

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510242

研究課題名（和文） コドン認識を拡張する修飾塩基の構造生物学的解析

研究課題名（英文） Structural bases for an expanded codon recognition by modified nucleotide.

## 研究代表者

竹本 千重 (TAKEMOTO CHIE)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

研究者番号：40306527

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、tRNA のアンチコドン 1 字目の修飾塩基がアミノ酸受容能の変換とコドン認識能の拡張を担うというユニークな性質を裏付ける構造基盤を得るために、リボソーム上で tRNA が mRNA と塩基対を形成している複合体の X 線結晶構造解析を行うことを目指した。本課題においては、高分解能データが期待できる 70S リボソームの調製法、結晶化条件の絞り込み、ハーベストにおける結晶へのダメージの軽減方法、更に測定実験における高分解能データ収集のためのストラテジーを確立した。

## 研究成果の概要（英文）：

Some modified nucleotides in the first letter of a tRNA anticodon is known to expand the codon recognition ability. I planed to reveal the mechanism based on the three-dimensional structure of the codon-anticodon basepair in the 70S ribosome.

In this study, I have succeeded to establish a reproducible method of 70S ribosome preparation for highly diffracted crystals. Once good crystals are obtained, technical improvements are required in the following steps: refinement of crystallization condition, less damage for crystals during harvesting, and strategy of data collection at an atomic resolution.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	0	0	0
2009 年度	0	0	0
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：リボソーム、X 線結晶構造解析、超分子複合体、tRNA、修飾塩基、コドン認識、Lysidine

## 1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報は、DNA の塩基配列が RNA に転写され、mRNA 上の 3 塩基毎の配列 (コドン) と 1 つのアミノ酸が対応するように、tRNA のアンチコドンによって読み取られ、タンパク質のアミノ酸配列に翻訳されて、その機能を発現する。この転写・翻訳のいずれの反応においても、情報伝達の正確性は、塩基間の特異的な水素結合形成によって実現されている。

4 種のヌクレオチドによって生成する 64 通りのコドンのうち、3 つの終止コドンは翻訳終結因子によって認識され、残り 61 通りは 20 種類のアミノ酸を指定している。コドンとアミノ酸のアダプターの役割を担う tRNA のアンチコドンは、コドンと相補的な水素結合を形成する・対合・が、コドン 3 文字目とアンチコドン 1 文字目の水素結合は、ゆらぎ塩基対と呼ばれる寛容性があるため、1 つの tRNA が、複数のコドンを認識することができる。グアニン(G)は、シトシン(C)だけでなくウリジン(U)とも対合できる。一方、U はアデニン(A)だけでなく、G, U, C 全ての塩基と対合できる可能性があるが、修飾を受けることによって、A または G のみと限定的に対合するようになる。例えば、大腸菌 tRNA<sup>Lys</sup> のアンチコドン UUU の 1 文字目には複雑な構造をもった修飾塩基 mnm<sup>5s</sup>2U (5-methylaminomethyl-2-thiouridine) が存在し、Lys のコドン(AAA, AAG)と対合するが、Asn のコドン(AAC, AAU)とは対合しない。また、アンチコドンの 3'隣接の塩基にも t<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyl-adenine) のような複雑な構造をもつ修飾が入っている。多くの場合、このようにアンチコドンの修飾塩基は、コドン認識の精度を上げる、すなわち対合を制限する働きがある。例外的に、コドン認識を拡張する修飾塩基として、2-lysilycytidine (Lysidine), 5-formylcytidine (f<sup>5</sup>C), イノシン(I)等がある[図 1]。Lysidine (L) と f<sup>5</sup>C は C の修飾塩基であり、イノシンは A の 6 位が脱アミノされた塩基で、AUN (N=A,U,G,C) コドンボックスの読み分けに重要な役割を果たしている。また、アンチコドンに Lysidine の修飾が入ると、AUG から AUA コドンへ認識能が変化するだけでなく、付加されるアミノ酸も Met から Ile に変化する[Ref. 1,2] というユニークな機能を持っている[図 2]。

[Ref. 1] Muramatsu T., *et. al.* "Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification." *Nature* **336**, 179-181, 1998.

[Ref. 2] Soma A., *et. al.* "An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine

tRNA." *Mol Cell* **12**, 689-698, 2003.

