

高度好塩菌における tRNA 修飾システムの解明

東端 啓貴

(東洋大学 生命科学部)

研究の目的

アーキアのtRNAに特異的に存在するアーキオシンは、その修飾がtRNAの15番目のヌクレオシドのグアニン(G15)で起こること、構造が7-デアザグアノシン誘導体であること、tRNA修飾過程に塩基置換反応を含む等、他のtRNA修飾塩基には見られない特異的な性質を数多く有している。バクテリアにおいて、アーキオシンに対応する修飾塩基がキューオシンである。キューオシンがtRNAへ導入されない変異株は一部のタンパク質の合成において正確性・伸長能が低下し、*Shigella*属細菌(赤痢菌)では病原性が低下する^{1,2)}。このことから、キューオシン生合成に関する酵素が薬剤開発のターゲットとして注目され各種阻害剤が合成されている³⁾。アーキオシンとキューオシン生合成経路には、preQ₀塩基を合成するのに必要な4つの酵素(GCHI, QueC, QueD, QueE)が共通して用いられている(図1)。近年、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*および*Streptomyces rimosus*由来のこれらの酵素活性が*in vitro*において確認された⁴⁾。しかしながら、アーキアのQueC, QueD, QueEの酵素活性は確認されておらず、アーキオシン生合成経路の最終ステップを触媒する酵素(ArcX)については、その遺伝子さえも同定されていない。そこで、本研究では、アーキオシン生合成遺伝子破壊株を構築することで、アーキオシンの生理的意義及びアーキオシン全生合成経路を解明することを目的とした。

方法と結果

高度好塩菌は、高塩濃度の環境に適応するため、その細胞内イオン濃度(KCl)を高濃度に保っている。アーキオシンはtRNAの構造維持に重要な役割を果たしていると考えられているが⁵⁾、高塩濃度環境下における(*in vitro*での)アーキオシンの効果は明らかにされていない。本研究では、ゲノムの全塩基配列が利用可能であり、且つ遺伝子破壊系が確立されている高度好塩性アーキア*Halobacterium* sp. NRC-1株を用いた。

ArcXは、ニトリル[R-C≡N]からアミジン[R-C(=NH)NH₂]への反応を触媒すると考えられるが、未だ同定されていない。そこで、tRNAグアニントランスグリコシラーゼ(TGT)のPUAドメイン(tRNA修飾酵素に広く保存されている)とλ型tRNA(G15へのaccessibilityが高まる構造)の構造維持に関与するC2ドメイン⁶⁾を基にアーキアのデータベース上を検索し、アーキオシン生合成経路の最終ステップを触媒する酵素の有力な候補遺伝子(*arcX*)を得た。次に、アーキオシン生合成遺伝子(*queC*, *queD*, *queE*, *tgt*, *arcX*)を取得するため、*Halobacterium* sp. NRC-1株のゲノム情報を基にプライマーを製作し、本菌から調製した染色体DNAを用いたPCR法によりそれぞれの遺伝子を含むDNA断片(約2.5kbp)を増幅した。すべてのDNA断片をpUC19へそれぞれクローン化できた。メピロニン耐性遺伝子断片をクローン化断片にある標的遺伝子内へ挿入すること

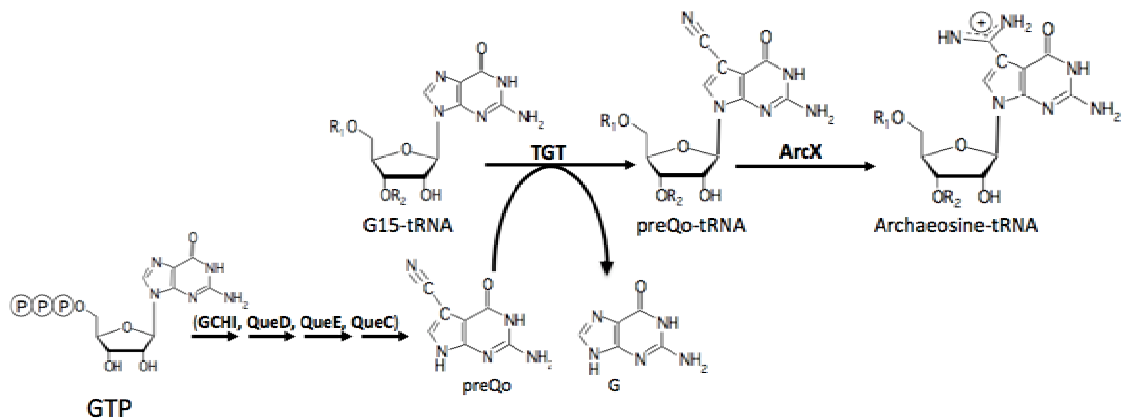


図1 アーキオシンの生合成経路

により遺伝子破壊用プラスミドを構築した。メビロニン耐性遺伝子断片は、高度好塩性アーキアと*E.coli*のシャトルベクターであるpWL102⁷⁾からPCR法により得た。Clineらの方法に従い⁸⁾、それぞれの遺伝子破壊用プラスミドを*Halobacterium* sp. NRC-1 株内へ導入し、シムバスタチン（メビロニン類似物質）を添加（終濃度 25 μ g/ml）した固形培地へ塗布することで、標的遺伝子破壊株の取得を試みた。

結論

本研究課題により、アーキオシン生合成遺伝子破壊用プラスミドを構築できた。現在、それぞれの遺伝子破壊株の取得を試みているところである。

文献

- 1) Durand, J. M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M., and Sasakawa, C. *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **176**: 4627-4634 (1994)
- 2) Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E., and Björk, G. R. Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Mol Microbiol.*, **35**: 924-935 (2000)
- 3) Brenk, R., Meyer, E.A., Reuter, K., Stubbs, M.T., Garcia, G.A., Diederich, F., and Klebe, G. Crystallographic study of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase suggests a new structure-based pharmacophore for virtual screening. *J. Mol. Biol.*, **338**: 55-75 (2004)
- 4) McCarty, R. M., Somogyi, Á., Lin, G., Jacobsen, N. E., and Bandarian, V. The deazapurine biosynthetic pathway revealed: in vitro enzymatic synthesis of PreQ(0) from guanosine 5'-triphosphate in four steps. *Biochemistry* **48**: 3847-3852 (2009)
- 5) Oliva, R., Tramontano, A., and Cavallo, L. Mg²⁺ binding and archaeosine modification stabilize the G15-C48 Levitt base pair in tRNAs. *RNA*, **13**: 1427-1436 (2007)

- 6) Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S., and Yokoyama, S. Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell*, **113**: 383-394 (2003)
- 7) Lam, W. L. and Doolittle, W. F. Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5478-5482 (1989)
- 8) Cline, S. W., Lam, W. L., Charlebois, R. L., Schalkwyk, L. C., and Doolittle, W. F. Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **35**: 148-152 (1989)