

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687015

研究課題名(和文)ミトコンドリアにおける tRNA プロセッシング機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation for the mitochondrial tRNA processing mechanism

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・主任研究員

研究者番号：10401564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：tRNAのアンチコドン周辺に存在する修飾ヌクレオシドは、遺伝暗号の正確な解読において重要な役割を担っている。また、ミトコンドリアtRNAにおける修飾の欠損はミトコンドリア病の原因となる。本研究では、tRNA修飾機構の解明の一環として、N6-スレオニルカルバモイルアデノシンの環化反応を触媒するtRNA修飾酵素の結晶構造を解析した。さらに、立体構造に基づいた変異体解析とあわせ、触媒反応に重要なアミノ酸残基などを同定した。

研究成果の概要(英文)：Post-transcriptional modifications at the tRNA anticodon loop are essential for precise decoding of the genetic code. The modification defects in mitochondrial tRNA are the main cause of the mitochondrial dysfunction. In this study, I determined the crystal structure of the tRNA modification enzyme, which is responsible for synthesizing the cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenine, as part of elucidating the tRNA modification mechanisms. Together with the structure-based mutational experiments, the amino acid residues crucial for the reaction were also identified.

研究分野：構造生物化学

キーワード：tRNA アンチコドン 修飾ヌクレオシド tRNA修飾酵素 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

転写された後、tRNA は様々な化学修飾を受けことが知られている。特に、tRNA のアンチコドン 1 字目 (34 位) とアンチコドン 3 字目の 3' 側に隣接した部位 (37 位) には多様な修飾ヌクレオシドが確認されている。これらアンチコドン周辺に見られる修飾ヌクレオシドは、正しいコドンの認識を可能にし、遺伝暗号の正確な解釈を保障するという重要な役割を担っている。したがって、tRNA のアンチコドン周辺の修飾が欠損すると、タンパク質合成反応に大きな影響を与えることが知られており、特に、ミトコンドリア tRNA における修飾欠損は、ミトコンドリア病と総称される様々な重篤な疾患の原因となる。よって、tRNA の転写後修飾機構の解明は、基礎科学および医学的な見地からも非常に重要な研究課題である。

2. 研究の目的

本研究では、tRNA の転写後修飾を触媒する酵素や酵素と tRNA との複合体の結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行い、酵素が tRNA を修飾するしくみを原子分解能レベルで解明することを目指している。tRNA には多様な修飾ヌクレオシドが見出されており、本研究では、修飾ヌクレオシドの一つである N⁶-スレオニルカルバモイルアデノシン (t⁶A) の環化反応を触媒する酵素 TcdA の機能構造解析から、本酵素の作動原理の解明を目指した。

t⁶A は、ANN コドンを読み取る tRNA の 37 位に存在する修飾ヌクレオシドで、ほぼ全ての生物に保存されており、tRNA のアミノアシル化やコドンの正確な認識など、タンパク質合成過程において重要な役割を担っていると考えられていた。しかしながら、最近になり、t⁶A はさらに脱水環化されサイクリック t⁶A (ct⁶A) として存在していることが分かり、ct⁶A が遺伝暗号の解釈過程において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。

TcdA は ATP 依存的に t⁶A を脱水環化して ct⁶A を形成する酵素であり、そのアミノ酸配列はユビキチン活性化酵素 E1 とよく類似している。ユビキチン活性化酵素 E1 は ATP を用いてユビキチンの C 末端をアデニル化し活性化する。したがって、TcdA は類似したしくみで t⁶A を活性化すると推定される。しかしながら、TcdA が基質 tRNA を認識するしくみや反応機構などはよく分かっていない。本研究では、ct⁶A の形成機構を解明することを目的に、TcdA の結晶構造を解析し、立体構造に基づき機能解析を行った。

3. 研究の方法

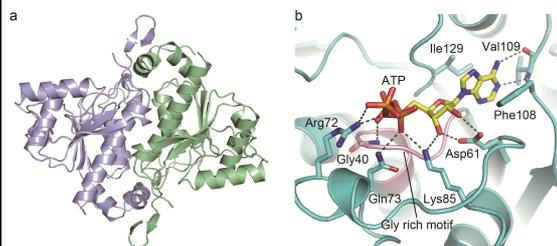
大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を宿主として、TcdA の組換えタンパク質を調製した。得られたサンプルを用いて、結晶化条件をスクリーニングし、TcdA 単独の結晶

