

バクテリアのtRNA修飾酵素遺伝子の網羅的同定とtRNA修飾塩基の機能解析

●関根 靖彦¹⁾ ◆鈴木 勉²⁾

1) 立教大学理学部 2) 東京大学大学院新領域創成科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

バクテリアのtRNAの修飾塩基は40種以上が知られているが、その修飾酵素の遺伝子の約7割は不明であり、またその機能もコドンとの対合に関与するアンチコドンの修飾以外はほとんど不明である。本研究は大腸菌及び枯草菌を対象に、tRNA中のすべての修飾塩基の合成酵素遺伝子を同定すること、同定した遺伝子の変異株、変異(未修飾)tRNAの性状の解析、修飾酵素遺伝子の機能ネットワークの解析、生育条件の変化による塩基修飾や修飾遺伝子の発現の変動の解析等を通して、tRNA修飾塩基の生合成機構の解明やtRNA修飾塩基の機能を網羅的に解析することを目的とする。

修飾塩基の合成酵素遺伝子の同定は、機能未知遺伝子またはtRNAの修飾への関与が予想される機能既知遺伝子の欠損株(または、ある遺伝子の発現を抑制した条件で培養した発現制御株)からRNAを抽出した後、酵素的にヌクレオシドに分解し、高速液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)法で分析し、検出された塩基のピークのプロファイルを野生株(または、発現を抑制しない条件で培養した発現制御株)のそれと比較することにより行う。欠損株でのみ検出されない修飾塩基があれば、欠損した遺伝子はその修飾塩基の生合成に関与していると結論できる。修飾酵素遺伝子が同定できた場合、その遺伝子産物を精製し、これをその遺伝子の変異株から単離した当該塩基が未修飾のtRNAと反応させることにより、生合成反応機構の解析を行う。また、その遺伝子の変異株を構築し、その生育や細胞内の翻訳の状況を調べること、当該塩基が未修飾のtRNAの諸性質を調べること、などの解析によって修飾塩基の機能を調べる。

〈研究開始時の研究計画〉

- (1) RNA修飾酵素の網羅的探索のためには、多くの機能未知遺伝子(または機能未知遺伝子)の破壊株の培養、細胞からのRNA抽出とその解析を効率的に行う必要がある。そこで、なるだけ効率的に多検体の培養、分析ができる条件を確立する。
- (2) 効率良くtRNA修飾酵素遺伝子を探索するために、大腸菌ゲノムの広範囲ゲノム欠失変異株(加藤博士[都立大]及びYale大CGSCより分与)からRNAを抽出し、LC/MS法で分析を行う。特定の修飾の欠損が検出された場合、欠失範囲を狭めた変異株、または欠失している遺伝子を補った株からRNAを抽出し、LC/MS法で分析を行うことにより、修飾酵素遺伝子を同定する。
- (3) (2)で述べた方法では生育に非必須の遺伝子しか検索の対象にならない。そこで、ある修飾酵素が生育に必須であることが予想された場合は、その修飾塩基がなくても生育できるような遺伝子システム(バイパスシステム)を導入した上で遺伝子を破壊し、その株のLC/MSによる解析を行う。
- (4) 修飾酵素遺伝子が同定できた場合は、その遺伝子産物を精製し、これをその遺伝子の変異株から単離し

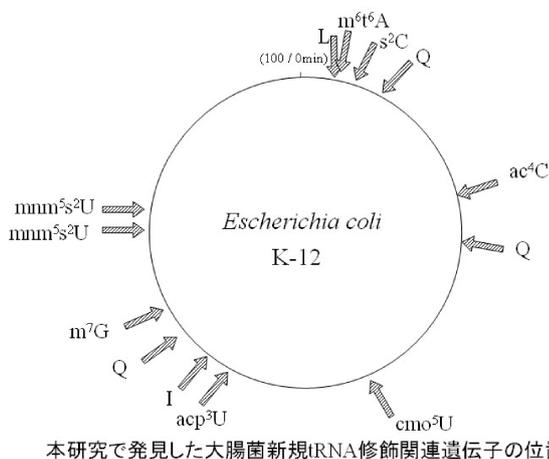
た当該塩基が未修飾のtRNAと反応させることにより、生合成反応機構の解析を行う。また、その遺伝子の変異株(生育非必須遺伝子なら破壊株、生育必須遺伝子なら発現制御株)を構築し、その生育や細胞内の翻訳の状況を調べること、当該塩基が未修飾のtRNAの諸性質(安定性や相互作用すると考えられるタンパク質との結合など)を調べること、によって修飾塩基の機能を調べる。

