

機関番号：82626
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20687007
 研究課題名（和文） tRNAアンチコドンの転写後修飾における酵素反応機構の分子的基盤解明
 研究課題名（英文） Elucidation of reaction mechanism for post-transcriptional modification at tRNA anticodon region
 研究代表者
 沼田 倫征（NUMATA TOMOYUKI）
 独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員
 研究者番号：10401564

研究成果の概要（和文）：グルタミン酸、グルタミン、リジンの tRNA のアンチコドン 1 文字目のウリジンは、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンに修飾されている。この修飾は正しいコドンの認識に不可欠であり、忠実な蛋白質合成を可能にしている。ウラシル塩基 5 位のカルボキシメチルアミノメチル化修飾には、二種の酵素（GidA と MnmE）が関与する。本研究では、GidA と MnmE の結晶構造を決定し、立体構造に基づいた変異体解析と併せ、新規な反応モデルを提唱した。

研究成果の概要（英文）：The uridine at the first position of the tRNA anticodon (U34) in tRNA^{Glu}_{UUC}, tRNA^{Lys}_{UUU}, tRNA^{Gln}_{UUG} is modified to 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine (cmnm⁵s²U), which is crucial for the precise decoding of the genetic code. In eubacteria, two conserved proteins, GidA and MnmE, are responsible for adding the cmnm⁵ group to the 5-position of U34. Here we report the crystal structures of GidA and MnmE. Together with the mutational study, we propose a novel mechanism for the cmnm⁵U modification process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：tRNA、転写後修飾、RNA 修飾酵素、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の発現過程において、mRNA 上のコドンは tRNA を介して対応するアミノ酸へと

翻訳される。つまり、tRNA はコドンというヌクレオチド配列の情報をアミノ酸配列の情報に変換するためのアダプター分子として

機能している。従って、遺伝情報を正確に発現させるためには、tRNA アンチコドンが対応するコドンのみを忠実に認識する必要がある。tRNA によるコドンの認識は、コドン-アンチコドン間の塩基対の形成により遂行されるが、その際、tRNA のアンチコドン領域に存在する修飾ヌクレオシドが、正確なコドンの認識に重要な役割を果たす。特に、tRNA のアンチコドン1文字目に存在する修飾ヌクレオシドは、コドン第三塩基と対合することから、コドンの縮重（揺らぎ）と密接に関わっている。本研究では、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応する tRNA のアンチコドン1文字目に存在する5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン修飾に関わる酵素の構造機能解析を行った。

グルタミン酸、リジン、グルタミンに対応するコドン (Glu:GAAとGAG, Lys:AAAとAAG, Gln:CAAとCAG) では、コドン第三塩基がAもしくはGである。従って、これらのコドンを正確に解読するためには、tRNAアンチコドンがコドン第三塩基にプリン環を持つコドンのみを認識し、逆にピリミジン環を持つコドンを排除する必要がある。このプリン環特異的認識を可能にするのが、tRNAアンチコドン1文字目のウリジン(U34)の5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン (cmnm⁵s²U)修飾である。つまり、cmnm⁵s²Uは遺伝情報を正確に発現させるために不可欠な修飾である。cmnm⁵s²Uは、ウラシル塩基5位がカルボキシメチルアミノメチル化、また、2位が硫黄化された複雑な化学構造を有する。これまでに我々は、ウラシル塩基2位の硫黄化修飾に関して、硫黄化修飾酵素MnmAの構造解析および機能解析から、tRNAに硫黄が導入される仕組みを明らかにしている。一方、ウラシル塩基5位のカルボキシメチルアミノメチル化修飾には、二種の酵素 (GidAとMnmE)

が関与する。両酵素は複合体を形成することが知られており、さらに、葉酸 (THF) 化合物由来の炭素原子とグリシンがカルボキシメチルアミノメチル基の骨格を形成することが推定されていた。しかしながら、その詳細な修飾反応メカニズムについては理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、GidA と MnmE の X 線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析から、カルボキシメチルアミノメチル化修飾反応における両酵素の役割と酵素反応機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

GidA および MnmE の大腸菌内における大量発現系を構築し、各種クロマトグラフィーを用いた精製スキームを確立した。精製した酵素を用いて結晶化条件をスクリーニングし、GidA と MnmE それぞれ単独の結晶を得た。GidA については単波長異常分散法によって、一方、MnmE については分子置換法によって結晶構造を決定した。全ての X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の大型放射光施設 Photon Factory にて行った。

4. 研究成果

(1) GidA にはフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) が補酵素として結合しており、変異体解析と併せ FAD のフラビン環結合部位周辺が GidA の活性部位であることが明らかとなった。FAD 結合部位近傍には種間で高度に保存されたシステイン (Cys48) が存在していた。Cys48 をセリンに置換した変異体を作製し、*gidA* 欠損大腸菌変異株を用いた *in vivo* 相補実験から、Cys48 がカルボキシメチ

