

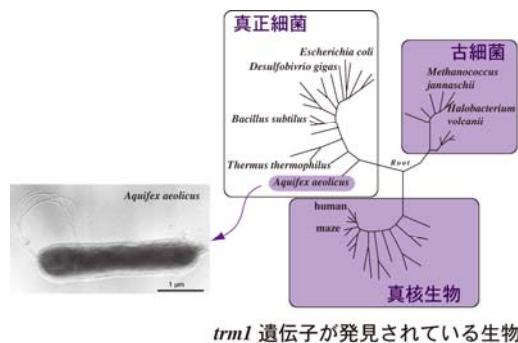
tRNA メチル化酵素 Trm1 の機能と構造

愛媛大学 理工学研究科
栗井貴子

tRNA は DNA の遺伝情報をもとにしたタンパク質の合成（翻訳）過程で、遺伝子上に暗号化された情報をアミノ酸に対応させるという非常に重要な役割を果たしています（右上図）。DNA から転写されたばかりの tRNA は、そのままでは機能を発揮することはできず、修飾やスプライシングなどの、編集・加工の工程を経て成熟し、さらに、それぞれの tRNA に得意的なアミノ酸が結合することが必要で

す。それでは、tRNA 修飾はどのような役割をもつのでしょうか？tRNA 修飾は、コドン・アンチコドン対合の強化、コドン認識能の改変、拡張、抑制、フレームシフトの防止、立体構造の安定化など、タンパク質合成の制御のための様々な役割をもち、少なくとも、現在、地球上に存在する生命で、tRNA 修飾なくしてタンパク質を合成できるものはいません。そのため、RNA 修飾系はタンパク質合成系の諸因子と並んで、生命進化の初期段階で獲得されていたと考えられています。

それでは、タンパク質合成系、tRNA 修飾系は、どのような経過をたどり、発展・細分化してきたのでしょうか？私たちはその手掛かりを得るために、真正細菌で最も初期に分岐したと考えられている、超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* をモデル生物として選



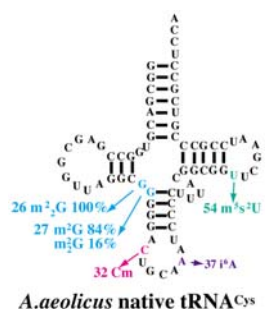
これまで、*trm1* 遺伝子は、真核生物と古細菌だけにしか発見されていませんでした。しかし、1998 年に真正細菌である *A. aeolicus* のゲノム上に *trm1* 遺伝子が保持されていることが確認されました。現在確認されている限りでは、*trm1* 遺伝子は、真正細菌で唯一 *A. aeolicus* でのみ確認されています（左下図）。

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 G のダイメチル化を触媒する酵素です（次項右上図）。私たちは Trm1 が真正細菌で発見されていなかったことから、大腸菌内大量発現系を構築し、組み換え Trm1 を精製し、この遺伝子産物が Trm1 活性を持つことを試験管内の実験で確認しました。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

することができました。

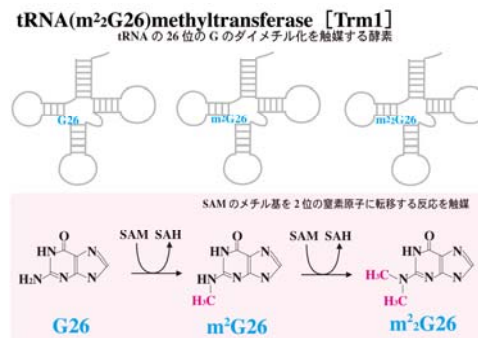
一方、*A. aeolicus* Tm1の基質tRNA特異性は、真核生物、古細菌どちらのTm1とも完全に異なり、*A. aeolicus* Tm1は、非常に多様なtRNAを基質として認識することがわかりました。さらに、質量分析による分析の結果、*A. aeolicus*の組み換えTm1は、少なくとも試験管内で26位のみならず、27位の修飾も触媒し得ることがわかりました。

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.a 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(左中図)。すなわち、*A. aeolicus* Tm1 は、古細菌や真



核生物の Tm1 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* Tm1 同様に、Tm1 が、この m²G27 の修飾酵素なのではないかと考えられます。ところで、これら 3 種の m²G27 をもつ tRNA は、43 位が U となっています。ところが、私たちが、m²G27 を発見した tRNA は、43 位が C の tRNA でした。*A. aeolicus* tRNA^{Cys} 中の m²G27 の割合は、それほど高くありません。これは、*A. aeolicus* tRNA^{Cys} では、43 位が C であり、26 位とワトソンクリック型の塩基対を作っているためではないかと考え、43 位の C を U に変えた転写産物を作成し、メチル基受容活性の変化を確認したところ、27 位のメチル化の割合が著しく上昇しました。

同時に私たちは、A.a Tm1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(右下図)。その結果、*A. aeolicus* Tm1は古細菌である*Pyrococcus horicoshii* のTm1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。Tm1の構造は、A.aとPhoで初めて構造が解かれたため、また、Tm1はプリン塩基の六員環の窒素原子をメチル化する酵素ですが、このタイプの酵素で立体構造が解析された例がないため、その基質選択性や触媒機構がどのようなタンパク質構造に基づいているのか、いまだに判っていません。そこで、構造と、いくつかの生物由来のTm1の配列比較をもとに、SAMの結合部位の予測をし、変異酵素を作成し解析を行ったところ、SAMの結合に重要



だと考えられるいくつかのアミノ酸を特定することに成功しました。しかし、反応機構を知るためには、tRNA複合体を得た上での実験など、さらに、情報が必要です。また、このシステインクラスターも、反応のために重要であると考え、その変異酵素を作成し、活性の確認を行ったところ、酵素反応に何らかの形で関わっていることがわかりました。これらの構造の違いが、酵素の基質特異性にどのように関わるのか今後、検討してゆきたいと考えています。