

葉酸依存性 tRNA U54 メチル化酵素 TrmFO の *in vitro* アッセイ法の確立
Establishment of *in vitro* assay system for folate-dependent tRNA U54
methyltransferase TrmFO

山上 龍太¹, 山下 光輝¹, 西増 弘志², 岩下 智香子¹, 平田 章¹, 濡木 理², 堀 弘幸^{1,3}

Ryota Yamagami¹, Koki Yamashita¹, Hiroshi Nishimasu², Chikako Iwashita¹,
Akira Hirata¹, Osamu Nureki², Hiroyuki Hori^{1,3}

(¹愛媛大・院理工 物質生命工学,²東大院・理・生物化学,³愛媛大・VBL)

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

多くの tRNA において U54 の 5 位はメチル化されており、m⁵U54 修飾は tRNA の立体構造の維持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(MTHF)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系は確立されていなかった。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)を加えることで、*in vitro*における TrmFO のアッセイ系を確立し、昨年、報告した。

ところが、このアッセイ系は定量性がやや悪く、酵素反応速度論解析が使いにくい、時間と手間がかかるという欠点があった。そこで、これらの問題点を解決すべく、アッセイ系の改良に取り組んだ。まず、系内の酵素量、基質量を拡大した。次に、フィルターを用いた活性測定方法へ変えた。さらに、¹⁴C-Ser よりも比活性の高い ³H-Ser を用いることで、測定感度を上げた。以上の改良により、簡便で迅速なアッセイ系を構築することができた。そして、そのアッセイ系を用いて、酵素反応速度論解析を行った。

また、TrmFO の tRNA に対する認識部位を同定するために、tRNA 変異体を作製し、活性測定を行ったところ、tRNA の T-arm 部分だけでもメチル基転移が行われることが示唆された。現在、tRNA-T-arm 変異体を作製し、tRNA の認識に重要なヌクレオチドを検討中である。