

メタン生成古細菌由来 archaeal tRNA-guanine transglycosylase の機能解析

**Functional analyses of archaeal tRNA-guanine transglycosylase
from methanogenic archaeon**

2016 年 3 月

能村 友一朗

目次

第1章 序論	1
1.1 セントラルドグマにおける tRNA の役割 と tRNA の代謝機構	1
1.2 古細菌固有の tRNA 修飾酵素: archaeal tRNA-guanine transglycosylase	2
1.3 tRNA 修飾酵素の基質 tRNA の認識機構	9
第2章 <i>M. acetivorans</i> ArcTGT の単離と特性評価	11
2.1 材料と方法	11
2.1.1 <i>M. acetivorans</i> の培養	
2.1.2 <i>M. acetivorans</i> ArcTGT の精製	
2.1.3 ArcTGT 発現ベクターの作製	
2.1.3.1 pETY_Blue の作製	
2.1.3.2 pETY_MA4419-His ₆ と pETY_MA0121-His ₆ の作製	
2.1.3.3 pETY_MA4419-MA0121-His ₆ の作製	
2.1.4 Recombinant ArcTGT の過剰発現と精製	
2.1.5 <i>M. acetivorans</i> tRNA ^{Met} transcript の調製	
2.1.6 ArcTGT によるグアニン交換反応	
2.1.7 質量分析による native ArcTGT 構成ポリペプチドの同定	
2.1.8 LC-MS による全長 tRNA の分子質量解析	
2.2 結果	19
2.2.1 Native ArcTGT の精製	
2.2.2 Recombinant ArcTGT の過剰発現と精製	
2.2.3 <i>M. acetivorans</i> ArcTGT の特性評価	
2.2.4 Recombinant ArcTGT を利用した preQ ₀ (15)-tRNA の調製	
2.3 考察	28

第3章 tRNAの構造安定性と ArcTGTの触媒効率における相関関係	30
3.1 材料と方法	30
3.1.1 Native <i>E. coli</i> tRNA に対する ArcTGT の活性測定	
3.1.1.1 大腸菌 ER2566 (pETY_MA4419-MA0121) 形質転換株の培養と tRNA mixture の調製	
3.1.1.2 ER 2566 (pETY_MA4419-0121) 形質転換株由来の tRNA mixture のヌクレオシドの調製	
3.1.1.3 LC-MS によるヌクレオシド分析	
3.1.1.4 Native <i>E. coli</i> tRNA の調製	
3.1.1.5 固相化プローブ法による native <i>E. coli</i> tRNA の精製	
3.1.1.6 <i>E. coli</i> tRNA transcript の精製	
3.1.1.7 Native <i>E. coli</i> tRNA と <i>E. coli</i> tRNA transcript に対する ArcTGT の触媒効率	
3.1.2 tRNA 修飾ヌクレオシドが ArcTGT の触媒効率に与える影響	
3.1.2.1 <i>E. coli</i> tRNA ^{Ser_(GGA)} family の調製	
3.1.2.2 <i>E. coli</i> tRNA ^{Ser_(GGA)} family の質量分析	
3.1.2.3 放射性標識されたグアニンを用いた ArcTGT の反応速度論的解析	
3.1.2.4 <i>E. coli</i> tRNA ^{Ser_(GGA)} family の融解温度 (<i>T_m</i>) 測定	
3.2 結果	37
3.2.1 <i>E. coli</i> tRNA に対する ArcTGT の触媒効率	
3.2.2 <i>E. coli</i> tRNA ^{Ser_(GGA)} family の調製	
3.2.2.1 ArcTGT の基質 tRNA の選択	
3.2.2.2 <i>E. coli</i> tRNA ^{Ser_(GGA)} family の調製と質量分析による確認	
3.2.3 <i>E. coli</i> tRNA ^{Ser_(GGA)} family に対する ArcTGT の反応速度論的解析	
3.2.4 修飾ヌクレオシドが tRNA の融解温度 (<i>T_m</i>) に与える影響	
3.3 考察	56
3.3.1 tRNA 修飾ヌクレオシドと tRNA の構造安定性	
3.3.2 tRNA の構造安定性 と ArcTGT の触媒効率	
3.3.3 tRNA 修飾過程における修飾ヌクレオシドの導入順序	

第 4 章 総括	66
4.1 ArcTGT の触媒機構	66
4.1 アーケオシン生合成機構の最終ステップ	66
4.2 tRNA の修飾ネットワーク	67
参考文献	69
謝辞	76

第 1 章 序論

1.1 セントラルドグマにおける tRNA の役割 と tRNA の代謝機構

1958 年に Crick は分子生物学の基本概念としてセントラルドグマを提唱した (Crick, 1958). これは 4 種類のヌクレオチドが連結した DNA にコードされた遺伝子から生体内の触媒反応を司るタンパク質が生合成される流れを示したものである. 僅か 4 種類のヌクレオチドの組合せである遺伝子から, 多種多様な機能をもつタンパク質が合成されることは非常に興味深いことである.

タンパク質の生合成は, 多くのタンパク質や RNA, またその複合体が適切なタイミングで相互作用することで達成される. セントラルドグマにおいて, transfer RNA (tRNA) は遺伝暗号をタンパク質の構成成分であるアミノ酸に変換する媒体としての役割を担っている (Crick, 1970). タンパク質の生合成は, 目的のタンパク質遺伝子が転写され messenger RNA (mRNA) が産出されることから始まる. アミノ酸を結合した tRNA は自身のアンチコドンが mRNA 上のコドンと正確に対合することで, 結果的に遺伝暗号を解読することになる. この過程において, tRNA は正しいアミノ酸と結合し, 正しいコドンと対合する必要があるが, そのためにはアミノアシル tRNA 合成酵素やリボソーム等の因子と厳密に相互作用しなければならない. tRNA が正しく機能するためには, tRNA が転写された後, 機能的な tRNA へと成熟する過程を経なければならない. この成熟過程は, 大まかにトリミング, スプライシング, ヌクレオチド修飾, 3'-CCA 末端の付加から成る. 遺伝暗号をアミノ酸に変換する過程でエラーが発生することは, 生命にとって致命的である. それ故, その役割を担う tRNA は正しく成熟過程を経る必要がある.

中でも, tRNA のヌクレオチド修飾は最も複雑な工程と言える. なぜなら, これまでに検出されている RNA の修飾ヌクレオチドは 100 種類以上にも及び, そのほとんどが tRNA に存在しているからである (図 1-1; Jühling *et al.*, 2009; Machnicka *et al.*, 2013). 特定の修飾ヌクレオチドが tRNA のどこに位置するか, またどのくらいの頻度で存在するかは, 高度に保存されている (Grosjean *et al.*, 1995). 特に, 保存された tRNA 修飾ヌクレオチドは tRNA の構造安定性と, 正確なコドンの解読に関与していると考えられる. なぜなら tRNA 修飾ヌクレオチドは, L 字型 tRNA 構造のコア領域 (D-loop, V-loop, TΨC-loop が相互作用している領域) と anticodon loop

に集中しているからである (図 1-1, 図 1-2). tRNA のコア領域に存在する修飾ヌクレオシドの多くは, yeast tRNA^{Phe}(GAA) で見られる Watson-Crick 塩基対 G19-C56 を除いて, 特殊な塩基対を形成している (Kim *et al.*, 1974; Robertus *et al.*, 1974; Jack *et al.*, 1976; Sussman *et al.*, 1978). Anticodon loop の 34, 37 位には, 多種多様な修飾ヌクレオシドが集中して見受けられる. おそらく, 遺伝子にコードされたアミノ酸情報を正確に読み取ることを可能にしていると考えられる (Farabaugh & Björk, 1999; Urbonavičius *et al.*, 2001; Agris *et al.*, 2007). 一方, anticodon loop 以外に存在する tRNA 修飾ヌクレオシドの大半は, tRNA 分子の構造安定性を強固なものにするために必要だと考えられている (Sampson & Uhlenbeck, 1988; Maglott *et al.*, 1998; Serebrov *et al.*, 1998; Shelton *et al.*, 1999; Nobles *et al.*, 2002). おそらく, tRNA 分子の構造が安定化することで, リボソーム内での tRNA と rRNA の複雑な相互作用が確実に遂行されるのであろう.

現在も依然として, 新規の tRNA 修飾ヌクレオシドの発見が報告されている (Mandal *et al.*, 2014). さらに, ゲノム情報を利用した研究が盛んに行われており, これまで不明だった tRNA の修飾を触媒する酵素 (tRNA 修飾酵素) も次々と同定されている. しかしながら, 依然として, 修飾ヌクレオシドが存在することの意義や, tRNA 修飾ヌクレオシドの生合成機構については未解明のものが多く残されている.

1.2 古細菌固有の tRNA 修飾酵素: archaeal tRNA-guanine transglycosylase

生物界は真正細菌, 古細菌, 真核生物の 3 つのドメインに分類することができる (Woese *et al.*, 1990). 古細菌は我々, ヒトが属する真核生物の祖先だとする説が有力である. そのため, 古細菌の遺伝子情報の解明は真核生物の生命現象の謎を解き明かす鍵になる可能性が大いにある. 最近報告された具体例としては, Englert *et al.* が古細菌の細胞抽出液から未知遺伝子であった tRNA ligase を同定した (Englert *et al.*, 2011). さらに, そのホモログ遺伝子がヒトにも存在しており (Popow *et al.*, 2011), 真核生物における tRNA splicing 機構の解明に大きな進展をもたらしたことが挙げられる.

tRNA 修飾ヌクレオシドは生物ドメインに固有なものと全てのドメインに共通のものが存在する. ここで, 7-deazaguanine derivative は全ての生物ドメインで検出される興味深い修飾ヌクレオシドの一つである. その理由として, 修飾ヌクレオシドは機能的な官能基の付加によるものが一般的であるが, 7-deazaguanine derivative は塩基交換反応により導入される稀な修飾

ヌクレオシドである (Nishimura, 1983). また, 真核生物と真正細菌では GUN anticodon を持つ tRNA (tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{His}, tRNA^{Tyr}) の 34 位 (7-deazaguanine derivative: Queosine (Q34)) (Iwata-Reuyl, 2003; Harada & Nishimura, 1972) に, 古細菌では tRNA の 15 位 (7-deazaguanine derivative: archaeosine (G⁺15)) (Gregson *et al.*, 1993) に存在している (図 1-3). Q34 はコドンとアンチコドンの塩基対形成 (Meier *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1999) を, G⁺15 は V-loop の C48 と塩基対を形成する際, 近隣のリン酸基と相互作用することで tRNA の L 字型構造を強めると考えられている (Oliva & Tramontano, 2007). 真正細菌では, 7-deazaguanine derivative: preQ₁ (Okada *et al.*, 1979) が bacterial tRNA-guanine transglycosylase (QueTGT) (Okada & Nishimura, 1979) によって tRNA に導入され (preQ₁(34)-tRNA), QueA (Slany *et al.*, 1994) と QueG (Miles *et al.*, 2011) により preQ₁(34)-tRNA が Q(34)-tRNA へと変換される. 真核生物では, サルベージ経路から合成された Q が直接 tRNA に導入される (Shindo-Okada *et al.*, 1980). 古細菌の場合, QueTGT のホモログである archaeal tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) により, 7-cyano-7-deazaguanine (preQ₀) が導入される (preQ₀(15)-tRNA) (Watanabe *et al.*, 1997). また, QueTGT と比べて, ArcTGT は約 300 残基の余分なアミノ酸配列からなる C 末端 domain が存在している (Ishitani *et al.*, 2001). QueTGT と ArcTGT のサイズの違いは, 各酵素の tRNA の触媒ターゲット部位によるものだと考えられる. 最近, preQ₀(15)-tRNA を G⁺(15)-tRNA に変換する酵素として archaeosine synthase (ArcS) (Phillips *et al.*, 2010) が同定された. しかしながら, *arcS* 遺伝子は古細菌全体での保存度が低く, ArcS 以外の酵素も提唱されており (Phillips *et al.*, 2012), 依然としてアーケオシン生合成機構の全貌は解明されていない.

本研究では, アーケオシン生合成機構の第一段階目の反応を担う酵素 ArcTGT の特徴解析を主軸に行うことにした. ArcTGT は full-size type と split type の 2 つに分けることができる. これまでの ArcTGT の研究報告のほとんどは full-size type に関するもので, tRNA との共結晶構造も解析されている (Ishitani *et al.*, 2003) (図 1-4). 以下に full-size ArcTGT のこれまでの報告を簡潔にまとめた. Full-size ArcTGT は 1 種類のポリペプチドがホモダイマーを形成しているが, そのポリペプチドは N 末端 domain と C 末端 domain に大きく分けることができる. N 末端 domain には触媒部位 (*P. horikoshii* ArcTGT では Asp95) があり, 塩基交換反応を触媒する. C 末端 domain は C1, C2, C3 domain のサブクラスに分けられる. 基質 tRNA 認識に重要だとされる C3 domain は pseudouridine synthase/archaeosine transglycosylase (PUA) domain と呼ばれており, tRNA の acceptor stem と相互作用する (Aravind *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2000; Watanabe *et*

al., 2001; Ishitani *et al.*, 2002, 2003). これとは対照的に、遺伝子情報によると、split-type ArcTGT のタンパク質構成因子は 2 種類のポリペプチドであると考えられている。また、アミノ酸配列アライメントから、その 2 種類のポリペプチドは full-size type の C1 と C2 domain の間で切断されたものに相当する (Sabina & Söll, 2006)。ゲノム情報から、古細菌のうち Euryarchaeota には full-size と split ArcTGT が見受けられるが、Crenarchaeota には split ArcTGT しか存在していない。従って、full-size type よりも split-type ArcTGT の方がより一般的であると考えられる。しかしながら、split-type ArcTGT に関する研究はほとんど報告されていない。ArcTGT は 1997 年に初めて、*Haloferax volcanii* の細胞抽出液から 1 種類のポリペプチドとして単離された (Watanabe *et al.*, 1997) が、ゲノム情報によると *H. volcanii* の ArcTGT は split type である。また、Söll らのグループは基質 tRNA の認識には full-size type の C 末端は必要ないと報告した (Sabina & Söll, 2006)。すなわち、split-type ArcTGT が 2 種類のポリペプチドから成る構造を形成しているのかは未解明のままであった (表 1-1)。

そこで、まず初めに split-type ArcTGT を保持すると考えられる *Methanosarcina acetivorans* の細胞抽出液から native ArcTGT を単離し、サブユニット構成の同定を試みた。また、大腸菌細胞により recombinant ArcTGT を大量発現させ、native ArcTGT と recombinant ArcTGT を反応速度論的解析により比較した。さらに、G⁺(15)-tRNA 前駆体となる preQ₀(15)-tRNA の大量調製を試みた。これは、実際に *M. acetivorans* 細胞抽出液から、アーケオシン生合成の関連因子を探索する際に必須の材料だと考えられる。

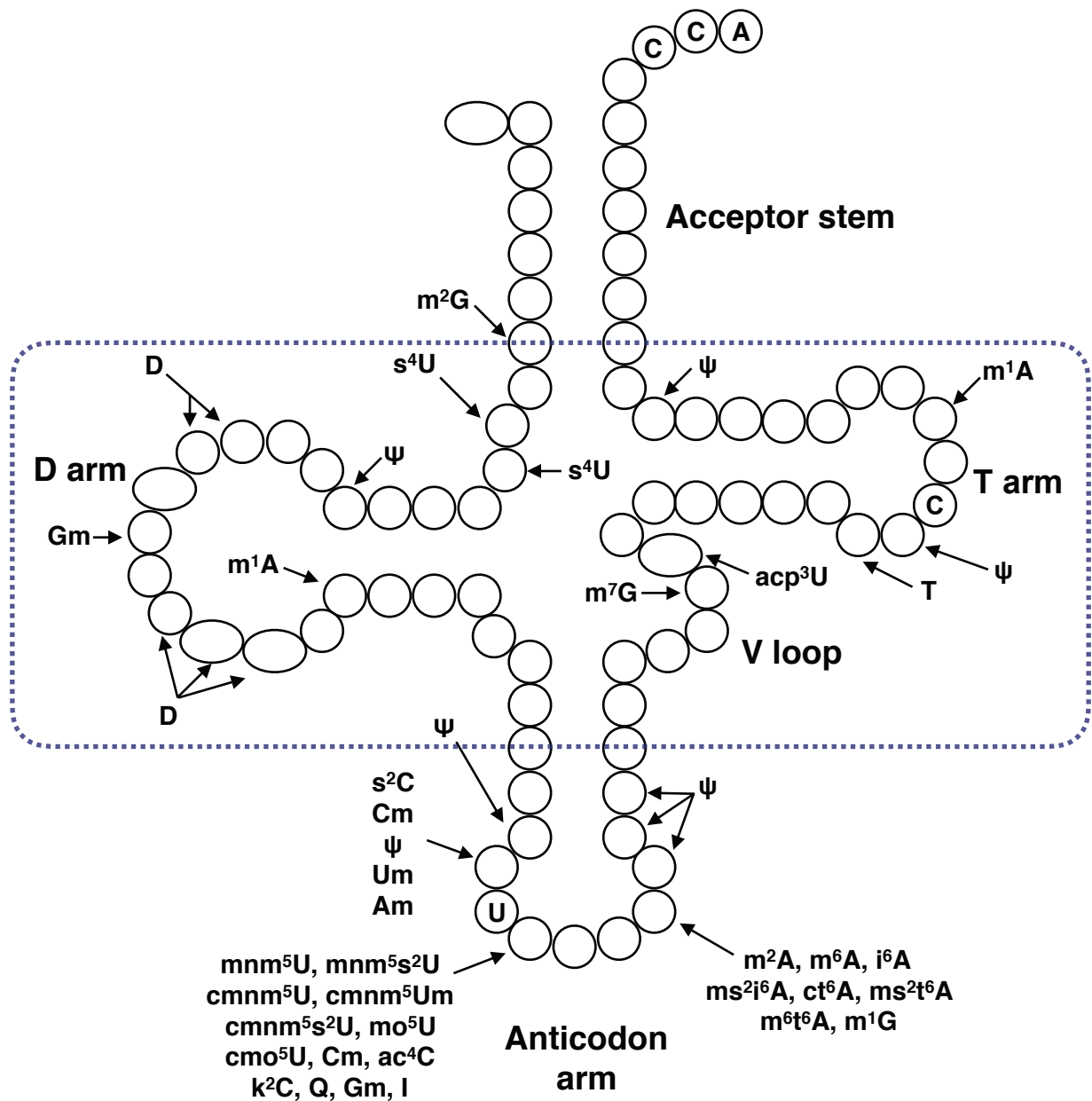


図 1-1 真正細菌の tRNA に見い出される修飾ヌクレオシド

青色の点線で囲まれた部位は tRNA のコア領域に相当する。略語は以下に示した。

m²G, N²-methylguanosine; s⁴U, 4-thiouridine; Ψ, pseudouridine; D, dihydrouridine; Gm, 2'-O-methylguanosine; m¹A, 1-methyladenosine; s²C, 2-thiocytidine; Cm, 2'-O-methylcytidine; Um, 2'-O-methyluridine; Am, 2'-O-methyladenosine; mnm⁵U, 5-methylaminomethyluridine; mnm⁵s²U, 5-methylaminomethyl-2-thiouridine; cmnm⁵U, 5-carboxymethylaminomethyluridine; cmnm⁵Um, 5-carboxymethylaminomethyl-2'-O-methyluridine; cmnm⁵s²U, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine; mo⁵U, 5-methoxyuridine; cmo⁵U, uridine 5-oxyacetic acid; ac⁴C, N⁴-acetylcytidine; k²C, 2-lysidine; Q, queuosine; I, inosine; m²A, 2-methyladenosine; m⁶A, N⁶-methyladenosine; i⁶A, N⁶-isopentenyladenosine; ms²i⁶A, 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenosine; ct⁶A, cyclic form of N⁶-threonylcarbamoyladenosine; ms²t⁶A, 2-methylthio-N⁶-threonylcarbamoyladenosine; m⁶t⁶A, N⁶-methyl-N⁶-threonylcarbamoyladenosine; m¹G, 1-methylguanosine; m⁷G, 7-methylguanosine; acp³U, 3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine; T, ribothymidine.

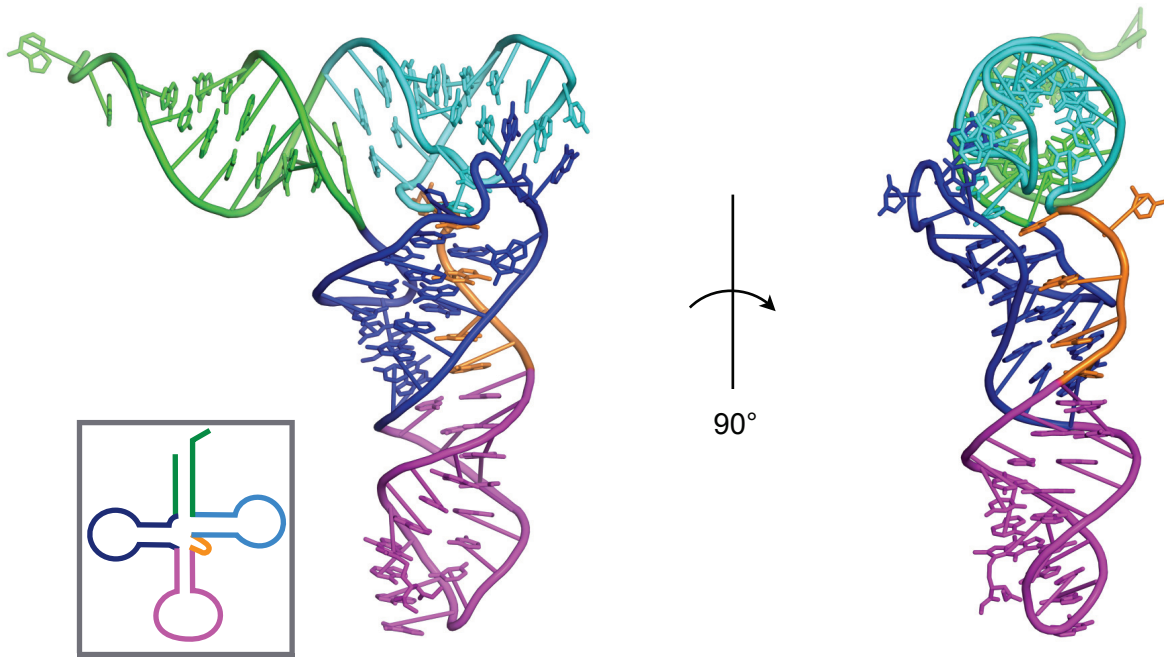


図 1-2 L 字型 tRNA におけるコア領域

L 字型 tRNA における acceptor stem (*green*), D-arm (*blue*), anticodon arm (*magenta*), V-loop (*orange*), T-arm (*cyan*) を色別に示した (PDB ID: 1EHZ). tRNA のコア領域は D-arm, V-loop, T-arm から成る. また, tRNA のクローバーリーフモデルを四角内に示した.

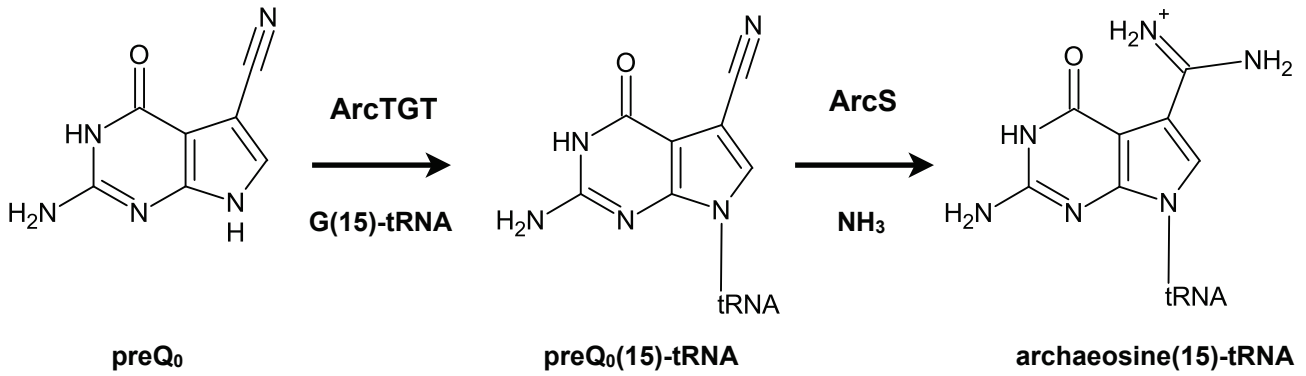


図 1-3 アーケオシン生合成経路

表 1-1 ArcTGT の分類と問題点

Type	Full-size	Split
遺伝子	1 種類 	2 種類?
ポリペプチド因子*	1 種類 	2 種類?
タンパク質構造	ホモダイマー (α ₂)	?

