

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	河村 卓哉
審査委員	主査 堀 弘幸 副査 高井 和幸 副査 田村 実

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-グアニントランスグリコシラーゼ (ArcTGT) の解析

### 審査結果の要旨

本学位論文は、序論、第1章、第2章、第3章、結果の総括の5つのパートから構成されている。

序論では、まず、古細菌の tRNA 修飾とその機能について説明している。続いて、通常は tRNA 中の 15 位のみに見出されるアーケオシンが好熱好酸古細菌 *Thermoplasma acidophilum* の tRNA<sup>Leu</sup> 中では 13 位と 15 位の 2 か所に発見され、未知のアーケオシン合成経路が存在する可能性について述べられている。また、序論の最終部では、学位論文全体の構成について説明されている。

第1章では、2 か所にアーケオシンが合成される現象は、既知のアーケオシン tRNA-グアニントランスグリコシラーゼ (ArcTGT) の反応と tRNA<sup>Leu</sup> の構造的平衡では説明がつかないことが実験的に検証されている。この検証実験では、既知の ArcTGT として、*Pyrococcus horikoshii* 由来の酵素が使われ、試験管内でのグアニン塩基交換反応は 15 位のみが起こることが確認されている。一方、*T. acidophilum* の細胞抽出液を用いた実験では、13 位と 15 位のグアニン塩基が交換され、未知の因子が *T. acidophilum* の細胞抽出液中に存在することが示されている。

第2章では、*T. acidophilum* の *arctgt* 遺伝子の同定および大腸菌での組換え ArcTGT の発現系の構築について述べられている。まず、ゲノム情報を元に、Ta1493 遺伝子が *T. acidophilum arctgt* 遺伝子であると予測し、大腸菌で発現させた粗精製標品にグアニン塩基交換活性が存在することを確認している。次に、精製標品を得るため、可溶性ベクターによる発現系や界面活性剤を用いた精製法が検討されている。しかしながら、*T. acidophilum* ArcTGT の特殊性のため、これらの手法では精製標品を調製することが困難であり、新たな実験系の開発が必要であることが論じられている。

第3章では、新たな実験として、別の古細菌 *Thermococcus kodakarensis* の遺伝子組換えシステムを改良し、*T. acidophilum* ArcTGT が 13 位と 15 位に作用するマルチサイト特異性酵素であることを実験的に証明している。具体的には、*T. kodakarensis* の新たな栄養要求株を開発し、この栄養要求性を用いて *T. kodakarensis arctgt* 遺伝子を破壊し、この遺伝子破壊株を *T. acidophilum arctgt* 遺伝子で相補し、さらに tRNA<sup>Leu</sup> を共発現させ、固相化 DNA プローブ法を用いて tRNA を精製

し質量分析を行っている。

結果の総括の部分では、本研究全体の結果について検討がなされ、研究の意義が語られている。*T. acidophilum* は好熱好酸菌であり、主に火山性土壌に生育しているが、鉱山残渣など硫酸酸性の産業廃棄物の分解にも関わっている。その耐酸・耐熱性がどのように維持されているのか分子生物学的な解明が待たれているが、極めて特殊な菌であり培養自体も難しく、特にタンパク質合成系の研究は進んでいない。本研究は、他の古細菌の遺伝子操作系を利用し、*T. acidophilum* のタンパク質を発現させるという新たな手法を開発し、この問題に取り組んでいる。このシステムは、ArcTGTのみならず、様々なタンパク質への応用が可能でその利用範囲は広い。また、本研究は、高温・硫酸酸性という特殊な環境に生物がどのように適応しタンパク質合成系を維持しているのかという問題の解明に取り組むものであり、生命の多様性の理解に新知見を加えるものでもある。

したがって、本論文は、博士（工学）の学位論文として極めて価値の高いものであると認められた。

本論文の公聴会は、平成28年2月5日に学術支援センター応用タンパク質研究部門4階会議室にて開催され、論文の口頭試問と質疑応答が行われた。

審査員から、（1）*T. acidophilum* ArcTGT 以外に、どのようなマルチサイト特異性 RNA 修飾酵素が知られているのか？（2）また、それらの酵素群と *T. acidophilum* ArcTGT のマルチサイト特異性は、タンパク質構造上、同じメカニズムで獲得されていると考えられるのか？（3）シングルサイト特異性 ArcTGT とマルチサイト特異性 ArcTGT は、同じ触媒残基を持っているのか？（4）2 か所にアーケオシンが形成された場合、tRNA の構造にどのような影響が出るのか等の質問がなされた。申請者は、そのすべての質問に科学的知見および実験データに基づいて、明確かつ丁寧に答えた。審査委員会は一致して本研究を高く評価し、博士（工学）の学位論文に値するものと結論した。