- (5) アミノ酸配列のモチーフサーチから、RNA修飾への関与が予想される遺伝子について、その欠損株のLC/MS法分析をする。

〈研究期間の成果〉

- (1) ディープウェルプレートを用いた大腸菌の培養と96ウェルのタイタープレートを用いたRNA抽出により、1日あたり196サンプルのペースでサンプルが調製できるシステムを開発した。高速液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC/MS)を用いた分析法に工夫を加え、1日あたり19サンプルの自動分析が可能となった。これにより、1ヶ月の自動分析で約600サンプルを処理することができる体制を整えた。
- (2) 前述の大腸菌ゲノムの広範囲ゲノム欠失変異株からRNAを抽出し、LC/MS法で分析した。そのうち、16株で修飾の欠落が観測された。このうち5株については既知の修飾遺伝子がゲノムの欠失領域に含まれることから、残りの11株は新規の修飾遺伝子を欠失していることになる。欠落が観測された修飾塩基は、s2U, ac4C, Q[2種], cm5U, m7G, mnm5s2U[2種], m6t6A, Q, acp3Uである。以上の解析で、合計で1968個のORFについて検索を終えたことになった。これらの広範囲欠失変異株では平均で約20の遺伝子を欠損している。このうちどれが原因遺伝子であるかを、個々の遺伝子の破壊株(三木博士[福岡歯科大]より分与)の分析と、各遺伝子を運ぶプラスミド(西村博士[遺伝研]より分与)を接合によって順番に欠失変異株に供給し欠落した修飾を復活させることで決定した。その結果、m7G合成酵素遺伝子とmnm5s2Uの2チオ化に関する酵素遺伝子を同定した。
- (3) イソロイシン(Ile)のAUAコドンのみを認識するtRNA^{Ile}(minor)のアンチコドンLAUの1文字目はL(リジジン)である。Lは前駆体tRNAのCにアミノ酸のリジンが付加することにより生じ、この修飾が起らないとメチオニンのコドンであるAUGを認識してしまう。また、この修飾は、アミノアシルtRNA合成酵素による認識の特異性をメチオニンからイソロイシンに変換する。このようにLは生物学的に大変興味深い修飾であるが、その生合成機構は長い間不明であった。そこでLの生合成に関する遺伝子の同定を目指し、以下のような結果を得た。
 - (a) この修飾が起らないとAUAコドンを認識できないため、Lの合成酵素遺伝子は必須であると予想される。

そこで、最初に、LがなくてもAUAコドンが認識できるようなバイパスシステムを構築することを試みた。出芽酵母のイソロイシンコドン認識システムを大腸菌に導入した上で遺伝子を破壊することを旨としたが、成功しなかった。そこで、実験方針を変更し、枯草菌の機能未知必須遺伝子の条件変異株（IPTGの添加により当該遺伝子の発現が制御されている株；小笠原博士[奈良先端大]より分与）をIPTGを含まない培地条件で培養した細胞からtRNAを抽出し、酸性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（酸性PAGE）によりLの含量を測定した。その結果、yacAの発現を抑えるとtRNA(Ile)のL含量が低下することがわかった。yacAの大腸菌における相同遺伝子mesJの温度感受性株でも、制限温度下ではtRNA(Ile)のL含量が低下した。mesJの遺伝子産物を大腸菌で大量産生、精製し、リジンとATP存在下で未修飾tRNA(Ile)と作用させるとin vitroでL合成がおこった。in vitroでL修飾したtRNA(Ile)のアミノアシル化の特異性はメチオニンからイソロイシンに変換した。以上の結果より、大腸菌のmesJがL合成酵素遺伝子であると結論し、tilS (tRNA(Ile)-lysidine synthetase)と命名した（論文1）。



