

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04334

研究課題名(和文) Cys-tRNAの二段階合成反応を触媒する酵素複合体の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of enzyme complexes catalyzing two-step reaction for Cys-tRNA synthesis

研究代表者

田中 勲 (Tanaka, Isao)

北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授

研究者番号：70093052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの塩基配列をもとに蛋白質を合成するには、アミノ酸を転移RNAに正しく結合させる必要があり(アミノアシル化反応)、通常、酵素aaRSがその役割を担う。しかし、メタン生成古細菌では、transsulfursomeと呼ばれる3者複合体(SepRS：SepCysE：SepCysS)が行う。本研究では、X線結晶構造解析法、X線小角散乱法、電子顕微鏡観察、その他の生化学的手法を使い、この系の反応機構を明らかにした。Transsulfursomeは、原始のアミノアシル化システムと考えられている。その機構が解明されたことにより、今後、遺伝暗号誕生に関わる謎の解明が一層進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：For synthesizing a protein from DNA base sequence, it is necessary to correctly bind the amino acid to the transfer RNA (aminoacylation reaction), and usually the enzyme called aminoacyl tRNA synthetase (aaRS) plays its role. However, in methanogenic archaeobacteria, an enzyme complex called transsulfursome (SepRS: SepCysE: SepCysS) does. In this study, the reaction mechanism of this system was clarified using X-ray crystal structure analysis method, X-ray small angle scattering method, electron microscope observation and other biochemical methods. Transsulfursome is thought to be the ancestral aminoacylation system. Therefore, it is expected that this research will go a step further to elucidate the mystery related to the birth of the genetic code in the future.

研究分野：X線構造解析

キーワード：X線結晶構造解析 tRNA修飾 アミノアシル合成酵素

1. 研究開始当初の背景

DNAの塩基配列をもとにタンパク質が作られる仕組み(翻訳)は、地球上のすべての生物に共通している。翻訳を正確に行うためには、最初に20種のアミノ酸のそれぞれを転移RNA(tRNA)分子に正しく結合させる必要があり、アミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)と呼ばれる酵素がその役割を担っている。長い間20種のアミノ酸それぞれに対応して20種のaaRSが存在すると考えられてきたが、最近のゲノム解析により、生物によっては必要とされるaaRSが存在しない場合のあることがわかってきた。メタン生成古細菌のアミノアシルtRNAであるCys-tRNA^{Cys}の合成はその一例であり、この場合、第1の酵素SepRSがリン酸化セリン(Sep)をtRNA^{Cys}に結合させてSep-tRNA^{Cys}を作り、次いで第2の酵素SepCysSが、Sep-tRNA^{Cys}をCys-tRNA^{Cys}へ変換する。我々は、最近、この2つの反応を効率よく進めるためには、第3のタンパク質SepCysEが必要であることを発見した(図1)。

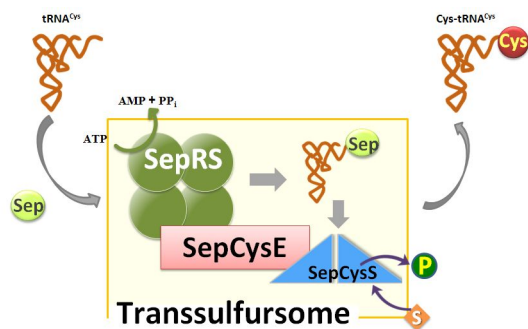


図1. Cys-tRNA^{Cys}の二段階合成

2. 研究の目的

本研究では、これらの3つの蛋白質から成る複合体(transsulfursomeと命名)がどのように相互作用して、最終的にCys-tRNA^{Cys}を合成するか、その分子メカニズムを明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

はじめに、SepRS, SepCysS, SepCysE及びTranssulfursomeに対するtRNA^{Cys}の結合親和性と化学量論比を明らかにし、得られた情報をもとに、TranssulfursomeならびにTranssulfursome-tRNA^{Cys}複合体の結晶を作成することを試みた。得られた結晶を利用して、放射光施設でX線回折データを収集し、その構造を決定した。並行して、小角X線散乱を利用し、溶液中の会合体の解析も行い、また電子顕微鏡を利用して動的挙動を追求した。これらの情報に基づいて変異体を作製し、活性に寄与する残基を特定し、tRNA認識と合成反応機構の検証を行い、Cys-tRNA^{Cys}の二段階合成反応機構を明らかにした。

4. 研究成果

(1)本研究では、SepRSとSepCysEの2成分複合体、及びSepCysE, SepCysS, tRNA^{Cys}の3成分複合体の結晶化に成功し、それらの構造を、X線結晶構造解析法を使って明らかにした。その結果、SepCysEは2つの蝶つがいにつながった3つの領域から構成されており、それぞれの領域が、SepRS, SepCysS, tRNA^{Cys}のそれぞれの分子と結合することが明らかになった(図2)。さらに、X線小角散乱法、電子顕微鏡観察、その他の生化学的研究結果と組み合わせることでSep-tRNA^{Cys}を第1の活性部位から第2の活性部位へ輸送する新しいメカニズムの存在が明らかになった。

