

生物の耐熱性を支える「錠前」の発見
～可逆的なリン酸化修飾が RNA を安定化する～

1. 発表者：

大平 高之（東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 助教）
蓑輪 恵一（東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 博士課程3年生）
富田 耕造（東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 教授）
鈴木 勉（東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ タンパク質はリン酸化と脱リン酸化によってその機能や細胞内における局在がダイナミックに制御されている。本研究は、タンパク合成のアダプター分子である tRNA（注1）において可逆的なリン酸化修飾（2'リン酸化ウリジン，U^p 修飾）を発見した。U^p 修飾は tRNA に耐熱性や RNA 分解酵素に対する耐性を与えることで、生物の耐熱性に寄与することを明らかにした。
- ◆ tRNA の X 線結晶構造解析から、U^p 修飾は準安定な tRNA の立体構造を許容することで tRNA の熱変性を防ぐという、RNA 修飾（注2）が担う新しい機能を提唱した。
- ◆ U^p 修飾を導入する酵素（ArkI）および U^p 修飾を脱リン酸化する酵素（KptA）を同定し、U^p 修飾が可逆であることを示した。U^p 修飾の可逆性は環境変化に応じて tRNA の構造と機能を調節することで生物の生存に寄与していると考えられる。
- ◆ 本研究成果は、RNA の構造と機能がリン酸化修飾によって、エピトランスクリプトミクス（注3）的に制御される新たな機構を提唱し、RNA 修飾が担う生命の環境適応進化の理解に貢献する。
- ◆ RNA は医薬開発における新しいモダリティとして注目されている。特に mRNA ワクチンをはじめ siRNA やアプタマーなどに代表される核酸医薬が次々と実用化されている。RNA 修飾は、細胞内における RNA 医薬の安定性や自然免疫の回避などの重要な機能が知られており、本研究で報告した U^p 修飾が将来的に RNA 医薬に応用されることが期待される。

3. 発表概要：

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻の大平高之助教、蓑輪恵一大学院生、鈴木勉教授のグループは、超好熱性アーキア（注4）の tRNA（図1A）の可変ループ（注5）内の47位から新規の RNA 修飾である 2'リン酸化ウリジン（U^p）（図1B）を発見した。生化学的な解析から、この修飾が tRNA に熱安定性に寄与し（図1C）、さらに RNA 分解酵素に対する耐性を付与（図1D）していることを明らかにした。

U^p 修飾による tRNA 構造の安定化機構を解明するため、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻の富田耕造教授らと共同で、X 線結晶構造解析を行い、アーキア tRNA の立体構造を 1.9 Å の高分解能で決定した（図2A）。U^p 修飾は可変ループにフレキシビリティを与えると共に、主鎖の回転を防ぐことで“南京錠”のように tRNA のコア領域（注6）が熱変性するのを防ぐ働きがあることが示された（図2B、C）。実際に、結晶構造の中に、U^p 修飾によって安定化された非標準的なコア構造を持つ tRNA 分子が見出されている

(図 2D)。すなわち、U^p 修飾が準安定なコア領域の構造を安定化することで tRNA の熱変性を防ぐという、これまでに知られていなかった RNA 構造の安定化原理を見出した。

さらに研究グループは、U^p 修飾酵素 (writer) (注 7) として ArkI を同定し (図 3A)、東京工業大学生命理工学院の福居俊昭教授らとの共同研究により、アーキアの遺伝学的な解析を行うことで、U^p 修飾が超好熱性アーキアの高温環境への適応に寄与していることを明らかにした (図 3B、C)。

また、生化学的解析から、ArkI はタンパク質リン酸化酵素ファミリーに属する新規の RNA リン酸化酵素であり (図 4A)、速度論的解析から、リン酸化反応の律速は ATP 濃度であり、細胞内のエネルギー状態を感知して U^p 修飾が導入される可能性が示唆された (図 4B)。さらに、X 線結晶構造解析により、ArkI の立体構造 (1.8 Å) が解かれ (図 4C)、活性中心の構造や RNA の認識に重要なアミノ酸残基が特定された (図 4D)。

さらに、研究グループは U^p 修飾の脱リン酸化酵素 (eraser) (注 8) として、KptA を特定し (図 5A)、速度論的解析から、KptA が tRNA から U^p 修飾を効率よく脱リン酸化する活性を有していることを突き止めた (図 5B)。さらに、KptA が細胞内においても U^p 修飾の eraser として働くことを証明した (図 5C、D)。この結果は、ArkI と KptA の両方を持つ生物種においては tRNA の構造や機能が U^p 修飾によって可逆的に調節されている可能性を強く示唆する (図 6)。

タンパク質や生体内のさまざまなメタボライトの機能や代謝が、リン酸化と脱リン酸化によって、ダイナミックに調節されていることは、生化学や分子生物学の基本的な概念として良く知られているが、RNA のリン酸化修飾は今日に至るまで見過ごされていた。本研究は、RNA の可逆的なリン酸化修飾を世界で初めて見出し、この修飾によって RNA の機能や構造が調節されること、さらには、極限環境生物の環境適応に寄与することを明らかにした。本研究成果は、RNA 修飾によるエピトランスクリプトミクな遺伝子発現の調節機構の理解や、RNA 修飾が担う生命の適応進化の理解に貢献するものである。本研究成果は 4 月 27 日 (英国夏時間) に科学誌「Nature」のオンライン版に掲載される予定である。