を得た。大型放射光施設フotonファクトリーにおいて結晶の X 線回折データを測定した。まず、ユビキチン活性化酵素 E1 をサーチモデルとした分子置換法によって、結晶の位相を決定しようと試みたが、この方法では TcdA の結晶構造を決定することはできなかった。そこで次に、大腸菌 B834(DE3) 株を宿主として、セレノメチオニン標識タンパク質を調製した。ネイティブタンパク質と同様の条件で、セレノメチオニン標識タンパク質の結晶を調製し、単波長異常分散法によって結晶の位相を決定した。最終的に、ネイティブデータを用い、分解能 2.0 Å で TcdA 単独の結晶構造を決定した。続いて、TcdA の結晶を、ATP を含んだリザーバー溶液に浸潤し複合体を形成させ、TcdA-ATP 複合体の結晶構造を分解能 1.9 Å で決定した。

4. 研究成果

構造を解析した結果、TcdA はシングルドメインタンパク質であり、2 量体を形成することが判明した。TcdA の構造は N 末端領域および C 末端領域に分割することができ、N 末端領域はユビキチン活性化酵素 E1 の N 末端側の構造と非常に類似していることが明らかとなった。また、この N 末端側の領域は、ユビキチン活性化酵素 E1 と同様に、TcdA の 2 量体化に関わっている。一方、TcdA の C 末端領域の構造は、ユビキチン活性化酵素 E1 の C 末端領域の構造とは全く類似性を示さなかった。したがって、TcdA は、本酵素に特有の C 末端領域を用いて、基質 tRNA と特異的に相互作用することが推定された。

ATP との複合体の結晶構造を解析した結果、N 末端領域に存在するグリシンリッチモチーフの近傍に ATP が結合しており、ユビキチン活性化酵素 E1 と同じ位置で ATP と相互作用していた。TcdA における ATP の結合様式は、ユビキチン活性化酵素 E1 が ATP を認識するしくみとよく類似していた。したがって、TcdA はユビキチン活性化酵素 E1 と同様、基質 tRNA の目的部位をアデニル化して



活性化することが強く示唆された。

図 1: TcdA の結晶構造。

(a): TcdA の 2 量体構造。

(b): TcdA と ATP との相互作用機構。

ATP と相互作用していたアミノ酸残基に変異を導入し、変異体の活性を測定した結果、ct⁶A の形成活性が大きく低下することが判明し、これらアミノ酸残基の重要性を確認し

た。また、ATP 結合部位以外についても、変異体を作製し、触媒反応に関わる重要なアミノ酸残基を同定した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

【査読有】Osawa, T., Inanaga, H., Sato, C. and Numata, T. Crystal structure of the CRISPR-Cas RNA silencing Cmr complex bound to a target analog. *Mol. Cell*, 58, 418-430 (2015).

DOI: 10.1016/j.molcel.2015.03.018.

【査読有】Osawa, T., Inanaga, H. and Numata, T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the CRISPR-Cas RNA silencing Cmr complex. *Acta Crystallogr. Sect. F*, 71, 735-740 (2015).

DOI:10.1107/S2053230X15007104.

【査読有】Numata, T. Mechanisms of the tRNA wobble cytidine modification essential for AUA codon decoding in prokaryotes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 347-353 (2015).

DOI: 10.1080/09168451.2014.975185.

【査読有】Numata, T., Inanaga, H., Sato, C. and Osawa, T. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. *J. Mol. Biol.*, 427, 259-273 (2015).

DOI: 10.1016/j.jmb.2014.09.029.

【査読有】Suzuki, T. and Numata, T. Convergent evolution of AUA decoding in bacteria and archaea. *RNA Biol.*, 11, 1586-1596 (2014).

DOI: 10.4161/15476286.2014.992281.

【査読有】Osawa, T., Inanaga, H. and Numata, T. Crystal structure of the Cmr2-Cmr3 subcomplex in the CRISPR-Cas RNA silencing effector complex. *J. Mol. Biol.*, 425, 3811-3823 (2013).

DOI: 10.1016/j.jmb.2013.03.042.

