

学位論文

*Thermoplasma acidophilum* におけるマルチサイト特異性  
アーケオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ  
(ArcTGT)の解析

博士（工学）

愛媛大学大学院理工学研究科  
物質生命工学専攻

河村 卓哉

2016年

## 目次

序論 .....	1
図 .....	6
第 1 章. <i>Thermoplasma acidophilum</i> tRNA <sup>Leu</sup> の構造的平衡	
1-1. 序 .....	12
1-2. 試薬、材料 .....	12
1-3. <i>T. acidophilum</i> tRNA <sup>Cys</sup> の解析方法 .....	12
1-3-1. <i>T. acidophilum</i> の培養 .....	13
1-3-2. total RNA の回収 .....	13
1-3-3. Q-Sepharose カラムを用いた高分子 RNA の除去.....	14
1-3-4. 固相化 DNA プローブ法 .....	14
1-3-5. ゲル切り出しによる精製.....	15
1-3-6. MALDI-MS 解析 .....	15
1-4. <i>Pyrococcus horikoshii</i> の ArcTGT と変異体 tRNA を用いた解析方法.....	15
1-4-1. <i>P. horikoshii</i> ArcTGT の発現・精製 .....	16
1-4-2. tRNA 転写産物の調整 .....	16
1-4-3. <sup>14</sup> C-グアニン塩基交換活性測定 .....	18
1-5. 結果 .....	19
1-5-1. <i>T. acidophilum</i> の培養 .....	19
1-5-2. total RNA の調整 .....	19
1-5-3. 単一な tRNA <sup>Cys</sup> の調整.....	19
1-5-4. tRNA <sup>Cys</sup> の質量分析.....	20
1-5-5. <i>P. horikoshii</i> ArcTGT を用いた <i>T. acidophilum</i> tRNA <sup>Leu</sup> の構造的平衡の検証..	21
1-6. 考察 .....	22
図 .....	23
第 2 章. 組み換えタンパク質を用いたマルチサイト特異性の解析	
2-1. 序 .....	28
2-2. 試薬・菌株 .....	28
2-3. <i>T. acidophilum</i> S30 の調整方法.....	28

2-4. Ta1493 遺伝子産物の調整方法.....	29
2-4-1. Ta1493 遺伝子産物の発現.....	29
2-4-2. Ta1493 遺伝子産物の精製.....	31
2-5. Ta1493 遺伝子産物可溶化条件の検討.....	31
2-5-1. 可溶化ベクターを用いた発現.....	32
2-5-2. 界面活性剤を用いたタンパク質精製.....	33
2-6. <i>Thermococcus kodakarensis</i> ArcTGT の発現・精製方法.....	34
2-7. in vitro での酵素と変異体 tRNA を用いた解析方法.....	35
2-8. 結果.....	36
2-8-1. <i>T. acidophilum</i> S30 を用いたグアニン塩基交換活性測定.....	36
2-8-2. <i>arcTGT</i> 遺伝子の探索.....	36
2-8-3. Ta1493 遺伝子産物を用いたグアニン塩基交換活性測定.....	37
2-8-4. Ta1493 遺伝子産物可溶化条件の検討.....	38
2-8-5. <i>T. kodakarensis</i> ArcTGT を用いたグアニン塩基交換活性測定.....	39
2-9. 考察.....	40
図.....	42

### 第3章. *T. kodakarensis* KUWA 株を用いたマルチサイト特異性の解析

3-1. 序.....	48
3-2. 試薬・培地・菌株.....	49
3-3. <i>arcTGT</i> 遺伝子破壊株の作製方法.....	53
3-3-1. <i>T. kodakarensis</i> KUWA 株由来ゲノム DNA の回収.....	53
3-3-2. 破壊株作製用プラスミド(pUD $\Delta$ arcTGT)の構築.....	54
3-3-3. $\Delta$ arcTGT 株の構築.....	57
3-3-4. $\Delta$ arcTGT 株の確認.....	57
3-3-5. $\Delta$ arcTGT 株大量培養.....	58
3-3-6. tRNA 混合物の調整.....	58
3-3-7. アーケオシン消失の確認.....	59
3-4. Ta1493 遺伝子相補株(KTA1493 株)の作製方法.....	60
3-4-1. 相同組み換え用プラスミド(pCTTA)の構築.....	60
3-4-2. KTA1493 株の構築.....	61
3-4-3. KTA1493株の大量培養.....	61
3-4-4. Ta1493 遺伝子由来タンパク質発現の確認.....	62

3-4-4-1. 抗 Ta1493 ポリクローナル抗体の調整 .....	62
3-4-4-2. ウェスタンブロッティング解析 .....	62
3-4-5. アーケオシン合成の確認.....	63
3-5. KTA1493 株での <i>T. acidophilum</i> tRNA <sup>Leu</sup> (WT と 3 種類の変異 tRNA)の発現方法.	63
3-5-1. <i>T. acidophilum</i> tRNA <sup>Leu</sup> 発現用プラスミド(pTk02-tRNA <sup>Leu</sup> )の作製 .....	63
3-5-2. <i>T. acidophilum</i> tRNA <sup>Leu</sup> 発現 .....	65
3-5-3. ノーザンハイブリダイゼーション解析.....	65
3-5-4. 発現させた tRNA <sup>Leu</sup> の解析.....	66
3-5-4-1. 固相化 DNA プローブ法.....	66
3-6. 6 x His-tag <i>T. acidophilum</i> ArcTGT を用いた解析 .....	67
3-6-1. 6 x His-ArcTGT の発現.....	67
3-6-2. 6 x His-ArcTGT の精製.....	69
3-6-3. ウェスタンブロッティング解析.....	69
3-7. 結果.....	70
3-7-1. $\Delta$ arcTGT 株の構築.....	70
3-7-2. KTA1493 株の構築 .....	70
3-7-3. <i>T. acidophilum</i> tRNA <sup>Leu</sup> の発現と回収 .....	71
3-7-4. マルチサイト特異性の解析.....	72
3-7-5. KTA1493 株における他の tRNA の分析.....	73
3-7-6. 6 x His-tag <i>T. acidophilum</i> ArcTGT 精製方法の検討.....	74
3-8. 考察.....	75
図 .....	77
結論 .....	88
参考文献 .....	89
発表論文 .....	97
学会発表 .....	98
略語表 .....	100
謝辞 .....	102

# 序論

## 古細菌の tRNA 修飾とその機能

地球上に存在する全ての生物は、真正細菌、古細菌、真核生物の3つのドメインに分類される[1]。多くの古細菌は、高温、高圧、低温、など我々には想像もつかないような極限環境下で生育しており、一見独自の進化を経た生物のように思える。実際、真核生物と古細菌では、核の有無・細胞膜の構造・エネルギー産生機構・異化代謝・生合成機構など多くの点で違いが見られる。しかしながら、Woese 等が小サブユニット rRNA (原核生物では 16S rRNA、真核生物では 18S rRNA)を解析した結果、古細菌は真正細菌や真核生物とは別のグループを形成しているが、古細菌の祖先と真核生物の祖先が途中で分岐していることが判った(図 1)[1]。そのため、古細菌は真正細菌よりも真核生物に近い生化学的特徴を持っていることが多く、古細菌の研究は真核生物の進化の謎を解く鍵を握っていると思われる。

*Thermoplasma acidophilum* は、至適生育温度が 56°C、至適 pH が 1.9 の好熱好酸性古細菌である[2]。この古細菌の特徴は、細胞壁をもたないため細胞は不定形をしており(図 2)、約 1500 の遺伝子しかないにもかかわらず、DNA と結合するヒストンに似たタンパク質があり、限られた遺伝子産物でプロテアソームやシャペロニンなどの巨大複合体を形成している[3-11]。また、真核生物の起源ではないかという仮説もある。この他にも多角的な角度から *T. acidophilum* の研究が行われているが、RNA に関する知見はあまりなかった[12-15]。しかし、近年 *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAG</sub> のヌクレオチド配列が決定され(図 3)、一般的な修飾ヌクレオシドから古細菌で初めて発見されたもの(s<sup>4</sup>U9, ncm<sup>5</sup>U34)や新規ポジションに存在する修飾ヌクレオシド(G<sup>+</sup>13, m<sup>7</sup>G49)などが報告された[16]。

RNA には、tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, piRNA など数多くの種類が存在し、全て DNA から転写され生成されるが、多くの RNA は転写後に修飾を受ける。中でも tRNA における修飾ヌクレオシドの種類は一際多く、2015 年 12 月現在、RNA 全体で発見されている 112 種類の修飾ヌクレオシドのうち 93 種類が tRNA に存在している[17, 18](The RNA Modification Database : <http://mods.rna.albany.edu/mods/modifications/search>)。これら修飾ヌクレオシドは、塩基部分にメチル基が転移されたものや酸素原子が硫黄原子に置換されたもの、多段階反応によって合成されるものや嵩高い官能基が付加したものなどがあり(図 4)、真正細菌、古細菌、真核生物の3つドメインに共通して存在するものや、各々のドメインや2つのドメイン間にのみ存在するものがある(図 5)。また、tRNA 修飾酵素

も多様化しており、1種類で機能するものや、複数の酵素で多段階反応を行うもの、同じ修飾でも部位によって異なる酵素が機能するため、tRNA 修飾酵素は 93 種類以上存在する。

tRNA は、RNA とアミノ酸間のアダプター分子でアミノ酸をリボソームに運ぶ役割を担っている。tRNA 修飾が多様化しているのは、効率よくタンパク質合成を行うためである。1 つの tRNA に複数の修飾ヌクレオシドが存在しているが、これらの修飾には、tRNA の構造の安定化や tRNA の種類に対応したアミノ酸の結合、mRNA のコドンを読み取る際の正確な読み枠の決定など様々な役割がある。また、極限環境に生息する生物にとって、tRNA の安定化は極めて重要である。温度だけに着目すると、地球上には高温な場所もあれば低温の場所もあり、短時間で高温から低温に低温から高温に変化する環境もある。生物はこのような環境にも対応して絶えずタンパク質合成を行わなければならない。そのため、構造の安定化を決定する tRNA 修飾は生物にとって必要不可欠なものである。

RNA が生命の誕生をもたらしたとする「RNA ワールド仮説」[19]があるように、RNA の起源は古く、生命と共に進化してきたと考えられ、それと並行して RNA 修飾酵素群も進化することで目まぐるしく変化する環境に対応してきたと思われる。そのため、RNA 修飾酵素は、分子進化を議論する上で注目されつつある。

そこで、RNA 修飾を通して古細菌と真核生物の RNA 成熟システムがどのような分子進化の道筋を経ていったのか議論するため、まずは *T. acidophilum* の tRNA<sup>Leu</sup> に存在するアーケオシンの研究を行った。

アーケオシン ( $G^+$ )は、2 段階反応で合成される修飾ヌクレオシドであり、1 段階目でアーケオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ (ArcTGT) によってグアニン塩基と preQ<sub>0</sub> 塩基が交換され、さらに preQ<sub>0</sub> 塩基からアーケオシン合成酵素 (ArcS)によってアーケオシンが合成される(図 6A)[20-24]。アーケオシンは、特徴的な構造をした 7-デアザグアニンと呼ばれる塩基で構成されており古細菌のみが持っているが[25]、真核生物と真正細菌にもこの塩基を利用したキューオシン (Q)が存在する。

真正細菌のキューオシンはアーケオシンと同様の多段階反応によって合成され、1 段階目でキューオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ (QueTGT) によってグアニン塩基と preQ<sub>1</sub> 塩基が交換され、その後 S-アデノシル-L-メチオニン tRNA リボシルトランスフェラーゼイソメラーゼ (QueA)とエポキシキューオシンレダクターゼ

(QueG)によって preQ<sub>1</sub> 塩基からエポキシキューオシンを経てキューオシンが合成される(図 6B)[26-29]。また、真核生物では栄養源として取り込んだキューオシンが真核生物 TGT によって直接グアニン塩基と交換されキューオシンが形成される[30, 31]。キューオシンは、GUN アンチコドンをもつ tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> の 34 位に存在しており(図 7A)、コドン-アンチコドン対合の強化とフレームシフトエラーを防ぐ機能を担っている[17, 32-34]。

一方、アーケオシンは初め *T. acidophilum* の tRNA<sup>Met<sub>m</sub></sup> から未知の修飾ヌクレオシドとして発見され[35]、その後 *Haloferax volcanii* [36], *Thermoproteus neutrophilus* [37], *Sulfolobus acidocaldarius* [28], *Haloarcula marismortui* [38, 39]などで発見された。特に *H. volcanii* では 33 種類の tRNA が分析されており、このうち 16 種類の tRNA でアーケオシンが検出され、どの tRNA でも 15 位にのみ存在していることが判っている(図 7A)。また、バイオインフォマティクスによって G<sup>+</sup>15 は、G15-C48 の塩基対合を強くし tRNA の L 字型構造の安定化に寄与していると推測されている(図 7B) [17, 40]。しかし、*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu<sub>UAG</sub></sup> では、アーケオシンが 15 位だけでなく 13 位にも存在しており[16]、これまで G<sup>+</sup>13 に関する報告はない。そこで、本研究では 2 カ所のアーケオシンが導入される生合成経路並びに機能を明らかにするため、まずは 1 段階目で働く ArcTGT が G13 と G15 のグアニン塩基を交換するメカニズムを解明することにした。

ArcTGT が tRNA<sup>Leu</sup> の 13 位と 15 位を認識する機構は 3 つ考えられ、1 つは tRNA に要因があり、tRNA<sup>Leu</sup> の G13 が G15 に位置するような構造的平衡が引き起こされるなら 15 位特異的な ArcTGT が 13 位のグアニン塩基も交換してしまうのかもしれない(図 8)。ArcTGT と tRNA との複合体の構造は既に解かれており、ArcTGT が tRNA を認識し結合すると tRNA の L 型構造が λ-form に変化することが報告されているため[41]、*T. acidophilum* の tRNA<sup>Leu</sup> の D-loop が図 8 のような構造的平衡を持つ可能性も考えられる。そこで、第 1 章で *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> の構造的平衡の有無を検証した。

また、酵素側の影響も考えられ 13 位と 15 位で部位特異性の異なる 2 種類の ArcTGT によって 2 カ所のグアニン塩基が交換されるか、はたまた両方に作用するマルチサイト特異性をもった ArcTGT によって交換されるのかもしれない(図 8)。tRNA 修飾酵素は基本的に部位特異的に反応するため、修飾部位が異なるとたとえ同じ修飾でも異なる酵素が働く。一例を挙げると、古細菌 tRNA には m<sup>2</sup>G (N<sup>2</sup>-メチルグアニン) が存在するが、6 位(m<sup>2</sup>G6)に導入する時には Trm14 が[42]、10 位(m<sup>2</sup>G10)に導入する時は Trm-G10 が[43]、



そして 26 位( $m^2G_{26}$ )に導入する時には Trm1 が反応する[44]。しかし例外的に複数の部位に作用する酵素もごくわずかだが存在しており、TrmI は 57 位と 58 位に  $m^1A$  ( $N^1$ -メチルアデニン)を導入し[45]、TruA は 38 位、39 位、40 位に  $\Psi$  (シュードウリジン)を導入する[46-51]。そして、*Aquifex aeolicus* の Trm1 は、 $m^2G$  ( $N^2$ ,  $N^2$ -ジメチルグアニン) を 26 位と 27 位に導入することが報告されている[52]。そのため ArcTGT がマルチサイト特異性をもつ可能性も否定できない。そこで第 2 章では、*T. acidophilum* arcTGT 遺伝子を同定し *in vitro* の実験を行いマルチサイト特異性を検証しようと試みた。しかし、大腸菌で組み換えタンパク質を発現させると不溶化してしまうことが判明した。

*T. acidophilum* に由来するタンパク質を大腸菌で発現させ回収することができなかつたので、第 3 章では、同じ古細菌に属し遺伝学的手法が確立している *Thermococcus kodakarensis* の細胞内で異種のタンパク質と tRNA を発現させるシステムを構築し、*T. acidophilum* ArcTGT の tRNA<sup>Leu</sup> に対するマルチサイト特異性を確認した。

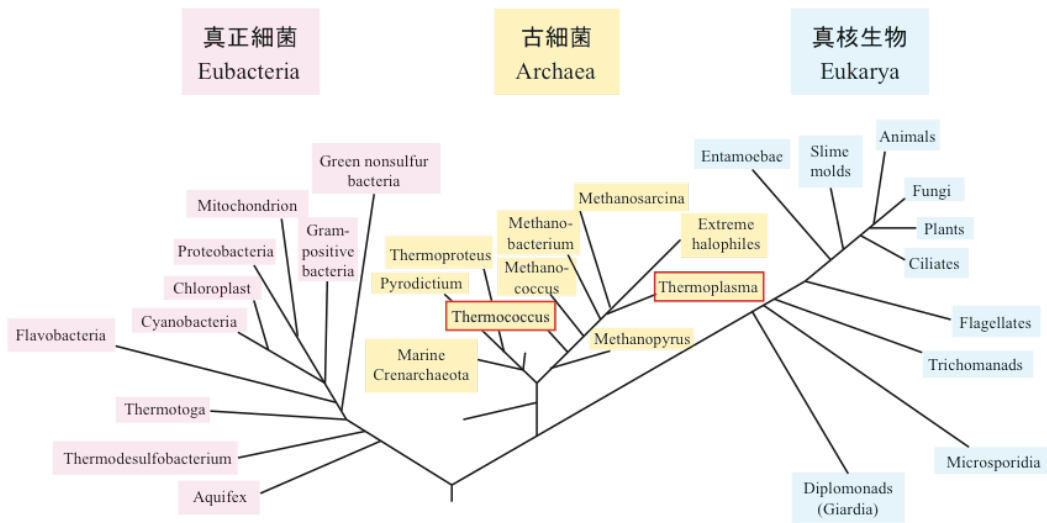


図 1. 生物の系統樹

(Brock Biology of Microorganisms, 2006, Pearson Prentice Hall, Inc.)

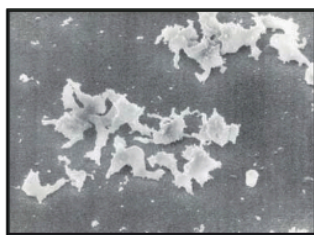


図 2. *Thermoplasma acidophilum*

(<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~lcb-7/poster.jpg>)

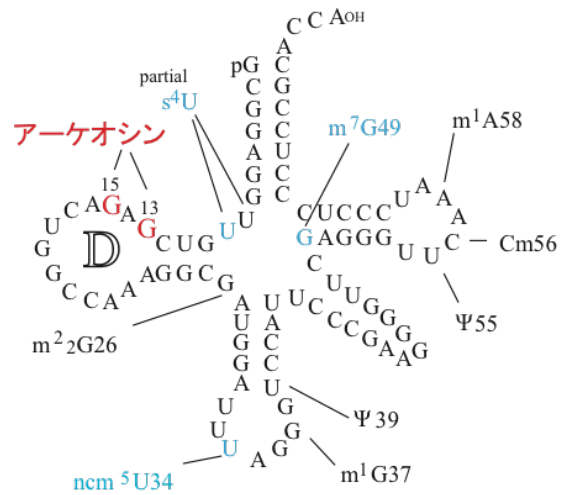


図 3. *Thermoplasma acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAG</sub>

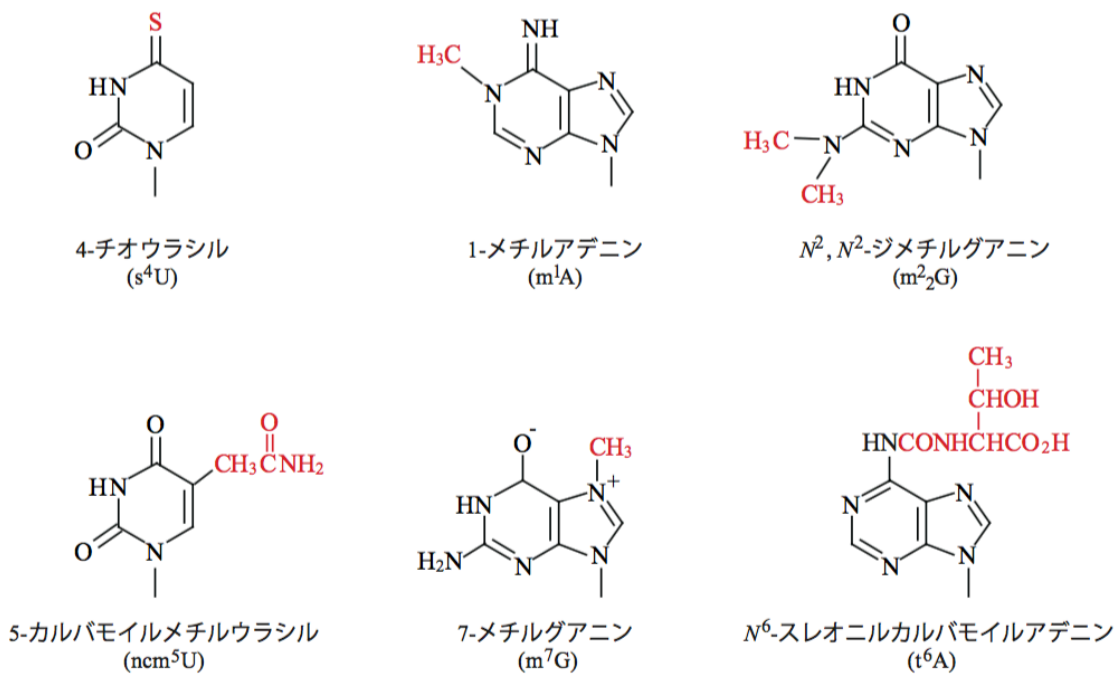


図 4. 一部の tRNA 修飾塩基

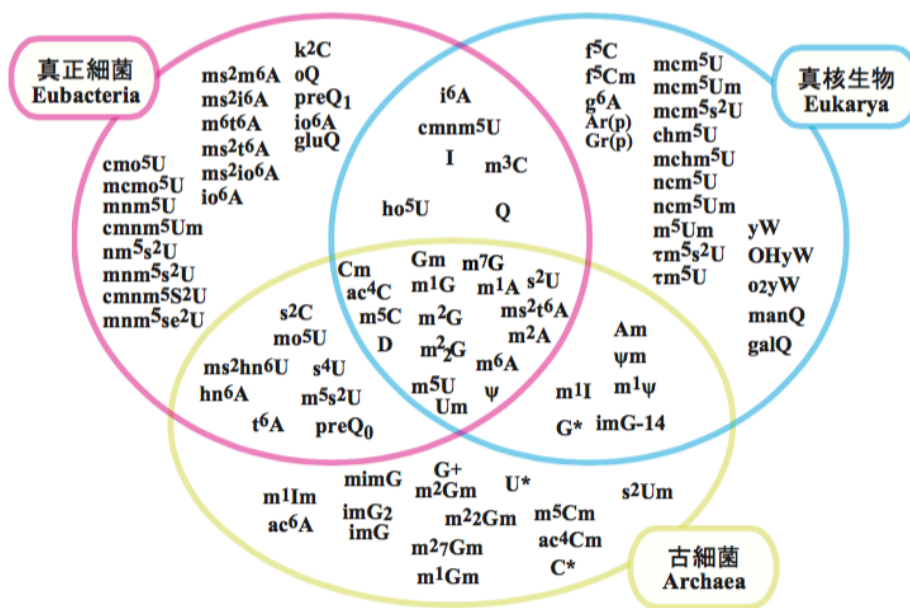


図 5. 修飾ヌクレオシドの分布

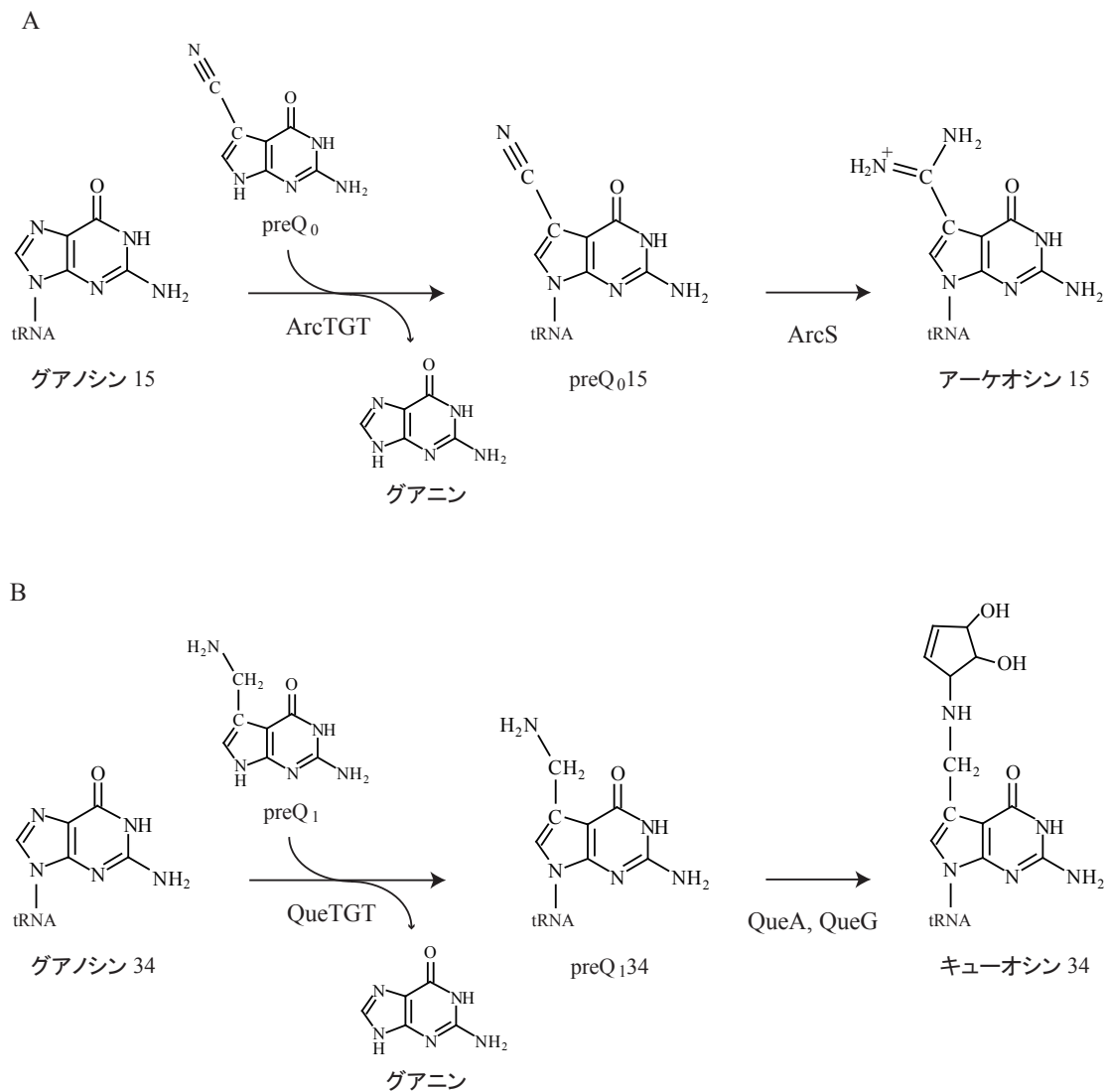


図 6. (A) アーケオシンの合成経路。 ArcTGT : アーケオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ, ArcS : アーケオシン合成酵素 (B) 真正細菌におけるキューオシン合成経路。 QueTGT : キューオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ, QueA : S-アデノシル-L-メチオニン tRNA リボシルトランスフェラーゼイソメラーゼ, QueG : エポキシキューオシンレダクターゼ

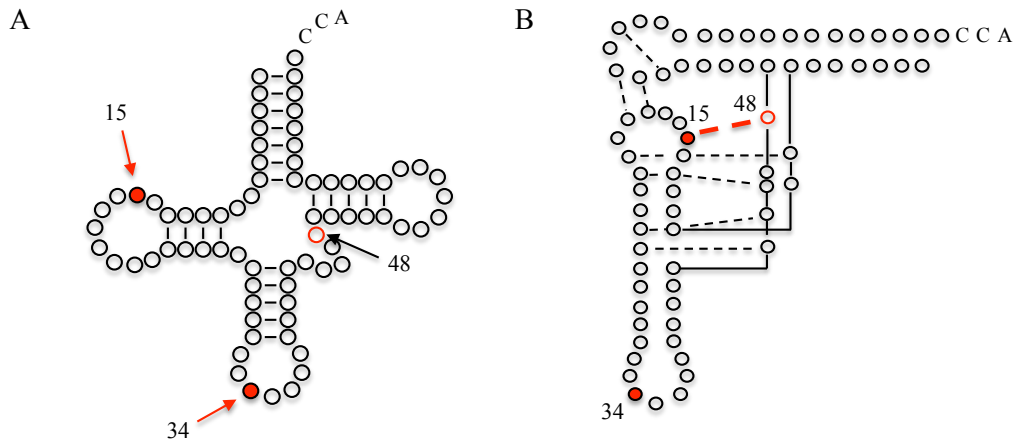
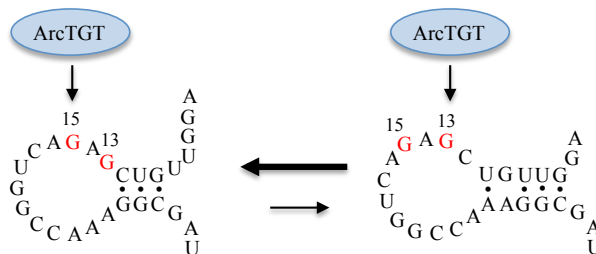
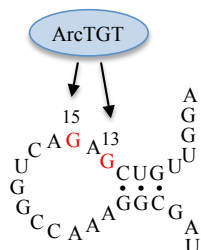


図 7. (A) tRNA クローバーリーフ構造。矢印と数字はポジションを表している。(B) tRNA の L 字型構造。数字はポジションを表しており、破線は塩基同士の相互作用を示している。

① D-armのG13が15位にくるような構造的平衡が存在する。



② ArcTGTがマルチサイト特異性を持つ。



③ 複数のArcTGTが存在する。

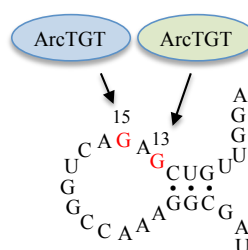


図 8. 13 位と 15 位の 2 カ所のグアニン塩基が交換される 3 つの仮説。

第 1 章 *Thermoplasma acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> の構造的平衡