* : N 末端 domain : C1 domain : C2 domain : C3 (PUA) domain

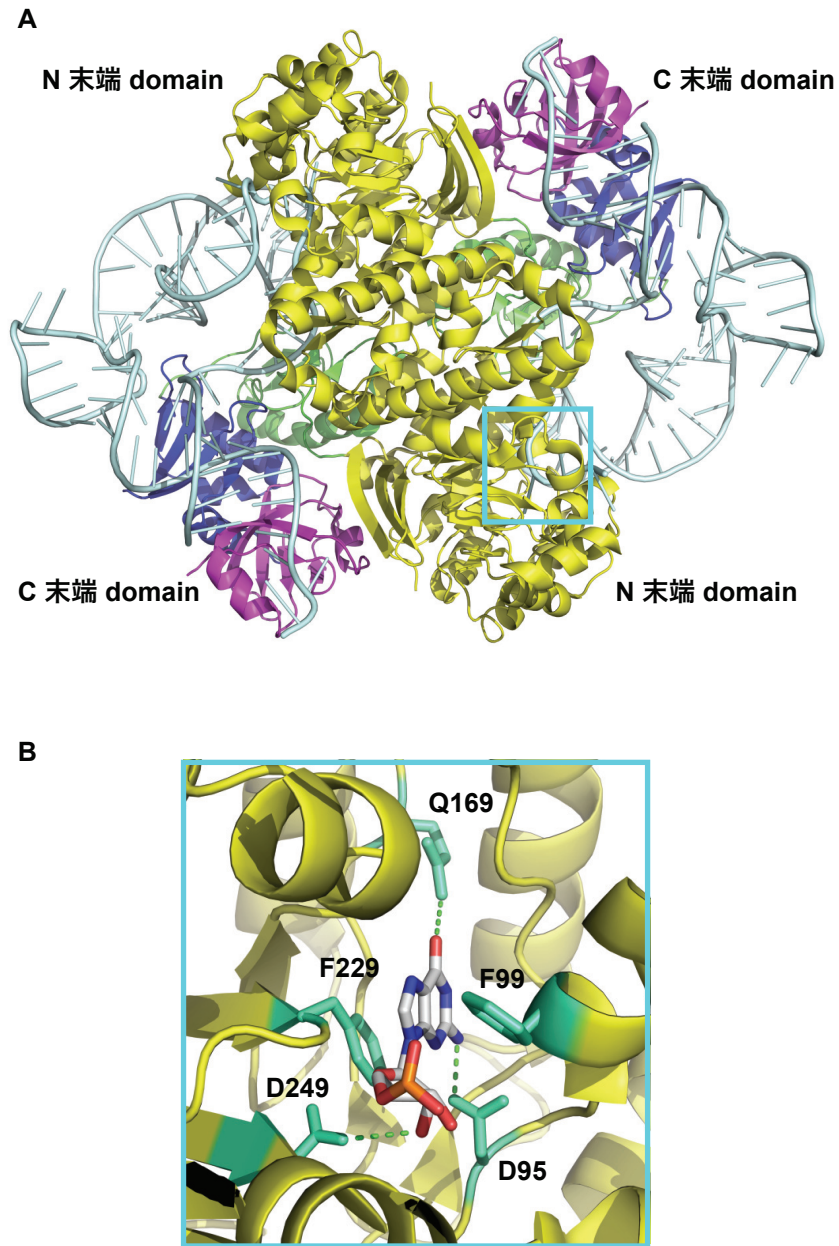


図 1-4 ArcTGT-tRNA 複合体の結晶構造

(A) Full-size ArcTGT と tRNA の共結晶構造 (PDB ID: 1J2B). 四角で囲まれた部位は ArcTGT の触媒ポケットを示している.

(B) ArcTGT の触媒ポケット. 15 位のグアニンの認識に重要なアミノ酸を示した. また, 緑色の点線は水素結合を示している.

1.3 tRNA 修飾酵素の基質 tRNA の認識機構

一連の tRNA 修飾過程において、各修飾ヌクレオシドがどのような順序で導入されるか、そして、tRNA が修飾される際にどのように構造変化するのか、に関する情報はほとんどない。tRNA 修飾酵素の触媒メカニズムのなかでも、tRNA の anticodon arm のヌクレオシドは L 字型 tRNA 構造の外部表面に位置しているため、その修飾を触媒する tRNA 修飾酵素は比較的容易に標的部位に接触することができると予想される。対照的に、L 字型 tRNA 構造のコア領域に位置するヌクレオシドは tRNA の内部に埋もれているため、その修飾を触媒する tRNA 修飾酵素は、標的部位のヌクレオシドに接触することが困難であると考えられる。そのため、tRNA のコア領域の修飾ヌクレオシドの導入には、大規模な tRNA の三次構造変化を伴うことが予想されている (Grosjean *et al.*, 1996)。しかしながら、tRNA 修飾酵素と複合体を形成した全長 tRNA の三次構造に関する報告はほとんど無いのが現状である。

tRNA 修飾酵素-全長 tRNA 複合体での結晶構造解析がなされた、数少ない報告例の一つが ArcTGT-tRNA 複合体の構造である (Ishitani *et al.*, 2003)。ArcTGT の触媒メカニズムに関する研究を以下に簡潔にまとめた。まず、PUA domain が L 字型 tRNA の acceptor stem を認識し、1 位から 15 位までのヌクレオシドを数えていくことで標的部位である G15 を見つける。その際 G15 は L 字型の tRNA の内部に埋もれているので、ここで tRNA の構造が変化せざるを得ない。実際、ArcTGT と結合している tRNA は λ 型と呼ばれる構造を形成していると報告された。L 字型構造では D arm は tRNA のコア領域に位置しているが、 λ 型では D arm が tRNA body から外側に突き出したユニークな構造を形成している (図 1-5)。従って、tRNA が L 字型から λ 型へ構造変化することで、ArcTGT が L 字型のコア領域に埋もれていた G15 を認識することが可能になると考えられる。ただし、tRNA 成熟過程において tRNA は修飾ヌクレオシドの導入に伴って、より安定な構造を形成していくと考えられる。そのため、L 字型から λ 型への構造変化は徐々に困難になることが予想された。

そこで、ArcTGT による preQ₀ の導入は、tRNA 修飾過程の初期段階に触媒されると仮説を立てた。本研究では、tRNA の各修飾ヌクレオシドがどれほど tRNA の構造安定性に寄与しているか、さらに、ArcTGT による反応は tRNA のヌクレオシド修飾のどの段階で行われるかを調べた。これらの解析を行うために、ArcTGT の基質 tRNA として tRNA 修飾ヌクレオシドや tRNA 修飾酵素に関する情報が最も蓄積している大腸菌の tRNA のうち、tRNA^{Ser(GGA)} を利用

することにした。また, tRNA^{Ser(GGA)} に存在している 6 つの修飾ヌクレオシドのうち 1 つだけを欠損させた一連の hypomodified tRNA^{Ser(GGA)}, 全ての修飾ヌクレオシドが導入されている native tRNA^{Ser(GGA)}, 全く修飾ヌクレオシドが導入されていない tRNA^{Ser(GGA)} transcript を用いた。以下 native tRNA^{Ser(GGA)}, 一連の hypomodified tRNA^{Ser(GGA)}, tRNA^{Ser(GGA)} transcript を tRNA^{Ser(GGA)} family と総称する。

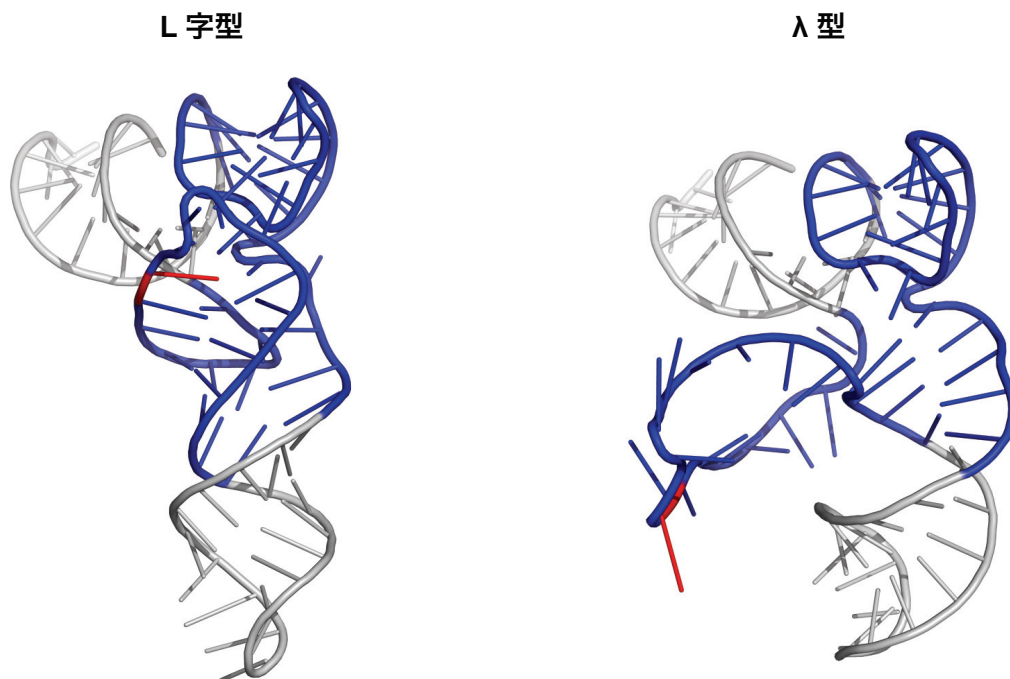


図 1-5 L 字型と λ 型 tRNA の三次構造の違い

L 字型 tRNA の D-arm, V-loop, T-arm が複雑に相互作用するコア領域は青色で示した。また, ArcTGT の標的部位である 15 位のグアニンは赤色で示してある。L 字型 tRNA, yeast tRNA^{Phe} (PDB ID: 1EHZ); λ 型 tRNA, *Pyrococcus horikoshii* tRNA^{Val} (PDB ID: 1J2B)。

第2章 *M. acetivorans* ArcTGT の単離と特性評価

2.1 材料と方法

2.1.1 *M. acetivorans* の培養

M. acetivorans C2A (Sowers *et al.*, 1984) は Riken BRC より購入した。液体培地は DSM medium 304 を改良したもの (Mahapatra *et al.*, 2006) を調製した (表 2-1)。CULTURE BAG (Fujimori Kogyo Co., Ltd.) に 4 L の液体培地を入れ、オートクレーブで滅菌した。嫌気条件にするために、CULTURE BAG 内を約 1 時間窒素置換し、methanol, cysteine, Na₂S をシリンジで添加した。*M. acetivorans* 種菌 100 mL を調製した培地にシリンジで添加し、37°C にて 4 日間静置培養した。

表 2-1 *M. acetivorans* の液体培地組成

表 2-1 <i>M. acetivorans</i> の液体培地組成		Trace element	
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0.56 g	Nitilotriacetic acid	1.50 g
Na ₂ HPO ₄	2.40 g	MgSO ₄	1.46 g
KCl	3.20 g	MnSO ₄ • 5H ₂ O	0.50 g
Yeast extract	4.00 g	NaCl	1.00 g
NH ₄ Cl	4.00 g	FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.10 g
MgSO ₄	18.44 g	CoSO ₄ • 7H ₂ O	0.18 g
NaCl	93.60 g	CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.10 g
1M MOPS (pH 7.0)	80.00 mL	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.18 g
Resazurin (1 mg/mL)	2.00 mg	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.01 g
Trace element	40.00 mL	AlK (SO ₄) ₂	0.01 g
Methanol	20.00 mL	H ₃ BO ₄	0.01 g
L-Cysteine-HCl • H ₂ O	1.00 g	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.01 g
Na ₂ S • 9 H ₂ O	1.00 g	NiCl ₂ • 6H ₂ O	0.03 g
dH ₂ O	up to 4 L	Na ₂ SeO ₃ • 5 H ₂ O	0.30 g
		dH ₂ O	up to 1,000 ml

2.1.2 *M. acetivorans* ArcTGT の精製

M. acetivorans C2A の菌体 ~ 30 g を 75 ml の 40 mM KCl を添加した buffer A (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT) に懸濁し, 超音波で菌体を破碎した. 遠心 (50,000 rpm, 4 hr) により S100 を回収した. 次いで, 30% 飽和硫酸濃度による沈殿を除いた後, 50% 飽和硫酸濃度で得られた沈殿を, 1.2 M (NH₄)₂SO₄ を添加した buffer A に懸濁し, Phenyl Sepharose HP column (20ml, GE Healthcare) で分画した. Buffer A 中, 1.2 M ~ 0.3 M (NH₄)₂SO₄ の直線濃度勾配により, 流速 2.0 ml/min, 400 ml の溶液で溶出させた. グアニン交換反応活性が検出された画分を Amicon-15 10 K (Merck Millipore) で濃縮し, 予め 50 mM KCl を添加した buffer A に平衡化しておいた HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column (GE Healthcare) で分画した. 流速 0.8 ml/min で溶出させ, グアニン交換反応活性が検出された画分を HiTrap Q HP column (5 ml, GE Healthcare) で分画した. Buffer A 中, 50 mM ~ 300 mM KCl の直線濃度勾配により, 流速 1.0 ml/min, 100 ml の溶液で溶出させた. グアニン交換反応活性が検出された画分を 40 mM KCl を添加した buffer B (20 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT) に対し透析し, HiTrap Heparin HP column (1 ml, GE Healthcare) で分画した. Buffer B 中, 40 mM ~ 600 mM KCl の直線濃度勾配により, 流速 0.5 ml/min, 20 ml の溶液で溶出させた. グアニン交換反応活性が検出された画分は, Amicon-15 10 K を用いて 40 mM KCl を添加した buffer A に置換した. これを, Mono Q column (1.0 ml, GE Healthcare) により分画した. Buffer A 中, 40 mM ~ 300 mM KCl の直線濃度勾配により, 流速 0.5 ml/min, 20 ml の溶液で溶出させた. 最終精製産物は Amicon-0.5 10 K (Merck Millipore) で濃縮し, -80°C に保存した. 各ステップで得られたタンパク質濃度は波長 228.5 nm と 234.5 nm における吸光度を用いて決定した (Ehresmann *et al.*, 1973). また, 最終精製産物は SDS-PAGE で精製具合を観察するとともに, そのバンドの濃さから, ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて濃度を決定した.

2.1.3 ArcTGT 発現ベクターの作製

2.1.3.1 pETY_Blue の作製

ArcTGT 発現プラスミドの作製に用いた primer は表 2-2 に示した. 青白選択が可能でハイコピー数ベクターである, pETY_Blue は以下の方法で作製した. *lac* promoter と β -galactosidase α fragment を 大腸菌 Q13 株から blue/white primer を用いて PCR 法によって増幅させた. 増幅

させた PCR 産物は, pET21a(+) (Merck Millipore) の Hind III と Nhe I site に導入した. 結果得られたベクターを pET_Azure とした. pET_Azure の RNA I inhibitor module は, Azure primer を用いて iPCR 法 (Ochman *et al.*, 1988) によって除いた. iPCR によって得られた二本鎖 DNA は, T4 polynucleotide kinase (Takara) と T4 DNA ligase (Takara) によって連結, 環状化した. さらに, RNA I 遺伝子は RNA I primer を用いて QuikChange[®] 法によって変異遺伝子にした.

表 2-2 ArcTGT 発現用プラスミドに用いた DNA primer

primer	DNA sequence (5' → 3')
Blue/white_F	GGG GAA GCT TGC GCA ACG CAA TTA ATG
Blue/white_R	GGG GGC TAG CTT ATT CGC CAT TCA GGC
Azure_F	GGC GCT CTT CCG CTT CCT CGC
Azure_R	GGT GCC TAA TGA GTG AGC TAA C
RNA I_F	GGC TAC ACT AGA AGA ACA GTA TTT GGT ATC
RNA I_R	GAT ACC AAA TAC TGT TCT TCT AGT GTA GCC
MA4419-1_F	GGG AAT TCA TAT GTC AGC GAT ATT TGA AA
MA4419-1_R	GGG GGT CGA CTT CTT TTT TCC AGG CTG
MA0121-1_F	GGG AAT TCA TAT GAA CAG CAA TGT GGA AA
MA0121-1_R	TGT TCG ACT TAA GCA CTC GAG TTA AAT TAA GAT TTT ATG ACT TA
MA4419-2_F	TGC TTA AGT CGA ACA CGT AGA GGA TCG AGA
MA4419-2_R	CGC ATC GTG GCC GGC ATC AC
MA0121-2_F	GCC GGC CAC GAT GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
MA0121-2_R	TGT TCG ACT TAA GCA CTC GAG TTA AAT TAA GAT TTT ATG ACT TA

2.1.3.2 pETY_MA4419-His₆ と pETY_MA0121-His₆ の作製

ゲノム情報から, *M. acetivorans* (GenBank Accession No. AE010299) ArcTGT は 2 種類のポリペプチドからなると予想された. 2 種類のポリペプチドに相当する遺伝子の予想から, MA4419 と MA0121 を発現させるベクターを以下の方法で作製した. MA4419 は, *M. acetivorans* ゲノム DNA から MA4419-1 primer を用いて PCR 法によって増幅させた. MA0121 は MA0121-1 primer を用いて PCR 法によって増幅させた. MA4419 は DNA 制限酵素 Nde I と Xho I で消化し, 同様の DNA 制限酵素で消化した pETY_Blue に導入し, pETY_MA4419-His₆ を作製した. 一方, MA0121 は DNA 制限酵素 Nde I と Sal I で消化し, Nde I と Xho I で消化した pETY_Blue に導入し, pETY_MA0121-His₆ を作製した.

2.1.3.3 pETY_MA4419-MA0121-His₆ の作製

MA4419 と MA0121 を共発現するベクターは In-Fusion[®] Advantage PCR Cloning system (Clontech) を基に以下の方法で作製した. ベクター DNA として, pETY_MA4419 の DNA 配列を MA4419-2 primer を用いて iPCR 法で増幅させた. インサート DNA として, pETY_MA0121 から, MA0121-2 primer を用いて PCR 法によって増幅させた. また, MA0121 と MA4419 遺伝子間には, 共発現ベクター: pACYCDuet-1 (Novagen) 由来のリンカー配列を用いた. 得られた 2 つの DNA を, In-Fusion 反応によって連結して pETY_MA4419-MA0121-His₆ を作製した (図 2-1).

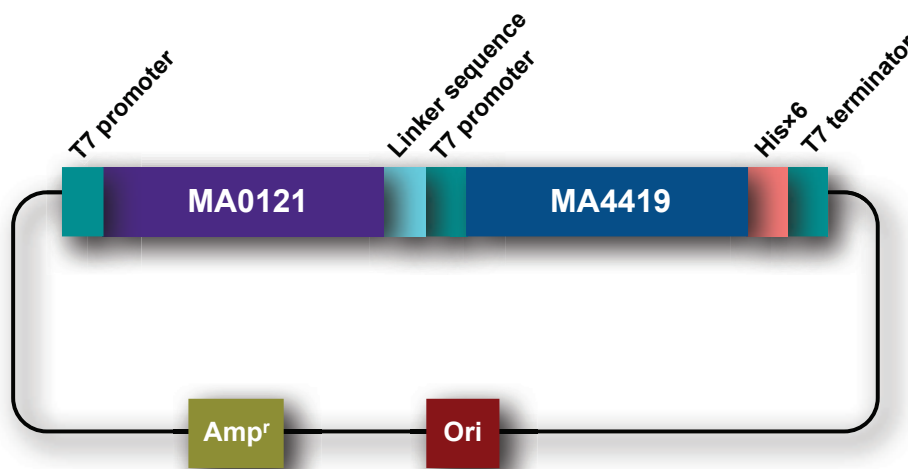


図 2-1 pETY_MA4419-MA0121-His₆

2.1.4 Recombinant ArcTGT の過剰発現と精製

大腸菌 ER2566 株 (New England Biolabs) を pETY_MA4419-MA0121-His₆ で形質転換し、終濃度 50 µg/ml になるようにアンピシリンを添加した 100 ml の LB 培地で、37°C にて培養した。波長 600 nm における濁度が 0.5 になった時点で、終濃度 0.5 mM になるように isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して、さらに 4 時間培養した。遠心 (5,800 × g, 15 分) により集菌した後、10 ml の buffer C (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 200 mM KCl) に懸濁し、超音波によって菌体を破碎した。遠心 (30,000 × g, 30 分) により沈殿を除いた後、細胞抽出液 S30 を Ni-NTA superflow column (1 ml, QIAGEN) で分画した。Buffer C 中、0 mM ~ 300 mM イミダゾールの直線濃度勾配により、流速 0.5 ml/min, 40 ml の溶液で溶出させた。Recombinant ArcTGT が含まれる画分は SDS-PAGE で検出し、Amicon-15 10 K で濃縮した。次いで、50 mM KCl を添加した buffer A で平衡化しておいた Superdex 200 column (25 ml, GE Healthcare) を用いて、流速 0.25 ml/min で溶出させた。Recombinant ArcTGT が含まれる画分は、HiTrap Q HP (1 ml) で分画した。Buffer A 中、50 mM ~ 300 mM KCl の直線濃度勾配により、流速 0.5 ml/min, 20 ml の溶液で溶出した。Recombinant ArcTGT が含まれる画分は、Amicon-4 10 K を用いて 100 mM KCl を添加した buffer A に置換した。これを、HiTrap Heparin HP column (1 ml) で分画した。Buffer A 中、250 mM ~ 550 mM KCl の直線濃度勾配により、流速 0.5 ml/min, 20 ml の溶液で溶出した。Recombinant ArcTGT だけを含む画分を、Amicon-4 10 K を用いて、40 mM KCl を添加した buffer A に置換し、-80 °C に保存した。最終精製産物のタンパク質濃度は、波長 280 nm における吸光度を測定し、ProtPram tool (<http://web.expasy.org/protrapam/>) を用いて決定した。その他のタンパク質濃度は 2.1.2 で記述した通りである。

2.1.5 *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript の調製

T7 promoter と pre-tRNA^{Met} (MAAt4696) からなる DNA 断片は, MAAt4696 primer を用いて PCR 法で増幅させた. 得られた DNA 断片は pUC19 (Takara) の EcoR I と Pst I site 間に導入した. MAAt4696 遺伝子に含まれるイントロン部位は, MAAt4696-intron primer を用いて, iPCR 法によって除いた. 次いで, T4 polynucleotide kinase と T4 DNA ligase によって, 直鎖 DNA を環状 DNA にした. *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript は, T7 primer と 2'-*O*-methyl (2'-OMe) primer を用いて PCR で調製した鋳型を用い, T7 RNA polymerase を用いた *in vitro* run off 転写法 (Milligan *et al.*, 1987) で調製した. 次いで, HiTrap Q HP column (5 ml) を用いて tRNA^{Met} を精製した. Buffer D (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂) 中, 0.4 M ~ 1.0 M KCl の直線濃度勾配により, 流速 1.0 ml/min で分画した. 最終精製産物の画分は, エタノール沈殿により, 脱塩と濃縮を行った.

表 2-3 *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript の調製に用いた DNA primer

primer	DNA sequence (5' → 3')
MAAt4696_F	GGG GGA ATT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GCC CGG ATA GCC TAG TC
MAAt4696_R	GGG GCT GCA GTG GTG CCC GGA GCG TGA
MAAt4696-intron_F	ATC TGG AGG TCG CGT GTT CG
MAAt4696-intron_R	TAT GAG TCT GGC GCC CCA AC
T7 primer	GGG GCT GCA GTA ATA CGA CTC ACT ATA
2'-OMe primer	T (Gm)G TGC CCG GTG CGT GTC T

2.1.6 ArcTGT によるグアニン交換反応

ArcTGT の比活性, 反応速度論的パラメーター (k_{cat} , K_m) は, RI 実験によって測定した. 反応液の組成は, 100 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 100mM NaCl, 1mM DTT, 43.2 μ M [^{14}C]-guanine hydrochloride (Moravek), *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript, ArcTGT (tRNA と 酵素の濃度は結果に示した) で, 37°C にて行った. 反応後に, 適当量を Whatman 3MM ろ紙 に染み込ませ, 5% trichloroacetic acid (TCA) 溶液に浸して反応を停止させた. さらに, 5% TCA 溶液で振盪することで, 反応産物をろ紙片に沈着させるとともに, 未反応の放射性グアニンを除いた. 最後に 100% エタノールに浸してから乾燥させた. 反応量の測定は, AccuFLEX-LSC 7200 (Hitachi Aloka Medical, Ltd.) を使用した.

