

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655156

研究課題名(和文)葉酸依存性RNAメチル化酵素はDNA複製の制御因子なのか

研究課題名(英文) Does the folate-dependent RNA methyltransferase regulate DNA replication?

研究代表者

堀 弘幸 (Hori, Hiroyuki)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20256960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、葉酸依存性RNAメチル化酵素(TrmFO)が、基質である5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸を消費することにより、DNA合成系の制御因子として働くのではないかと仮説を検証しようとするものであった。貧栄養条件下では、高度好熱菌trmFO遺伝子破壊株は、野生株よりも生育速度が速く、野生株の生育速度はチミンやチミジル酸添加により加速した。これらの実験結果は、上記仮説を支持するものであった。そこでさらに、TrmFO、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸合成酵素、チミジル酸合成酵素の細胞内モル比を決定し、試験管内でTrmFOと5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸合成酵素が競合することも確認した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was the validation of our hypothesis, in which the folate-dependent RNA methyltransferase (TrmFO) regulates the DNA synthesis via consumption of 5, 10-methylenetetrahydrofolate. Under nutrient-poor condition, the trmFO gene disruptant strain of extreme-thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*, grew faster than the wild-type strain. The slow growth of wild-type strain was accelerated by addition of thymine or thymidilate. These results supported the hypothesis. Furthermore, we determined the molecular ratio of TrmFO, 5, 10-methylenetetrahydrofolate synthase and thymidilate synthase. Our in vitro experiment revealed that TrmFO and thymidilate synthase compete each other via consumption of 5, 10-methylenetetrahydrofolate.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA RNA modification methylation DNA synthesis folate enzyme thermophile

1. 研究開始当初の背景

葉酸依存性 tRNA メチル化酵素 (TrmFO) は、2005 年に発見された比較的新しい酵素である。多くの RNA メチル化酵素が、S-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体とするのに対し、この酵素は例外的に、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をメチル基供与体とする。生体内で、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸を代謝する主要な反応として、TrmFO による tRNA のメチル化以外に、チミジル酸 (dTMP) の合成が知られている。チミジル酸合成酵素 (ThyX) によるチミジル酸合成は、DNA 合成全体の律速反応であることが知られている。

TrmFO は、多くの真正細菌 (すべてのグラム陽性菌と一部のグラム陰性菌) が保持しているが、ヒトを含めた動植物は保持していない。TrmFO を保持している真正細菌には、破傷風菌、レンサ球菌など多くの感染性細菌が含まれていることから、TrmFO は抗菌剤開発の有力な標的タンパク質の一つとなっている。

2009 年、研究代表者らは高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の TrmFO の X 線結晶構造解析に成功し、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌にその成果を発表した。しかしながら、TrmFO の定量的な酵素活性測定法はなく、その機能の詳細は未解明の問題であった。また、高度好熱菌の *trmFO* 遺伝子破壊株を作成したところ、高温環境下で、この破壊株の生育は野生株より早く、もしかしたら、tRNA のメチル化システムが DNA 合成系とリンクしているのではないかとこの本研究の着想を与えた。さらに、研究代表者らの一連の研究により、高度好熱菌の tRNA 修飾酵素と修飾ヌクレオシドはネットワーク (カスケード) を構成し、温度変化に応じて、tRNA 中の修飾ヌクレオシドの含有量や種類を変化させることが知られている。しかしながら、研究開始当初は、TrmFO によってもたらされる m⁵U54 修飾が、このネットワーク上でどこに位置し、どのような生理機能を担っているのかは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、TrmFO が基質であるメチレンテトラヒドロ葉酸を奪うことにより、DNA 複製系に影響を及ぼしているのではないかとこの仮説を検証することを最終目標とした。

この目標を達成するためには、定量的な TrmFO の活性測定法を開発する、TrmFO の tRNA 認識機構を明らかにする、*trmFO* 遺伝子破壊株の表現型を調べ、tRNA 修飾ネットワーク上での機能を明らかにするなどの課題をクリアする必要があった。