## 1-1. 序

13 位がグアノシン(G)の tRNA は、古細菌、真正細菌、真核生物の tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>で見られるが、古細菌 *Halofelax volcanii* のこれらの tRNA では 13 位が未修飾の G となっている[17]。 *Thermoplasma acidophilum* でも tRNA<sup>Leu</sup>に加えて tRNA<sup>Cys</sup>が G13 と G15 となっているため、 *T. acidophilum* の細胞内では、 tRNA<sup>Cys</sup>も G<sup>+</sup>13, G<sup>+</sup>15 に修飾されていると予想された。そこで、この tRNA の 13 位と 15 位の配列を確認するため、精製し質量分析を行った。

また、 *T. acidophilum* の ArcTGT が 13 位と 15 位の 2 カ所に作用する原因が図 1-1 のような tRNA<sup>Leu</sup> の構造的平衡にないことを確認した。そのために、 *Pyrococcus horikoshii* の ArcTGT を *T. acidophilum* Wild-type tRNA<sup>Leu</sup> (G13・G15)と 13 位 15 位のグアノシンをアデノシンに変えた変異体 tRNA の転写産物と反応させ、グアニン塩基交換活性を測定した。 *P. horikoshii* ArcTGT は、変異体 tRNA を用いた基質認識機構の生化学的解析や構造解析が行われており、アクセプターステムからの G15 のリン酸バックボーンを認識し、G15 を位置特異的にかつ配列非特異的に認識していることが報告されている[53, 54]。もしも、tRNA<sup>Leu</sup>に構造的平衡があるならば、15 位にしか反応しない *P. horikoshii* ArcTGT でも 13 位と 15 位の 2 カ所に作用すると考えられた。

## 1-2. 試薬・菌株

Guanine hydrochloride [8-<sup>14</sup>C] (2.19 Mbq/mmol) は Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA)から購入した。Hitrap Q-Sepharose, Hitrap Heparine-Sepharose、AKTA prime は、GE Healthcare (Tokyo, Japan) から購入した。DNA オリゴマーInvitrogen Japan (Tokyo, Japan) から購入した。その他の化学試薬は、分子生物学用グレードを使った。

本研究で用いた *T. acidophilum* strain HO-62 の種菌は、山岸明彦博士(東京薬科大学)より譲渡していただいた[4]。

## 1-3. *T. acidophilum* tRNA<sup>Cys</sup> の解析方法

*T. acidophilum* tRNA<sup>Cys</sup> の 13 位と 15 位がアーケオシンに修飾されているか確認するため、 *T. acidophilum* を培養し、培養した菌体から total RNA を回収した後に、固相化 DNA

プローブ法を行い単一な tRNA<sup>Cys</sup> を調製した。そして、tRNA<sup>Cys</sup> を RNaseT1 で処理し質量分析を行った。

### 1-3-1. *T. acidophilum* の培養

*T. acidophilum* の培養は、文献 [4]の方法に従って行った。*T. acidophilum* は、凍結保存ができないため、植え継いでから 2 ヶ月以内に新しい液体培地に植え継がなくてはならない。また、菌体を回収するために大きい系で培養する際には、前回植え継いでからの経過時間に注意しなければならない。*T. acidophilum* の液体培地は、1 L あたり Yeast extract 1.0 g, Casamino acid 1.0 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.3 g, NaCl 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.25 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.05 g を含んでおり、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で pH を 1.8 にあわせた。オートクレーブ後は、暗所にて保存した。試験管で培養する際は、5 ml の液体培地をねじ付きの試験管に入れ、56°C で静置培養した。大量培養する際は、56°C, 96 時間、試験管で静置培養した菌体を 1 L の液体培地に全量植え継ぎ、80 rpm, 56°C, 96 時間(後期対数増殖期まで)培養し、6,000 rpm, 4°C, 10 分遠心して集菌した。次に、菌体を液体培地から Yeast extract と Casamino acid を除いた無機培地で懸濁した後、再び 6,000 rpm, 4°C, 10 分遠心し、回収した菌体を -80°C で保存した。

### 1-3-2. total RNA の回収

培養した菌体から Acid Guanidium Phenol Chloroform (AGPC)法を参考にして total RNA を回収した。1.0 g の菌体を 10 ml の Denaturing Solution (4 M チオシアン酸グアニジン, 25 mM クエン酸ナトリウム, 0.1 M 2-メルカプトエタノール, 0.5% N-ラウロイルサルコシンナトリウム)で懸濁し、1 ml の 2 M 酢酸ナトリウム(pH 4.0)を加え、再び懸濁した。そして、10 ml の milliQ で飽和させたフェノールを加え懸濁した後に、5 ml のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え懸濁した。その後、氷上で 15 分静置し、10,000 g, 15 分, 4°C で遠心した。回収した上清に 10 ml の 2-プロパノールを加え懸濁し、室温で 10 分静置した後に、再び 10,000 g, 20 分, 4°C で遠心し、遠心後の沈殿物を 500 µl の milliQ で溶かした。この溶液中に total RNA が溶解している。



### 1-3-3. Q-Sepharose カラムを用いた高分子 RNA の除去

total RNA に終濃度が 400 mM になるように 5 M NaCl を加え、tRNA wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 400 mM NaCl) で平衡化した Q-Sepharose カラムにアプライした。この時、1 ml の Q-Sepharose の樹脂に対して 30 A<sub>260</sub>units の total RNA をカラムにアプライした。次に、tRNA wash buffer をカラムに通し、260nm の吸光度が 0.1 A<sub>260</sub>units を切るまで洗浄した。その後、tRNA elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 600 mM NaCl) で tRNA を溶出させた。この操作も、260nm の吸光度が 0.1 A<sub>260</sub>units を切るまで行い、溶出させた RNA はエタノール沈殿を行い回収した。

### 1-3-4. 固相化 DNA プローブ法

文献[55]を参考にして固相化 DNA プローブ法を行った[56]。低温乾燥機(YAMATO DX302)内で Hitrap Streptavidin HP (GE Healthcare) に約 5 A<sub>260</sub>units の DNA プローブを結合させ 71°C に温め、ペリスタポンプ(Pharmacia Biotech)を用いて 500 µl/min の流速で 50 A<sub>260</sub>units の RNA 画分(Q-Sepharose 精製後)を循環させた。循環させながら温度を 65°C まで下げ、65°C になったところで 20 mM Tris-HCl (pH7.6) を 30 分循環させカラムを洗浄した。その後、カラムを 65°C で 30 分温め、65°C に温めておいた 20 mM Tris-HCl (pH7.6) を 10 分循環させ目的の tRNA を溶出させた。

#### DNA プローブの配列

プローブは tRNA の 36 位から 15 位に相補的で T<sub>m</sub> が約 68°C になるようにデザインし、3' 末端にビオチンを結合させた。22 位が m<sup>2</sup>G に修飾されていると予想し、相補的なヌクレオシドを T とした。

*T. acidophilum* tRNA<sup>Cys</sup>

5' – TGCAGTCCCATGCATGACCTC - biotin 3' T<sub>m</sub>=68°C

### 1-3-5. ゲル切り出しによる精製

固相化 DNA プローブ法で調製した tRNA<sup>Cys</sup> には、ビオチン化 DNA プローブが混入していたため、ゲル切り出しで精製した。溶出画分 0.1 A<sub>260</sub>units を用いて 7 M urea 10% PAGE を行い、泳動後、ゲルにトルイジンブルーをかけて tRNA<sup>Cys</sup> 部分のゲルをカッターで切り出した。切り出したゲルは、Gel elution buffer (500 mM NH<sub>4</sub>COOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) に浸し、37°C、6 時間以上静置させた。その後、溶液をマイクロチューブに移し、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い tRNA<sup>Cys</sup> を回収した。Gel elution buffer に多量の塩が含まれているため、エタノール沈殿の時に塩を加えずに行った。

### 1-3-6. MALDI-MS 解析

MALDI-MS 解析は、岐阜大学の横川隆志博士等の御協力のもと行った。ゲル切り出し後の tRNA 0.1 A<sub>260</sub>units を ZipTip<sub>C18</sub> に通し、20 mM Triethylamine acetate (pH6.9) で洗浄した後、20 µl アセトニトリルで溶出させることで脱塩処理を行った。その後、遠心蒸発器で乾燥させ、5 µl の milliQ に溶解した。1.5 µl のサンプルと 1.5 µl の RNaseT1 溶液 (50 mM Triethylammonium bicarbonate (pH7.0), 4 units/µl RNaseT1)、もしくは RNaseA 溶液 (50 mM Triethylammonium bicarbonate (pH7.0), 100 µg/ml RNaseA (Roche)) を混ぜ、37°C、2 時間反応させ、さらに 65°C、5 分と 37°C、2 時間反応させた。そして、1 µl のサンプルと 1 µl の MALDI matrix (20 mg/ml 3-hydroxypicolinic acid, 5 mg/ml diammonium hydrogen citrate in 45% (v/v) acetonitrile, 0.045% (v/v) trifluoroacetic acid) を混ぜ、MALDI プレートにスポットし、AXIMA Resonance<sup>TM</sup> MALDI-QIT-TOF mass spectrometer system (Shimadzu) のポジティブイオンモードで分析した。

### 1-4. *P. horikoshii* の ArcTGT と変異体 tRNA を用いた解析方法

*P. horikoshii* の ArcTGT を *T. acidophilum* Wild-type tRNA<sup>Leu</sup> (G13・G15) と 13 位 15 位のグアノシンをアデノシンに変えた変異体 tRNA の転写産物を用いてグアニン塩基交換活性を測定し、*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> に構造的平衡の可能性があるか調べた。

ArcTGT の酵素活性測定は、ArcTGT がグアニン塩基と preQ<sub>0</sub> 塩基以外にグアニン塩基

同士も交換してしまう副反応を利用して、 $^{14}\text{C}$ -グアニンを反応系に加え、これの取り込みを測定することで酵素活性を確認できる(図 1-4A)。

#### 1-4-1. *P. horikoshii* ArcTGT の発現・精製

*P. horikoshii* の ArcTGT 発現用プラスミドは、群馬大学の行木信一博士より譲渡していただいた。このプラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株(Novagen)を形質転換し、 $100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  のアンピシリンを含んだ LB 寒天培地で  $37^\circ\text{C}$ , 12 時間培養した。形成したコロニーを 250 ml の LB 培地に植菌し、 $37^\circ\text{C}$ , 14 時間振盪培養した後、1 L の LB 培地に全量植え継ぎ  $37^\circ\text{C}$ , 2 時間(約  $0.6\ A_{600}$  まで)培養した。その後、終濃度が  $100\ \text{mM}$  と  $100\ \mu\text{M}$  になるように IPTG と  $\text{ZnCl}_2$  を加え、さらに 4 時間培養した。そして、 $10,000\ \text{g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15 分遠心することで菌体を回収し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

ArcTGTの精製は、文献[53, 57]を参考にして行った。培養した *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2株1 gをEDTA-free protease inhibitor (Thermo Scientific)を含むBuffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl,  $10\ \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 6 mM 2-mercaptoethanol)で懸濁し、氷上で超音波破碎機(model VCX-500, Sonic and Materials Inc, USA)を用いて破碎した後、 $16,000\ \text{g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15分遠心した。上清を $85^\circ\text{C}$ , 30分熱処理し、再び $16,000\ \text{g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15分遠心した。次に、上清をHiTrap Q-Sepharoseに吸着させ、Buffer AとBuffer B (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 M KCl,  $10\ \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 6 mM 2-mercaptoethanol)を用いて直線塩濃度勾配溶出を行い、12.5% SDS-PAGEでArcTGTが溶出した画分を確認した。その後、ArcTGTを含んだ画分をBuffer Aで透析し、HiTrap Heparin-Sepharoseに吸着させ、Buffer AとBuffer Bを用いて直線塩濃度勾配溶出を行い、12.5% SDS-PAGEで確認した。ArcTGT溶出画分をBuffer Aで透析し、Vivaspin 15R MWCO: 30,000 (Sartorius Japan, Tokyo, Japan)を用いて濃縮した後、終濃度が50%(v/v)になるようにグリセロールを加え、 $-30^\circ\text{C}$  で保存した。

#### 1-4-2. tRNA 転写産物の調製

試験管内での tRNA 転写産物の調製は、文献[58]を参考にして行った。以下のプライマーを組み合わせ、DNA polymerase (Blend-Taq polymerase (TOYOBO))を用いて PCR を

行い T7 プロモーターを含んだ転写鋳型を作製し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い DNA polymerase を除去した。転写反応は、40 mM Hepes – KOH (pH 7.6), 5 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidine, 50 µg/ml BSA, 2.5 mM NTPmix, 0.2 units/µl Recombinat ribonuclease inhibitor, 0.0025 units/µl Pyrophosphatase, 5 units/µl T7 RNA polymerase, DNA 転写鋳型の 200 µl の系で 37°C, 2 時間行い、さらに 5 units/µl の T7 RNA polymerase を加え 37°C, 2 時間反応させた。次に、転写産物のリン酸のマイナスチャージを利用して強陰イオン交換樹脂 Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) で精製した。P1000 のチップに滅菌した綿を詰め、milliQ で平衡化した 50 µl Q-Sepharose 懸濁液を加え、樹脂を枯らさないようにピペットマンで加圧して水分を落とした。これをカラムとした。次に、Buffer C (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 400 mM NaCl) で平衡化し、200 µl の転写サンプルに 5 µl の 5 M NaCl を加え、カラムにアプライした。800 µl の Buffer C でカラムを洗浄し、400 µl の Buffer D (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 800 mM NaCl) で tRNA を溶出させ、エタノール沈殿によって tRNA を回収した。10% PAGE (7 M urea) 後、トルイジンブルー(Sigma Aldrich)で染色し、4 種類の tRNA (Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15) が転写されているか確認した。

使用したプライマー

*T.acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (Wild-type (G13 • G15))

Forward primer

5' - GCG AAA TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGC GGA GGT TGT CGA GAC TGG CCA  
AAG GCG ATG GAT TTA GGG TC - 3'

Reverse primer

5' - TGG TGC GGA GGG AGG GAT TTG AAC CCT CGA ACC CCT TCG GGA ATG GAC  
CCT AAA TCC ATC GCC TTT GGC - 3'

*T.acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (A13 • G15)

Forward primer

5' - GCG AAA TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGC GGA GGT TGT CAA GAC TGG CCA  
AAG GCG ATG GAT TTA GGG TC - 3'

Reverse primer

5' - TGG TGC GGA GGG AGG GAT TTG AAC CCT CGA ACC CCT TCG GGA ATG GAC  
CCT AAA TCC ATC GCC TTT GGC - 3'

*T.acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (G13 • A15)

Forward primer

5' - GCG AAA TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGC GGA GGT TGT CGA AAC TGG CCA  
AAG GCG ATG GAT TTA GGG TC - 3'

Reverse primer

5' - TGG TGC GGA GGG AGG GAT TTG AAC CCT CGA ACC CCT TCG GGA ATG GAC  
CCT AAA TCC ATC GCC TTT GGC - 3'

*T.acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (A13 • A15)

Forward primer

5' - GCG AAA TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGC GGA GGT TGT CAA AAC TGG CCA  
AAG GCG ATG GAT TTA GGG TC - 3'

Reverse primer

5' - TGG TGC GGA GGG AGG GAT TTG AAC CCT CGA ACC CCT TCG GGA ATG GAC  
CCT AAA TCC ATC GCC TTT GGC - 3'

(赤色 : 変異を導入した塩基、緑色 : T7 プロモーター配列)

PCR cycles

94°C	2 min	} × 25
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	1 min	
20°C	∞	

#### 1-4-3. <sup>14</sup>C-グアニン塩基交換活性測定

グアニン塩基交換活性の測定は、ゲルアッセイで行った。1 μg の ArcTGT, 0.1 A<sub>260</sub>units tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物, 1.69 nmol <sup>14</sup>C-グアニンを 20 μl の Buffer E (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol)の系で 55°C, 30 分反応させた。次に、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、5 μl の milliQ に tRNA を溶かし

た。そして、このサンプルで 10% PAGE (7 M urea)行った。ゲルをメチレンブルー(MB)(ナカライテスク)で染色後、水で脱色し、モデル 583 ゲルドライヤー(Bio-Rad)で乾燥させた。その後、イメージングプレートに 16~60 時間感光させ、Typhoon FLA 7000 Laser Scanner (GE Healthcare)で検出した。

## 1-5. 結果

### 1-5-1. *T. acidophilum* の培養

*T. acidophilum* strain HO-62 は、東京薬科大学の山岸明彦博士に譲渡していただいた。*T. acidophilum* は、凍結保存ができないため常に継代培養しており、継代の期間は 2 ヶ月以内としている。

*T. acidophilum* の生育はとても遅いため、大量培養する際は継代の期間に注意を払わなければならない。前回植え継いでから 2 週間以上経過している場合は、一度試験管培地に植え継ぎ 96 時間静置培養した後、また試験管培地に植え継いで 96 時間静置培養し、全量を 1 L の培地に植え継いで 96 時間振とう培養することで大量の菌体を得た。1 L 培養の生育曲線は図 1-2 のようになり、96 時間の後期対数増殖期に回収することで約 1 g の菌体を得られた。

### 1-5-2. total RNA の調製

AGPC 法を行い菌体 1 g から約 150~250 A<sub>260</sub>units の total RNA を調製できるため、数回同じ操作を繰り返し行い total RNA を大量に回収した。その後、300 A<sub>260</sub>units の total RNA を 10 ml Q-Sepharose FF のカラムに通し、tRNA elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 600 mM NaCl)で溶出させ、約 80 A<sub>260</sub>units の RNA を回収した。この画分には、5S rRNA と tRNA が主に含まれており、大部分の長鎖 RNA は除くことができたため(図 1-3B)、このサンプルを用いて固相化 DNA プローブ法を行った。

### 1-5-3. 単一な tRNA<sup>Cys</sup> の調製

tRNA<sup>Cys</sup> の 13 位と 15 位がアーケオシンに修飾されているか確認するため、まずは単

一な tRNA<sup>Cys</sup> を固相化 DNA プローブ法で回収した[56]。ビオチン化プローブは、tRNA<sup>Cys</sup> の A36-G15 と相補になるようにデザインし、3'末端にビオチンを結合させた(図 1-3A)。これまでは、マイクロチューブサイズの 50  $\mu$ l の樹脂を用いた系で固相化 DNA プローブ法を行っていたが、tRNA<sup>Cys</sup> の発現量は少ないため質量分析に必要な量を回収するのに時間がかかってしまう。そこで、1 ml の樹脂を用いて行う large-scale purification system を利用した[55]。Q-Sepharose カラムで精製した 50 A<sub>260</sub>units の RNA 画分を DNA プローブを結合させた Streptavidin カラムに通し、プローブと結合している tRNA<sup>Cys</sup> を溶出させた。この操作を 2 回行った。溶出画分には、ビオチン化 DNA プローブも混入しているため、さらにゲル切り出しを行い単一な tRNA<sup>Cys</sup> を精製し、最終的に 0.12 A<sub>260</sub>units の tRNA<sup>Cys</sup> を回収した(図 1-3B)。

#### 1-5-4. tRNA<sup>Cys</sup> の質量分析

固相化 DNA プローブ法で回収した tRNA<sup>Cys</sup> を岐阜大学の横川隆志博士等の御協力のもと質量分析を行った。tRNA<sup>Cys</sup> 0.1 A<sub>260</sub>units を脱塩処理し、RNaseT1 と反応させ特異的に分解した後に、AXIMA Resonance<sup>TM</sup> MALDI-QIT-TOF mass spectrometer system (Shimadzu) のポジティブイオンモードで分析した。さらに検出されたピークを MSMS 解析し、配列と修飾ヌクレオシドの位置を決定した。

図 1-3C は、質量分析を行った結果の一部であり質量電荷比が 600-2500 の範囲を表している。tRNA<sup>Cys</sup> の D-arm は、RNaseT1 で処理すると図 1-3A の矢印で示した位置で切断されるが、アーケオシンが存在すると RNaseT1 で切断できないため 13 位と 15 位の切断パターンが修飾の有無によって異ってくる。以下に、修飾の有無によって検出される断片と質量電荷比の違いをまとめた。

G13, G15 の場合	G <sup>+</sup> 13, G15 の場合
CAGp : 998.2	CAG <sup>+</sup> AGp : 1713.3
AGp : 693.1	AGp : 693.1
G13, G <sup>+</sup> 15 の場合	G <sup>+</sup> 13, G <sup>+</sup> 15 の場合
CAGp : 998.2	CAG <sup>+</sup> AG <sup>+</sup> AGp : 2418.4
AG <sup>+</sup> AGp : 1408.2	

図 1-3C に示すように質量分析の結果、 $m/z = 998.2$  と  $m/z = 1408.2$  が検出された。この質量電荷比は、それぞれ CAGp と  $AG^+AGp$  の配列に相当する。さらに、 $m/z = 1408.2$  を MSMS で解析すると図 1-4D の結果となり、 $y_3, c_2, c_3$  の値より、この断片が  $AG^+AGp$  の配列であることが判った。以上の結果より  $tRNA^{Cys}$  は、13 位が未修飾の G で 15 位のみアーケオシンを持つことが判明した。また、 $tRNA^{Cys}$  を RNaseA で処理したサンプルで質量分析を行っても同様の結果を得た。よって、*T. acidophilum* 細胞内での  $G^+13, G^+15$  は、 $tRNA^{Leu}$  特異的であることが示唆された。

また、この質量分析で Cm32,  $m^1G37$ , Cm56,  $m^1A58$  が検出された。

#### 1-5-5. *P. horikoshii* ArcTGT を用いた *T. acidophilum* $tRNA^{Leu}$ の構造的平衡の検証

*T. acidophilum*  $tRNA^{Leu}$  の D-arm の構造的平衡を検証するのに *P. horikoshii* ArcTGT と *T. acidophilum*  $tRNA^{Leu}$  転写産物 (Wild-type ( $G13 \cdot G15$ ),  $A13 \cdot G15$ ,  $G13 \cdot A15$ ,  $A13 \cdot A15$ ) を反応させるため、まずはそれぞれを調整した。

*P. horikoshii* ArcTGT は、*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株(Novagen)を用いてタンパク質発現させ、HiTrap Q-Sepharose と HiTrap Heparin-Sepharose のカラムで精製した。精製後の *P. horikoshii* ArcTGT は、単一なバンドをあたえる高純度であった(図 1-4 C)。

$tRNA^{Leu}$  は 4 種類用意した。13 位と 15 位が G の Wild-type の  $tRNA$  ( $G13 \cdot G15$ )、13 位を A に変えた  $tRNA$  ( $A13 \cdot G15$ )、15 位を A に変えた  $tRNA$  ( $G13 \cdot A15$ )、13 位と 15 位を A に変えた  $tRNA$  ( $A13 \cdot A15$ )である(図 1-4B)。これらの  $tRNA$  転写産物は、プライマーコンビネーションで調整した。

調整した酵素と  $tRNA$  を用いてゲルアッセイ法でグアニン塩基交換活性を測定した。反応させたサンプルで 10% PAGE (7 M urea)を行い(図 1-4D 左)、オートラジオグラフィで  $^{14}C$ -グアニンの取り込みを確認したところ (図 1-4D 右)、 $G13 \cdot G15$  と  $A13 \cdot G15$  の  $tRNA$  でグアニン塩基交換活性があることを確認できた。つまり、*P. horikoshii* ArcTGT は 15 位のグアニン塩基だけを交換していることが判った。



## 1-6. 考察

13位がグアノシン(G)の tRNA は、tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Cys</sup> で頻繁に見られるが、古細菌 *Halofelax volcanii* のこれらの tRNA では 13 位が未修飾の G となっている[17]。しかし、富川千恵博士が *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup><sub>UAG</sub> の配列を決定したところ[16]、15 位だけでなく 13 位もアーケオシンに修飾されていた。*T. acidophilum* では、tRNA<sup>Cys</sup> も G13, G15 になっているため、2 カ所ともアーケオシンに修飾されていると予想された。

そこで *T. acidophilum* tRNA<sup>Cys</sup> の G13 と G15 が、細胞内でアーケオシンに修飾されているか確認したところ、15 位にのみアーケオシンが合成され 13 位は未修飾の G であることが判明した。この結果より、G<sup>+</sup>13, G<sup>+</sup>15 が tRNA<sup>Leu</sup> に特異的に見られる修飾であると考えられた。

*T. acidophilum* ArcTGT が tRNA<sup>Leu</sup> の 13 位と 15 位の 2 カ所のグアニン塩基交換活性を有する要因が、tRNA<sup>Leu</sup> の構造的平衡にあるか確認するため、15 位にのみ活性をもつ *P. horikoshii* ArcTGT と *T. acidophilum* 変異体 tRNA<sup>Leu</sup> を反応させたところ、*P. horikoshii* ArcTGT は 15 位の G にのみ作用していた(図 1-4D)。ArcTGT が tRNA と結合すると tRNA の構造が L 字型から λ 型に変化することが報告されている[41]。そのため、*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> が λ 型に変化した際に図 1-1 のような D-arm の構造的平衡の可能性も考えられたが、この結果より、そのような可能性はなく、13 位のアーケオシン修飾が tRNA の構造的平衡によるものでないことが示唆された。

この結果より、2 カ所のグアニン塩基交換は酵素側に要因があると推測された。

実際に *T. acidophilum* ArcTGT が tRNA<sup>Leu</sup> に対してマルチサイト特異性を持つのか、酵素側の検証を次章から詳しく述べる。

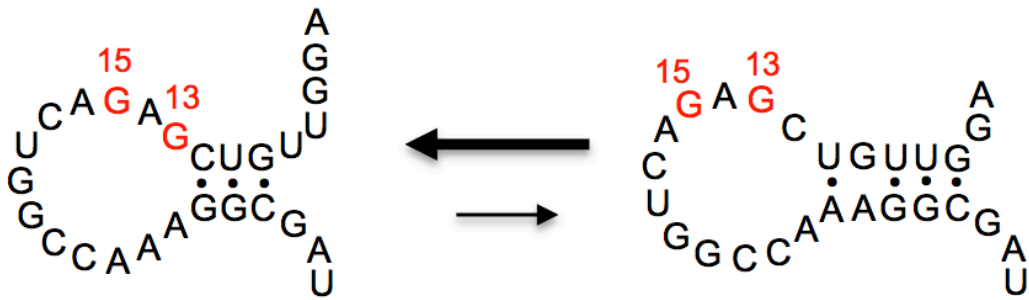


図 1-1. tRNA<sup>Leu</sup> D-arm の構造的平衡  
13 位と 15 位を赤色で示してある。

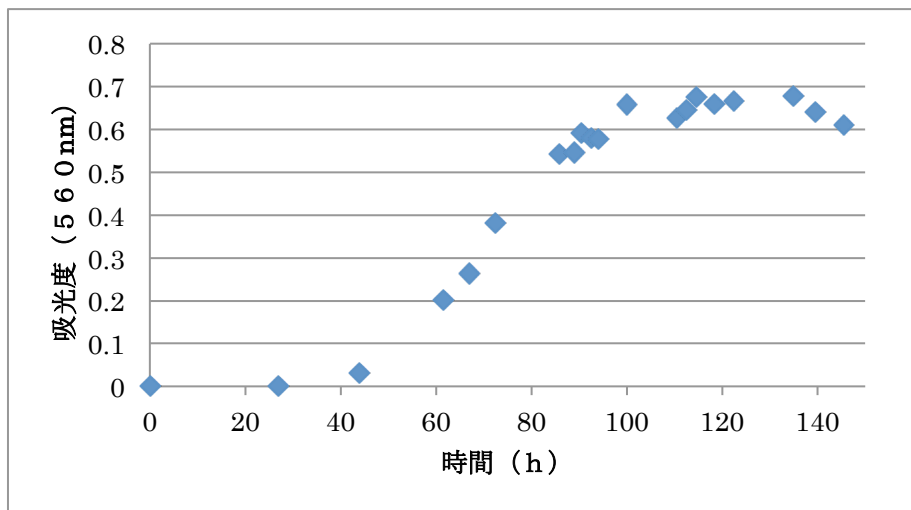


図 1-2. *T. acidophilum* 培養曲線

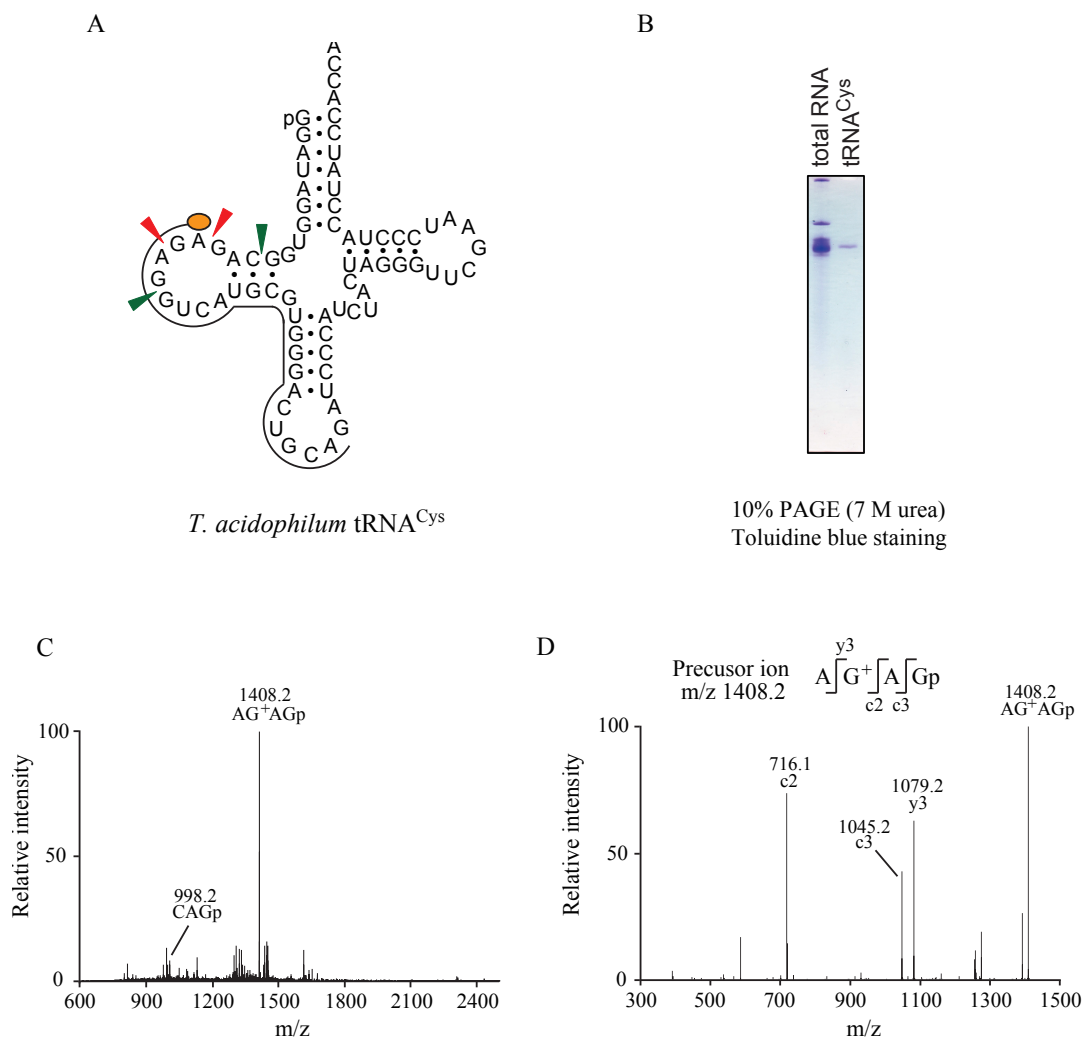


図 1-3. *T. acidophilum* tRNA<sup>Cys</sup> の G13 と G15 が Archaeosine に修飾されているか確認した。(A) *T. acidophilum* tRNA<sup>Cys</sup> のクローバーリーフ構造。DNA プロブは、A36- G15 の領域でハイブリダイズするようにデザインした。矢印は RNaseT1 で切断される位置を示しており、赤色の矢印は Archaeosine の有無によって切断パターンが変わる。(B) *T. acidophilum* total RNA (左、0.3 A<sub>260</sub>units)と精製した tRNA<sup>Cys</sup> (右、0.015 A<sub>260</sub>units)で 10% PAGE (7 M urea)を行った。(C) 精製した tRNA<sup>Cys</sup> (0.03 A<sub>260</sub>units)を RNaseT1 で切断し質量分析を行った。(D) (C)で検出された AG<sup>+</sup>AGp (m/z = 1408.2)の配列を MSMS 解析で決定した。

