

*Thermus thermophilus* 由来 dihydrouridine 合成酵素 (Dus) の機能解析

Functional analysis of dihydrouridine **synthetase** from *Thermus thremophilus*

吉田 剛士<sup>1</sup>, 岩崎 絵梨<sup>1</sup>, 栗井 貴子<sup>1</sup>, 富川 千恵<sup>1</sup>, 平田 章<sup>1,2</sup>, 堀 弘幸<sup>1,2</sup>

Takeshi Yoshida<sup>1</sup>, Eri Iwasaki<sup>1</sup>, Takako Awai<sup>1</sup>, Chie Tomikawa<sup>1</sup>, Akira Hirata<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Hori<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>愛媛大・院理工 物質生命工学,<sup>2</sup>愛媛大・VBL)

(<sup>1</sup>Dept. of Materials Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Ehime Univ.,

<sup>2</sup>VBL, Ehime Univ.)

tRNAには様々な修飾塩基が存在し、部位特異性の高い修飾酵素によって転写後に導入されている。修飾塩基はtRNAの立体構造の保持やコドン認識等の機能を担っている。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 50~83°Cで生育する高度好熱性の真正細菌である。高度好熱菌のtRNAでは、20位のウリジン(U20)はDihydrouridine Synthase (Dus)により、ジヒドロウリジン(D20)へと修飾される。大腸菌では三種類のDusがコードされており、それらが分業して働いていると考えられている。しかし、高度好熱菌には、一種類の遺伝子しかなく、実際にどのように修飾が起こっているのか分かっておらず、活性測定の方法も確立されていない。

今回実験を始めるにあたり、高度好熱菌由来 Dus を大腸菌内で大量発現させ、DE52、CM-Toyopearl 650M、Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィにより精製した。精製したDusとNADH、NADPHのみを用いてアッセイを行った。その結果、D formation 活性は確認出来ず、Dusに電子を供与する何らかのタンパク質が、細胞内に存在していることが予想された。次に、*T. thermophilus* 細胞抽出液 S100、S30を反応液として、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTPで内部標識した高度好熱菌由来のtRNA<sup>Phe</sup>転写産物、精製したDus、NADH、NADPHを用いて反応させ、ヌクレアーゼP1処理したサンプルの2D-TLC解析により修飾が起こるかどうか確認した。その結果、S100中で、D formation 活性を確認することが出来た。Dusの生体内での機能解析を行うために、Dusの遺伝子破壊株を作成し、HPLCによりDのピークの消失を確認した。

野生株と遺伝子破壊株の50~70°Cにおける生育曲線も確認した。

今後、Dus タンパク質と相互作用するタンパク質が何であるかを調べていく予定である。