2.1.7 質量分析による native ArcTGT 構成ポリペプチドの同定

M. acetivorans ArcTGT の最終精製産物を SDS-PAGE により分離し, PVDF メンブレン (Fluoro Trans[®] W 0.2 μ m, PALL Life Sciences) に転写した. 以下に詳細な方法を記す. ろ紙 ① と ② を溶液 (300 mM Tris, 0.05% SDS, 20% methanol) に, ろ紙 ③ と ④ を溶液 (12.5 mM Tris, 0.025% SDS, 10% methanol) に 5 分間浸し, エレクトロブロットング装置の陽極側から順番に重ねた. さらに, メタノールで洗浄し溶液 A (12.5 mM Tris, 0.025% SDS, 10% methanol, 40 mM ϵ -amino-n-caproic acid) に 5 分間浸した PVDF メンブレンと溶液 A に 5 分間浸したゲルを順に重ねた. 最後に, 溶液 A に 5 分間浸しておいたろ紙 ⑤ と ⑥ を重ねて 90 分電気泳動することで, メンブレンにタンパク質を転写した. メンブレンは染色液 (0.008% Direct Blue 71, 40% ethanol, 10% 酢酸) と洗浄液 (40% ethanol, 10% 酢酸) を用いて, 染色と洗浄を行った. 乾燥させたメンブレンに検出されたタンパク質を切り出し, 還元用 buffer (500 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.3% EDTA-Na, 5% acetonitrile, 10 mg/ml DTT, 8 M グアニジン塩酸塩) を加えて, 56°C にて 1 時間保温した. 反応後のメンブレンを超純水で洗浄し, アルキル化溶液 (55 mM ヨードアセトアミド, 25 mM 重炭酸ナトリウム) を加え, 30°C にて 45 分熱処理した. 反応後のメンブレンは 2% アセトニトリル溶液で洗浄しエンドプロテアーゼ Lys-C による消化を行った. 反応液の組成は, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50% acetonitrile, 0.0005% TritonX-45, 2.5 ng/ μ l Lys-C で, 37°C にて 3 時間行った. その後, 反応液 1 μ l とマトリックス溶液 (33% α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA), 0.066% トリフルオロ酢酸) 4 μ l を混合して, 質量分析用のプレートにスポット

した。質量分析装置は, UltraFlex TOF/TOF mass spectrometer (BRUKER DALTONICS®) を使用し, Mascot database search (MATRIX SCIENCE) の情報を基にポリペプチドを同定した。

2.1.8 LC-MS による全長 tRNA の分子質量解析

preQ₀ は過去に報告されている方法に基づいて, 岐阜大学・工学部・岡夏央准教授に合成して頂いた (Migawa *et al.*, 1996). 実際に *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript への preQ₀ 導入を検証した。反応液の組成は, 100 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 16 μM tRNA^{Met} transcript, 1 mM preQ₀, 0.5 μM ArcTGT で, 37°C にて 1 時間行った。反応後の溶液は, 水飽和フェノールを用いて tRNA を抽出し, エタノール沈殿で脱塩と濃縮を行った。液体クロマトグラフィー解析は ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm 2.1 × 100 mm Column (Waters) を用いて, 流速 0.25 μl/min, 100 mM 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP), 8.6 mM Triethylamine (TEA) から 50 mM HFIP, 4.3 mM TEA, 50% methanol の直線濃度勾配により溶出させた。質量分析装置は, Xevo™ QTof mass spectrometry instrument (Waters) を使用した。

2.2 結果

2.2.1 Native ArcTGT の精製

まず初めに, *M. acetivorans* 細胞抽出液 S100 から native ArcTGT の単離を試みた. 酵素活性の定義は, *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript に 1 pmol/min のグアニンの取り込みを触媒する量を 1 unit とした. 精製結果を表 2-2-1 に記す. Mono Q column による最終精製物の回収率は 0.19% と非常に低い値となった. これは, 5 段目に用いた HiTrap Q HP column による回収率が低かったことに起因すると考えられる. HiTrap Q HP column の代わりとして, 一般的に用いられるほとんどのカラムを用いて回収率の改善を試みたが, このカラムよりも効率が良いカラムを見出すことはできなかった. 3 段目と 4 段目も同様に適当なカラムを見いだすことが困難である中で, Phenyl HP と Sephacryl S-200 column のパフォーマンスが最も効率が良いと考えられた. しかしながら, 6 段目と 7 段目での回収量は高効率となった. 図 2-2-1 は, 最終精製ステップでの Mono Q column による精製画分の SDS-PAGE の結果である. ここでは, 2 種類のポリペプチドだけが, 等モルの割合で検出された. これらのタンパク質を MALDI-MS 装置で質量分析したところ, 各々 MA4419 と MA0121 であることが判明した. ゲノム情報から, *M. acetivorans* ArcTGT は split type であり, そのポリペプチド因子は MA4419 と MA0121 であると予想されていた (Phillips *et al.*, 2010). また, full-size type との配列比較により, MA4419 は full-size type の N 末端ドメイン, MA0121 は full-size type の C 末端ドメインに相当すると考えられていた. 本研究で得られた結果は, これまでの予想を裏付けるものであり, split-type ArcTGT は細胞内で 2 種類のポリペプチドが複合体を形成していることが判明した.

表 2-2-1 Native ArcTGT の精製

Step	Protein (mg)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
S100	3100	29000	9.4	1.0	100
Ammonium sulfate	1600	27000	17	1.9	94
Phenyl HP	47	7600	160	17	26
Sephacryl S-200	24	4800	200	21	17
HiTrap Q HP	0.048	100	2105	220	0.34
HiTrap Heparin HP	0.014	59	4370	470	0.20
Mono Q	0.002	54	27000	2900	0.19

各精製ステップの活性画分の溶液と 11 μ M *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript を含む反応溶液 (20 μ l) を 37°C にて 15 分反応させた. 反応後の溶液から, 10 μ l をろ紙にしみ込ませ, 放射線量を測定した.

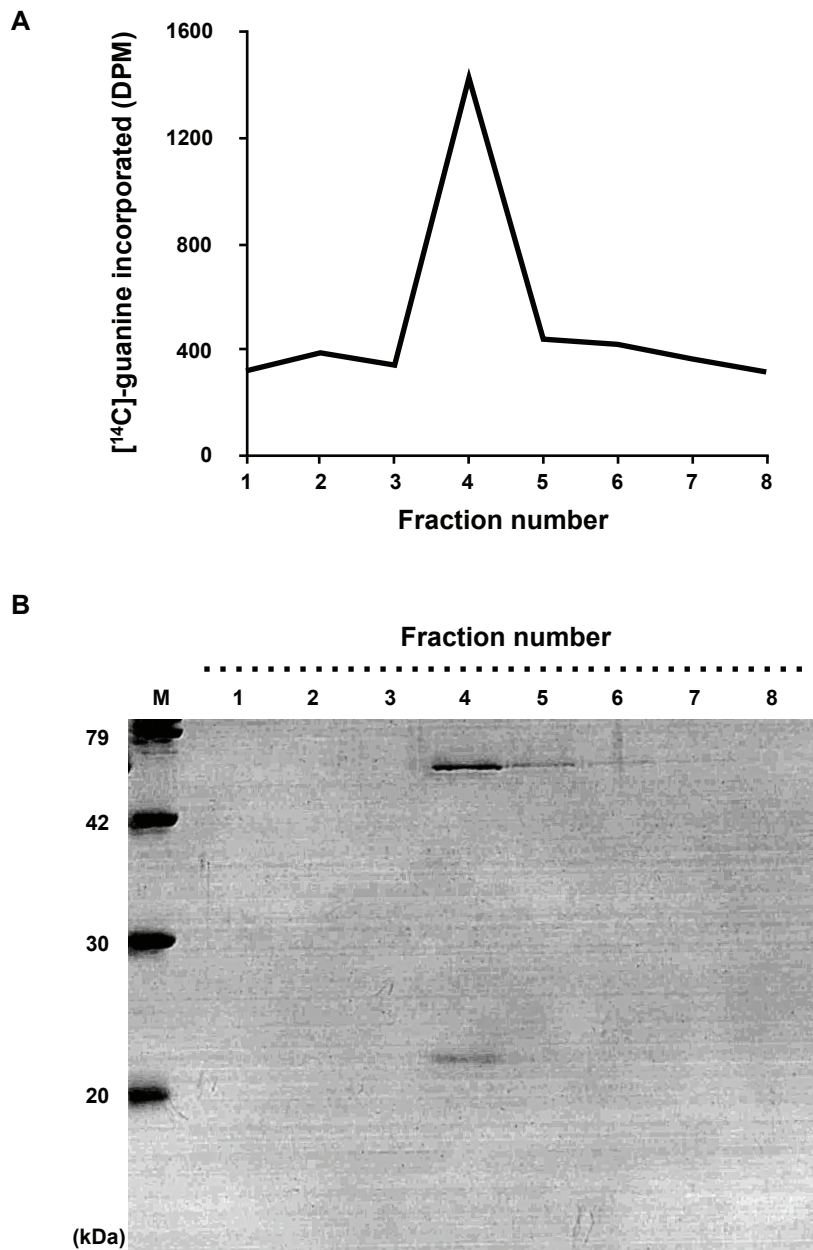


図 2-2-1 Native *M. acetivorans* ArcTGT の精製

(A) Mono Q カラムより得られた各フラクションのグアニン交換反応の活性測定. 6.4 μ M *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript を含む反応溶液 (10 μ l) を 37°C にて 15 分反応させた. 反応後の溶液から 10 μ l をろ紙にしみ込ませ, 放射線量を測定した.

(B) Mono Q カラムより得られた各フラクションに含まれるポリペプチドの検出. Fraction no. 1 から 8 の各溶液 20 μ l を SDS-PAGE で分離し, CBB により染色した. M は protein marker で, 各バンドの分子質量を示した.

2.2.2 Recombinant ArcTGT の過剰発現と精製

Recombinant ArcTGT は、大腸菌細胞内で過剰発現させ、その細胞抽出液から精製した。まず初めの試みとして、MA4419 と MA0121 をそれぞれ過剰発現させることにした。しかしながら、MA4419 は不溶化タンパク質画分に検出され、MA0121 に至っては全く発現していない結果となった。そこで、MA4419 と MA0121 を共発現させることにした。菌体破碎後の細胞抽出液中のタンパク質を SDS-PAGE で分析したところ、MA4419 と MA0121 が可溶化していることが観察された。共発現用ベクターでは、MA4419 の C 末端に His オリゴペプチドが連結されるように構築しておいたので、精製ステップの 1 段目に、Ni-NTA superflow column を用いた。最終精製産物として、native ArcTGT と同様に、2 つのポリペプチドが SDS-PAGE より検出された (図 2-2-2)。表 2-2-2 には recombinant ArcTGT の精製結果を示した。また、native ArcTGT と recombinant ArcTGT の最終精製産物の比活性はそれぞれ、27,000 U/mg と 31,000 U/mg であった (表 2-2-1, 2-2-2)。従って、比活性の観点から、native ArcTGT とヒスチジンタグを融合した recombinant ArcTGT は殆ど同程度の活性を示すことが判明した。

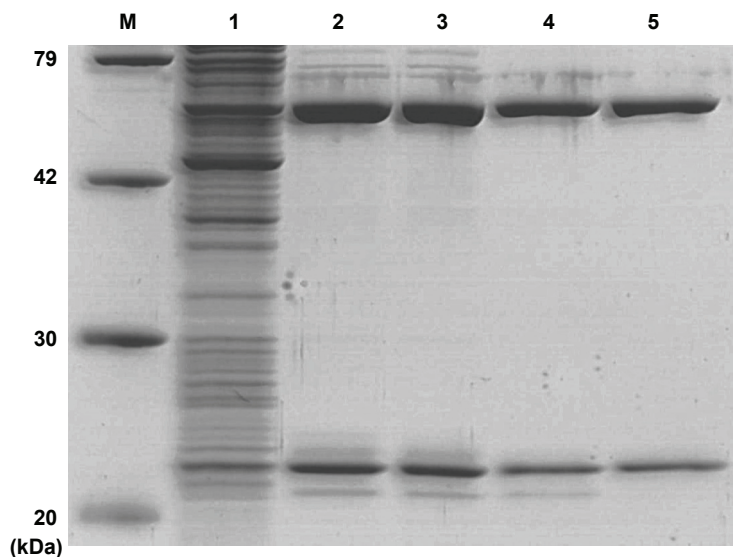


図 2-2-2. Recombinant *M. acetivorans* ArcTGT の精製

Lane 1, S30; lane 2, Ni-NTA column; lane 3, superdex 200 column; lane 4, HiTrap Q HP column; lane 5, HiTrap Heparin HP column; M, protein marker.

表 2-2-2 Recombinant *M. acetivorans* ArcTGT の精製

Step	Protein (mg)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
S30	12	28000	2300	1.0	100
Ni-NTA superflow	1.1	14000	12000	5.4	48
superdex 200	0.4	5800	15000	6.5	21
HiTrap Q HP	0.14	3000	21000	9.5	11
HiTrap Heparin HP	0.042	1300	31000	14	5

各精製ステップの活性画分の溶液と 11 μ M *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript を含む反応溶液 (20 μ l) を 37°C にて 15 分反応させた. 反応後の溶液から 10 μ l をろ紙にしみ込ませ, 放射線量を測定した.

2.2.3 *M. acetivorans* ArcTGT の特性評価

M. acetivorans ArcTGT 複合体の分子質量を, ゲルろ過カラムにより決定した. カラムは, Superdex 200 column を, 分子質量マーカーとして, glutamate dehydrogenase (290 kDa), aldolase (158 kDa), lactate dehydrogenase (140 kDa), enolase (67 kDa) を用いた (図 2-2-3). 最終的に回収できた native ArcTGT の量が非常に少なかったため, 精製した recombinant ArcTGT を用いて解析した. LC クロマトグラムの結果から, 波長 280 nm における吸収が fraction no. 14 で極大となった. このことから, *M. acetivorans* ArcTGT の分子質量は約 150 kDa と見積もることができ. さらに, SDS-PAGE の結果から MA4419 と MA0121 が等モルの割合で存在していた. MA4419 の分子質量は 54 kDa, MA0121 の分子質量は 19 kDa であることから, *M. acetivorans* ArcTGT はヘテロテトラマー ($\alpha_2\beta_2$) 構造を形成していることが判明した. また, native ArcTGT の粗精製サンプルを同様の方法で分析したところ, recombinant ArcTGT と全く同じ溶出パターンが観察された.

次いで, *M. acetivorans* ArcTGT の触媒反応における最適条件を分析した. 至適 pH は, *M. acetivorans* の生育が pH ~ 7.0 であることを考慮して, pH 5.8 ~ 9.0 の範囲を検証した. 結果として, *M. acetivorans* ArcTGT は pH 7.5 で最も強い活性を示した. また, *P. horikoshii* ArcTGT の結晶構造解析 (Ishitani *et al.*, 2002) では, Mg^{2+} と Zn^{2+} が結合していた. そこで, 各々の金属イオンについて検証した. その結果, *M. acetivorans* ArcTGT は 10 mM Mg^{2+} で最も強い活性を示した. しかしながら, 0 ~ 20 mM Zn^{2+} を検証したところ, *M. acetivorans* ArcTGT の活性には全く影響が観察されなかった. おそらく, *M. acetivorans* ArcTGT が, 細胞内の Zn^{2+} を結合したままで精製されたと考えられる. 本研究で行った, *M. acetivorans* ArcTGT のグアニン交換反応は, ここで決定した最適条件を用いることにした.

最後に, native と recombinant *M. acetivorans* ArcTGT を反応速度論的パラメーターに基づいて比較した (表 2-2-3). Native ArcTGT の最終精製産物量が非常に少ないことから, 反応速度論的パラメーターは一度しか測定することができなかった. 結果として, *kcat/Km* 値はどちらも同程度の値であることが判明した.

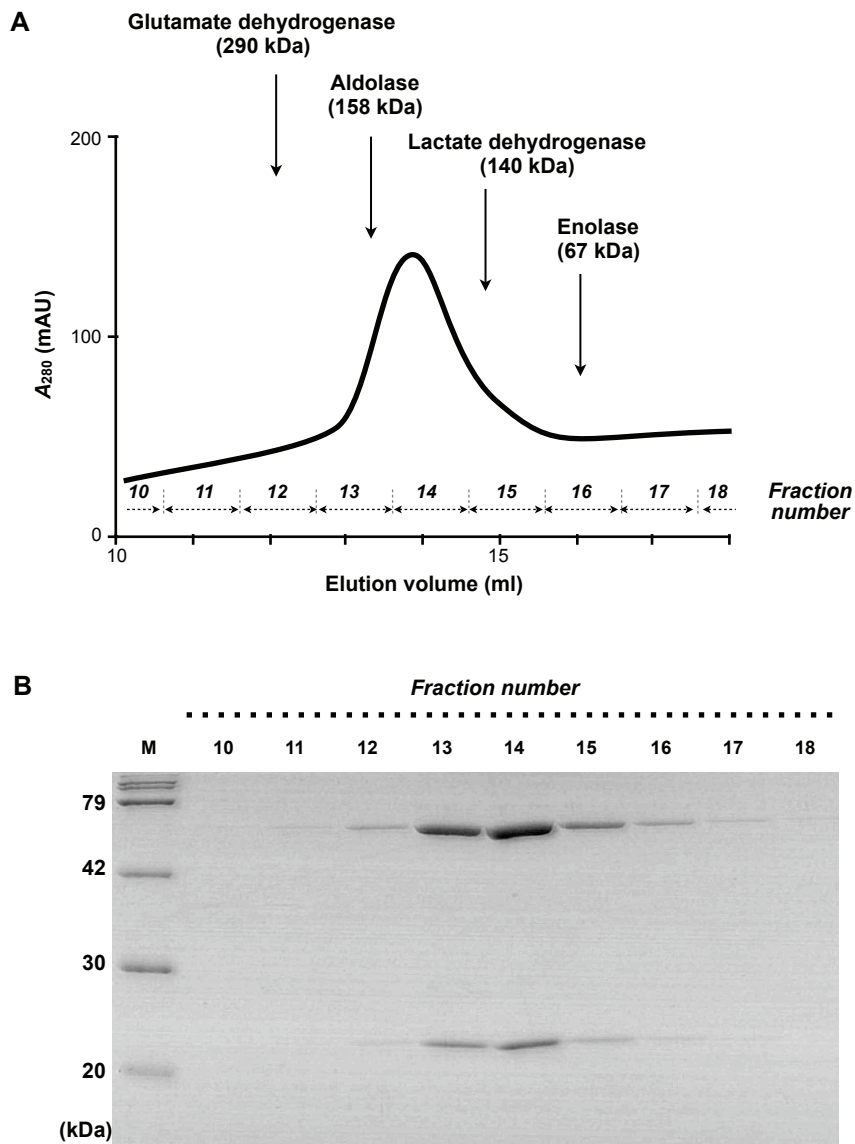


図 2-2-3 Split-type ArcTGT の四次構造プロファイリング

(A) Recombinant *M. acetivorans* ArcTGT の分子質量をゲルろ過カラム Superdex 200 の溶出パターンから解析した。結果は、波長 280 nm における吸光度をプロットしたものである。Protein marker として glutamate dehydrogenase (290 kDa), aldolase (158 kDa), lactate dehydrogenase (140 kDa), enolase (67 kDa) を使用し、各々の溶出位置を矢印で示した。

(B) Fraction no. 10 から 18 の各溶液 20 μ l に含まれるポリペプチド因子を SDS-PAGE により検出した。M: protein marker.

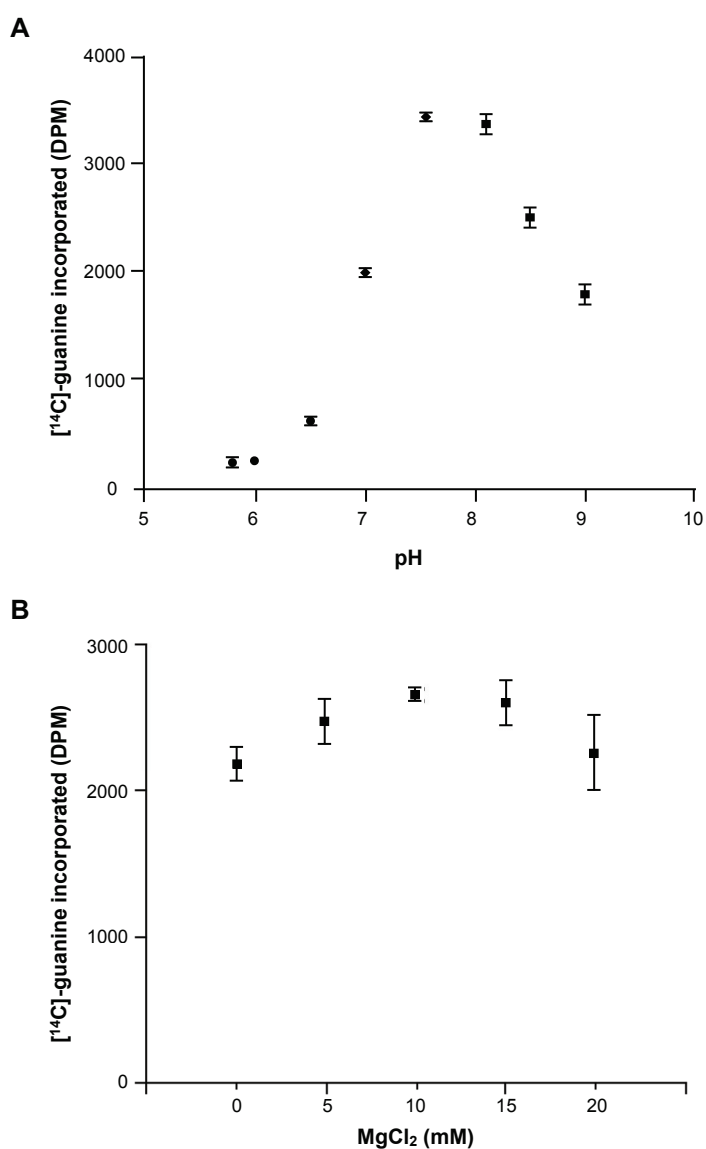


図 2-2-4 *M. acetivorans* ArcTGT の触媒反応における至適条件

(A) 緩衝液は, 100 mM MES-NaOH (pH 5.8, 6.0, 6.5) (*circle*), HEPES-NaOH (pH 7.0, 7.5) (*diamond*), TAPS-NaOH (pH 8.1, 8.5, 9.0) (*square*) を用いた. さらに, 11 μ M tRNA^{Met} transcript と 0.4 μ g recombinant ArcTGT を使用し 37°C にて 5 分反応させた. 反応後の溶液から 10 μ l をろ紙にしみ込ませ, 放射線量を測定した. この実験は 3 回行い, その平均値をプロットした. エラーバーは標準偏差を示している.

(B) 0 ~ 20 mM MgCl₂ の濃度を検証した. 11 μ M tRNA^{Met} transcript と 0.4 μ g recombinant ArcTGT を使用し 37°C にて 5 分反応させた. 反応後の溶液から 10 μ l をろ紙にしみ込ませ, 放射線量を測定した. 試行回数は 3 回行い, 平均値をプロットした. エラーバーは標準偏差を示している.

表 2-2-3 *M. acetivorans* ArcTGT の反応速度論的パラメーター

ArcTGT	k_{cat} (10^{-3} s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
recombinant	66.7 ± 5.05	2.1 ± 0.34	3.1×10^4
native	31.1	1.2	2.7×10^4

反応には, 0.5 ~ 11 μM *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript を使用した. Recombinant *M. acetivorans* ArcTGTは 0.29 μM , native *M. acetivorans* ArcTGT は 10 nM の濃度で行った.

2.2.4 Recombinant ArcTGT を利用した preQ₀(15)-tRNA の調製

実際に, *M. acetivorans* ArcTGT が preQ₀ を tRNA に導入できるか, 質量分析により確認した. *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript (G(15)-tRNA^{Met}) の場合, 分子質量の理論値は, 24,885 Da, preQ₀(15)-tRNA^{Met} の場合, 24,909 Da となる. 図 2-2-5 から, コントロールとして用いた G(15)-tRNA^{Met} は, 理論値通りの質量として検出された. また, ナトリウム付加体として, 24,906 Da のピークも検出された. G(15)-tRNA^{Met}, preQ₀, recombinant ArcTGT を反応させたサンプルから回収した tRNA の質量は, preQ₀(15)-tRNA^{Met} の理論値と一致していた. また, G(15)-tRNA^{Met} のピークの大幅な減少が観察された. G(15)-tRNA^{Met} の質量分析と同様に, 24,930 Da はナトリウム付加体である. また, 結果は省略したが, RNase T₁ 分解断片の MS/MS 解析から, preQ₀ が実際に *M. acetivorans* tRNA^{Met} の 15 位に存在していることも確認した.

