



修飾塩基には、単純なメチル化やアセチル化塩基以外に、多段階反応を経由して非常に長い側鎖が結合したものもある。なかでも、種類が多いのは、メチル化塩基である（図2）。

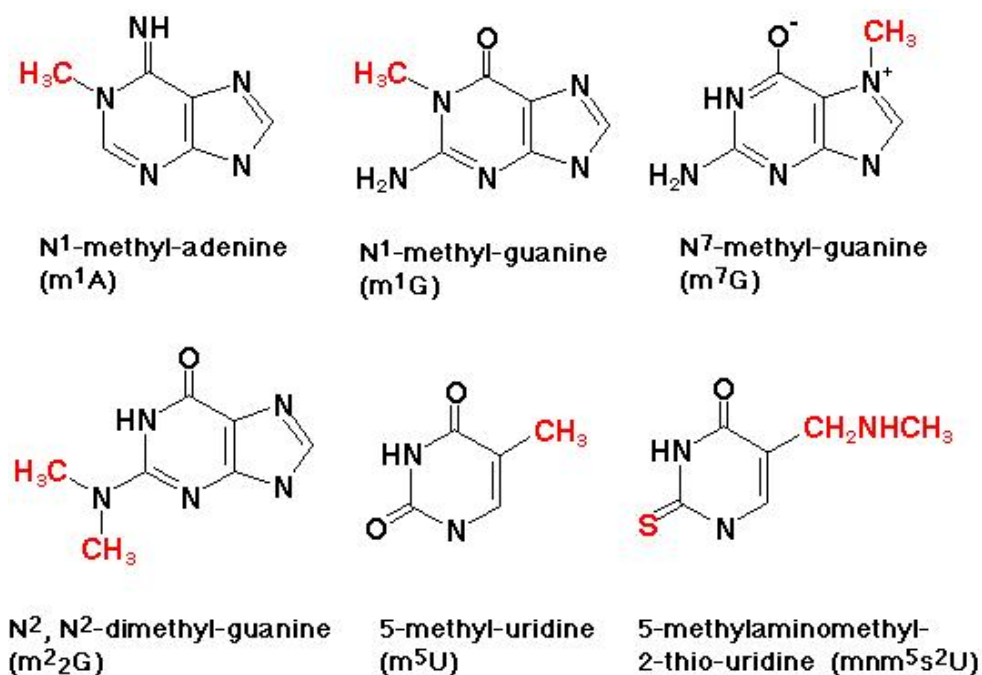


図2 メチル化塩基

代表的なメチル化塩基を名称および略号とともに示した。ハーフトーンで表示した部分が修飾部位である。

図2のように、メチル化塩基には、単純なメチル基転移反応で合成されるものから、多段階反応の途中もしくは最終段階でメチル基転移が関与するものまで様々ある。メチル化ヌクレオシドとしては、塩基部分のメチル化以外に、リボースの2'位のメチル化もあり、それらが複合する場合もある。このように、RNA修飾でもっとも多いパターンは、塩基およびリボースのメチル化であり、修飾ヌクレオシドの7割以上は生合成経路のどこかでメチル化が関与していると思われる。

RNA修飾は、いずれも転写後修飾によってもたらされるが、修飾されるRNAの分子種、部位が異なれば、同じ修飾ヌクレオシドでも別の酵素が働くことが多い。したがって、その数だけ修飾酵素が必要であり、大腸菌の場合、そのゲノ

ムの1%以上がRNA修飾酵素をコードするために使われている。メチル化ヌクレオシドはその種類が多く、RNAメチル化酵素も文献上、300種類近くが存在すると予想されている。

演者は、これだけ多岐に渡るRNAメチル化酵素をゲノム情報に基づいて包括的にとらえ、そこから生命現象を説明できないか？というスタンスで研究を進めてきた。本セミナーでは、我々の研究結果とともに、内外の最新知見をあわせて紹介する。

