

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770125

研究課題名(和文)RNAの耐熱性効果に関わるRNA成熟作用マシナリーの動的分子認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of molecular dynamics recognition by RNA machineries involved in the thermostable RNA maturation

研究代表者

平田 章(Hirata, Akira)

愛媛大学・理工学研究科・講師

研究者番号：60527381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：極小アーキア由来ARMAN-2のtRNAスプライシング酵素(EndA)の構造機能解析から、特異的ループがEndAの幅広い基質認識に関与していることが明らかになりました。一方、超好熱性アーキアThermococcus kodakarensisのtRNAメチル基転移酵素Trm-m2G10/m22G10(arcTrm11)の構造、生化学、遺伝学的解析を行いました。その結果、arcTrm11はN末端側にRNA認識に関与するTHUMPドメイン、C末端側にロスマンフォールド型の触媒ドメインで構成されていました。また、arcTrm11遺伝子は、高温環境下で生育するのに必須であることがわかりました。

研究成果の概要(英文)：Structural and functional analyses of tRNA splicing enzyme (EndA) from ultra-small archaeon, ARMAN-2, revealed that ARMAN-2 specific loop is involved in the broad substrate specificity of ARMAN-2 EndA. On the other hands, structural, biochemical and genetic analyses of tRNA (m2G10/m22G10) methyltransferase (arcTrm11) in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis showed that the crystal structure of arcTrm11 consists of two domains, N-terminal THUMP domain which is involved in the RNA recognition and C-terminal Rossman fold-type catalytic domain, and that arcTrm11 gene is essential for cell viability at high temperature.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の基質認識機構 酵素の生理機能 tRNAプロセッシング アーキア

1. 研究開始当初の背景

前駆体 RNA は、多くの場合、RNA プロセシング、スプライシング、RNA 修飾など、様々な編集加工の工程を経て、成熟 RNA となり、その生理機能を発揮する。真核生物、真正細菌、古細菌 (アーキア) の成熟化 tRNA 分子には、共通する修飾ヌクレオシドが数多く存在し、修飾酵素も類似性がある。好熱性アーキアの tRNA 成熟マシナリーは、真核生物と類似した構造と機能を持つ。好熱性アーキアの場合、tRNA 成熟マシナリーは、tRNA の耐熱化に寄与していることが考えられる。おそらく、tRNA 成熟マシナリーによって、前駆体 tRNA 中のイントロンが切断され、修飾ヌクレオシドが付与されることで成熟型 tRNA が耐熱化される。好熱性アーキアの tRNA 成熟マシナリーのうち、前駆体 tRNA 中のイントロンを除去する tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼと tRNA の G10 の 2 位のアミノ基をジメチル化する tRNA (m²G10/m²G10) メチル基転移酵素(arcTrm11)の動的な基質認識機構や m²G10/m²G10 修飾ヌクレオシドの生理的意義は未だに解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、好熱性アーキア *Candidatus Micrarchaeum acidiphilum* (ARMAN-2) tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ(EndA) および超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* tRNA (m²G10/m²G10)メチル基転移酵素(arcTrm11)の基質認識機構および arcTrm11 の生理的意義を明らかにするために、ARMAN-2 EndA および arcTrm11 の構造機能解析、arcTrm11 の遺伝学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ARMAN-2 EndA の X 線結晶構造解析

大腸菌で発現させたレコンビナント ARMAN-2 EndA をアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせ精製した。精製した ARMAN-2 EndA の結晶化条件を市販の結晶化キットを用いて初期スクリーニングを行った。その結果、PEG イオン系試薬を含む結晶化溶液で蒸気拡散ハンギングドロップ法により ARMAN-2 EndA の結晶を得ることに成功した。

ARMAN-2 EndA の結晶を Pt 重原子溶液に浸し、バックソーキング後、重原子置換体 ARMAN-2 EndA の結晶を作成した。結晶の X 線回折データの収集は放射光施設 (Hyogo, SPring-8) で行った。重原子置換体 ARMAN-2 EndA の Pt 原子の位置を SAD 法により Phenix プログラムを用いて同定し、ARMAN-2 EndA の分子構造の位相情報を得ることができた。良好な電子密度マップを獲得することができ、ARMAN-2 EndA の分子モデルを Coot プログラムを用いて構築し精密化を Phenix プログラムで行った。

決定した ARMAN-2 EndA の X 線結晶構造を他のアーキア EndA を比較したところ、ARMAN-2 EndA に特異的なループが見つかり、このループ上に保存されたリジン残基が ARMAN-2 EndA の基質認識に重要で可能性が考えられた。その可能性を検証するために、ARMAN-2 EndA の変異体解析を行った。