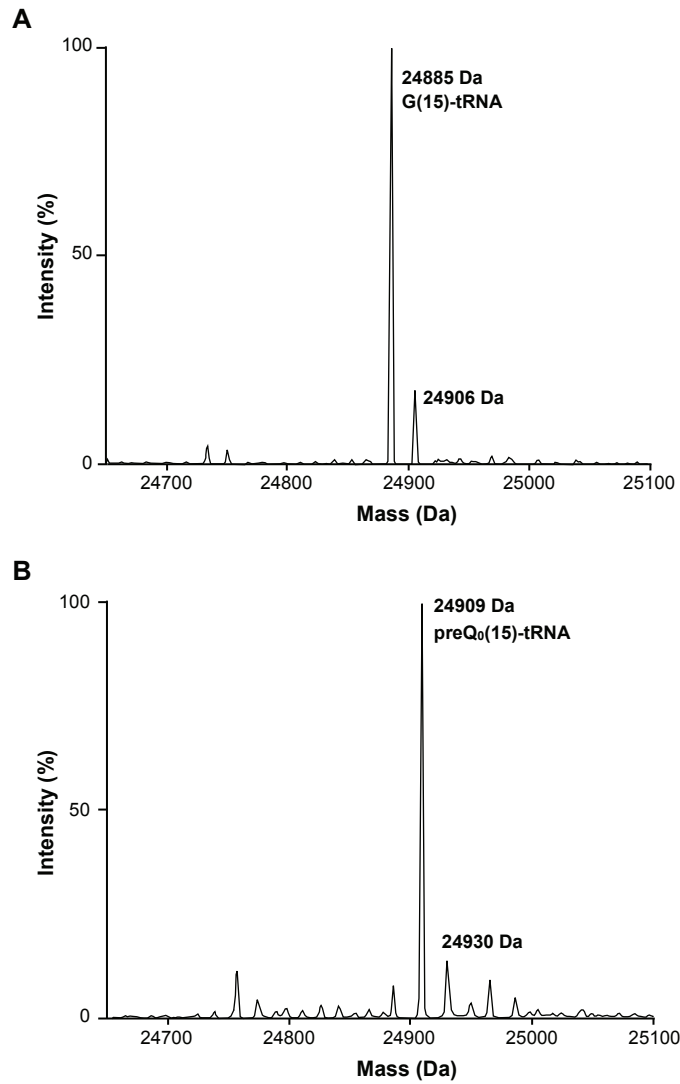


図 2-2-5 Recombinant *M. acetivorans* ArcTGT による preQ₀(15)-tRNA の調製

(A) *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript の質量分析. (B) *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript, preQ₀, recombinant ArcTGT を反応させたサンプルから回収した tRNA の質量分析.

2.3 考察

古細菌は一般的に、好酸性、好塩性、好熱性、嫌気性等の極限環境下で生育するため、その培養は非常に困難なものである。さらに、古細菌の細胞抽出液から、native タンパク質を精製するにはリットルスケールでの培養が必要となる。そのため、今のところ古細菌由来のタンパク質は古細菌のゲノム情報を基に、大腸菌細胞による発現系を用いることが一般的である。この手法では、ヒスチジンタグ等の配列を付加することが可能なので、その精製は非常に容易である。しかしながら、古細菌特有のタンパク質成熟過程が存在する可能性があるため、大腸菌細胞により発現された古細菌由来のタンパク質 (recombinant protein) の特性が、本当に native タンパク質のそれと同じとは言い切れない。しかしながら、native タンパク質と大腸菌によって過剰発現された recombinant タンパク質の活性を比較した例はほとんどない。本研究室では、これまで *M. acetivorans* の大量培養系を深化させることで、一度に 6 L スケールの培養を可能にした。そこで、先に挙げた問題を解明しようと試みた。まず、*M. acetivorans* 細胞抽出液から native ArcTGT を単離することに成功した。さらに、大腸菌発現系を利用し、ヒスチジンタグが融合した recombinant *M. acetivorans* ArcTGT の単離精製も行った。Native と recombinant ArcTGT の触媒効率を、比活性と反応速度論的解析に基づいて比較した結果、native ArcTGT の比活性、tRNA に対する反応速度論的パラメーター (k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m) は、recombinant ArcTGT のそれらと、どれも同程度の値であることが判明した。従って、大腸菌発現系を利用して調製した *M. acetivorans* 由来 ArcTGT の有効性を示すことができた。しかしながら、カラムクロマトグラフィーによる精製過程において、native ArcTGT と recombinant ArcTGT に唯一大きな違いが観察された。精製テーブルからも分かるように、native ArcTGT の回収量は非常に低いものであった (表 2-2-1, 2-2-2)。Recombinant ArcTGT とは対照的に、native ArcTGT に有効なカラムは少なく、カラムクロマトグラフィーによる濃縮は困難であった。ArcTGT のアミノ酸配列から、pI (Isoelectric point) の理論値は pH 7.6 と算出された。しかしながら、native と recombinant ArcTGT の精製に、陽イオン交換カラム (S-HP, pH 7.0) を用いたところ、ほとんど濃縮効果が得られなかった。一方、陰イオン交換カラム (Q-HP, pH 7.6) は、recombinant ArcTGT には非常に効果的であった。Native ArcTGT に対しては S-HP よりも効果的ではあるが、recombinant ArcTGT の溶出パターンと比較すると、非常にブロードなピークとして溶出されてしまった。この原因として、native ArcTGT は *M. acetivorans* 細胞抽出液中の古細菌固有のタ

ンパク質や RNA 等と複合体を形成しており、カラムクロマトグラフィーによる精製が進むにつれて、ArcTGT と比較的弱く相互作用している因子が、徐々に外れていったと考えられる。

P. horikoshii, *E. coli*, human TGT の基質 tRNA に対する K_m 値はそれぞれ, 0.57, 0.19, 0.34 μM であることが報告されており (Slany *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010), *M. acetivorans* ArcTGT のそれよりも小さい値である。従って, split-type ArcTGT の基質 tRNA に対する親和性は, full-size ArcTGT や QueTGT よりも低い可能性が示唆された。今のところ split-type ArcTGT の研究報告は殆どされておらず, split type と full-size type の相違点に関する今後の解析が必要である。

Full-size ArcTGT は, ホモダイマー型の複合体 (α_2) を形成していることが結晶構造で明らかにされている (Ishitani *et al.*, 2002)。しかしながら, split-type ArcTGT ではその配列相同性から, ヘテロテトラマー型複合体構造 ($\alpha_2\beta_2$) が予想されているだけであり, それを裏付ける決定的な証拠はなかった。本研究では, 初めて native split-type ArcTGT をヘテロテトラマー型複合体構造として単離精製することに成功し, ゲノム情報からの予想が正しいことを示した。Split-type ArcTGT では, α サブユニットと β サブユニットが細胞内で互いに強固に相互作用しており, おそらく全体構造として full-size ArcTGT と同様の構造を形成しているのだろう。また, ArcS 等の他種のポリペプチド因子が複合体形成に関与していないことも判明した。

Recombinant ArcTGT の調製の際, 2 種類のポリペプチドを個々に過剰発現させる試みを行ったが, 可溶化タンパク質として回収することができなかった。一方, 共発現系による調製では, どちらのポリペプチドも可溶化タンパク質として大量調製が可能であった。このことから, split type では 2 種類のポリペプチドにおける相互作用が, ArcTGT 全体の構造安定化に重要であることが示唆された。

第3章 tRNAの構造安定性と ArcTGT の触媒効率における相関関係

3.1 材料と方法

3.1.1 Native *E. coli* tRNA に対する ArcTGT の活性測定

3.1.1.1 大腸菌 ER2566 (pETY_MA4419-MA0121) 形質転換株の培養と tRNA mixture の調製

大腸菌 ER2566 株を pETY_MA4419-MA0121-His₆ で形質転換し、終濃度 50 µg/ml アンピシリンと 2 mM preQ₀ を含む 100 ml の LB 培地で 37°C にて培養した。波長 600 nm における濁度が 0.5 になった時点で、終濃度 0.5 mM になるように IPTG を添加し、20°C にて 20 時間培養した。遠心 (5,800 × g, 15 分) により集菌した後、菌体を 10 ml の 0.3 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 4.75) に懸濁した。そこへ、等量の水飽和フェノールを添加し、室温で一晩振盪した。遠心 (7,500 rpm, 30 分) 後、RNA mixture の画分である上清を回収し、エタノール沈殿した。RNA mixture から、Q-Sepharose Fast Flow resin (GE Healthcare) を充填した Econo-Pac[®] Disposable Chromatography Column (1.5 × 12 cm, Bio-Rad) により、tRNA mixture を精製した。2 つの buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.4 M NaCl) と buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.8 M NaCl) を用いてステップワイズにより溶出させた。0.8 M NaCl にて溶出させた画分をエタノール沈殿し、脱塩と濃縮を行った。

3.1.1.2 ER 2566 (pETY_MA4419-0121) 形質転換株由来の tRNA mixture のヌクレオシドの調製

3.1.1.1 で得られた tRNA mixture は、Nuclease P₁ (Wako) を用いて 37°C にて 3 時間反応させ、ヌクレオチドに分解した。その後、Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Takara) により、37°C にて一晩反応させ、5'-リン酸を除いた (表 3-1-1, 3-1-2)。翌日、反応後の溶液に超純水を加えて 200 µl にし、Amicon-0.5 10 K で遠心 (14,000 × g, 15 分) し、ろ液を回収した。さらに、遠心エバポレーターでろ液を濃縮した。

表 3-1-1 Nuclease P₁ による分解反応

0.1 U/μl Nuclease P₁
10 A₂₆₀unit tRNA mixture

表 3-1-2 SAP による脱リン酸化反応

50 mM Tris-HCl (pH 9.0)
5 mM MgCl₂
0.05U/μl SAP
tRNA mixture (Nuclease P₁ 分解産物)

3.1.1.3 LC-MS によるヌクレオシド分析

3.1.1.2 で回収したヌクレオシドは、5 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.3) から 3.75 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.3)、25% acetonitrile の直線濃度勾配により溶出させ、ポジティブイオンモードで質量電荷比を解析した。使用した機器やその他の操作は 2.1.8 と同じである。

3.1.1.4 Native *E. coli* tRNA の調製

16 種類のアミノ酸に対応する *E. coli* tRNA は、当研究室のストックサンプルを用いた。これらの tRNA サンプルは、tRNA を構成的に発現するプラスミド pTPP (Ikeda-Boku *et al.*, 2013) と、RNase I 欠損株である大腸菌 Q13 株 (NBRC) を用いて調製した。以下に培養方法と tRNA 抽出法を記す。目的の tRNA を発現するように作製した pTPP ベクターで、大腸菌 Q13 株を形質転換し、終濃度 20 μg/ml クロラムフェニコール (Cm) を含む 2 ml の LB 培地 (LB-Cm) で、37°C にて一晩培養した。翌日、培養液を 1.0 L の LB-Cm 培地に添加し、37°C にてさらに一晩培養した。遠心 (5,800 × g, 15 分) により集菌した後、50 ml の 0.3 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 4.75) に懸濁した。そこへ、等量の水飽和フェノールを添加し、一晩振盪した。遠心 (7,500 rpm, 30 分) 後、RNA mixture の画分である上清を回収し、エタノール沈殿した。RNA mixture から tRNA mixture の精製は 3.1.1.1 と同様の方法で行った。

3.1.1.5 固相化プローブ法による native *E. coli* tRNA の精製

16 種類の native *E. coli* tRNA は、横川研究室卒業生・松浦が固相化プローブ法により精製したものを使用した。以下にその方法を簡潔に記す。固相化プローブ法 (Yokogawa *et al.*, 2010) では、目的の tRNA と相補鎖的な DNA プローブを設計し、3' 末端がビオチン化された oligo DNA (以下 Bio-oligo DNA) (Operon) を使用した (表 3-1-3)。まず初めに、Bio-oligo DNA を Streptavidin Sepharose™ High Performance resin (GE Healthcare) に結合させた。樹脂の詳細な作製方法は以下の通りである。1.5 ml 容量の遠心フィルターチューブ, Ultrafree®-MC-GV (PVDF 0.22 μm, Merck Millipore) の 4 つのフィルター容器に 100 μl の Streptavidin Sepharose™ High Performance resin を添加し、遠心 (6,000 × g, 10 秒) し、20% エタノール溶液を除いた。400 μl の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) をフィルター容器に添加し、ピペッティング操作により樹脂を懸濁し、遠心 (6,000 × g, 10 秒) し、緩衝液に置換した。約 0.8 A₂₆₀unit の Bio-oligo DNA は、2 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液に溶かし、各フィルター容器に 500 μl 加え、ピペッティング操作により、懸濁しながら室温で 10 分間反応させ DNA 固定化樹脂を作製した。

次いで、tRNA mixture から目的 tRNA の精製を行った。tRNA mixture は、10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.9 M tetraethylammonium chloride, 0.1 mM EDTA で溶解し 500 μl とした。これを作製した DNA 固定化樹脂の入った各フィルター容器に 125 μl ずつ加え、65°C にて 10 分アニーリングさせた。その後、遠心 (6,000 × g, 10 秒) し、結合しなかった tRNA を除いた。さらに、400 μl の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) を各フィルター容器に添加し、ピペッティング操作により懸濁して、遠心 (6,000 × g, 10 秒) することで樹脂と非特異的に結合した tRNA を除いた。フィルター容器から抜けた溶液の波長 260 nm における吸光度が 0.01 以下になるまで、この操作を繰り返した。十分な洗浄を行った後、400 μl の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) を各フィルター容器に添加した。同時にフィルター容器の底には 1 M MgCl₂ を終濃度 10 mM になるように添加しておき、65°C にて 5 分保温した。その後、遠心 (6,000 × g, 10 秒) し、溶出した tRNA 溶液を回収し、エタノール沈殿による脱塩と濃縮を行った。

表 3-1-3 Bio-oligo DNA

<i>E. coli</i> tRNA	DNA sequence (5' → 3'-Bio)
tRNA ^{Asp}	GAC AGG CAG GTA TTC TAA CCG ACT GA
tRNA ^{Cys}	ACA AAG CGG UUA UGU AGC GGA UUG CA
tRNA ^{Gln}	CAG AAT CCG GTG CCT TAC CGC TTG GC
tRNA ^{Gly}	GGC AAG GTC GTG CTC TAC CAA CTG AG
tRNA ^{His}	CAC AAT CCA GGG CTC TAC CAA CTG AG
tRNA ^{Ile}	ATC AGG GGT GCG CTC TAA CCA CCT GA
tRNA ^{Lys}	CAC AAT CCA GGG CTC TAC CAA CTG AG
tRNA ^{Met}	ATG AGT GAT GTG CTC TAA CCA ACT GA
tRNA ^{Phe}	TTC AAT CCC CTG CTC TAC CGA CTG AG
tRNA ^{Pro}	CCC ATG ACG GTG CGC TAC CAG GCT GC
tRNA ^{Ser}	TCC AGG CGT GCT CCT TCA GCC ACT CG
tRNA ^{Thr}	ACC AAG GGT GCG CTC TAC CAA CTG AG
tRNA ^{Trp}	TGG AGA CCG GTG CTC TAC CAA TTG AA
tRNA ^{Tyr}	TAC AGT CTG CTC CCT TTG GCC GCT CG
tRNA ^{Val}	GTC AAG GTG GTG CTC TAA CCA ACT GA

3.1.1.6 *E. coli* tRNA transcript の精製

tRNA^{Phe}_(GAA), tRNA^{Ser}_(GGA), tRNA^{Thr}_(GCU), tRNA^{Val}_(GAC) transcript の調製方法は基本的に 2.1.5 と同じである. 表 3-1-4 に使用した 2'-OMe primer を記す.

表 3-1-4 *E. coli* tRNA transcript の調製に用いた DNA primer

tRNA	DNA sequence (5' → 3')
tRNA ^{Phe} _(GAA)	T (Gm) G TGC CCG GAC TCG GAA T
tRNA ^{Ser} _(GGA)	T (Gm) G CGG TGA GGG GGG GAT T
tRNA ^{Thr} _(GCU)	T (Gm) G TGC TGA TAC CCA GAG T
tRNA ^{Val} _(GAC)	T (Gm) G TGC GTC CGA GTG GAC T

3.1.1.7 Native *E. coli* tRNA と *E. coli* tRNA transcript に対する ArcTGT の触媒効率

16 種類の native *E. coli* tRNA に対する *M. acetivorans* ArcTGT の触媒効率を、放射性標識されたグアニンを用いて検証した。基本的な方法は 2.1.6 で示した通りである。Native *E. coli* tRNA は、*aspT*, *cysT*, *glnV*, *gluT*, *glyV*, *hisR*, *ileT*, *lysT*, *metT*, *pheU*, *proL*, *serW*, *thrV*, *trpT*, *tyrU*, *valE* 遺伝子由来のものを用いた。コントロールとして *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript を使用した。反応液の組成と操作方法は 2.1.6 と基本的に同じである。各 tRNA の濃度は 8.0 A₂₆₀unit/ml, *M. acetivorans* ArcTGT の濃度は 0.6 μM, 反応時間は 25 分で行った。

4 種類の native *E. coli* tRNA と *E. coli* tRNA transcript を用いた際のグアニン交換反応における比較実験では、native tRNA^{Phe}_(GAA), tRNA^{Ser}_(GGA), tRNA^{Thr}_(GCU), tRNA^{Val}_(GAC) とその transcript について、それぞれ比較した。反応液の組成と操作方法は 2.1.6 と基本的に同じである。各 tRNA の濃度は 8.0 μM, *M. acetivorans* ArcTGT の濃度は 0.6 μM, 反応時間は 5, 15, 30 分の経時変化を観察した。

3.1.2 tRNA 修飾ヌクレオシドが ArcTGT の触媒効率に与える影響

3.1.2.1 *E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) family の調製

大腸菌 K-12 BW 25113 株の tRNA 修飾酵素の遺伝子破壊株とホスト株 (Keio collection) は NBRP より購入した。Keio collection は tRNA 修飾酵素遺伝子, *thiI*, *trmH*, *dusA*, *truA*, *trmA*, *truB* の各遺伝子を欠失させる際に、カナマイシン耐性遺伝子を挿入してある。また、tRNA^{Ser} を構成的に発現するプラスミド pTPP_SerW による形質転換株を用いた。形質転換株の調製、培養、tRNA の調製方法は 3.1.1.1, 3.1.1.5 と基本的に同じである。各形質転換株は、終濃度 20 μg/ml クロラムフェニコール (Cm) とカナマイシン (Km) を含む 10 ml の LB-Cm-Km 培地で 37°C にて一晚培養した。翌日、培養液を 3.0 L の LB-Cm-Km 培地に添加し、37°C にてさらに一晚培養した。また、RNA 抽出の際には、100 ml の 0.3 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 4.75) に懸濁し、等量の水飽和フェノールを添加して一晚振盪させた。

3.1.2.2 *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) family の質量分析

全長 tRNA の質量分析方法は 2.1.8 に記した通りである。また、各 tRNA^{Ser} は RNaseT₁ により 37°C にて 3 時間反応させて分解した (表 3-1-5)。プソイドウリジン (Ψ) の検出は、*N*-cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide (CMC, Sigma-Aldrich) 修飾産物 (Ψ-CMC) を調製し、RNase T₁ 分解断片を解析することで決定した。CMC の修飾反応は基本的に Ofengand *et al.* の方法を参考にした (Ofengand *et al.*, 2001)。まず、以下の方法で TEU buffer を調製した。TEU buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 7 M Urea, 4 mM EDTA (pH 8.0)) は最終的に、塩酸により pH 9.0 に調整した。1.0 A₂₆₀unit tRNA を 20 μl の超純水に溶かし、20 μl の 1 M CMC と 80 μl の TEU buffer を添加して、37°C にて 20 分反応させた。また、ネガティブコントロールには、CMC 溶液の代わりとして超純水を使用した。反応後の溶液に、終濃度 20 μg/ml になるようにグリコーゲンを添加して、エタノール沈殿を行った。乾燥させたサンプルは、50 μl の炭酸ナトリウム buffer (50 mM Na₂CO₃ (pH 10.4), 2 mM EDTA (pH 8.0)) で溶解し、37°C にて 4 時間反応させた。その後、エタノール沈殿による脱塩と濃縮を行った。RNase T₁ 分解産物の質量分析は、2.1.8 で記したカラムと質量分析装置を使用した。液体クロマトグラフィー解析は、流速 0.25 ml/min, 200 mM HFIP, 8.6 mM TEA から 50 mM HFIP, 4.3 mM TEA, 50% methanol の直線濃度勾配により溶出させた (Suzuki *et al.*, 2007)。

表 3-1-5 RNase T₁ による分解反応

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
1 mM EDTA (pH 8.0)
2.0 A ₂₆₀ unit tRNA ^{Ser} family
1 unit/μl RNase T ₁

3.1.2.3 放射性標識されたグアニンを用いた ArcTGT の反応速度論的解析

反応液の組成と操作方法は 2.1.6 と基本的に同じである。 *M. acetivorans* ArcTGT の濃度は 1.2 μ M, 反応時間は 90 秒で行った。 反応速度論的パラメーター (Michaelis-Menten kinetics) は DataAnalysis software (<http://www.scidataanalysis.com/sda/contact.html>) を用いて決定した。

3.1.2.4 *E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) family の融解温度 (*T_m*) 測定

各 tRNA^{Ser} 0.75 A₂₆₀unit を 400 μ l の buffer (10 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 200 M NaCl, 10 mM MgCl₂) で溶解し, アスピレーターを用いて 20 分脱気した (Watanabe *et al.*, 1980; Serebrov *et al.*, 1998; Yokogawa *et al.*, 2010). 測定機器は, DU[®] 640 spectrophotometer (Beckman) を使用した。 プログラムは, 25 ~ 95°C までの温度間を 0.5°C/min で上昇させた。 波長 260 nm における吸光度は, 0.2°C 毎に測定した。 各 tRNA^{Ser} の *T_m* 値は融解曲線から, 一次微分法を用いて算出した。

3.2. 結果

3.2.1 *E. coli* tRNA に対する ArcTGT の触媒効率

ArcTGT の基質 tRNA の認識機構は、位置特異的かつ配列非特異的であることが報告されている (Watanabe *et al.*, 1997, 2001). このことから、tRNA の 15 位にグアニンが存在する tRNA (G15-tRNA) は、ArcTGT の基質になるはずである. そこで、まず初めに、*M. acetivorans* ArcTGT 発現ベクター、pETY_MA4419-MA0121-His₆ で形質転換した大腸菌 ER2566 株由来の tRNA mixture のヌクレオシドを分析した. また、宿主株由来の tRNA mixture のヌクレオシドも分析することで、大腸菌に存在するヌクレオシドと形質転換株由来のヌクレオシドを比較することにした. さらに、コントロールとして *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript に preQ₀ を導入したものを使用した. その結果、形質転換株だけに selected ion chromatogram と質量電荷比において特異的なピークを検出した (図 3-2-1). この実験では、preQ₀ 特異的な吸収波長 305 nm を用いた. 質量分析の結果から、preQ₀ 塩基とヌクレオシドに一致する質量電荷比 (理論値: m/z 176.05, m/z 308.09) が検出された. 従って、*M. acetivorans* ArcTGT が、大腸菌細胞内の tRNA に対して preQ₀ を導入したことが判明した.

次いで、*M. acetivorans* ArcTGT の基質として、native *E. coli* tRNA を用いた場合、グアニン交換反応効率はどれ程のものか *in vitro* 実験で検証した. ArcTGT のグアニン交換反応の本来の基質は preQ₀ であるが、グアニンも基質となることが報告されている (Watanabe *et al.*, 1997). そこで、*in vitro* 実験では、放射性標識されたグアニン ([8-¹⁴C]-guanine) を用いて ArcTGT の触媒効率を評価することにした. 基質 tRNA として、16 種類のアミノ酸に対応する native *E. coli* tRNA を用いた (表 3-2-1). tRNA の 15 位は一般的にグアニンであるが、例外として、tRNA^{Leu}, tRNA^{Trp} と一部の tRNA^{Arg}, tRNA^{Gly} は A15, tRNA^{Sec} は C15 である (本研究で用いた tRNA^{Gly} は G15 を持つものを使用した). ArcTGT の基質認識には、G15 が必須となるため、ネガティブコントロールとして 15 位にアデニンを持つ tRNA^{Trp} を採用した (図 3-2-2). また、tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn} のサンプル量が少なすぎたため、これらの tRNA に対する ArcTGT の触媒効率は測定できなかった. さらに、ポジティブコントロールとして、*M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript を使用した. 図 3-2-2 は各 tRNA に対する ArcTGT のグアニン交換反応の結果を示している. まず tRNA^{Trp} は A15 であるため、ArcTGT によるグアニン交換反応が全く起こらなかった. G15-

tRNA に関しては, tRNA^{Cys}, tRNA^{Pro} 以外の native *E. coli* tRNA は, ArcTGT の基質としてほとんど機能しないことが判明した. *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript と native *E. coli* tRNA の違いは, 塩基配列も異なるが, 修飾ヌクレオシドの有無も大きな違いである (表 3-2-1). ArcTGT に, 塩基配列特異性はあまりないと報告されていることから (Watanabe *et al.*, 2001), 修飾ヌクレオシドの存在により, ArcTGT のグアニン交換反応が阻害されていることが示唆された.

そこで, native *E. coli* tRNA と *E. coli* tRNA transcript を ArcTGT の基質とし, そのグアニン交換反応の効率を比較することにした. ここでは, *E. coli* tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Val} の 4 種類の tRNA を用いて, それぞれのグアニン交換反応の経時変化を観察した (図 3-2-3). 結果から, native tRNA のグアニン交換反応の効率は, transcript のそれと比べて非常に低い値となった. 従って, ArcTGT の基質認識には, 修飾ヌクレオシドが関与していることが判明した.

