

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18498

研究課題名(和文) tRNAスプライシングにおける多機能性tRNAリガーゼの分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism elucidation of multifunctional tRNA ligase in tRNA splicing

研究代表者

加藤 公児 (Kato, Koji)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：30452428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Trl1リガーゼドメイン(Trl1-LD) - GMP複合体の構造を2.75オングストローム分解能で決定した。Trl1-LDの活性中心付近に2分子のGMPがスタックして結合していた。その複合体構造を詳細に解析した結果、2分子のGMPの周辺には塩基性のアミノ酸が集中していた。このことから、これらのGMPはライゲーション過程のtRNAエキソンをミミックしているものと考えられた。これによりTrl1-LDのtRNAの結合様式を類推することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Crystal structure of Trl1 ligase domain (Trl1-LD) - GMP complex was determined with 2.75 angstrom resolution. Two molecules of GMP were stacked and bonded near the active center of Trl1-LD. As a result of detailed analysis of the complex structure, basic amino acids were concentrated around two molecules of GMPs. From these facts, it was considered that these GMPs are mimicking tRNA exons in the ligation process. Based on this structure, it was possible to infer the binding mode of tRNA of Trl1-LD.

研究分野：構造生物学

キーワード：tRNAスプライシング X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

翻訳過程において、tRNA がリボソーム上までアミノ酸を運搬することで正常なタンパク質合成が行われる。tRNA は 5'側のリーダー配列と 3'側のトレーラー配列を含む前駆体として転写され、これら延長配列のトリミングや、3'末端 CCA 配列の付加、ヌクレオチドの修飾等を受けて成熟化する。tRNA の成熟体は約 76 塩基と短い RNA ながら、その約 2 割の遺伝子にはイントロンを含む。古細菌と真核生物の tRNA のイントロンには共通した特徴が見られ、そのスプライシングは mRNA のそれと違い、全てタンパク質性の酵素によって触媒される。この反応はまず、Endonuclease により tRNA 前駆体に含まれるイントロンが切除され、多機能性 tRNA ligase による 5'-エキソン、3'-エキソン間のライゲーションが起こり、最後にリン酸基転移酵素による残った 2'-PO₄ の除去により終結する (図 1)。この過程において、イントロン除去反応及びエキソン結合反応のいずれも tRNA が正しく折りたたまれていることが条件であり、このスプライシング反応は tRNA 生産の品質管理を担っていると考えられる (1)。

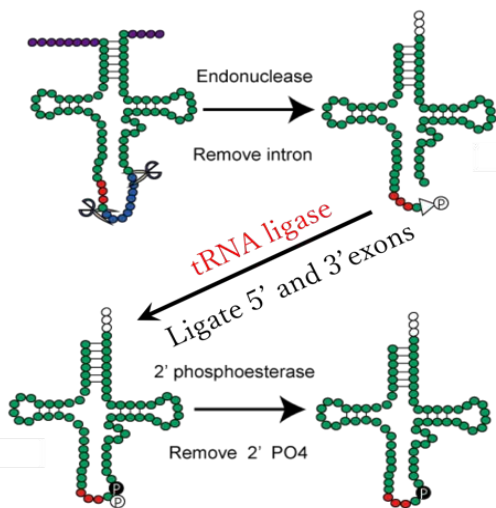


図 1 tRNA splicing の反応経路

tRNA スプライシングにおける tRNA のライゲーションは複雑な化学反応によって制御されており、酵母において、多機能 tRNA リガーゼ (Trl1) がこの反応を司る。Trl1 は 5'-エキソンの 2',3'-環状ホスホジエステル基を開裂する環状ホスホジエステラーゼ (CPDase) ドメイン、3'-エキソンの 5'-OH 基を GTP 依存的にリン酸化するポリヌクレオチドキナーゼ (キナーゼ) ドメイン、この 5'-リン酸基に ATP 由来の AMP を転移させ、これを脱離基として 5'-エキソンの 3'-OH との間にホスホジエステルを形成するアデニル酸合成酵素(リガーゼ)ドメインの三つの酵素活性ドメインを持つ (図 2) (2)。

