

Thermus thermophilus 由来 tRNA U54 メチル化酵素 TrmFO
in vitro アッセイ法の確立

**Establishment of *in vitro* assay system for tRNA U54 methyltransferase TrmFO from
*Thermus thermophilus***

山下 光輝¹, 岩下 知香子¹, 西増 弘志², 濡木 理², 堀 弘幸^{1,3}

Koki Yamashita¹, Chikako Iwashita¹, Hiroshi Nishimasu², Osamu Nureki², Hiroyuki Hori^{1,3}

(¹愛媛大・院理工 物質生命工学,²東京大・医科研・基礎医科学,³愛媛大・VBL)

(¹ Dept. of Materials Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Ehime Univ.,² Dept. of Basic Med. Sci., Inst of Med. Sci., Univ. of Tokyo,³VBL, Ehime Univ.)

e-mail: u843046b@mails.cc.ehime-u.ac.jp

tRNA 上には様々な修飾塩基が存在するが、これらは極めて部位選択性の高い修飾酵素によって転写後に導入されている。これら修飾塩基は tRNA の立体構造保持やコドン認識等の機能を確かなものにしてている。tRNA の多くは U54 の 5 位がメチル化されており、m⁵U54 修飾は tRNA の安定性に重要であることが知られている。ほとんどのグラム陰性菌では TrmA が S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として m⁵U54 形成を触媒するが、グラム陽性菌と *Thermus thermophilus* を含む一部のグラム陰性菌では TrmFO が 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸をメチル基供与体として m⁵U54 形成を触媒する。

5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸が不安定であり、ラジオアイソトープ化合物も市販されていないなどの理由から、TrmFO 活性の定量的なアッセイ方法は確立されていない。そこで我々は、テトラヒドロ葉酸とセリンから 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸への合成を触媒する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 TrmFO 活性の *in vitro* アッセイ系の確立を試みた。

テトラヒドロ葉酸、¹⁴C-セリン、SHMT、tRNA^{Phe} 転写産物、TrmFO、NADPH を含む反応溶液を用いて ¹⁴C-メチル基が tRNA^{Phe} に導入されるかを検討した。反応には、大腸菌で大量発現させ精製した *T. thermophilus* 由来の SHMT と TrmFO、および *in vitro* 転写した *T. thermophilus* 由来の tRNA^{Phe} 転写産物を用いた。その結果、オートラジオグラフィーによって tRNA^{Phe} 転写産物への ¹⁴C-メチル基転移が観察された。さらに、ヌクレアーゼ P1 処理したサンプルの 2D-TLC 解析によって、生成したヌクレオチドが ¹⁴C-pm⁵U であることが確認された。これらの観察から、*in vitro* で SHMT により ¹⁴C-セリンとテトラヒドロ葉酸から ¹⁴C-メチレン基を持つ 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸が合成され、続いて TrmFO により 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸のメチレン基が tRNA^{Phe} の U の 5 位へメチル基として転移されたことが示唆された。

現在、³²P で内部標識された *T. thermophilus* tRNA^{Ile} 転写産物を用いた *T. thermophilus* S100 中での pm⁵U 形成の確認、ならびにメチル化の行われる最適条件の決定を試みているので、その結果も報告する予定である。