4. 発表内容：

タンパク質合成 (翻訳) は全ての生物に必須のプロセスである。tRNA は翻訳の過程で mRNA 上の遺伝暗号 (コドン) とアミノ酸を対応付けるアダプター分子として機能する。tRNA は転写後に多様な化学修飾を受けることで機能的に成熟する。これらの修飾は、tRNA の立体構造の安定化や、コドン解読の正確性に寄与している。従って、tRNA 修飾の欠損や異常は遺伝子発現の破綻を招き、しばしば生育不良や疾患の原因となることが知られている。また、高温環境で生育する好熱性生物において tRNA 修飾は tRNA の耐熱性に関与しており、tRNA 修飾の欠失した好熱性生物が高温感受性 (高温下での生育低下や生育不能) を示す例が知られている。生育温度に応じて修飾率がダイナミックに変動する tRNA 修飾も知られ、tRNA の固さやフレキシビリティを調節することで、生育温度における翻訳の最適化に寄与している。

研究グループは、超好熱性アーキアである *Sulfurisphaera tokodaii* から複数種の tRNA を単離精製し、詳細な質量分析 (RNA-MS) および生化学的な解析から、tRNA の可変ループ内の 47 位に、ウリジン (U) の 2'位がリン酸化された新規 RNA 修飾、2'リン酸化ウリジン (U^p) を発見した (図 1A、B)。U^p 修飾は、可変ループの長さが 5 塩基のすべての tRNA に見られ、82~100%と非常に高い修飾率で導入されていた。

U^p修飾が tRNA 構造に与える効果を調べるため、U^p修飾を持つ tRNA と、U^p修飾を酵素的に脱リン酸化した tRNA の熱融解温度 (T_m 値) を測定したところ、U^p修飾を持つ tRNA は持たない tRNA と比較して、 T_m 値で 6.6°C も融点が高いことが判明した (図 1C)。また RNA 分解酵素に対する感受性を比較したところ、U^p修飾は tRNA を分解酵素から保護する役割があることが判明した (図 1D)。

次に、U^p修飾による tRNA の安定化機構を明らかにするため、単離した *S. tokodaii* tRNA^{Val3} を結晶化し、X 線結晶構造解析により、高分解能 (1.9 Å) の立体構造を得た (図 2A)。1 つの格子中にコア構造の異なる 2 つの tRNA 分子 (Mol. A と Mol. B) が観察され、どちらの構造においても U^pのリボースは C2' -endo コンフォメーション (注 9) をとっていた。また、2'リン酸基は溶媒側に突出しており、反対にウラシル塩基は tRNA のコア領域側を向いていた (図 2B)。通常、tRNA の 47 位は塩基部分が溶媒側を向いていることから、U^pの 2'リン酸基は主鎖の回転を制限することで塩基部分を内側に向けていることが示唆された (図 2B)。Mol. A は tRNA の標準的なコア構造を持ち (図 2D)、 Ψ 13-G22-G46 から成るベーストリプルが形成されているが、Mol. B ではこのベーストリプルから G46 が離脱し U^p47 のウリジン塩基とスタッキングしていた (図 2D)。また、抜けた G46 の代わりに下層から C9 が持ち上がり、 Ψ 13-G22-C9 から成る新たなベーストリプルを形成していた (図 2D)。tRNA が熱変性する際には、コア領域から崩壊することが知られており (図 2D)、G46 の離脱は、熱変性の中間状態とみなすこともできる。U^p47 は主鎖の回転を防ぐことで、G46 を受け止め、準安定なコア構造を安定化し tRNA の熱変性を防いでいると考えられる (図 2D)。また、U^pを脱リン酸化した tRNA の結晶構造は標準的なコア構造を持つ Mol. A のみで、Mol. B は観察されなかった。U^p修飾は tRNA を頑強に固めて安定化するのではなく、tRNA のコア構造の柔軟性をむしろ維持し、準安定な構造をとれるようにすることで、tRNA の熱変性を食い止める、言わば南京錠のような働きがあると言える (図 2C)。このような RNA 修飾の機能は前例がなく、従来の常識を覆す発見である。

次に、U^p修飾を持つ生物種の分布を調べ、その結果を基に比較ゲノム解析による U^p47 の修飾酵素遺伝子の絞り込みを行った。その結果、機能未知のタンパク質リン酸化酵素が候補遺伝子として絞り込まれた。超好熱性アーキアである *Thermococcus kodakarensis* において、この候補遺伝子の破壊株を作成し、LC/MS 解析により修飾の有無を調べたところ、この株において U^p修飾が消失していることが判明した (図 3A)。研究グループはこの遺伝子を *arkI* (Archaeal RNA kinase) と命名した。次に、U^p修飾の生理的意義を調べるため、*T. kodakarensis* の野生株および *arkI* 遺伝子破壊株 ($\Delta arkI$) の生育を 83°C、87°C、91°C 条件下で比較したところ、 $\Delta arkI$ は弱い高温感受性を示した (図 3B)。さらに tRNA コア領域に剛直性を与えるアーケオシン (G⁺) 修飾 (図 1A) に着目し、その生合成遺伝子である *queE* と *arkI* との二重破壊株 ($\Delta arkI/\Delta queE$) を作成し生育を比較した (図 3B)。その結果、 $\Delta arkI/\Delta queE$ は 87°C において $\Delta arkI$ よりも顕著な高温感受性を示し (図 3B)、U^p修飾が G⁺修飾と協調して超高温環境下での生育に必須の役割を担うことが判明した。U^p修飾を“南京錠”に例えるなら、G⁺修飾は tRNA を剛直に固定する言わば“ネジ”のような働きがあり (図 3C)、本研究から、tRNA が作用機構の全く異なる 2 つの tRNA 修飾によって協調的に安定化されていることが明らかとなった。

ArkI の生化学的特性を明らかにするため、大腸菌発現系により *T. kodakarensis* 由来の ArkI (TkArkI) を取得し、U^p修飾の試験管内再構成実験を行った。その結果、TkArkI は ATP をリン酸基供与体として tRNA をリン酸化することが判明した (図 4A)。反応速度論的解析