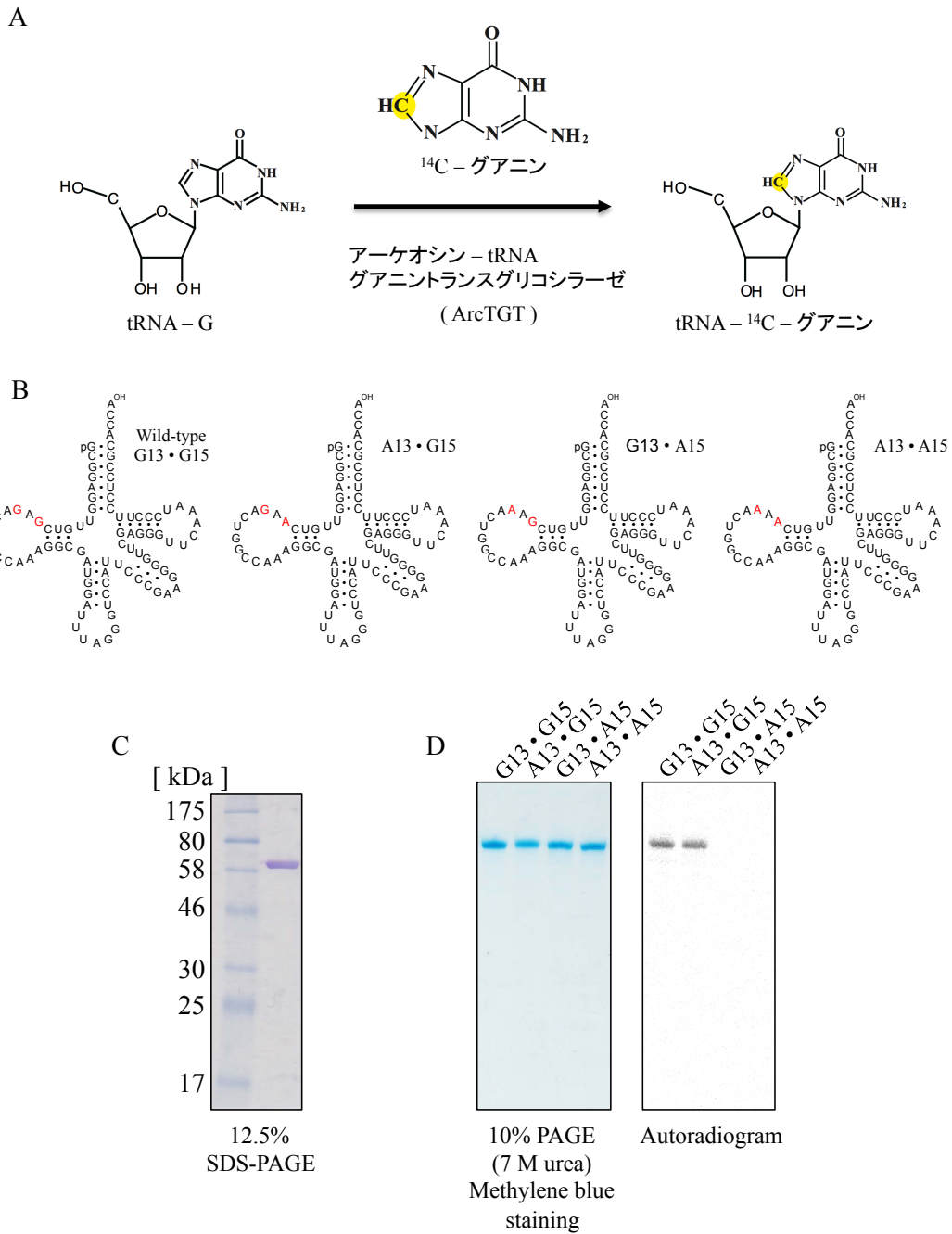


図1-4. *P. horikoshii* ArcTGT と *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup>を用いて tRNA<sup>Leu</sup>の構造的平衡の可能性を確認した。(A) ArcTGT 酵素活性測定系。14C-標識炭素原子は黄色で示した。(B) tRNA<sup>Leu</sup> (Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15)のクローバーリーフ構造。13位と15位を赤色で示してある。(C) *P. horikoshii* ArcTGT を精製し 12.5% SDS-PAGE を行った。(D) *P. horikoshii* ArcTGT と *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup>を用いたゲルアッセイ法によるグアニン塩基交換活性の測定。

第2章. 組み換えタンパク質を用いた *in vitro* での  
マルチサイト特異性の解析

## 2-1. 序

*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> の 2 カ所にアーケオシンが合成される要因が、tRNA の構造的平衡ではないことが示唆されたため、酵素側からの検証を行うことにした。まずは、*T. acidophilum* S30 を用いて Wild-type と 3 種類の変異体 tRNA 転写産物に対するグアニン塩基交換活性を測定し、13 位と 15 位のグアニン塩基が交換されるか確認した。その後、*T. acidophilum arcTGT* 遺伝子を探索し、大腸菌を用いてタンパク質を発現させ、同様に 2 カ所のグアニン塩基交換活性を確認することにした。また、後に *T. kodakarensis* の細胞内で *T. acidophilum* ArcTGT を発現させる実験計画があったため、*T. kodakarensis* の ArcTGT がマルチサイト特異性を持っていないか同様の実験を行い確認した。

## 2-2. 試薬

Guanine hydrochloride [8-<sup>14</sup>C] (2.19 Mbq/mmol) は Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) から購入した。Hitrap Q-Sepharose, Hitrap Heparine-Sepharose、AKTA prime は、GE Healthcare (Tokyo, Japan) から購入した。DNA オリゴマー Invitrogen Japan (Tokyo, Japan) から購入した。その他の化学試薬は、分子生物学用グレードを使った。

本実験で用いた *T. acidophilum* strain HO-62 の種菌は、山岸明彦博士(東京薬科大学)より譲渡していただいた[4]。

## 2-3. *T. acidophilum* S30 の調製方法

*T. acidophilum* の細胞抽出液(S30)は、文献[59]を参考にして調製した。*T. acidophilum* の冷凍細胞 0.5 g を 5 ml の milliQ で懸濁した後、4,000 g, 4°C, 10 分遠心して集菌することで菌体が保持している培地を除いた。次に、菌体を 1 ml の EDTA-free protease inhibitor (Thermo Scientific) を含む milliQ で懸濁し、100 µl DNase I buffer (40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) を加えた後、2 M Trizma base で pH 7.5 に合わせた。この時点で溶菌するが、Genomic DNA も細胞から出てくるため、かなり粘性が高くなっていた。100 unit DNase I (Roche) を加え穏やかに攪拌し氷上で 1 時間静置した後、37°C, 15 分反応させることで、Genomic DNA が分解されサンプルの粘性がなくなった。このサンプルを 30,000 g, 4°C, 1 時間の遠心によって上清と沈殿に分離し、上清を細胞抽

出液(S30)として後記の実験に用いた。

## 2-4. Ta1493 遺伝子産物の調整方法

*T. acidophilum* の *arcTGT* と *arcS* 遺伝子が未同定であったため、*P. horikoshii arcTGT* 遺伝子、*H. volcanii arcS* 遺伝子と相同性の高い遺伝子が *T. acidophilum* のゲノム配列中に存在するか探索し、*arcTGT*: Ta1493, *arcS*: Ta0924 を候補遺伝子とした。Genomic DNA を鋳型にして PCR を行うことでそれぞれの遺伝子を増幅させ、In-Fusion 反応で pET30a に導入し発現用プラスミドを構築した。このプラスミドを用いて大腸菌内でタンパク質を大量に発現させ、複数のカラムクロマトグラフィーを行い精製を試みた。

### 2-4-1. Ta1493 遺伝子産物の発現

In-Fusion 反応に必要な配列を含んだ下記のプライマーで Genomic DNA と pET30a を鋳型に DNA polymerase (KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO))を用いて PCR を行った。PCR で得られた Insert: 約 2,000 bp、Vector: 5,400 bp の断片をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後目的の断片を切り出した。エコノスピナラムを用いて切り出したゲルから DNA 断片を回収し、Insert 200 ng、Vector 50 ng と In-Fusion HD Cloning kit (TAKARA)を用いて 50°C, 15 分 In-Fusion 反応を行った。このサンプルで *E.coli* DH5  $\alpha$  コンピテントセル(TOYOBO)を形質転換し、50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  のカナマイシンを含んだ LB 寒天培地で 37°C, 12 時間培養した。形成したコロニー1 つに対して 1 本の 3 ml LB 液体培地に植菌し、37°C で一晩振とう培養した。培養した菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit の手法を参考にしてプラスミドを回収し、塩基配列を確認した。塩基配列は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し確認した。

使用したプライマー

*T. acidophilum* ArcTGT

Forward primer : T.a arcTGT F,

5' - GGAGATATACATATG AAGATAGAGGAAAGGGACGG - 3'

Reverse primer : T.a arcTGT R,

5' - GAATTCGGATCCTCA CTATTTCTCTGATTGATCTCTGCC - 3'

*T. acidophilum* ArcS

Forward primer : T.a arcS F,

5' - GGAGATATAACAATG ATTGAAGATCAGGCTCTCTTC - 3'

Reverse primer : T.a arcS R,

5' - GAATTCGGATCCTCA TCAGCGAACCTTGACGGCAATC - 3'

pET30a

Forward primer : pET30a F,

5' - TGAGGATCCGAATTC GAGCTCCGT - 3'

Reverse primer : pET30a R,

5' - CATATGTATATCTCC TTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC - 3'

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

10×KOD buffer	5 μl
2 mM dNTPs	5 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 μl
T.k arcTGT F (10 pmol/μl)	1.5 μl
T.k arcTGT R (10 pmol/μl)	1.5 μl
鋳型 DNA	50 ng
KOD-plus- (1.0 u/μl)	1 μl
milliQ	33 μl
<hr/>	
Total	50 μl

PCR cycles

94°C	2 min	} × 25
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
68°C	1 min/kb	
68°C	2 min	
20°C	∞	



上記で作製した Ta1493 遺伝子産物発現用のプラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株 (Novagen) を形質転換し、50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  のカナマイシンを含んだ LB 寒天培地で 37°C, 12 時間培養した。形成したコロニーを 250 ml の LB 培地に植菌し、37°C, 14 時間振盪培養した後、1 L の LB 培地に全量植え継ぎ 37°C, 2 時間(約 0.6  $A_{600}$  まで)培養した。その後、終濃度が 100 mM になるように IPTG を加え、さらに 4 時間培養した。そして、10,000 g, 4°C, 15 分遠心して菌体を回収し、-80°C で保存した。

#### 2-4-2. Ta1493 遺伝子産物の精製

Ta1493 遺伝子産物の精製は、*P. horikoshii* ArcTGT の精製(1-4-1) [53, 57] を参考にして行った。培養した *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株 1 g を EDTA-free protease inhibitor を含む Buffer A (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol) に懸濁し、氷上で超音波破碎機(model VCX-500, Sonic and Materials Inc, USA) を用いて破碎した後、16,000 g, 4°C, 15 分遠心した。上清を 50°C, 30 分熱処理し、再び 16,000 g, 4°C, 15 分遠心した。次に、上清を HiTrap Q-Sepharose に吸着させ、Buffer A と Buffer B (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 M KCl, 10  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol) を用いて直線塩濃度勾配溶出を行い、12.5% SDS-PAGE で Ta1493 遺伝子産物が溶出した画分を確認した。その後、この画分を Buffer A で透析し、HiTrap Heparin-Sepharose に吸着させ、Buffer A と Buffer B を用いて直線塩濃度勾配溶出を行い、12.5% SDS-PAGE で確認した。Ta1493 遺伝子産物溶出画分を Buffer A で透析し、Vivaspin 15R MWCO: 30,000 (Sartorius Japan, Tokyo, Japan) を用いて濃縮した。

#### 2-5. Ta1493 遺伝子産物可溶化条件の検討

上記の精製方法以外にも陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーなど試してみたが、単一の酵素は得られなかった。詳しく調べたところ大腸菌を超音波破碎した段階で、発現したタンパク質の大部分が沈殿していることが判った。

タンパク質が不溶化した原因としてタンパク質のフォールディングとタンパク質の細胞膜との相互作用が考えられた。

そこで 1 つ目の原因の解決策として、シャペロン様の性質を持つ SUMO タグをコー

ドした SUMO vector (LifeSensors)と正確にフォールディングできるように低温でタンパク質発現が可能な pCold vector (Takara)を用いてタンパク質発現を行った。2つ目の原因の解決策として界面活性剤を利用してタンパク質精製を行うことにした。

#### 2-5-1. 可溶化ベクターを用いた発現

2-4-1 と同様の操作を行い、In-Fusion 反応に必要な配列を含んだ下記のプライマーと SUMO vector、pCold vector を用いて Ta1493 遺伝子の発現用プラスミドを構築した。SUMO vector の場合は、目的のタンパク質発現後に SUMO-tag を切断できるように tag と Ta1493 遺伝子の間に SUMO プロテアーゼ切断サイトを導入してある。

SUMO vector のタンパク質発現は、*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株(Novagen)を形質転換し、形成したコロニーを 250 ml の LB 培地に植菌して 37°C, 14 時間前培養した後、1 L の LB 培地に全量植え継ぎ 37°C, 2 時間(約 0.6 A<sub>600</sub> まで)培養し、終濃度が 100 mM になるように IPTG を加え、さらに 4 時間培養した。また、よりタンパク質がフォールディングしやすいように IPTG を加えてから 20°C, 24 時間培養の条件も試した。培養後は、10,000 g, 4°C, 15 分遠心して菌体を回収し、-80°C で保存した。

pCold vector のタンパク質発現は、*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株(Novagen)を形質転換し、形成したコロニーを 250 ml の LB 培地に植菌して 37°C, 14 時間前培養した後、全量を 1 L の LB 培地に植え継ぎ 37°C, 2 時間 (約 0.6 A<sub>600</sub> まで)培養した。抗生物質は 100 µg/µl のアンピシリンを用いた。その後、終濃度が 100 mM になるように IPTG を加え、さらに 20°C, 24 時間培養した。そして、10,000 g, 4°C, 15 分遠心して菌体を回収し、-80°C で保存した。

Ta1493 遺伝子産物が可溶化するか確認するため、SUMO vector と pCold vector で発現させたタンパク質を以下の操作で回収し SDS-PAGE で分析した。培養した *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株を EDTA-free protease inhibitor を含む BufferA に懸濁し、氷上で超音波破碎した後、16,000 g, 4°C, 15 分遠心した。上清を 50°C, 30 分熱処理し、再び 16,000 g, 4°C, 15 分遠心した。遠心後の上清と沈殿で SDS-PAGE を行った。遠心後の沈殿物はそのままでは電気泳動できないため、沈殿物に 2 × SDS-PAGE サンプルバッファー(100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 2.5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol) を加え懸濁し、16,000 g, 4°C, 15 分遠心して得た上清を電気泳動に使用した。

使用したプライマー

*T. acidophilum* ArcTGT SUMO

Forward primer : T.a arcTGT SUMO F,

5' - GAACAGATTGGAGGTATGAAGATAGAGGAAAGGGACGG - 3'

Reverse primer : T.a arcTGT SUMO R,

5' - CCACTAGTGGTCTCATTATTATTTCTCTGATTGATCTCTGCCCT - 3'

SUMO vector

Forward primer : SUMO vector F,

5' - TGAGACCACTAGTGGTACCGGT - 3'

Reverse primer : SUMO vector R,

5' - ACCTCCAATCTGTTCGCGGTGA - 3'

*T. acidophilum* ArcTGT pCold

Forward primer : T.a arcTGT pCold F,

5' - CACAAAGTGCATATGAAGATAGAGGAAAGGGACGG - 3'

Reverse primer : T.a arcTGT pCold R,

5' - CTTGAATTCGGATCCTTATTATTTCTCTGATTGATCTCTGCCCT - 3'

pCold vector

Forward primer : pCold vector F,

5' - GGATCCGAATTCAAGCTTGTGACCTG - 3'

Reverse primer : pCold vector R,

5' - CATATGCACTTTGTGATTCATGGTGTATTACCTC - 3'

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

## 2-5-2. 界面活性剤を用いたタンパク質精製

膜タンパク質の精製などで利用されている非イオン性界面活性剤の Tween 20 と Triton X-100 を用いて大腸菌を破碎した。1.0% tween 20 か Triton X-100 を含む Buffer A

で培養した *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株を懸濁し、氷上で超音波破碎した後、16,000 g, 4°C, 15 分遠心した。沈殿物に 2 × SDS-PAGE サンプルバッファー(100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 2.5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)を加え懸濁し、16,000 g, 4°C, 15 分遠心して得た上清と先ほどの遠心後の上清で SDS-PAGE を行った。

## 2-6. *Thermococcus kodakarensis* ArcTGT の発現・精製方法

*T. kodakarensis* の ArcTGT が、マルチサイト特異性を持っていないか確認するため、*T. kodakarensis* の ArcTGT 組み換えタンパク質を調製し、試験管内でグアニン塩基交換活性を測定した。

*P. horikoshii arcTGT* 遺伝子と相同性の高い遺伝子が *T. kodakarensis* のゲノム配列中に存在するか探索し、Tk0760 を見出した。In-Fusion 反応に必要な配列を含んだ下記のプライマーを用いて *T. kodakarensis* の Genomic DNA と pET30a を鋳型に PCR を行い、2-4-1 と同様の操作で ArcTGT の発現用プラスミドを構築した。

このプラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株(Novagen)を形質転換し、形成したコロニーを 250 ml の LB 培地に植菌して 37°C, 14 時間前培養した後、1 L の LB 培地に全量植え継ぎ 37°C, 2 時間(約 0.6 A<sub>600</sub> まで)培養した。抗生物質は 50 µg/µl のカナマシンを用了。その後、終濃度が 100 mM と 100 µM になるように IPTG と ZnCl<sub>2</sub> を加え、さらに 4 時間培養した。培養後は、10,000 g, 4°C, 15 分遠心して菌体を回収し、-80°C で保存した。

使用したプライマー

*T. kodakarensis* ArcTGT

Forward primer : T.k arcTGT F,

5' - GGAGATATACATATGGTTCGATTTTCAGGTTTGAGGT - 3'

Reverse primer : T.k arcTGT R,

5' - GAATTCGGATCCTCATAACTACTTCTCGACTCCCCTCCTA - 3'

pET30a

Forward primer : pET30a F,

5' - TGAGACCACTAGTGGTACCGGT - 3'

Reverse primer : pET30a R,

5' - ACCTCCAATCTGTTCGCGGTGA - 3'

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

ArcTGTの精製は、*P. horikoshii* ArcTGTの精製(1-4-1)と同様にHiTrap Q-Sepharose と HiTrap Heparin-Sepharoseを用いて行い、12.5% SDS-PAGEで単一に精製できたことを確認した。ArcTGT溶出画分は、Buffer F (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 600 mM KCl, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol)で透析し、終濃度が50%(v/v)になるようにグリセロールを加え、-30°Cで保存した。

## 2-7. *in vitro* での酵素と変異体 tRNA を用いた解析方法

*T. acidophilum* S30 と *T. kodakarensis* ArcTGT が 2 カ所のグアニン塩基を交換するか確認するため、4種類の tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物 (Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15) と反応させグアニン塩基交換活性を測定した。また、Ta1493 遺伝子産物において、グアニン塩基交換活性の測定を行い、遺伝子の同定並びに、マルチサイト特異性の確認をすることにした。

今回は、グアニン塩基交換活性を測定するのにゲルアッセイとフィルターアッセイの 2 通りの方法で行った。

### ゲルアッセイ

酵素(1  $\mu$ g の精製酵素か 30  $\mu$ g の S30), 0.1 A<sub>260</sub>unit tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物, 1.69 nmol <sup>14</sup>C-グアニンを 20  $\mu$ l の Buffer E (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol)の系で 55°C, 30 分反応させた。経時変化をみる際は、55°Cで 0, 5, 10, 20 分反応させた。次いで、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、5  $\mu$ l

の milliQ に tRNA を溶かした。そして、このサンプルで 10% PAGE (7 M urea)を行った。ゲルをメチレンブルー(MB)(ナカライテスク)で染色後、水で脱色し、モデル 583 ゲルドライヤー (Bio-Rad)で乾燥させた。イメージングプレートに 1 日から 1 週間感光させ、Typhoon FLA 7000 Laser Scanner (GE Healthcare)で検出した。

#### フィルターアッセイ

任意の量の酵素, 0.2 A<sub>260</sub>units tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物, 1.69 nmol <sup>14</sup>C-グアニンを 40 µl の Buffer E の系で 55°C, 任意の時間反応させた。反応させたサンプルは、3MM (Whatman) にスポットし、5%トリクロロ酢酸で 5 回洗浄した後、フィルターを乾燥させ、液体シンチレーションカウンターで <sup>14</sup>C-グアニンの取り込み量を確認した。

## 2-8. 結果

### 2-8-1. *T. acidophilum* S30 を用いたグアニン塩基交換活性測定

*T. acidophilum arcTGT* 遺伝子を同定してマルチサイト特異性を検証する前に、*T. acidophilum* の細胞抽出液で 13 位と 15 位の 2 カ所のグアニン塩基が交換されるか確認した。

培養し冷凍保存した菌体 0.5 g から 22.4 mg の細胞抽出液 (S30)を回収し(図 2-1B)、この S30 と 4 種類の tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物 (Wild-type (G13・G15), A13・G15, G13・A15, A13・A15)(図 2-1A)を用いてゲルアッセイを行った。S30 を用いてフィルターアッセイ法も行って見たが、フィルターアッセイではバックが高く、微弱な酵素活性を検出できなかった。アッセイを行った結果、S30 中に 13 位と 15 位のグアニン塩基交換活性があることが判った。(図 2-1B)また、当初は 13 位と 15 位は同程度に交換されるか、もしくは 15 位が優先的に交換されると考えていたが、予想に反して A13・G15 での活性が G13・A15 に対して低かった。そこで、G13・G15 と A13・G15 と G13・A15 で経時的に反応を見てみたが、やはり 13 位が優先的に交換されていた(図 2-1D)。

### 2-8-2. *arcTGT* 遺伝子の探索

ゲノムシーケンスによって決定された約 1,500 のオペロンの中から BLAST-search に

よって候補遺伝子として *arcTGT* 遺伝子 : Ta1493 と *arcS* 遺伝子 : Ta0924 を見出した。そこで *P. horikoshii* ArcTGT と Ta1493 遺伝子のアミノ酸配列を比較してみると、両者で 98% という高い相同性が見られた。しかしながら、Ta1493 遺伝子のアミノ酸配列には、C1 と C2 ドメインの 3 カ所にインサージョンがあり、Zinc 結合サイトである CXCX<sub>2</sub>CX<sub>22</sub>H(CCCH)モチーフがなかった(図 2-2A)。また、グアニン結合サイトである Gln169 周辺のアミノ酸配列が異なっていた。

*P. horikoshii* ArcTGT と tRNA の複合体の構造解析より、tRNA は触媒ドメインと C2 ドメインの C 末端領域、そして C3(PUA)ドメインと相互作用していることが判っており[41]、Ta1493 遺伝子産物で見られる 3 カ所のインサージョンは、tRNA 結合サイト付近に位置しないと予想された。さらに、*Haloferax volcanii* [60], *Methanosarcina barkeri* [61], *Methanosarcina acetivorans* [62] の ArcTGT は split-type であり、C1 と C2 ドメイン間の連結領域が欠損しているがグアニン塩基交換活性は持っている[60-62]。また、*Pyrococcus furiosus* の ArcTGT において C3 (PUA)ドメインを欠失させると、tRNA に対する親和性は低下するが酵素活性は保持されたままであったことから[61]、C 末端領域の変異はグアニン塩基交換活性に影響を及ぼさないと考えられた。そして、Zinc 結合サイトは触媒ポケットと反対方向に位置しているため(図 2-2B)、Zinc も触媒反応に関与しないと思われた。

これらの理由から、Ta1493 遺伝子産物は、C1 と C2 ドメインに 3 カ所のインサージョンがあり Zinc 結合サイトが欠如しているが、*T. acidophilum* の ArcTGT であると推測した。

### 2-8-3. Ta1493 遺伝子産物を用いたグアニン塩基交換活性測定

Ta1493 遺伝子産物は、*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株(Novagen)を用いてタンパク質発現させ、HiTrap Q-Sepharose と HiTrap Heparin-Sepharose のカラムで精製した。大量発現させているにもかかわらず、精製後の SDS-PAGE でメインバンドとして Ta1493 遺伝子産物を確認できなかった。また、*P. horikoshii* ArcTGT のように単一のバンドにならなかった(図 2-3 A)。

大腸菌由来のタンパク質が多く粗精製ではあるが、Ta1493 遺伝子産物(約 72 kDa)に相当するバンドがみられるため、このサンプルを用いて tRNA<sup>Leu</sup> Wild-type (G13・G15) に対するグアニン塩基交換活性を測定した。Control として tRNA<sup>Leu</sup> を除いた系を用意した。1 時間反応させた時の結果は図 2-3B のようになり、粗精製タンパク質中に <sup>14</sup>C-グ

アニンの交換活性を確認できた。

この反応系で用いた酵素には、大腸菌由来のタンパク質が含まれているためこの<sup>14</sup>C-グアニンの取り込みが QueTGT による可能性も考えられるが、QueTGT は G34 にのみ作用し今回アッセイに用いた tRNA<sup>Leu</sup> は 34 位が G でなく U になっている。そのため、QueTGT によるグアニン塩基交換はない。つまり、この結果より、Ta1493 遺伝子産物はグアニン塩基交換活性を有することが判った。

#### 2-8-4. Ta1493 遺伝子産物の可溶化条件の検討

*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株で発現させた Ta1493 遺伝子産物がグアニン塩基交換活性を有することを確認できたので、さらに高純度な酵素を得るために陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを試してみたが、単一の酵素は得られなかった。また、SDS-PAGE を行った時に、Ta1493 遺伝子産物(約 72 kDa)に由来すると考えられるバンドがメインバンドとして確認できなかった。そのため、発現されたタンパク質が大腸菌の細胞内でプロテアーゼによって分解されていないか確認したところ、タンパク質発現の段階では分解されておらず、発現はしていることが判った(図 2-4A)。次に、大腸菌の破砕や熱処理の段階で分解されていないか確認した。その結果、大腸菌を超音波破砕した段階で、発現したタンパク質の大部分が沈殿していることが判った(図 2-4B)。タンパク質が不溶化した原因として 2 つの理由が考えられ、1 つはタンパク質が正確にフォールディングしておらず、疎水性の表面が多くなり不溶化してしまったと考えられた。また、別の原因として発現したタンパク質が細胞膜と相互作用しており、菌体を破砕することで細胞膜と一緒に沈殿した可能性も考えられた。

そこで 1 つ目の原因の解決策として、シャペロン様の性質を持つ SUMO タグをコードした SUMO vector (LifeSensors) と正確にフォールディングできるように低温でタンパク質発現が可能な pCold vector (Takara) を用いてタンパク質発現を行った。2 つ目の原因の解決策として界面活性剤を利用してタンパク質精製を行うことにした。

#### SUMO vector, pCold vector

SUMO vector と pCold vector に In-Fusion 反応で Ta1493 遺伝子を導入し、*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株を用いて 37°C と 20°C 培養でタンパク質を発現させた。経時的に回収し



た菌体を 2 × SDS-PAGE サンプルバッファーで破碎し電気泳動したところ、SUMO vector では SUMO-tag(約 18 kDa)と Ta1493 遺伝子産物(約 72 kDa)を合わせた約 90 kDa のバンドが経時的に濃くなっているのが確認できた(図 2-5A)。また、pCold vector でも Ta1493 遺伝子産物(約 72 kDa)が発現していた(図 2-5B)。そこで、発現させたタンパク質が可溶化するか超音波破碎し 12.5% SDS-PAGE で確認した。その結果、両方とも Ta1493 遺伝子産物が沈殿してしまっており可溶化しなかった(図 2-5A, B)。さらに IPTG によるタンパク質発現のタイミングや培養温度の条件を複数通り試してみたが、改善が見られなかった。

