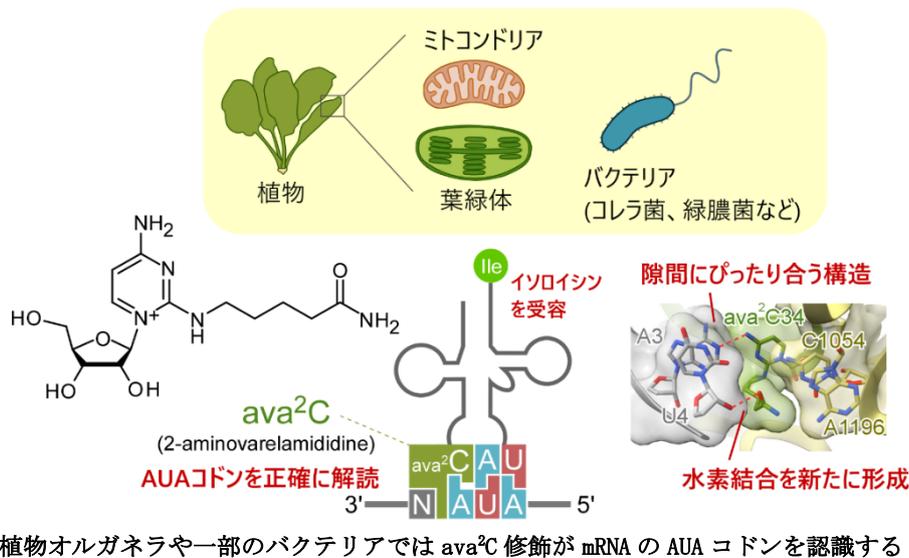


病原性細菌と植物に共通の新規 tRNA 修飾 ——タンパク質合成の隠れた調整役——

発表のポイント

- ◆ コレラ菌や緑膿菌を含む一部の病原性細菌と植物のオルガネラから、tRNA の新たなシチジン修飾、2-アミノバレラミジジン(ava²C)を発見しました。ava²C 修飾は、tRNA へのアミノ酸付加と、mRNA 上のコドン認識に必須であり、タンパク質合成に欠かせない働きをしていることがわかりました。
- ◆ AUA コドンの認識に関わるシチジン修飾は他の生物種において二種類見つかっていますが、今回見つかった ava²C はそれらとは異なる修飾です。これは、生命活動の根幹を成す遺伝情報の読み取り方が生物ごとに微調整されていることを示す重要な発見です。
- ◆ 本成果は将来的に、病原菌のもつ tRNA 修飾を阻害することで増殖を抑えるような抗生物質の開発にも応用が期待できます。