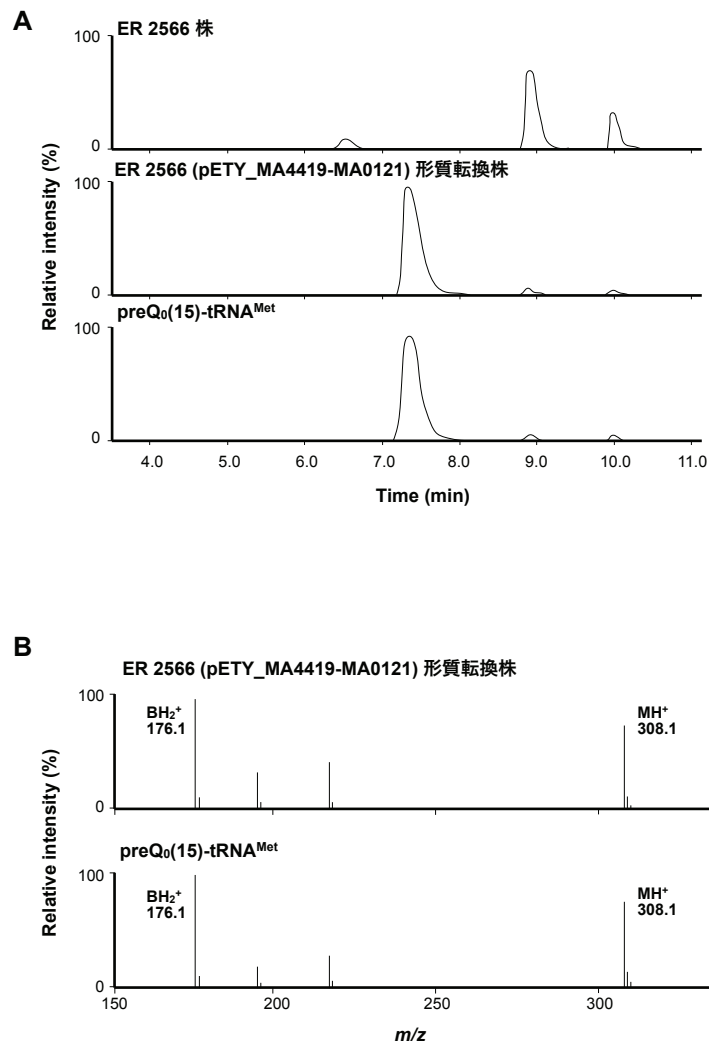


図 3-2-1 LC-MS によるヌクレオシド分析

(A) m/z 308 における selected ion chromatogram の結果. preQ₀(15)-tRNA: *M. acetivorans* tRNA^{Met} transcript に preQ₀ を導入したもので, preQ₀ 塩基, ヌクレオシドのコントロールとして用いた. (B) (A) における 7~8 min で検出されたピークに含まれるマススペクトル解析. preQ₀ 塩基, ヌクレオシドの理論値はそれぞれ m/z 176.1, 308.1. また, ER 2566 (ホスト) 株からは, preQ₀ 相当のピークが検出されなかったので省略した.

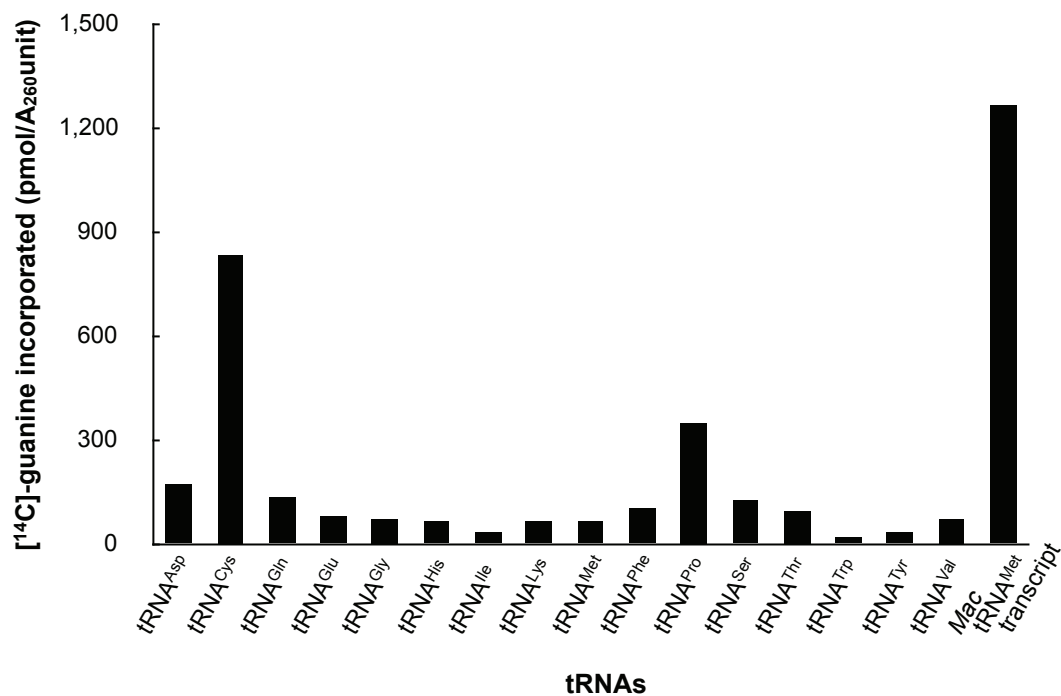


図 3-2-2 Native *E. coli* tRNA に対する ArcTGT のグアニン交換反応

各 native *E. coli* tRNA に対して ArcTGT が導入した [8-¹⁴C]-guanine の量を示した. コントロールとして *M. acetivorans* (*Mac*) tRNA^{Met} transcript を用いた (最右列). 各 tRNA は 8.0 A₂₆₀unit/ml を使用した. このアッセイは, native *E. coli* tRNA の量が少なかったため一度だけの試行である.

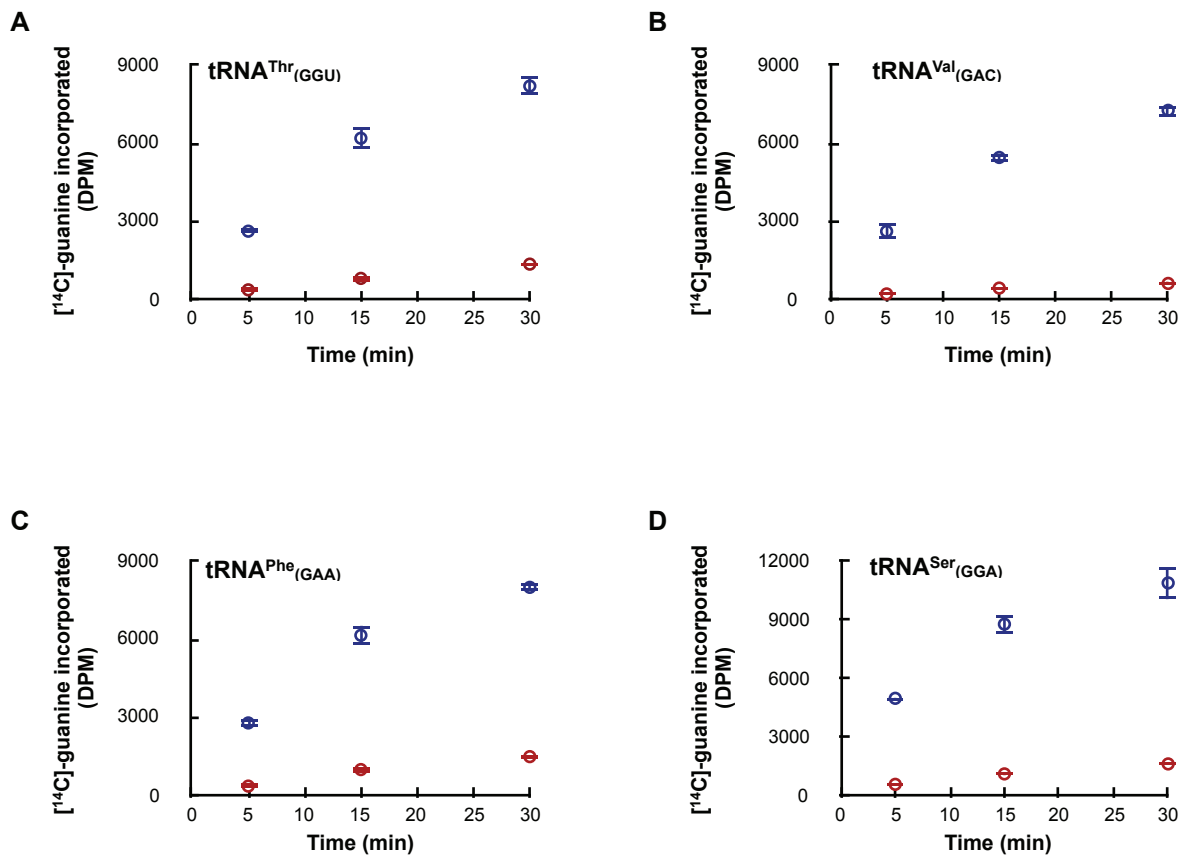


図 3-2-3 Native *E. coli* tRNA と *E. coli* tRNA transcript に対する ArcTGT のグアニン交換反応

各 native *E. coli* tRNA と *E. coli* tRNA transcript に対して ArcTGT が導入した [8- ^{14}C]-guanine 量の経時変化を観察した. 基質 tRNA として, *E. coli* $tRNA^{Thr}$ (A), $tRNA^{Val}$ (B), $tRNA^{Phe}$ (C), $tRNA^{Ser}$ (D) を用いた. 赤丸は native *E. coli* tRNA を, 青丸は *E. coli* tRNA transcript を示している. このアッセイは 3 回行い, その平均値をプロットした. また, エラーバーは標準偏差を示している.

表 3-2-1 本研究で用いた *E. coli* tRNA に存在する修飾ヌクレオシド

tRNA	anticodon	modified nucleosides and positions in tRNA
tRNA ^{Asp}	gluQUC	s ⁴ U8, D16, D20, D20a, gluQ34, m ² A37, m ⁷ G46, T54, Ψ55, Ψ65
tRNA ^{Cys}	GCA	s ⁴ U8, D20, D20a, Ψ32, ms ² i ⁶ A37, Ψ39, T54, Ψ55
tRNA ^{Gln}	CUG	s ⁴ U8, Gm18, D20, Um32, m ² A37, Ψ38, Ψ39, T54, Ψ55
tRNA ^{Glu}	mnm ⁵ s ² UUC	Ψ13, mnm ⁵ s ² U34, m ² A37, T54, Ψ55
tRNA ^{Gly}	GCC	D16, D17, D20, m ⁷ G46, T54, Ψ55
tRNA ^{His}	QUG	s ⁴ U8, D16, D17, D20, Q34, m ² A37, Ψ38, Ψ39, m ⁷ G46, T54, Ψ55
tRNA ^{Ile}	GAU	D17, D20, D20a, ct ⁶ A37, m ⁷ G46, acp ³ U47, T54, Ψ55, Ψ65
tRNA ^{Lys}	mnm ⁵ s ² UUU	s ⁴ U8, D16, D17, D20, mnm ⁵ s ² U34, ct ⁶ A37, Ψ39, m ⁷ G46, acp ³ U47, T54, Ψ55
tRNA ^{Met}	ac ⁴ CAU	s ⁴ U8, D16, D17, Gm18, D20, D20a, ac ⁴ C34, ct ⁶ A37, Ψ39, m ⁷ G46, acp ³ U47, T54, Ψ55
tRNA ^{Phe}	GAA	s ⁴ U8, D16, D20, Ψ32, ms ² i ⁶ A37, Ψ39, m ⁷ G46, acp ³ U47, T54, Ψ55
tRNA ^{Pro}	GGG	s ⁴ U8, D20, Am32, m ¹ G37, Ψ40, m ⁷ G46, T54, Ψ55
tRNA ^{Ser}	GGA	s ⁴ U8, Gm18, D20a, Ψ40, T54, Ψ55
tRNA ^{Thr}	GGU	s ⁴ U8, D16, D17, D20, m ⁶ t ⁶ A37, m ⁷ G46, T54, Ψ55
tRNA ^{Trp}	CCA	s ⁴ U8, D16, D17, D20, Cm32, ms ² i ⁶ A37, m ⁷ G46, T54, Ψ55
tRNA ^{Tyr}	QUA	s ⁴ U8, s ⁴ U9, Gm18, Q34, ms ² i ⁶ A37, Ψ39, T54, Ψ55
tRNA ^{Val}	GAC	s ⁴ U8, D16, D17, D20, D20a, m ⁷ G46, acp ³ U47, T54, Ψ55

本研究で用いた native *E. coli* tRNA に存在する修飾ヌクレオシドを示した (Machnika *et al.*, 2013). また, t⁶A は ct⁶A と表記した (Miyachi *et al.*, 2013). 略語は以下に示した.

s⁴U, 4-thiouridine; D, dihydrouridine; gluQ, glutamyl-queosine; m²A, 2-methyladenosine; m⁷G, 7-methylguanosine; T, ribothymidine; Ψ, pseudouridine; ms²i⁶A, 2-methylthio-*N*⁶-isopentenyladenosine; Gm, 2'-*O*-methylguanosine; Um, 2'-*O*-methyluridine; mnm⁵s²U, 5-methylaminomethyl-2-thiouridine; Q, queosine; ct⁶A, cyclic form of *N*⁶-threonylcarbamoyladenosine; acp³U, 3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine; ac⁴C, *N*⁴-acetylcytidine; Am, 2'-*O*-methyladenosine; m¹G, 1-methylguanosine; m⁶t⁶A, *N*⁶-methyl-*N*⁶-threonylcarbamoyladenosine; Cm, 2'-*O*-methylcytidine.

3.2.2 *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) family の調製

3.2.2.1 ArcTGT の基質 tRNA の選択

ArcTGT の触媒効率には、どの修飾ヌクレオシドが影響を与えるのか検証するために、3.2.1 で使用した 4 種類の tRNA から、*E. coli* tRNA^{Ser} を選択した。選択理由を以下に記す: ① *E. coli* tRNA の 16, 17, 20, 20a 位 (D-loop) にはジヒドロウリジンが存在しており、その修飾を触媒する酵素 dihydrouridine synthase (Dus) は 3 種類 (DusA, DusB, DusC; Bishop *et al.*, 2002) 存在している。DusA は、単独で 20, 20a 位のジヒドロウリジンを形成すると報告 (Bishop *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2011) されているが、16 と 17 位のジヒドロウリジン形成は、どの Dus が触媒しているのか解明されていない。4 種類の tRNA の内、tRNA^{Ser} は 1 つだけジヒドロウリジンが存在しており、その位置は 20a 位にあたる。しかしながら、残りの 3 種類の tRNA はどれも 16, 17 位のどちらか一方、あるいは両方にジヒドロウリジンが存在している (表 3-2-1)。② tRNA^{Ser} には 6 つの修飾ヌクレオシド (s⁴U8, Gm18, D20a, Ψ40, T54, Ψ55: 表 3-2-1, 図 3-2-4) が存在している。これは、4 種類の tRNA の中で最も少ない数である。③ 図 3-2-3 に示すように、native tRNA^{Ser} と tRNA^{Ser} transcript に対する ArcTGT の触媒効率の差は、最も大きい。

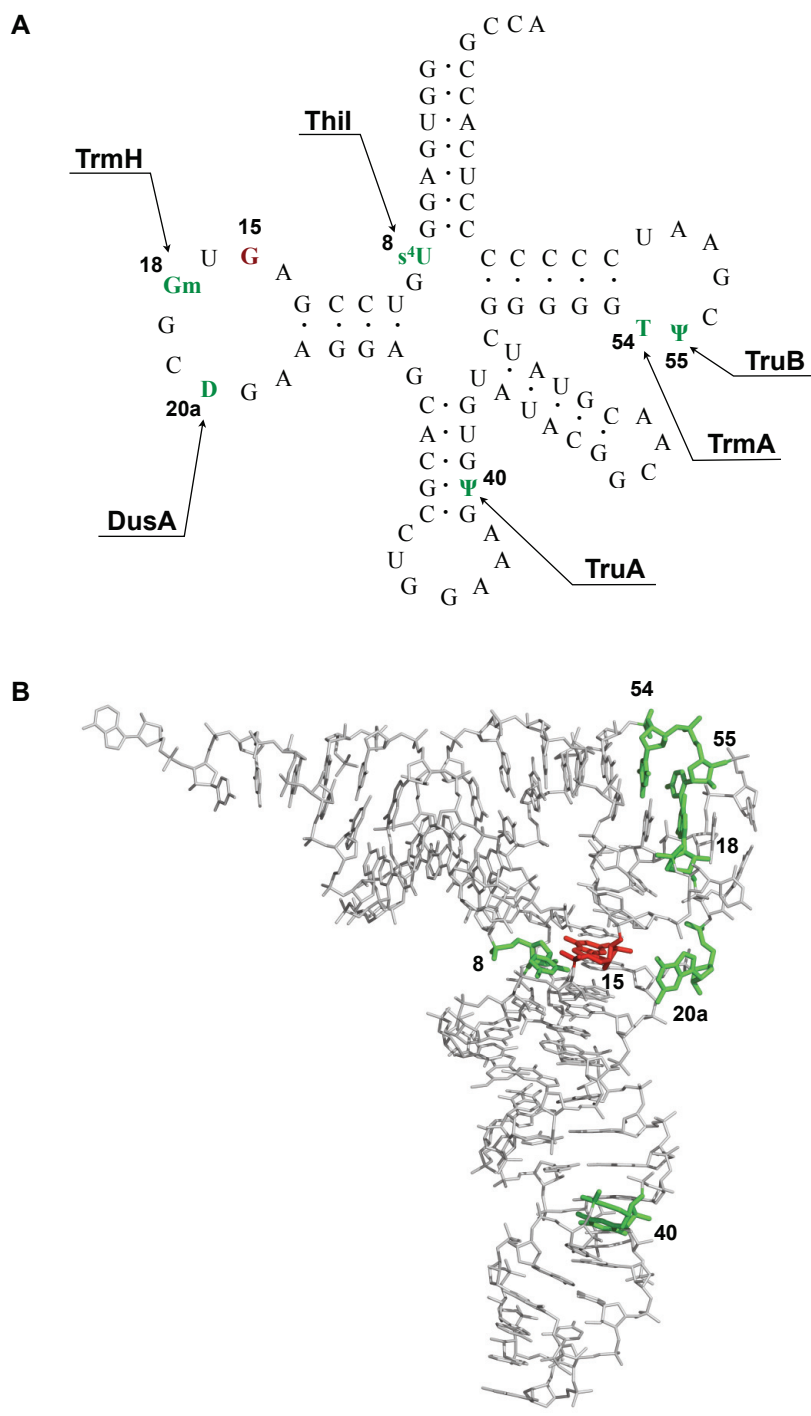


図 3-2-4 *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) に存在する 6 つの修飾ヌクレオシド

(A) *E. coli* tRNA^{Ser} のクローバーリーフモデル. 6 つの修飾ヌクレオシドは緑色の文字で, ArcTGT の標的部位 G15 は赤色の文字で記した. 各修飾ヌクレオシドを導入する酵素は矢印で示した.

(B) *E. coli* tRNA^{Ser} の三次構造における修飾ヌクレオシドの位置. Yeast tRNA^{Phe} (PDB ID: 1EHZ) に基づいて PyMOL software (www.pymol.org) を用いて作成した. Yeast tRNA^{Phe} には 20a 位のヌクレオシドが存在しないため, 20 位のヌクレオシドを 20a 位のヌクレオシドに見立てた. 表記法は (A) と同じである.

3.2.2.2 *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) family の調製と質量分析による確認

E. coli tRNA^{Ser} の修飾ヌクレオシドを導入する酵素は既に同定されている (図 3-2-4). しかしながら, *in vitro* にて 1 つの修飾ヌクレオシドを tRNA^{Ser} transcript に完全に導入することは困難である. そこで, 6 つの修飾ヌクレオシドのうち 1 つだけを欠損させた hypomodified tRNA^{Ser} (s⁴U8U-, Gm18G-, D20aU-, Ψ40U-, T54U-, Ψ55U-tRNA^{Ser}) を, 各 tRNA 修飾酵素 (ThiI, TrmH, DusA, TruA, TrmA, TruB: Björk & Isaksson, 1970; Kammen *et al.*, 1988; Nurse *et al.*, 1995; Persson *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 2002) の遺伝子欠損型の大腸菌株を用いて調製した. また, 質量分析により, 各 hypomodified tRNA^{Ser} が狙い通りに調製されたか確認した. 全長 tRNA^{Ser} family の LC クロマトグラムの結果から, 各 tRNA^{Ser} が単離精製されていることを確認できた (図 3-2-5). また, 質量分析の結果から, 理論値と一致する単一な分子質量が検出された (図 3-2-6).

実際に目的の修飾ヌクレオシドだけが欠失していることを確認するために, RNase T₁ 分解断片の質量分析を行なった (表 3-2-2). また, ウリジンとプソイドウリジンでは分子質量の変化がないため, プソイドウリジン特異的に結合する試薬 CMC を用いた. CMC はプソイドウリジンの 3 位の N と反応し, 共有結合を形成する. この CMC 付加体 (Ψ-CMC) 形成により 252 Da の分子質量シフトが観察される. ここでは, Ψ40U-tRNA^{Ser} と Ψ55U-tRNA^{Ser} を CMC 修飾したものと, していないもので比較した. また, コントロールとして, native tRNA^{Ser} と tRNA^{Ser} transcript を用いた. これらの CMC 付加体は, RNase T₁ 分解断片にしてから質量分析した (表 3-2-3). Hypomodified tRNA^{Ser} に関する RNase T₁ 断片の質量分析の結果, s⁴U8 を触媒する修飾酵素 ThiI の遺伝子欠損株 (ΔThiI strain) から調製した tRNA^{Ser} には, U8 のチオール化が完全に欠失していた. さらに, U8 以外の 5 つの修飾ヌクレオシドは完全に導入されていた. 同様にして, ΔTrmH, ΔDusA, ΔTruA, ΔTrmA, ΔTruB strain 由来の tRNA^{Ser} には各修飾酵素が導入する修飾ヌクレオシドだけが完全に欠失していた. また, native tRNA^{Ser} は 6 つの修飾ヌクレオシドが完全に導入されており, tRNA^{Ser} transcript には全く修飾が導入されていないことを確認することができた.

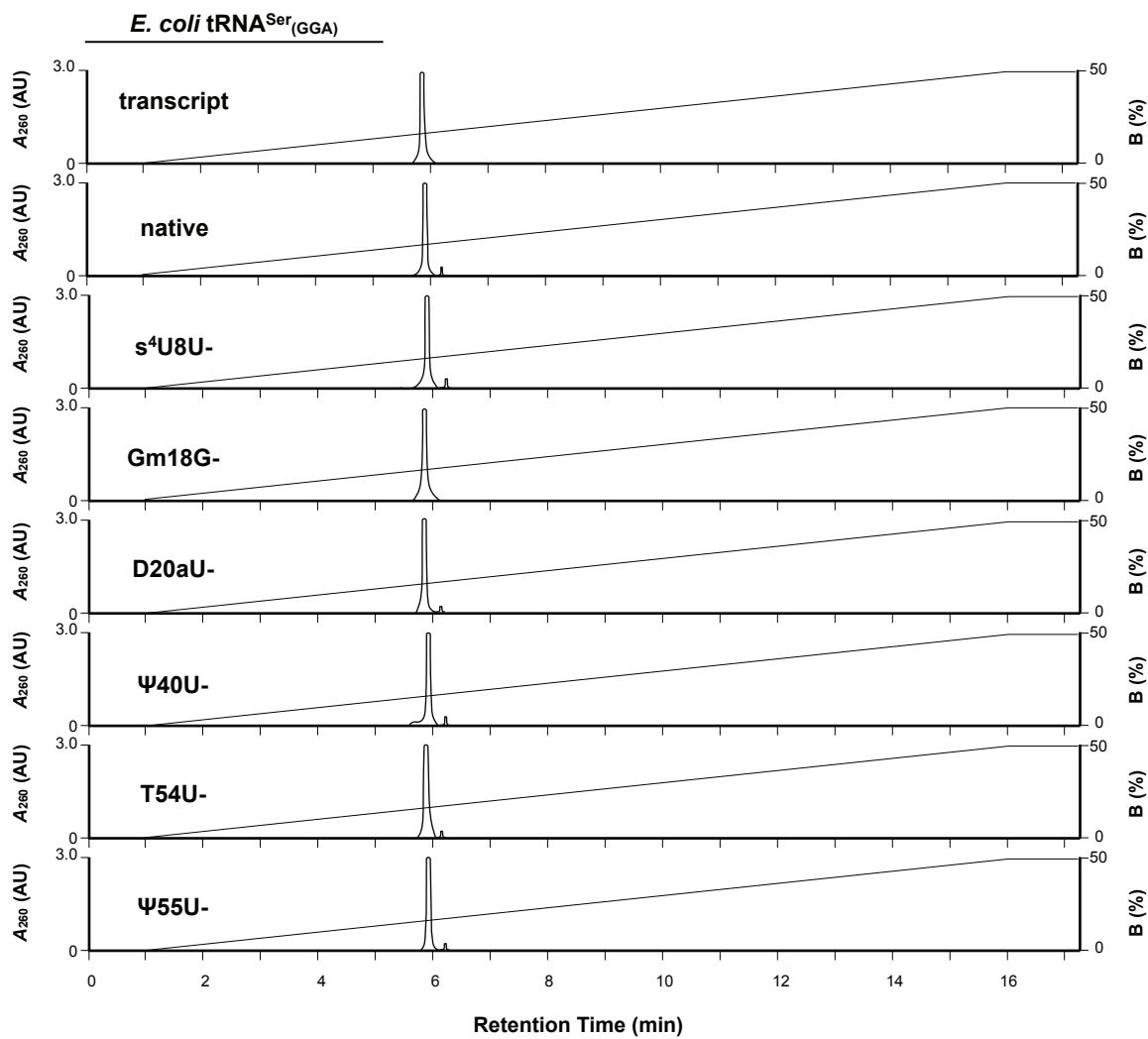


図 3-2-5 *E. coli* tRNA^{Ser} family の LC クロマトグラム

上から順に tRNA^{Ser} transcript, native tRNA^{Ser}, s⁴U8U-, Gm18G-, D20aU-, Ψ40U-, T54U-, Ψ55U-tRNA^{Ser} の吸収波長 260 nm におけるクロマトグラムを示した (左軸). Buffer B の濃度勾配 (B (%)) は右軸に示した.

