海外だより

バクテリア tRNA 修飾研究の海外動向 tRNA 転写後修飾によるタンパク質翻訳制御機構

高瀬隆一

京都大学

筆者は日本で博士を取得後、米国東部ペンシルベニア州フィラデルフィアの Thomas Jefferson University にて3年半の間、博士研究員としてタンパク質翻訳制御機構についての研究を行いました。私なりの視点で、米国での研究動向や研究生活をご紹介します。ご参考になりましたら幸いです。

タンパク質の構造機能相関研究から海外で
核酸化学研究へ switch !

筆者は常温常圧、水溶液中でさまざまな化学反応を制御することで生命を維持する酵素に興味を抱き、その機能を制御することを目的とした微生物由来タンパク質の構造機能相関解明をテーマとして博士の学位を取得しました。X線結晶構造解析により還元酵素の立体構造を決定し、酵素の触媒部位の電荷と空間容積を形成する2本のループを交換することで、還元酵素の補酵素 (NADP (H) あるいは NAD(H)) 要求性を高い酵素活性を保ったまま変換することに成功しました⁽¹⁾。論文発表から約1週間後に、米国 Thomas Jefferson University にて tRNA 転写後修飾をはじめとする核酸化学の研究を推進している Ya-Ming Hou 教授より博士研究員のポストクのポジションを打診されました。Ya-Ming Hou 教授は tRNA の修飾酵素に関する研究で著名ですが、それまで筆者は核酸化学のことは疎く、存じ上げておりませんでした。筆者は元々、学位取得後はタンパク質の構造機能相関をさらに追求したいと考えておりましたが、このポストク打診のお話をいただいた際、直感でこのお話を受けてみようと感じ、履歴書の提出とインターネット通話ソフトスカイプによる面接を済ませ、無事博士研究員と

して受け入れていただくことになりました。渡米前に読んでおくように渡された参考論文を読み進めていくうちに、tRNA の転写後修飾とヒトの疾患の関係に関する研究など、筆者にとって全く新しい分野であると感じましたが、酵素の反応速度論的解析などは自身が行っていた研究と共通しており、少しは役立つことができそうだと思います。しかし、核酸化学に関する知識の乏しさゆえ、その後苦労することとなります。

ユーミン戦法とノーゴール助っ人外国人

行き先が決まってからも博士論文の作成やパスポート・ビザの取得などで忙しく、緊張をする間もない状態で渡米し、あれよあれよという間にポストク生活が始まりました。筆者が日本を出たのはこれが初めてでした。出発の際、ラボの後輩が見送りに来てくれたことが非常にうれしかったことを思い出します。肝心の英語ですが、予想どおり初日から自分の英語が通じないうえに相手に何を言われているかもよくわからないということを痛感しました。しかし何としてでも意思疎通を図ろうとして、筆者が生み出した苦し紛れの策が「ユーミン戦法」です。これは相手に質問をされた際、何を言われたかわからないものの、かすかに聞き取った単語、相手の表情や身振り手振り、その場の状況などから言いたいことを一瞬で予測し、それを You mean ~? と自分の言葉で確認するという手法です。相手の質問とは違った場合は No と言われるため、正解するまで繰り返し確認し続けるはめになります。時間はかかりますが、これで何とかコミュニケーションがとれるということがわかり、

図1 ■ 大学よりフィラデルフィア・センターシティを望む

この戦法に1年近くお世話になりました。

さて、肝心の研究ですが一生懸命やったつもりでも1年目は議論についていけず、またほとんどポジティブな結果を出すこともできませんでした。それにもかかわらずラボから給料をもらっているという立場上、次第にラボに居辛くなってしまいました。例えるならばサッカーで海外から移籍してきたフォワードの助っ人外国人選手が1シーズンノーゴールというようなものです。初めての海外生活で心細かったこともあったと思いますが、もう辞めて帰国してしまおうかと毎日考える日々を過ごしていました。そんな折、ずさんな体調管理などが原因で体調を崩して入院してしまいました。幸い、2週間ほどゆっくりすることができたのですが、少し元気が回復したお陰か、筆頭著者として論文を一報書いて帰る覚悟を決め、粘ることにしました。退院後も相変わらずデータが出ずに辛い日々は続きましたが、どうにかして過ごしていると徐々にデータも出るようになってきて、それに伴い次第に周りからも認められるようになり、居心地もよくなっていました。また、英語で意思疎通が図れるようになってくると、日本で学生時代に学んだこともしっかり生かせるようになり、自分がラボに貢献していると実感できるようになっていきました。