発表概要

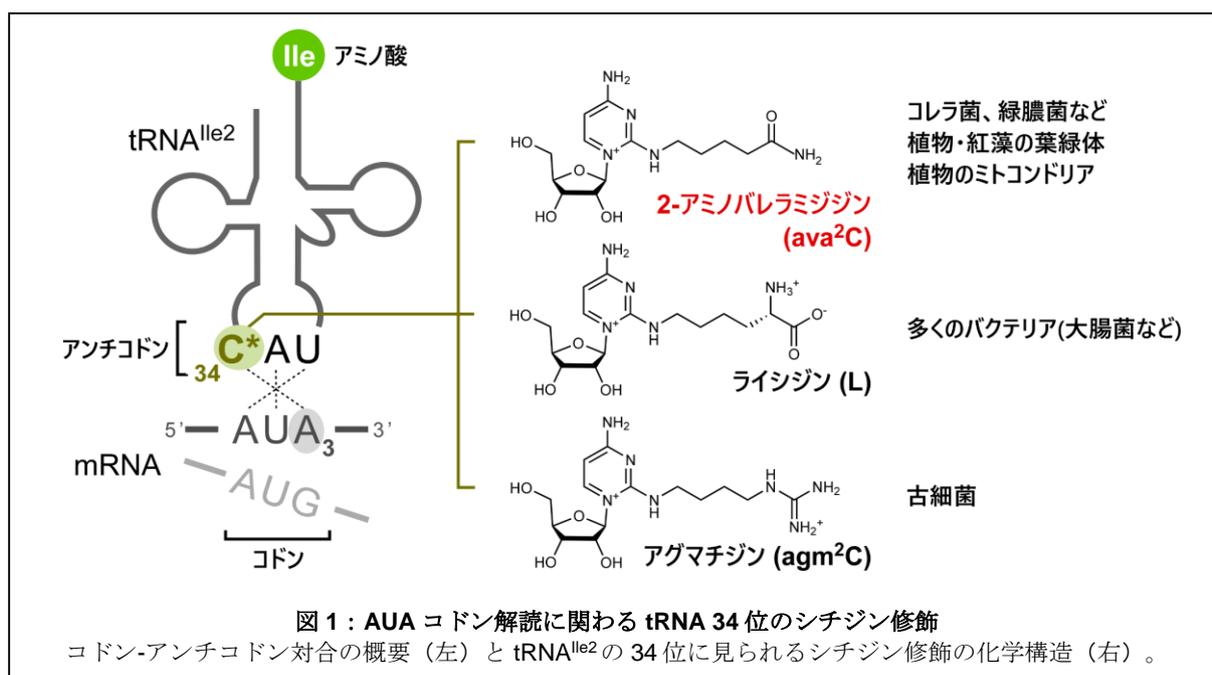
東京大学大学院工学系研究科の宮内健常特任研究員、秋山奈穂大学院生、鈴木勉教授らの研究グループと、Brigham and Women's Hospital の木村聡講師（研究当時、現：コーネル大学准教授）、Matthew K. Waldor 教授の研究グループは、東京大学大学院工学系研究科の岡本晃充教授、理化学研究所生命機能科学研究センターの白水美香子チームリーダー、千葉大学大学院園芸学研究院の相馬亜希子講師らと共同で、tRNA（注 1）のアンチコドン（注 2）から新規シチジン修飾である 2-アミノバレラミジジン (ava²C) を発見し、クライオ電子顕微鏡（注 3）を用いた構造解析により、リボソーム（注 4）上でこの修飾が AUA コドン（注 5）を解読するしくみを明らかにしました。

tRNA はタンパク質合成においてコドン（注 6）を解読する重要な役割を担う短い RNA 分子であり、多様な化学修飾が数多く施されることが知られています。特に、アンチコドン領域にはさまざまな修飾が見られ、tRNA がアミノ酸を受容するアミノアシル化（注 7）や、リボソーム上にお

いて、mRNAのコドンを読み取る際に重要な役割を担うことで、正確で効率の良いタンパク質合成を可能にしています。

大腸菌を代表とする多くの細菌において、AUA コドンをイソロイシン (Ile) に解読する tRNA (tRNA^{Ile2}) のアンチコドン 1 字目 (34 位) にシチジン (C) の修飾体であるライシジン (L) が見つかっています (図 1)。L は、tRNA^{Ile2} が Ile を受容し、AUA コドンを認識するための必須の修飾であることがわかっています。L の修飾酵素はほぼすべての細菌に存在することから、L は細菌に共通の tRNA 修飾であると考えられてきました。一方で、アーキア(古細菌)では tRNA^{Ile2} にアグマチジン (agm²C) (図 1) と呼ばれる別のシチジン修飾が存在し、L と同様の働きをしています。また、植物のオルガネラ (注8) であるミトコンドリアと葉緑体の tRNA^{Ile2} も何らかのシチジン修飾を利用して AUA コドンを Ile に解読すると推定されてきましたが、その化学構造は不明でした。

本研究では、ホウレンソウの葉緑体およびミトコンドリアから単離した tRNA^{Ile2} に含まれる塩基修飾を RNA 質量分析法 (注 9) により調べ、アンチコドンの 34 位に新たな修飾体を発見しました。この修飾はシチジンに 5-アミノバレラミド (注 10) という化合物が結合した化学構造をもつことがわかり、2-アミノバレラミジジン (ava²C) と命名しました (図 1)。ava²C は、長い側鎖をもつ点で L に類似していますが、側鎖の末端は異なる化学構造をもっています。



他の生物についても tRNA^{Ile2} の修飾を調べたところ、シロイヌナズナやタバコなどの高等植物、原始的な藻類である紅藻のほか、意外なことに緑膿菌やコレラ菌など一部の細菌にも ava²C が見つかりました。L 同様、ava²C は tRNA^{Ile2} が Ile を受容するために必要であり、さらに AUA コドンの解読に欠かせない修飾であることがわかりました。

