

モデルタンパク質を元にした SpoU ファミリーの反応機構の推定

愛媛大学工学部応用化学科

渡辺 和則

RNA と一言でいっても mRNA、tRNA、rRNA、snRNA といった様々な分子種が存在している。RNA を構成している基本塩基はアデニン(A)、グアニン(G)、ウラシル(U)、シトシン(C)の4つである。この4つの塩基以外にも RNA には修飾塩基が存在しておりこれまでに約 100 種類ほど報告されている(Fig. 1)。修飾塩基の中でも特によくみられる修飾の1つはメチル化である。メチル化は RNA メチル基転移酵素によりメチル基供与体である S-Adenosyl-L-Methionine (SAM)のメチル基を RNA に転移することにより起こっている。

RNA メチル基転移酵素は TrmH (SpoU)ファミリーや TrmD ファミリー、TrmA ファミリーのように機能毎に分類することができる。近年、アミノ酸配列をコンピューター解析した結果、TrmH ファミリーと TrmD ファミリーは、起源を同じくするスーパーファミリー、SPOUT (SpoU-TrmD super family)ではないかという仮説が報告されている。そこで我々は進化の観点から非常に興味深い SPOUT に着目し、中でも TrmH ファミリーの原型だと考えられる *Thermus thermophilus* tRNA (Gm18) methyltransferase をモデルタンパク質として(1)、(2)のことを行った。

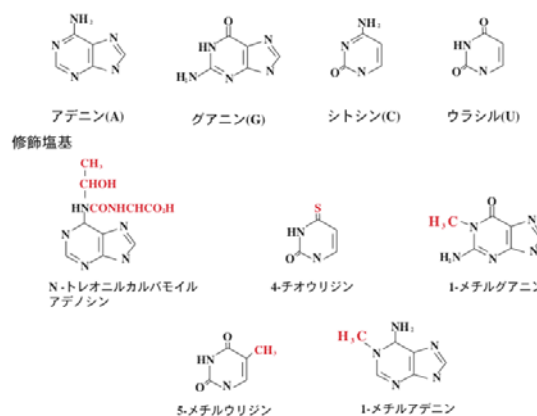


Fig. 1 基本となる4つの塩基と修飾塩基の一例

(1) *T. thermophilus* tRNA (Gm18) methyltransferase の立体構造と基質結合部位の同定

T. thermophilus tRNA (Gm18) methyltransferase の X線結晶構造解析を行い、酵素単独、SAM 複合体の立体構造を明らかにした(Fig. 2 (A))。その結果、SAM と相互作用しているアミノ酸残基がわかった。そこで相互作用しているアミノ酸残基に変異を導入し、生化学的解析を行った結果、特に Met144、Leu151 が SAM の結合に重要であることが

わかった。さらに本酵素の立体構造は、メチル基転移酵素によくみられるロスマンフォールド構造ではなく、ポリペプチドがループを縫うようなトレフォイルノット構造であった(Fig. 2 (B))。これまでにトレフォイルノット構造は我々が報告した *T. thermophilus* tRNA (Gm18) methyltransferase (TrmH ファミリー)以外にも TrmD ファミリーでも報告されている。

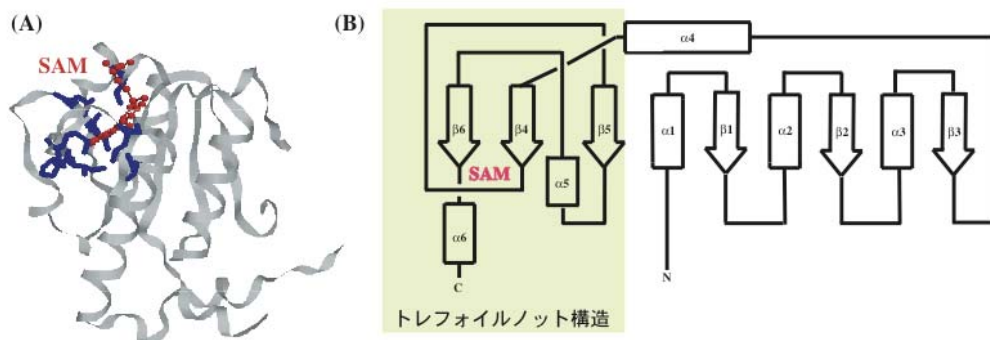


Fig. 2 酵素-SAM複合体の立体構造とトポロジーモデル
 (A) 酵素-SAM複合体の立体構造。青色で示しているのがSAM結合部位、赤色で示しているのがSAM
 (B) トポロジーモデル。黄色で囲っている部位がトレフォイルノット構造を示している

(2) TrmH ファミリーに保存されたアミノ酸配列 (モチーフ) の機能の同定

TrmH ファミリーには3つの高度に保存されたアミノ酸配列 (モチーフ) が存在する (Fig. 3)。現在、保存されている3つのモチーフ機能は、コンピューター予測がされているのみで生化学解析などによる機能同定はされていない。そこで我々はモチーフ中でもっとも高度に保存されているアミノ酸残基に変異を導入し、生化学的解析と、構造解析の結果をあわせ、各モチーフ機能の同定を行った。その結果、モチーフ1の N35 は SAM、tRNA への結合に重要でかつ、生産物である S-Adenosyl-L-Homocysteine の解離にもっとも重要な残基であることがわかった。モチーフ1中でもう1つ高度に保存されている残基である R41 は最も重要な機能の1つである活性中心であり、また tRNA への結合や構造の安定化にも重要である。モチーフ2の E124 は tRNA への結合や構造の安定化に重要である。モチーフ3の S150 は活性中心である R41 の側鎖の方向を決めるのに重要であり、また構造の安定化にも重