から、TkArkI は tRNA を効率よく認識して (K_m 値 97 nM) リン酸化を行う一方で、ATP に対する K_m 値は 1.2 mM と非常に高く、ATP に対する親和性が非常に低いことが明らかとなった (図 4B)。この結果は、U^p 修飾の律速は細胞内の ATP 濃度であり、TkArkI は細胞内の ATP 濃度を感知して tRNA をリン酸化することが示唆された。さらに、TkArkI を結晶化し、その X 線結晶構造を 1.8 Å の解像度で取得した。TkArkI は 2 つのローブ (区画された領域) からなり、真核生物のタンパク質リン酸化酵素 (ePK; Eukaryotic Protein Kinase) に類似していた (図 4C)。TkArkI の活性中心には、ATP 結合モチーフやリン酸基転移に関与する ePK に保存されたモチーフが観察された。変異体解析によりこれらのモチーフに保存された残基が実際に活性に寄与することが判明した (図 4E)。また、活性中心の周りは正電荷の表面で覆われており (図 4D)、これらの正電荷は tRNA との結合に必要であることが変異体解析から示唆された (図 4E)。また、活性中心には ATP ではなくグアノシンが結合していた (図 4C)。この結合様式は想定される ATP 結合様式とは異なっていることから、tRNA が結合すると ATP のリン酸基を認識するモチーフが活性中心に配置され、ATP が結合できるようになると類推された。この知見は TkArkI が ATP に対する高い K_m 値を持つことに説明を与えている。

最後に、U^p 修飾の可逆性について解析を行った。ArkI を持つ生物の一部には 2'リン酸転移酵素である KptA を持つものが存在することから、これら生物において U^p 修飾は可逆的である可能性が示唆された。そこで *T. kodakarensis* 由来の KptA (TkKptA) を取得し、生化学的および反応速度論的解析を行った。その結果、TkKptA は U^p 修飾を脱リン酸化する高い活性を持ち (図 5A)、tRNA に対する親和性が TkArkI と同程度であることが判明した (図 5B)。次に、KptA が細胞内で実際に U^p 修飾を脱リン酸化するかどうかを調べるため、大腸菌内で ArkI を発現し tRNA に U^p 修飾を導入した状態で、TkKptA の発現を誘導したところ、U^p 修飾は TkKptA の発現に応じて減少し、KptA が細胞内で実際に eraser として機能する事が示された (図 5C、D)。この結果は、タンパク質の機能が可逆的なリン酸化によって調節されているように、tRNA も可逆的なリン酸化による機能調節を受けているというエピトランスクリプトミックな遺伝子発現調節機構の存在を示唆している (図 6)。超好熱性アーキアのような極限環境生物において、U^p 修飾の可逆性は、tRNA 構造の柔軟性を素早く変化させることで、急激な生育温度の変化などに速やかに適応することを可能にしている、と考えられる。

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) の基盤研究 (S)「RNA エピジェネティッ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)、新学術領域研究 (研究領域提案型)「ncRNA のケミカルタクソノミ」(代表: 鈴木 勉、26113003)、基盤研究 (A)「高次生命現象を制御する鋳型非依存的 RNA 合成酵素の構造と機能」(代表: 富田 耕造、18H03980)、新学術領域研究 (研究領域提案型)「ncRNA 作動エレメントの配列構造の同定」(代表: 富田 耕造、26113002)、若手研究 (B)「tRNA の新規成熟経路の解析と 5'キャップによる成熟制御機構の解析」(代表: 大平 高之、26840005)、若手研究 (A)「Pre-tRNA capping が関与する遺伝子発現制御機構の探究」(代表: 大平 高之、17H04997)、特別研究員奨励費「tRNA 安定化に寄与するリン酸化修飾を触媒する新規酵素 ARKI の分子機構の解明」(代表: 蓑輪 恵一、19J20723)、および科学技術振興機構 (JST) の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) の支援を受けて実施された。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Nature*」

論文タイトル：Reversible RNA phosphorylation stabilizes tRNA for cellular thermotolerance

著者：Takayuki Ohira, Keiichi Minowa, Kei Sugiyama, Seisuke Yamashita, Yuriko Sakaguchi, Kenjyo Miyauchi, Ryo Noguchi, Akira Kaneko, Izumi Orita, Toshiaki Fukui, Kozo Tomita, and Tsutomu Suzuki

DOI 番号：10.1038/s41586-022-04677-2

アブストラクト URL：<https://www.nature.com/articles/s41586-022-04677-2>

6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

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）

E-mail: [ts\[at\]chembio.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:ts[at]chembio.t.u-tokyo.ac.jp)

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻
助教 大平 高之（おおひら たかゆき）

Tel: 03-5841-1260

E-mail: [ohira_t\[at\]chembio.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:ohira_t[at]chembio.t.u-tokyo.ac.jp)

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻
教授 富田 耕造（とみた こうぞう）

Tel: 04-7136-3611

E-mail: [kozo-tomita\[at\]edu.k.u-tokyo.ac.jp](mailto:kozo-tomita[at]edu.k.u-tokyo.ac.jp)

<報道に関すること>

東京大学 大学院工学系研究科 広報室

Tel: 03-5841-0235, E-mail: [kouhou\[at\]pr.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:kouhou[at]pr.t.u-tokyo.ac.jp)

科学技術振興機構 広報課

Tel: 03-5214-8404, E-mail: [jstkoho\[at\]jst.go.jp](mailto:jstkoho[at]jst.go.jp)

<JST 事業に関すること>

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 グリーンイノベーショングループ
加藤 豪（かとう ごう）

Tel: 03-3512-3528, E-mail: [eratowww\[at\]jst.go.jp](mailto:eratowww[at]jst.go.jp)