### 界面活性剤 (Tween 20, Triton X-100)

界面活性剤は、タンパク質を可溶化させることもできるが、作用が強すぎると目的タンパク質の立体構造を壊し、弱いと目的タンパク質を十分可溶化できない。そこで使用する界面活性剤は、可溶性画分への目的タンパク質の収量が多いことや目的のタンパク質を失活させないこと、また分析に干渉しないことなどの条件を満たしている必要がある。そのため、界面活性剤は慎重に選択しなければならないが、界面活性剤の種類はとも多く全てを試すことは難しいので、膜タンパク質の精製で広く利用されている非イオン性界面活性剤の Tween 20 と Triton X-100 を試した。

実際、界面活性剤を用いて大腸菌を超音波破碎し 12.5% SDS-PAGE を行ったところ図 2-5C のようになり、界面活性剤を用いても可溶化したタンパク質を回収できなかった。

### 2-8-5. *T. kodakarensis* ArcTGT を用いたグアニン塩基交換活性測定

第 3 章で Ta1493 遺伝子産物を *T. kodakarensis* の細胞内で発現させる計画があるため、*T. kodakarensis* の ArcTGT がマルチサイト特異性を持っていないか確認した。まずは *P. horikoshii arcTGT* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を BLAST-search で探索し、*T. kodakarensis* のゲノム中から Tk0760 を見出した。In-Fusion 反応で ArcTGT の発現用プラスミドを構築し、*E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株を用いてタンパク質を発現させた。精製は、*P. horikoshii* ArcTGT の時と同様に HiTrap Q-Sepharose と HiTrap Heparin-Sepharose のカラムを用いて行い、12.5% SDS-PAGE で確認したところ単一のバンドをあたえる高純度であった(図 2-1 B)。

調整した酵素と4種類の tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物(図 2-1A)を用いてゲルアッセイ法でグアニン塩基交換活性を測定した。その結果、図 2-1B に示すように、G13・G15 と A13・G15 の tRNA でのみ <sup>14</sup>C-グアニンが取り込まれていることを確認できた。よって、*T. kodakarensis* ArcTGT も 15 位のグアニン塩基だけを交換しており、マルチサイト特異性を持っていないことが示唆された。

## 2-9. 考察

既に遺伝子が同定されている *P. horikoshii* の ArcTGT と相同性の高い遺伝子を探し、Ta1493 遺伝子 1 つを見出した。このことから ArcTGT は 1 種類しかなくマルチサイト特異性を持っていると推測された。そして、これら 2 つのアミノ酸配列を比較してみると、Ta1493 遺伝子産物では Zinc 結合サイトが欠如しており 3 つのインサーションが存在していることが判明した。

Zinc を持っていない ArcTGT はいくつか存在し、*Ferroplasma acidophilum* の ArcTGT もその 1 つである。そのため、Zinc 結合サイトである CCCH モチーフが欠如していることは、*T. acidophilum* に特有のことではない。また、*F. acidophilum* と *T. acidophilum* は、両方とも好酸性古細菌であるので、Zinc 結合サイトがないのは酸性条件下での Zinc の利用が不可能なためではないかと考えられそうだが、ZnSO<sub>4</sub> の溶解度はとても高く 20°C で 540 g/L となっており、他の好熱好酸性古細菌である *Sulfolobus solfataricus* の ArcTGT は CCCH モチーフを持っている。そのため、酸性条件下でも Zinc は利用可能で CCCH モチーフがないのは、環境が要因ではないと考えられた。

一方、インサーションが存在する ArcTGT は多くの生物でみられ、C1 や C2 ドメインの配列は多様性に富んでいることが判った。そのため、Ta1493 遺伝子産物のインサーションはマルチサイト特異性に直接寄与しないと思われた。また、*T. acidophilum* のプロテオーム解析によって、細胞内で多くのタンパク質が巨大な複合体を形成していることが報告されており、Ta1493 遺伝子産物も可溶性を維持するためにインサーションの部分で他のタンパク質と相互作用しているのかもしれない。

*P. furiosus* ArcTGT は、C3 (PUA) ドメインを欠損させても 15 位の厳密な認識に影響がなく [61]、*P. horikoshii* ArcTGT が tRNA のアミノアシルステムから D-arm にかけてのリボースとリン酸バックボーンを認識していることから [53]、ArcTGT は触媒ドメインとリボースとリン酸バックボーン間の相互作用が部位特異性に重要なのではないかと考えられる。*P. horikoshii* ArcTGT と tRNA 複合体の構造を見てみると、12 位と 13 位間の

リン酸、13位のリボース、13位と14位間のリン酸は、それぞれ Glu202, Tyr204, Arg261 によって捉えられており [41]、これらのアミノ酸配列は Ta1493 遺伝子産物や他の ArcTGT で高く保存されていた。しかしながら、Ta1493 遺伝子産物では触媒ポケット近傍のアミノ酸配列がかなり異なっている(図 2-2A)。そのため、この違いがマルチサイト特異性に寄与しているのかもしれない。

実際に部位特異性を確認したところ *P. horikoshii* と *T. kodakarensis* ArcTGT では15位にしか作用しなかったが、*T. acidophilum* S30 では13位と15位の2カ所のグアニン塩基が交換されていた。そこで Ta1493 遺伝子産物がマルチサイト特異性を持つのか、どこがマルチサイト特異性に寄与しているのか調べるため、大腸菌を用いて組み換えタンパク質の発現を試みたが不溶化してしまい回収することができなかった。可溶化しない原因はおそらく C3 (PUA) ドメインにあると思われた。PUA ドメインの 561-631aa にかけて酸性アミノ酸であるグルタミン酸とアスパラギン酸が連続して存在する箇所があり、酸性アミノ酸が多い領域は、分子内や分子間など複数箇所と相互作用しふらつくため、正確にフォールディングしにくいことがある。そのため、Ta1493 遺伝子産物は不溶化してしまったと考えられた。

また、真正細菌と古細菌のシャペロニンの違いにも注目した。真正細菌のシャペロニンは GroEL であり補因子として GroES が機能しているが、古細菌のシャペロニンは Hsp60 で基本的には補因子を必要とせず補助的に GimC が機能する場合がある。そのため、古細菌特有のシャペロニンや因子がないと可溶化しにくいのではないかと考えられた。そこで大腸菌ではなく古細菌の細胞内で Ta1493 遺伝子産物を発現させることにした。ホストには古細菌である *T. Kodakarensis* を用いた。*T. kodakarensis* は日本の鹿児島県にある子宝島で単離された超好熱菌で、全てのゲノム配列が決定されており、遺伝子操作技術も開発されている [63-66]。そこで、*T. kodakarensis* の細胞内で Ta1493 遺伝子産物と tRNA<sup>Leu</sup> を発現させマルチサイト特異性を調べることにした。

次章で、*T. kodakarensis* 用いた解析について詳しく述べる。

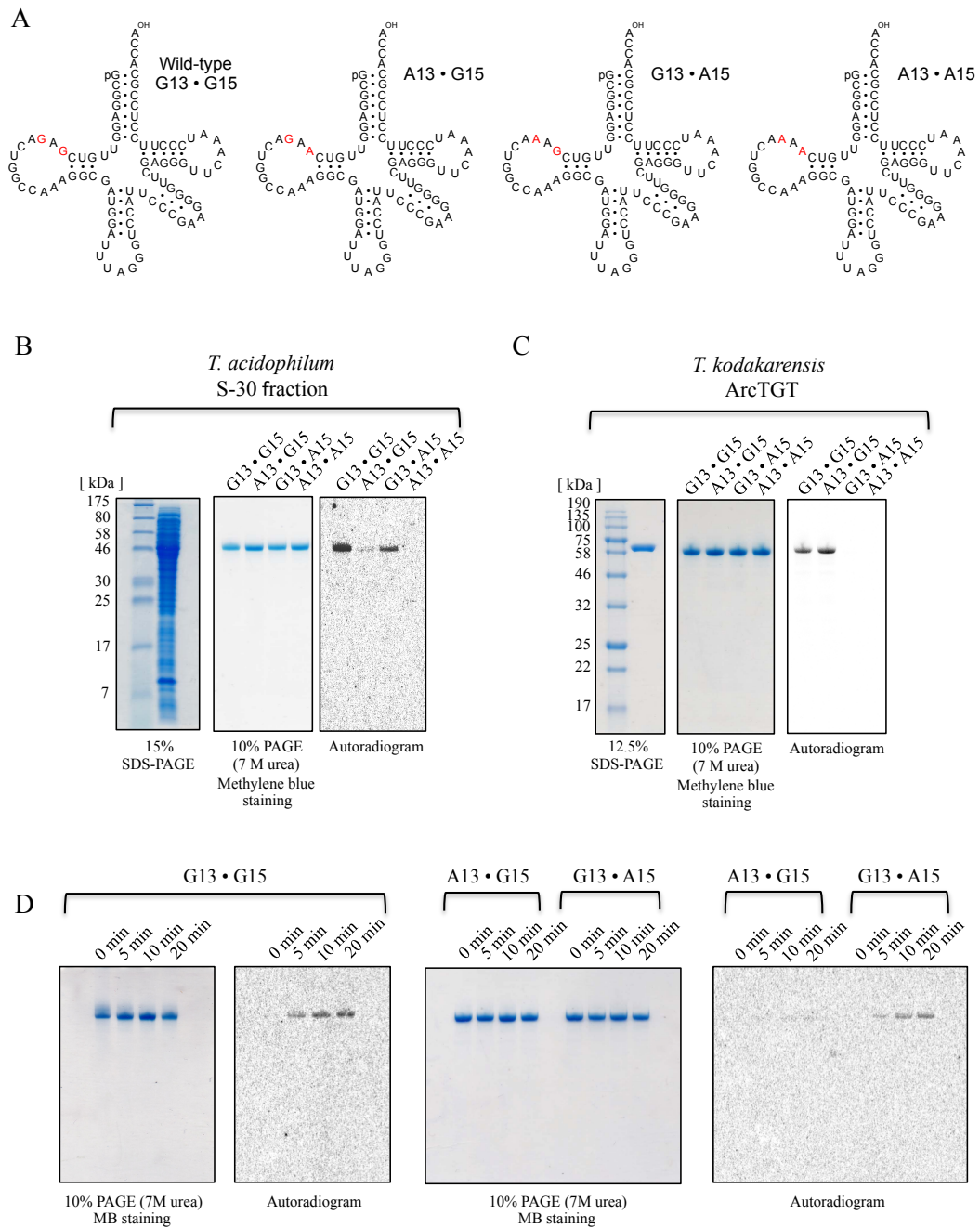
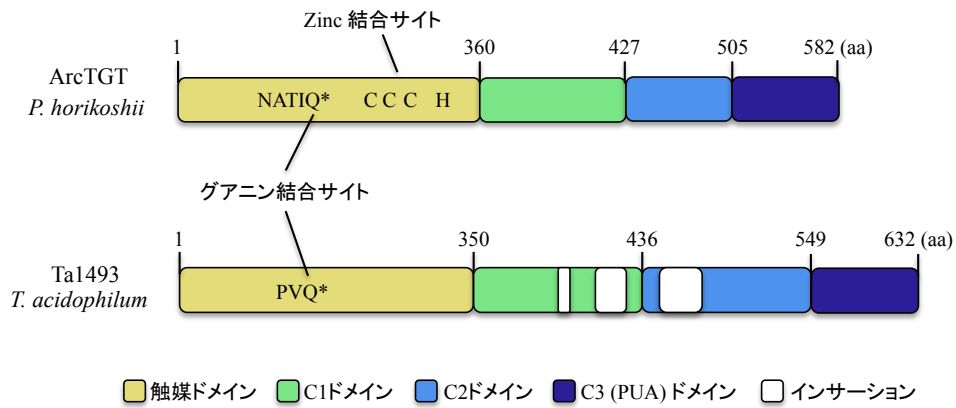


図 2-1. *T. acidophilum* S30 と *T. kodakarensis* ArcTGT が 13 位と 15 位に作用するか確認した。(A) 4 種類の tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物 (Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15) のクローバーリーフ構造。13 位と 15 位を赤色で示してある。(B) *T. acidophilum* S30 によるグアニン塩基交換活性の確認。(C) *T. kodakarensis* ArcTGT によるグアニン塩基交換活性の確認。(D) *T. acidophilum* S30 と 3 種類の tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物を用いた経時的グアニン塩基交換反応の測定。

A



B

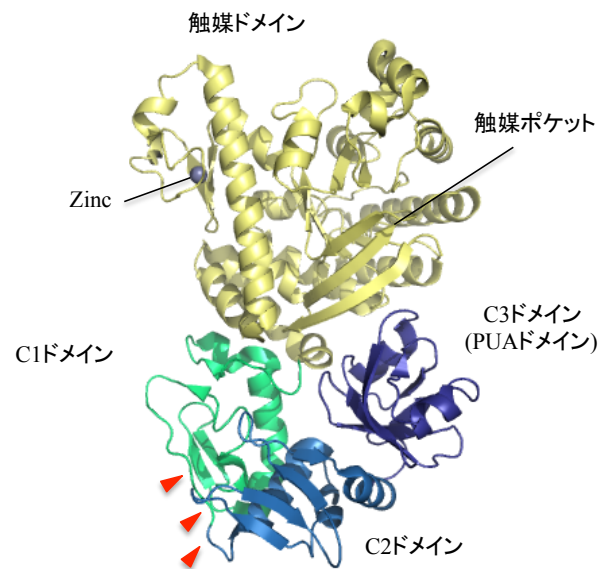


図 2-2. Ta1493 と *P. horikoshii* ArcTGT との比較 (A) *T. acidophilum* Ta1493 遺伝子産物と *P. horikoshii* ArcTGT のアミノ酸配列の比較。(B) *P. horikoshii* ArcTGT の構造。矢印は Ta1493 遺伝子産物のインサージョンの位置を示している。

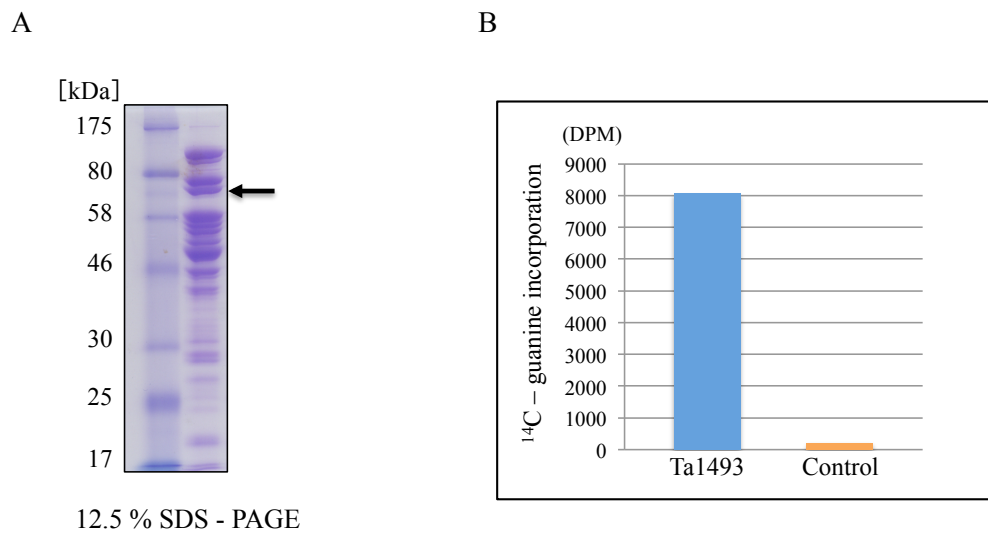


図 2-3. Ta1493 遺伝子産物粗精製標品での <sup>14</sup>C-グアニン塩基交換活性の測定 (A) Ta1493 遺伝子産物粗精製標品で 12.5% SDS-PAGE を行った結果。矢印は、Ta1493 遺伝子産物に相当するバンド(約 72 kDa)を示している。(B) Ta1493 遺伝子産物の粗精製標品と tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物を 1 時間反応させた結果。Control として tRNA を除いた系を用いた。

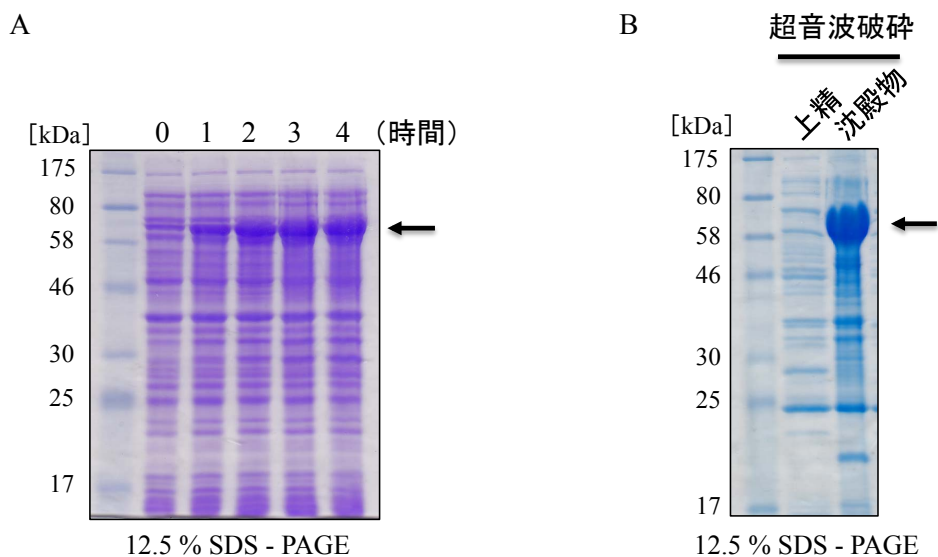


図 2-4. Ta1493 遺伝子産物が発現しているか確認した。矢印は Ta1493 遺伝子産物(約 72 kDa) を示している。(A) IPTG を加え、0, 1, 2, 3, 4 時間毎に菌体の一部を回収し、12.5% SDS-PAGE で発現確認を行った。(B) 超音波破碎後に Ta1493 遺伝子産物が可溶化しているか確認した。

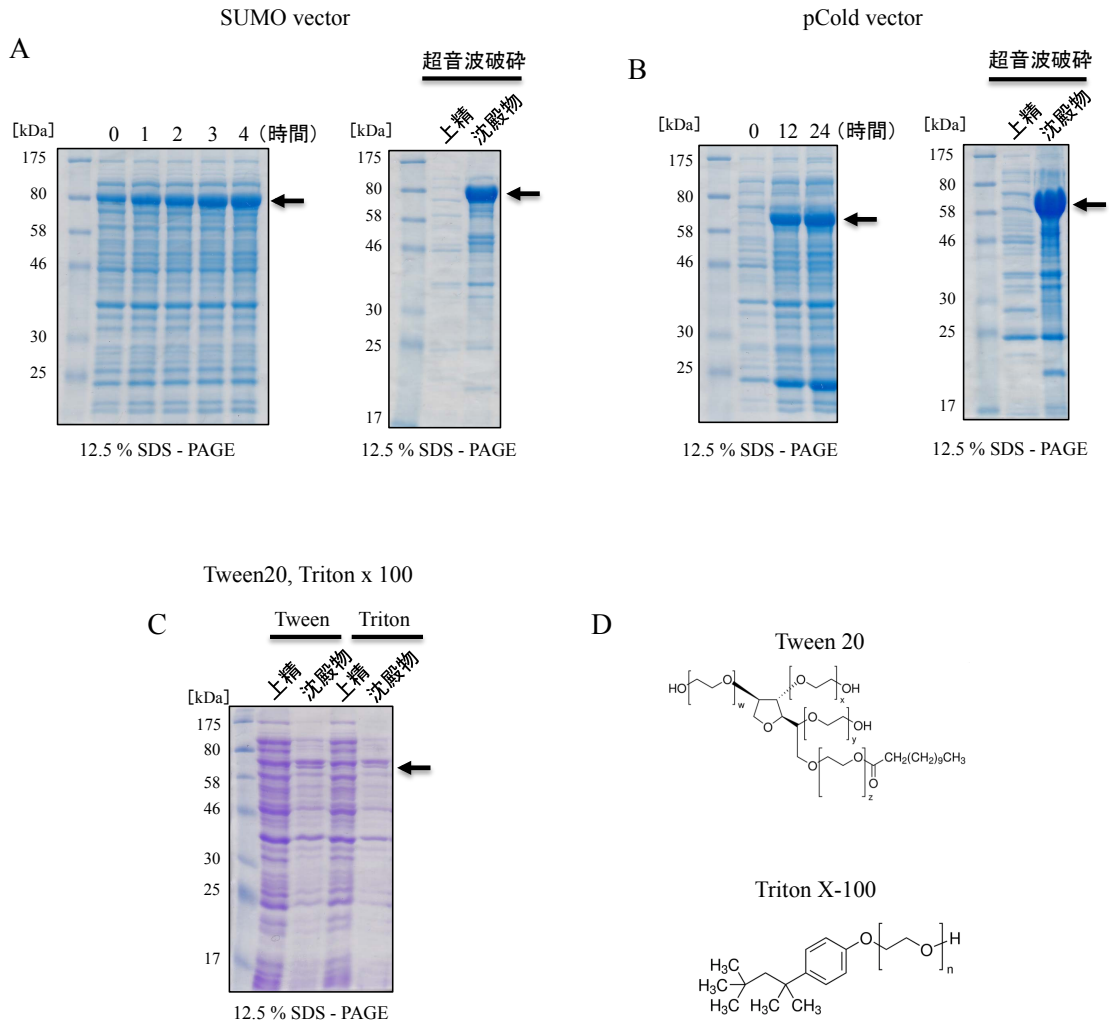


図 2-5. 可溶化条件の検討、矢印は Ta1493 遺伝子産物を示している。(A) SUMO vector を用いたタンパク質発現。経時的タンパク質発現の確認 (左図)。Ta1493 遺伝子産物の可溶化の確認(右図)。SUMO-tag (約 18 kDa)と Ta1493 遺伝子産物 (約 72 kDa)を合わせて約 90 kDa ある。(B) pCold vector を用いたタンパク質発現。経時的タンパク質発現の確認(左図)。Ta1493 遺伝子産物の可溶化の確認(右図)。(C) Tween 20, Triton X-100 を用いた大腸菌破碎の結果。(D) Tween 20, Triton X-100 の構造。

第3章. *Thermococcus kodakarensis* KUWA 株を用いた  
マルチサイト特異性の解析



### 3-1. 序

大腸菌で発現させた組み換えタンパク質は、大部分が不溶化し回収できなかったため、*T. acidophilum* の Ta1493 遺伝子産物と tRNA<sup>Leu</sup> を異種の高細菌の細胞内で共発現させ、細胞内で両者を反応させることにした。そこで、超好熱性高細菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 に着目した。*T. kodakarensis* は、至適生育温度が 85°C であるが、生育温度は 60°C から 100°C と幅広く、従属栄養、絶対嫌気性という特徴を持っている [66, 67]。また、栄養要求性を用いた遺伝子破壊法が開発されており、複数のマーカーを用いた多重遺伝子操作が可能で、染色体中にマーカー遺伝子を残さずに繰り返し遺伝子破壊が行える相同組み換え法も開発されている [68-71]。*T. acidophilum* の酵素が活性を持つ 60°C で培養が可能であり、遺伝学的手法が確立しているため *T. kodakarensis* KOD1 を宿主として利用し、*T. acidophilum* 由来 ArcTGT のマルチサイト特異性を確認することにした。また、当初は *T. acidophilum* ArcTGT、ArcS、tRNA<sup>Leu</sup> を発現させる計画だったため、ピリミジン生合成経路遺伝子 *pyrF* (Tk2276 : オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ) とトリプトファン生合成経路遺伝子 *trpE* (Tk0254 : アントラニル酸シンターゼ)、アグマチン生合成経路遺伝子 *pdaD* (Tk0149 : アルギニンデカルボキシラーゼ) を破壊したウラシル、トリプトファン、アグマチン要求性である *Thermococcus kodakarensis* KOD1 KUWA 株(KUW1 の派生株 [68, 69] )を用いた。

*in vivo* で解析を行うため、まず *T. kodakarensis* 内在の *arcTGT* 遺伝子(Tk0760)を破壊し、この破壊株のゲノム中に *T. acidophilum* Ta1493 遺伝子を導入した。その後、相補株を *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子(TA\_RS03210)をコードした plasmid で形質転換し、60°C で培養することで *T. acidophilum* Ta1493 遺伝子産物と tRNA<sup>Leu</sup> を共発現させ反応させた(図 3-5)。そして、固相化 DNA プローブ法を用いて発現させた *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> のみを回収し、ヌクレオシド分析と質量分析を行うことで、13 位と 15 位の 2 カ所のグアニンが preQ<sub>0</sub> かアーケオシンに変換されているかどうかを確認した。この遺伝子組み換えの実験では、選択マーカーとして *arcTGT* 遺伝子破壊と Ta1493 遺伝子導入の際にウラシルを、そして tRNA<sup>Leu</sup> の発現の時にはアグマチンを利用した。

また、Ta1493 遺伝子産物が ArcTGT であり、*T. kodakarensis* の細胞内で機能していることが確認できたので、His タグを付加した *T. acidophilum* ArcTGT を *T. kodakarensis* の細胞内で発現させ Ni-NTA カラムで精製し、試験管内でグアニン塩基交換活性の測定を行い、マルチサイト特異性を確かめることにした。

### 3-2. 試薬・培地・菌株

Guanine hydrochloride [ $8\text{-}^{14}\text{C}$ ] (2.19 Mbq/mmol)は Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) から購入した。Hitrap Q-Sepharose, Hitrap Heparine-Sepharose、AKTA prime は、GE Healthcare(Tokyo, Japan)から購入した。DNA オリゴマーInvitrogen Japan (Tokyo, Japan) から購入した。その他の化学試薬は、分子生物学用グレードを使った。

本実験で用いた KUWA 株は、当研究室の長野倫子さん等が金井保博士(京都大学)より譲渡していただいた KUW1 株から作製した。

#### 0.1% Resazurin (50 ml につき)

Resazurin sodium salt	50 mg
-----------------------	-------

#### 0.5% Na<sub>2</sub>S (50 ml につき)

Na <sub>2</sub> S	0.25 g
-------------------	--------

#### *T. kodakarensis* 栄養培地 MA-YT 培地 (100 ml につき)

Yeast extract	0.5 g
Tryptone	0.5 g
Marine art	3.04 g
0.5% Resazurin (TCI)	5 $\mu$ l
Sulfer powder	0.4 g
0.5% Na <sub>2</sub> S	17 $\mu$ l

オートクレーブした後に Sulfer powder と 0.5% Na<sub>2</sub>S を加えた。

4 x Artificial sea water (ASW) (1 Lにつき)

NaCl	80 g
MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	12 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	24 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.8 g
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	1.2 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.68 g
NaBr	0.2 g
SrCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.08 g
Fe(NH <sub>4</sub> )Citrate	0.04 g

2 x Amino acids solution (AA) (1 Lにつき)

Cysteine • HCl • H <sub>2</sub> O	1000 mg
Alanine	300 mg
Arginine • HCl	500 mg
Asparagine • H <sub>2</sub> O	400 mg
Aspartic acid	200 mg
Glutamine	200 mg
Glutamic acid	800 mg
Glycine	800 mg
Histidine • HCl • H <sub>2</sub> O	400 mg
Isoleucine	400 mg
Leucine	400 mg
Lysine • HCl	400 mg
Methionine	300 mg
Phenylalanine	300 mg
Proline	500 mg
Serine	300 mg

Threonine	400 mg
Tryptophan	300 mg
Tyrosine	400 mg
Valine	200 mg

milli-Q 水で 1 L にメスアップした後に、NaOH で pH 8 に調整した。

Vitamins mixture (50 ml につき)

Niacin	10 mg
Biotin	4 mg
Pantothenate	10 mg
Lipoic acid	10 mg
Folic acid	4 mg
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	10 mg
Thiamine (B <sub>1</sub> )	10 mg
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	10 mg
Pyridoxine (B <sub>6</sub> )	10 mg
Cobalamin (B <sub>12</sub> )	10 mg

Minerals solution (50 ml につき)

MnSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	500 mg
CoCl <sub>2</sub>	100 mg
ZnSO <sub>4</sub>	100 mg
CuSO • 5H <sub>2</sub> O	10 mg
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	10 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	10 mg

Tungsten solution (100 ml につき)

Na<sub>2</sub>WO • 2H<sub>2</sub>O 30 mg

*T. kodakarensis* 合成培地 (ASW-AA 培地) (20 ml につき)

4 x ASW 5 ml

2 x AA 10 ml

Water 5 ml

0.5 % Resazurin 2 µl

Vitamins mixture 20 µl

Minerals solution 5 µl

Tungsten solution 20 µl

Sulfer powder 40 mg

0.5 % Na<sub>2</sub>S 3 µl

Vitamins mixture、Minerals solution、Tungsten solution、Sulfer powder、0.5 % Na<sub>2</sub>S はオートクレーブ後に加えた。

Polysulfides solution (15 ml につき)

Na<sub>2</sub>S • 9H<sub>2</sub>O 10 g

Sulfur powder 3 g

フィルターを用いて滅菌した。

ASW-AA プレーットの作製 (ガラスのシャーレ 4 枚分)

メジューム瓶 1 に 4 x ASW 25 ml と 2 x AA 50 ml を採り、オートクレーブにかけた後、Minerals solution 25 µl、Vitamin mixture 100 µl、Tungsten solution 12.5 µl を加えた。また、培養条件に応じて 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) 750 mg、1 M NaOH 4.5 ml (5-FOA を加える際にのみ加える。)、Uracil 5 mg、Agmatine 0.25 g を加えた。その後、85°C に設定したインキュベーターで 1 時間保温した。前記の操作と同時に、メジューム瓶 2 に蒸留水 25 ml と Gelrite 1 g を採りオートクレーブにかけた後に、85°C のインキュベーターで 1

時間保温した。1時間後、メジューム瓶1と2を嫌気装置内に入れ、培養に必要な硫黄を加え、かつ容存酸素を除去するためにメジューム瓶1に polysulfides solution 200  $\mu$ l と 0.5%  $\text{Na}_2\text{S}$  6  $\mu$ l を加え手早く振り混ぜた。その後、メジューム瓶1と2を混ぜ手早く振り、ガラスシャーレ4枚に注ぎ込み、培地が白く固まるまで室温で約1h 静置させた。菌体を撒いたプレートの培養は、嫌気環境を保ちながら培養を行うために脱酸素剤であるアネロパック（三菱ガス化学株式会社）が入ったジャーを用いて行った。