研究の厳しさ～scrap and build

アメリカは競争が激しいということは事前に覚悟していましたが、果たして予想どおりでした。ポストドクはもちろん、研究室の主催者も強いプレッシャーの下で必死に研究を行っています。3年間予算を取れない状況が続

図2 ■ Ya-Ming Hou ラボのメンバー

右列奥が筆者、左列前から3番目がHou教授。

くと、研究室が強制的に閉鎖されると耳にしました。実際、同じ研究棟に入っているほかの研究室が閉鎖された際は、残された実験器具などをもらいに行きました。あまり人目につかないよう（？）夕方以降にもらいに行きましたが、後片付けもされずにガラーンとした、機能を停止したラボの光景は予想を超えるインパクトがありました。その後、他大学から新たな研究チームがやって来てラボを構えました。こうして競争力を失ったラボを強制的に閉鎖し、新たな研究チームを迎え入れるシステム（scrap and build）により、高い研究レベルが保たれています。また、自分自身のみならず、ラボ全体でも良い結果が出ずに、思うように予算が取れない苦しい時期も経験しましたが、Hou教授の決して諦めない気迫も身近で感じることができました。Hou教授は常にレベルの高いサイエンスを行うために妥協を許さず、時にたいへん厳しい要求をされますが、その姿勢はたいへん勉強になりました。そうして我慢の時期を乗り越え、予算状況も軌道に乗ってくるという経験を通じて、徐々にですが自分もタフになっていくことができたように思います。

アメリカでの研究～バクテリア tRNA の転写後修飾によるタンパク質翻訳制御

私が実際に携わった研究の周辺についてご紹介します。タンパク質の翻訳は、生命における基本的で重要な反応であり、遺伝子情報の正確なタンパク質への翻訳、あるいは外部の環境変化に応じた個々の遺伝子の発現量制御は、生命の維持に不可欠です。本分野は古くから研究が行われている分野でありながら、近年でも新たな知見が次々と見つかる分野でもあります。tRNAはDNAから転写された後、リボソーム内においてコドン情報を読み取って対応するアミノ酸を合成中のタンパク質へ付与しますが、転写後にリボソーム内で働く前にいくつもの転写後修飾を受け成熟することで、タンパク質

図3 ■ バクテリア tRNA^{Pro/UGG} の転写後修飾と翻訳制御

中央, *E. coli* tRNA^{Pro/UGG}; 左下枠内, cmo⁵U34, 赤字は5位のカルボキシメトキシ基. 右端のOHがさらにメチル化されると, mcm⁵U34となる; 右下枠内, m¹G37, 赤字は1位のメチル基; 左, U34修飾の有無による差異; 右, G37修飾の有無による差異.

翻訳において完全に機能するようになります. tRNAの修飾はこれまでに100種類以上が知られています. 近年はmRNAの転写後修飾もタンパク質の翻訳を制御することなどが明らかになってきていますが, その修飾基のほとんどは既にtRNAで見いだされています. Ya-Ming Hou ラボはバクテリア tRNAの転写後修飾を担う修飾酵素に関する研究で著名な業績を上げています. 多種多様なtRNAの修飾のなかでも, バクテリア tRNAにおいて特に重要で興味深い修飾は, mRNA上のコドンの3番目の塩基との間で複数の塩基対を形成可能な, 揺らぎ塩基対を形成する34番目の塩基U (ウラシル) 34に対して行われる複雑な修飾 (cmo⁵U34) と, アンチコドン形成する塩基 (34, 35, 36番目) の一つ隣の塩基G (グアニン) 37に対する修飾 (m¹G37) です. cmo⁵U34とは, tRNAのU34の5位にカルボキシメトキシ基が修飾されている (図3中央左下枠内) ことを示し, m¹G37とはG37の1位がメチル化を受けている (図3中央右下枠内) ことを示します. ここでは, 上記の両修飾をもち, アンチコドンとしてUGGをもつプロリンtRNA (tRNA^{Pro/UGG}) についてご紹介します (図3). 翻訳において, リボソーム内でmRNAのコドン1, 2, 3番目の塩基はそれぞれtRNAのアンチコドン36, 35, 34番目の塩基と塩基対を形成します. 通常, tRNA^{Pro/UGG}のU34はA (アデニン) と塩基対を形成することで, プロリンコドンCCAを解読しますが, 興味深いことにU34が修飾を受けcmo⁵U34となることで, G, U, またはC (シトシン) ととも塩基対を形成することが可能となり, すべてのプロリンコドンCCA, CCG, CCU, CCCの解読が可能となります (図3左). これはcmo⁵U34修飾によりU34の塩基を含むアンチコドンの構造が僅かに変化し, 未修飾時は形成されることのない水素結合がtRNAのcmo⁵U34とmRNAの3番目のコドン塩基との間に形成されることが原因であることが, リボソームとtRNA-mRNA複