7. 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 (遺伝暗号) とアミノ酸を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、二次構造としては特徴的なクローバー葉様構造をとり、それが折りたたまり L 字型の立体構造を取る。tRNA は 3'末端に対応するアミノ酸を受容し、20 種類のアミノ酸に対応して異なる tRNA 種が存在する。tRNA にはコドンと対合するアンチコドンを持ち、リボソーム上で mRNA (伝令 RNA) 上のコドンと結合することで、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) RNA 修飾

RNA は転写後に多様な化学修飾が酵素的に導入される。現在までに、およそ 150 種類の RNA 修飾がさまざまな生物種から見つかっている。約 80% の RNA 修飾は tRNA から見つかったものである。アンチコドンとその近傍にある tRNA 修飾はコドンの解読精度やタンパク合成の効率に関わる。一方、コア領域に見られる tRNA 修飾は tRNA 全体の構造の安定化や耐熱性などに寄与する。

(注 3) エピトランスクリプトミクス

RNA の構造や機能が RNA の転写後修飾によってダイナミックに制御されることで、遺伝子発現の調節を介して、さまざまな生命現象に関与するという概念。

(注 4) 超好熱性アーキア

地球上の全ての生物は原核生物、真核生物、アーキアの三界に分類することができる。アーキアは極限環境で生育するものが多く、特に 80°C 以上の温度で生育するアーキアを超好熱性アーキアと呼ぶ。超好熱性アーキアは進化系統樹の根本に位置することから、原始生命体に近いと考えられている。

(注 5) 可変ループ

tRNA のクローバー葉様構造には、部位ごとに名称があり (図 1A)、可変ループはアンチコドンアームと T アームの間に位置する。

(注 6) コア領域

tRNA の中心部分の構造を指す。D アーム、T アーム、可変ループから形成される。

(注 7) writer

RNA 修飾酵素の総称。RNA 修飾を書き込むというニュアンスからこのように呼ばれる。

(注 8) eraser

RNA 脱修飾酵素の総称。writer によって書き込まれた修飾を消すというニュアンスからこのように呼ばれる。

(注 9) C2'-endo コンフォメーション

糖の立体配座の 1 つ。

8. 添付資料：

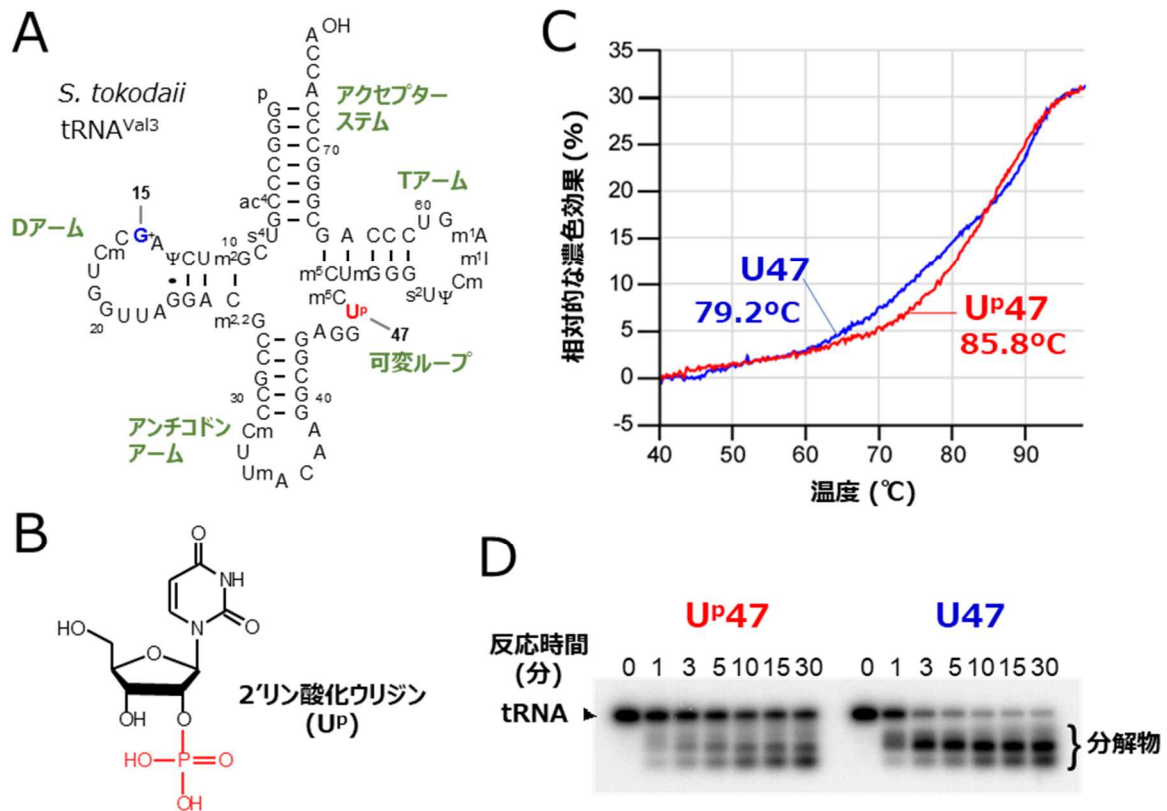


図 1. U^p 修飾は tRNA に熱安定性および RNA 分解酵素に対する耐性を付与する
 (A) *S. tokodaii* tRNA^{Val3} の二次構造。47 位の U^p 修飾を赤字、15 位のアーケオシン (G⁺) 修飾を青字で示した。
 (B) 2'リン酸化ウリジン (U^p) 修飾の化学構造。
 (C) *S. tokodaii* tRNA^{Val3} の熱融解曲線。U^p 修飾を持つ tRNA (U^p47) と持たない tRNA (U47) をそれぞれ赤線と青線で示す。U^p 修飾を外した tRNA は T_m 値が 6.6°C 低下した。
 (D) *S. tokodaii* tRNA^{Val3} の RNA 分解酵素に対する感受性。U^p 修飾を持たない tRNA (U47) は時間と共に速やかに分解するのにに対し、U^p 修飾を持つ tRNA (U^p47) は RNA 分解酵素に対して明確な耐性を示した。