### 新規RNAメチル化酵素ファミリーの発見

従来、S-アデノシル-L-メチオニン依存性メチル化酵素は、すべて同じ触媒ドメイン構造を持ち、同じ触媒メカニズムでメチル基転移するものと信じられてきた。1998年ごろ、演者はこの考え方に基づいてRNAメチル化酵素のアミノ酸配列を比較してみたところ、いくつか例外のあることに気付いた。そのひとつが、tRNA(Gm18)methyltransferase [TrmH]である(図3)。

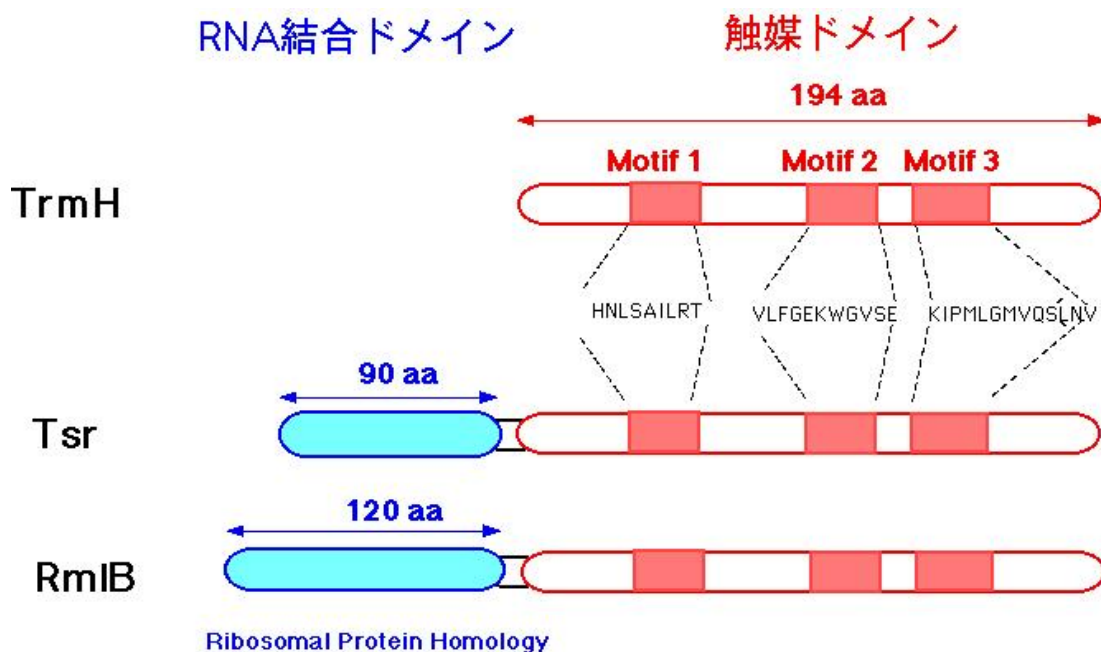


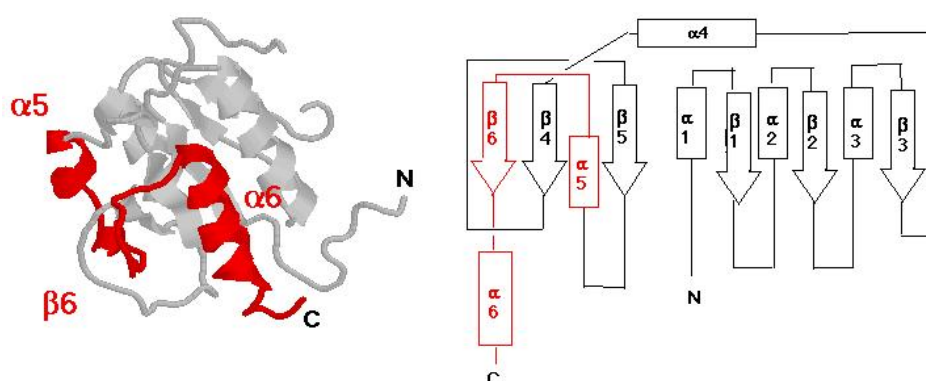
図3 tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH]とrRNAメチル化酵素

