

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06975

研究課題名(和文)ダイマー型RNA成熟酵素の動的分子認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of dynamic-molecular recognition mechanism by the dimeric RNA maturation enzymes

研究代表者

平田 章 (Hirata, Akira)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・講師

研究者番号：60527381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物tRNA(m2G10)メチル化酵素Trm11-Trm112の触媒ユニットTrm11に相当するアーキアaTrm11のX線結晶構造を決定し、aTrm11の基質認識機構を明らかにしました。一方、超好熱性アーキアMethanopyrus kandleri (MKA) RNAスプライシングエンドヌクレアーゼ(EndA)の構造機能解析の結果から、MKA EndAは限定的な基質特異性を示すことも分子レベルで解明しました。

研究成果の概要(英文)：The X-ray structure of archaeal aTrm11, which is homologous to the catalytic unit of Trm11 in eukaryotic tRNA (m2G10) methyltransferase Trm11-Trm112, is determined, and the structure-guided biochemical analysis provides mechanistic insight into site specificity of archaeal Trm11 and further proposes a molecular ruler mechanism by which the Trm11 defines the distance and angle from the end of 3'-CCA in substrate tRNA to methylation site. The structural and functional analyses of RNA-splicing endonuclease (EndA) from hyperthermophilic archaeon Methanopyrus kandleri have demonstrated that the MKA EndA consists of heterodimer ()² and shows a constrain substrate specificity.

研究分野：構造生物化学

キーワード：tRNA maturation tRNA modification recognition mechanism X-ray structure SAXS analysis tRNA methyltransferase RNA splicing

1. 研究開始当初の背景

DNA 上にコードされた遺伝情報は、RNA を介してタンパク質へと翻訳される。RNA は、多くの場合、RNA プロセッシング、スプライシング、RNA 修飾など、様々な編集加工を経て、成熟 RNA となり、その生理機能を発揮する。アーキアと真核生物の RNA 成熟システムは酷似しており、両者の RNA 成熟因子は構造・機能的に保存されている。このことは、3つの生命ドメインの進化系統樹にあるように、両者が同じ共通祖先から分岐したことにより支持されている。したがって、アーキアおよび真核生物の RNA 成熟因子群を研究することは、タンパク質分子の機能進化の変遷を探る上でも極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究ではアーキアと真核生物の RNA 成熟システムにおいて、(1)アーキアの前駆体 tRNA 中のイントロンを切断するダイマー型 RNA スプライシングエンドヌクレアーゼ (EndA)、(2)アーキアおよび真核生物の tRNA の G10 をメチル化する酵素 Trm11、(3)真核生物の tRNA^{Phe} の G34 の 2'-O 原子をメチル化する Trm7-Trm734 の各酵素の基質認識機構について、構造生物学的手法を主に用いて解明することにした。

3. 研究の方法

3つの各酵素は、大腸菌発現系を用いたリコンビナントタンパク質として構築し、カラムクロマトグラフィーにより高純度のものを精製した。精製後、市販の結晶化スクリーニングキットを用い、各タンパク質結晶を作成し、大型放射光施設 SPring-8(兵庫県)に持ち込み、X線回折データの収集を行なった。各酵素の X線結晶構造は単波長異常分散法(SAD)によって決定した。また、各酵素の X線結晶構造に基づき、変異体解析を行なった。さらに、Trm7-Trm734 の場合、大型放射光施設 KEK-PF (茨城県)で X線小角散乱実験を行い、溶液中の分子モデルを推定した。

4. 研究成果

(1) 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* (*Tko*)Trm11 の基質認識機構の解明

*Tko*Trm11 は、tRNA 中における m²G10/m₂G10 形成の責任酵素であり、S-アデノシル-L-メチオニン(SAM) をメチル基供与体として用いている。*Tko*Trm11 は、真核生物のダイマー型 tRNA メチル化酵素 Trm11-Trm112 の触媒ユニット Trm11 と相同性があり、*Tko*Trm11 は、N 末端側に RNA 結合に重要な N-terminal ferredoxin-like (NFL) ドメイン及び thiouridine synthases, conserved RNA methylases, archaeal pseudouridine synthases (THUMP) ドメイン、C 末端側に SAM が結合した Rossmann-fold methyltransferase (RFM) 触媒ドメインの計

3つのドメインで構成されている(図1)。

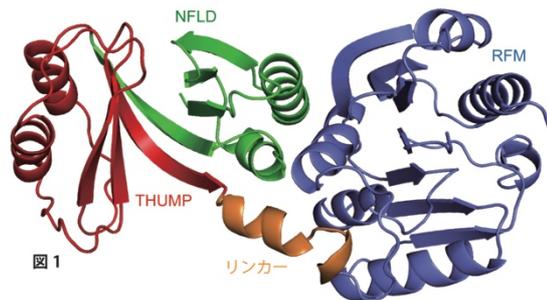


図1 *Tko*Trm11 の X線結晶構造 1.7 Å 分解能

他の tRNA 修飾酵素と構造比較した結果、m²G6 の責任酵素である *arc*Trm14 と酷似していた。*Tko*Trm11 と *arc*Trm14 の差異は、THUMP ドメインと RFM ドメインを繋ぐ領域の立体構造とその配置であり、また、RFM ドメインの立体配置も異なっていた。さらに、*Tko*Trm11 の NFL と THUMP ドメインに酷似した構造は、4-チオウリジン合成酵素 ThiI 及びシチジン脱アミノ化酵素 CDAT8 にも保存されていた。ThiI は s⁴U8 の修飾ヌクレオシド形成を触媒し、CDAT は C8U の脱アミド化を触媒する tRNA 修飾酵素である。*Tko*Trm11 の生化学的解析と最新の知見を合わせると、*Tko*Trm11、*arc*Trm14、ThiI および CDAT8 は THUMP ドメインが 3'-CCA 末端を認識し、それを起点に THUMP および NFL ドメインが tRNA アクセプターシステムと結合することで、3'-CCA 末端から基質認識部位までの長さを規定している。すなわち、NFL 及び THUMP ドメインを持つ tRNA 修飾酵素は、部位特異性を決定する共通の「分子定規」を採用していることが考えられる(図2)。