- (b)大腸菌の細胞でtilSの発現を抑えると、AUAコドンを含むレポーター遺伝子の発現が大幅に減少した（論文1）。
- (c)in vitro L合成反応系を用いて解析した結果、L合成反応は、AMPがtRNA(Ile)のアンチコドンのCに付加した中間体を経た2段階で進行することがわかった（論文2）。
- (d)AUAコドン認識するtRNA(Ile)の配列はtRNA(Met)と相同性が高い（特にアンチコドンループの配列は同一である）。TilSタンパク質によるtRNA(Ile)の認識機構、およびtRNA(Met)の排除機構を知るために、変異を導入したtRNA(Ile)またはtRNA(Met)を用いてin vitro L合成反応を行い、L合成効率を測定した。その結果、TilSタンパク質によるtRNA(Ile)の認識には、アンチコドンループ、アンチコドンシステム、アクセプターシステムが重要であり、tRNA(Met)との区別には特にアクセプターシステムが重要であることがわかった（論文2）。
- (4) deaminase モチーフを有する枯草菌の機能未知遺伝子の欠損株（小笠原博士[奈良先端大]より分与）数種の解析から、yaaJ（大腸菌ではyfhCに相当）がtRNA(Arg)のアンチコドンに存在するI（イノシン）の合成酵素遺伝子であることを示した。大腸菌のyfhCは生育に必須であるが、枯草菌のyaaJは生育に非必須であることが判明した。I修飾される

tRNA(Arg)はCGU, CGC, CGAコドン認識するが、大腸菌のyfhC発現制御株で、yfhCの発現を減少させると、CGAコドンの認識能が大きく低下した。これは、I修飾がCGAコドンの認識に重要であることを示す。一方、枯草菌のyaaJ破壊株では、CGAコドンの認識能の低下は観察されなかった。これは枯草菌ではCGAコドンの認識にI修飾が必要ないことを示唆する。

〈国内外での成果の位置づけ〉

tRNA修飾の研究は外国のいくつかのグループ(Bjork[スウェーデン], Grosjean[フランス]など)が行っているが、本研究のように機能未知遺伝子群から逆遺伝学的手法により、網羅的にtRNA修飾遺伝子を同定する試みは例がない。Lはその興味深い性質からその合成酵素遺伝子の同定が長い間多くの研究者によって試みられてきたが、我々はそれに成功した。論文を投稿するに当り、内外のtRNAの専門家数人に意見を求めたところ、いずれからも高い評価を得ることができた。また、我々の論文は、tRNA研究の第一人者のレビュー(Grosjean and Bjork, Trends Biochem. Sci. 29, 165-168 (2004))に取り上げられた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

修飾の欠落を観測した11種類の広範囲欠失変異株に関して、2種の原因遺伝子は同定できたが、その他については原因遺伝子の同定を期間内に完了することができなかった。

〈今後の課題〉

修飾の欠落を観測した広範囲欠失変異株すべてに関して、原因遺伝子を同定する。これまでの解析で合計14の新規修飾遺伝子を同定してきたが、tRNAの修飾には、未同定の遺伝子が少なくとも10以上は関与していると見られる。これらを同定する。この際、既知の遺伝子の検索の対象にする。これまでに同定した遺伝子に関して、その欠損株の諸性質（翻訳活性、細胞増殖、ストレス耐性など）や未修飾tRNAの諸性質を調べることにより、tRNA修飾の生物学的意義を明らかにする。大腸菌と枯草菌において、I修飾の役割に関して異なっていることが示唆されたので、その違いが何に原因するのかについて明らかにする。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
- 1. 0602102248
Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T.: An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. Mol. Cell, 12, 689-698 (2003)
- 2. 0602102323
Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y., and Suzuki, T. Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition. Mol Cell, 19, 235-246 (2005)