3. 研究の方法

研究計画は、3 年計画とした。

非常に幸運なことに、初年度に定量的な TrmFO の活性測定法の開発に成功した。この

活性測定法は、不安定な 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸を、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) の作用により、反応系内で合成・供給するシステムである。この活性測定法は、従来法に比べて、1000 倍近く感度が高く、かつ、多検体を処理することができる。すなわち、反応速度論分析や阻害機構分析が可能となった。初年度は、この活性測定法を駆使し、かつ蛍光分析、ゲルシフトアッセイ法などを併用して、TrmFO の tRNA 認識機構の詳細を調べることができた。この研究成果を国際的学術誌 (発表論文(1)) に発表することができたので、研究計画を 3 か月前倒しして、TrmFO、SHMT、チミジル酸合成酵素 (ThyX) を抗原としてポリクローナル抗体の作成に入った。

2 年目には、野生株と *trmFO* 遺伝子破壊株の比較実験に着手した。まず、最初に着手したのは、TrmFO が tRNA 修飾ネットワーク (カスケード) 上でどこに位置し、どのような機能を持っているのかを解明することであった。種々の温度で培養した野生株と *trmFO* 遺伝子破壊株から tRNA を単離し、その修飾頻度を分析した。また、タンパク質合成系への影響も調べた。その結果、TrmFO によってもたらされる m⁵U54 修飾は、Gm18、m²G6、m¹A58 修飾を制御し、タンパク質合成系の低温適応に必要であることが判った。これらの実験では、栄養豊富な培地を使用していたが、葉酸やアミノ酸の供給量が TrmFO と ThyX の消費量を上回ってしまうことも判った。すなわち、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸の細胞内循環 (再生) 経路からの補給量以上に外部からの供給量が多い条件では、遺伝子破壊株と野生株の間に明確な差異を見出せず、DNA 合成系とのリンクを解析することが困難なことが判明した。そこで、幾つかの培地を試し、葉酸およびアミノ酸供給量がぎりぎり生存可能なレベルを探し、ほぼ 3 か月かけて、最適な培養条件を探り当てることができた。

3 年目には、この貧栄養下で *trmFO* 遺伝子破壊株と野生株の生育速度を比較した。その結果、貧栄養下では、至適温度でも、*trmFO* 遺伝子破壊株のほうが野生株よりも生育が速いことが判った。そこで、チミジン、チミジル酸を培地に添加してみたところ、野生株の生育遅滞が解消されることが判った。これらの結果は、目的としていた仮説を支持する結果である。そこでさらに、同位体セリンを基質にし、tRNA のメチル化と DNA 合成に消費されるメチレンテトラヒドロ葉酸の量を測定してみたところ、2:5 の割合であることが判った。また、細胞内の SHMT、TrmFO、ThyX の量比 (モル比) は、5:1:1.5 であり、この割合で各酵素が存在した場合、テストしたすべての条件で、TrmFO と ThyX がメチレンテトラヒドロ葉酸を奪い合うことが判った。すなわち、研究の最終目標とした仮説を支持する結果が得られた。

4. 研究成果

3 の研究の方法欄に、実験結果の一部を記述したので、なるだけ重複を避けつつ記載する。本研究では以下のことを明らかにすることができた。

- (1) TrmFO は tRNA の U54U55C56 配列および G53-C61 塩基対を認識する。
- (2) tRNA 上に A38 配列がある場合は、TrmFO がアンチコドンループを認識し、誤ってメチル化するのを防ぐ。
- (3) TrmFO と tRNA の相互作用（結合と解離速度）は極めて速く、これが反応速度分析で親和性が低いかなのようなパラメーターを与える。
- (4) *trmFO* 遺伝子破壊株は高栄養条件下でも、低温環境で生育が悪くなる。
- (5) TrmFO によってもたらされる m⁵U54 修飾は、Gm18、m²G6、m¹A58 修飾を制御し、タンパク質合成系の低温適応に必要である。
- (6) 貧栄養下で、TrmFO は野生株より速く生育し、野生株の生育遅滞はチミジンもしくはチミジル酸の添加で解消される。すなわち、TrmFO が存在した場合、DNA 合成を負に制御する。
- (7) SHMT, TrmFO, ThyX の量比は、5:1:1.5 であり、定常期には TrmFO の割合が若干増加する。この割合で各酵素が存在した場合、テストしたすべての条件で、TrmFO と ThyX がメチレントラヒドロ葉酸を奪い合う。