ルアミノメチル化反応において触媒残基として機能することを明らかにした。

カルボキシメチルアミノメチル化反応には GidA および MnmE が関与し、両酵素は複合体を形成することが報告されている。しかしながら、tRNA が両酵素とそれぞれ相互作用するのか、また、どちらか一方の酵素のみと特異的に相互作用するのかは明らかではない。そこでゲルシフト解析を行ったところ、tRNA が GidA と強固に相互作用することが明らかとなり、GidA と MnmE が形成する複合体において、GidA が主に tRNA との結合に関わることを示唆した。GidA には活性部位を中心とした広範な塩基性領域が存在しており、変異体解析から、この塩基性領域が tRNA との結合に関わるということが明らかとなった。これらの結果から、修飾反応過程において tRNA のアンチコドン一文字目のウリジンが、触媒に関わる Cys48 の近傍に配置されることが予想され、GidA がチミジル酸合成酵素と類似の反応メカニズムでウリジンの 5 位を修飾することを示唆した。

(2) MnmE は三つのドメイン (N 末端ドメイン、ヘリカルドメイン、GTPase ドメイン) から構成されており、N 末端ドメインを介して二量体化することが明らかとなった。立体構造の相同性から、MnmE の二量体化した N 末端ドメインの構造は、THF 結合モジュールと類似することが明らかとなった。構造を詳細に解析した結果、N 末端ドメイン同士が会合する分子境界付近に、深いクレフトが形成されており、そのクレフトに強い電子密度が観察された。N 末端ドメインが THF 結合モジュールと類似していること、さらに、カルボキシメチルアミノメチル化修飾には THF 誘導体が炭素源として利用されることを考慮すると、この電子密度の正体がカルボキシメチルア

ミノメチル化修飾に利用される THF 化合物であることが推定された。そこで、質量分析法によって、MnmE に結合している化合物を解析したところ、5,10-メチレン THF 及びその分解産物である THF が検出された。これらの結果より、カルボキシメチルアミノメチル化修飾には 5,10-メチレン THF が基質として利用されることを示唆した。また、MnmE の結晶を 5,10-メチレン THF を含む溶液に浸潤させ、複合体の結晶構造を決定するとともに、*mnmE* 欠損大腸菌変異株を用いた *in vivo* 相補実験から、5,10-メチレン THF 近傍に位置する保存されたリジン残基が、カルボキシメチルアミノメチル化修飾に不可欠であることを示した。

(3) これまでに、カルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる GidA と MnmE は複合体を形成すること、また最近になって、カルボキシメチルアミノメチル基の骨格は 5,10-メチレン THF 由来のメチレン炭素とグリシンから構成されることが報告されている。しかしながら、如何にして tRNA アンチコドン 1 文字目のウリジンに、このような非常に複雑な側鎖を導入しているのかといった機構は明らかではない。本研究における GidA と MnmE の構造機能解析から、(i) 主に GidA が tRNA との相互作用に関わること、(ii) GidA の触媒部位においてチミジル酸合成酵素と類似の反応メカニズムでウリジンの 5 位を修飾すること、(iii) MnmE に 5,10-メチレン THF が結合することが明らかとなっている。これらの結果から、(a) MnmE がカルボキシメチルアミノメチル基前駆体を合成すること、(b) カルボキシメチルアミノメチル基前駆体が GidA の活性部位に輸送されること、(c) GidA によって活性化された U34 にカルボキシメチ

ルアミノメチル基前駆体が取り込まれ修飾反応が完了するという新規な反応モデルが推定された。

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3件)

- ① 【査読有】 Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T. and Suzuki, T. Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.*, 6, 277-282 (2010).
- ② 【査読有】 Osawa, T., Ito, K., Inanaga, H., Nureki, O., Tomita, K. and Numata, T.* Conserved cysteine residues of GidA are essential for biogenesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine at tRNA anticodon. *Structure* **17**, 713-724 (2009).
*: Corresponding author
- ③ 【査読有】 Osawa, T., Inanaga, H. and Numata, T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the tRNA-modification enzyme GidA from *Aquifex aeolicus*. *Acta Crystallogr. Sect. F* **65**, 508-511 (2009).
*: Corresponding author

[学会発表] (計6件)

- ① 大澤拓生、寺坂尚紘、木村聡、鈴木勉、沼田倫征 「アーキアtRNA^{11e}のアンチコドン領域に見られる新規RNA修飾塩基の生合成機構解明」第34回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、福岡、

2010年9月

- ② 大澤拓生、稲永英子、沼田倫征 「tRNA揺らぎ塩基の5-カルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる酵素GidAおよびMnmEの構造機能解析」第10回日本蛋白質科学会年会、札幌、2010年6月
- ③ 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNA揺らぎ塩基の5-カルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる酵素MnmEの結晶構造解析」第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月
- ④ 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNAアンチコドンの修飾に関わる酵素GidAにおいて保存されているシステインは5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン生合成に不可欠である」第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月
- ⑤ 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNA揺らぎ塩基の修飾に関わる酵素の構造機能解析(1)」日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009年3月
- ⑥ 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNA揺らぎ塩基の修飾に関わる酵素の構造機能解析(2)」日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009年3月

[図書] (計1件)

- ① 「第4章 生命現象の理解に迫る構造生物学研究、4.3 翻訳」
富田耕造、沼田倫征
入門 構造生物学 -放射光 X線と中性子で最新の生命現象を読み解く- 111-119 (2010).
共立出版

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 倫征 (NUMATA TOMOYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・研究員

研究者番号：10401564