

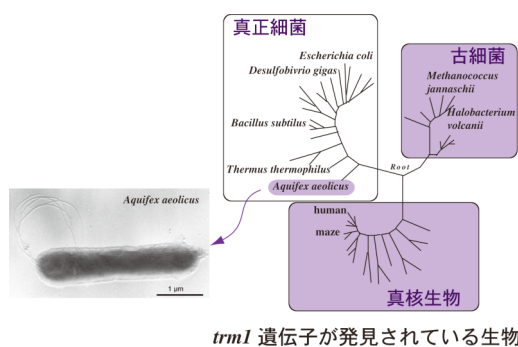
超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* の推定上の *trm1* 遺伝子産物の性質決定
Characterization of putative *trm1* gene product from a hyper-thermophilic eubacterium, *Aquifex aeolicus*

栗井貴子¹、木村 聡²、Ihsanawati³、富川千恵¹、越智杏奈¹、別所義隆³、横山茂之^{3,4}、
 横川隆志⁵、鈴木 勉²、堀 弘幸^{1,3,6}

Takako Awai¹, Satoshi Kimura², Ihsanawati³, Chie Tomikawa¹, Anna Ochi¹, Yoshitaka Bessho³, Shigeyuki Yokoyama^{3,4}, Takashi Yokogawa⁵, Tsutomu Suzuki², Hiroyuki Hori^{1,3,6}
 (1. 愛媛大・院理工 2. 東京大・院工 3. 理研横浜・生命分子システム領域 4. 東京大・院理 5. 岐阜大・工 6. 愛媛大・VBL)

(1. Grad. Sch. of Sci. and Eng., Ehime Univ. 2. Grad. Sch. of Eng., Tokyo Univ. 3. SSBC, Yokohama Inst., RIKEN 4. Grad. Sch. of Sci., Univ. of Tokyo 5. Fac. of Eng., Gifu Univ. 6. VBL, Ehime Univ.)

E-mail: t852002u@mails.cc.ehime-u.ac.jp

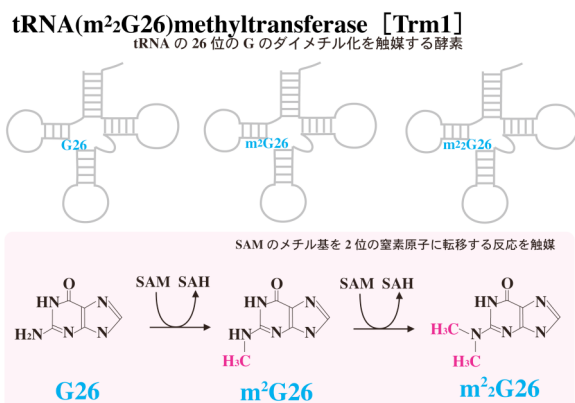


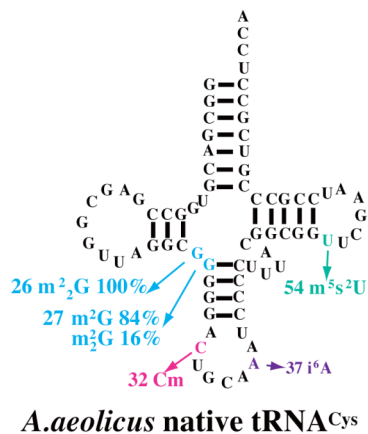
Aquifex aeolicus は、至適生育温度 90℃以上の超好熱性真正細菌です。16S rRNA に基づく系統樹によると、この細菌は、真正細菌で最も初期に分岐したと考えられています。そのため、私たちは、この細菌の RNA 修飾酵素の解析により、初期のタンパク質合成系に関する重要な情報が得られるのではないかと考え、この細菌をモデル生物として選び、研究を進めています。

1998 年に *A. aeolicus* のゲノム配列が決定され、推定上の *trm1* 遺伝子がコードされていることが報告されました。*trm1* 遺伝子は、それまでに、古細菌と真核生物だけにしか発見されておらず、現在確認されている限りでは、真正細菌では唯一 *A. aeolicus* でのみ確認されています(左上図)。*trm1* 遺伝子とは、tRNA(m²G26)methyltransferase[Trm1] をコードする遺伝子であり、Trm1 は、tRNA の 26 位の N², N²-dimethylguanosine (m²G26)の生成反応を触媒する酵素です(右下図)。*trm1* 遺伝子同様に、tRNA の m²G26 修飾は、古細菌と真核生物の tRNA では発見されていますが、真正細菌では発見されていませんでした。

私たちはまず、この遺伝子産物が Trm1 活性を持つことを確認しました。さらに、ウェスタンブロッティング解析により、菌体内で *trm1* 遺伝子が発現していることを確認し、また、*A. aeolicus* 細胞抽出液中にも Trm1 活性を見いだすことができました。

一方、基質 tRNA 特異性を探る目的で、様々な tRNA 転写産物のメチル基受容活性を調べたところ、*A. aeolicus* Trm1 は、真核生物、古細菌どちらの Trm1 とともに完全に異なり、非常に多様な tRNA を基質として認識することがわかりました。さらに、質量分析による分析の結果、*A. aeolicus* の組み換え Trm1 は、少なくとも試験管内で 26 位のみならず、





27 位の修飾も触媒し得ることがわかりました。そこで、生きた細胞内でも G27 のメチル化が起こっているかどうかを確認するため、*A. aeolicus* の抽出液から tRNA^{Cys} を単離し、修飾塩基の同定を行なったところ、細胞内でも、G27 のメチル化が確認されました(左上図)。すなわち、*A. aeolicus* Trm1 は、古細菌や真核生物の Trm1 と異なり、tRNA (m²G26, 27) methyltransferase であることがわかりました。現在までに m²G27 が発見されている tRNA は、Bovine Liver tRNA^{Tyr} と Human Placenta tRNA^{Tyr} のみです。これらは、いずれも、m²G26 が同時に確認されており、そのため、これらの修飾酵素は、まだ見つかっていませんが、*A. aeolicus* Trm1 同様に、Trm1 が、この m²G27 の

修飾酵素なのではないかと考えられます。

同時に私たちは、*A. aeolicus* Trm1 の基質認識を構造の点からも総合的に理解するために、構造解析を行い SAM 結合型の X 線結晶構造解析に成功しました。その結果、*A. aeolicus* Trm1 は古細菌である *Pyrococcus horicoshii* Trm1 と、C 末側ドメインの他、いくつかの構造が異なり、さらに 4 つのシステイン残基が集合したクラスター構造を C 末端付近に持つことがわかりました。現在、解かれた構造とアライメントをもとに、酵素機能に重要であると考えられる部位を予測し、解析を進めています。また、*Pyrococcus horicoshii* Trm1 との構造の違いが、酵素の基質特異性にどのように関わるのか、検討してゆきたいと考えています。