## 2. 研究の目的

申請者は最近、牛ミトコンドリア tRNA<sup>Met</sup> は、アンチコドン 1 文字目の修飾塩基 f<sup>5</sup>C によって、AUG と AUA の 2 つのコドンを認識できることを明らかにし、f<sup>5</sup>C-G, f<sup>5</sup>C-A の対合様式を提案した[Ref. 3]。さらに、大腸菌の tRNA<sup>Ile2</sup> (アンチコドン LAU) のコドン認識能を検証し、すでに報告のある AUA に加えて、AUC も認識することを見出した[Supplementary data, Ref. 3]。この結果は、AUU と対合する可能性を示唆している。このように A, U, C と対合できる修飾塩基は、イノシンがあるが、Lysidine は、化学構造が全く異なるだけでなく、Lysidine 自身の立体構造も未解明である。近年、リボソーム小サブユニットの結晶に、アンチコドンとコドンに相当する合成 RNA 断片を挿入した複合体の結晶構造解析が行われ、修飾塩基を含むアンチコドンによる対合様式が報告された[Ref. 4-7]。最も重要な発見は、コドン-アンチコドン塩基対は 3'-stacking (3'側の塩基にスタックした構造)を取るということである。すなわち、通常の本鎖 RNA は 5'-stacking であるのに対し、tRNA のアンチコドンは、特徴的な構造上の制約を受けているのである。例えば、G-U 塩基対の構造は、アンチコドンが G の場合と U の場合で、対合様式が異なることが提案されている[Ref. 4]。

本研究計画では、大腸菌 tRNA<sup>Ile2</sup> を大量精製し、コドン認識能とアミノ酸受容能を検証すると共に、リボソーム上でコドンと塩基対を形成させた複合体の X 線結晶構造解析によって、Lysidine の立体構造を解明し、コドン認識能を拡張するメカニズムの構造的基盤を得たいと考えている。

### (A) 本研究で明らかになること

#### (1) 大腸菌 tRNA<sup>Ile2</sup> の修飾とアミノ酸受容能およびコドン認識能の関係

大腸菌から配列特異的な方法によって大量の tRNA を調製すると、未修飾の塩基を含む tRNA が調製できる。tRNA<sup>Ile2</sup> には、アンチコドンに L と t<sup>6</sup>A、それ以外に 6 種類の修飾塩基がある。精製した tRNA<sup>Ile2</sup> の修飾の度合いを HPLC と質量分析計を用いて詳細に解析することによって、tRNA<sup>Ile2</sup> への塩基修飾に順番があるかどうか明らかになることが期待される。さらに、修飾の状態が異なる tRNA<sup>Ile2</sup> 分子種のアミノ酸受容能とコドン認識能を検証し、それらの相関を明らかにする。

#### (2) Lysidine の立体構造と塩基対合様式の解明

リボソームを tRNA<sup>Met</sup> と AUN コドンを含む短い mRNA と共に結晶化することにより、コドン-アンチコドンの塩基対合の構造を決定する。これによって、修飾塩基 Lysidine の立体構造が明らかになると同時に、A, U, C と同じように水素結合を形成しているのか、あるいは L-A と、L-C または L-U は異なる様式によるものなのかを明らかにすることができる。

(B) 本研究の学術的特色と予想される結果と意義

本研究計画は、伝統的な生化学実験を土台として、質量分析法による微量かつ精度の高い物質同定法と、巨大な RNA-タンパク質複合体であるリボソームの X 線結晶構造解析という物理化学的手法を駆使して、遺伝情報系の正確性を維持するユニークなメカニズムの構造的基盤を得ようとするものである。申請者は、一貫して遺伝情報発現系の研究に取り組んでおり、分子生物学の分野で博士号を取得後、近年は、構造解析の経験を積んでおり、双方の分野の最先端技術を融合させて課題に取り組むことができる。

修飾塩基 Lysidine の立体構造は、ヌクレオシドレベルで NMR 解析など行われているが、複数の可能性があり未解明である。また、この構造解析が成功すれば、修飾塩基が直接塩基対合に関与する初めての報告となる。さらに、tRNA のアミノ酸受容能と遺伝暗号認識という遺伝情報伝達系の 2 つの要のステップに変化をもたらす修飾塩基の構造情報は、遺伝情報系自身の変遷を進化的な視点から考察する際にも、重要な知見となることが期待できる。

[Ref. 3] Takemoto C., *et. al.* "Unconventional decoding of the AUA codon as methionine by mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> with the anticodon f<sup>5</sup>CAU as revealed with a mitochondrial *in vitro* translation system." *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1616-1627, 2009.