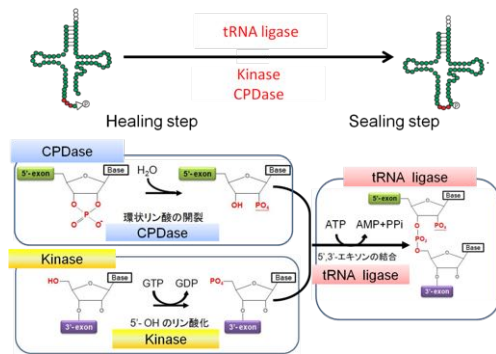


図 2 ライゲーション反応経路

Trl1 の 3 つの機能ドメインに対するそれぞれの類縁酵素の構造解析がなされており、ライゲーション過程における個々の 3 つの反応機構は提案されている。しかしながら Trl1 とその類縁酵素とのアミノ酸配列の相同性は低く (12-20%)、Trl1 の立体構造を予測することは困難であった。また Trl1 がライゲーションしなければならない tRNA エキソンをどのように認識するのか、さらに 3 つの機能ドメインが如何に協調し秩序だててライゲーション反応を進めるのかは、解明されていない。

最近、申請者らは Trl1 のリガーゼドメイン (Trl1-LD) 単独での X 線結晶構造解析に成功し、その構造を明らかにした (図 3)。活性中心の周辺は、これまでに構造解析されている類縁酵素 T4RNA リガーゼ (Rnl1) と一部保存されていた。しかし興味深いことに Trl1-LD の活性中心のリジン残基にはライゲーション反応に重要な AMP が共有結合しており、活性化中間体の構造であった。さらに tRNA 認識部位は Rnl1 とは大きく異なっており、ライゲーション活性測定や相互作用解析の結果から、これまでに知られている tRNA の認識機構とは異なることが示唆された。

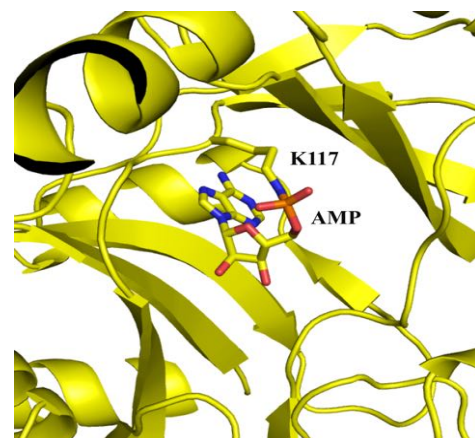


図 3 申請者らが解析した Trl1-LD1 の構造

<引用文献>

1. Johannes J., et. al (2012) *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 2657
2. Li K. W., et al (2015) *RNA* **11**, 966

2. 研究の目的

真菌や植物に共通する tRNA スプライシングのライゲーション反応機構は、これまで Trl1 の3つの機能ドメインそれぞれの類縁酵素のみによって議論されており、3つの機能ドメインを含む Trl1 全体による反応機構は一切解明されていない。本研究では、より正確なライゲーション反応経路の構造的知見を得るため、Trl1 の各機能ドメイン及び Trl1-tRNA エキソン複合体を X 線結晶構造解析により解明し、構造をもとに変異体を使った機能解析を行い、この分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Trl1 各ドメイン及び全長と tRNA エキシソンの結合親和性解析

Trl1 各ドメイン及び全長は、His タグを融合した目的のタンパク質を Ni-アフィニティークロマトグラフィーで精製後、ヘパリンクロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーで精製することにより、大量かつ高純度で目的タンパク質を得る。

tRNA 前駆体(97塩基)は T7 RNA Polymerase を用いた *in vitro* transcription により大量調製し、高速液体クロマトグラフィーシステムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーで精製を行う。tRNA イントロンの除去に用いる Endonuclease は、His タグを融合した目的のタンパク質を Ni-アフィニティークロマトグラフィーで精製することにより粗酵素を調製する。調製した tRNA 前駆体を Endonuclease 処理することにより、エキソンとイントロンを切断し、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにより分離する。

