

Thermus thermophilus 由来 dihydrouridine 合成酵素 (Dus) の機能解析

Functional analysis of dihydrouridine synthetase from *Thermus thermophilus*

吉田 剛士¹, 岩崎 絵梨¹, 栗井 貴子¹, 富川 千恵¹, 平田 章^{1,2}, 堀 弘幸^{1,2}

Takeshi Yoshida¹, Eri Iwasaki¹, Akira Hirata^{1,2}, Hiroyuki Hori^{1,2}

(¹ 愛媛大・院理工 物質生命工学, ² 愛媛大・VBL)

(¹ Dept. of Materials Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Ehime Univ.,

²VBL, Ehime Univ.)

e-mail:takeshi_sep_25@yahoo.co.jp

大腸菌では三種類のDusがコードされており、それらが分業して働いていると考えられている。しかし、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* には、一種類の遺伝子しかなく、実際にどのように機能しているか分かっていない。*Thermus thermophilus* は、50~83°Cで生育する高度好熱性の真正細菌である。

本菌のtRNA では、20 位のウリジン (U20)はDihydrouridine Synthase (Dus) により、ジヒドロウリジン(D20)へと修飾される。本酵素は還元反応によりtRNA 修飾を行う事が判っているが、その電子供与体は今のところ確認されていない。今回実験を始めるにあたり、まず、精製したDus とNADH、NADPHのみを用いてassay を行った。Dus は大腸菌内で大量発現し、DE52、CM-Toyopearl 650M、Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィにより精製した。その結果、Dus 活性は確認出来ず、Dus と複合体を形成しているタンパク質が、細胞内に存在していることが予想された。次に、*T. thermophilus* 細胞抽出液 S100、S30を反応液として、 α -³²P-UTPで内部標識した*T. thermophilus* 由来のtRNA^{Phe}転写産物、精製したDus、NADH、NADPHを用いて修飾が起こるかどうかを2D-TLC解析により行った。その結果、修飾が起こることが分かった。

本研究では、Dus の修飾反応を解析するにあたり、細胞内でDus と複合体を形成しているタンパク質が存在するかどうかを調べる事にした。

精製Dus タンパク質を抗原とし、抗Dus 血清を得た。この血清から、抗Dus-ウサギポリクローナル抗体画分を調製した。*T. thermophilus* 細胞抽出液と抗体を用いて、Western Blotting を行う事で、Dusタンパク質は100,000 x g 超遠心上清 (S-100) 画分に存在し、総タンパク質の約40,000 分の1 含まれている事が分かった。さらに、Dus と複合体を形成するタンパク質について調べるため、免疫沈降を行い、SDS 電気泳動で、Dus と共沈するタンパク質画分を分離して、その複合体を同定している。

また、Dusの生体内での機能解析を行うために、現在Dusの遺伝子破壊株を作成中である。