[Ref. 4] Weixlbaumer A., *et. al.* "Mechanism for expanding the decoding capacity of transfer RNAs by modification of uridines." *Nat Struct Mol Biol.*, **14**, 498-502, 2007.

[Ref. 5] Murphy FV 4th, *et. al.* "The role of modifications in codon discrimination by tRNA<sup>Lys</sup>UUU." *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1186-1191, 2004.

[Ref. 6] Kurata S., *et. al.* "Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U-G wobble pairing during decoding." *J Biol Chem.*, **283**, 18801-18811, 2008.

[Ref. 7] Murphy FV 4<sup>th</sup> & Ramakrishnan V. "Structure of a purine-purine wobble base pair in the decoding center of the ribosome." *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1251-1252, 2004.

### 3. 研究の方法

まず結晶化に適する 70S リボソームの調製方法を確立する。構造の安定性を考慮して高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリボソームを用いる。基本的には細胞を破碎して、抽出液を超遠心や液体クロマトグラフィー、ショ糖密度勾配遠心で分離する方法しかないが、使用する塩の種類や、精製ステップの順番を変えると結晶の再現性に影響があることは分かっている。実際に結晶に X 線を照射して、回折データを比較することで、精製方法を確立したいと考えている。

tRNA<sup>Met</sup> は、配列特異的に精製する方法を用いて [Ref. 8]、テスト実験で目的の tRNA が精製できることを確認した後、スケールアップを図る。大腸菌 tRNA<sup>Met</sup> の修飾塩基の詳細解析は、連携研究者の東京大学の鈴木健夫助教に依頼する。修飾塩基解析によって複数の分子種が同定された場合は、tRNA<sup>Met</sup> の各分子種のアミノ酸受容能の速度論的解析等を行い、コドン-アンチコドン対合の構造解析の結果と合わせて、コドン認識を拡張する修飾塩基の構造と機能について、生物の生存戦略の視点から合理的な解釈を試みる。

申請者は、本研究計画の他に、リボソームの機能的複合体の構造解析に従事しているので、リボソーム試料のみならず、複合体調製・結晶化・回折実験についての知見やアッセイ系を活用できる。

[Ref. 8] Yokogawa T., *et. al.* "Optimization of the hybridization-based method for purification of thermostable tRNAs in the presence of tetraalkylammonium salts." *Nucleic Acids Res.* **38**, e89, 2010.

### 4. 研究成果

遺伝情報の正確な発現は、核酸塩基間の特異的な水素結合形成によって実現されている。アミノ酸と mRNA 上のコドンを対応させる tRNA 分子には、その精度を保つために修飾塩基が使われている例が多数知られている。大腸菌の tRNA Ile2 は、アンチコドン 1 文字目の C にリジンが導入され、Lysidine になることによって、アミノ酸受容能を Met から Ile に、コドン認識能を AUG から AUA へと変化させる。本研究では、このユニークな性質を裏付ける構造基盤一すなわち、Lysidine が、どのような塩基対を形成するか

を明らかにし、コドン認識能を拡張するメカニズムの構造的情報を得るために、リボソーム上で tRNA<sup>Ile2</sup> がコドンと塩基対を形成している複合体の X 線結晶構造解析を行うことを目指した。

本課題においては、高分解能データが期待できる 70S リボソームの調製方法を確立し、結晶化実験の各段階における検討すべき条件の絞り込み、ハーベストにおける結晶へのダメージの軽減方法の確立、更に測定条件における高分解能データ収集のためのストラテジーを確立した。

(1) リボソーム調製方法：mid-late log phase の菌体を連続式圧力破碎装置に、800-1000bar で 3 サイクルかける。0.5M KCl と 1.1M sucrose を含む緩衝液でリンスした後、疎水クロマトグラフィーとショ糖密度勾配遠心によって精製する。

(2) 結晶化条件：KSCN、PEG20K と 550MME を沈殿剤として用いて、2 種類の PEG の混合比と pH でグリッドにする。

(3) ハーベストは、母液の PEG の濃度が少しずつ上がるように、段階的に時間をかけて行う。

(4) テスト測定で反射がエッジに達している結晶を選別し、最初のイメージから 10 度で反射数が 70%になる程度の dose で測定を行い、複数の結晶を使って、十分な角度のデータを収集する。

## 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹本 千重 (TAKEMOTO CHIE)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

研究者番号：40306527

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

鈴木 健夫 (SUZUKI TAKEO)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90533125