(2) arcTrm11 の X 線結晶構造解析

大腸菌で発現させたレコンビナント arcTrm11 をアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせ精製した。arcTrm11 の結晶化条件を市販の結晶化キットを用いて初期スクリーニングを行った結果、高濃度の塩化ナトリウム試薬を含む結晶化溶液で蒸気拡散ハンギングドロップ法により arcTrm11 の結晶を得ることに成功した。また、メチル基供与体 S-アデノシルメチオニン(SAM)を加えた共結晶 arcTrm11-SAM も構築した。

セレノメチオニン置換体 arcTrm11 を、セレノメチオニンを含む最少培地で培養した大腸菌に発現・精製し作成した。結晶の X 線回折データの収集は放射光施設 (Hyogo, SPring-8) で行った。セレノメチオニン置換体 arcTrm11 結晶の X 線回折データと Phenix プログラムを用いて SAD 法により、Se 原子の位置情報を得て、arcTrm11 の良好な電子密度マップを描くことができた。この電子密度マップにアミノ酸分子を当てはめ、精密化を行い arcTrm11 の結晶構造を決定するに至った。

arcTrm11-SAM の X 線結晶構造に tRNA 分子をドッキングしたモデルを構築した結果、arcTrm11 は、アクセプターステム、tRNA の 3 次構造の形成に重要なコア部分、CCA 末端配列を通じて、基質 tRNA を認識していることが考えられた。そこで arcTrm11 の変異体および tRNA 変異体分子構築して、それぞれのメチル基受容活性を測定した。

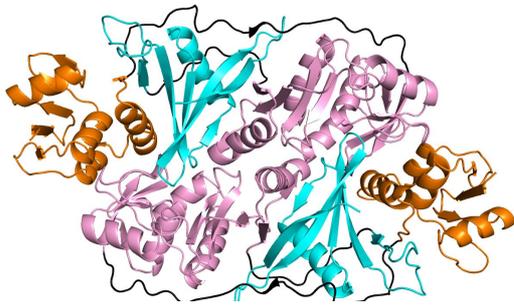
(3) arcTrm11 の遺伝学的解析

□ターゲット遺伝子破壊法を用いて *Thermococcus kodakarensis* のゲノム DNA から、arcTrm11 遺伝子を選択マーカーに置換して、arcTrm11 遺伝子破壊株を単離した。arcTrm11 遺伝子破壊株と野生株の生育特性解析を行った。また、arcTrm11 遺伝子破壊株から total tRNA および tRNA^{Trp} を抽出・精製してモノヌクレオシド分析を行った。さらに、arcTrm11 遺伝子破壊株に arcTrm11 遺伝子を導入して相補実験も行った。

4. 研究成果

(1) ARMAN-2 EndA の X 線結晶構造を 2.25 分解能で決定した (図 1)。ARMAN-2 EndA は、3 つのユニット (N - C) から成る

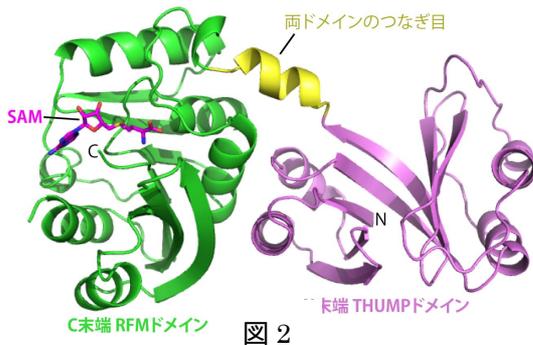
図1 ARMAN-2 EndA の X 線結晶構造



橙色は N、桃色は C、水色は C を示している。

がホモダイマー (α_2) を形成し活性型フォームになることが明らかになった。ARMAN-2 EndA は、幅広い基質認識機構をもつクレンアーキア EndA の特異的ループ(CSL)と構造的に似た ARMAN-2 specific loop(ASL)を保持していた。ASL の機能を調べるために、変異体解析を行った結果、ASL 上のリジン残基が RNA 認識部位として機能するために、ARMAN-2 EndA は幅広い基質認識機構を有することが分かった。以上の結果から、ASL は CSL と同じ機能になるように収斂進化したものであり、今回の結果はタンパク質と RNA の共進化を示したものとと言える。これらの研究成果をまとめて、*Nucleic acids research* 誌に報告した。

(2) arcTrm11-SAM 複合体の X 線結晶構造を 1.7 Å 分解能で決定した(図 2)。arcTrm11 は、



N 末端側に RNA 認識に関与する THUMP ドメイン、C 末端側にロスマンフォールド (RFM) 型の触媒ドメインの二つ部分で構成されていた。SAM は、触媒ドメインに結合しており、G6 の 2 位のアミノ基をメチル化する TrmN と似た結合様式だった。arcTrm11-SAM 複合体と tRNA のドッキングモデルを構築したところ、アクセプターステム、L 字型構造の形成に重要なコア部分、CCA 末端配列を認識していることが推定された(図 3)。実際に、変異体解析を行った結果、このドッキングモデルを支持する生化学的証拠を得ることができた。以上の研究成果をまとめて、国