さらに、ava²C が AUA コドンの読み取りにどのように関わるかを調べるために、クライオ電子顕微鏡によりコドン-アンチコドン相互作用の構造を可視化しました。その結果、AUA コドン 3 字目のアデニンと ava²C が 1 本の水素結合を介した特殊な配向で対合すること、ava²C の側鎖がこの対合の安定化に寄与することが示されました。生物種により異なる tRNA 修飾を用いてコドン解読が微調整されていることが示唆されました。

さまざまな tRNA 修飾によってタンパク質合成の精度や効率が制御されることが知られている一方、生物種ごとにどの修飾を用いてどのようにタンパク質合成の精度や効率を制御しているかについては未解明な部分が多いのが現状です。本研究は未知の RNA 修飾レパートリーによるタンパク質合成制御機構の一端を明らかにした成果と言えます。また、コレラ菌や緑膿菌などの病原性細菌が ava^2C をもつことから、新しい抗生物質の開発など創薬のターゲットとしても期待できます。

本研究成果は、2024 年 9 月 19 日（英国夏時間）に「Nature Chemical Biology」に公開されました。

発表内容

〈研究の背景〉

すべての生物はゲノム DNA に塩基配列としてタンパク質のアミノ酸配列が記録されており、mRNA への転写、タンパク質への翻訳という過程を経てタンパク質が合成されます。その際、mRNA 上のコドンを読み取り、対応するアミノ酸を合成途中のタンパク質へ運ぶアダプター分子が tRNA です。tRNA は転写後に多くの化学修飾が施され、tRNA 分子の安定性や機能が適切に調節されます。特に、mRNA のコドンと対合するアンチコドン領域にはさまざまな修飾が見られ、mRNA 上のコドン解読能やアミノ酸の受容能を制御することで、正確で効率のよいタンパク質合成を可能にしています。近年の研究から、生物は種によって異なる修飾塩基を tRNA に付与することにより mRNA 上のコドンを解読していることが明らかとなってきています。それぞれの生物種がどのような修飾塩基を用いてコドンを解読しているかを明らかにすることは生命の根幹を担う遺伝暗号解読の進化を考える上で非常に重要です。

大腸菌や枯草菌を含む多くの細菌において AUA コドンを Ile に解読する tRNA ($\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$) のアンチコドン 1 字目 (34 位) には、シチジンの 2 位にリジンが結合した修飾体、ライシジン (L) (図 1) が存在します。L 修飾は、 $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ のアミノ酸受容能をメチオニン (Met) から Ile に変化させるとともに、コドン認識能を AUG から AUA に変えることで、AUA コドンの解読に必須な修飾であることがわかっています。当研究グループにより発見された L 修飾酵素である Tl1S (注 11) は、大腸菌や枯草菌において必須遺伝子にコードされており、L 修飾は細菌の生存に欠かせない tRNA 修飾であることがわかっています。

他のさまざまな細菌についても $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ が L 修飾を受けていると考えられてきましたが、枯草菌やマイコプラズマなどいくつかの細菌を除き、多くの生物種では、tRNA の修飾状態はほとんど調べられていませんでした。また、植物のオルガネラ、すなわち葉緑体とミトコンドリアにおいても、未知の tRNA 修飾が AUA コドンを Ile に解読すると考えられてきましたが、その化学構造は同定されていませんでした。アーキア (古細菌) では、 $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ にアグマチジン (agm^2C) (図 1) と呼ばれる別のシチジン修飾が当研究グループにより発見され、L と同様の働きをしていることが明らかとなっています。

そこで本研究では植物の葉緑体、およびミトコンドリアにおける $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ の修飾塩基の構造および機能を明らかにすることを目指しました。

〈研究の内容〉

宮内健常特任研究員らは、ハウレンソウから葉緑体 $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ を単離精製し、RNA 質量分析法により修飾を調べたところ、分子量 341 の未知の修飾体 N341 を発見しました。同じ N341 修飾が、ハウレンソウ、シロイヌナズナの葉緑体とミトコンドリアそれぞれの $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ 、原始的な藻類であ