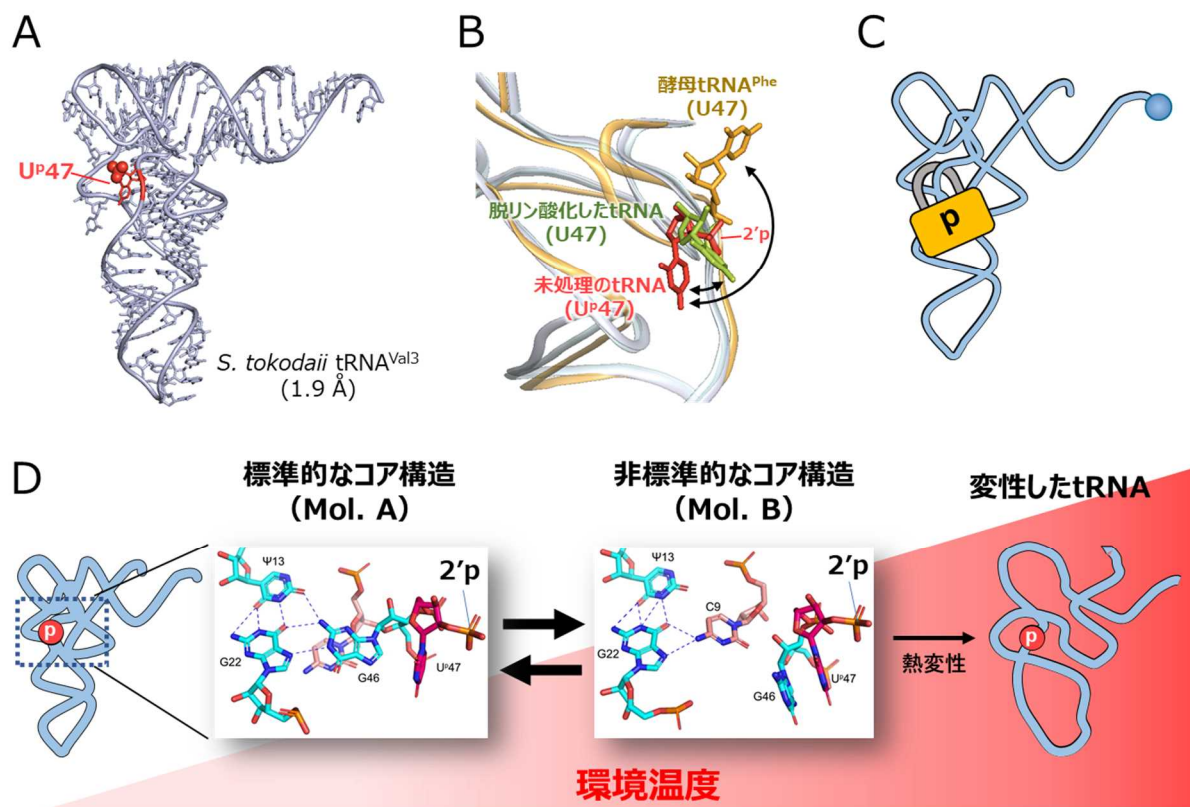


図 2. U^p 修飾は tRNA の準安定なコア構造を安定化している

(A) *S. tokodaii* tRNA^{Val3} の X 線結晶構造 (解像度 1.9 Å)。U^p 修飾を赤で示す。

(B) コア領域の構造比較。未処理の *S. tokodaii* tRNA^{Val3} (U^p47、赤)、U^p 修飾を外した tRNA (U47、緑)、酵母 tRNA^{Phe} (U47、黄、PDB:1EHZ) を重ね合わせた。47 位は Ball and Stick で表示する。未処理の tRNA では 2'リン酸基が溶媒側を向き、ウラシル塩基がコア領域を向いている。

(C) U^p 修飾は tRNA にある程度の柔軟性を担保しながら主鎖の回転範囲を制限し、tRNA の崩壊を防ぐ南京錠のように働く。

(D) U^p 修飾による tRNA コア領域の安定化モデル。tRNA の熱変性はコア領域の崩壊から始まることから、Ψ13-G22-G46 から成るベーストリプルからの G46 の離脱は、熱変性の中間状態とみなすことができる。U^p 修飾が主鎖の回転を制限することでコア構造の安定化に寄与するだけでなく、コアから解離した G46 をスタッキングによって受け止め、Ψ13-G22-C9 からなる準安定なコア構造を安定化することで熱変性による tRNA の崩壊を防ぐとともに、再び標準的なコア構造に戻る機会を増やすと考えられる。