合体の結晶構造解析により示唆されています⁽²⁾. したがって, cmo⁵U34修飾によりコドンの解読能が拡張され, プロリンコドンCCA, CCU, CCCを多く含む遺伝子の翻訳がスムーズに進むようになります. 実際, マイコバクテリウム属細菌において, 低酸素ストレス存在下でtRNA^{Thr/UGU}のcmo⁵U34修飾が促進され, その結果としてコドン解読能が変化し, ストレス応答タンパク質の発現量が上昇することで, ストレスに対応していることが報告されています⁽³⁾. cmo⁵U34は核酸修飾の中では複雑な修飾ではありますが, 目的遺伝子の発現量を上昇させるためにmRNAへの転写量を増大させることに比べると構築が容易であるため, エネルギー消費量や迅速性の観点からも効率よく遺伝子の発現量を制御することができる優れたメカニズムであることがうかがえます. 近年, cmo⁵U34の先端がさらにメチル化され, mcm⁵U34となることで翻訳の正確性を向上させることが明らかになりましたが⁽⁴⁾, 筆者らはこのメチル化を担う酵素CmoMはG35をもつtRNAを認識し, cmo⁵U34のメチル化を行うことを明らかにしました⁽⁵⁾. その際, 35番目の塩基がCmoM活性へ与える影響を*in vitro*で調べるため, tRNA^{Pro/UGG}のG35A変異体を細胞内で発現させ, 精製・取得する必要がありましたが, 本遺伝子は必須遺伝子であるため, 単純にG35A変異を導入すると細菌が生育しないことが課題でした. そこで, ゲノム中に含まれる非必須遺伝子であるほかのプロリンtRNAであるtRNA^{Pro/GGG}のアンチコドンをGGGからUGGへとすることで細菌の生育を保ったうえで, ゲノム中のtRNA^{Pro/UGG}をG35A変異体としたところ, 細胞の生育を保ったまま, 目的の変異体を取得することができました. この手法は, ほかの必須tRNA変異体の作製にも応用が可能であると考えられます. 筆者らは, さらにこのU34の修飾がリボソーム内において翻訳を制御するメカニズムの詳細を明らかにする研究を行いました, 残念

ながら現時点で論文執筆中であり、こちらに成果を記すことはできません。

また、tRNA^{Pro/UGG}のG37はコドンの一番目と塩基対を形成するtRNAの36番目の塩基の隣に位置しますが、G37の一位がメチル化酵素TrmDによりメチル化されm¹G37となることで、リボソーム内でコドンの読み枠がずれることを防ぎ、正確な翻訳が可能となります⁽⁶⁾ (図3右)。本修飾は細菌の生存に必須であり、tRNA修飾のなかでも特に重要です。興味深いことに、真核生物や古細菌のtRNAも同様のm¹G37修飾をもちますが、本メチル化はTrmDとは配列も立体構造も全く異なるメチル化酵素Trm5が担います。TrmDはその必須性、配列の保存性、または病原菌における分布性などから、総合的に抗菌剤のドラッグターゲットとして細菌のもつ全タンパク質中1番目の候補となっており、多剤耐性菌に対する薬剤開発の観点からも非常に高い注目を集めています⁽⁷⁾。実際に、TrmDによるm¹G37修飾を高いレベルに保つことが薬剤の排出を担う膜タンパク質の発現に重要であり、m¹G37修飾レベルが低下することで、さまざまな薬剤に対する抵抗性が低下することが近年明らかにされました⁽⁸⁾。また、メチル化酵素TrmDとTrm5は別々に進化したものの同様の活性を示すようになったことから、タンパク質翻訳におけるtRNAのm¹G37修飾の重要性と、異なる酵素が同様の活性をもつに至る酵素の進化の興味深さが伺えます。このように、tRNAの修飾はさまざまな機構を通じてタンパク質の翻訳に深くかわり、その結果として生命の維持に重要な役割を果たしています。

コラボレーションXコラボレーション

アメリカで研究生活を送るうえで日本との違いを感じたことの一つに、共同研究の活発さがあげられます。実験結果の解釈に困ったことがあったときや、優れたほかのラボの技術を自分たちのプロジェクトに組み込みたいときなど、気軽にスカイプでディスカッションが始まります。Hou教授はアメリカのみならず、ヨーロッパやアジアにも多くの共同研究者をもち、積極的にコラボレーションを推進しており、筆者も何度もスカイプでのディスカッションに参加しました。どうしても一つのラボでカバーできる技術は限られているため、ほかのラボとのコラボレーションで互いの強みを活かすことで、効率よくプロジェクトのレベルを上げることが可能となります。レベルの高い論文作成や、研究予算取得においても、いろいろな観点や技術を生かしてプロジェクトを推