触媒ドメインに保存されている三つのアミノ酸配列 (Motif 1, 2, 3) を基準に三つの酵素を比較してみると rRNAメチル化酵素には明確なRNA結合ドメインが存在するが、TrmHにはない。

図3に示したように、TrmHには明確なRNA結合ドメインがない。しかしながら、本酵素はtRNAの保存ヌクレオシドG18のリボースを正確に認識し、2'-OH基をメチル化する。この酵素のRNA認識メカニズムはどうなっているのだろうか？という着想が本研究のスタートであった。

そこでX線結晶構造解析をおこなってみたところ、本酵素の触媒ドメインは既知のメチル化酵素と全く異なっていることが判った(図4)。

### tRNA (Gm18) methyltransferase (TrmH)に発見された trefoil-knot構造



Nureki, O. *et al.* (2004) *Structure* 12, 593-602.

図4 TrmH単量体サブユニットの構造(左)とトポロジー図(右)

TrmHの主要部分は、触媒ドメインからなっており、全く新規なタンパク質フォールディングをしていることが判った。C末側ポリペプチドがタンパク質ループ構造を縫った構造をしており、トレフォイル・ノット構造と命名された。

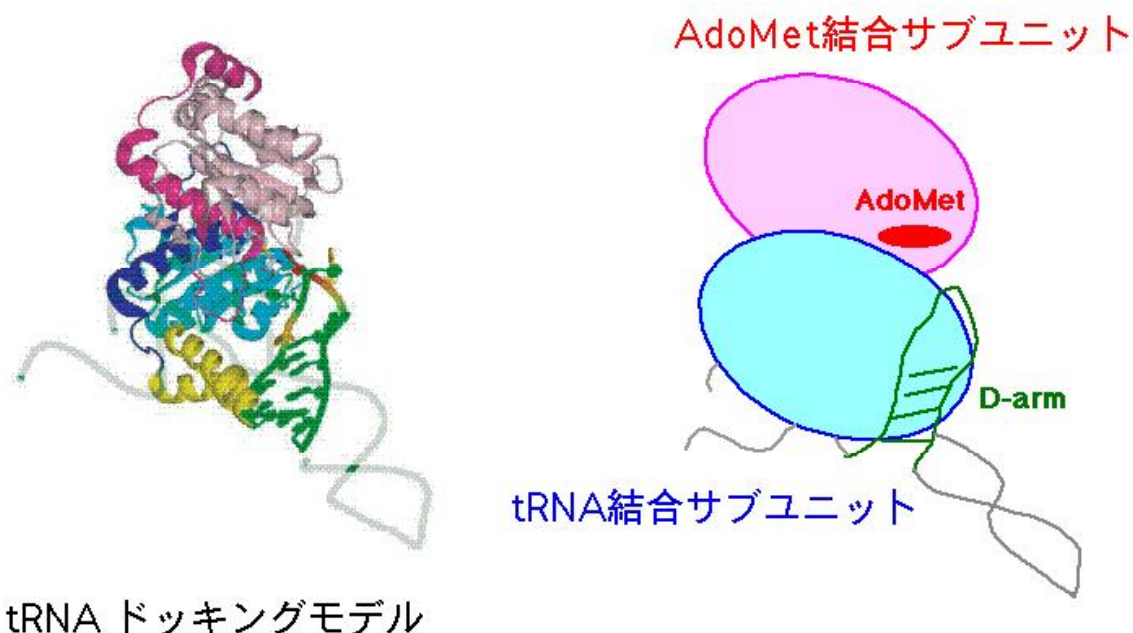
また、我々はTrmHとS-adenosyl-L-methionine (AdoMet)複合体のX線結晶構造解析にも成功したが、AdoMet結合部位はこのトレフォイル・ノット構造上に位置することを見いだした。そこで、この構造データ上、AdoMetと会合する残基に部位特異的に変異を導入して、AdoMet結合に重要な残基を特定することにした。その結果、Met144、Leu151残基との疎水的相互作用により、AdoMetが結合することが確認できた。このAdoMet結合部位も、従来知られていた水素結合ネットワークにより形成されるAdoMet結合部位に比べてかなり異なっている。そ