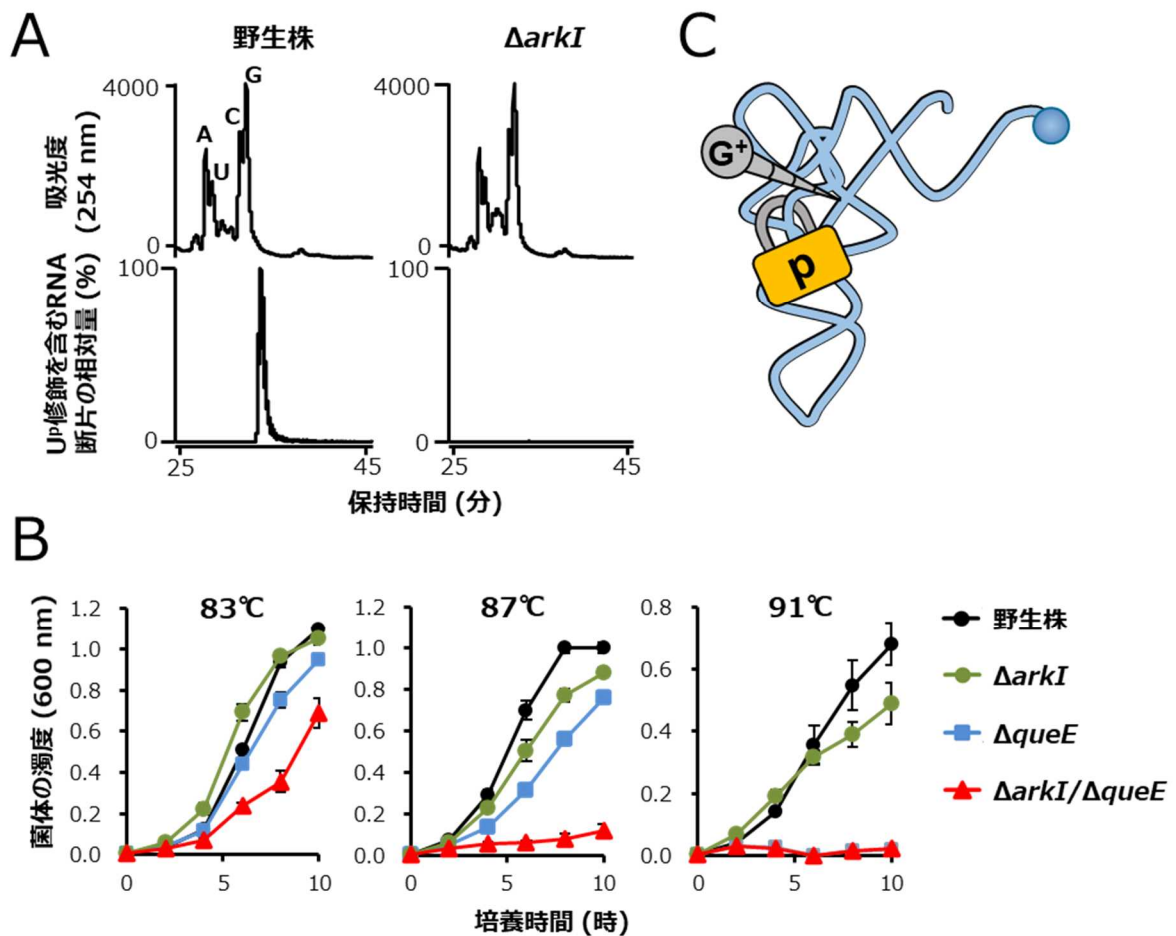


図 3. U^p 修飾は超好熱性アーキアの高温適応に寄与する

(A) LC/MS 解析による U^p 修飾の確認。上段は UV 吸光度 (254 nm) のクロマトグラム。下段は U^p47 を含む断片 (pU^pm⁵C、*m/z* 724) のマスクロマトグラム。左は野生株、右は候補遺伝子破壊株。候補遺伝子 ($\Delta arkI$) の破壊株で U^p 修飾が消失した。

(B) *T. kodakarensis* 遺伝子破壊株の生育曲線 (培養温度は 83°C、87°C、91°C)。野生株 (黒)、*arkI* 遺伝子破壊株 ($\Delta arkI$ 、緑) G⁺修飾に関わる *queE* 遺伝子破壊株 ($\Delta queE$ 、シアン)、*arkI/queE* 二重遺伝子破壊株 ($\Delta arkI/\Delta queE$ 、赤)。*arkI* の単独遺伝子破壊株は弱い温度感受性を示し、二重遺伝子破壊株は顕著な温度感受性を示した。

(C) U^p 修飾が G⁺修飾と協働して tRNA を安定化するモデル。前述したように U^p 修飾は柔軟性を許容しながら tRNA の崩壊を防ぐ南京錠のように働く一方で、G⁺修飾は周辺のヌクレオチドと多数の相互作用を形成することで、ネジのように堅く tRNA を安定化する。