これらのサンプルを用いてゲル濾過クロマトグラフィー及び Urea-PAGE を行い、Trl1 各ドメイン及び全長と tRNA の相互作用解析を行う。その結果に基づいて、各タンパク質と tRNA の安定複合体を得る。

(2) Trl1 各ドメイン、全長、及び tRNA エキシソンの複合体の結晶化

得られた単体のタンパク質と tRNA 安定複合体について、結晶化条件の探索を行う。結晶化の初期スクリーニングは市販のキットを用いた約 2000 条件で行う。良質な単結晶が得られた場合には、シンクロトロン放射光施設にてクライオ条件下で X 線回折実験を行う。そのための予備実験は、当研究室に既存の X 線回折装置を使用する。構造因子の初期位相の決定には、類縁酵素の構造情報はアミノ酸相同性が低く分子置換法を適用できない (Trl1-LD の位相決定には Se-SAD 法を用いた)。そのため、Se-Met をタンパク質に導入する Se-SAD 法もしくはシステイン、メチオニンの持つ硫黄原子の異常分散効果を利用した S-SAD 法により初期位相を求め、構造を決定する。

(3) Trl1-LD と核酸複合体の構造解析

Trl1-LD と核酸複合体の構造解析に向けて、Trl1-LD と 1-10mM の濃度の GMP との共結晶化または Trl1-LD 単体結晶への 1-10mM の濃度の GMP の浸漬 (ソーキング) を行うことにより、Trl1-LD と GMP 複合体結晶を作成する。良質な単結晶が得られた場合には、シンクロトロン放射光施設にてクライオ条件下で X 線回折実験を行う。そのための予備実験は、当研究室に既存の X 線回折装置を使用する。構造因子の初期位相の決定には、既に構造決定している Trl1-LD アポ体の構造をサーチモデルとして分子置換法を使用し、構造を決定する。

4. 研究成果

(1) 相互作用解析

Trl1-tRNA 複合体の構造解析に向けて、Trl1 各ドメイン及び全長と tRNA エキシソンの相互作用解析を行った。Trl1 各ドメイン及び全長と tRNA エキシソンを個別に調整し、*in vitro* で混合したのちにゲル濾過クロマトグラフィーを行い、その溶出位置の比較と SDS-PAGE、Urea-PAGE により、複合体形成の有無を確認した。その結果、Trl1 全長と Trl1-LD のみ tRNA エキシソンと複合体を形成することが確認された (図4)。その他の CPDase (Trl1-CD)、キナーゼドメイン (Trl1-KD) は、Trl1-LD と比較して tRNA エキシソンとの相互作用が弱く、全長の Trl1 では Trl1-LD の補助的な相互作用を必要とし、それぞれの酵素活性を発揮しているのではないかと考えられる。

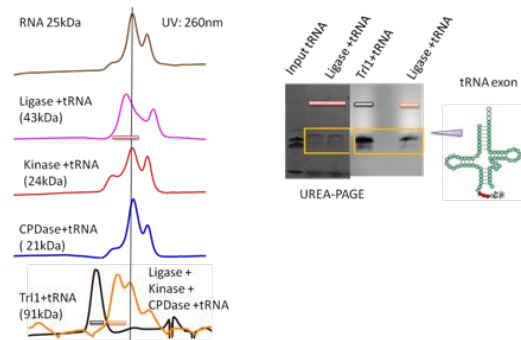


図4 Trl1 各ドメイン及び全長と tRNA エキシソンの相互作用解析。

ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムと複合体のピークの Urea-PAGE を示す。

(2) 結晶化と X 線回折実験

Trl1 キナーゼドメイン (Trl1-KD) と Trl1 CPDase ドメイン (Trl1-CD) の単体での構造決定に向けて、それぞれのサンプルについて結晶化を最適化することによって、Trl1-KD については 2.9Å 分解能のデータを収集すること