その後 2006 年 2 月までに、国内外のグループから、トレフォイル・ノット構造をもつ RNA メチル化酵素（もしくは、その候補タンパク質）の X 線結晶構造解析の結果が、全部で 9 種類報告され、これらは新規な RNA メチル化酵素ファミリーを形成していることが判った。

### RNA 結合の問題と触媒メカニズム

X 線結晶構造解析の結果は、長年続いていた TrmH のサブユニット構造に関する議論にも終止符を打った。生きた *Thermus thermophilus* から精製される酵素量は、100 g の菌体から数十  $\mu\text{g}$  程度と極めて少ない。この天然酵素は、高濃度標品ならば二量体構造であるが、希釈状態で保存すると、単量体サブユニットが大部分となる。このどちらが、活性型フォームであるのか結論が出ていなかった。結晶中の TrmH は二量体構造であり、その tRNA ドッキングモデルは二量体構造に tRNA 一分子が結合するモデルを提案した（図 5）。

### TrmH は二量体構造であった



### tRNA ドッキングモデル

図 5 TrmH の二量体構造と tRNA のドッキングモデル

二つのサブユニットを赤と青で示した。右は模式図で、サブユニットの AdoMet と tRNA の相対的な位置関係を表示している。

また、このドッキングモデルは、TrmH には明確な RNA 結合ドメインがないという問題も解決した。二つのサブユニットのうち、片方が RNA 結合サブユニットとして機能し、もう片方が AdoMet を結合する。さらに、触媒ポケットの精密構造は、本酵素の触媒メカニズムも提案した ( 図 6 )。