る紅藻シアニディオシジンの葉緑体 tRNA^{Ile2} にもあることが判明しました。紅藻の培養は相馬亜希子講師らと共同で行われました。

木村聡講師（当時）らは独立にコレラ菌 tRNA の解析において分子量 341 の修飾体を見つけ、両研究グループは共同で、この修飾は植物で見つかった N341 と同一であることを確認しました。安定同位体のリジンを用いた代謝ラベル実験や、単離した N341 ヌクレオシドを用いた重水素置換実験などから N341 の化学構造をシチジンの 2 位に 5-アミノバレラミドが結合した構造と推定しました。この推定候補化合物の化学合成を岡本晃充教授らのグループが行い、植物で見つかった N341 と比較したところ、天然の N341 と推定化合物が同一であることが判明し、N341 を 2-アミノバレラミジジン (ava²C) と命名しました (図 1)。ava²C は、長い側鎖をもつ点で L に似ていますが、側鎖の末端構造が異なります。

進化的に離れた生物種である植物と細菌において同一の tRNA 修飾が見出されたことは興味深く、ava²C 修飾がこれら生物種において共通の役割を担っていることを示唆しています。

次に、AUA コドンを Ile に解読する際の ava²C 修飾の役割を明らかにしました。まず、未修飾シチジン、L、ava²C をそれぞれ導入した tRNA^{Ile2} を用意し、tRNA がイソロイシル tRNA 合成酵素 (注 12) によって Ile を受容する効率を測ったところ、ava²C を導入した tRNA は、L を導入した tRNA と同程度の高い効率で Ile を受容することが判明しました (図 2A)。次に、これら修飾状態の異なる tRNA^{Ile2} がリボソーム上で AUA コドンを認識する効率を試験管内で測定したところ、ava²C を導入することで tRNA^{Ile2} は AUG コドンに結合しづらくなり、AUA コドンに特異的かつ効率よく結合するようになりました (図 2B)。さらに、細胞内 tRNA^{Ile2} の ava²C 修飾を培地中のアラビノース濃度で制御できるように設計したコレラ菌を用い、連続した AUA コドンを含むレポーター遺伝子を翻訳させました。その結果、アラビノース濃度を下げ、ava²C 修飾率を低下させた際に、AUA コドンを含むレポーター遺伝子の発現量が顕著に低下しました (図 2C)。