### 3-3. *arcTGT* 遺伝子破壊株の作製方法

*T. kodakarensis arcTGT* 遺伝子破壊株は図3-1Aのように2段階の相同組み換えで作製した [72]。まずは、*arcTGT* 遺伝子の量末端 1000bp の断片を隣接させたプラスミドで KUWA 株を形質転換する。すると、細胞内で1ヶ所の相同組み換え(シングルクロスオーバー相同組み換え)が起こり、プラスミドがゲノム中に入り込む。プラスミドには、ピリミジン合成経路遺伝子 *pyrF* 遺伝子がコードされているため、ウラシルを除いたアミノ酸合成(ASW-AA)培地で培養することで、候補株を単離できる。次に、この株を5-フルオロオロチン酸(5-FOA)を含んだ培地で培養すると、PyrF によって取り込まれた5-FOA から5-フルオロウリジンモノリン酸(5-FUMP)が合成され、5-FUMP は DNA や RNA の合成を阻害してしまうため、細胞にとって有毒である。そのため、*pyrF* 遺伝子が欠失するように2回目の相同組み換え(ポップアウト相同組み換え)が起こる。その結果、目的の *arcTGT* 遺伝子破壊株のみが生存し、単離できる。また、この手法を用いて遺伝子破壊を行うことで、もう一度ウラシルのマーカールが利用できる。

#### 3-3-1. *T. kodakarensis* KUWA 株由来 Genomic DNA の回収

アグマチンを含む MA-YT 培地で培養した KUWA 株をマイクロチューブに 1.5 ml 分注し、20,000 g, 5 min 遠心した。その後、上精を除き、20  $\mu$ l の milliQ と等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 25:24:1 (ナカライテスク)を加え懸濁した。再び 20,000 g, 5 min 遠心し、水相を回収した。この溶液に Genomic DNA が含まれている。

### 3-3-2. 破壊株作製用プラスミド(pUD $\Delta$ arcTGT)の構築

まずは、*arcTGT* 遺伝子の量末端に 1000bp を付加した断片を Genomic DNA から PCR で増幅し、*pyrF* 遺伝子をコードした pUD3 vector に In-Fusion 反応で導入した。その後、この plasmid を鋳型にして、リン酸化したプライマーでリバーズ PCR を行いセルフライゲーションすることで、*arcTGT* 遺伝子の配列を除いた破壊株作製用プラスミド (pUD $\Delta$ arcTGT) を構築した(図 3-2)。PCR は、KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO) を用いて行った。

使用したプライマー

*arcTGT* の上流 1000 bp – *arcTGT* – *arcTGT* の下流 1000bp

Forward primer : T.k  $\Delta$ arcTGT Up F,

5' - CCAGTGCCAAGCTTG TGCTACATAAACTATATAGACACAATA - 3'

Reverse primer : T.k  $\Delta$ arcTGT Down R,

5' - ATGATTACGAATTCG ACCTCGACCTCAGGAAATATG - 3'

pUD3

Forward primer : pUD3 F,

5' - CGAATTCGTAATCAT GGTCATAGCTGTTTCCT - 3'

Reverse primer : pUD3 R,

5' - CAAGCTTGGCACTGG CCGTCGTTTTA - 3'

リバーズ PCR

Forward primer : T.k *arcTGT* Reverse F,

5' - AAAAAATTATAAACCTCTCCTTTTTTC - 3'

Reverse primer : T.k *arcTGT* R Reverse R,

5' - TTTTCTCACCTACCTTGAATTGGAA - 3'

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

PCR mixture

10×KOD buffer	5 $\mu$ l
2 mM dNTPs	5 $\mu$ l
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l
T.k arcTGT F (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
T.k arcTGT R (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
鋳型 DNA	50 ng
KOD-plus- (1.0 u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
milliQ	33 $\mu$ l
<hr/>	
Total	50 $\mu$ l

PCR cycles

94°C	2 min	} × 25
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
68°C	1 min/kb	
68°C	2 min	
20°C	$\infty$	

PCR で得られた Insert : 約 3700 bp、Vector : 3500 bp の断片をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後目的の断片を切り出した。エコノスピンカラムを用いて切り出したゲルから DNA 断片を回収し、Insert 200 ng、Vector 50 ng と In-Fusion HD Cloning kit (TAKARA)を用いて 50°C, 15 分 In-Fusion 反応を行った。In-Fusion 反応後のサンプルで *E.coli* DH5  $\alpha$  コンピテントセル(TOYOBO)を形質転換し、100  $\mu$ g/ $\mu$ l のアンピシリンを含んだ LB 寒天培地で 37°C, 12 時間培養した。形成したコロニー1 つに対して 1 本の 3 ml LB 液体培地に植菌し、37°Cで一晩振とう培養した。培養した菌体を QIAprep Spin Miniprep Kit の手法を参考にしてプラスミドを回収し、塩基配列を確認した。塩基配列は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し確認した。

次に、このプラスミドを鋳型にして、リン酸化プライマーを用いてリバーズ PCR を行い、*arcTGT* 遺伝子を除いた。プライマーのリン酸化は、Forward と Reverse 別々に行った。



プライマーのリン酸化

10× T <sub>4</sub> polynucleotide kinase buffer	2 μl
10 mM ATP	2 μl
T <sub>4</sub> polynucleotide kinase (10 U/μl)	1 μl
Primer (50 pmol/μl)	2.5 μl
milliQ	12.5 μl
<hr/>	
Total	20 μl

リバース PCR mixture

10× KOD buffer	5 μl
2 mM dNTPs	5 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 μl
T.k arcTGT F (10 pmol/μl)	1.5 μl
T.k arcTGT R (10 pmol/μl)	1.5 μl
pUD3arcTGT	50 ng
KOD-plus- (1.0 u/μl)	1 μl
milliQ	33 μl
<hr/>	
Total	50 μl

リバース PCR cycles

94°C	2 min	} × 25
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
68°C	4.5 min	
68°C	5 min	
20°C	∞	

リバース PCR 後のサンプルを DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TAKARA)を用いてライゲーションさせ、このサンプルで再び *E.coli* DH5 α コンピテントセル(TOYOBO)を形質転換し、培養した。そして、培養した菌体からプラスミドを回収し、塩基配列を確認

した。このプラスミドを *arcTGT* 遺伝子破壊株作製用プラスミド(pUD $\Delta$ *arcTGT*)とした。

### 3-3-3. $\Delta$ *arcTGT* 株の構築

アグマチンを含む MA-YT 培地で培養した KUWA 株を 2 本のマイクロチューブに 1.5 ml ずつ分注し、20,000 g, 5 min 遠心することで上精を除いた。それぞれのマイクロチューブに 100  $\mu$ l の ASW を加え、沈殿物を懸濁し 30 分氷上に置いた。次に、溶液を 1 本にまとめ、3  $\mu$ g の pUD $\Delta$ *arcTGT* を加え、再び 30 分氷上に置いた。その後、85°C で 45 分インキュベートし、10 分氷上に置いた後に、全量をウラシル無しのアグマチンを含む ASW-AA 培地(18 ml)で 85°C, 16 時間培養した。翌日、180  $\mu$ l を新しいウラシル無しのアグマチンを含む ASW-AA 培地(18 ml)に植え継ぎ、85°C, 16 時間培養した。この操作を 2 回繰り返し行うことで、シングルクロスオーバーの相同組み換えが起こり、プラスミドをゲノムに取り込んだ株を選択的に培養した。

培養した菌体を 200  $\mu$ l マイクロチューブにとり、そのうち 100  $\mu$ l をウラシル、アグマチン、5-FOA を含む ASW-AA プレートにまいた。また、残りの菌体 10  $\mu$ l と ASW 90  $\mu$ l を混ぜることで 10 倍に希釈し、同様にプレートにまいた。85°C で 14 時間培養するとコロニーが形成される。ここで生育している菌体は、ゲノム中から *pyrF* 遺伝子が除かれた菌体である。このコロニーをアグマチンを含む MA-YT 培地に植菌し、85°C で 12 時間培養した。

### 3-3-4. $\Delta$ *arcTGT* 株の確認

培養した菌体の *arcTGT* 遺伝子が欠失しているか PCR (図 3-1B)と DNA シーケンシングを行うことで確認した。3-3-1 と同様の操作でゲノム DNA を回収し、以下のプライマーを用いて 3-3-2 と同様の操作で PCR を行った。

使用したプライマー

*arcTGT* の上流 1000 bp – *arcTGT* – *arcTGT* の下流 1000bp

Forward primer : T.k *arcTGT* Up F,

5' - CCAGTGCCAAGCTTGTGCTACATAAACTATATAGACACAATA - 3'

Reverse primer : T.k arcTGT Down R,

5' - ATGATTACGAATTCGACCTCGACCTCAGGAAATATG - 3'

*arcTGT* 遺伝子

Forward primer : T.k arcTGT F,

5' - GGAGATATACATATGGTTCGATTTTCAGGTTTGAGGT - 3'

Reverse primer : T.k arcTGT R,

5' - GAATTCGGATCCTCATAACTACTTCTCGACTCCCCTCCTA- 3'

### 3-3-5. $\Delta arcTGT$ 株大量培養

KUWA $\Delta arcTGT$  破壊株を大量培養すると、多量のアグマチンを消費してしまう。そのため、培養を行う前に、この株を関西学院大学の藤原先生に譲渡していただいた pTK02 で形質転換した。pTK02 は、複製起点とアグマチン合成遺伝子(*pDad*)を持っているため、プラスミドが細胞内で分解されることなく、アグマチンを合成することが可能である。

3-2-3 と同様の操作で pTK02 を用いて KUWA $\Delta arcTGT$  破壊株を形質転換し、18 ml MA-YT 培地で 85°C, 12 時間培養した後に、80 ml MA-YT 培地に 10% 植え継ぎ 85°C, 12 時間培養した。次に、1.6 L MA-YT 培地に 0.01 A<sub>660</sub> になるように植え継ぎ、85°C, 16 時間(0.7 A<sub>660</sub> まで)培養と 60°C, 約 65 時間(0.7 A<sub>660</sub> まで)培養した。60°C 培養では菌体の生育がかなり遅いため、この温度での培養時のみ培地に硫黄を加えた。培養した菌体は、11,000 g, 30 分遠心して回収し、-80°C で保存した。

### 3-3-6. tRNA 混合物の回収

培養した菌体から Acid Guanidium Phenol Chloroform(AGPC 法)を参考にして total RNA を回収し、Q-Sepharose カラムによる精製とゲル切り出しを行い tRNA 混合物を回収した。AGPC 法と Q-Sepharose による高分子 RNA の除去は、1-3-2,3 に記載している操作と同様に行った。

Q-Sepharose カラムで精製した RNA から tRNA 画分のみを回収するため、7 M urea 10% PAGE を用いたゲル切り出しを行った。0.1~1.0 A<sub>260</sub>units の RNA を用いて 7 M urea 10%

PAGE を行い、泳動後、ゲルにトルイジンブルーをかけて tRNA 部分のゲルをカッターで切り出した。切り出したゲルは、Gel elution buffer (500 mM NH<sub>4</sub>COOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)に浸し、37°C, 6 時間以上静置させた。その後、溶液をマイクロチューブに移し、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い tRNA 混合物を回収した。Gel elution buffer に多量の塩が含まれているため、エタノール沈殿の時に塩を加えずに行った。

### 3-3-7. アーケオシン消失の確認

KUWA *ΔarcTGT* 株の tRNA 混合物中のアーケオシンが消失しているか、ヌクレオシド分析を行い確認した。ヌクレオシド分析は、文献 [73] を参考にして行った。標準化合物として m<sup>2</sup>G は、Trm1 [52] によって酵素的に準備した。Trm1 は、当研究室の西山聖示君より分与して頂いた。また、アーケオシンの溶出時間は、岐阜大学の横川隆志博士等に質量分析を行って頂き確認した。

ゲル切り出しで精製した tRNA 混合物 2.0 A<sub>260</sub>unit を 50 mM Tris-HCl pH8.0 を含んだ 20 μl の系で 2.0 μg snake venom phosphodiesterase (Sigma)、20 μg RNaseA (Invitrogen)、0.125 U bacterial alkaline phosphatase (Takara) と 37°C, 12 時間以上反応させ、ヌクレオシドにした。ヌクレオシドは、逆相カラム C18 (NUCLEOSIL 100 C18; 25 cm x 4.6 mm、7 μm; GL Science, Inc) と HPLC (Hitachi L-2000 system) を利用して、流速は 1 ml/min とシマルチステップ・リニアグラジエントで分析した。グラジエントプログラムは、以下に示す通りである。Buffer は、Buffer G (50 mM リン酸ナトリウム(pH 5.1)) と Buffer H (50 mM リン酸ナトリウム(pH 5.1), 70% メタノール) を用いた。

時間 (分)	Buffer G (%)	Buffer H (%)
0	97	3
10	97	3
25	77	23
50	65	35
65	2	98
75	0	100
75.1	100	0
100	100	0

### 3-4. Ta1493 遺伝子相補株(KTA1493 株)の作製方法

*T. kodakarensis* 細胞内でのタンパク質発現システムは、平田章博士等 [74] によって開発されていたため、この論文を参考に Ta1493 遺伝子相補株(KTA1493 株)を作製した。まずは、当研究室で使用していた pCTP を元にマーカーとなる *pyrF* 遺伝子とフルクトース 1,6-ビスフォスファターゼ(FBPase)のプロモーター、そして Ta1493 遺伝子を含んだ pCTTA を作製し、このプラスミドを用いて *T. kodakarensis* KUWA  $\Delta arcTGT$  株を形質転換した。そして、ウラシル無しのアグマチンを含む培地で培養することで、ダブルクロスオーバーの相同組み換えが起こり、キチナーゼ (Tk1765)遺伝子部分に Ta1493 遺伝子が導入された KTA1493 株を作製した [74] (図 3-3A)。Tk1765 遺伝子の破壊は、キチンが炭素源として使用されない限り生育に影響を及ぼさない。また、今回用いた FBPase のプロモーターは、糖新生条件下でのみ転写活性が ON になるため培養の際は、培地にピルビン酸ナトリウムを加える必要がある。

#### 3-4-1. 相同組み換え用プラスミド(pCTTA)の構築

3-3-2 と同様の操作で Ta1493 遺伝子を *T. acidophilum* genomic DNA から PCR で増幅し、pCTP の Pro FBPase 下流に In-Fusion 反応で導入することで pCTTA を構築した(図 3-3B)。塩基配列の決定は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し行った。

使用したプライマー

Ta1493 遺伝子

Forward primer : Ta1493 pCTP F,

5' - CGAATTCGTAATCAT GGTCATAGCTGTTTCCT- 3'

Reverse primer : Ta1493 pCTP R,

5' - CAAGCTTGGCACTGG CCGTCGTTTTA - 3'

pCTP

Forward primer : pCTP F,

5' - TGACCCCTCTCTTCCTCCTTTTGTCCATAAT- 3'

Reverse primer : pCTP R,

5' - CATATGAACCACCGGTATTTTTAACCTCTTTTATGC- 3'

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

### 3-4-2. KTA1493 株の構築

アグマチンを含む MA-YT 培地で培養した  $\Delta arcTGT$  株を 3-3-3 と同様の操作を行い形質転換した。この際、3  $\mu\text{g}$  の pCTTA を用いた。形質転換した菌体をアグマチンを含む ASW-AA 培地(18 ml)で 85°C, 16 時間培養した。翌日、180  $\mu\text{l}$  を新しい同じ組成の培地(18 ml)に植え継ぎ、85°C, 16 時間培養した。この操作を 2 回繰り返し行った。

培養した菌体を 200  $\mu\text{l}$  マイクロチューブにとり、そのうち 100  $\mu\text{l}$  をアグマチンを含む ASW-AA プレートにまいた。また、残りの菌体 10  $\mu\text{l}$  と ASW 90  $\mu\text{l}$  を混ぜることで 10 倍に希釈し、同様にプレートにまいた。85°C で 14 時間培養するとコロニーが形成され、このコロニーをアグマチンを含む MA-YT 培地に植菌し、85°C で 12 時間培養した。培養した菌体に Ta1493 遺伝子が導入されているか、プロモーターとターミネーター部分と相補するプライマーを用いて 3-3-4 と同様の操作で確認した。

使用したプライマー

Forward primer : KTA1493 R,

5' - GGCCCCAATTCTGACGCCATAAAG- 3'

Reverse primer : KTA1493 R,

5' - GGCTCCACATCAACCGCGAGA- 3'

### 3-4-3. KTA1493株の大量培養

ゲノム中に導入した Ta1493 遺伝子由来のタンパク質が発現し機能するか確認するため、85°C と 60°C で培養を行った。

KTA1493 株も大量培養を行う前に pTK02 で形質転換し、18 ml MA-YT 培地で 85°C, 12 時間培養した後に、80 ml MA-YT 培地に 10% 植え継ぎ 85°C, 12 時間培養した。次に、

ピルビン酸ナトリウムを含んだ 1.6 L MA-YT 培地に 0.01 A<sub>660</sub> になるように植え継ぎ、85°C、16 時間(0.7 A<sub>660</sub> まで)培養と 60°C、約 65 時間(0.7 A<sub>660</sub> まで)培養を行った。60°C 培養では菌体の生育がかなり遅いため、この温度での培養時のみ培地に硫黄を加えた。培養した菌体は、11,000 g、30 分遠心して回収し、-80°C で保存した。

#### 3-4-4. Ta1493 遺伝子由来タンパク質発現の確認

KTA1493 株を 60°C で培養することで、Ta1493 遺伝子由来タンパク質がプロテアーゼで分解されずに発現されるかウエスタンブロッティングを行い確認した。

##### 3-4-4-1. 抗 Ta1493 ポリクローナル抗体の調製

Ta1493 遺伝子由来タンパク質を発現させた *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta2 株 1 g を超音波破碎し、16,000 g、4°C、15 分遠心した。沈殿物に目的のタンパク質が大量に含まれているため、沈殿物を 6 M グアニジン塩酸を含む Buffer I (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-メルカプトエタノール) 5 ml で懸濁し、16,000 g、4°C、15 分遠心した。グアニジン塩酸で処理するとタンパク質の水素結合が切断されるため、不溶化していたタンパク質が変性し可溶化するようになる。次に、遠心後の上清に 45 ml Buffer I を加えて希釈したところ、再び白い沈殿ができてしまったため、16,000 g、4°C、15 分遠心した。再び沈殿物を 6 M グアニジン塩酸を含んだ Buffer で懸濁しても良かったが、6 M グアニジン塩酸を含んだ溶液では抗体を作製できないため、沈殿物に 2 M 尿素を含んだ Buffer I を 6 ml 加え懸濁した。大腸菌由来のタンパク質も少し見られるが、大部分が Ta1493 遺伝子由来のタンパク質であるので、北山ラベスに依頼し、このサンプルを用いて Ta1493 ウサギ抗血清を作製した。抗 Ta1493 ポリクローナル抗体は、Econo-pac serum IgG purification kit (Bio-Rad) を使って調製した。

##### 3-4-4-2. ウエスタンブロッティング解析

ウエスタンブロッティングは、文献 [75] を参考にして行った。60°C と 85°C で 0.7 A<sub>660</sub> まで培養した  $\Delta arcTGT$  株と KTA1493 株を 250  $\mu$ l マイクロチューブに分注し、15,000 g、4°C、5 分遠心した。回収した沈殿物に 2  $\times$  sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM

dithiothreitol, 2.5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)を 20  $\mu$ l 加え懸濁し、菌体を破碎した。その後、サンプルを煮沸させ 20,000 g, 15 min で遠心し、上清を 15% SDS-PAGE した。セミドライ式エレクトロブロッターを用いて 50 V, 100 mA, 90 分泳動し、ニトロセルロースメンブレン(Nitro Bind membrane code EP2HY315F5, pore size 0.45mm, Osmonics)に転写し、メンブレンを Blocking One (ナカライテスク)でブロッキングした。超純水でメンブレンを洗浄した後に、抗 Ta1493 抗体を反応させ、PBST で洗浄し 2 次抗体として Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen)を反応させた。検出は、Typhoon Imager (GE Healthcare)で行った。

### 3-4-5. アーケオシン合成の確認

KTA1493株のtRNA混合物中にアーケオシンが合成されているか確認するため、3-3-6と同様の操作を行いtRNA混合物を回収し、3-3-7と同様の操作でヌクレオシド分析を行った。

### 3-5. KTA1493株での*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (WTと3種類の変異tRNA)の発現方法

関西学院大学の藤原先生に譲っていただいた pTK02 の NdeI サイトと NotI サイト間に、[グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)(Tk1431)プロモーター配列] - [*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子(TA\_RS03210)] - [キチナーゼ(Tk1765)のターミネーター配列]を導入した。GDH は、*T. kodakarensis* の細胞内で恒常的に発現しているため、このプロモーターを用いることで *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> を大量に発現することが可能となる。*T. acidophilum* ArcTGT が 13 位と 15 位の 2 カ所に作用するか確認するため Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15 の 4 種類の tRNA<sup>Leu</sup> を発現させた。

#### 3-5-1. *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 発現用プラスミド(pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>)の作製

tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子を Genomic DNA から以下のプライマーを用いて PCR で増幅し、pTK02



の NdeI と NotI の間に In-Fusion 反応で導入することで 4 種類のプラスミド (TK02-tRNA<sup>Leu</sup>(G13・G15), pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>(A13・G15), pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>(G13・A15), pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>(A13・A15)) を作製した(図 3-4)。Forward のプライマーに GDH のプロモーター配列が、Reverse のプライマーにキチナーゼのターミネーター配列が含まれている。プラスミドの構築は、3-3-2 と同様の操作で行い、塩基配列はユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し確認した。

使用したプライマー

*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子

Forward primer : Leu WT F,

5' - AACCACTTCCATATG**GTTTATCGAAAGGTTTATATATGCAAACGCCTAA**  
**GTTAACCTCGGA**ACTATGACAAAAGCGGAGGTTGTC**GAG**ACTGG - 3'

Forward primer : Leu A13 F,

5' - AACCACTTCCATATG**GTTTATCGAAAGGTTTATATATGCAAACGCCTAA**  
**GTTAACCTCGGA**ACTATGACAAAAGCGGAGGTTGTC**AAG**ACTGGC - 3'

Forward primer : Leu A15 F,

5' - AACCACTTCCATATG**GTTTATCGAAAGGTTTATATATGCAAACGCCTAA**  
**GTTAACCTCGGA**ACTATGACAAAAGCGGAGGTTGTC**GAA**ACTGGC - 3'

Forward primer : Leu A13・A15 F,

5' - AACCACTTCCATATG**GTTTATCGAAAGGTTTATATATGCAAACGCCTAA**  
**GTTAACCTCGGA**ACTATGACAAAAGCGGAGGTTGTC**AAA**ACTGGC - 3'

Reverse primer : Leu R,

5' - TGCTCGAGCGGCCGCTAGCTGTTTCTCCAATTCATTATGGACAAAAGA  
GGAGAAGAGAGGGGTCATTACAATAGAAGTGGTGCGGAGGG - 3'

pTK02

Forward primer : pTK02 F,

5' - GCGGCCGCTCGAGCATGCAT - 3'

Reverse primer : pTK02 R,

5' - CATATGGAAGTGGTTATCTTCGAG - 3'

赤字は変異を導入した箇所、緑字は GDH のプロモーター配列、青字はキチナーゼのターミネーターの配列を示している。

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

### 3-5-2. *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 発現

アグマチンを含む MA-YT 培地で培養した KUWA 株と KTA1493 株を上記で作製したプラスミド 3 µg を用いて、3-3-3 と同様の操作を行い形質転換した。形質転換した菌体を MA-YT 培地(18 ml)で 85°C, 16 時間培養した。翌日、180 µl を新しい同じ組成の培地(18 ml)に植え継ぎ、85°C, 16 時間培養した。この操作を 2 回繰り返した。

培養した菌体を ASW-AA プレートにまき、85°C で 14 時間培養した後にコロニーを MA-YT 培地に植菌し、85°C で 12 時間培養した。3-3-5 と同様の操作を行い、それぞれの菌体を 60°C で大量に培養した。培養した菌体は、-80°C で保存した。

### 3-5-3. ノーザンハイブリダイゼーション解析

3-5-2 で培養した菌体が *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> を発現しているかノーザンハイブリダイゼーションを行い確認した。コントロールとして tRNA 遺伝子をコードしていない pTK02 で形質転換した KTA1493 株の RNA を用いた。

培養した菌体から 1-3-2 に記載している AGPC 法で total RNA を回収し、total RNA 0.1 A<sub>260</sub>units を 10% PAGE (7 M urea) にかけて、セミドライ式エレクトロブロッターを用いて 250 V, 30 mA, 45 分泳動した後に、Hybond-N<sup>+</sup>メンブレン(GE Healthcare)に RNA を転写した。その後、メンブレンを 30 分乾燥させ、UV を 5 分照射することでメンブレンに RNA 固定した。次に、下記の操作で、*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> と相補するオリゴ DNA プロブの 5'末端を <sup>32</sup>P で標識した。

標識したプロブとメンブレンをハイブリダイゼーションバッファー(GE Healthcare)に入れ、53°C, 16 時間保温した。その後、メンブレンを 1 X SSC で 30 分洗浄し乾燥させ、イメージングプレートに 16 時間感光させた後に Typhoon FLA 7000 Laser Scanner (GE Healthcare)で検出した。

### オリゴ DNA プローブの標識

下記の組成で 37°C, 1 時間反応させ、15% PAGE (7 M urea)を行った後、トルイジンブルーをかけゲルを切り出し、Gel elution buffer で標識されたオリゴ DNA を回収した。

10×T <sub>4</sub> polynucleotide kinase buffer	1 μl
[γ- <sup>32</sup> P] ATP	1 μl
T <sub>4</sub> polynucleotide kinase (10 U/μl)	2 μl
オリゴ DNA (100 pmol/μl)	5 μl
milliQ	1 μl
<hr/>	
Total	10 μl

### オリゴ DNA 配列

*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 5' - CCTAAATCCATTGCCTTTGGCCAGT - 3'

### 3-5-4. 発現させた tRNA<sup>Leu</sup> の解析

発現させた *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15) の 13 位と 15 位にアーケオシンが合成されているか確認するために、total RNA から固相化 DNA プローブ法で tRNA<sup>Leu</sup> のみを回収し、ヌクレオシド分析を行った。また、tRNA<sup>Leu</sup> Wild-type (G13 • G15) の 13 位と 15 位の 2 カ所にアーケオシンが合成されているか確認するため、質量分析を行った。この際、コントロールに KUWA 株で発現させた *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> Wild-type (G13 • G15) を用いた。ヌクレオシド分析は 3-3-7 と質量分析は 1-3-5 と同様の操作で行った。

#### 3-5-4-1. 固相化 DNA プローブ法

それぞれの tRNA<sup>Leu</sup> を発現させた株から 1-3-2, 1-3-3 と同様の操作を行い、RNA 画分 (tRNA+5S rRNA) を回収し、この画分から文献[55]を参考にして固相化 DNA プローブ法 [56]を行った。低温乾燥機(YAMATO DX302)内で Hitrap Streptavidin HP (GE Healthcare) に約 5 A<sub>260</sub>units の DNA プローブを結合させ 71°C に温め、ペリスタポンプ(Pharmacia Biotech)を用いて 500 μl/min の流速で 30 A<sub>260</sub>units の RNA 画分を循環させた。循環させ

ながら温度を 66°C まで下げ、66°C になったところで 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) を 30 分循環させカラムを洗浄した。その後、カラムを 66°C で 30 分温め、あらかじめ 66°C に温めておいた 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) を 10 分循環させ目的の tRNA を溶出させた。溶出画分には、ビオチン化 DNA プローブが混入しているため、ゲル切り出しを行い単一の tRNA を精製した。

#### DNA プローブの配列

プローブは tRNA の 36 位から 14 位に相補的で T<sub>m</sub> が約 68°C になるようにデザインし、3' 末端にビオチンを結合させた。22 位が m<sup>2</sup>G に修飾されていると予想されたので、相補的なヌクレオシドを T とした。

#### *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup>

5' - CTAAATCCATTGCCTTTGGCCAGT - biotin 3'

#### *T. kodakarensis* tRNA<sup>Leu</sup>

5' - CTAAATCCCGTGCCTTTGGCC - biotin 3'

### 3-6. 6 x His-tag *T. acidophilum* ArcTGT を用いた解析

*T. acidophilum* ArcTGT が *T. kodakarensis* の細胞内で機能していることが判ったので、pTK02-tRNA<sup>Leu</sup> の発現システムを利用して 6 x His-tag *T. acidophilum* ArcTGT を発現させ精製し、試験管内でグアニン塩基交換活性並びにマルチサイト特異性の確認を試みた。

pTK02-tRNA<sup>Leu</sup> (G13・G15) は、GDH プロモーター配列を持っているが SD 配列がないため、[*gdh* 遺伝子の上流 200 bp] - [6 x His-tag arcTGT] - [キチナーゼのターミネーター配列] になるようにプラスミドを再構築した。次に、このプラスミドで  $\Delta$ arcTGT 株を形質転換し、60°C で培養することで 6 x His-ArcTGT を発現させた。その後、Ni-NTA カラムを用いて精製し、試験管内でグアニン塩基交換活性を測定した。

#### 3-6-1. 6 x His-ArcTGT の発現

①のプライマーを用いて *T. kodakarensis* Genomic DNA と pTK02-tRNA<sup>Leu</sup> を鋳型に PCR を行った後、In-fusion 反応によって [GDH プロモーター] - [GDH] を pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>

の NdeI と[キチナーゼのターミネーター配列]の間に導入した。次に、②のプライマーを用いて PCR を行い、In-Fusion 反応によってプラスミド(pTK02-6 x His-tag ArcTGT)を構築した(図 3-6)。ArcTGT を精製した後に 6 x His-tag を切断できるように tag と *arcTGT* 遺伝子の間に HRV3C プロテアーゼ切断サイトを導入した。プラスミドの構築は、3-3-2 と同様の操作で行った。

このプラスミドを用いて 3-5-2 と同様の操作を行い、 $\Delta$ *arcTGT* 株を形質転換し、60°C で培養することで 6 x His-ArcTGT を発現させた。