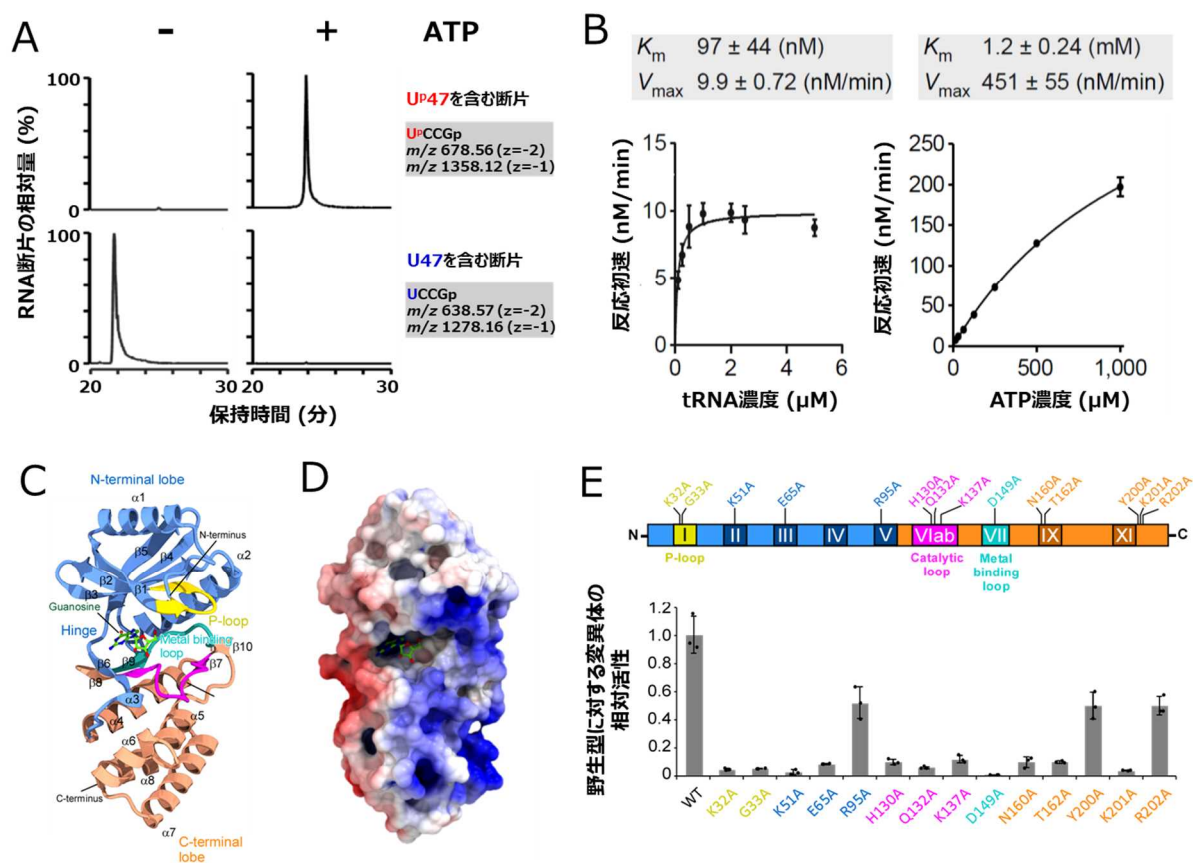


図 4. ArkI は ATP 依存的な RNA リン酸化酵素である

(A) 組換え TkArkI を用いた試験管内 U^p 修飾再構成。上段は U^p47 を含む RNA 断片のマスククロマトグラム。下段は未修飾の U47 を含む RNA 断片のマスククロマトグラム。左は ATP 未添加、右は ATP 添加時の結果を示す。

(B) TkArkI による U^p 修飾形成の反応速度論解析。左は tRNA 濃度に対する反応初速を計測し、tRNA に対する K_m 値、 V_{max} 値を非線形解析で算出した。右は ATP 濃度に対する反応初速を計測し、ATP に対し K_m 値、 V_{max} 値を同様に算出した。

(C) TkArkI の X 線結晶構造 (解像度 1.8 Å)。モチーフや部分構造を色分けした。N-terminal lobe を青、C-terminal lobe をオレンジ、P-loop を黄色、Catalytic loop をピンク、Metal binding loop をシアンで示す。また、活性中心にはグアノシンが結合していた (緑の Ball and Stick で示す)。二次構造の情報は黒字で併記した。

(D) TkArkI の表面電荷。寒色は正電荷、暖色は負電荷を示す。活性中心から C-terminal lobe にかけて正電荷の帯が見える。

(E) TkArkI の変異体解析。上は TkArkI のモチーフ構造と変異を導入した部位を表す。下は各変異体の活性。縦軸は野生型 (WT) の活性の平均を 1 としたときの相対活性を示す。横軸は各アミノ酸をアラニンに置換した変異体を表す。各変異体について 3 回ずつ試行し、平均値を棒グラフ、標準偏差をエラーバー、各試行の値を点で表示した。11 個の変異体で大きな活性の低下が見られ、これらのアミノ酸が活性に寄与していることが示された。