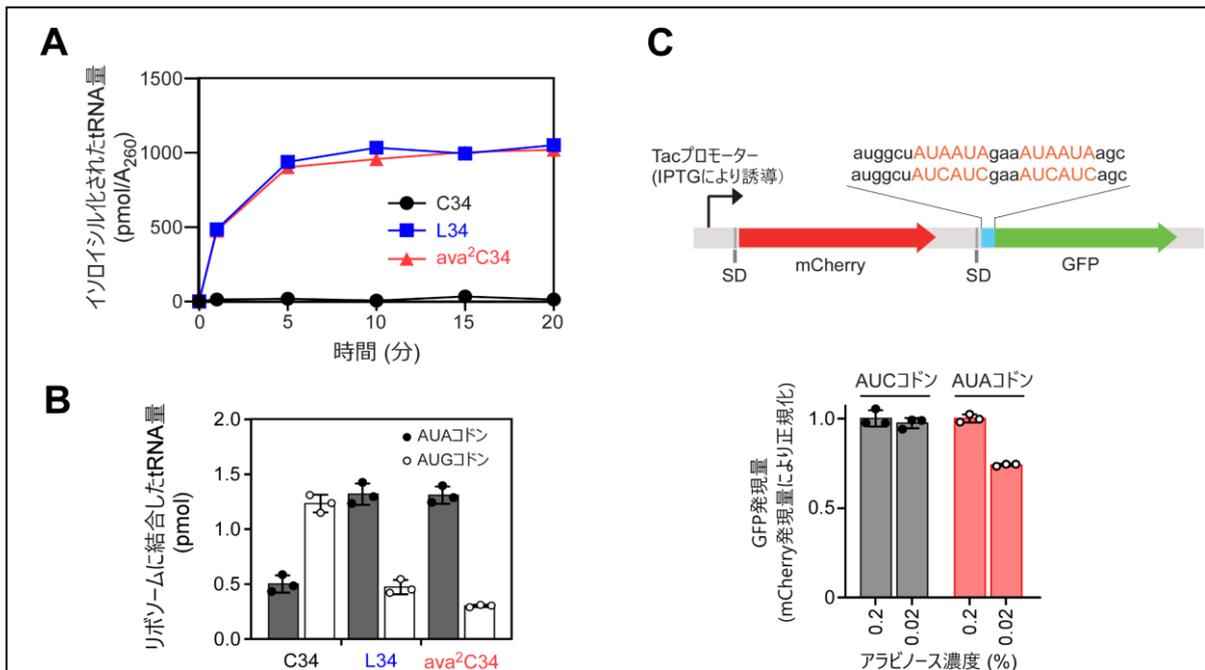
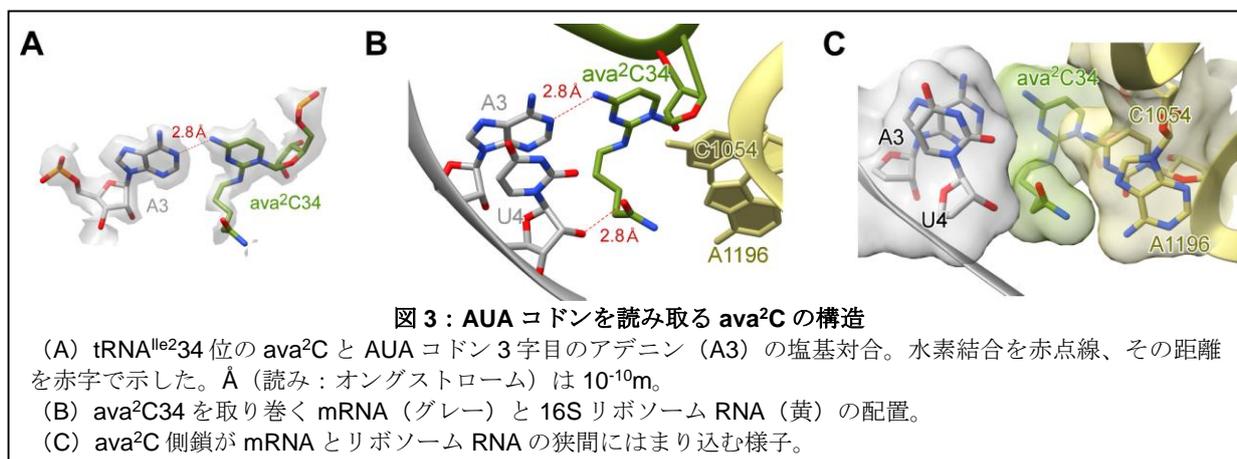


図 2 : ava²C は AUA コドンの正確かつ安定な読み取りを支えている

- (A) 異なる 34 位修飾をもつ tRNA の試験管内におけるイソロイシル化効率。
- (B) 異なる 34 位修飾をもつ tRNA のリボソーム上における AUA/AUG コドンへの結合量 (n=3)。
- (C) レポーター遺伝子のデザイン (上) とコレラ菌での AUA/AUC コドンの翻訳効率 (下)。AUA コドンまたは AUC コドンを遺伝子配列の上流に含む GFP の発現量を、mCherry の発現量で正規化した (n=3)。

これらの試験管内および細胞内の実験により、 ava^2C 修飾は $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ のアミノアシル化および AUA コドンの解読に必須であることが明らかになりました。

さらにクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析により、 ava^2C を含む $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ のアンチコドンが mRNA 上の AUA コドンとどのように対合するかを原子レベルで解明しました (図 3)。