使用したプライマー①

*gdh* 遺伝子

Forward primer : *gdh* F,

5' - AACCACTTCCATATGTTTTGTTCAAACAGACTGTTTTCCA - 3'

Reverse primer : *gdh* R,

5' - AGAAGAGAGGGGTCATCACTTCTTCACCCATCCGCG - 3'

pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>

Forward primer : pTK02-tRNA<sup>Leu</sup> F,

5' - GCGGCCGCTCGAGCATGCAT - 3'

Reverse primer : pTK02-tRNA<sup>Leu</sup> R,

5' - CATATGGAAGTGGTTATCTTCGAG - 3'

使用したプライマー②

Forward primer : 6 x His-tag ArcTGT F,

5' - AATGAGGTGGTATGAATGCACCATCACCATCACCATCTTGAAGTCCTCT  
TTCAGGGACCAAGATAGAGGAAAGGGACGGCC - 3'

Reverse primer : 6 x His-tag ArcTGT R,

5' - AGAAGAGAGGGGTCATTACTATTTCTCTGATTGATCTCTGCC - 3'

pTK02-tRNA<sup>Leu</sup>

Forward primer : pTK02-GDH F,

5' - TGACCCCTCTCTTCCTCTTTT - 3'

Reverse primer : pTK02-GDH R,

5' - TCATACCACCTCATTCGGTAATC - 3'

(緑色 : 6 x His-tag, 青色 : HRV3C プロテアーゼ切断サイト )

下線は、In-Fusion 反応に必要な配列である。

### 3-6-2. 6 x His-ArcTGT の精製

培養した菌体 1 g を EDTA-free protease inhibitor (Thermo Scientific)を含む Buffer J (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol, 20 mM imidazole)に懸濁し、氷上で超音波破碎機(model VCX-500, Sonics and Materials Inc, USA)を用いて破碎した後、16,000 g, 4°C, 15 分遠心した。上清を 0.45 µm の minisart シリンジフィルター(Sartorius Stedim Biotech)に通して不純物を除き、Ni-NTA Superflow Cartridge (5 ml, Qiagen)にアプライした。25 ml の Buffer J でカラムを洗浄し、Buffer J : Buffer K (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol, 500 mM imidazole) = 9 : 1 の溶液 10 ml で結合していたタンパク質を溶出した。12.5% SDS-PAGE で 6 x His-tag ArcTGT が溶出しているのを確認し、Buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 10 µM ZnCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol)に透析した。その後、HiTrap Heparin-Sepharose に吸着させ、Buffer A と Buffer B (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 M KCl, 10 µM ZnCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol)を用いて直線塩濃度勾配溶出を行い、12.5% SDS-PAGE で確認した後、6 x His-tag ArcTGT 溶出画分を Buffer A で透析した。

### 3-6-3. ウェスタンブロッティング解析

HiTrap Heparin-Sepharose で精製し SDS-PAGE を行ったところ、予想される位置にバンドが確認でき、高純度で 6 x His-tag ArcTGT が精製できていると考えられた。本当にこのバンドが 6 x His-tag ArcTGT に由来するものなのか確認するため、抗 His 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

上記で精製したサンプルを TCA 沈殿で濃縮し 12.5% SDS-PAGE を行い、セミドライ式エレクトロブロッターを用いて 50 V, 100 mA, 110 分泳動した。その後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、メンブレンを Blocking One で 1.5 時間振とうさせブロッキ

ングした。次いで、2 ml PBST と 1  $\mu$ l Anti-His Antibody (GE Healthcare code : 27471001) の混合溶液で 30 分、室温で振とうし、PBST で 3 回洗浄後、10 ml PBST と 1  $\mu$ l ECL Anti-mouse IgG, HRP-Linked F(ab')<sub>2</sub> Fragment sheep (GE Healthcare, code : NA9310-1ML) の混合溶液で 30 分、室温で振とうした。PBST で洗浄後 3 回洗浄後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, code : WBKLS0500) と ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare)を用いて検出した。

### 3-7. 結果

#### 3-7-1. $\Delta arcTGT$ 株の構築

選択マーカーとしてウラシルを利用してシングルクロスオーバーの相同組み換えで KUWA 株の *arcTGT* 遺伝子を破壊した。この方法を用いることで再度ウラシルをマーカーとして利用出来る。遺伝子が破壊できたことを PCR と DNA シーケンシングで確認した。PCR の結果(図 3-1B)、KUWA 株と比較して *arcTGT* 遺伝子(約 1700 bp)の増幅が見られず、相同領域の断片が小さくなっていることから *arcTGT* 遺伝子が破壊されたと考えた。

そこでこの株を大量培養し tRNA 混合物を回収したところ、生育速度や菌体量、tRNA 混合物の回収量とも野生株と遜色なかった。しかし、図 3-7A に示すように 85°C で培養した KUWA 株の tRNA 混合物ではアーケオシンが検出されたが(図 3-7A 左)、破壊株ではアーケオシンに相当するピークが消失していた(図 3-7A 右)。

以上の PCR, DNA シーケンシング, ヌクレオシド分析の結果より、 $\Delta arcTGT$  株が作成できたと判断した。

#### 3-7-2. KTA1493株の構築

$\Delta arcTGT$  株の *chiA* 遺伝子部分に Ta1493 遺伝子を導入するため、再びウラシルを選択マーカーとしてダブルクロスオーバー相同組み換えを行い、DNA シーケンシングで KTA1493株が構築されたことを確認した。この株を 60°C と 85°C で大量に培養したところ 60°C 培養では生育速度がとても遅く、0.7 A<sub>660</sub> まで約 65 時間を要したが、回収した菌体と RNA の量にそれほど差はなかった。実際に 60°C で培養した KTA1493 株で Ta1493

遺伝子産物が発現されアーケオシン合成に関与しているか、ウエスタンブロッティングとヌクレオシド分析で確認した。

抗 Ta1493 抗体は、大腸菌で発現し不溶化した Ta1493 遺伝子産物を 6 M guanidine – HCl と urea で処理したサンプルを抗原として調製した。もともと可溶化しておらず guanidine と urea で変性させたためか、調製した抗 Ta1493 抗体の力価は他の修飾酵素由来のものと比較して低かった。しかし、ウエスタンブロッティングを行うのには問題なかったため、60°Cと 85°C培養の *ΔarcTGT* 株と KTA1493 株の細胞抽出液で解析した(図 3-7B)。その結果、60°C培養の KTA1493 株では Ta1493 遺伝子産物に由来するバンドを検出できたが、*ΔarcTGT*株ではバンドを確認できなかった。また、85°C培養では KTA1493 株でもバンドを検出できなかった。これは、85°Cで培養することで Ta1493 遺伝子産物の変性し分解されたと思われる。これらの結果より、Ta1493 遺伝子産物は、60°C培養で発現することが判った。これは *T. acidophilum* の至適生育温度が 56°Cであるのと一致している[4]。

60°C培養の KTA1493 株の tRNA 混合物をヌクレオシド分析したところ、KUWA 株に比べてかなり少ないもののアーケオシンが合成されていることが確認できた。しかし、この株を 85°Cで培養するとアーケオシンに相当するピークが検出できなかった。(図 3-7C, D) これらの結果は、ウエスタンブロッティングの結果と相関があり、Ta1493 遺伝子産物は 60°C培養で発現され、アーケオシン合成に関与していることが判った。つまり、Ta1493 は *arcTGT* 遺伝子であると言える。

さらに、preQ<sub>0</sub>のピークが検出されなかったことから、*T. acidophilum* ArcTGT によるグアニン塩基交換反応はアーケオシン合成の律速であるように思われる。

### 3-7-3. *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> の発現と回収

*T. acidophilum* ArcTGT (Ta1493 遺伝子産物)が *T. kodakarensis* の細胞内で発現し機能することが判ったので、次にマルチサイト特異性を確認するため 4 種類の *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> (Wild-type (G13 • G15), A13 • G15, G13 • A15, A13 • A15)を発現させるプラスミドを構築した。今回は、選択マーカーとしてアグマチンを利用するため、プラスミドにアグマチン生合成経路遺伝子 *pdaD* がコードされている(図 3-4)。それぞれの tRNA に対応したプラスミドで KTA1493 株を形質転換し 60°Cで培養したところ、KTA1493 と同じ



生育をみせ回収した菌体量と RNA 量もほぼ同じであった。

60°C培養で tRNA<sup>Leu</sup>が発現されているかノーザンハイブリダイゼーションで確認するため、プローブの配列は、tRNA<sup>Leu</sup>の G36-A16 と相補になるようにデザインした(図 3-8A)。 *T. acidophilum* と *T. kodakarensis* の tRNA<sup>Leu</sup>の配列はかなり似ているが、幸いにもこのプローブは *T. acidophilum* の tRNA<sup>Leu</sup> とのみハイブリダイズした。図 3-8B に示すように、tRNA の種類によって発現量は多少異なるものの全ての tRNA が発現していることを確認できた。

発現させた tRNA<sup>Leu</sup>は、固相化 DNA プローブ法で回収した。tRNA<sup>Cys</sup>の時よりも全ての温度を 1°C 上げて行った。30 A<sub>260</sub>units の total RNA から以下の量の tRNA<sup>Leu</sup>を回収できた。固相化 DNA プローブ法では、tRNA<sup>Leu</sup>を回収する時に少量のプローブも溶出してしまうため、この操作を数回繰り返し行い、ゲル切り出しによって単一な tRNA を調製した(図 3-8C)。

tRNA <sup>Leu</sup> の種類	A <sub>260</sub> unit
Wild-type (G13・G15)	0.75
A13・G15	0.50
G13・A15	0.20
A13・A15	0.20

#### 3-7-4. G<sup>+</sup>13 形成の解析

3-7-3 で調製した 4 種類の tRNA<sup>Leu</sup>のヌクレオシド分析をしたところ、アーケオシンが Wild-type (G13・G15), A13・G15, G13・A15 の 3 つの tRNA で合成されおり、A13・A15 の tRNA では合成されていなかった(図 3-8D)。この結果は、アーケオシンが 13 位と 15 位に合成されていることを示している。

次に、KTA1493 株で発現させた Wild-type の tRNA<sup>Leu</sup>でアーケオシンがどの位置に合成されているか MALDI-MS で確認した。この実験では、コントロールとして KUWA 株で発現させた Wild-type の tRNA<sup>Leu</sup>を用意した。

コントロールの tRNA<sup>Leu</sup>を RNaseA で処理すると矢印で示した位置で切断され、生じ

た断片の質量を分析し、さらに検出されたピークを MSMS で解析することで配列と修飾ヌクレオシドの位置を決定した。図 3-9A は質量分析で得られた結果の一部であり質量電荷比が 1600-1800 の範囲を表している。この範囲では、一番高いピークとして  $m/z = 1713.2$  を検出でき、このピークを MSMS で解析すると  $y_3, y_4, c_3, c_4$  の値より  $GAG^+ACp$  の配列をしていることが判った(図 3-9B)。また  $m/z = 1703.3, m/z = 1672.3$  も MSMS の解析により、それぞれ  $AGm^1GGUp$  (アンチコドンループ),  $GAGACp$  (G15 が未修飾)であることが判った。この結果より、KUWA 株で発現させた Wild-type の  $tRNA^{Leu}$  では、15 位にのみアーケオシンが合成されていることが判った。これは、*T. kodakarensis* ArcTGT のグアニン塩基交換活性の結果と一致している(2-8-5, 図 2-1C)。

一方、KTA1493 株で発現させた Wild-type の  $tRNA^{Leu}$  を RNaseA で処理し、質量分析を行ったところ図 3-9C の結果になり、 $m/z = 1754.3$  の新しい質量を検出した。この質量電荷比は、2 つのアーケオシンを含んだ  $GAGACp$  の配列に相当し、MSMS で解析すると予想通り  $G^+AG^+ACp$  の配列であり、アーケオシンが 13 位と 15 位の 2 カ所の合成されていることが判った(図 3-9D)。これまでの実験結果より、*T. acidophilum* ArcTGT はマルチサイト特異性を持っており、 $tRNA^{Leu}$  の 13 位と 15 位のアーケオシン合成に関与していることが判明した。

また、 $m/z = 1713.2$  は 1 つのアーケオシンを含む断片の質量に相当し、これを MSMS で解析したところ  $G^+AGACp$  と  $GAG^+ACp$  の 2 つの断片が存在しており(図 3-9E)、KTA1493 株で発現させた ArcTGT には 13 位と 15 位に作用する順番がないと考えられた。今回は MALDI-MS で解析しているため、質量が同じ断片が 1 つのピークとして検出された。この結果は、*T. acidophilum* S30 によるグアニン塩基交換活性の結果と相関がある(2-8-1, 図 2-1B)。

### 3-7-5. KTA1493 株における他の $tRNA$ の分析

*T. kodakarensis* にも G13, G15 を持つ  $tRNA^{Leu}_{UAG}$  がある。そこで 60°C 培養の KTA1493 株で、この  $tRNA$  の 13 位と 15 位がアーケオシンに修飾されているのか確認した。

固相化 DNA プローブ法で使用した DNA プローブは、 $tRNA^{Leu}_{UAG}$  の G36-G18 と相補するようにデザインしたが、*T. kodakarensis* は  $tRNA^{Leu}_{UAG}$  とアンチコドン 1 文字目しか違わない  $tRNA^{Leu}_{CAG}$  を持っており、これらを分けるのは難しい(図 3-10A)。そのため、今回はこれら 2 つの  $tRNA^{Leu}$  を混ぜて回収した(図 3-10B)。これらの  $tRNA^{Leu}$  の質量分析

の結果、図 3-10C, D に示すように予想に反して GAGCp ( $m/z = 1343.2$ )の質量しか検出されず、13 位と 15 位とも未修飾であることが判った。しかし、60°Cで培養した KTA1493 株の tRNA 混合物では、少量のアーケオシンが合成されているため(図 3-9)、*T. acidophilum* ArcTGT の酵素活性が弱く、他の tRNA に優先的にアーケオシンが合成されたと思われる。また、60°Cで培養しているため *T. acidophilum* よりも G-C 含有量の多い *T. kodakarensis* の tRNA<sup>Leu</sup> の構造を *T. acidophilum* ArcTGT が  $\lambda$ 型に変形させにくいのかもしれない。

### 3-7-6. 6 x His-tag *T. acidophilum* ArcTGT 精製方法の検討

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)の下流に 6 x His-tag *T. acidophilum* ArcTGT をコードしたタンパク質発現用プラスミドを pTK02 を元に構築した。このプラスミドで KUWA の  $\Delta$ arcTGT 株を形質転換し、60°C培養を行うことで 6 x His-tag ArcTGT を発現させた。次いで、Ni-NTA Superflow と HiTrap Heparin-Sepharose カラムを用いて精製し 12.5% SDS-PAGE で確認したところ、ArcTGT の分子量(約 72 kDa)と一致する大きさ付近にバンドを確認できたため、6 x His-tag ArcTGT が高純度で精製できたと思われた(図 3-11A)。

そこで 6 x His-tag ArcTGT が回収できているか確認するため、Ni-NTA カラムと Heparin カラムの溶出画分に対する抗 His 抗体の反応をウエスタンブロッティングで確認した。その結果図 3-11A に示すように、6 x His-tag ArcTGT (約 72 kDa)だと思われたバンドは抗体と全く反応しておらず、Ni-NTA 溶出画分のレーンで 72 kDa よりも低い位置にバンドを検出できた。

次に、これらの溶出画分にグアニン塩基交換活性があるか確認するため、2-7 と同様の操作でゲルアッセイを行ったところ Ni-NTA 画分と Wild-type の tRNA<sup>Leu</sup>を反応させた系でのみ交換活性が見られた(図 3-11B)。この実験では  $\Delta$ arcTGT 株でタンパク質発現を行ったため、この酵素活性は 6 x His-tag *T. acidophilum* ArcTGT によるものであると考えられる。また、ウエスタンブロッティングの結果と合わせて、Heparin カラムの溶出画分には ArcTGT が存在しないことが判った。

KTA1493 の細胞内で *T. acidophilum* ArcTGT は全長で存在していることが判っている

ため(図 3-9)、短くなった 6 x His-tag ArcTGT が検出されたのは、おそらく菌体を超音波破碎した後にプロテアーゼによって切断されたためだと思われる。今後、さらなる精製方法の検討が必要である。

### 3-8. 考察

この実験で *T. acidophilum* ArcTGT は、15 位だけでなく 13 位にも作用するマルチサイト特異性を持っており、13 位と 15 位のアーケオシン形成に関与していることが判明した。また、*T. acidophilum* の ArcTGT は、マルチサイト特異性を有しているが tRNA<sup>Cys</sup> では 13 位に作用しないため、13 位と 15 位の G を位置特異的にかつ配列非特異的に認識しているのではなく、これまでに報告されていない性質を持っているのかもしれない。もしくは、*T. acidophilum* ArcTGT と tRNA<sup>Leu</sup> のコンビネーションの時にしか起きない反応なのかもしれない。ArcTGT のマルチサイト特異性のメカニズムの解明と ArcTGT の試験管内調製のさらなる研究が必要である。

ArcS は、*T. acidophilum* ではなく *T. kodakarensis* のものが機能しており、*T. kodakarensis* の ArcS も 13 位と 15 位の両方に作用していることが判った。ArcS による tRNA 認識メカニズムは、これまでに報告されていないが、ArcS も幅広い基質認識機構を持っていると予想される。ArcS のアミノ酸配列を見てみると、ArcS は Zinc 結合サイト、触媒ドメイン、C2 ドメイン、C3(PUA)ドメインから構成されており、触媒ドメインの位置と N 末端と C1 ドメインの長さが ArcTGT と異なっている[22] (図 3-12)。ArcS では、ArcTGT における N 末端の 70-130 アミノ酸が欠けており、ArcTGT における C1 ドメインが ArcS では触媒ドメインに置き換わっている。また、*P. horikoshii* ArcTGT で tRNA の D-loop と相互作用している Asp95, Ser96, Phe99 などいくつかのアミノ酸残基は ArcS で見られない。このような ArcTGT との違いが ArcS の幅広い基質認識を生み出しているのかもしれない。

本研究では、*T. acidophilum* ArcTGT のマルチサイト特異性にもみ焦点を絞り実験を行ってきたため、*T. kodakarensis* の  $\Delta arcTGT$  株の phenotype やアーケオシンの機能について詳細を調べなかった。しかし、この実験条件では  $\Delta arcTGT$  株の生育速度に変化は見られず、*H. volcanii*  $\Delta arcTGT$  株の phenotype と一致していたため[60]、 $\Delta arcTGT$  株では tRNA 中のアーケオシンが消失しても他の修飾が補うことで、tRNA の機能を維持しているの

だと思われる。

また、アーケオシンの機能については、バイオインフォマティクスで検証されており、L字型構造が解かれている酵母の tRNA<sup>Phe</sup>において G15 は C48 と塩基対を形成し、G15 の 7 位の窒素原子が Mg<sup>2+</sup>結合サイトを構成していることが報告されているが[76-78]、15 位がアーケオシンに修飾された場合は Mg<sup>2+</sup>結合サイトが破壊され、アーケオシンのポジティブチャージが Mg<sup>2+</sup>の役割を果たし、G<sup>+</sup>15-C48 の塩基対を強化していると推測されている[40]。tRNA<sup>Leu</sup>はバリアブル領域が長く D-arm とバリアブル領域との相互作用が tRNA<sup>Phe</sup>と異なるうえ(図 3-13A,B)、tRNA<sup>Leu</sup>の構造が解かれていないため G<sup>+</sup>15 と G<sup>+</sup>13 の塩基対形成を議論できない。しかし幸いにも、G13 と G15 を持つ *Thermus thermophilus* tRNA<sup>ser</sup>の構造が解かれているため、これに G<sup>+</sup>13 と G<sup>+</sup>15 を置いてみると G<sup>+</sup>13 は A22 と G9、G<sup>+</sup>15 は C48 と D20a と 3 塩基対合をとることになる[81]。*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup>では、G9 は s<sup>4</sup>U9 であり D20a は A20 であるため実際の塩基対ではないが、G<sup>+</sup>13 と G<sup>+</sup>15 の 7-formamidino 基の位置は予測できる。図 3-13C, D に示すように、G<sup>+</sup>13 と G<sup>+</sup>15 の 7-formamidino 基は、三塩基対合を妨げることなくリン酸基と相互作用していると思われる。従って *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> の 13 位と 15 位のアーケオシンは、三塩基対合の障害にならず、G<sup>+</sup>15-C48-A20, A14-s<sup>4</sup>U8-A21, G<sup>+</sup>13-A22-s<sup>4</sup>U9 のスタッキングを強めていると考えられる。

近年、古細菌の遺伝子操作技術が進歩し、複数の古細菌で遺伝子破壊株が作製できるようになっており、実際に *H. volcanii* の遺伝子操作によって *arcTGT* 遺伝子を確認した実験が発表されている[60, 64, 65, 68, 69, 72, 79, 80]。しかし、*T. acidophilum* の遺伝子操作は確立されていないため、本研究では *T. kodakarensis* を用いて実験した。また、当初は 13 位のアーケオシン合成に *T. acidophilum* の ArcS や tRNA<sup>Leu</sup> の構造変化を誘発する未知の因子が必要かもしれないと考えていたため、複数のマーカーを利用した遺伝子操作ができるように KUWA 株を利用し、大腸菌の代わりとなる古細菌でのヘテロ遺伝子産物発現システムを作製した。この *T. kodakarensis* のシステムは、tRNA 修飾酵素以外の多くのタンパク質で活用することができるだろう。

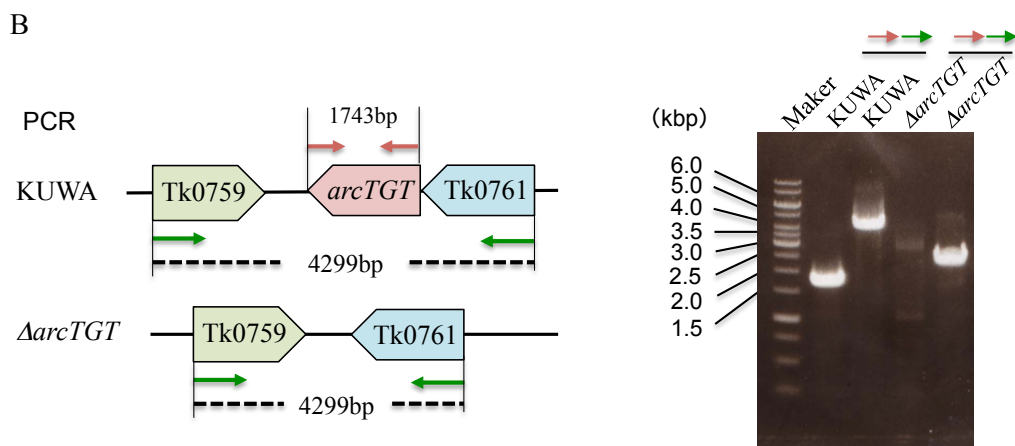
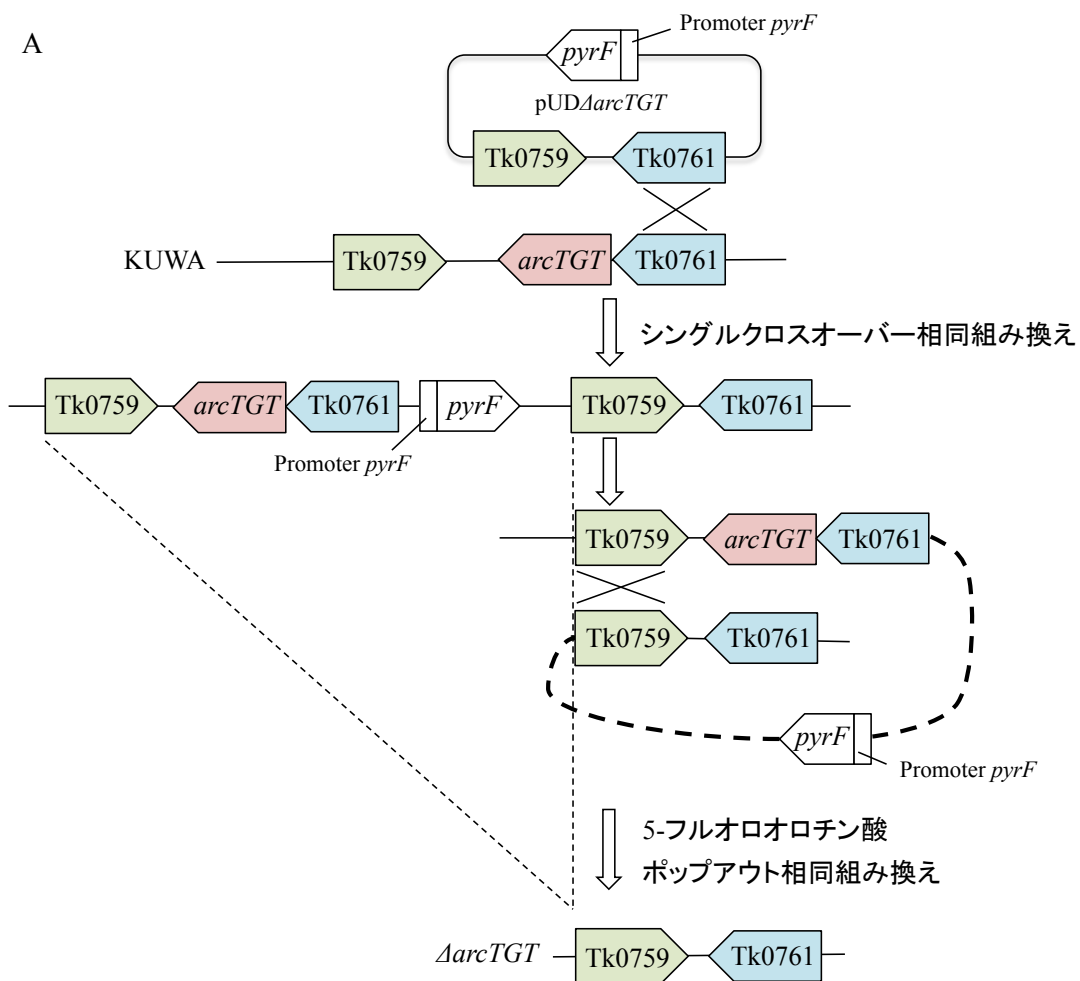


図 3-1. *T. kodakarensis* KUWA  $\Delta arcTGT$  株の作製。(A) 一段階目の相同組み換えでプラスミドがゲノム中に取り込まれる。その後、5-フルオロオロチン酸存在かで培養することで、*pyrF* 遺伝子が欠失する方向に相同組み換えが起こり、その結果  $\Delta arcTGT$  株が作製できる。(B) PCR によって  $\Delta arcTGT$  株が作製できたことを確認した。