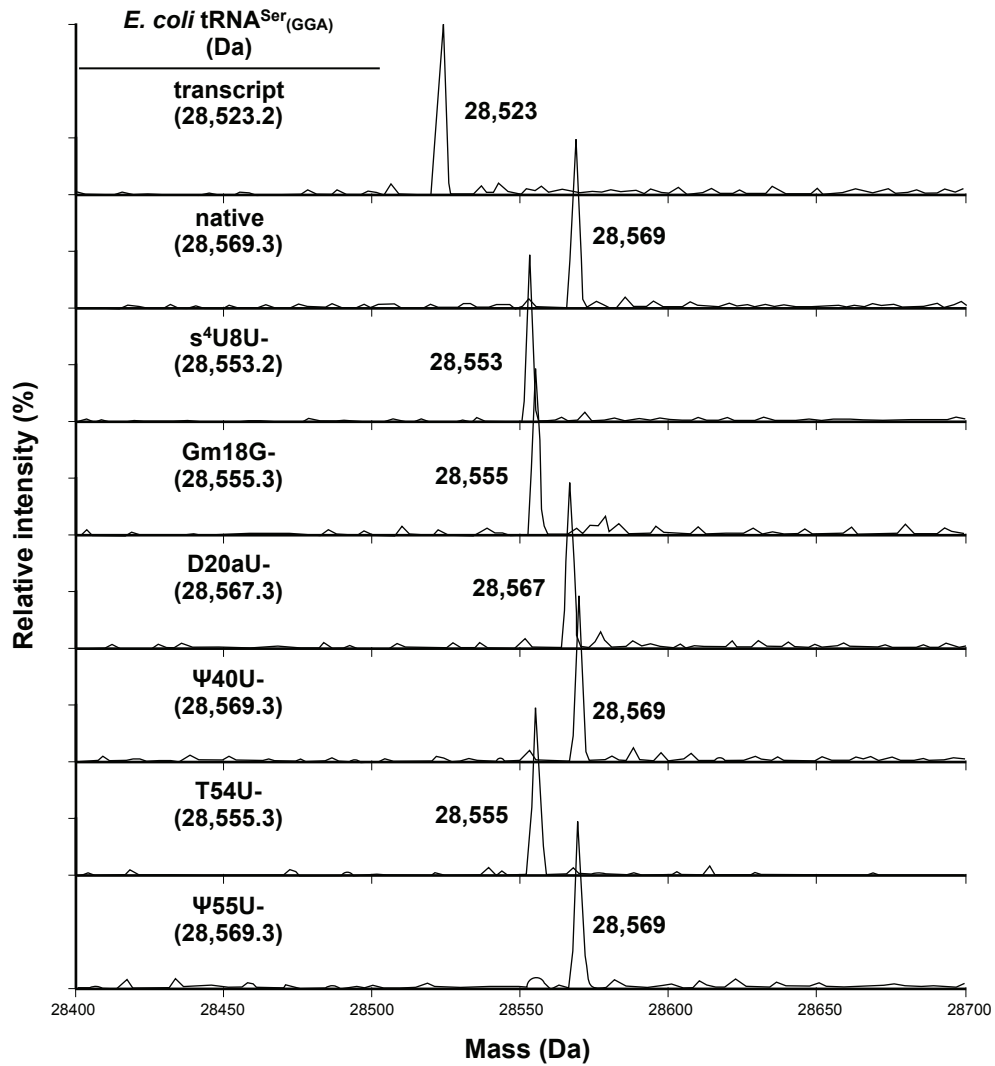


図 3-2-6 *E. coli* tRNA^{Ser} family の質量分析

上から順に tRNA^{Ser} transcript, native tRNA^{Ser}, s⁴U8U-, Gm18G-, D20aU-, Ψ40U-, T54U-, Ψ55U-tRNA^{Ser} サンプルから検出された質量と理論値 (括弧内に記載) を示した。

表 3-2-2 RNase T₁ 断片の質量分析

RNase T ₁ fragment ^a	theoretical <i>m/z</i>	tRNA ^{Ser} _(GGA)							
		transcript	native (BW25113)	s ⁴ U8U- (ΔThiI)	Gm18G- (ΔTrmH)	D20aU- (ΔDusA)	Ψ40U- (ΔTruA)	T54U- (ΔTrmA)	Ψ55U- (ΔTruB)
s ⁴ U8G9-p	684.05	— ^b	684.03	—	684.02	684.00	684.02	684.02	684.00
U16GmG19-p	1027.13	—	1027.09	1027.09	—	1027.09	1027.09	1027.09	1027.09
C20UG20b-p	973.12	973.08	—	—	—	973.10	—	—	—
C20DG20b-p	975.13	—	975.11	975.11	975.11	—	975.09	975.11	975.11
U54U/ΨCG57-p ^c	1279.14	1279.21	—	—	—	—	—	1279.21	—
T54U/ΨCG57-p ^c	1293.15	—	1293.15	1293.15	1293.15	1293.15	1293.15	—	1293.15

E. coli tRNA^{Ser}_(GGA) に 6ヶ所存在する修飾ヌクレオシドの 1つだけを欠損した hypomodified tRNA^{Ser} は, s⁴U8U-, Gm18G-, D20aU-, Ψ40U-, T54U-, Ψ55U-tRNA^{Ser}_(GGA) と表記した. ΔThiI, ΔTrmH, ΔDusA, ΔTruA, ΔTrmA, ΔTruB は, 各 tRNA 修飾ヌクレオシドを導入する酵素 ThiI, TrmH, DusA, TruA, TrmA, TruB の遺伝子破壊株を表しており, 括弧内に記した. 理論値 *m/z* 以外の数字は検出された *m/z* の値である.

^atRNA^{Ser}_(GGA) におけるヌクレオシドの位置を示した.

^b理論値 *m/z* が検出されないことを示す.

^cプソイドウリジンの有無は, CMC 修飾によって決定した (表 3-2-3).

表 3-2-3 CMC 付加体の tRNA^{Ser}_(GGA) の質量分析

RNase T ₁ fragment ^a	theoretical <i>m/z</i>	tRNA ^{Ser} _(GGA)							
		transcript		native (BW25113)		Ψ40U- (ΔTruA)		Ψ55U- (ΔTruB)	
		w/o ^b	w/ ^c	w/o	w/	w/o	w/	w/o	w/
(Ψ-CMC)40-G41-p	921.29	— ^d	—	—	921.28	—	—	—	921.30
T54-(Ψ-CMC)55-CG57-p	1546.37	—	—	—	1546.42	—	1546.42	—	—

表記法は表 3-2-2 と同じである.

^atRNA^{Ser}_(GGA) におけるヌクレオシドの位置を示した.

^bwithout CMC.

^cwith CMC.

^d理論値 *m/z* が検出されないことを示す.

3.2.3 *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) family に対する ArcTGT の反応速度論的解析

tRNA^{Ser} family を基質とした際の ArcTGT の触媒効率は、反応速度論的解析により評価した。反応速度論的パラメーター (k_{cat} , K_m) は、[8-¹⁴C]-guanine を用いることで、ArcTGT によりグアニンが交換された tRNA の量を測定し、Michaelis-Menten 式によって決定した。具体例として、native tRNA^{Ser} と tRNA^{Ser} transcript を ArcTGT の基質 tRNA とした場合に得られた Michaelis-Menten plot を示した (図 3-2-7)。同様の方法で得られた各 tRNA^{Ser} family に対する ArcTGT の反応速度論的パラメーターをまとめた (表 3-2-4)。Native tRNA^{Ser} と hypomodified tRNA^{Ser} の k_{cat} は、同程度の値 (約 $10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) となり、ほとんど差が観察されなかった。さらに、tRNA^{Ser} transcript の k_{cat} は、native tRNA^{Ser} の約 3 倍の値となり、それほど大きな差がないことが判明した。一方で、native tRNA^{Ser} の K_m は tRNA^{Ser} transcript の約 13 倍も大きな値となった。また、hypomodified tRNA^{Ser} の K_m は、どれも同程度の値 (約 10 μM) となり、この値は native tRNA^{Ser} と tRNA^{Ser} transcript のおよそ中間の値であった。反応速度論的パラメーター、 k_{cat} は酵素が基質を触媒する際の代謝回転数を示し、 K_m は酵素と基質の親和性の指標となる。従って、G15 以外に存在する修飾ヌクレオシドが ArcTGT の触媒効率を低下させており、特に tRNA の親和性、言い換えると ArcTGT と tRNA が複合体を形成する際に悪い影響を与えていると考えられる。

tRNA^{Ser} transcript の k_{cat}/K_m は、native tRNA^{Ser} の約 40 倍も大きな値であった。そこで、各 hypomodified tRNA^{Ser} の k_{cat}/K_m を native tRNA^{Ser} の k_{cat}/K_m を基に相対値として算出し (Relative ArcTGT activity: 表 3-2-4 最右列)、それらすべての値を掛け合わせた値は、約 35 であった。この値は tRNA^{Ser} transcript の相対数値 (約 40) に近いものである。このことから、tRNA^{Ser} に存在する 6 つの修飾ヌクレオシドは、個々に独立して ArcTGT の触媒効率を低下させており、その効果は相乗的であると考えられる。また、反応速度論的解析から、 $\Psi 40$ も ArcTGT の触媒効率を阻害することが判明した。しかしながら、ArcTGT-tRNA 複合体の結晶構造解析 (Ishitani *et al.*, 2003) から、N30-N40 の塩基対は λ 型 tRNA の anticodon stem でも形成されたままであった。従って、ArcTGT が tRNA と複合体を形成する際には、tRNA の L 字構造のコア領域だけでなく、anticodon stem も一時的に壊れることが示唆された。

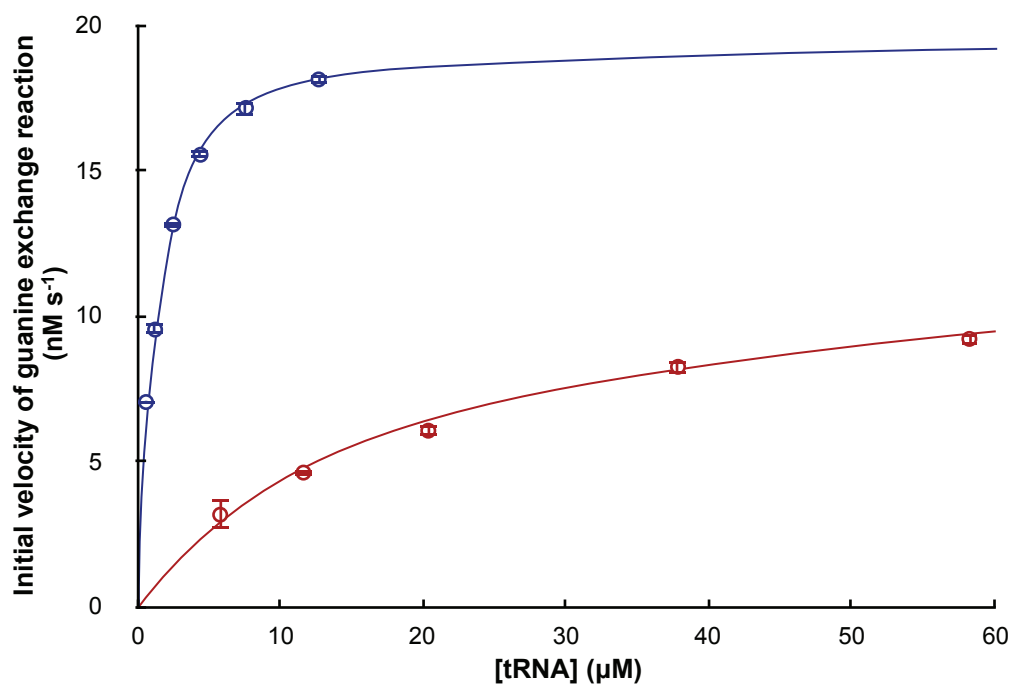


図 3-2-7 Native tRNA^{Ser}(GGA) と tRNA^{Ser}(GGA) transcript を ArcTGT の基質とした際に得られた Michaelis-Menten plot

Native tRNA^{Ser} における初速度は赤色の点で, tRNA^{Ser} transcript における初速度は青色の点でプロットした. このアッセイは 3 回行い, その平均値をプロットした. また, エラーバーは標準偏差を示している. Michaelis-Menten 式の双曲線: $v = V_{max} [S]/(K_m + [S])$ は DataAnalysis software (<http://www.scidataanalysis.com/sda/contact.html>) を用いてフィッティングし, 反応速度論的パラメーターを算出した.

表 3-2-4 *E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) family を ArcTGT の基質とした際に得られた反応速度論的パラメーター

Substrate for ArcTGT ^a	<i>kcat</i> (10 ⁻³ s ⁻¹)	<i>Km</i> (μM)	<i>kcat/Km</i> (10 ² M ⁻¹ s ⁻¹)	Relative ArcTGT activity ^b
native tRNA ^{Ser} _(GGA)	9.26 ± 0.24	17.3 ± 0.14	5.35	1
s ⁴ U8U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	9.72 ± 0.28	8.65 ± 0.54	11.2	2.1
Gm18G-tRNA ^{Ser} _(GGA)	10.2 ± 0.07	10.2 ± 0.18	10.0	1.9
D20aU-tRNA ^{Ser} _(GGA)	8.72 ± 0.08	12.0 ± 0.14	7.27	1.4
Ψ40U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	11.9 ± 0.14	10.1 ± 0.47	11.8	2.2
T54U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	10.1 ± 0.25	12.4 ± 0.56	8.15	1.5
Ψ55U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	10.8 ± 0.18	10.7 ± 0.29	10.1	1.9
tRNA ^{Ser} _(GGA) transcript	27.5 ± 0.28	1.29 ± 0.05	213	39.8 (35.0 ^c)

各 tRNA^{Ser} family に対する反応速度論的パラメーターは図 3-2-7 と同様にして算出した。このアッセイは 3 回行い、その平均値と標準偏差を示している。

^a*E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) に 6 ケ所存在する修飾ヌクレオシドの 1 つだけを欠損した hypomodified tRNA^{Ser} は、s⁴U8U-, Gm18G-, D20aU-, Ψ40U-, T54U-, Ψ55U-tRNA^{Ser}_(GGA) と表記した。

^bRelative ArcTGT activity は、native tRNA^{Ser} に対する *kcat/Km* を基に算出した。

^cHypomodified tRNA^{Ser} の relative ArcTGT activity を掛け合わせた値を示した。

3.2.4 修飾ヌクレオシドが tRNA の融解温度 (T_m) に与える影響

tRNA のコア領域における修飾ヌクレオシドと tRNA の構造安定性を評価するために、tRNA^{Ser} family の T_m を測定した (表 3-2-5). また、図 3-2-8 には 各 tRNA^{Ser} family の融解曲線を示した. tRNA^{Ser} family のなかで、最も低い値は tRNA^{Ser} transcript (64.8°C)、一方、最も高い値は native tRNA^{Ser} (74.3°C) であった. つまり、6 つの修飾ヌクレオシドが全て導入されることで、tRNA^{Ser} transcript の T_m はおよそ 10°C 上昇することが判明した. 6 つの修飾ヌクレオシドのうち、1 つだけを欠損させた hypomodified tRNA^{Ser} の T_m はどれも同程度の値 (約 71°C) であった. 従って、tRNA^{Ser} に存在する修飾ヌクレオシドはどれも tRNA の構造安定化に寄与すると考えられる. 特に、s⁴U8U-tRNA^{Ser} の T_m は、hypomodified tRNA^{Ser} のなかでも最も低い値 (69.6°C) であった. さらに、この値は tRNA^{Ser} transcript と native tRNA^{Ser} の T_m のちょうど中間の値である. U8 は tRNA の三次構造におけるコア領域の最も深い位置に埋もれており、D-loop の A14 と塩基対を形成している (図 3-2-4). 従って、U8 のチオール化は tRNA の構造安定化に最も重要な修飾ヌクレオシドの一つであると考えられる. tRNA^{Ser} に存在する 6 つの修飾ヌクレオシドのうち、s⁴U8, Gm18, Ψ40, T54, Ψ55 は tRNA の構造安定化に寄与することが予想された. 一方、D-loop に存在するジヒドロウリジンは tRNA の構造不安定化に寄与すると報告されていた (Dulluge *et al.*, 1996) が、本研究の結果から、tRNA の D-loop を特徴付けるジヒドロウリジン (tRNA^{Ser} の場合: D20a) もまた、tRNA の構造安定化をもたらすことが判明した.

最後に、 k_{cat} - T_m と K_m - T_m の関係を散布図にまとめた (図 3-2-9, 3-2-10). さらに、Pearson's correlation coefficient (以下、相関係数 r) を算出した. その結果、 K_m - T_m には強い正の相関関係 ($r = 0.967$) が存在していることを見出した. つまり、tRNA^{Ser} に存在する 6 つの修飾ヌクレオシドは、tRNA^{Ser} の構造安定化をもたらす. そして、転写後の tRNA^{Ser} への修飾ヌクレオシドの導入が完成するに連れて、ArcTGT の触媒効率、特に基質 tRNA への親和性が下がると考えられる. 一方、 k_{cat} - T_m の場合でも、負の相関関係 ($r = -0.845$) が存在していると予想されるが、native tRNA^{Ser} と hypomodified tRNA^{Ser} に対する ArcTGT の k_{cat} にほとんど差が観察されなかったため、相関関係の有無を議論するのは困難であると考えられる.

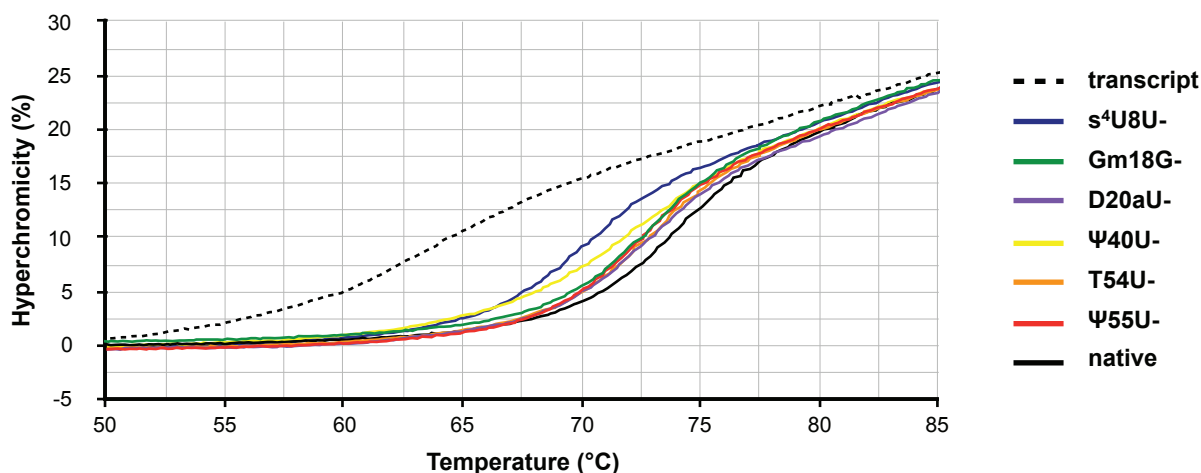


図 3-2-8 *E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) family の融解曲線

E. coli tRNA^{Ser}_(GGA) に 6 ヶ所存在する修飾ヌクレオシドの 1 つだけを欠損した hypomodified tRNA^{Ser} は, s⁴U8U (blue)-, Gm18G (green)-, D20aU (purple)-, Ψ40U (yellow)-, T54U (orange)-, Ψ55U (red)-tRNA^{Ser}_(GGA) と表記した. 融解温度 T_m は, 融解曲線を一次微分して算出した.

表 3-2-5 *E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) family の融解温度 (T_m)

tRNA ^{Ser} _(GGA) ^a	T_m (°C)
tRNA ^{Ser} _(GGA) transcript	64.8 ± 0.7
s ⁴ U8U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	69.6 ± 0.1
Gm18G-tRNA ^{Ser} _(GGA)	71.6 ± 0.2
D20aU-tRNA ^{Ser} _(GGA)	72.4 ± 0.9
Ψ40U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	71.7 ± 0.1
T54U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	72.8 ± 0.7
Ψ55U-tRNA ^{Ser} _(GGA)	72.0 ± 0.2
tRNA ^{Ser} _(GGA) native	74.3 ± 0.2

各 tRNA^{Ser} family の融解温度測定は 3 回行い, その平均値と標準偏差を示した.

^a*E. coli* tRNA^{Ser}_(GGA) に 6 ヶ所存在する修飾ヌクレオシドのうち, 1 つだけを欠損した hypomodified tRNA^{Ser} は, s⁴U8U-, Gm18G-, D20aU-, Ψ40U-, T54U-, Ψ55U-tRNA^{Ser}_(GGA) と表記した.

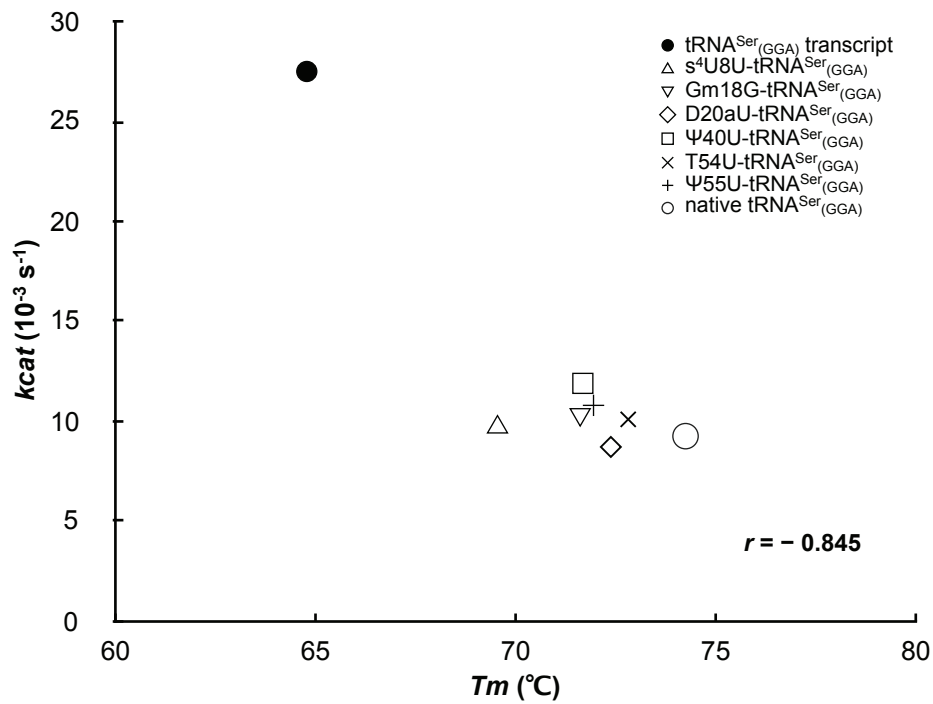


図 3-2-9 ArcTGT の k_{cat} と *E. coli* tRNA^{Ser(GGA)} family の T_m における相関関係

表 3-2-5 で得られた T_m の平均値を X 軸に, 表 3-2-4 で得られた k_{cat} の平均値を Y 軸にプロットした. 回帰直線方程式: $y = -1.94x + 150$ ($R^2 = 0.803$).

