

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770079

研究課題名 (和文) 小分子 RNA を含むリボヌクレオプロテイン複合体の機能の構造基盤の解明

研究課題名 (英文) Structure and function of small RNA-protein complexes

研究代表者

西増 弘志 (NISHIMASU HIROSHI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：00467044

研究成果の概要 (和文)：

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* に由来する tRNA メチル化酵素 TrmFO の結晶構造を決定し、TrmFO が葉酸/FAD 依存的に tRNA U54 をメチル化する反応メカニズムを解明した。好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* と *Methanococcus jannaschii* に由来する tRNA 修飾酵素 TYW2 の結晶構造を決定し、TYW2 が S-アデノシルメチオニンの α -アミノ α -カルボキシプロピル基を tRNA imG-14 に転移する反応メカニズムを解明した。

研究成果の概要 (英文)：

We solved the crystal structure of *Thermus thermophilus* TrmFO, providing a structural basis for the folate/FAD-dependent methylation of tRNA U54. We also solved the crystal structure of *Pyrococcus horikoshii* and *Methanococcus jannaschii* TYW2s, providing a structural basis for the S-adenosylmethionine-dependent transfer of the α -amino- α -carboxypropyl group into tRNA imG-14.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質，核酸，結晶構造

1. 研究開始当初の背景

tRNA をはじめとする非コード RNA は遺伝子発現制御に重要で遺伝暗号翻訳から翻訳抑制にいたるさまざまな生命現象に関与する。非コード RNA の多くは転写された後に適切な化学修飾をうけることで機能的分子へと成熟する。

tRNA の U54 は通常 5-メチルウリジン (T54) に修飾されており、T54 は tRNA の構造安定化

に寄与する。古細菌，グラム陰性細菌，真核生物ではメチル化酵素 TrmA が S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体として T54 形成を触媒する一方で，グラム陽性細菌ではフラビン酵素 TrmFO が 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (MTHF) をメチル基供与体として T54 形成を触媒する。しかし，TrmFO が葉酸/FAD 依存的に T54 形成を触媒する反応メ

カニズムは不明だった。

真核生物の tRNA^{Phe} のアンチコドン隣接部位 (37 位) には三環構造を有するワイプトシン yW 塩基が存在し、コドン-アンチコドン対合を補強することで暗号翻訳の正確性を保証している。yW は 5 種の酵素 (Trm5 と TYW1-4) が触媒する連続的な反応で生成される。それらの酵素のうち、TYW2 (tRNA-yW synthesizing enzyme-2) は SAM の α -アミノ α -カルボキシプロピル基 (acp 基) を yW 前駆体である imG-14 の C7 位に転移し、yW-86 塩基を合成する。通常のメチル化酵素と異なり、TYW2 は SAM のメチル基ではなく acp 基を基質に転移するが、その反応メカニズムは不明だった。

Piwi-interacting RNA (piRNA) は生殖細胞特異的に発現する ~30 塩基の非コード RNA で、Piwi サブファミリーの Argonaute タンパク質に結合しトランスポゾン抑制することで生殖細胞の維持に関与する。piRNA の 3' 末端 2' -OH 基は特異的な Pimet メチル化酵素によってメチル化されるが、その分子メカニズムは不明だった。

2. 研究の目的

本研究では非コード RNA が関与する多彩な生理機能を原子レベルで理解することを目的として、非コード RNA を含むリボヌクレオプロテイン複合体の X 線結晶構造解析を目指す。

3. 研究の方法

T. thermophilus に由来する TrmFO を大腸菌で大量発現させ、熱処理、ヘパリンカラム、ゲルろ過カラムを用いて SDS-PAGE で単一になるまで精製した。精製酵素を用いて結晶化スクリーニングを行い結晶を得た後、結晶化条件の最適化を行い、X 線回折実験が可能な大きさの結晶を得た。得られた結晶を用いて放射光施設 SPring-8 と Photon Factory にて X 線回折データを収集し、SeMet 置換体を用いた MAD 法により TrmFO 単体の結晶構造を決定した。さらに、テトラヒドロ葉酸 (THF)、および、還元型グルタチオン (GSH) 存在下で TrmFO を結晶化し、THF、および、GSH との複合体の結晶構造を決定した。*in vitro* 活性測定系を確立し、立体構造情報に基づいた変異体解析を行い、TrmFO が触媒する葉酸/FAD 依存的メチル化反応のメカニズムを解明した。

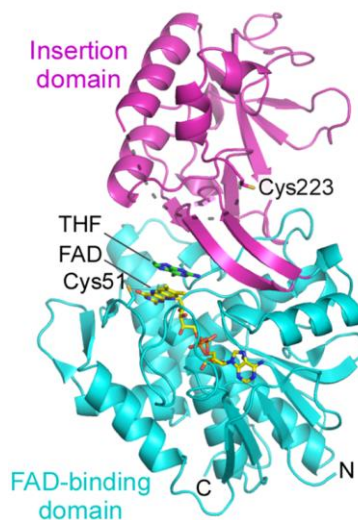
P. horikoshii と *M. jannaschii* に由来する TYW2 を大腸菌で大量発現させ、熱処理、NiNTA カラム、ヘパリンカラム、ゲルろ過カラムを用いて SDS-PAGE で単一になるまで精製した。精製酵素を用いて結晶化スクリーニ