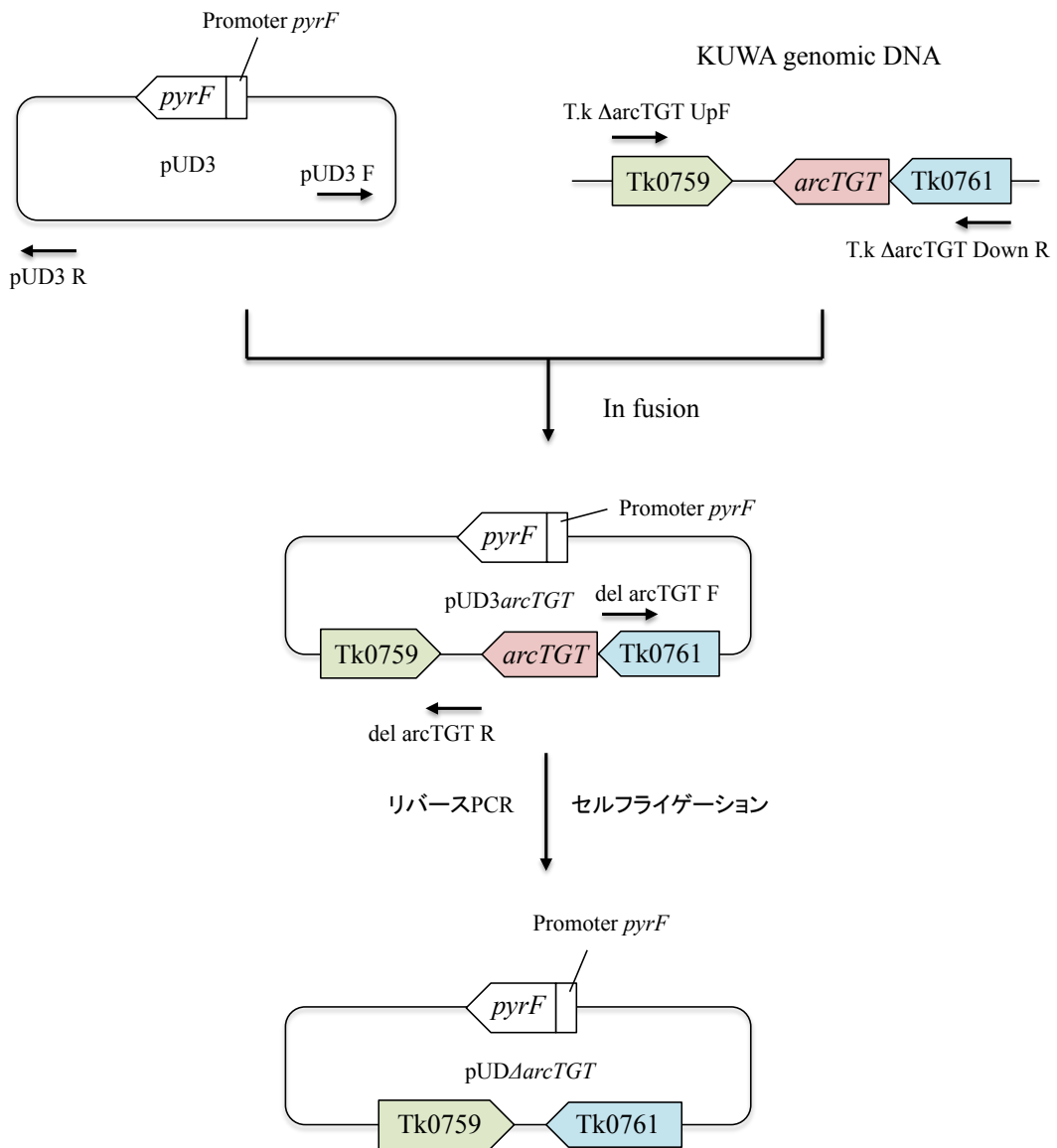


図 3-2. pUD $\Delta$ arcTGT の構築

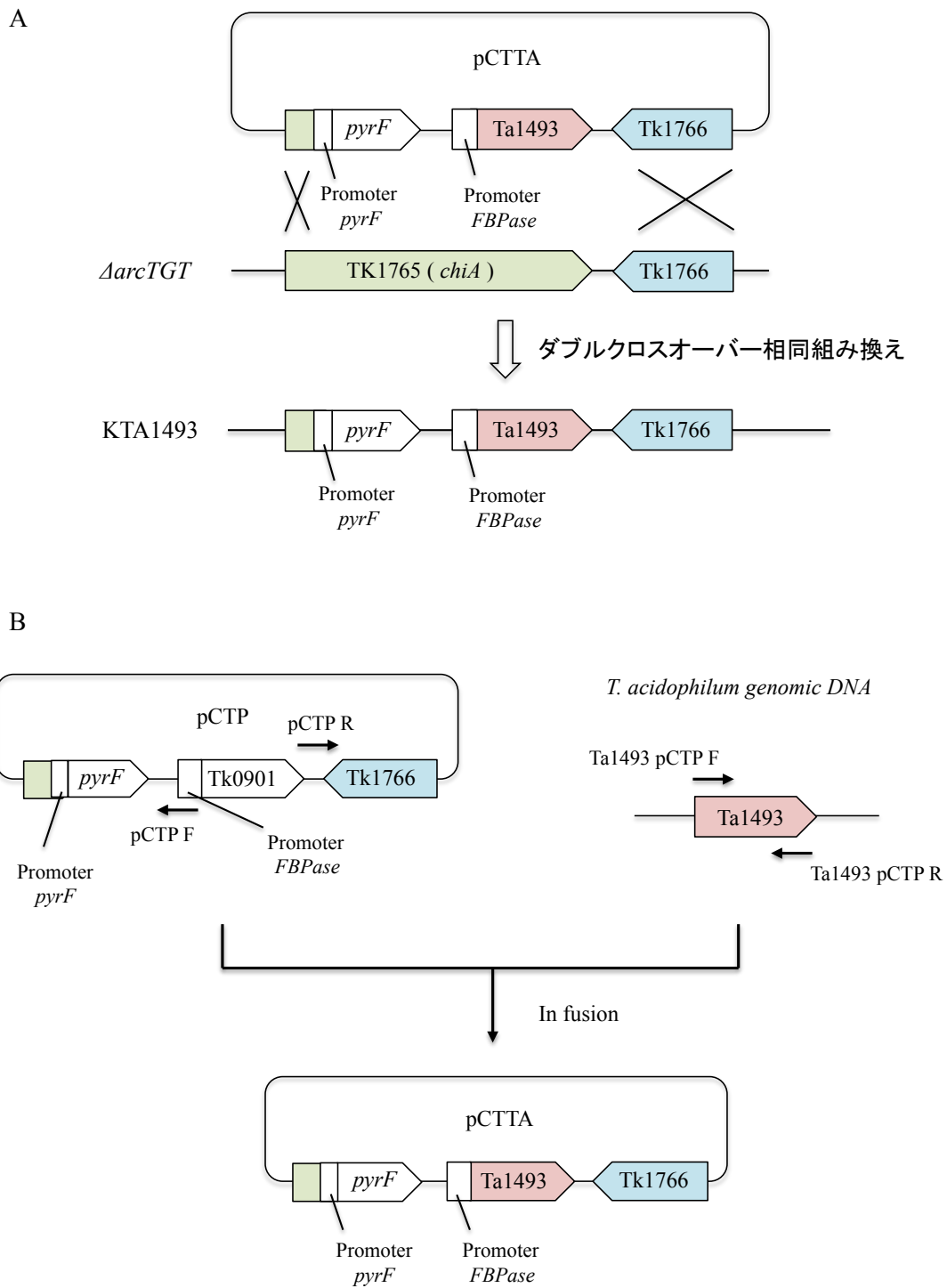


図 3-3. KTA1493 株の作製 (A)  $\Delta arcTGT$  株を宿主として pCTTA を用いて相同組み換えをした。pCTTA は、複製起点がないため細胞内で維持されない。Ta1493 遺伝子産物はピルビン酸ナトリウム存在下で継続的に発現される。(B) pCTTA の構築



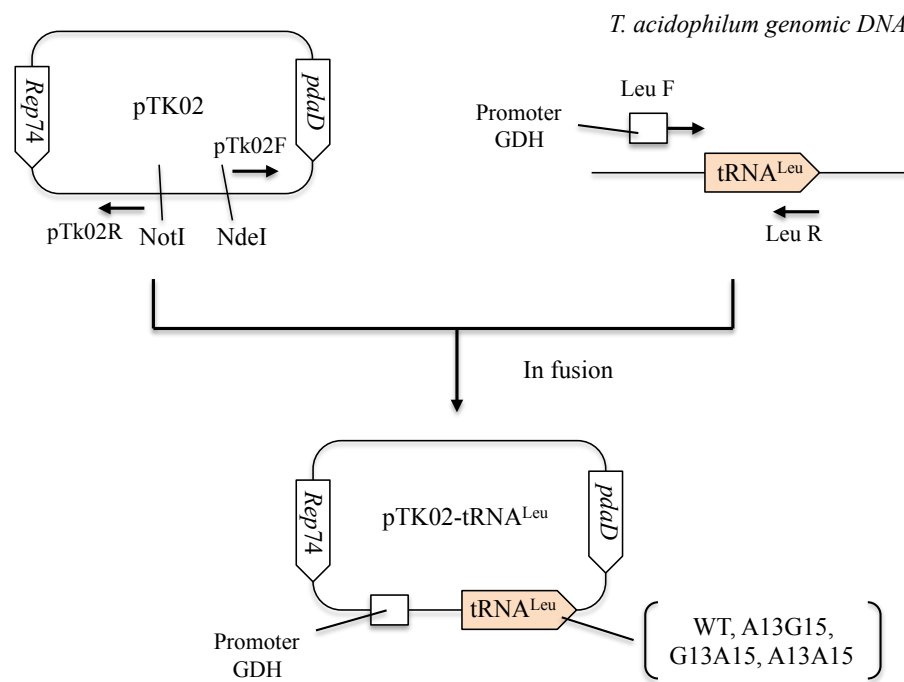


図 3-4 pTK02-tRNA<sup>Leu</sup> の構築

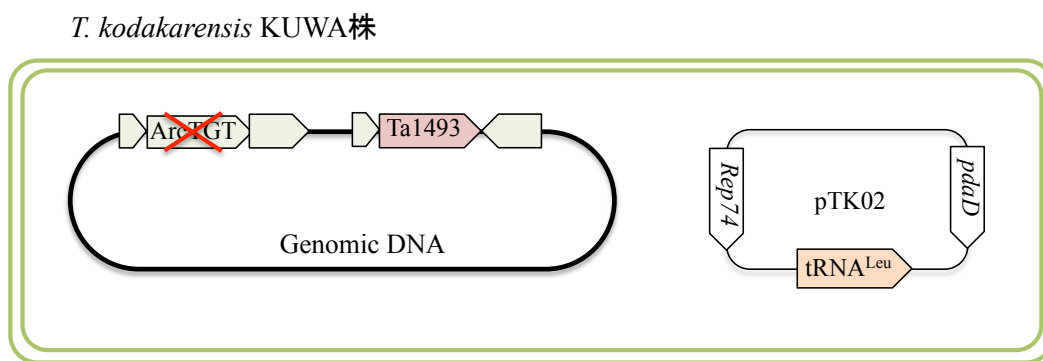


図 3-5. *T. kodakarensis* KUWA 株を用いた最終的な実験系。*T. kodakarensis arcTGT* 遺伝子を破壊し、Ta1493 遺伝子を相補した後に *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> をプラスミドで発現させた。

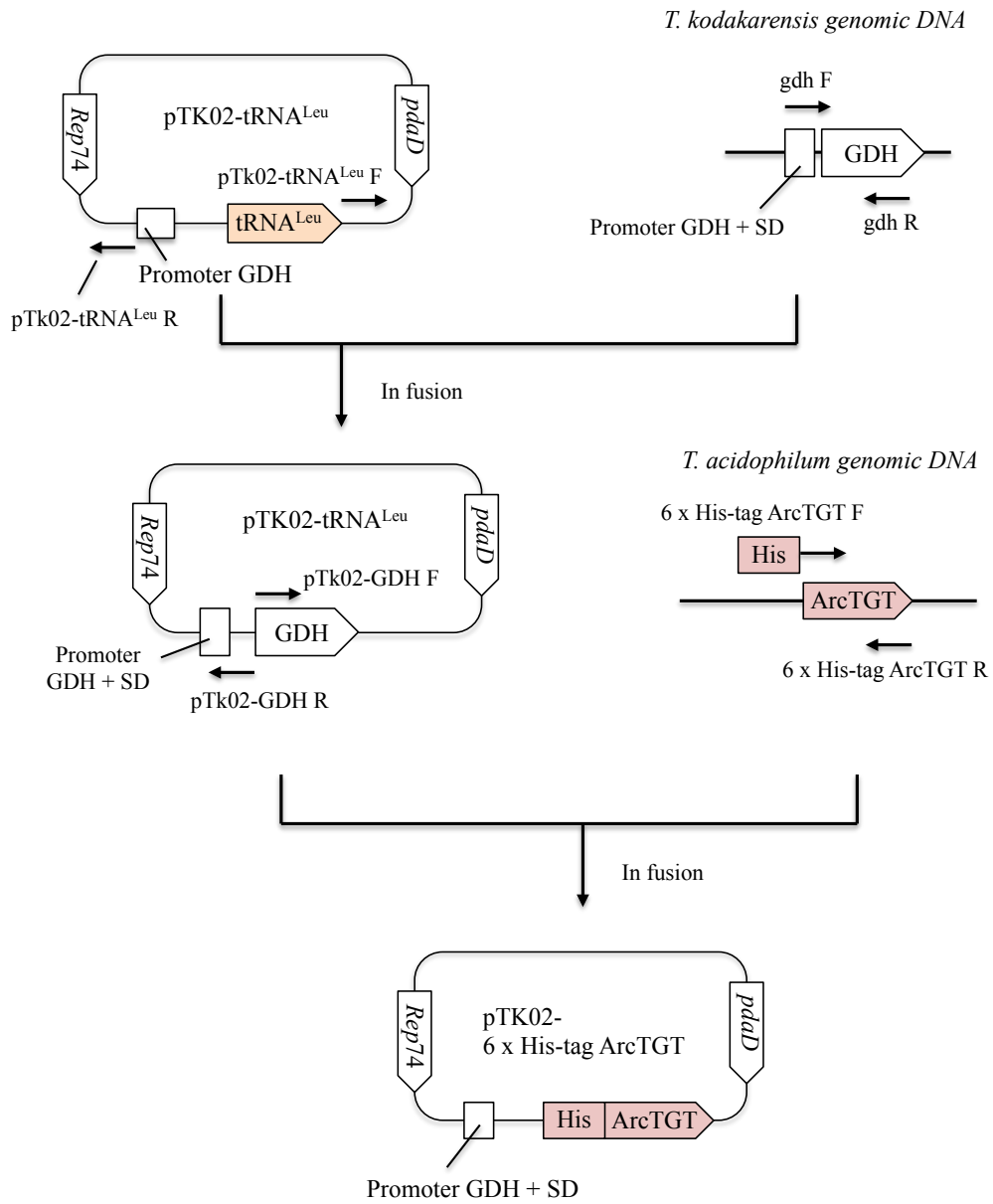


図 3-6. 6 x His-tag ArcTGT 遺伝子産物発現用プラスミド (pTK02-6 x His-tag ArcTGT) の構築

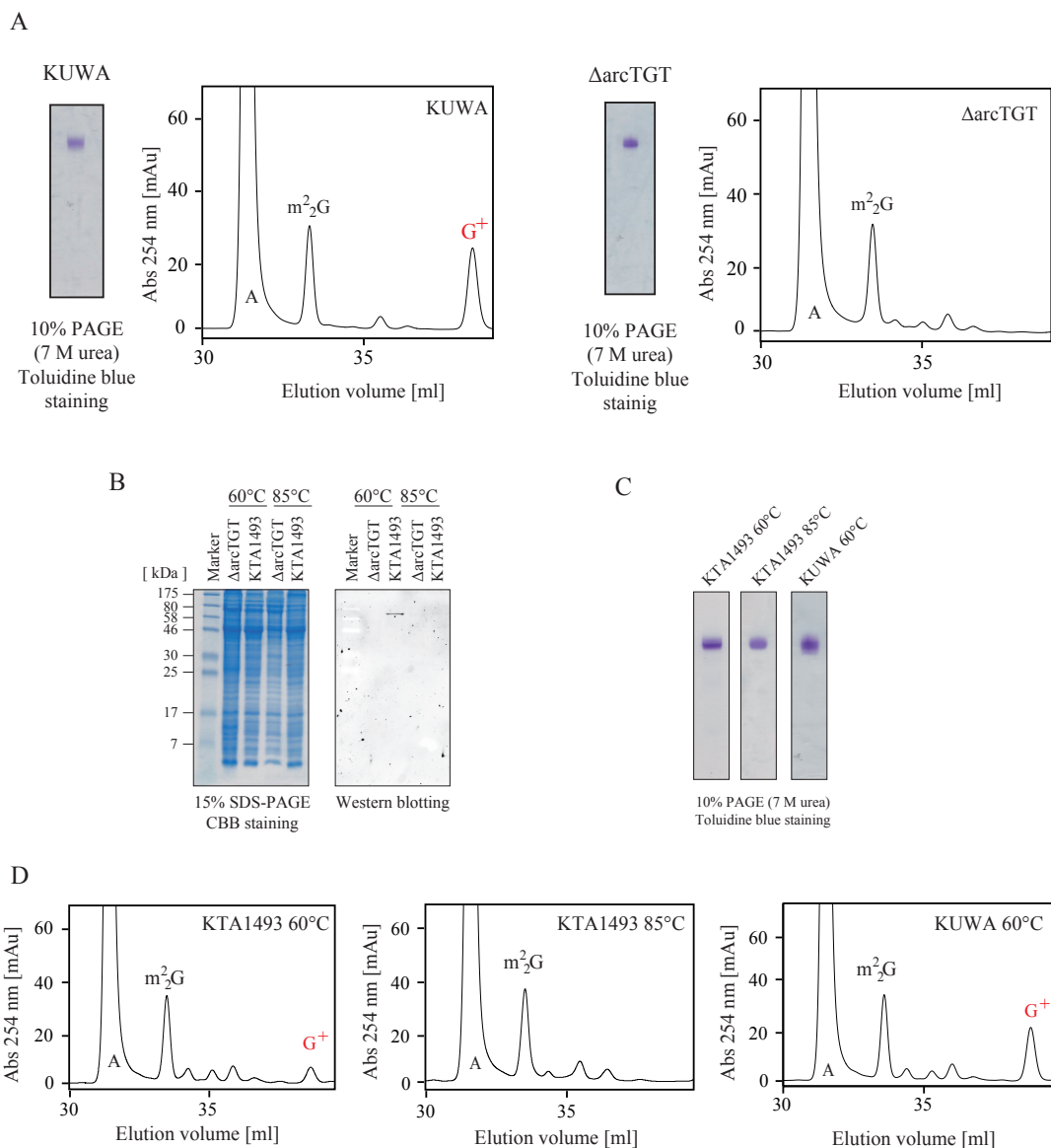


図 3-7. (A) KUWA 株と  $\Delta arcTGT$  株の 85°C 培養における tRNA 混合物 0.2 A<sub>260</sub>units とヌクレオシド分析の結果。 (B)  $\Delta arcTGT$  株と KTA1493 株を 60°C と 85°C で培養した時のウェスタンブロッティングの結果。 (C) 60°C と 85°C 培養における KUWA と KTA1493 の tRNA 混合物 0.2 A<sub>260</sub>units を 10% PAGE (7 M urea) で確認した。 (D) KUWA と KTA1493 の 60°C と 85°C 培養における tRNA 混合物のヌクレオシド分析の結果。

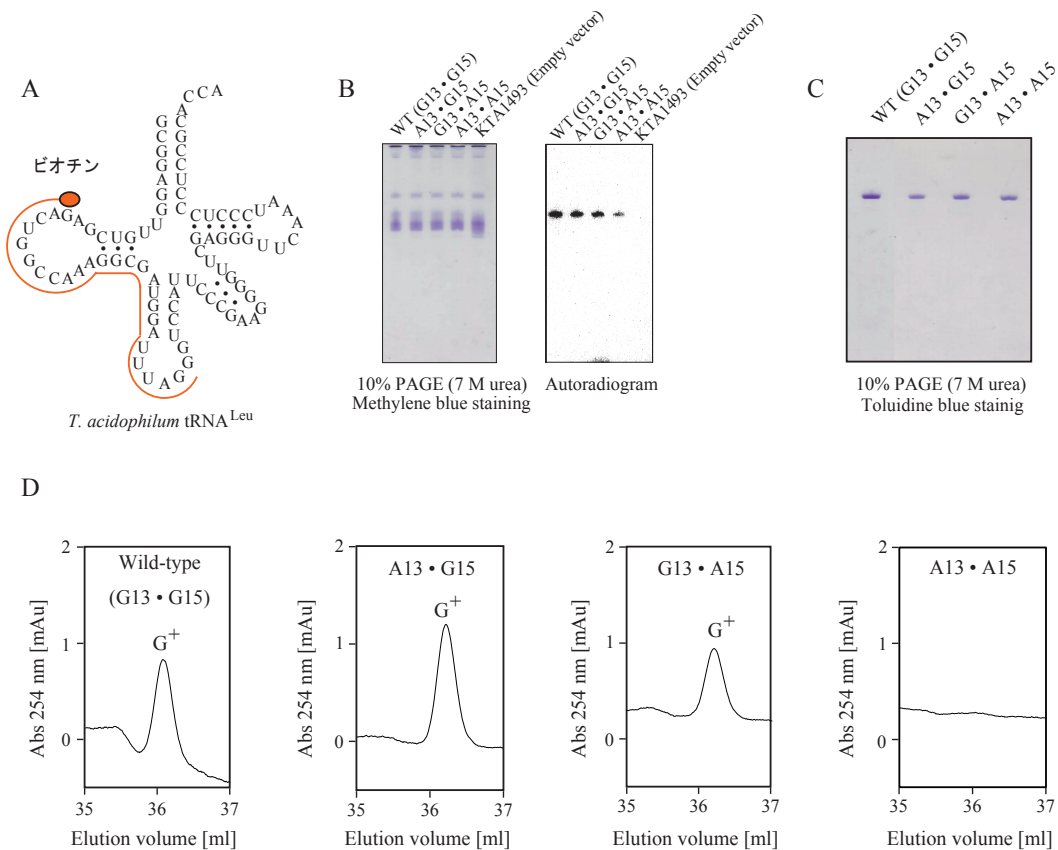


図 3-8. (A) *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> のクローバーリーフ構造。ハイブリダイゼーション用プローブは、G36-A14 と相補するようにデザインした。(B) ノーザンブロッティングの結果。それぞれの tRNA を発現させた KTA1493 株から回収した 0.2 A<sub>260</sub>unit の total RNA で 10% PAGE (7 M urea) を行い(左図)、<sup>32</sup>P で標識したプローブで発現させた tRNA を検出した(右図)。コントロールとして、空の pTK02 で形質転換した KTA1493 株の total RNA を用いた。(C) total RNA から固相化 DNA プローブ法によって単一の 4 種類の tRNA<sup>Leu</sup> を調製し、10% PAGE (7 M urea) で確認した。(D) 精製した 4 種類の tRNA<sup>Leu</sup> にアーケオシンが存在するかヌクレオシド分析で確認した。

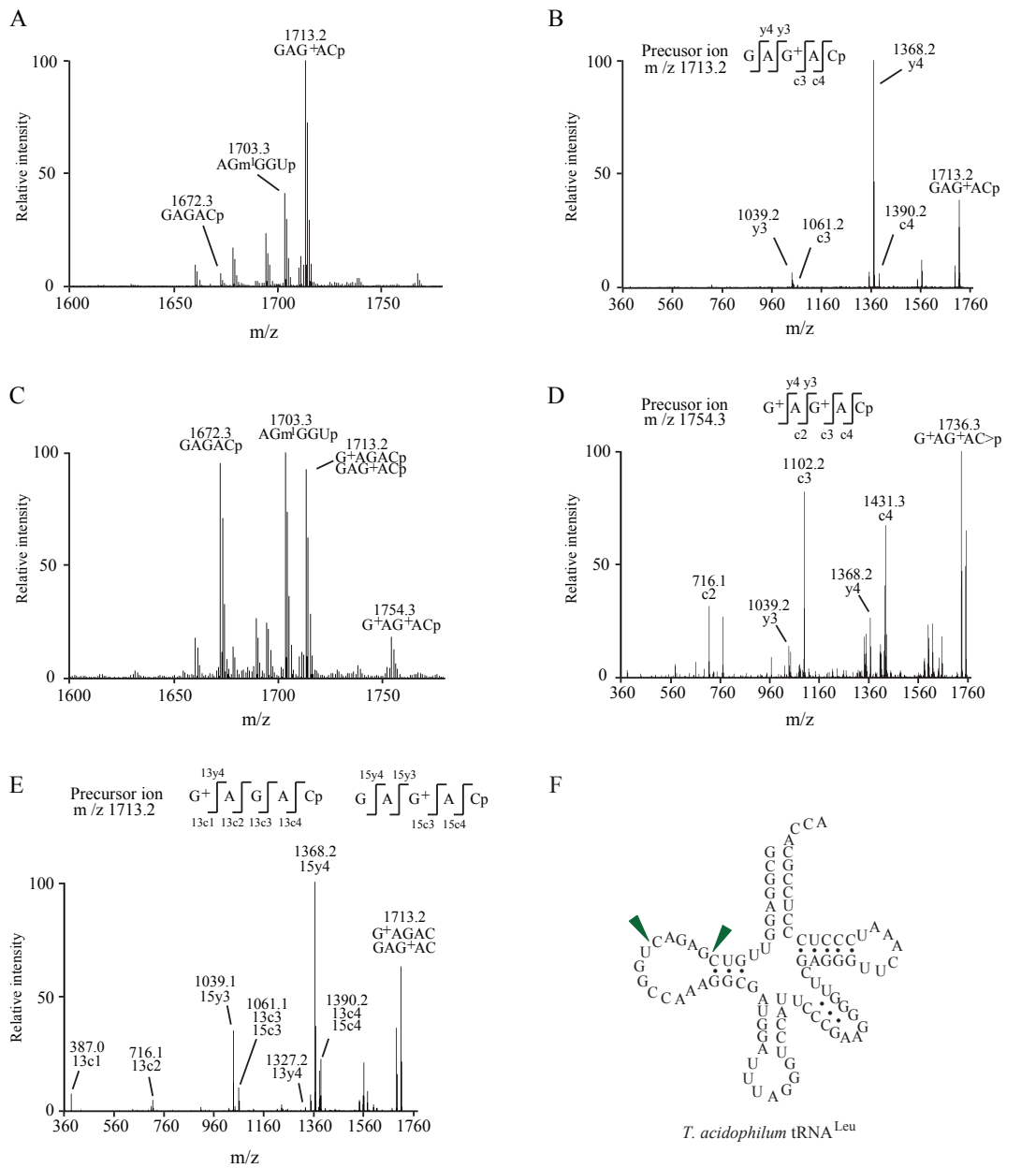


図 3-9. *T. acidophilum* Wild-type (G13 • G15) tRNA<sup>Leu</sup> の MALDI-MS 解析の結果 (A) コントロールとして KUWA 株で発現させた Wild-type tRNA<sup>Leu</sup> を RNaseA で処理し質量分析を行った。(B) (A)で検出した m/z = 1713.2 を MSMS 解析することで配列を決定し GAG<sup>+</sup>ACp であることが判った。(C) KTA1493 株で発現させた Wild-type tRNA<sup>Leu</sup> を RNaseA で処理し質量分析を行った。(D) (C)で検出した m/z = 1754.3 を MSMS で解析することで G<sup>+</sup>AG<sup>+</sup>ACp であることが判った。(E) (C)で検出した m/z = 1713.2 を MSMS で解析し G<sup>+</sup>AGACp と GAG<sup>+</sup>ACp の 2 つの断片が検出された。(F) *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> のクローバーリーフ構造。矢印は RNaseA で切断される位置を示している。

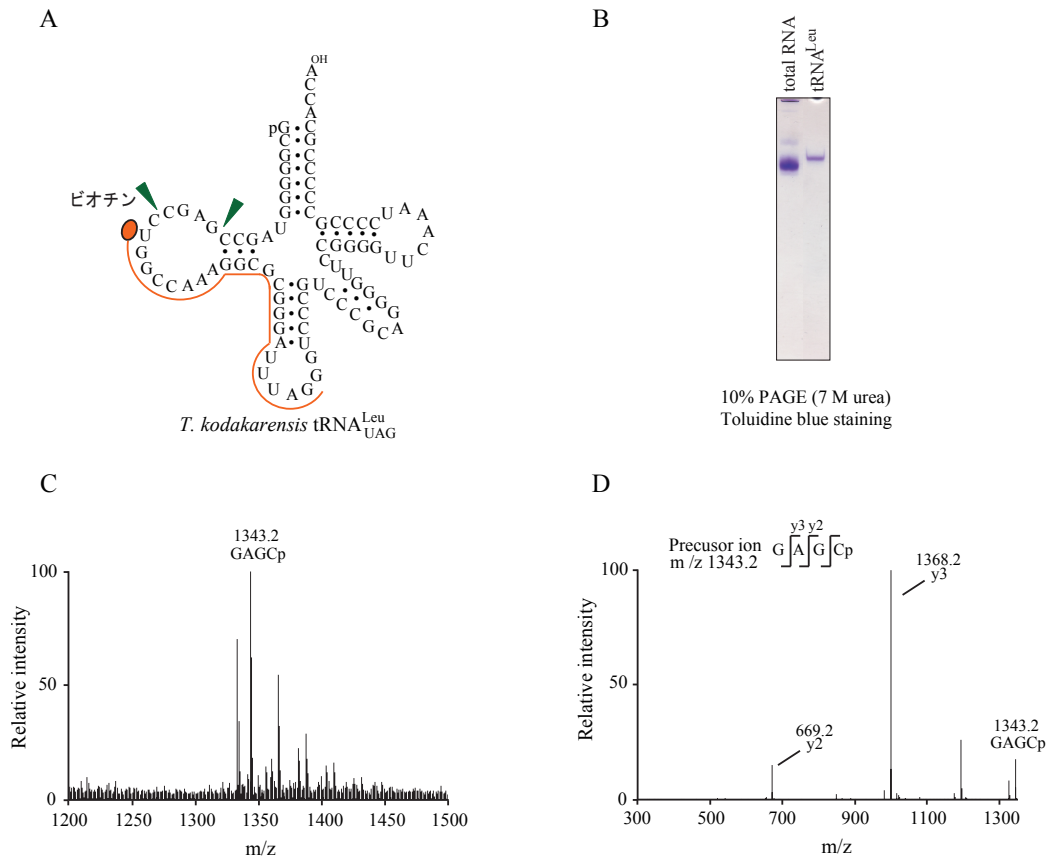


図 3-10. KTA1493 株由来 *T. kodakarensis* tRNA<sup>Leu</sup> の解析 (A) *T. kodakarensis* tRNA<sup>Leu</sup> のクローバーリーフ構造。DNA プローブは、G36-G18 の領域でハイブリダイズするようにデザインした。矢印は RNaseA で切断される位置を示している。(B) *T. kodakarensis* total RNA (左、0.3 A<sub>260</sub>units)と精製した tRNA<sup>Leu</sup>(右、0.02 A<sub>260</sub>units)で 10% PAGE (7 M urea)を行った。(C) 精製した tRNA<sup>Leu</sup>(0.03 A<sub>260</sub>units)を RNaseA で処理し質量分析を行った。(D) (C)で検出した m/z = 1343.2 を MSMS 解析し GAGCp の配列であることを決定した。

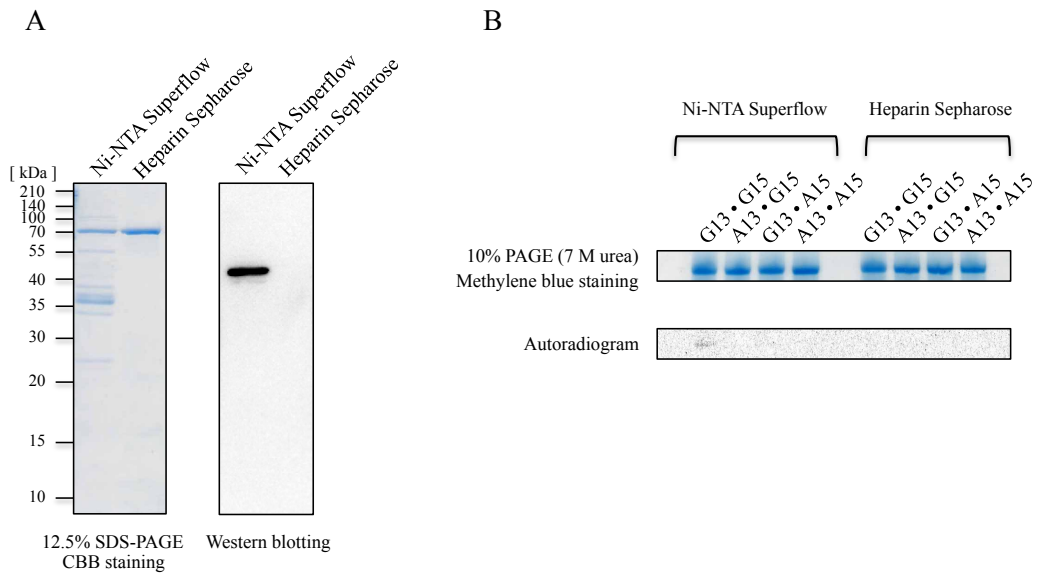


図 3-11. (A) 6 x His-tag ArcTGT を Ni-NTA Superflow と Heparin Sepharose カラムで精製し、12.5% SDS-PAGE で確認した。(B) 精製したサンプルでゲルアッセイを行った結果。

