみを識別する機構を解明するために、様々な tRNA 変異体を作製し ac⁴C 修飾形成能を測定した。その結果、伸長 tRNA^{Met} の U32/C38 の二つの塩基が TmcAL による強い正の識別部位である事を見出した。また、TmcAL のアラインメントを作製し、保存されている残基を Ala に置換した変異体を複数作製し、同様に ac⁴C 修飾再構成反応を行った。その結果、TmcAL の反応に重要である複数の His や Arg といった塩基性の残基を同定する事に成功した。

更に、論文提出者は TmcAL と ac⁴C 修飾が担う生物学的な意義について研究を行った。tmcAL 欠損株は低温感受性を示すが、AUA コドンの解読に必須な L 修飾遺伝子 *tilS* の発現を抑制すると、強い生育阻害があることが判明した。この株からタンパク質を抽出し、LC/MS を用いてペプチド配列を解析したところ、AUA コドン特異的な Ile から Met への誤翻訳が高頻度で観察されることを見出した。この事実は、tRNA^{Met} の ac⁴C 修飾と tRNA^{Ile2} の L 修飾が協調的に AUA コドンの誤翻訳を防止する役割を担っていることを寄与する事を示す結果である。この成果は、ac⁴C 修飾の生理学的な役割を初めて明らかにした点で高く評価できる。

本論文において、提出者は、① バクテリア tRNA^{Met} を基質にする新規 ac⁴C 修飾酵素を発見し ac⁴C 修飾の収斂進化を考察した点、② 酢酸イオンを基質とする初めての RNA 修飾酵素の発見、③ 二つの tRNA 修飾による協調的な AUA コドンの誤翻訳を防止、といった点を明らかにし、また、これらに対する考察と今後の展望を述べている。これらの成果は、AUA コドン解読機構に対する新たな重要な知見を与えることで修飾塩基が担う遺伝暗号解読機構に新しい視点を与え、生化学、分子生物学の進展に大きく貢献している。また、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。