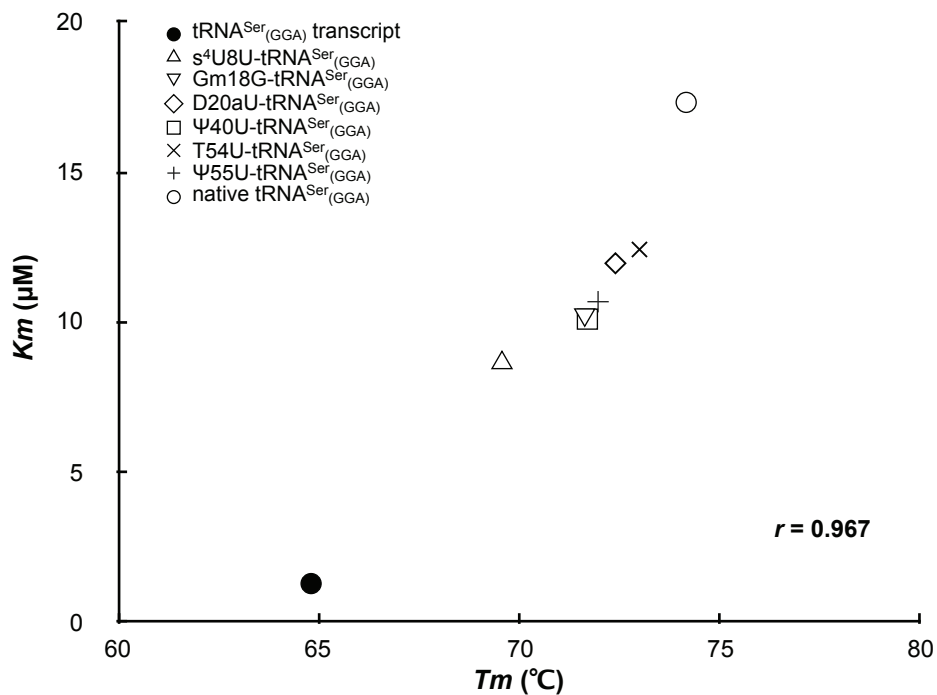


図 3-2-10 ArcTGT の K_m と *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) family の T_m における相関関係

表 3-2-5 で得られた T_m の平均値を X 軸に, 表 3-2-4 で得られた K_m の平均値を Y 軸にプロットした. 回帰直線方程式: $y = 1.50x - 96.7$ ($R^2 = 0.936$).

3.3. 考察

3.3.1 tRNA 修飾ヌクレオシドと tRNA の構造安定性

tRNA は最も研究されてきた生体高分子の一つである。特に、tRNA を特徴づけている修飾ヌクレオシドは、これまで 100 種類以上が検出されており、今もなお新規の修飾ヌクレオシドが発見されている。tRNA 修飾ヌクレオシドの研究では、大腸菌 tRNA に関する研究が最も進展しており、一つあたりの tRNA に対して 3 から 13 個の修飾ヌクレオシドが存在し、それらの修飾を導入する酵素もほとんど同定されている (Machnicka *et al.*, 2013)。また、修飾ヌクレオシドを効率良く、しかも正確に導入するためには、tRNA の構造変化が必須であると考えられており、tRNA コア領域に導入される修飾ヌクレオシドでは、その構造変化の程度も大きくなると予想されている (Grosjesn *et al.*, 1996)。tRNA 修飾ヌクレオシドの導入に伴う tRNA の構造変化を調べる最も有効な手法の一つが、tRNA 修飾酵素-tRNA 複合体の結晶構造解析である。これまでに解かれている構造解析の報告例として、 $\Psi 55$ を触媒する TruB と tRNA mimic (T-arm だけからなる tRNA) の共結晶構造解析がある (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001)。この解析結果から、おそらく T-loop における U55 がフリップアウトするだけで、TruB の触媒部位に U55 がうまく収まることができると予想された。しかしながら、TruB-tRNA 複合体の結晶構造解析と同様に、tRNA のコア領域に存在する修飾ヌクレオシドに関しては、複合体形成が困難であることから、共結晶構造に用いられている tRNA のほとんどが tRNA mimic であり、全長 tRNA を用いた例は僅かである (Ishitani *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2011; Byrne *et al.*, 2015)。ここで、tRNA transcript の構造解析から、G18 と U55 は tRNA の三次構造において塩基対を形成していることが分かっている (Byrne *et al.*, 2010)。従って、 $\Psi 55$ を導入する際には T-loop の構造変化だけでなく、tRNA の三次構造も崩壊しているはずである。しかしながら、tRNA 修飾酵素がどのようにして tRNA コア領域のターゲット部位へアプローチしているのかは、ほとんど分かっていない。

本研究は、tRNA 修飾酵素の基質 tRNA の認識機構には、tRNA の塩基配列や三次構造が重要になるが、tRNA の構造安定性も重要な因子の一つではないかという予想から始まった。ここで、tRNA のコア領域に存在する修飾ヌクレオシドの主な役割は、tRNA の構造安定化であると考えられてきたが、その根拠となる情報は NMR スペクトル分析 と X 線結晶構造解析によ

るものである。NMR スペクトル分析では、tRNA の一部の塩基配列に焦点を絞っており、オリゴヌクレオチドを用いる解析がほとんどである。そのため、tRNA の局所的な構造安定性の情報しか得られない。また、X 線結晶構造解析では全長 tRNA を用いているが、その報告例は少ない。このような背景から、修飾ヌクレオシドと tRNA 分子全体の安定性の相関については、ほとんど未解明であった。そこで、本研究では tRNA の融解温度を測定した。この方法は、古典的な生化学的手法であるが、tRNA の三次構造全体の安定性を評価するには、非常に有効な手段である。さらに、1 つだけ修飾ヌクレオシドを欠失した hypomodified tRNA^{Ser} を利用することで、どの修飾ヌクレオシドが tRNA 構造安定化あるいは不安定化に寄与するのか評価することができた。その結果、tRNA^{Ser} に存在する 6 つの修飾ヌクレオシドはどれも、 T_m の減少を招いた。ここで、s⁴U8、Gm18、T54、 Ψ 55 は tRNA の三次構造における塩基対 (s⁴U8-A14、Gm18- Ψ 55、T54-A58) を、 Ψ 40 は anticodon stem における塩基対 (G30- Ψ 40) を形成している (図 3-3-1)。さらに、ウリジンのチオール化、リボースのメチル化、プソイドウリジン化は tRNA の構造安定化をもたらすと予想されてきた。本研究では実際に、これらの修飾ヌクレオシドが tRNA の構造安定化に関わる重要な因子であることを生化学的実験により示すことができた。興味深いことに、tRNA^{Ser} に存在する修飾ヌクレオシドのなかで、唯一塩基対を形成しないジヒドロウリジンも tRNA の構造安定化に働く修飾ヌクレオシドであることが判明した。しかしながら、tRNA の D-loop のウリジンがジヒドロウリジンになると、D-loop は C3'-endo パッカリングから C2'-endo パッカリングへと構造変化を起こし、その結果、D-loop は不安定な構造になる (Dalluge *et al.*, 1996)。さらに、低温菌の tRNA に存在するジヒドロウリジンの平均的な数は、中温菌や好熱菌のそれよりも多いと報告されている (Dalluge *et al.*, 1997)。そのため、tRNA の構造安定化に寄与する、ウリジンのチオール化、リボースのメチル化、プソイドウリジン化とは対照的に、ジヒドロウリジン化は tRNA の構造不安定化をもたらすと考えられてきた。しかしながら、本研究で得られた結果から、ジヒドロウリジン化は、tRNA の三次構造全体の安定化につながることを判明した。ジヒドロウリジンが存在する D-loop には、V-/T-loop に存在する塩基と三次構造における塩基対を形成する塩基が集中している (図 3-3-1)。つまり、ジヒドロウリジンの獲得によって tRNA の D-loop は構造不安定になるが、この不安定化が tRNA の複雑な三次構造における塩基対形成 (A14-U8、G15-C48、G18-U55、G19-C56) を促す働きをしていると思われる。その結果、tRNA の三次構造全体をより強固な構造にすると推論した。

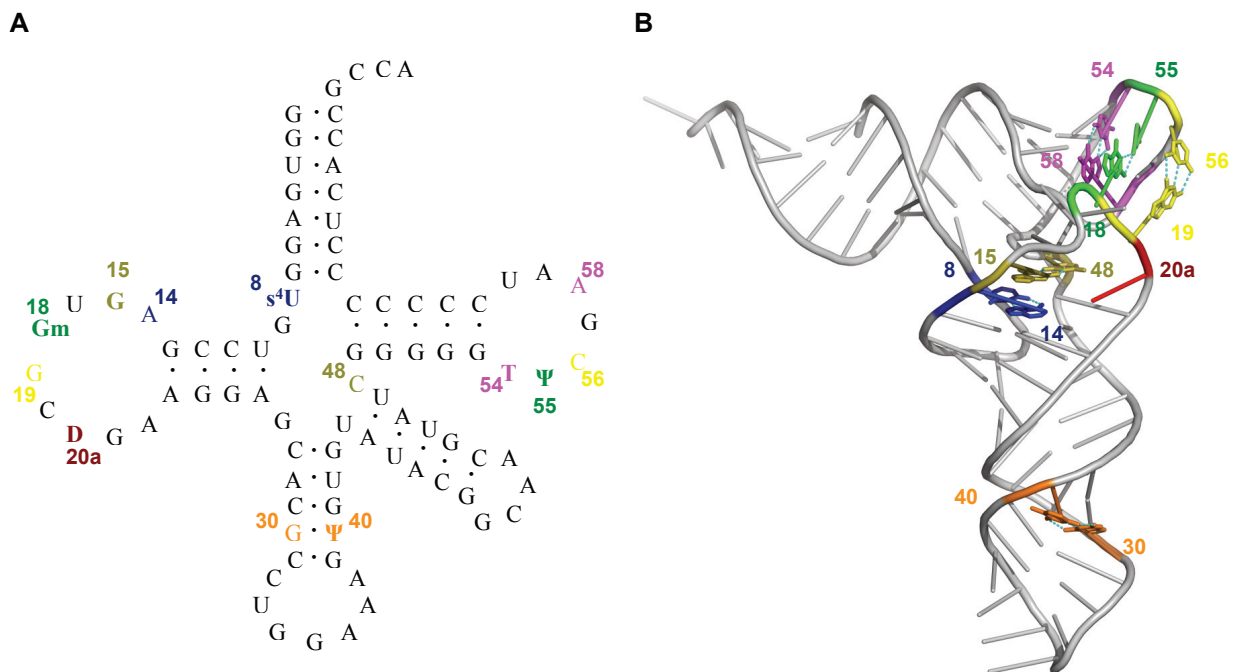


図 3-3-1 *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) に見受けられる三次構造における塩基対

(A) *E. coli* tRNA^{Ser} のクローバーリーフモデル. tRNA の三次構造における塩基対を形成するヌクレオシドの組合せを色別に示した. Anticodon stem に存在する修飾ヌクレオシド Ψ40 と G30 の二次構造における塩基対は橙色で示した. また, 唯一塩基対を形成しない修飾ヌクレオシド D20a は赤色で示してある.

(B) *E. coli* tRNA^{Ser} の三次構造における塩基対の位置. Yeast tRNA^{Phe} (PDB ID: 1EHZ) に基づいて PyMOL software (www.pymol.org) を用いて作成した. Yeast tRNA^{Phe} には 20a 位のヌクレオシドが存在しないため, 20 位のヌクレオシドを 20a 位のヌクレオシドに見立てた. 表記法は (A) と同じである. また, 水色の点線は水素結合を示している.

3.3.2 tRNA の構造安定性と ArcTGT の触媒効率

ArcTGT の触媒効率は明らかに、tRNA 修飾ヌクレオシドの存在によって低下した。この結果、ArcTGT は修飾ヌクレオシドが導入されていない tRNA を基質として好む傾向があると考えられる。さらに、ArcTGT の K_m と tRNA の T_m には強い相関関係 ($r = 0.967$) が見出されたことから、ArcTGT の基質 tRNA の認識には、tRNA の三次構造全体の不安定性が必要であると示唆された。また、*in vitro* では ArcTGT は修飾ヌクレオシドの導入が完成した native tRNA に対するグアニン交換反応はほとんど観察されなかった (図 3-2-2)。しかしながら、*in vivo* では ArcTGT は *E. coli* tRNA へ高効率で preQ₀ を導入することができた (図 3-2-1)。従って、ArcTGT による preQ₀ 導入は tRNA 修飾過程の初期段階に起こると考えられる。この ArcTGT の基質認識は、tRNA の標的部位 (G15) と関連があると予想された。ArcTGT のターゲットとなる G15 は tRNA のコア領域のなかでも、最も奥深くに埋もれた場所に位置している。そのため、G15 が ArcTGT の触媒ポケットにうまく収まるためには tRNA の大規模な構造変化が必要であり、tRNA の構造が安定化するに連れて ArcTGT に対応する構造変化は困難になるのだろう。また、native *E. coli* tRNA^{Cys} に対する ArcTGT の触媒効率は、他の native *E. coli* tRNA より非常に高いものであった (図 3-2-2)。ここで、一般的には tRNA の三次構造安定化に寄与する Levitt base pair は G15-C48 (Levitt, 1969; Klug *et al.*, 1974) であるが、tRNA^{Cys} の場合、稀な G15-G48 塩基対を形成している (Hou *et al.*, 1993) (図 3-3-2)。そのため、ArcTGT の tRNA^{Cys} の G15 へのアクセスは容易にできるのではないかと考えられる。従って、修飾ヌクレオシドに関わらず、塩基配列に依存した構造安定性も重要な因子であることが示唆された。

Ishitani *et al.* が報告した、*P. horikoshii* tRNA^{Val}-ArcTGT の共結晶構造解析において、ArcTGT と tRNA の相互作用部位のほとんどが acceptor stem と D-arm であった。さらに、L 字型構造にはない DV-helix を持つ λ 型 tRNA 構造が見出されていた (Ishitani *et al.*, 2003)。ここで、 λ 型 tRNA では、L 字型構造と同じ anticodon stem が存在していた (図 3-3-3)。このことから、ArcTGT が tRNA と複合体を形成する際、tRNA のコア領域の構造変化だけが起こると予想された。しかしながら、反応速度論的パラメーターの測定結果から、U40 のプソイドウリジン化も ArcTGT の触媒効率を低下させることが判明した。さらに、 Ψ 40 は ArcTGT の k_{cat}/K_m に最も大きな影響を及ぼす修飾ヌクレオシドの一つであることが判明した (表 3-2-4)。従って、ArcTGT と tRNA が複合体を形成する際、tRNA の anticodon stem も一時的に崩壊すると考え

られる。これまでの報告から, ArcTGT-tRNA の複合体形成には λ 型 tRNA 構造における DV-helix が必然であると考えられてきた。しかしながら, *E. coli* tRNA^{Ser} は長い V-loop をもつ class II tRNA (Brennan & Sundaralingam, 1976) に属しており, D-stem と V-loop 間で 2 塩基以上の相補的な配列が見当たらない。そのため, DV-helix を形成することは難しいと思われる。さらに, Watanabe *et al.* は, *P. horikoshii* tRNA^{Val} の D-stem の塩基配列 (G10-C25, U11-A24, C12-G23) を異なる配列にした tRNA^{Val} (C10-G25, A11-U24, G12-C23) を用いて, ArcTGT の触媒効率を反応速度論的パラメーターから評価している。その実験結果によると, wild type と mutant tRNA^{Val} に対する ArcTGT の触媒効率は全く同じであった (Watanabe *et al.*, 2001)。Mutant tRNA^{Val} もまた, *E. coli* tRNA^{Ser}(GGA) と同様に DV-helix を形成することは難しいように思われる。従って, DV-helix 構造は ArcTGT との複合体形成において必須の因子ではなく, むしろ *P. horikoshii* tRNA^{Val} の場合に観察された特異的な構造ではないかと考えた。そこで, ArcTGT が tRNA を認識し, tRNA と複合体を形成するまでのメカニズムを以下のように予想した。まず初めに, ArcTGT の PUA domain が L 字型 tRNA の acceptor stem に結合する。次いで, acceptor stem 以外の tRNA 構造全体が大規模な変化を起こし, G15 が ArcTGT の触媒ポケットに収まる。その際, tRNA は ArcTGT と安定な複合体を形成しており, 基質 tRNA の塩基配列によっては λ 型, あるいはそれ以外の未知な構造を形成する。

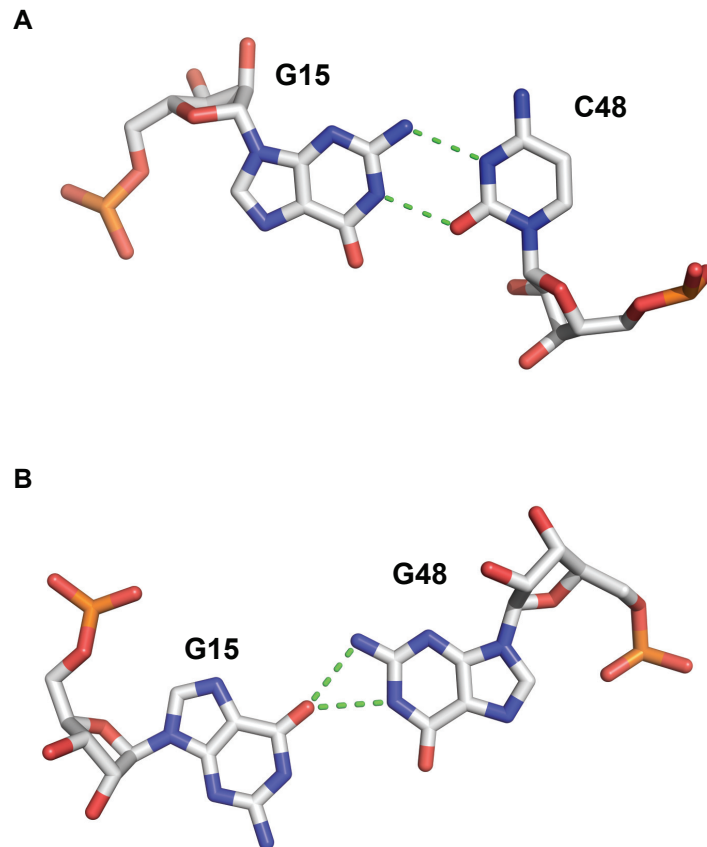


図 3-3-2 Levitt base pair

(A) 一般に見受けられる Levitt base pair (PDB ID: 1EHZ).

(B) *E. coli* tRNA^{Cys}に見受けられる稀な Levitt base pair (PDB ID: 1B23). G15-G48 は、一般に見受けられる G15-C48 の塩基対よりも弱いと予想される。また、G15-G48 は cysteinyl-tRNA synthetase による認識に重要な因子である (Hou *et al.*, 1993).

L字型



λ型

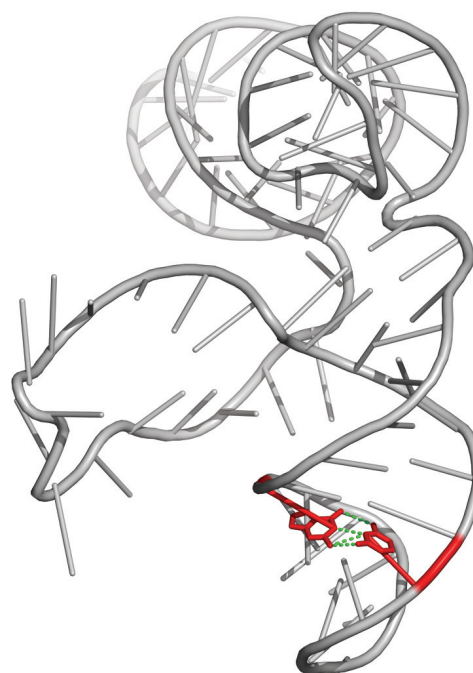


図 3-3-3 L字型とλ型 tRNA で見受けられる N30-N40 base pair

Anticodon stem における塩基対 N30-N40 のヌクレオチドを赤色で示した。また、緑色の点線は水素結合を示している。L字型 tRNA, yeast tRNA^{Phe} (PDB ID: 1EHZ); λ型 tRNA, *Pyrococcus horikoshii* tRNA^{Val} (PDB ID: 1J2B).

3.3.3 tRNA 修飾過程における修飾ヌクレオシドの導入順序

僅か 6 種類の修飾ヌクレオシドによって、*E. coli* tRNA^{Ser} の構造安定性は飛躍的に増した。Anticodon loop 以外の修飾ヌクレオシドの大半は、二次構造あるいは三次構造における塩基対形成に関与しており、さらには、その修飾ヌクレオシドのほとんどが各生物ドメインにおいて高度に保存されたものである。また、それらの修飾ヌクレオシドが一つでも欠けると、tRNA の三次構造は大幅に不安定になってしまう。おそらく生物の進化の過程において、タンパク質合成をより忠実に効率良く行うために、tRNA を安定化させてきた結果だと考えられる。tRNA の修飾過程において、tRNA は徐々に構造安定性を獲得していく。ArcTGT の触媒効率が tRNA の構造安定性に依存しているように、他の tRNA 修飾酵素にもそれぞれ適した tRNA の構造安定性が存在していることが予想される。つまり、tRNA の修飾ヌクレオシドが導入される順序が存在している可能性がある。tRNA と tRNA 修飾酵素の複合体形成における複雑な構造変遷に関する研究は少ないが、ここではいくつかの例を紹介する。U8 のチオール化を触媒する ThiI の触媒機構では、おそらく ArcTGT のように K_m と T_m に正の相関関係が存在していると考えられる。U8 は G15 と同様に L 字型 tRNA のコア領域の内部に埋もれている。また、ThiI の結晶構造解析では、全長の tRNA をドッキングされたモデルが提唱されている (Neumann *et al.*, 2014)。ThiI-全長 tRNA 複合体のドッキングモデルでは、ThiI の pyrophosphatase domain と tRNA の D-stem と anticodon stem に立体障害が生じる。つまり、ArcTGT と同様に ThiI と tRNA の複合体形成には、tRNA の大規模な構造変化が必須であり、tRNA の構造は λ 型のように L 字型構造とは異なる構造を形成していると考えられる。一方、Gm18, D20a, Ψ 40, T54, Ψ 55 は tRNA のコア領域のなかでも U8, G15 と比べて表面側に位置している。つまり、これらの修飾ヌクレオシドを導入する酵素は比較的容易に tRNA のターゲットサイトにアタックできるため、tRNA の大規模な構造変化を伴わないと予想できる。ここでは、tRNA 修飾酵素-全長 tRNA の共結晶構造が解かれている、ジヒドロウリジンに関する具体例を挙げる。まず、Dus の触媒効率は tRNA の修飾ヌクレオシドの存在により飛躍的に高まることが判明している (Rider *et al.*, 2009)。また、DusA/DusC-全長 tRNA の共結晶構造解析から、DusA/DusC が tRNA と複合体を形成した際の tRNA の構造は、tRNA のターゲットとなるウリジンだけが tRNA body からフリップアウトしているだけであった (Yu *et al.*, 2011, Byrne *et al.*,

2015) (図 3-3-4). つまり, Dus の基質 tRNA 認識には, 構造が安定な tRNA が必須になる. そのため, K_m と T_m には負の相関関係が存在すると考えられる.

本研究では, 生化学的手法により, 結晶構造解析では曖昧なままであった, ArcTGT と複合体を形成する際に起こる tRNA の構造変化を詳細に解明することができた. おそらく, この手法を用いることで, 依然解明されていない tRNA 修飾酵素と tRNA の複合体形成における構造変化, さらには tRNA 修飾過程における修飾ヌクレオシドの導入順序の解明に繋がること期待される.