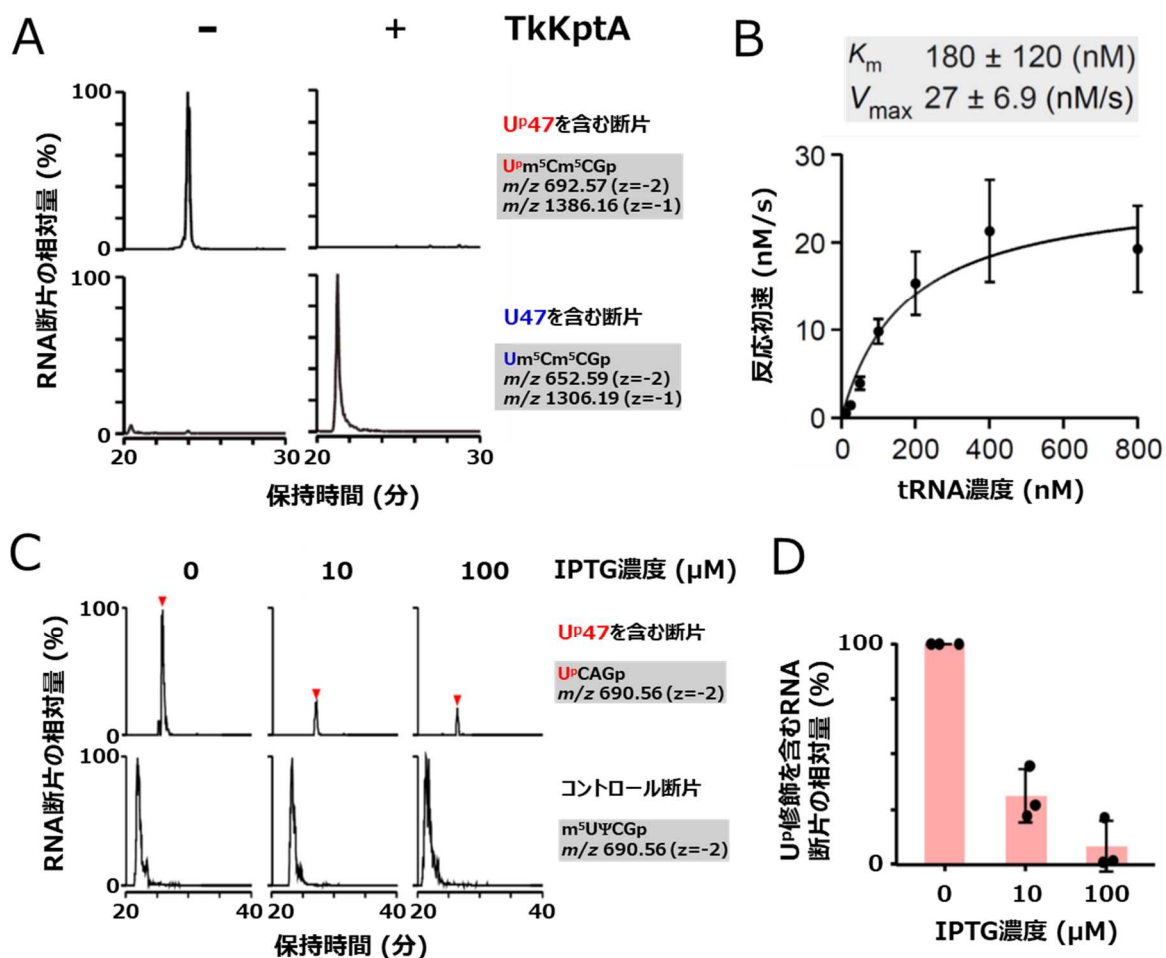


図 5. KptA は U^p 修飾の脱リン酸化酵素である

(A) 組換え TkKptA を用いた試験管内 U^p 修飾の脱リン酸化反応。上段は U^p47 を含む RNA 断片のマスキロマトグラム、下段は未修飾の U47 を含む RNA 断片のマスキロマトグラム。左は TkKptA 未添加、右は添加時の結果を示す。

(B) TkKptA による U^p 脱リン酸化反応の反応速度論解析。tRNA 濃度に対する反応初速を計測し、tRNA に対する K_m 値、 V_{max} 値を非線形解析で算出した。

(C) 大腸菌内で TkArkI を発現し大腸菌の内在の tRNA に U^p 修飾を導入した状態で、TkKptA の発現を異なる IPTG の濃度 (0、10、100 μM) で誘導した。上段は U^p47 を含む RNA 断片 (U^pCAGp) のマスキロマトグラム、下段はコントロールとして用いた RNA 断片 (m⁵UΨCGp) のマスキロマトグラムを示す。

(D) TkKptA の発現を異なる IPTG 濃度で誘導した後、U^p 修飾を含む RNA 断片 (U^pCAGp) を定量し、コントロールの RNA 断片に対する相対値を棒グラフで示した。TkKptA の発現に応じて U^p 修飾が減少し、KptA が細胞内で実際に eraser として機能する事が示された。

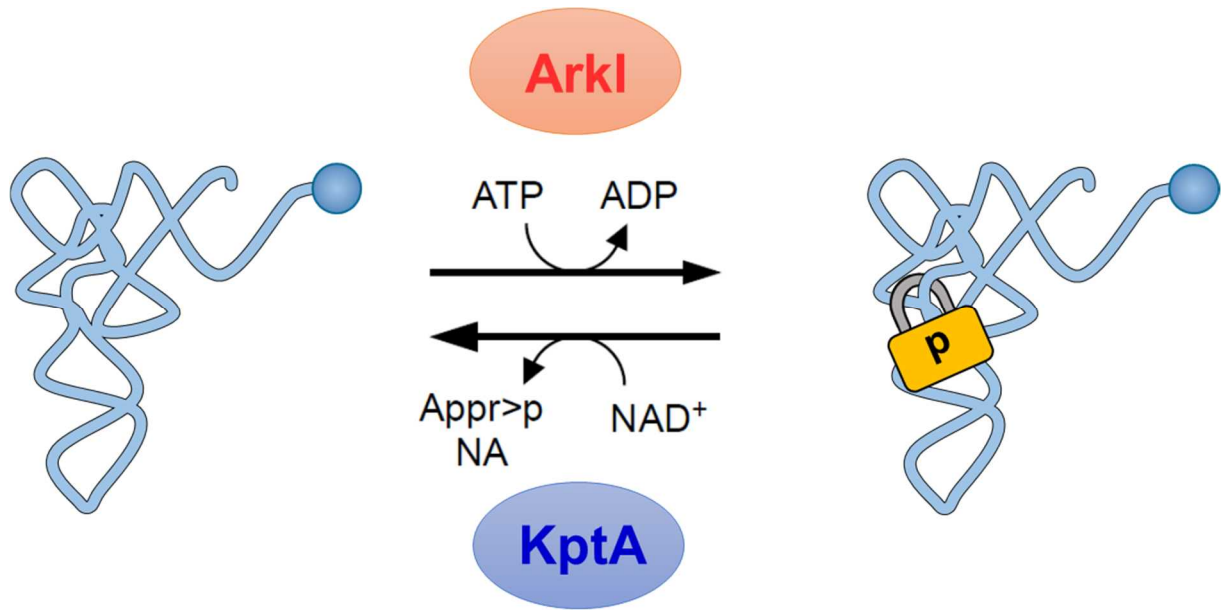


図 6. ArkI と KptA による可逆的な tRNA のリン酸化

tRNA は writer である ArkI により U^p 修飾（南京錠のマークで示す）を導入されることでコア構造がロックされ安定となる。一方、eraser である KptA が U^p 修飾を外すことでコア構造が柔軟になる。このような可逆的な RNA リン酸化による tRNA 構造の調節は、急激な温度変化といった環境変化に応じた遺伝子発現の調節に貢献していると考えられる。ArkI は ATP をリン酸基ドナーとして用い、tRNA をリン酸化後、ADP が副産物として生じる。KptA はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) をリン酸基アクセプターとして用い、 U^p 修飾から脱離したリン酸基と反応すると ADP-ribose 1'',2''-cyclic phosphate (Appr>p) とニコチンアミド (NA) が生じる。