【査読有】Osawa, T., Inanaga, H. and Numata, T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Cmr2-Cmr3 subcomplex in the CRISPR-Cas RNA-silencing effector complex. *Acta Crystallogr. Sect. F*, 69, 585-587 (2013).

DOI: 10.1107/S1744309113011202.

【査読有】Osawa, T., Kimura, S., Terasaka, N., Inanaga, H., Suzuki, T. and Numata, T. Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1275-1280 (2011).

DOI: 10.1038/nsmb.2144.

【査読有】Terasaka, N., Kimura, S.,

Osawa, T., Numata, T. and Suzuki, T. Biogenesis of 2-agmatinylycytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1268-1274 (2011).

DOI: 10.1038/nsmb.2121.

【査読有】Osawa, T., Inanaga, H., Kimura, S., Terasaka, N., Suzuki, T. and Numata, T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an archaeal tRNA-modification enzyme, TiaS, complexed with tRNA^{Leu2} and ATP. *Acta Crystallogr. Sect. F*, 67, 1414-1416 (2011).

DOI: 10.1107/S1744309111034890.

〔学会発表〕(計 10 件)

沼田倫征「tRNA 転写後修飾メカニズムの分子的基盤解明」日本農芸化学会 2014 年度第 2 回関東支部例会、神奈川県横浜市、2014 年 11 月

沼田倫征、宮内健常、大澤拓生、鈴木勉「N6-スレオニルカルバモイルアデノシンの環化を触媒する tRNA 修飾酵素の結晶構造」第 14 回日本蛋白質科学会年会、神奈川県横浜市、2014 年 6 月

沼田倫征「tRNA 転写後修飾メカニズムの分子的基盤解明」日本農芸化学会 2014 年度大会、東京都新宿区、2014 年 3 月

沼田倫征「tRNA のアンチコドンにアグマチンで化学修飾するしくみ」第 37 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、長崎県雲仙市、2013 年 9 月

沼田倫征、大澤拓生「CRISPR-Cas システムのエフェクター複合体を構成する Cmr2-Cmr3 複合体の結晶構造」第 13 回日本蛋白質科学会年会、鳥取県鳥取市、2013 年 6 月

大澤拓生、木村聡、寺坂尚紘、稲永英子、鈴木勉、沼田倫征「tRNA^{Leu2} アグマチニル化反応の構造的基盤」第 12 回日本蛋白質科学会年会、愛知県名古屋市、2012 年 6 月

沼田倫征、大澤拓生、稲永英子、寺坂尚紘、木村聡、鈴木勉「tRNA 修飾酵素 TiaS による tRNA^{Leu2} の認識機構」第 12 回日本蛋白質科学会年会、愛知県名古屋市、2012 年 6 月

大澤拓生、木村聡、寺坂尚紘、稲永英子、鈴木勉、沼田倫征「tRNA アグマチニル化反応の構造的基盤」日本農芸化学会 2012 年度大会、京都府京都市、2012 年 3 月

大澤拓生、沼田倫征「tRNA^{Leu2} アグマチニル化反応の構造的基盤」第 29 回 PF シンポジウム、茨城県つくば市、2012 年 3 月

沼田倫征、大澤拓生「tRNA 修飾酵素 TiaS による tRNA^{Leu2} の特異的認識機構」第 29 回 PF シンポジウム、茨城県つくば市、

2012年3月

〔図書〕(計4件)

沼田倫征、大澤拓生「結晶構造解析から明らかとなった tRNA のアグマチニル化修飾機構」日本結晶学会誌 54、213-219、2012

沼田倫征「AUA コドンの解読に不可欠な tRNA^{Ile} アグマチニル化修飾の分子基盤」生化学 第84巻、第12号、1004-1008、2012

大澤拓生、沼田倫征「結晶構造から見る古細菌 tRNA^{Ile2} のアグマチニル化反応：新しい tRNA アンチコドン修飾メカニズムの解明」化学と生物 Vol.50、No.7、481-483、2012

大澤拓生、沼田倫征「tRNA をアグマチンで化学修飾するしくみ」ライフサイエンス新着論文レビュー、2011、(<http://first.lifesciencedb.jp/archives/3789>)

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・主任研究員

研究者番号：10401564