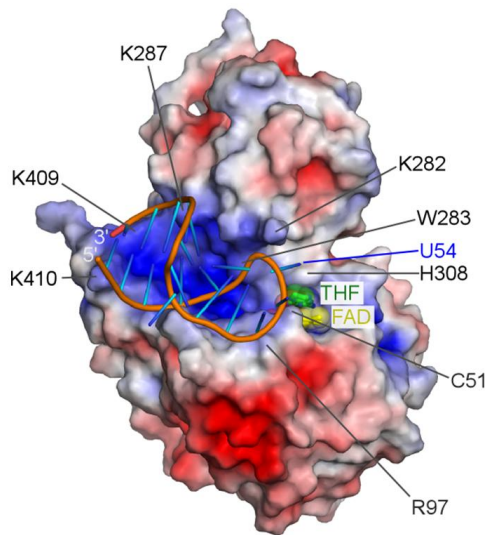
ングを行い結晶を得た後、結晶化条件の最適化を行い、X 線回折実験が可能な大きさの結晶を得た。得られた結晶を用いて放射光施設 SPring-8 と Photon Factory にて X 線回折データを収集し、分子置換法により TYW2 単体の結晶構造を決定した。さらに、SAM 存在下で TYW2 を結晶化し、SAM との複合体の結晶構造を決定した。立体構造情報に基づいた変異体解析を行い、TYW2 が触媒する acp 基転移反応のメカニズムを解明した。

ショウジョウバエに由来する Pimet を大腸菌で大量発現させ、NiNTA、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて SDS-PAGE で単一になるまで精製した。精製酵素を用いて Pimet 単独、SAM 存在下、SAM と一本鎖 RNA 存在下で結晶化スクリーニングを行った。

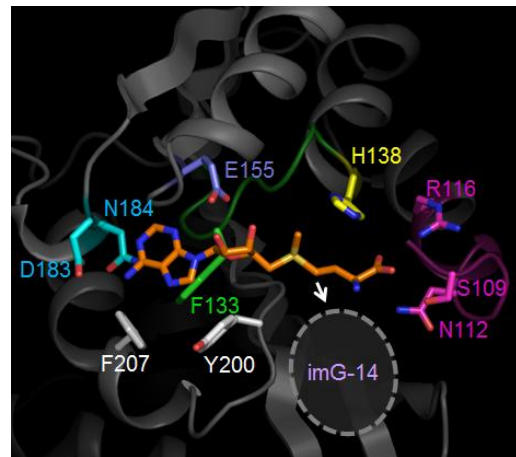
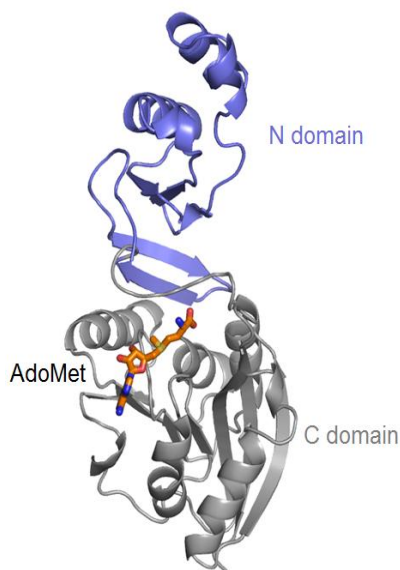
4. 研究成果

T. thermophilus に由来する TrmFO の酵素単体、THF 複合体、GSH 複合体の結晶構造を決定した。TrmFO は FAD 結合ドメインと挿入ドメインの 2 つのドメインからなり (図 1)、ドメイン間に正に帯電したクレフトが存在していた (図 2)。THF 複合体中で THF のプテリジン環は FAD のフラビン環とスタッキング相互作用していた。THF 複合体構造は葉酸/FAD 依存性メチル化酵素で初めての葉酸結合型構造であり、MTHF のメチレン基が FAD の N5 原子の近傍に位置することが示唆された。*in vitro* 活性測定系を用いて、構造情報に基づいた変異体解析を行い、ドメイン間のクレフトが tRNA 結合に重要であることを明らかにした。以上の結果を総合して、MTHF のメチレン基が U54 の 5 位に転移した後に FADH₂ が U54 のメチレン基を還元し T54 が形成されるという反応メカニズムが提唱された。





P. horikoshii と *M. jannaschii* に由来する TYW2 の酵素単体, および, SAM 複合体の結晶構造を決定した. TYW2 の全体構造は通常メチル化酵素と類似していたが (図 3), SAM はメチル基ではなく *acp* 基を基質分子に転移するのに適した向きで TYW2 の活性部位に結合していた (図 4). *M. jannaschii* に由来する Trm5-tRNA 複合体との比較から, TYW2-tRNA ドッキングモデルを構築し, TYW2 の tRNA 認識機構, および, imG-14 認識機構を類推し, 変異体解析を行い, TYW2 に保存されたアミノ酸残基が *acp* 基転移活性と imG-14 認識に重要であることを明らかにした. 以上の結果から, TYW2 が SAM のメチル基ではなく *acp* 基を imG-14 に転移する分子メカニズムが明らかになった.



