

(第3号様式)(Form No. 3)

## 学位論文要旨 Dissertation Summary

氏名 (Name) 河村 卓哉

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

(Dissertation Title) The analysis of multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) from *Thermoplasma acidophilum*

---

タンパク質合成において、tRNAはコドンに対応するアミノ酸をリボソームに供給する役割を担っている。tRNAは、基本的にアデノシン(A)、ウリジン(U)、シチジン(C)、グアノシン(G)の4種類のヌクレオシドで構成されているが、一部のヌクレオシドはメチル化やチオ化などの修飾を受け、タンパク質合成系を厳密に制御する上で重要な役割を果たしている。tRNA修飾はこれまで90種類以上が発見されており、近年古細菌でも新規修飾ヌクレオシドやその合成系に関わる酵素が幾つか同定されている。アーケオシン (G<sup>+</sup>)は、古細菌のみが持つ修飾ヌクレオシドであり二段階反応で合成される。まず、一段階目ではアーケオシン tRNA-グアニ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>塩基の交換反応が起こり、その後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。これまでアーケオシンは、tRNAの15位にのみ存在すると考えられていた。しかし、好熱好酸性古細菌*Thermoplasma acidophilum*のtRNA<sup>Leu</sup>において、初めてアーケオシンが15位と13位の2カ所で発見された。そこで本研究では、13位と15位の2カ所のアーケオシンが合成される機構を明らかにしようとした。そのために、まずはアーケオシン合成の第一段階で働くArcTGTに焦点を絞り、ArcTGTがどのようなメカニズムで2カ所のグアニン塩基を交換しているのか解明することにした。

そして研究開始時に、ArcTGTが2カ所に作用する要因として3つの仮説が考えられた。①tRNA側の構造に原因があり、tRNA<sup>Leu</sup>のD-armのG13が15位にくる

ような構造的平衡が存在し、従来知られていた ArcTGT が 2 カ所のグアニンを交換する？②一種類の ArcTGT がマルチサイト特異性を持っており二カ所のグアニンを交換する？③修飾部位特異性が異なる複数の ArcTGT が存在する？

まず仮説①を検証するために、生化学的解析と構造解析が行われ 15 位特異的に反応することが知られている *Pyrococcus horikoshii* 由来 ArcTGT を用い、*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 転写産物へのグアニン交換活性を調べたところ、この酵素は 15 位のみ作用することが確認された。よって、①の可能性は否定された。次に酵素側からの検証を行うために *P. horikoshii* ArcTGT のアミノ酸配列をもとに候補遺伝子を探したところ Ta1493 遺伝子のみを見出した。この結果より、③の可能性は低いことが判った。さらに②の仮説の可否を検討するため、Ta1493 遺伝子産物を大腸菌で発現させたところ、粗精製画分中にグアニン交換活性を検出できたが、発現タンパク質の大部分が沈殿し精製標品を得ることができなかった。

そこで、遺伝学的手法が確立された超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* で Ta1493 遺伝子産物を発現させるシステムを構築し、仮説を検証することにした。実験の手順としては、*T. kodakarensis* arcTGT 遺伝子破壊株を作成し、この細胞内で Ta1493 遺伝子産物と *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> を共発現させ、発現させた tRNA<sup>Leu</sup> を回収して分析した。まず、相同組み換えによって *T. kodakarensis* arcTGT 遺伝子破壊株を構築し、破壊株のゲノム中に *T. acidophilum* arcTGT 遺伝子を組み込んだ。この株を 60°C と 85°C で培養し、C<sub>18</sub>-シリカ逆相カラムクロマトグラフィで tRNA のヌクレオシドを分析したところ、60°C 培養でのみ、アーケオシンが合成されていた。すなわち、Ta1493 遺伝子産物は、60°C 培養で発現しアーケオシン合成を相補することが判った。また、Ta1493 遺伝子産物が ArcTGT であることも判明した。その後、この株を *T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子をコードした plasmid で形質転換し 60°C で培養した。培養した菌体から total RNA を回収しノーザンブロッティング解析を行ったところ、*T. acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> が発現していることを確認できたため、固相化 DNA プローブ法で単一な tRNA<sup>Leu</sup> を調整し、質量分析を行った。その結果、tRNA<sup>Leu</sup> の 13 位と 15 位にアーケオシンが合成されており、*T. acidophilum* ArcTGT はマルチサイト特異性を持つことが判明した。