## 推定反応メカニズム

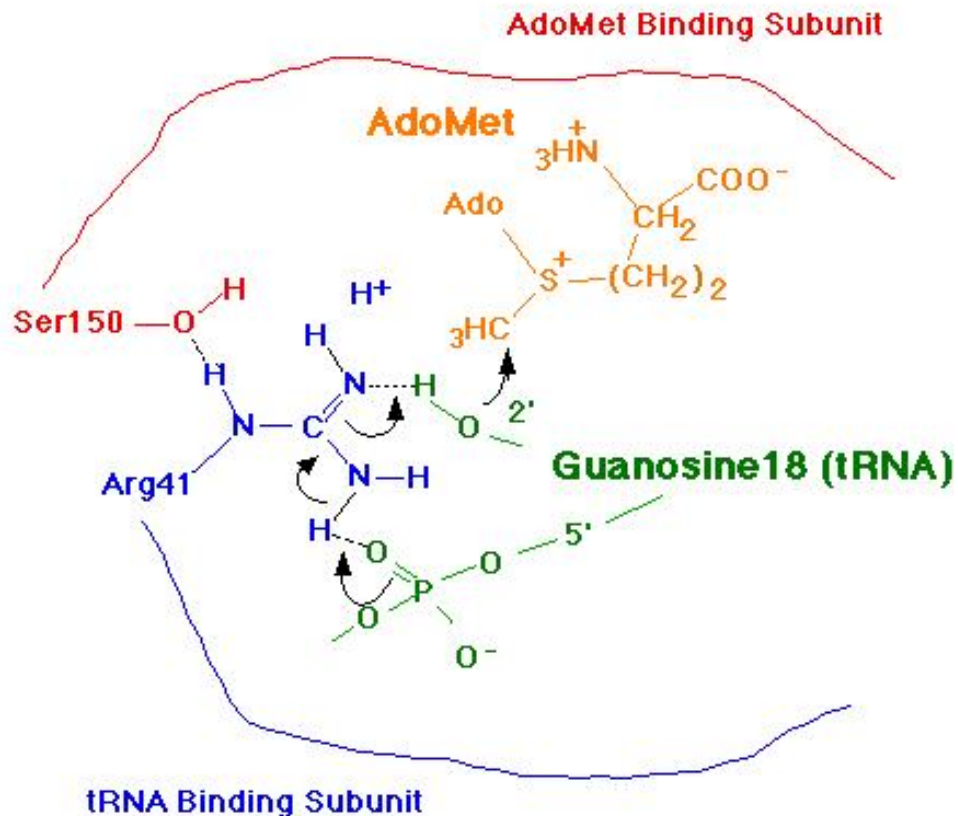


図 6 TrmH の推定反応メカニズム

細胞内でレスタンピング状態にある TrmH は、二つのサブユニットおのおのに AdoMet が一分子ずつ結合している。ここに、tRNA が結合してくると、G18 のリボースの 5' 位のリン酸基が活性中心の Arg 残基を活性化する。活性化された Arg 残基は、リボースの 2' 位の OH 基を脱プロトン化し、この活性化された酸素原子がもう片方のサブユニットに結合した AdoMet のメチル基を求核攻撃して、メチル基転移が起こる。



現在のところ、この構造データに基づく反応メカニズムが生化学解析の結果をもっとも矛盾なく説明する仮説である。

### 終わりに

我々が TrmH で示した生化学解析や構造解析の結果は、RNA メチル化酵素の分類を再考する契機となった。現在では、トレフォイルノット構造をもった RNA メチル化酵素ファミリーは世界的に認知され、旧来知られていたロスマンフォールド型メチル化酵素も再検討されつつある(図7)。ゲノム情報を活用することによって、さらに新規な酵素や反応機構が見つかるかもしれない。

### AdoMet依存性RNAメチル化酵素 (アミノ酸配列による推定)

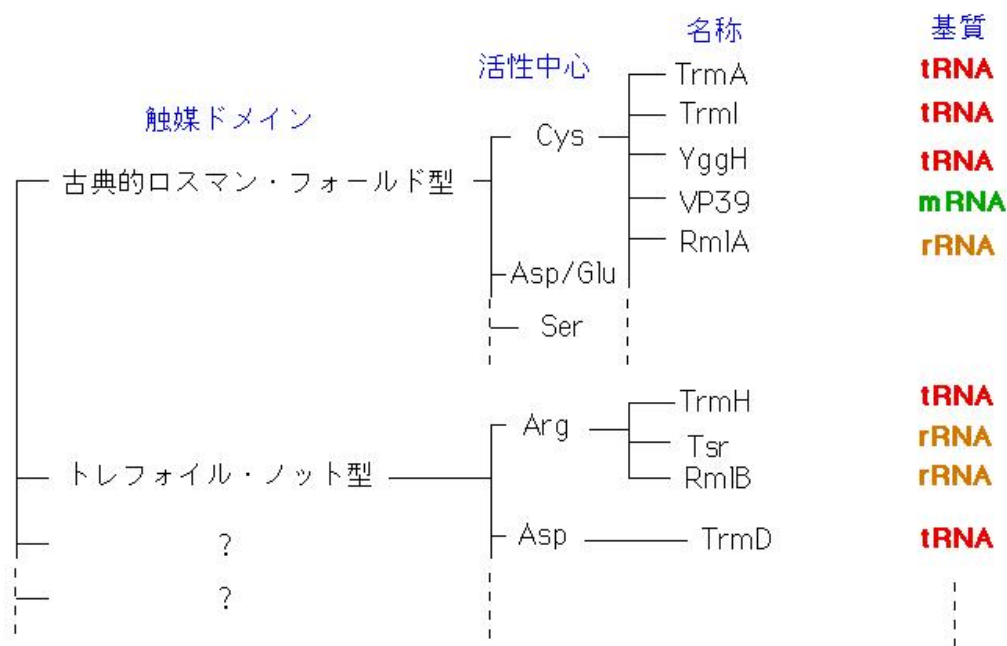


図7 再分類されつつある AdoMet 依存性 RNA メチル化酵素

RNA メチル化酵素を触媒ドメインの構造と活性中心をもとに再分類してみた。この比較から、新たな酵素や触媒ドメイン、反応機構が発見されるかもしれない。

### 謝辞

本研究は、愛媛大学工学部応用化学科応用生物化学研究室の遠藤先生ほか、多くの学生・大学院生および他大学の共同研究者の皆様の力添えでなされたものです。あらためて深謝いたします。