

学位論文要約

Dissertation Abstract

氏名 (Name) 山上 龍太

論文名: 葉酸依存性RNAメチル化酵素TrmFOの包括的解析
(Dissertation Title)

Transfer RNA (tRNA) は、機能性RNA分子の一種である。tRNAは、転写産物においては、その機能をもたないため、機能性tRNAへと成熟するための様々な編集加工の工程を経る必要がある。その工程には、tRNA中の余分な付加配列の除去反応や構造安定化因子、コドン認識に関わる因子の付加反応など、多様な成熟化反応が含まれており、それらの反応は、同時多発的に生体内で展開される。すなわち、1つのtRNAに対して複数の成熟化酵素群が協調的にはたらいている。では、細胞の無秩序な空間の中で、tRNA成熟化酵素群は、如何にして標的tRNAを効率よく見つけ出し、如何にして他の成熟化酵素群と協調してはたらいているのだろうか？本論文では、それらの疑問を解決すべく、葉酸依存

性RNAメチル化酵素TrmFOを用いて、以下の3つの観点から研究を進めた。

(1)TrmFOは、どのようにして、tRNAのU54を認識しているのだろうか？

*Thermus thermophilus*において、tRNA中のU54は、葉酸依存性tRNA(m⁵U54)メチル化酵素TrmFOによって、メチル化される。一般的にRNAメチル化酵素は、S-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体とするが、TrmFOは、例外的にメチレンテトラヒドロ葉酸をメチル基供与体とする。メチレンテトラヒドロ葉酸は、非常に不安定なため、TrmFOの酵素活性を測定することが困難であった。そこで、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT)を用いた2段階酵素活性測定法を開発し、反応系を最適化することで、この問題を解決した。

次に、この酵素活性測定法と42種の変異tRNAを用いて、基質認識部位を同定した。その結果、TrmFOは、T-アーム中のU54U55C56とG53-C61の保存配列を認識していた。さらに、TrmFOは、アンチコドン-アームのA38をネガティブデターミナントとして認識し、誤った部位にメチル基転移が起こるのを防いでいた。また、ゲルモビリティシフトアッセイ、蛍光スペクトル測定、基質阻害実験を併せた結果より、以下ことが明らかになった。

(I)TrmFOの反応は、少なくとも基質の初期結合過程とメチル化部位のループ構造を崩壊させる過程の2つ以上のステップから成っている。

(II)基質の初期結合過程において、基質tRNAの結合と解離が非常に速く起こっている。

(III)基質認識の律速段階は、T-アームの構造崩壊のステップにある。

さらに、他の修飾ヌクレオシドの存在がTrmFOに、どのように影響するかを確認したところ、T-アーム内に存在するm¹A58修飾ヌクレオシドが、TrmFOの反応を加速させた。以上の速度論的解析結果を用いて、TrmFOとT-アームの複合体モデルを構築した。

(2)tRNA中のm⁵U54は、他の修飾酵素とどのようにして相互作用し得るか？

近年、tRNA中の3D-コアの修飾ヌクレオシドは、tRNA修飾ネットワークを介して調節されることがわかってきた。そこで、tRNA修飾ネットワークの全貌を明らかにするために、m⁵U54の存在意義を検討した。初めに、*T. thermophilus*を用いて、*trmFO*遺伝子破壊株を相対的組み換え法によって作製した。得られた*trmFO*遺伝子破壊株の生育的特性の変化を確認したところ、*trmFO*遺伝子破壊株は、低温域で生育が遅れることがわかった。そこで、低温培養時のtRNA修飾ヌクレオシド量やタンパク質合成量を確認したところ、次のことがわかった。

(I)*trmFO*遺伝子破壊株のtRNAでは、m²G6とGm18の含有量が増加し、m¹A58の含有量が減少する。

(II)*trmFO*遺伝子破壊株では、タンパク質合成速度が低下するが、合成されたタンパク質のポピュレーションは変化しない。

以上より、m⁵U54は、低温環境下でのtRNAの環境適応機構に関与していた。

(3)TrmFOの存在は、DNA合成系に影響を及ぼすか？

同じくMTHFをメチル基供与体とするDNAの基質前駆体であるdTMP合成酵素ThyXとTrmFOの関連について、*trmFO*遺伝子破壊株を用いて解析した。*trmFO*遺伝子破壊株は、最少培地で生育速度が速くなった。この原因を追及するためにさらなる解析を行

ったところ、以下のことが明らかになった。

(Ⅰ)DNA合成に使われるチミジンやセリンのメチル基の量は、*trmFO*遺伝子破壊株で増加していた。

(Ⅱ)試験管内におけるTrmFOのメチル基転移活性は、ThyXの存在によって阻害された。

以上より、*trmFO*遺伝子破壊株で生育速度が速くなる原因は、TrmFOが消失することで、DNA合成系で代謝されるMTHFの量が増加し、DNA合成速度が上昇したためであると予想した。