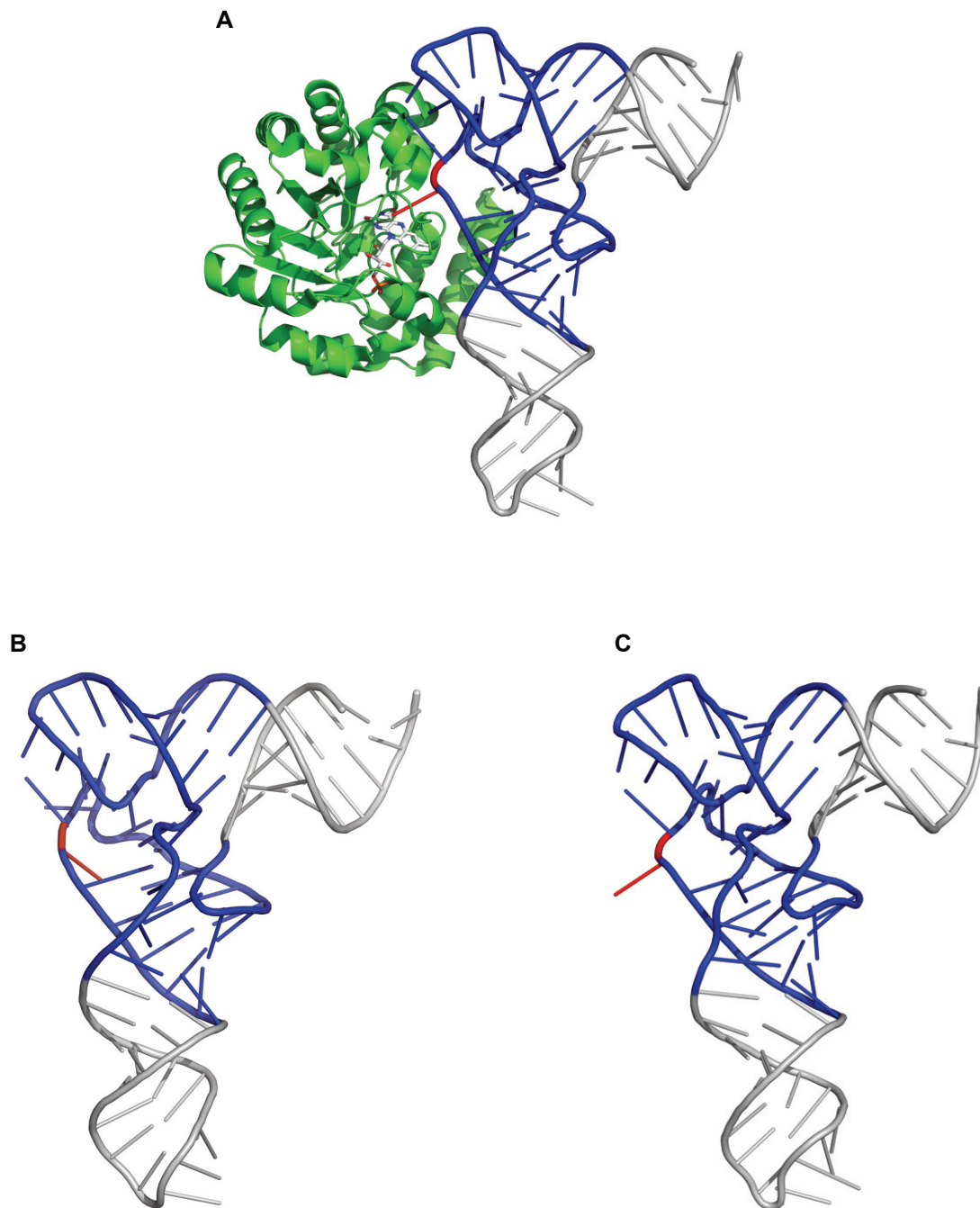


図 3-3-4 DusA と複合体を形成した際の tRNA の構造変化

(A) *Thermus thermophilus* DusA-tRNA-FMN 複合体での結晶構造 (PDB ID: 3B0V).

(B) L 字型 tRNA, yeast tRNA^{Phe} (PDB ID: 1EHZ).

(C) Dus A と複合体を形成した際の *Thermus thermophilus* tRNA^{Phe} (PDB ID: 3B0V). tRNA のコア領域は青色で, DusA の標的部位である U20 は赤色で示してある.

第4章 総括

4.1 ArcTGT の触媒機構

本研究では, split ArcTGT を *M. acetivorans* の細胞抽出液から精製し, そのサブユニット構成の同定を試みた. その結果, split ArcTGT では, full-size ArcTGT の N 末端と C 末端ドメインに相当するサブユニットが別々の遺伝子にコードされており, 2 種類のサブユニットが細胞内で強固に相互作用することで複合体を形成していることを示した. これまでは主に full-size ArcTGT の基質 tRNA 認識や触媒機構が研究されてきたが, split ArcTGT も full-size ArcTGT と同様の方法で tRNA を認識し触媒していることが判明した. また, split ArcTGT は tRNA を介さずに複合体を形成しており, 2 種類のサブユニット間における相互作用が ArcTGT 全体の構造安定性に重要であることも示唆された.

これまでの結晶構造解析により, tRNA 修飾酵素と複合体を形成した tRNA の構造が明らかにされてきた. そのおかげで, ArcTGT の基質 tRNA の認識機構は, L 字型の acceptor stem を認識し, 結合することで始まることが示された. そして, tRNA の三次構造におけるコア領域を大規模に崩壊させることで, G15 を触媒ポケットに収めることができると考えられてきた. 本研究では, ArcTGT の基質として修飾ヌクレオシドの組成が異なる tRNA を用いることで, tRNA の anticodon stem も一時的に崩壊することを新たに見出すことができた. また, ArcTGT と複合体を形成した tRNA の構造は, その塩基配列や鎖長により λ 型以外の構造を形成することが示唆された.

4.2 アーケオシン生合成機構の最終ステップ

アーケオシン生合成の最終ステップの触媒を担う酵素として, ArcS が報告されている. しかしながら, ArcS の触媒機構に関する報告例はほとんどない. そこで, ArcS の機能解析も試みてきた. 大腸菌発現系を利用して recombinant *M. acetivorans* ArcS を調製し, preQ₀(15)-tRNA を G⁺(15)-tRNA に変換する活性を観察してみたが, その活性は全く検出されなかった. さらに, Phillips *et al.* と同様に, recombinant *Methanocaldococcus jannaschii* ArcS を調製し, 彼らの実験を再現しようと試みたが, ここでも ArcS の活性を検出することはできなかった. しかしながら

ら, *H. volcanii* の *arcS* 遺伝子破壊株由来の tRNA 中にアーケオシンが存在していないことから, ArcS がアーケオシン生合成系に関与していることは間違い無いと考えられる. 従って, アーケオシン生合成には, ArcTGT と ArcS 以外の酵素が関与していると予想される. また, ArcS は古細菌全体, 特に Crenarchaeota にはほとんど保存されていない. つまり, Euryarchaeota と Crenarchaeota では, preQ₀ 導入後のアーケオシン生合成経路が全く異なると考えられる. 今後, アーケオシン生合成機構の全容解明が待たれる.

4.3 tRNA の修飾ネットワーク

数十年に及ぶ tRNA 修飾機構に関する研究では, 主に基質である tRNA の塩基配列や部位情報, あるいは tRNA 修飾酵素単独での結晶構造解析といった局所的で断片的な解析がほとんどであった. そのため, tRNA 修飾酵素の基質認識や触媒メカニズムに関しては, 依然として未解明な部分が多く残されている. tRNA の修飾過程の場合, 一つの tRNA に複数の修飾ヌクレオシドを導入するために, 効率よく, しかも正確に全ての修飾が導入される仕組みがあるのだろう. ここで, 我々が行った生化学的手法から, 基質 tRNA の認識機構には, tRNA 分子全体の構造安定性が重要な因子になることが判明した. 従って, 細胞内では修飾ヌクレオシドの導入順序は tRNA の構造安定性に基づいて決められていることが予想される. さらに, 修飾ヌクレオシドの導入に伴う tRNA の構造変化の程度を考慮すると, より内部に存在する修飾ヌクレオシドから順番に導入されると考えられる.

大腸菌 tRNA の D-loop に存在するジヒドロウリジンは, tRNA 修飾過程の終盤に導入される修飾であり, tRNA の構造安定性をより強固にするために, tRNA 三次構造における塩基対のバランスを調整していることが示唆された. また, 大腸菌 tRNA の D-loop に存在するウリジンが全てジヒドロウリジンになる訳ではないことから, 必要になるジヒドロウリジンの最適な数は Dus が tRNA の構造安定性を確認することで決めているのではないかと予想している. しかしながら, これだけでは説明できない現象が多数ある. 本研究のテーマであるアーケオシンの場合, G15 を持つ古細菌 tRNA の全てに G⁺15 が導入される訳ではない. しかしながら, *in vitro* では, ArcTGT は G15 を持つ tRNA transcript に対して, 生物ドメインの違いを考慮することなく, 無差別に preQ₀ を導入できた. つまり, tRNA 修飾過程には, これまでの研究方法では解明できない複雑なメカニズムが存在していることが示唆された. ここで, tRNA の修

飾過程を tRNA の成熟化プロセス全体から捉えた場合、トリミングやスプライシング等の前後関係も関係してくるはずである。さらに、真核生物の場合、tRNA の成熟化には細胞内の場所などの因子も関与してくるため、tRNA 修飾酵素の局在性や tRNA 輸送に関するタンパク質等も考慮しなければならない。これらのことを踏まえると、tRNA 修飾過程には tRNA 修飾酵素群が協調して機能するネットワークが存在していると予想している。たとえば、preQ₀ の導入の際には、tRNA の構造が大規模に壊れるとともに、複数の tRNA 修飾酵素が同時に、あるいは連携することで次々と修飾ヌクレオシドを導入していく。ここでは、tRNA を媒体にした巨大な複合体、あるいは tRNA 修飾酵素同士の複合体形成が存在しているのかもしれない。今後こうした tRNA 修飾ネットワークの詳細が明らかになることを期待したい。

参考文献

- Agris, P.F., Vendeix, F.A. & Graham, W.D. (2007) tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.*, **366**, 1–13.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. (1999) Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery. *J. Mol. Evol.*, **48**, 291–302.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008.
- Bai, Y., Fox, D.T., Lacy, J.A., Van Lanen, S.G. & Iwata-Reuyl, D. (2000) Hypermodification of tRNA in thermophilic archaea. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28731–28738.
- Bishop, A.C., Xu, J., Johnson, R.C., Schimmel, P. & de Crécy-Lagard, V. (2002) Identification of the tRNA-dihydrouridine synthase family. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25090–25095.
- Björk, G.R. & Isaksson, L.A. (1970) Isolation of mutants of *Escherichia coli* lacking 5-methyluracil in transfer ribonucleic acid or 1-methylguanine in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, **51**, 83–100.
- Brennan, T. & Sundaralingam, M. (1976) Structure of transfer RNA molecules containing the long variable loop. *Nucleic Acids Res.*, **3**, 3235–3250.
- Byrne, R.T., Konevega, A.L., Rodnina, M.V. & Antson, A.A. (2010) The crystal structure of unmodified tRNA^{Phe} from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4154–4162.
- Byrne, R.T., Jenkins, H.T., Peters, D.T., Whelan, F., Stowell, J., Aziz, N., Kasatsky, P., Rodnina, M.V., Koonin, E.V., Konevega, A.L. & Antson, A.A. (2015) Major reorientation of tRNA substrates defines specificity of dihydrouridine synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 6033–6037.
- Dalluge, J.J., Hashizume, T., Sopchik, A.E., McCloskey, J.A. & Davis, D.R. (1996) Conformational flexibility in RNA: the role of dihydrouridine. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1073–1079.
- Chen, Y.C., Brooks, A.F., Goodenough-Lashua, D.M., Kittendorf, J.D., Showalter, H.D. & Garcia, G.A. (2011) Evolution of eukaryal tRNA-guanine transglycosylase: insight gained from the heterocyclic substrate recognition by the wild-type and mutant human and *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylases. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 392834–2844.
- Chen, Y.C., Kelly, V.P., Stachura, S.V. & Garcia, G.A. (2010) Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: Confirmation of the heterodimeric subunit structure. *RNA*, **16**, 958–968.

- Crick, F. (1958) On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 139–163.
- Crick, F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*, **227**, 561–563.
- Dalluge, J.J., Hamamoto, T., Horikoshi, K., Morita, R.Y., Stetter, K.O. & McCloskey, J.A. (1997) Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, **179**, 1918–1923.
- Davis, D.R. (1995) Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 5020–5026.
- Ehresmann, B., Imbault, P. & Well, J.H. (1973) Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.*, **54**, 454–463.
- Englert, M., Sheppard, K., Aslanian, A., Yates, J. R., & Söll, D. (2011) Archaeal 3'-phosphate RNA splicing ligase characterization identifies the missing component in tRNA maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 1290–1295.
- Farabaugh, P.J. & Björk, G.R. (1999) How translational accuracy influences reading frame maintenance. *EMBO J.*, **18**, 1427–1434.
- Gregson, J.M., Crain, P.F., Edmonds, C.G., Gupta, R., Hashizume, T., Phillipson, D.W. & McCloskey, J.A. (1993) Structure of the archaeal transfer RNA nucleoside G⁺-15 (2-amino-4, 7-dihydro-4-oxo-7-β-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide (Archaeosine)). *J. Biol. Chem.*, **268**, 10076–10086.
- Grosjean, H., Sprinzl, M. & Steinberg, S. (1995) Posttranscriptionally modified nucleosides in transfer RNA: Their locations and frequencies. *Biochimie*, **77**, 139–141.
- Grosjean, H., Edqvist, J., Stråby, K.B. & Giegé, R. (1996) Enzymatic formation of modified nucleosides in tRNA: dependence on tRNA architecture. *J. Mol. Biol.*, **255**, 67–85.
- Harada, F. & Nishimura, S. (1972) Possible anticodon sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, and tRNA^{Asp} from *Escherichia coli* B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acids. *Biochemistry*, **11**, 301–308.
- Hoang, C. & Ferré-D'Amaré, A.R. (2001) Cocystal structure of a tRNA Ψ55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme. *Cell*, **107**, 929–939.
- Hou, Y.M., Westhof, E. & Giegé, R. (1993) An unusual RNA tertiary interaction has a role for the specific aminoacylation of a transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 6776–6780.
- Iwata-Reuyl, D. (2003) Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. *Bioorg. Chem.*, **31**, 24–43.

- Ikedo-Boku, A., Ohno, S., Hibino, Y., Yokogawa, T., Hayashi, N. & Nishikawa, K. (2013) A simple system for expression of proteins containing 3-azidotyrosine at a pre-determined site in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **153**, 317–326.
- Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Kijimoto, T., Nameki, N., Watanabe, M., Kondo, H., Sekine, M., Okada, N., Nishimura, S. & Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase. *J. Mol. Biol.*, **318**, 665–677.
- Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S. & Yokoyama, S. (2003) Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell*, **113**, 383–394.
- Jack, A., Ladner, J.E. & Klug, A. (1976) Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **108**, 619–649.
- Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R.K., Sprinzl, M., Stadler, P.F. & Pütz, J. (2009) tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D159–D162.
- Kammen, H.O., Marvel, C.C., Hardy, L. & Penhoet, E.E. (1988) Purification, structure, and properties of *Escherichia coli* tRNA pseudouridine synthase I. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2255–2263.
- Kawai, G., Yamamoto, Y., Kamimura, T., Masegi, T., Sekine, M., Hata, T., Iimori, T., Watanabe, T., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1992) Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group. *Biochemistry*, **31**, 1040–1046.
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H., Seeman, N.C. & Rich, A. (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science*, **185**, 435–440.
- Klug, A., Ladner, J. & Robertus, J.D. (1974) The structural geometry of co-ordinated base changes in transfer RNA. *J. Mol. Biol.*, **89**, 511–516.
- Kumar, R.K. & Davis, D.R. (1997) Synthesis and studies on the effect of 2-thiouridine and 4-thiouridine on sugar conformation and RNA duplex stability. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1272–1280.
- Leontis, N.B., Stombaugh, J. & Westhof, E. (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3497–3531.
- Levitt, M. (1969) Detailed molecular model for transfer ribonucleic acid. *Nature*, **224**, 759–763.
- Machnicka, M.A., Milanowska, K., Oglou, O.O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K.M., Helm, M.,

- Bujnicki, J.M. & Grosjean, H. (2013) MODOMICS: a database of RNA modification pathways-2013 update. *Nucleic Acids Res.*, **41**, D262–D267.
- Mahapatra, A., Patel, A., Soares, J. A., Larue, R. C., Zhang, J. K., Metcalf, W. W. & Krzycki, J. A. (2006) Characterization of a *Methanosarcina acetivorans* mutant unable to translate UAG as pyrrolysine. *Mol. Microbiol.*, **59**, 56–66.
- Mandal, D., Köhrer, C., Su, D., Babu, I. R., Chan, C. T. Y., Liu, Y., Söll, D., Blum, P., Kuwahara, M., Dedon, P.C., Rajbhandary, U.T. (2014) Identification and codon reading properties of 5-cyanomethyl uridine, a new modified nucleoside found in the anticodon wobble position of mutant haloarchaeal isoleucine tRNAs. *RNA*, **20**, 177–188.
- Maglott, E.J., Deo, S.S., Przykorska, A. & Glick, G.D. (1998) Conformational transitions of an unmodified tRNA: implications for RNA folding. *Biochemistry*, **37**, 16349–16359.
- Meier, F., Suter, B., Grosjean, H., Keith, G. & Kubli, E. (1985) Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences ‘*in vivo*’ decoding properties. *EMBO J.*, **4**, 823–827.
- Migawa, M.T., Hinkley, J.M., Hoops, G.C. & Townsend, L.B. (1996) A two step synthesis of the nucleoside Q precursor 2-amino-5-cyanopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one (preQ₀). *Synth. Commun.*, **26**, 3317–3322.
- Miles, Z.D., McCarty, R.M., Molnar, G. & Bandarian, V. (2011) Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 7368–7372.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. & Uhlenbeck, O.C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8783–8798.
- Morris, R.C., Brown, K.G. & Elliott, M.S. (1999) The effect of queuosine on tRNA structure and function. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **16**, 754–774.
- Mueller, E.G., Buck, C.J., Palenchar, P.M., Barnhart, L.E. & Paulson, J.L. (1998) Identification of a gene involved in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2606–2610.
- Neumann, P., Lakomek, K., Naumann, P.T., Erwin, W.M., Lauhon, C.T. & Ficner, R. (2014) Crystal structure of a 4-thiouridine synthetase-RNA complex reveals specificity of tRNA U8 modification. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 6673–6685.
- Nishimura, S. (1983) Structure, biosynthesis, and function of queuosine in transfer RNA. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **28**, 49–73.
- Nobles, K.N., Yarian, C.S., Liu, G., Guenther, R.H. & Agris, P.F. (2002) Highly conserved modified nucleosides influence Mg²⁺-dependent tRNA folding. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4751–4760.

- Nomura, Y., Ohno, S., Nishikawa, K. & Yokogawa, T. (2016) Correlation between the stability of tRNA tertiary structure and the catalytic efficiency of a tRNA-modifying enzyme, archaeal tRNA-guanine transglycosylase. *Genes to Cells*, **21**, 41–52.
- Nomura, Y., Onda, Y., Ohno, S., Taniguchi, H., Ando, K., Oka, N., Nishikawa, K. & Yokogawa, T. (2013) Purification and comparison of native and recombinant tRNA-guanine transglycosylases from *Methanosarcina acetivorans*. *Protein Expr. Purif.*, **88**, 13–19.
- Nurse, K., Wrzesinski, J., Bakin, A., Lane, B.G. & Ofengand, J. (1995) Purification, cloning, and properties of the tRNA Ψ 55 synthase from *Escherichia coli*. *RNA*, **1**, 102–112.
- Ofengand, J., Del Campo, M. & Kaya, Y. (2001) Mapping pseudouridines in RNA molecules. *Methods*, **25**, 365–373.
- Ochman, H., Gerber, A.S. & Hartl, (1988) D.L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.*, **120**, 621–623.
- Okada, N. & Nishimura, S. (1979) Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3061–3066.
- Okada, N., Noguchi, S., Kasai, H., Sindo-Okada, N., Ohgi, T., Goto, T. & Nishimura, S. (1979) Novel mechanism of post-transcriptional modification of tRNA. Insertion of bases of Q precursors into tRNA by a specific tRNA transglycosylase reaction. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3067–3073.
- Oliva, R., Tramontano, A. & Cavallo, L. (2007) Mg²⁺ binding and archaeosine modification stabilize the G15-C48 Levitt base pair in tRNAs. *RNA*, **13**, 1427–1436.
- Pérez-Arellano, I., Gallego, J. & Cervera, J. (2007) The PUA domain - a structural and functional overview. *FEBS J.*, **274**, 4972–4984.
- Persson, B.C., Jäger, G. & Gustafsson, C. (1997) The *spoU* gene of *Escherichia coli*, the fourth gene of the *spoT* operon, is essential for tRNA (Gm18) 2'-O-methyltransferase activity. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4093–4097.
- Phillips, G., Chikwana, V.M., Maxwell, A., EI-Yacoubi, B., Swairjo, M.A., Iwata-Reuyl, D. & de Crécy-Lagard, V. (2010) Discovery and characterization of an amidinotransferase involved in the modification of archaeal tRNA. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12706–12713.
- Phillips, G., Swairjo, M.A., Gaston, K.W., Bailly, M., Limbach, P.A., Iwata-Reuyl, D. & de Crécy-Lagard, V. (2012) Diversity of archaeosine synthesis in crenarchaeota. *ACS Chem. Biol.*, **7**, 300–305.
- Popow, J., Englert, M., Weitzer, S., Schleiffer, A., Mierzwa, B., Mechtler, K., Towitzch, S., Will, C., Lührmann, R., Söll, D. & Martinez, J. (2011) HSPC117 is the essential subunit of a human tRNA splicing ligase complex. *Science*, **331**, 760–764.

- Rider, L.W., Ottosen, M.B., Gattis, S.G. & Palfey, B.A. (2009) Mechanism of dihydrouridine synthase 2 from yeast and the importance of modifications for efficient tRNA reduction. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10324–10333.
- Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F. & Klug, A. (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature*, **250**, 546–551.
- Romier, C., Meyer, J.E. & Suck, D. (1997) Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms. *FEBS Lett.*, **416**, 93–98.
- Sabina, J. & Söll, D. (2006) The RNA-binding PUA domain of archaeal tRNA-guanine trasglycosylase is not required for archaeosine formation. *J. Biol. Chem.*, **281**, 6993–7001.
- Sampson, J.R. & Uhlenbeck, O.C. (1988) Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1033–1037.
- Serebrov, V., Vassilenko, K., Kholod, N., Gross, H.J. & Kisselev, L. (1998) Mg²⁺ binding and structural stability of mature and *in vitro* synthesized unmodified *Escherichia coli* tRNA^{Phe}. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2723–2728.
- Shelton, V.M., Sosnick, T.R. & Pan, T. (1999) Applicability of urea in the thermodynamic analysis of secondary and tertiary RNA folding. *Biochemistry*, **38**, 16831–16839.
- Shindo-Okada, N., Okada, N., Ohgi, T., Goto, T. & Nishimura, S. (1980) Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver. *Biochemistry*, **19**, 395–400.
- Slany, R.K., Bösl, M. & Kersten, H. (1994) Transfer and isomerization of the ribose moiety of AdoMet during the biosynthesis of queuosine tRNAs, a new unique reaction catalyzed by the QueA protein from *Escherichia coli*. *Biochimie*, **76**, 389–393.
- Sowers, K.R., Baron, S.F. & Ferry, J.G. (1984) *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 971–978.
- Sussman, J.L., Holbrook, S.R., Warrant, R.W., Church, G.M. & Kim, S.H. (1978) Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. I. Crystallographic refinement. *J. Mol. Biol.*, **123**, 607–630.
- Suzuki, T., Ikeuchi, Y., Noma, A., Suzuki, T. & Sakaguchi, Y. (2007) Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods Enzymol.*, **425**, 211–229.
- Urbonavičius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G. & Björk, G.R. (2001) Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.*, **20**, 4863–4873.

- Watanabe, K., Yokoyama, S., Hansske, F., Kasai, H. & Miyazawa, T. (1979) CD and NMR studies on the conformational thermostability of 2-thioribothymidine found in the TΨC loop of thermophile tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 671–677.
- Watanabe, K., Oshima, T., Iijima, K., Yamaizumi, Z. & Nishimura, S. (1980) Purification and thermal stability of several amino acid-specific tRNAs from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.*, **87**, 1–13.
- Watanabe, M., Matsuo, M., Tanaka, S., Akimoto, H., Asahi, S., Nishimura, S., Katze, J.R., Hashizume, T., Crain, P.F., McCloskey, J.A. & 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.
- Watanabe, M., Nameki, N., Matsuo-Takasaki, M., Nishimura, S. & Okada, N. (2001) tRNA recognition of tRNA-guanine transglycosylase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2387–2394.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4576–4579.
- Yokogawa, T., Kitamura, Y., Nakamura, D., Ohno, S. & 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.
- Yu, F., Tanaka, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Nakamura, A., Hirano, N., Suzuki, T., Yao, M. & Tanaka, I. (2011) Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 19593–19598.
- Zubay, G. (1962) The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.*, **4**, 347–356.

謝辞

自身の研究生活は、西川一八前教授のもとで始まりました。西川先生のご指導のもと、「研究」の意義について深く学ばせて頂きました。心より感謝いたします。

横川隆志教授からは、研究に対する真摯な姿勢を学ばせて頂きました。先生の教えのもと、「研究者としてのあり方」を学ぶことができました。

横川研究室・大野敏助教からは、多くの機器における詳細な操作方法を学ばせて頂きました。また、横川先生と大野先生、お二方には、大学生活や将来の人生設計についての助言や激励を頂きました。心より感謝いたします。

岐阜大学・工学部・化学生命工学科、岡夏央准教授と研究室の皆様には、ArcTGT の様々な基質化合物を頂きました。深く感謝いたします。

愛媛大学・大学院理工学研究科・物質生命工学、堀弘幸教授と研究室の皆様には、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 の *arcS* 遺伝子破壊株由来の tRNA を調製して頂きました。深く感謝いたします。

西川研究室と横川研究室の皆様には、実験の準備等で多くのサポートをして頂きました。深く感謝いたします。特に、西川研究室卒業生・恩田由美子さんには、本研究のセットアップ等にご尽力頂きました。深く感謝いたします。横川研究室・安田旭宏さんには、本研究で使用した酵素の調製等にご尽力頂きました。深く感謝いたします。

最後に、これまであらゆる場面で支援を頂いた両親には、心より感謝いたします。

2016年3月