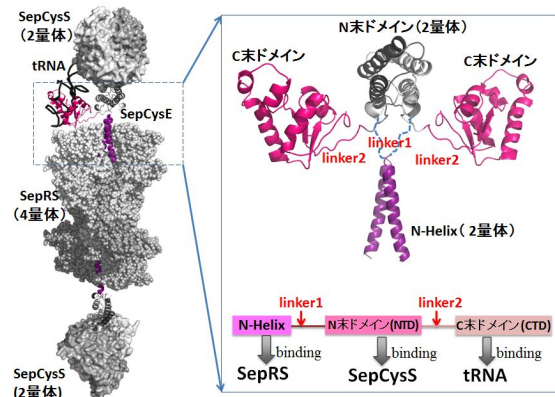


図2. SepCysEの構造とTranssulfursomeモデル

(2) Transsulfursome による Cys- tRNA^{Cys} の間接合成は、分子系統学的研究から、古代の Cys 生合成機構、古代のアミノアシル化機構であると考えられている。今回、transsulfursome の分子メカニズムが解明されたことにより、遺伝暗号に関わる酵素の進化の一端に迫ることができた。今後、地球生命誕生の謎の解明、すなわち遺伝暗号がどのように誕生したのか、その謎の解明が一層進むことが期待される。さらに本研究は、transsulfursome を利用した効率的な Cys 生合成技術の開発、リン酸化セリンをタンパク質の特定の場所に導入する技術の開発など、工業や医薬への応用展開も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Meirong Chen, Koji Kato, Yume Kubo, Yoshikazu Tanaka, Yuchen Liu, Feng Long, William Whitman, Pascal Lill, Christos Gatsogiannis, Stefan Raunser, Nobutaka Shimizu, Akira Shinoda, Akiyoshi Nakamura, Isao Tanaka, and Min Yao, Structural basis for the tRNA-dependent cysteine biosynthesis, *Nature Communications*, 査読有, 8, 1521-1532 (2017)

Meirong Chen, Yuto Nakazawa, Yume Kubo, Nozomi Asano, Koji Kato, Isao Tanaka and Min Yao, Crystallographic analysis of a subcomplex of the transsulfursome with tRNA for Cys-tRNA(Cys) synthesis, *Acta Crystallographica Section F*, 査読有, F, 72, 569-572 (2016)

〔学会発表〕(計 9 件)

姚閔, SAXS 解析による transsulfursome のダイナミクス研究の事例, 第 4 回タンパク質 X 線溶液散乱講習会, 2017 年 12 月 12 日, 高エネルギー加速器研究機構 (茨城県つくば

市)

Meirong Chen, Yume Kubo, Koji Kato, Yoshikazu Tanaka, Isao Tanaka, Min Yao, Structural basis of transsulfursome for Cys-tRNA(Cys) synthesis in indirect pathway, The 4th International Life-Science Symposium (ILSS), 2016 年 11 月 18 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

Meirong Chen, Yume Kubo, Yuto Nakazawa, Nozomi Asano, Koji Kato, Akiyoshi Nakamura, Isao Tanaka, Min Yao, Cys tRNA(Cys) synthesis requires a huge transsulfursome in Methanogenic archaea, The 42nd NAITO CONFERENCE on "in the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences", 2016 年 10 月 4 日~7 日, シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道札幌市)

Meirong Chen, Yume Kubo, Koji Kato, Akira Shinoda, Akiyoshi Nakamura, Isao Tanaka, Min Yao, Structural Basis of Transsulfursome: A Huge Complex Produces Cys-tRNA(Cys) in Methanogenic Archaea, The 26th tRNA Conference, 2016 年 9 月 4 日~8 日, Jeju (Korea)

陳美容, 久保結女, 中澤祐人, 朝野希美, 加藤公児, 中村彰良, 田中勲, 姚閔, Transsulfursome における Cys- tRNA(Cys) 生合成の分子基盤解明, RNA フロンティアミーティング 2016, 2016 年 8 月 31 日~9 月 2 日, ニセコ温泉郷 いこいの湯宿 いろは (北海道ニセコ町)

Meirong Chen, Yume Kubo, Koji Kato, Yoshikazu Tanaka, Isao Tanaka, Min Yao, Multidomain architecture of SepCysE

confers transsulfursome flexibility to synthesize Cys-tRNA(Cys) in two-step indirect pathway, 第 53 回日本生化学会北海道支部例会 日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部 合同シンポジウム, 2016 年 7 月 8 日, 北海道大学工学部 鈴木章ホール (北海道札幌市)

Meirong Chen, Yume Kubo, Yuto Nakazawa, Nozomi Asano, Koji Kato, Akiyoshi Nakamura, Isao Tanaka, Min Yao, Structural basis of cysteine-tRNA(Cys) synthesis in the second step by SepCysS-SepCysE, The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan (RNA2016), 2016 年 6 月 28 日 ~ 7 月 2 日, 京都国際会議場(京都府京都市)

Min Yao, Molecular base of transsulfursome for synthesizing Cys-tRNA(Cys) by indirect pathway, 2016 Taiwan-Japan Joint Symposium of Crystallography -Frontier of Protein Crystallography, 2016 年 6 月 23 日 ~ 24 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

Meirong Chen, Yuta Nakazawa, Yume Kubo, Nozomi Asano, Koji Kato, Yoshikazu Tanaka, Min Yao, SepCysE possesses non-specific tRNA binding domain, 2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ・第 7 回 M L F シンポジウム・第 3 3 回 P F シンポジウム, 2016 年 3 月 15 日-16 日, 筑波国際会議場 (つくば市)

〔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

北海道大学 X 線構造生物学研究室 ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 勲 (TANAKA Isao)

北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授

研究者番号 : 70093052

(2)研究分担者

姚 閔 (YAO Min)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号 : 40311518