その結果、 $\text{tRNA}^{\text{Ile2}}$ 34 位の ava^2C は AUA コドン 3 字目のアデニン塩基とたった 1 本の水素結合を介して対合していることがわかりました (図 3A)。一般的に、RNA の塩基対合は 2 本または 3 本の水素結合を形成しますが、 $\text{ava}^2\text{C34-A3}$ 塩基対はそれらと異なる特徴的な対合様式です。さらに $\text{ava}^2\text{C34}$ の周辺の構造を詳しく見てみると、 ava^2C 側鎖は mRNA の下流 (3' 方向) に伸び、AUA コドンの 3 字目に隣接した 4 番目の mRNA 残基と追加の水素結合を作ることが示されました (図 3B)。また、 ava^2C の側鎖が mRNA とリボソーム RNA の作る溝にぴったりと収まることで、疎水性相互作用 (注 13) やファン・デル・ワールス相互作用 (注 14) が生じることが示唆されました (図 3C)。こうして ava^2C 側鎖が AUA コドン以外の残基とのさまざまな相互作用を仲立ちすることで、1 本の水素結合しか持たない不安定な $\text{ava}^2\text{C34-A3}$ 塩基対を安定化し、AUA コドンを効率よく読めるようにしていると考えられます。

今回、 ava^2C 側鎖の全長にわたって密度を観察することができました (図 3A)。AUA コドンを認識する L の構造を明らかにした当グループの先行研究 [Akiyama et al., *Nature Struct Mol Biol.*, 31, 817-825 (2024)] では L 側鎖の全長を観察できなかったことから、L よりも ava^2C の側鎖の方が、周囲との相互作用でより強く固定されていると言えます。また、 ava^2C 側鎖末端は電荷を持たないアミド基であり、L 側鎖より化学的に不活性かつ疎水的です。したがって、 ava^2C は、L よりも安定かつ AUA コドンの解読をより強くサポートする修飾塩基として、一部の生物が進化の過程で獲得したものと考えられます。

〈今後の展望〉

本研究は、それぞれの生物がさまざまな化学修飾を駆使することで正しい遺伝暗号解読を実現していることを示しています。多くの生物種における tRNA の化学修飾を用いた遺伝暗号の解読機構には未知なことが多く、さらなる研究が必要です。 ava^2C 修飾はコレラ菌や緑膿菌などの病原性細菌からも見つかったことから、tRNA 修飾を阻害することでコレラ菌や緑膿菌の増殖を抑えるような新たな抗生物質の開発にも応用が期待できます。また、tRNA は新たな創薬モダリティとしても脚光を浴びており、本研究成果は将来的に、tRNA の機能を調節するためのツールとして、創薬研究にも利用できる可能性を秘めています。

発表者・研究者等情報

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻

宮内 健常 特任研究員

秋山 奈穂 博士課程/日本学術振興会特別研究員

鈴木 勉 教授

Brigham and Women's Hospital

木村 聡 研究当時：講師、現：コーネル大学准教授

Matthew K. Waldor 教授

論文情報

雑誌名：Nature Chemical Biology

題名：A tRNA modification with aminovaleramide facilitates AUA decoding in protein synthesis

著者名：Kenjyo Miyauchi+, Satoshi Kimura+, Naho Akiyama+, Kazuki Inoue, Kensuke Ishiguro, Thien-Son Vu, Veerasak Srisuknimit, Kenta Koyama, Akiko Soma, Asuteka Nagao, Mikako Shirouzu, Akimitsu Okamoto, Matthew K. Waldor*, Tsutomu Suzuki*
+ Equal contributions, * Corresponding authors

DOI：10.1038/s41589-024-01726-x

研究助成

本研究は、日本学術振興会 JSPS の基盤研究 (S) 「RNA エピジェネティクスと高次生命現象」 (代表：鈴木勉、26220205)、基盤研究 (S) 「RNA 修飾の変動と生命現象」 (代表：鈴木勉、18H05272)、特別研究員奨励費「原核生物における AUA コドン解読の分子基盤」 (代表：秋山奈穂、23KJ0409)、および科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 ERATO「鈴木 RNA 修飾生命機能プロジェクト」 (研究総括：鈴木勉、JPMJER2002) などの支援を受けて実施されました。

用語解説

(注 1) tRNA

Transfer RNA (転移 RNA)。タンパク質合成において、コドン (特定の 3 つの塩基配列) とアミノ酸を 1 対 1 で対応させるアダプター分子として働く。70~90 塩基長の短い一本鎖 RNA で、特徴的なクローバー葉様の二次構造をとり、それが折りたたまれて L 字型の立体構造をとる。tRNA は 3' 末端に自身に対応した特定のアミノ酸を受容し、20 種類のアミノ酸それぞれに、対応する tRNA が複数種類存在する。tRNA はコドンに対応した 3 塩基からなるアンチコドンを持ち、リボソーム上で mRNA (伝令 RNA) 上のコドンと結合し、そのコドンに対応するアミノ酸を伸長中のタンパク質へと導入する。