(1)~(3)の研究成果は、論文(1)として発表することができた。研究成果(4)~(7)については、国際的学術誌に投稿中であるが、残念ながら、現時点で論文が受理されていない。また、学会発表は未発表データの公開を避け、原則的に発表論文(1)の内容のみにとどめた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) R. Yamagami, K. Yamashita, H. Nishimasu, C. Tomikawa, A. Ochi, C. Iwashita, A. Hirata, R. Ishitani, O. Nureki, and H. Hori, “The tRNA recognition mechanism of folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase (TrmFO).” *J. Biol. Chem.* **287**, 42480-42494 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 山上龍太、嶋 直樹、朝井信一、渡辺公綱、堀 弘幸、”高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における tRNA 修飾ネットワーク上から見た葉酸依存性 RNA メチル

化酵素 TrmFO の存在意義 “、第 15 回極限環境生物学会、沖縄、今帰仁村コミュニティセンター、2014 年 11 月 1 日~3 日

- (2) R. Yamagami, K. Yamashita, H. Nishimasu, C. Tomikawa, A. Ochi, C. Iwashita, R. Ishitani, O. Nureki, and H. Hori, “How does the folate-dependent tRNA (m⁵U54) methyltransferase (TrmFO) recognize substrate tRNA?”, 25th tRNA Conference, ギリシャ、キリニ、オリンピア・オアシス、2014 年 9 月 21 日~25 日
- (3) 山上龍太、嶋 直樹、朝井信一、渡辺公綱、堀 弘幸、”葉酸依存性メチル化酵素 TrmFO の遺伝学的解析 “、第 16 回日本 RNA 学会、名古屋市ウインク愛知、2014 年 7 月 23 日~25 日
- (4) 山上龍太、山下光輝、西増弘志、富川千恵、越智杏奈、岩下智香子、平田 章、石谷隆一郎、瀧木 理、堀 弘幸、”葉酸依存性 tRNA(m⁵U54)メチル化酵素 TrmFO はどうやって tRNA 中の U54 を認識しているのか? “、第 15 回日本 RNA 学会年会、松山市県民文化会館、2013 年 7 月 24 日
- (5) 堀 弘幸 “RNA メチル化酵素の構造と反応機構の多様性”、岐阜大学生命工学科セミナー(依頼講演) 2012 年 11 月 27 日、岐阜県岐阜市岐阜大学
- (6) 堀 弘幸 “RNA メチル化酵素の構造と反応機構の多様性：トポロジカル・ノット型 RNA メチル化酵素発見からの 8 年間”、第 184 回愛媛大学工学部応用化学科セミナー(依頼講演) 2012 年 10 月 30 日、愛媛県松山市愛媛大学
- (7) R. Yamagami, K. Yamashita, H. Nishimasu, C. Iwashita, A. Hirata, O. Nureki, and H. Hori, “Substrate transfer RNA recognition mechanism of tRNA (m⁵U54) methyltransferase (TrmFO) based on the biochemical and structural analysis.”、第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会、兵庫県、高輝度放射光施設 SPring-8・理化学研究所播磨研究所、2012 年 9 月 28 日
- (8) R. Yamagami, K. Yamashita, H. Nishimasu, C. Tomikawa, A. Ochi, C. Iwashita, A. Hirata, R. Ishitani, O. Nureki, and H. Hori, “Transfer RNA recognition mechanism of *Thermus thermophilus* folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase (TrmFO)”, 9th Extremophiles 2012 セビラ、スペイン September 9, 2012
- (9) 山上龍太、山下光輝、西増弘志、富川千恵、越智杏奈、岩下智香子、平田 章、石谷隆一郎、瀧木 理、堀 弘幸 ”サーマス・サーモフィラス由来 tRNA メチル化酵素 TrmFO の基質認識機構”、第 14 回日本 RNA 学会年会、宮城県仙台市東北大学百周年記念会館、2012 年 7 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

愛媛大学・工学部・応用化学科・応用生物化学研究室

<http://www.ach.ehime-u.ac.jp/bchem/>

6．研究組織

(1)研究代表者

堀 弘幸（HORI, Hiroyuki）

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20256960

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし