

FAD/Folate 依存 tRNA m⁵U54 メチル化酵素 TrmFO の基質認識メカニズム解明に向けて

Reserch for substrate recognition mechanism of FAD/Folate dependent

tRNA m⁵U54 methyltransferase TrmFO.

山下 光輝¹, 西増 弘志², 岩下 知香子¹, 石谷 隆一郎², 平田 章¹, 濡木 理², 堀 弘幸^{1,3}

Koki Yamashita¹, Hiroshi Nishimasu², Chikako Iwashita¹, Ryuichiro Ishitani²,

Akira Hirata¹, Osamu Nureki², Hiroyuki Hori^{1,3}

(¹愛媛大・院理工 物質生命工学,²東京大・医科研・基礎医科学,³愛媛大・VBL)

(¹ Dept. of Materials Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Ehime Univ.,² Dept. of Basic Med. Sci., Inst of Med. Sci., Univ. of Tokyo,³ VBL, Ehime Univ.)

e-mail:koki19850925@yahoo.co.jp

tRNA 上には様々な修飾塩基が存在するが、これらは極めて部位選択性の高い修飾酵素によって転写後に導入されている。そして、これら修飾塩基は tRNA の立体構造保持やコドン認識等の機能を確かなものになっている。tRNA の多くは U54 の 5 位がメチル化されており、m⁵U54 修飾は tRNA の安定性に重要であることが知られている。ほとんどのグラム陰性菌では TrmA が S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として m⁵U54 形成を触媒するが、グラム陽性菌と *Thermus thermophilus* を含む一部のグラム陰性菌では TrmFO が 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸をメチル基供与体として m⁵U54 形成を触媒することが知られている。

我々は今日までに、テトラヒドロ葉酸 (THF) とセリンから 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (MTHF) への合成を触媒するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) を用いた二段階での TrmFO *in vitro* アッセイ系を確立した。その結果、TrmFO の機能解析が可能になった。現在、この系を用いて電子ドナーである NADPH や NADH 反応速度解析や、TrmFO の RNA 認識を解明するために tRNA 変異体を作製し活性測定を行っている。

また今回 *Thermus thermophilus* 由来 TrmFO の立体構造を X 線構造解析によって決定したのでこれも報告する。得られた立体構造は TrmFO ligand-free form、TrmFO-MTHF bound form、TrmFO-glutathione bound form の 3 種類であり、それぞれ 2.1-,1.6-,1.05 Å の分解能であった。これら立体構造によって与えられた情報から、TrmFO 酵素活性に重要と考えられる残基のアラニン変異体酵素を作製し、それぞれの変異体酵素について tRNA m⁵U54 化の初速度解析をおこなった。活性測定は THF、¹⁴C-セリン、セリン、SHMT、tRNA^{Ile} または tRNA^{Thr} 転写産物、TrmFO、NADPH を含む反応溶液を用いて ¹⁴C-メチル基が tRNA^{Ile}、tRNA^{Thr} に導入されるかを検討した。反応には、大腸菌で大量発現させ精製した *T. thermophilus* 由来の SHMT と TrmFO、および *in vitro* 転写した *T. thermophilus* 由来の tRNA^{Ile}、tRNA^{Thr} 転写産物を用いた。反応溶液を処理したのち、オートラジオグラフィによって tRNA^{Ile}、tRNA^{Thr} 転写産物への ¹⁴C-メチル基転移の強度を観察し、活性を比較検討した。