際的な学術雑誌に報告予定である。

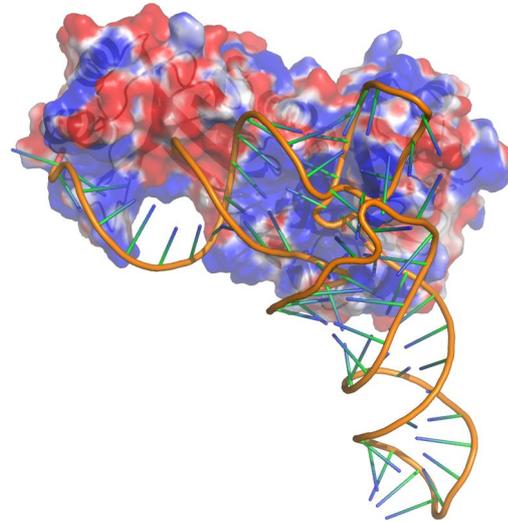


図3 arcTrm11-SAM と tRNA のドッキングモデル

(3) 至適生育温度である 85 °C と低温の 70 °C において、*arcTrm11* 遺伝子破壊株は野生株と同様の生育曲線を示した。しかしながら、95 °C の高温環境下において、破壊株の生育は見られなかった。破壊株のゲノム DNA に *arcTrm11* 遺伝子を導入して相補実験を行ったところ、破壊株は野生株と同様に 95 °C で生育した。現在、*arcTrm11* 遺伝子破壊株の tRNA 分析を進めており、今後は tRNA の m²G10/m²G10 修飾がなぜ高温環境下の生育に必須であるのか tRNA の耐熱性に焦点を当てて研究を進めていく予定である。

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 1 件)

Akira Hirata, Kosuke Fujishima, Royota Yamagami, Takuya Kawamura, Jillian F. Banfield, Akio Kanai and Hiroyuki Hori
X-ray structure of the fourth type of archaeal tRNA splicing endonuclease: insights into the evolution of a novel three-unit composition and a unique loop involved in broad substrate specificity
Nucleic Acids Research 40, 10554-10566 (2012)
10.1093/nar/gks826

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 西山聖示、平田 章、田村俊浩、堀弘幸 *Thermococcus kodakarensis* 由来 tRNA メチル化酵素 (Trm- m22G10) の構造機能解析
第 14 回極限環境生物学会年会 (神奈川県)
2013 年 10 月 26 日 ~ 2013 年 10 月 27 日

(2) 前田雄太、平田 章、長野倫子、土手智裕、鈴木健夫、金井 保、鈴木勉、堀弘幸

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis*
由来 tRNA^{Trp} の修飾ヌクレオシド分析
第 14 回極限環境生物学会年会 (神奈川県)
2013 年 10 月 26 日 ~ 2013 年 10 月 27 日

(3) Akira Hirata, Kosuke Fujishima, Ryota Yamagami, Takuya Kawamura, Jillian F. Banfield, Akio Kanaib and Hiroyuki Hori
X-ray crystal structure of the fourth type of tRNA splicing endonuclease from an uncultivated archaeon *Candidatus Micrarchaeum acidiphilum* (ARMAN-2)
Thermophiles2013 (ドイツ)
2013 年 09 月 08 日 ~ 2013 年 09 月 13 日

(4) 平田 章、藤島皓介、山上龍太、河村卓哉、JF.Banfield、堀 弘幸
世界最小クラスの生命体 ARMAN における 4 番目のタイプの tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼの X 線結晶構造解析
第 13 回極限環境生物学会年会 (東京)
2012 年 12 月 01 日 ~ 2012 年 12 月 02 日

(5) 平田 章、藤島皓介、山上龍太、河村卓哉、JF.Banfield、堀 弘幸
Structural insight into the evolution and broad substrate specificity of the fourth type of tRNA splicing endonuclease
9th INTERNATIONAL CONGRESS ON EXTREMOPHILES 2012 (スペイン)
2012 年 09 月 10 日 ~ 2012 年 09 月 13 日

(6) 平田 章、藤島皓介、山上龍太、河村卓哉、JF.Banfield、堀 弘幸
極小アーキアにおける tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼの構造機能解析
第 25 回日本アーキア研究会 (兵庫)
2012 年 07 月 20 日 ~ 2012 年 07 月 21 日

[その他]

ホームページ等
世界最小クラスの生命体 ARMAN の RNA 介在配列除去システムの構造を解明しました。
http://www.ehime-u.ac.jp/research/news/detail.html?new_rec=9781

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平田 章 (HIRATA AKIRA)

愛媛大学・大学院理工学研究科・講師

研究者番号 : 60527381