

RNA 修飾酵素の RNA 認識機構の解明に向けて

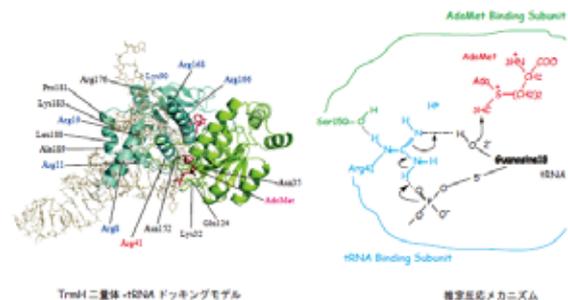
応用生物化学・越智 杏奈

どのようなタンパク質構造がどのような RNA を認識し、どのような反応を行うのか？ タンパク質と RNA との相互作用に統一のルールはあるのか？ この大きな課題に対し、私は knot 構造を持つタンパク質についての解析を行っている。

私の所属する研究室では主に RNA 修飾酵素についての研究が行われている。現在、様々な RNA 修飾酵素の構造が解かれ、それぞれ解析が進められている。しかしながら、これらがどうやって RNA の特定部位を認識しているか、ということは、どれ一つとして解っていない。

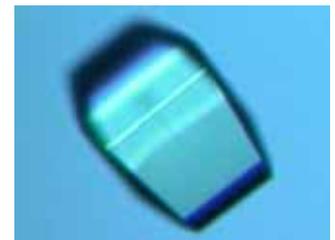
DNA 上にコードされた遺伝情報は、RNA を介してタンパク質へと変換される。RNA は、転写後、RNA 修飾酵素によって修飾を受け、はじめてその生理機能を発揮する。RNA 修飾は、主にタンパク質合成の制御に関わっており、生命現象の維持に重要である。また、RNA 修飾は現在 100 種類以上が確認されており、その約 8 割が tRNA 中に存在することが知られている。

私は、tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH]をモデルタンパク質とし、その RNA 認識に焦点を絞り解析を進めている。TrmH は、tRNA 中に保存された G18 のリボース 2'OH に S-Adenosyl-L-methionine(AdoMet)をメチル基供与体として、メチル基を転移する酵素である。本酵素は、当研究室においてクローニングされ、酵素単独での X 線結晶構造解析に成功している。その結果、活性中心が決定され、保存されたアミノ酸残基の機能解析が行われている。さらに tRNA とのドッキングモデルからその反応メカニズムが予想されている（右図）。



しかしながら、TrmH が実際にどのようにして RNA を認識し、なぜ G18 のみをメチル化するのか、ということはまだ解っていない。その実態を把握するためには、TrmH-AdoMet-tRNA 複合体の X 線結晶構造解析が有力な手法となるが、そのためには TrmH と tRNA がどのような条件下で安定な複合体を形成するのか調べる必要がある。TrmH は AdoMet 存在下でのみ tRNA との親和性が上昇するが、tRNA と AdoMet が共存した場合、TrmH による触媒反応が進行してしまい、複合体が解離してしまうという問題があった。

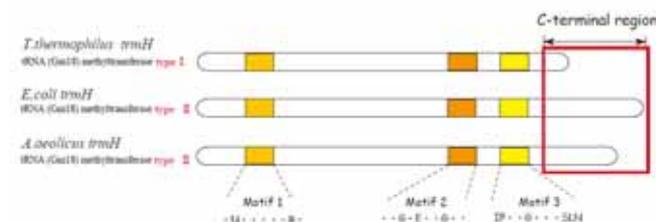
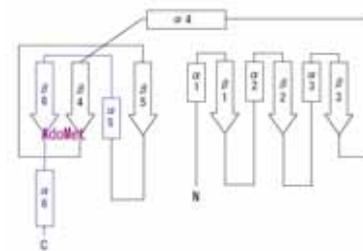
この問題を解決するために、次のようなアプローチを行った。推定された反応メカニズムをどこかで妨害することが出来れば、安定な三者複合体（反応中間体）が得られるのではないかと考えられた。そこで、G18 をデオキシ体に変えた Chimera tRNA^{Phe} を作製し解析した。その結果、これは TrmH によって G19 がメチル化されてしまった。そこで、yeast tRNA^{Phe} の塩基配列を考慮し、G18 とその周辺を変えた Chimera tRNA^{Phe}A20 を作製した。TrmH との相互作用を解析した結果、これは TrmH によってメチル化さ



れず、安定な三者複合体を形成することが解った。そこで、これを大量に調整し結晶化を行った。その結果、幾つかの条件下において、小さな結晶を得ることが出来た。しかしながら、これらはどれもTrmHの結晶であり、tRNAを確認することは出来なかった。今後、tRNAの解離反応も考慮し、さらに安定な三者複合体の調製に挑戦していきたい。

一方、RNA 認識にタンパク質の構造はどのように関係しているのか？ TrmH のどの領域がどのようにして tRNA を認識しているのだろうか？

T.th TrmH は、新規フォールディングであるトレフォイル・ノット構造を持っている（右図）。このようなトレフォイル・ノット型構造の触媒ドメインを持つ RNA メチル化酵素群は SPOUT (spoU-TrmD super family) と呼ばれており、中でも tRNA のリボースをメチル化するものは TrmH family と呼ばれている。TrmH は、その tRNA 認識メカニズムによって Type I

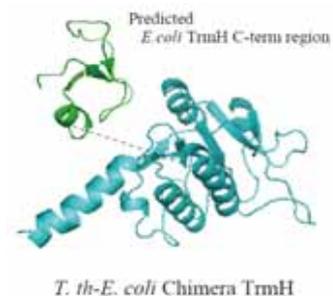


型および Type II 型酵素に分けられる。Type I 型酵素は高熱菌に分布し、全ての tRNA 分子種をメチル化する。一方、Type II 型酵素は、常温で生息する真正細菌および真核生物に分布し、特定の tRNA のみをメチル化する。また、*T. th* を含む Type I 型に比べ、

E. coli を含む Type II 型酵素は、C 末端が長くなっている（左中図）。このことから、TrmH の C 末端領域が tRNA の認識に重要なのではないかと指摘されている。

そこで、*T. thermophilus* TrmH の C 末端領域による tRNA 認識機構の解析に着手した。まず、TrmH の C 末端の α -helix 中、分子表面にあり重要だと思われるアミノ酸残基を Alanine に置き換え、tRNA との相互作用を解析した。さらに、C 末端の Deletion mutant を作製し、解析を行った。これらの結果より、*T. th* TrmH の C 末端は tRNA の認識に関わっており、その中でも特に末端に近い部分が重要であるということが解った。

また、C 末端領域による tRNA の選別を見るために、*T. th*-*E. coli* Chimera TrmH (右下図) を作製し解析した。その結果、*T. th*-*E. coli* Chimera TrmH は、反応温度は *E. coli* のものになっているが、tRNA の選別は *T. th* の Type I 型のままであった。



これらのことより、TrmH の C 末端領域は確かに tRNA の認識に関わってはいるが、tRNA の選別の違いは、それだけでは説明出来ないということが解った。今後、TrmH のどの領域がどのようにして tRNA を選別しているのか、解析を進めていきたい。

この他にも、*T. thermophilus* trmH 遺伝子破壊株の tRNA の解析や SAH 結合フォームの TrmH の結晶構造解析なども行っている。

これらのことも併せ、TrmH の tRNA 認識メカニズムの全体像を考えていきたい。