	Motif1	Motif2	Motif3
<i>T. thermophilus</i> tRNA (Gm18) methyltransferase	--H ³⁵ NL ⁴¹ SAILRT--	--LFGA ¹²⁴ EKGVS--	--I ¹⁵⁰ PMLGMVQ ¹⁵² SLNV--
<i>S. cerevisiae</i> tRNA(Gm18)methyltransferase	--PNLGGICRL--	--LLGT EAFGIP--	--IQFGVIR SMNI--
<i>S. cerevisiae</i> Mitochondrial 21S rRNA(Gm2270) methyltransferase	--HNIGAIRS--	--VWGN ESQVGR--	--IPFGG---SLNV--
<i>Streptomyces azureus</i> 23S rRNA(Am1068)methyltransferase	--GNIGAIVRT--	--LFGS EKGGPS--	--IPMMGQTE SLNV--

Fig.3 TrmHファミリーのアミノ酸配列の比較
 保存されているアミノ酸配列 (モチーフ) をN末からMotif 1,2,3としている
 赤色で示しているのがもっとも高度に保存されているアミノ酸残基

つた。その結果、モチーフ1の N35 は SAM、tRNA への結合に重要でかつ、生産物である S-Adenosyl-L-Homocysteine の解離にもっとも重要な残基であることがわかった。モチーフ1中でもう1つ高度に保存されている残基である R41 は最も重要な機能の1つである活性中心であり、また tRNA への結合や構造の安定化にも重要である。モチーフ2の E124 は tRNA への結合や構造の安定化に重要である。モチーフ3の S150 は活性中心である R41 の側鎖の方向を決めるのに重要であり、また構造の安定化にも重

要であり、N152はtRNAへの結合と構造の安定化に重要である。

我々は(1)、(2)の結果から *T. thermophilus* tRNA (Gm18) methyltransferase の反応機構を推定した(Fig. 4)。まず、酵素に tRNA が結合することにより、tRNA の 5'側のリン酸基が R41 に接近し、R41 が活性化される。その際、R41 は S150 により側鎖の方向が決められている。活性化された R41 はグアノシン 18 のリボース 2'-OH を脱プロトン化する。脱プロトン化された 2'-Oは SAM のメチル基を求核攻撃しメチル基転移反応が起こると考えられる。この反応機構は活性中心である R41 が TrmH ファミリー全体で最も高度に保存されている残基の1つであることから TrmH ファミリー全体にあてはまると考えられる。

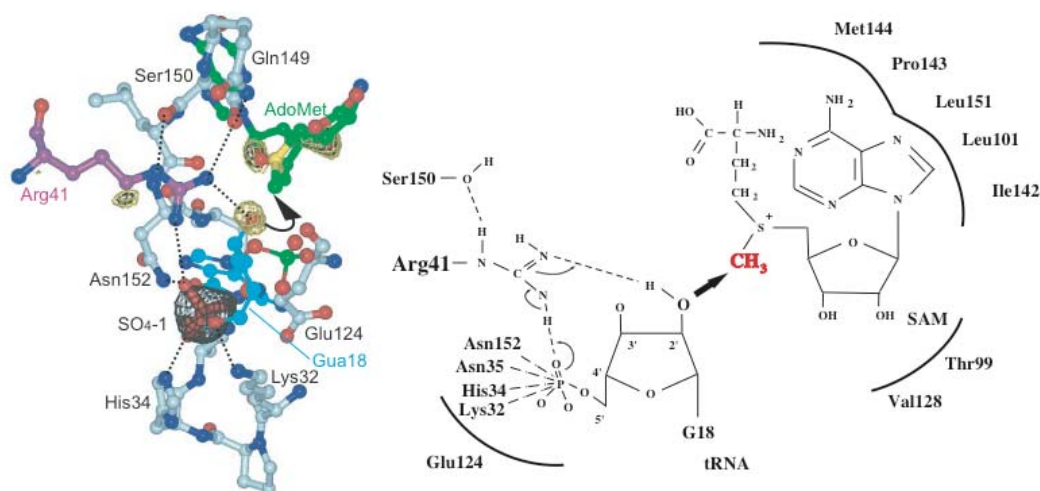


Fig. 4 *T. thermophilus* tRNA (Gm18) methyltransferaseの反応機構の推定

最後に、SPOUT を形成しているのか、つまり TrmH ファミリーと TrmD ファミリーは共通の起源をもっているのか考察するために、今回得られた TrmH ファミリーの結果とこれまでに得られている TrmD ファミリーの知見を比較してみた。まず異なっている点としては、SAM 結合が異なっており、予測されている tRNA 結合部位も違っている。つまり基質結合部位が完全に異なっている。さらに活性中心が異なっており、当然推定されている反応機構も全く違っている。しかしながら、アミノ酸配列が似ているところが存在しており、立体構造が SPOUT 特徴的なトレフォイルノット構造をしていることから本当に共通の起源をもっているのかもしれない。また、共通の起源をもっているのならば、TrmH ファミリーと TrmD ファミリーは進化の初期の初期の段階で分化したのかもしれない。