ショウジョウバエに由来する Pimet の N 末端に His タグを付加して大腸菌で大量発現させ, NiNTA カラム, 陰イオン交換カラム, ゲルろ過カラムを用いて SDS-PAGE で単一になるまで精製し, SAM 存在下, および, SAM と一本鎖 RNA 存在下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. そこで, 生物種間での保存性が低くディスオーダーしていることが予想される C 末端部分を削った種々のコンストラクトを作製し, 大腸菌で発現を検討し, C 末端を~40 残基削った変異体が全長と同様に発現することを見出し, 単一になるまで精製した. 精製した変異体酵素を用いて野生型と同様に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. ショウジョウバエに由来する Pimet に加えて, ヒトやマウスに由来する Pimet, および, ディスオーダー領域が少ないと予想された *Tribolium castaneum* Pimet に関して大腸菌での発現を検討したが, ショウジョウバエに由来する Pimet とは異なり, どれも溶解度が低く精製途中で沈殿した. 以上の結果から, Pimet は分子内の柔軟性が高く結晶化が困難であることがわかった. この内在的な柔軟性が配列と長さが異なる様々な piRNA をメチル化するのに重要なかもしれない.

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 6 件)

① “Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators”

H. Nishimasu, S. Okudaira, K. Hama, E. Mihara, N. Dohmae, A. Inoue, R. Ishitani, J. Takagi, J. Aoki & O. Nureki.

Nat Struct Mol Biol 18, 205-212 (2011)
査読有

② “Crystal structure of a PFU-PUL domain pair of *Saccharomyces cerevisiae* Doal/Ufd3”

R. Nishimasu, H. Komori, Y. Higuchi, H. Nishimasu & H. Hiroaki.

Kobe J Med Sci 56, 125-139 (2010)
査読有

③ “Structural basis of novel interactions between the small-GTPase and GDI-like domains in prokaryotic FeoB iron transporter”

M. Hattori, Y. Jin, H. Nishimasu, Y. Tanaka, M. Mochizuki, T. Uchiumi, R. Ishitani, K. Ito & O. Nureki.

Structure 17, 1345-1355 (2009)
査読有

④ “Structural basis of AdoMet-dependent aminocarboxypropyl transfer reaction catalyzed by tRNA-wybutosine synthesizing enzyme, TYW2”

M. Umitsu, H. Nishimasu, A. Noma, T. Suzuki, R. Ishitani & O. Nureki.

Proc Natl Acad Sci USA 106, 15616-15621 (2009)
査読有

⑤ “Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the truncated cytosolic domain of the iron transporter FeoB”

Y. Jin, M. Hattori, H. Nishimasu, R. Ishitani & O. Nureki.

Acta Crystallogr F 65, 784-787 (2009)
査読有

⑥ “Atomic structure of a folate/FAD-dependent tRNA T54 methyltransferase”

H. Nishimasu, R. Ishitani, K. Yamashita, C. Iwashita, A. Hirata, H. Hori & O. Nureki.

Proc Natl Acad Sci USA 106, 8180-8185 (2009)

査読有

[学会発表] (計4件)

① “Structural basis of AdoMet-dependent aminocarboxypropyl transfer reaction catalyzed by tRNA-wybutosine synthesizing

enzyme, TYW2”

西増 弘志

BMB2010, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド

② “Atomic structure of a folate/FAD-dependent tRNA T54 methyltransferase”

Hiroshi Nishimasu

23rd tRNA workshop

2010年1月29日, ポルトガル, アヴェイロ

③ “葉酸/FAD依存性tRNA U54メチル化酵素 TrmFOの機能と構造”

西増 弘志, 第11回RNAミーティング, 2009年7月28日, 新潟朱鷺メッセ

④ “1.0-Å resolution structure of a new RNA modification enzyme”

Hiroshi Nishimasu

Gordon Research Conferences (RNA editing), 2009年1月12日, アメリカ, テキサス

[図書] (計1件)

① “実験医学増刊 拡大・進展を続けるRNA研究の最先端”

西増 弘志, 濡木 理

羊土社, 2010年, 207ページ (107-113)

[その他]

① “脂質メディエーター産生酵素オートタキシンの結晶構造”

西増 弘志, 青木 淳賢, 濡木 理

ライフサイエンス新着論文レビュー (<http://first.lifesciencedb.jp/>) 2011年2月3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西増 弘志 (NISHIMASU HIROSHI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号: 00467044