に成功した。また Trl1-CD については再現性のある結晶化条件を決定でき、分解能 10Å 程度の回折点を確認している (図 5)。

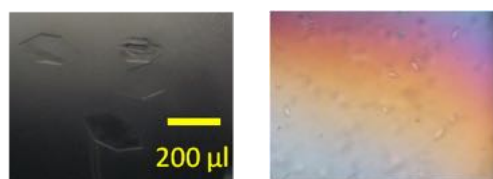


図 5 Trl1-KD と Trl1-CD の結晶

また Trl1-tRNA 複合体の構造解析に向けて、Trl1-tRNA 複合体の大量調整し、結晶化を試みた。相互作用解析の結果、Trl1 全長と Trl1-LD のみ tRNA エキソンと安定な複合体を形成することが確認されたため、精製した Trl1 全長、及び Trl1-LD と *in vitro* で転写した tRNA エキソンを混合しゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、それぞれの複合体を高純度で大量に調整した。それらのサンプルを用いて、それぞれについて約 2000 条件で結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。一般的に tRNA は構造が柔軟であり、結晶化が困難である場合が多い。Trl1-tRNA 複合体においても、tRNA の柔軟性が結晶が析出しなかった原因の 1 つであると考えられる。

(3) Trl1-LD と GMP 複合体の構造解析

前述のように Trl1 全長、及び Trl1-LD と tRNA エキソン複合体の結晶が得られなかったため、既に構造が得られている Trl1-LD と 1-10mM GMP との共結晶化または Trl1-LD 単体結晶への 1-10mM GMP ソーキングによって Trl1-LD と核酸の複合体の構造解析を試みた。その結果、10mM GMP をソーキングした結晶において、2.75 オングストローム分解能で構

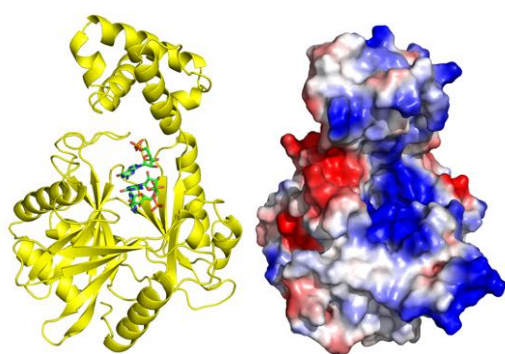


図 6 Trl1-LD-GMP 複合体 (左) と Trl1-LD の表面電化分布図 (右)。

Trl1-LD-GMP 複合体において、活性中心のリジン残基に共有結合した AMP と今回決定した GMP をスティック表示で示した。表面電化分布図は Trl1-LD-GMP 複合体と同じ配向で示す。

造解析可能な X 線回折強度データを収集することに成功し、構造を決定することができた (図 6)。決定した構造には Trl1-LD の活性中心付近に 2 分子の GMP が結合しており、その GMP と相互作用しているアミノ酸、及びその周辺には塩基性のアミノ酸が集中していたことから、これらの GMP はライゲーション過程の tRNA エキソンをミミックしているものと考えられた。これにより Trl1-LD の tRNA の結合様式を類推することが可能となった。現在、本研究で得られた成果を取りまとめた論文を準備している。

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)

[学会発表] (計 1 件)

1、鈴木稚菜、陳美容、村井綱二、加藤公児、姚関

「真菌 tRNA リガーゼ (Trl1) の反応機構解明」
第 17 回日本蛋白質科学会年回
2017 年

[その他]

北海道大学 X 線構造生物学研究室ホームページ (tRNA 成熟に関連する酵素の研究)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 公児 (KATO Koji)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教
研究者番号：30452428

(2) 研究協力者

桜井 直文 (SAKURAI Naofumi)

鈴木 稚菜 (SUZUKI Wakana)