(注 2) アンチコドン

tRNA の 34~36 位の 3 つの塩基から構成され、リボソーム上で対応するコドンと対合することで遺伝暗号を解読し、対応するアミノ酸を導入する。

(注 3) クライオ電子顕微鏡

生体分子の試料に低温下（約-200℃）で電子線を照射し、その構造を観察できる電子顕微鏡。試料を水溶液中で瞬間凍結することで、生体内に近い環境で目的分子の構造解析を行うことができる。

(注 4) リボソーム

タンパク質合成の場である、3 ないし 4 種の RNA と多数のタンパク質から構成される巨大な複合体。大小 2 つのサブユニットからなり、大サブユニットはペプチジル転移反応を、小サブユニットは mRNA と tRNA 間のコドン-アンチコドン対合を監視するといった重要な役割をもつ。

(注 5) AUA コドン

コドンの一種。この記事で登場する細菌、アーキア、植物オルガネラの AUA コドンは Ile を指定する。一方、隣のコドンである AUG は Met（メチオニン）を指定する。

(注 6) コドン

遺伝暗号の基本単位。RNA の 4 種類ある塩基（アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン）が 3 つずつの組となり、64 通りのコドンが定義される。標準的な遺伝暗号では、このうち 61 個が 20 種類のアミノ酸に対応し、3 個のコドンがタンパク質合成の終結を指定する。

(注 7) アミノアシル化

tRNA の末端にアミノ酸を結合させる生体反応。アミノ酸の種類ごとに専属のアミノアシル tRNA 合成酵素が存在し、特定の tRNA に対して正しい種類のアミノ酸を結合させることで、コドンとアミノ酸の対応づけが厳密に制御されている。

(注 8) オルガネラ

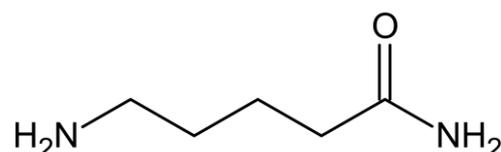
細胞内小器官。核、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体、ゴルジ体など、細胞内の構造物のこと。

(注 9) RNA 質量分析法

質量分析により RNA 分子を解析する手法。さまざまな核酸消化酵素を用いて RNA をヌクレオシドモノマー、あるいは短い断片に分解し、液体クロマトグラフィーで分離しつつ質量分析を行う。得られた質量電荷比 (m/z) から精密な分子量がわかり、修飾構造の決定や修飾率の推定を行うことができる。

(注 10) 5-アミノバレラミド

分子式 $C_5H_{12}N_2O$ で示される物質で、5-アミノペンタンアミド、5-アミノ吉草酸アミドとも呼ばれる。さまざまな生物から微量な代謝物として検出された例が知られるが、生成、代謝経路については一部の細菌でしか判明していない。



(注 11) Tils

tRNA(Ile)ライシン合成酵素のこと。2003年に当研究グループが以下の論文で発見したイソロイシン tRNA に L 修飾を導入する酵素。ほぼすべての細菌が持ち、大腸菌や枯草菌では必須遺伝子にコードされている。Soma et al., *Mol Cell*. 2003 Sep;12(3):689-98. doi:10.1016/s1097-2765(03)00346-0.

(注 12) イソロイシル tRNA 合成酵素

tRNA^{Ile} を特異的に認識し、その 3' 末端に Ile をアシル結合させる反応を触媒する。

(注 13) 疎水性相互作用

水溶液中に存在する疎水性分子が水を避けて互いに引き合うことで、溶媒との接触面を少なくし安定化する作用。

(注 14) ファン・デル・ワールス相互作用

分子同士の相互作用のうち、双極子同士の間を生じる引力性の力。

問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻
教授 鈴木 勉 (すずき つとむ)

(報道に関する問合せ)

東京大学大学院工学系研究科 広報室

科学技術振興機構 広報課

(JST 事業に関する問合せ)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 ICT/ライフイノベーショングループ
今林 文枝 (いまばやし ふみえ)