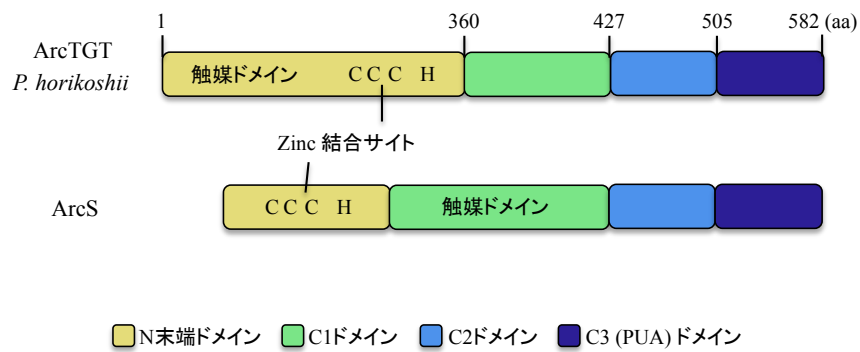


図 3-12. *P. horikoshii* ArcTGT と ArcS のアミノ酸配列の比較

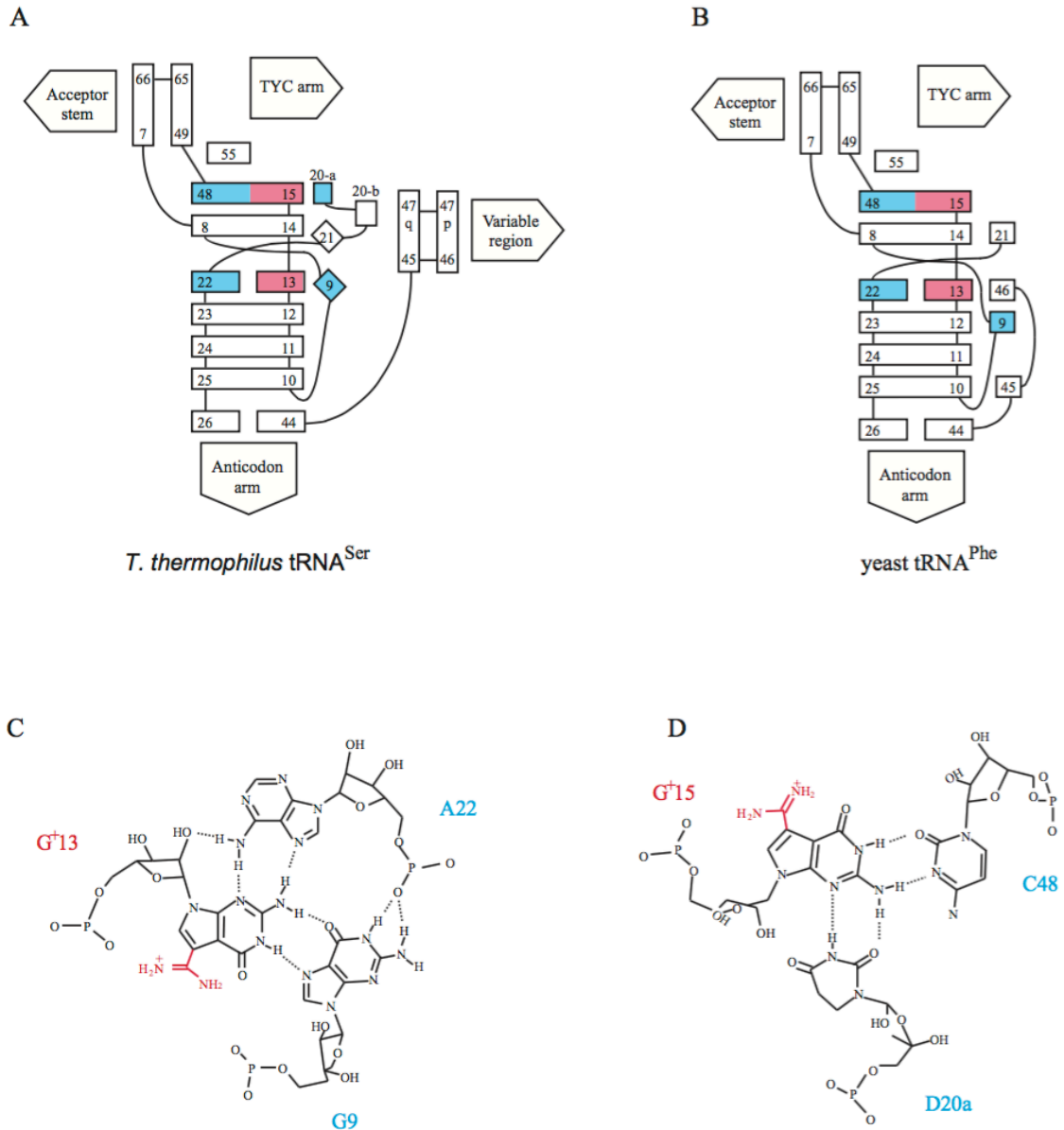


図 3-13. *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> における G<sup>+</sup>13 と G<sup>+</sup>15 の予想される三塩基対合 (A) *T. thermophilus* tRNA<sup>Ser</sup> の三次構造。(B) yeast tRNA<sup>Phe</sup> の三次構造。(C), (D) G<sup>+</sup>13-G9-A22 と G<sup>+</sup>15-D20a-C48 の三塩基対合。G<sup>+</sup>13 と G<sup>+</sup>15 は赤で、G9, A22, D20a, C48 はシアンで表している。



## 結論

好熱好酸性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* ArcTGT に関して以下のことを明らかにした。

- ◎ Ta1493 はアーケオシン tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) 遺伝子である。
- ◎ ArcTGT が 13 位と 15 位のグアニン塩基を交換するのは、tRNA<sup>Leu</sup> の構造的平衡が原因ではないことが示唆された。
- ◎ *T. acidophilum* ArcTGT は、tRNA<sup>Leu</sup> の 13 位と 15 位のアーケオシン合成に関与するマルチサイト特異性を持っていることが判明した。しかし、tRNA<sup>Cys</sup> では 15 位にしか作用しないため、これまで報告されている ArcTGT とは異なるメカニズムで基質を認識していると予想される。
- ◎ *T. acidophilum* の細胞抽出液では 13 位が優先的に塩基交換されるが、KTA1493 株で発現させた tRNA<sup>Leu</sup> を分析すると 13 位と 15 位のアーケオシン合成に順番はないことが明らかになった。また、preQ<sub>0</sub> 塩基が検出されなかったことからグアニン塩基交換反応はアーケオシン合成の律速であると推測される。

## 参考文献

1. Woese, C. R., Kandler, O. and Whwulis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4576-4579.
2. Darland, G.; Brock, T.D.; Samsonoff, W.; Conti, S.F. (1970) A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science*. **170**, 1416–1418.
3. Mayberry-Carson, K.J.; Roth, I.L.; Harris, J.L.; Smith, P.F. (1974) Scanning electron microscopy of *Thermoplasma acidophilum*. *J. Bactriol.* **120**, 1472–1475.
4. Yasuda, M.; Oyaizu, H.; Yamagishi, A.; Oshima T. (1995) Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3482–3485.
5. Stein, D.B.; Sercy, D.G. (1978) Physiologically Important Stabilization of DNA by a Prokaryotic Histone-like Protein. *Science*. **202**, 219–221.
6. DeLange R.J. (1981) A Histone-like Protein (HTa) from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **256**, 900–904.
7. Ruepp, A.; Graml, W.; Santos-Martinez, M.L.; Koretke, K.K.; Volker, C.; Mewes, H.W.; Frishman, D.; Stocker, S.; Lupas, A.N.; Baumeister, W. (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature*. **407**, 508–813.
8. Brandstetter, H.; Kim, J.-S.; Groll, M.; Huber, R. (2001) Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line. *Nature*. **414**, 466–470.
9. Steinbacher, S.; Ditzel, L. (2001) Review: Nucleotide Binding to the *Thermoplasma* Thermosome: Implications for the Functional Cycle of Group II Chaperonins. *J. Struct. Biol.* **135**, 147–156.
10. Noi, K.; Hirai, H.; Hongo, K.; Mizobata, T.; Kawata, Y. (2009) Implications for the Functional Cycle of Group II Chaperonins from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochemistry*. **48**, 9405–9415.
11. Ruschak, A. M.; Religa, T.L.; Breuer, S.; Witt, S.; Kay, L.E. (2010) The proteasome antechamber maintains substrates in an unfolded state. *Nature*. **467**, 868–873.
12. Kilpatrick, M.W.; Walker, R.T. (1981) The nucleotide sequence of the tRNA<sub>M<sup>Met</sup></sub> from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Res.* **9**, 4387–4390.
13. Kuchino, Y.; Ihara, M.; Yabusaki, Y.; Nishimura, S. (1982) Initiator tRNAs from archaebacteria show common unique sequence characteristics. *Nature*. **298**, 684–685.
14. Walker, R.T. (1983) Mycoplasma evolution: A review of the use of ribosomal and transfer

- RNA nucleotide sequences in the determination of phylogenetic relationships. *Yale J. Biol. Med.* **56**, 367–372.
15. Edmonds, C.G.; Crain, P.F.; Gupta, R.; Hashizume, T.; Hocart, C.H.; Kowalak, J.A.; Pomerantz, S.C.; Stetter, K.O.; McCloskey, J.A. (1991) Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria). *J. Bacteriol.* **173**, 3138–3148.
  16. Tomikawa, C.; Ohira, T.; Inoue, Y.; Kawamura, T.; Yamagishi, A.; Suzuki, T.; Hori, H. (2013) Distinct tRNA modifications in the thermo-acidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.* **587**, 3575–3580.
  17. Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., and Pütz, J. (2009) tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **37**, D159-162.
  18. Machnicka, M.A., Milanowska, K., Osman, Oglou, O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K. M., Helm, M., Bujnicki, J.M. and Grosjean, H. (2013) MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res.*, **41**, D262-267.
  19. Gilbert, W. (1986) Origin of life: The RNA world. *Nature.* **319**, 618
  20. Watanabe, M., Matsuo, M., Tanaka, S., Akimoto, H., Asahi, S., Nishimura, S., Katze, J.R., Hashizume, T., Crain, P.F., McCloskey, J.A., and Okada, N. (1997) Biosynthesis of archaeosine, a novel derivative of 7-deazaguanosine specific to archaeal tRNA, proceeds via a pathway involving base replacement on the tRNA polynucleotide chain. *J. Biol. Chem.* **272**, 20146-20151.
  21. Bai, Y., Fox, D.T., Lacy, J.A., Van Lanen, S.G., and Iwata-Reuyl, D. (2000) Hypermodification of tRNA in Thermophilic archaea. Cloning, overexpression, and characterization of tRNA-guanine transglycosylase from *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28731-28738.
  22. Phillips, G., Chikwana, V.M., Maxwell, A., El-Yacoubi, B., Swairjo, M.A., Iwata-Reuyl, D., and de Crécy-Lagard, V. (2010) Discovery and characterization of an amidinotransferase involved in the modification of archaeal tRNA. *J. Biol. Chem.* **285**, 12706-12713.
  23. Phillips, G., and de Crécy-Lagard, V. (2011) Biosynthesis and function of tRNA modifications in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 335-341.
  24. Phillips, G., Swairjo, M.A., Gaston, K.W., Bailly, M., Limbach, P.A., Iwata-Reuyl, D., and de Crécy-Lagard, V. (2012) Diversity of archaeosine synthesis in crenarchaeota. *ACS*

- Chem, Biol.* **7**, 300-305.
25. Gregson, J.M., Crain, P.F., Edmonds, C.G., Gupta, R., Hashizume, T., Phillipson, D.W. and McCloskey, J.A. (1993) Structure of the archaeal transfer RNA nucleoside G\*-15 (2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-7-beta-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide (archaeosine)). *J. Biol. Chem.* **268**, 10076-10086.
  26. Okada, N. and Nishimura, S. (1979) Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 3061-3066.
  27. Okada, N., Noguchi, S., Nishimura, S., Ohgi, T., Goto, T., Crain, P.F. and McCloskey, J.A. (1978) Structure determination of a nucleoside Q precursor isolated from *E. coli* tRNA: 7-(aminomethyl)-7-deazaguanosine. *Nucleic Acids Res.* **5**, 2289-2296.
  28. Slany, R.K., Bösl, M., Crain, P.F., and Kersten, H. (1993) A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry* **32**, 7811-7817.
  29. Miles, Z.D., McCarty, R.M., Molnar, G., and Bandarian, V. (2011) Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 7368-7372.
  30. Reuter, K., Slany, R., Ullrich, F., and Kersten, H. (1991) Structure and organization of *Escherichia coli* genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative queuine, a nutrient factor for eukaryotes. *J. Bacteriol.* **173**, 2256-2264.
  31. Gündüz, U., Katze, J. R. (1984) Queuine salvage in mammalian cells. Evidence that queuine is generated from queuosine 5'-phosphate. *J. Biol. Chem.* **25**, 1110-1113
  32. Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G. and Björk, G.R. (2001) Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.* **20**, 4863-4873.
  33. Carlson, B.A., Kwon, S.Y., Chamorro, M., Oroszlan, S., Hatfield, D.L. and Lee, B.J. (1999) Transfer RNA modification status influences retroviral ribosomal frameshifting. *Virology* **255**, 2-8.
  34. Zaborske, J.M., DuMont, V.L., Wallace, E.W., Pan, T., Aquadro, C.F. and Drummond, D.A. (2014) A nutrient-driven tRNA modification alters translational fidelity and genome-wide protein coding across an animal genus. *PLoS Biol.* **12**, e1002015.
  35. Kilpatrick, M.W. and Walker, R.T. (1981) The nucleotide sequence of the tRNA<sub>M</sub><sup>Met</sup> from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Res.* **9**, 4387-4390.

36. Gupta, R. (1984) *Halobacterium volcanii* tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs. *J. Biol. Chem.* **259**, 9461-9471.
37. Edmonds, C.G., Crain, P.F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C.H., Kowalak, J.A., Pomerantz, S.C., Stetter, K.O. and McCloskey, J.A. (1991) Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria). *J. Bacteriol.* **173**, 3138-3148.
38. Mandal, D., Köhrer, C., Su, D., Russell, S.P., Krivos, K., Castleberry, C.M., Blum, P., Limbach, P.A., Söll, D. and RajBhandary, U.L. (2010) Agmatidine, a modified cytidine in the anticodon of archaeal tRNA(Ile), base pairs with adenosine but not with guanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2872-2877.
39. Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T. and Suzuki, T. (2010) Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 277-282.
40. Oliva, R., Tramontano, A. and Cavallo, L. (2007) Mg<sup>2+</sup> binding and archaeosine modification stabilize the G15 C48 Levitt base pair in tRNAs. *RNA* **13**, 1427-1436.
41. Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S. and Yokoyama, S. (2003) Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell* **113**, 383-394.
42. Menezes, S., Gaston, K. W., Krivos, K. L., Apolinario, E. E., Reich, N. O., Sowers, K. R., Limbach, P. A., and Perona, J. J. (2011) Formation of m<sup>2</sup>G6 in *Methanocaldococcus jannaschii* tRNA catalyzed by the novel methyltransferase Trm14. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7641-7655.
43. Armengaud, J., Urbonavicius, J., Fernandez, B., Chaussinand, G., Bujnicki, J. M., and Grosjean, H. (2004) N<sup>2</sup>-methylation of guanosine at position 10 in tRNA is catalyzed by a THUMP domain-containing, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, conserved in Archaea and Eukaryota. *J. Biol. Chem.* **279**, 37142-37152.
44. Kawamura, T., Anraku, R., Hasegawa, T., Tomikawa, C. and Hori, H. (2014) Transfer RNA methyltransferases from *Thermoplasma acidophilum*, a thermoacidophilic archaeon. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 91-113.
45. Roovers, M., Wouters, J., Bujnicki, J. M., Tricot, C., Stalon, V., Grosjean, H., and Droogmans, L. (2004) A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m<sup>1</sup>A) methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **32**, 465-476.
46. Singer, C. E., Smith, G. R., Cortese, R. and Ames, B. N. (1972) Mutant tRNA His

- ineffective in expression and lacking two pseudouridine modifications. *Nat New Biol* **238**, 72-74.
47. Singer, C. E. and Smith, G. R. (1972) Histidine regulation in *Salmonella typhimurium*. 13. Nucleotide sequence of histidine transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem* **247**, 2989-3000.
  48. Allaudeen, H. S., Yang, S. K. and Söll, D. (1973) Luecine tRNA(1) from HisT mutant of *Salmonella typhimurium* lacks two pseudones. *FEBS Lett.* **28**, 205-208.
  49. Cortese, R., Kammen, H. O., Spengler, S. J. and Ames, B. N. (1974) Biosynthesis of pseudouridine in transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **249**, 1103-1108.
  50. Hur, S. and Stroud, R. M. (2007) How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA. *Mol. Cell.* **26**, 189-203.
  51. Garcia, G. A. and Goodenough-Lashua, D. M. (1998) Chapter8: Modifying and editing enzyme mechanisms. In Grosjean, H. and Benne, R. (eds), *Modification and Editing of RNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 147-150.
  52. Awai, T., Kimura, S., Tomikawa, C., Ochi, A., Ihsanawati, Bessho, Y., Yokoyama, S., Ohno, S., Nishikawa, K., Yokogawa, T., Suzuki, T., and Hori, H. (2009) *Aquifex aeolicus* tRNA ( $N^2, N^2$ -guanine)-dimethyltransferase (Trm1) catalyzes transfer of methyl groups not only to guanine 26 but also to guanine 27 in tRNA. *J. Biol. Chem.* **284**, 20467-20478.
  53. Watanabe, M., Nameki, N., Matsuo-Takasaki, M., Nishimura, S. and Okada, N. (2001) tRNA recognition of tRNA-guanine transglycosylase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* **276**, 2387-2394.
  54. Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Kijimoto, T., Nameki, N., Watanabe, M., Kondo, H., Sekine, M., Okada, N., Nishimura, S. and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase. *J. Mol. Biol.* **318**, 665-677.
  55. Kazayama, A., Yamagami, R., Yokogawa, T., and Hori, H. (2015) Improved solid-phase DNA probe method for tRNA purification: large scale preparation, and alteration of DNA fixation. *J Biochem.* **157**, 411-418.
  56. Yokogawa, T., Kitamura, Y., Nakamura, D., Ohno, S. and Nishikawa, K. (2010) Optimization of the hybridization-based method for purification of thermostable tRNAs in the presence of tetraalkylammonium salts. *Nucleic Acids Res.* **38**, e89.
  57. Ishikawa, K., Ishida, H., Koyama, Y., Kawarabayasi, Y., Kawahara, Jun-ichi., Matsui, E. and Matsui, I. (1998) Acylamino Acid-releasing Enzyme from the Thermophilic Archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* **273**, 17726-17731.
  58. Takeda, H., Toyooka, T., Ikeuchi, Y., Ykobori, S., Okadome, K., Takano, F., Oshima, T.,

- Szuki, T., Endo, Y. and Hori, H. (2006) The substrate specificity of tRNA (m<sup>1</sup>G37) methyltransferase (TrmD) from *Aquifex Aeolicus*. *Genes Cells*, **11**, 1353-1365.
59. Hubert, A., Mitani, Y., Tamura, T., Boicu, M., and Nagy, I. (2014) Protein complex purification from *Thermoplasma acidophilum* using a phage display library. *J Microbiol Methods* **98**, 15-22.
60. El Yacoubi, B., Phillips, G., Blaby, I.K., Haas, C.E., Cruz, Y., Greenberg, J. and de Crécy-Lagard, V. (2009) A Gateway platform for functional genomics in *Haloferax volcanii*: deletion of three tRNA modification genes. *Archaea* **2**, 211-219.
61. Sabina, J. and Söll, D. (2006) The RNA-binding PUA domain of archaeal tRNA-guanine transglycosylase is not required for archaeosine formation. *J. Biol. Chem.* **281**, 6993-7001.
62. Nomura, Y., Onda, Y., Ohno, S., Taniguchi, H., Ando, K., Oka, N., Nishikawa, K. and Yokogawa, T. (2013) Purification and comparison of native and recombinant tRNA-guanine transglycosylases from *Methanosarcina acetivorans*. *Protein Expr. Purif.* **88**, 13-19.
63. Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S. and Imanaka, T. (2005) Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res.* **15**, 352-363.
64. Nagaoka, E., Hidese, R., Imanaka, T. and Fujiwara, S. (2013) Importance and determinants of induction of cold-induced DEAD RNA helicase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* **195**, 3442-3450.
65. Takemasa, R., Yokooji, Y., Yamatsu, A., Atomi, H., and Imanaka, T. (2011) *Thermococcus kodakarensis* as a host for gene expression and protein secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2392-2398.
66. Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T. and Imanaka, T. (1994) Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4559-4566.
67. Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M. and Imanaka, T. (2004) Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea*, **1**, 263-267.
68. Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. (2003) Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol*, **185**, 210-220.

69. Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. (2005) Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3889-3899.
70. Atomi, H., Sato, T. and Kanai, T. (2011) Application of hyperthermophiles and their enzymes. *Curr Opin Biotechnol*, **22**, 618-626.
71. Hileman, T.H. and Santangelo, T.J. (2012) Genetics Techniques for *Thermococcus kodakarensis*. *Front Microbiol*, **3**, 195.
72. Atomi, H., Imanaka, T. and Fukui, T. (2012) Overview of the genetic tools in the Archaea. *Front. Microbiol.* **3**, 337.
73. Tomikawa, C., Yokogawa, T., Kanai, T. and Hori, H. (2010) *N*<sup>7</sup>-Methylguanine at position 46 (m<sup>7</sup>G46) in tRNA from *Thermus thermophilus* is required for cell viability through a tRNA modification network. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 942-957.
74. Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T.J., Tajiri, M., Manabe, K., Reeve, J.N., Imanaka, T. and Murakami, K.S. (2008) Archaeal RNA polymerase subunits E and F are not required for transcription in vitro, but a *Thermococcus kodakarensis* mutant lacking subunit F is temperature-sensitive. *Mol Microbiol*, **70**, 623-633.
75. Kusuba, H., Yoshida, T., Iwasaki, E., Awai, T., Kazayama, A., Hirata, A., Tomikawa, C., Yamagami, R., and Hori, H. (2015) *In vitro* dihydrouridine formation by tRNA dihydrouridine synthase from *Thermus thermophilus*, an extreme-thermophilic eubacterium. *J. Biochem.* **158**, 513-521.
76. Robertus, J. D., Ladner, J. E., Finch, J. T., Rhodes, D., Brown, R. S., Clark, B. F. C., and Klug, A. (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution *Nature* **250**, 546–551.
77. Kim, S. H., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, A., Sussan, J. L., Wang, A. H. J., Seeman, N. C., and Rich, A. (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA *Science* **185**, 435–440.
78. Shi H, and Moore, P. B. (2000) The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited. *RNA* **6**, 1091-1105.
79. Zhang, C., Tian, B., Li, S., Ao, X., Dalgaard, K., Gökce, S., Liang, Y. and She, Q. (2013) Genetic manipulation in *Sulfolobus islandicus* and functional analysis of DNA repair genes. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 405-410.
80. Kohler, P.R. and Metcalf, W. W. (2012) Genetic manipulation of *Methanosarcina spp.* *Front. Microbiol.* **3**, 259.



81. Biou, V., Yaremchuk, A., Tukalo, M. and Cusack, S. (1994) The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Ser). *Science* **263**, 1404-1410.

## 発表論文

### [参考論文]

**Takuya Kawamura**, Akira Hirata, Satoshi Ohno, Yuichiro Nomura, Tomoko Nagano, Nobukazu Nameki, Takashi Yokogawa, and Hiroyuki Hori

Multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) from *Thermoplasma acidophilum*, a thermo-acidophilic archaeon

*Nucleic Acids Research*, 2016 年発表予定

### [その他の論文]

Akira Hirata, Kosuke Fujishima, Ryota Yamagami, **Takuya Kawamura**, Jillian F. Banfield, Akio Kanai, and Hiroyuki Hori.

X-ray structure of the fourth type of archaeal tRNA splicing endonuclease: insights into the evolution of a novel three-unit composition and a unique loop involved in broad substrate specificity.

*Nucleic Acids Research*, 2012, vol.40, No.20, pp.10554-10566

Chie Tomikawa, Takayuki Ohira, Yasushi Inoue, **Takuya Kawamura**, Akihiko Yamagishi, Tsutomu Suzuki, and Hiroyuki Hori.

Distinct tRNA modifications in the thermo-acidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*.

*FEBS Letters*, 2013, vol.587, No.21, pp.3575-3580

**Takuya Kawamura**, Ryou Anraku, Takahiro Hasegawa, Chie Tomikawa, and Hiroyuki Hori.

Transfer RNA methyltransferases from *Thermoplasma acidophilum*, a thermoacidophilic archaeon

*International Journal Molecular Science*, 2014, vol.16, No.1, pp.91-113

## 学会発表

### [口頭発表]

**河村 卓哉**, 平田 章, 能村 友一朗, 行木 信一, 大野 敏, 横川 隆志, 堀 弘幸  
“*Thermoplasma acidophilum* におけるアーケオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼのマルチサイト特異性の解析”  
Archaea 研究会, 愛媛, 2015 年 7 月

### [ポスター発表]

- (1) **河村 卓哉**, 富川 千恵, 大平 高之, 井上 仁, 行木 信一, 岡 夏央, 谷口 浩輝, 安藤 香織, 大野 敏, 山岸 明彦, 鈴木 勉, 横川 隆志, 堀 弘幸  
“*Thermoplasma acidophilum* 由来 tRNA<sup>Leu</sup> において Archaeosine が 2 カ所に形成されるメカニズムの解析”  
第 15 回日本 RNA 学会年会, 愛媛, 2013 年 7 月
- (2) **Takuya Kawamura**, Chie Tomikawa, Takayuki Ohira, Yasushi Inoue, Nobukazu Nameki, Natsuhisa Oka, Hiroki Taniguchi, Kaori Ando, Satoshi Ohno, Akihiko Yamagishi, Tsutomu Suzuki, Takashi Yokogawa, and Hiroyuki Hori.  
“The synthesis mechanism of a tRNA modification in thermophilic bacteria”  
Riboclub 2013 Annual Meeting, Canada, September, 2013.
- (3) **河村 卓哉**, 平田 章, 能村 友一朗, 行木 信一, 岡 夏央, 谷口 浩輝, 安藤 香織, 大野 敏, 横川 隆志, 堀 弘幸  
“アーキアの互換性機能を用いた *Thermoplasma acidophilum* 由来アーケオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ反応機構の解明”  
第 15 回極限環境生物学会, 沖縄, 2014 年 11 月
- (4) **Takuya Kawamura**, Akira Hirata, Yuichiro Nomura, Nobukazu Nameki, Satoshi Ohno, Takashi Yokogawa, and Hiroyuki Hori.  
“Multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosidase from *Thermoplasma acidophilum*”

Thermophiles 2015, Chile, August, 2015.

## 略語表

*T. acidophilum*···*Thermoplasma acidophilum*

*T. kodakarensis*···*Thermococcus kodakarensis*

*P. horikoshii*···*Pyrococcus horikoshii*

*E. coli*···*Escherichia coli*

*H. volcanii*···*Haloferax volcanii*

*P. furiosus*···*Pyrococcus furiosus*

*F. acidophilum*···*Ferroplasma acidophilum*

Tris···Tris-(Hydroxymethyl)-1-aminomethane

RNase···Ribonuclease

DNase···Deoxyribonuclease

HPLC···High performance liquid chromatography

IPTG···Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

SDS···Sodium dodecyl sulfate

PAGE···Polyacrylamide gel electrophoresis

CBB···Coomassie brilliant blue

EDTA···Ethylenediaminetetraacetic acid

DTT···Dithiothreitol

BSA···Bovine serum albumin

IP···Imaging plate

MB···Methylene blue

Leu···leucine

m<sup>1</sup>A···1-methyladenosine

s<sup>4</sup>U···4-thiouridine

ncm<sup>5</sup>U···5-carbamoylmethyluridine

m<sup>2</sup>G···2-methylguanosine

m<sup>2</sup><sub>2</sub>G···2, 2-dimethylguanosine

m<sup>1</sup>G···1-methylguanosine

m<sup>7</sup>G···7-methylguanosine

G···Guanosine

G<sup>+</sup>···Archaeosine

Q···Queuosine

preQ<sub>0</sub>···7-cyano-7-deazaguanine

preQ<sub>1</sub>···7-aminomethyl-7-deazaguanine

## 謝辞

*Thermoplasma acidophilum* ArcTGT の研究は、一筋縄ではいかずかなり苦戦しましたが、堀弘幸教授のご指導の下なんとか結果を発表することができました。また、研究に関してのみならず、進路に関しても親身になって相談にのっていただきました。研究室に在籍していた 6 年間、堀先生にご教授いただけたことを深く感謝いたします。

平田章講師には、研究が壁にぶつかり進んでいない時に、多くのアドバイスを頂きました。また、国際学会にも同行していただいたことで、日本だけでなく海外での研究にも関心を抱くようになりました。心より感謝致します。

岐阜大学の横川隆志先生、大野敏先生、能村友一朗さんには、質量分析で tRNA の配列を決定していただきました。こちらの都合に合わせて何度も測定をしていただき、深く感謝致します。質量分析がなければ、ここまでの結果を得られなかったと思います。

群馬大学の行木信一先生には、タンパク質の精製や構造に関して多くのアドバイスをいただきました。また、*P. horikoshii* ArcTGT の発現プラスミドを譲渡していただいたおかげで、tRNA の構造問題を検証することができました。どうも有り難うございました。

同期の長野倫子さんは、*T. kodakarensis* KUWA 株を構築して下さいました。おかげで、効率良く研究を行うことができました。

堀研究室で皆さんと過ごした日々は、私にとってかけがえのないものであり、楽しく充実した毎日を過ごすことができました。感謝しています。

公益財団法人吉田育英会には、経済面で支援していただいたことで研究に専念することができました。また、奨学生の交流会を催していただいたことで他分野の方々と繋がることができ、幅広い知識を得ることができました。大変感謝致します。

最後に、長い学生生活を支えてくれた家族に心から感謝します。これからも迷惑をかけるかもしれませんが、是非温かく見守っていただければ幸いです。これまで本当に有り難うございました。