進することが有利に働くため、多くの研究者が積極的にコラボレーションを進めているようです。異なるバックグラウンドをもつ初対面の研究者とディスカッションを行うのはたいへんでしたが、同時に刺激も強く、学びも多いため、良い経験を積むことができました。

フィラデルフィアでの豊かな生活

アメリカでの暮らしは研究で生き残ることが第一であったため、休日に観光地に出かけて行く気力はありませんでした。その代わり、地元フィラデルフィアを満喫することにし、色々歩き回って街を探索しました。フィラデルフィアに来てから鑑賞するのが好きになったものにオーケストラとバレエがあります。どちらもセンターシティーの中心に劇場がありますが、筆者の住んでいるところから徒歩5分の距離だったこともあり、よく通いました。オーケストラは土曜の晩、当日売れ残り券を開演2時間半前から10ドルで買えるため、非常にお得です。フィラデルフィアオーケストラは全米でも屈指のレベルを誇ります。研究で疲れた脳と身体を、生演奏で奏でられる音楽で包み込んでもらうような感覚は癖になるほど良いものでした。バレエについても、同様に全米屈指のペンシルベニアバレエがフィラデルフィアを本拠地として活動しています。こちらは実際にプロのバレリーナとして活躍する友人の紹介で観に行き始めました。大人も満喫できるファンタジーという形容がぴったりな世界観を堪能でき、またプロのダンサーの美しく力強い動きにも舌を巻きました。野球MLBのPhilliesやバスケットボールNBAの76ersの本拠地スタジアムも電車で15分ほどの距離にありアクセスが容易であり、ハイレベルで多様な文化を味わうことができる環境は非常に贅沢なものでした。また、フィラデルフィア在住の友人も多くできました。筆者のずさんな食生活を心配して、友人家族がたびたびディナーに招待してくれたりもしました。

数多くの苦楽が思い出されますが、フィラデルフィアは筆者が研究者として武者修行し成長することができた、思い出の詰まったふるさととなりました。Hou教授と功さんをはじめとするラボのメンバー、フィラデルフィアで知り合った友人たち、そして挑戦を応援してくれた家族に感謝しています。

文献

- 1) R. Takase, B. Mikami, S. Kawai, K. Murata & W. Hashimoto: *J. Biol. Chem.*, **289**, 33198 (2014).
- 2) A. Weixlbaumer, F. V. Murphy 4th, A. Dziergowska, A.

- Malkiewicz, F. A. P. Vendeix, P. F. Agris & V. Ramakrishnan: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 498 (2007).
- 3) Y. H. Chionh, M. McBee, I. R. Babu, F. Hia, W. Lin, W. Zhao, J. Cao, A. Dziergowska, A. Malkiewicz, T. J. Begley *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 13302 (2016).
 - 4) Y. Sakai, K. Miyauchi, S. Kimura & T. Suzuki: *Nucleic Acids Res.*, **44**, 509 (2015).
 - 5) I. Masuda[†], R. Takase[†], R. Matsubara, M. J. Paulines, H. Gamper, P. A. Limbach & Y. M. Hou: *Nucleic Acids Res.*, **46**, e37 (2018). [†]These authors contributed equally to this work as first authors.
 - 6) H. Gamper, I. Masuda, M. Frenkel-Morgenstern & Y. M. Hou: *Nat. Commun.*, **6**, 7226 (2015).
 - 7) T. A. White & D. B. Kell: *Comp. Funct. Genomics*, **5**, 304 (2004).
 - 8) I. Masuda, R. Matsubara, T. Christian, E. R. Rojas, S. S. Yadavalli, L. Zhang, M. Goulian, L. J. Foster, K. C. Huang & Y. M. Hou: *Cell Syst.*, **8**, 302 (2019).

プロフィール

高瀬 隆一 (Ryuichi TAKASE)

＜略歴＞2009年京都大学農学部食品生物科学科卒業／2015年同大学大学院農学研究科博士課程修了／同年Thomas Jefferson University 博士研究員／2019年京都大学大学院農学研究科助教，現在に至る＜研究テーマと抱負＞細胞膜の湾曲・切除・融合にかかる微生物の細胞膜動態制御機構の解明と膜小胞を利用した有用物質生産＜趣味＞世界のオモシロYouTuberの開拓

Copyright © 2020 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.58.193