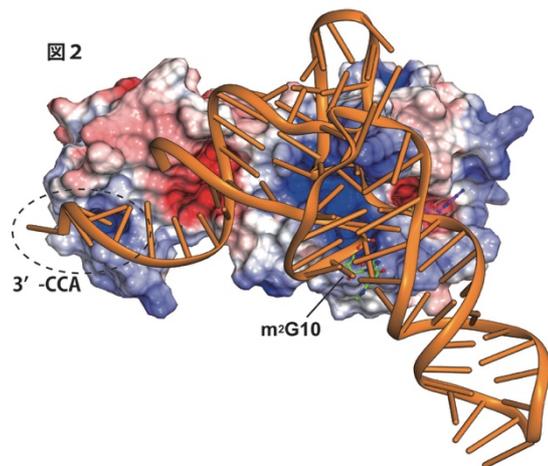


図2 *Tko*Trm11-SAM-tRNA 複合体モデル

本研究成果は、*Nucleic acids research* 誌に報告し、愛媛大学の学報記事に研究トピックスとして掲載された。

(2) 超好熱性アーキア *Methanopyrus kandleri* (MKA) の基質認識に関する研究

アーキアの前駆体 tRNA 中のイントロンは、tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ (EndA) によって除去される。アーキアの EndA はサブユニット組成の違いから、ホモ二量体の α_2 および ε_2 タイプ、ホモ四量体の α_4 タイプ、ヘテロ四量体の $\alpha_2\beta_2$ タイプの 4 つに分類されている。一般的に α_2 、 α_4 、 ε_2 タイプはユーリアーキア門に、 $\alpha_2\beta_2$ タイプはナノアーキア門とクレンアーキア門に保存されている。ユーリアーキア門の前駆体 tRNA では、イントロンが真核生物と同様にアンチコドンループの 37 番と 38 番の間に挿入されている。一方、ナノアーキアとクレンアーキア門の前駆体 tRNA では、イントロンがアンチコドンループだけではなく、D ループや T ループなど様々な位置に存在することもあり、複数のイントロンが 1 つの前駆体 tRNA 中に見出される場合もある。アーキアの EndA は前駆体 tRNA 中の Bulge Helix Bulge (BHB) モチーフを認識してイントロンを切断する。 α_2 と α_4 タイプは典型的な BHB モチーフしか切断しないが、 $\alpha_2\beta_2$ と ε_2 タイプは、BHB モチーフのみならず、変則的な Bulge Helix Loop (BHL) モチーフも切断する広範囲な基質特異性を有している。われわれは以前に、 $\alpha_2\beta_2$ EndA による BHB および BHL モチーフの認識が、 α サブユニット中の Crenarchaea specific loop (CSL) に起因していることを明らかにしている。超好熱性アーキア *Methanopyrus kandleri* (MKA) はユーリアーキア門では唯一例外的に、 $\alpha_2\beta_2$ EndA を保持し、前駆体 tRNA 中において、BHB および BHL モチーフを含むイントロンが存在することが予測されている。また、MKA EndA の α サブユニット中には、CSL 配列が見られない。このことから、おそらく、MKA EndA は、CSL なしで、BHB 及び BHL モチーフの両方を認識してイントロンを前駆体 tRNA から切断している。すなわち、MKA EndA は、新規な分子機構によって、広範囲な基質特異性を獲得している可能性がある。そこで本研究では、MKA EndA の基質認識機構を分子レベルで明らかにすることを目的とし、MKA EndA の生化学・構造生物学的解析を行った。

まず、MKA α 及び β サブユニットの共発現用プラスミドで、*E. coli* Rosetta II 株を形質転換した。菌体抽出液を調製し、Ni-NTA およびヘパリンカラム・クロマトグラフィーにより精製操作を行った。しかし、得られたタンパク質はヘテロ四量体 $\alpha_2\beta_2$ 構造を形成していなかった。そこで、 β サブユニットの C 末端と α サブユニットの N 末端を 3 つのグリシン残基で繋いだ融合タンパク質 FMka EndA を構築した。次に、前駆体 MKA tRNA^{Asn} 及び tRNA^{Glu} 転写産物を基質として、FMka EndA、*Aeropyrum pernix* (APE) $\alpha_2\beta_2$ EndA および *Archaeoglobus fulgidus* (AFU) α_2 EndA によるイントロン切断活性を測定した。その結果、全ての EndA は、前駆体 tRNA^{Asn} 中のアンチコ

ドンループにある BHB イントロンを効率的に切断したが、AFU EndA および FMka EndA は、前駆体 MKA tRNA^{Glu} の D ループに存在する BHL イントロンの切断活性が低かった (図 1)。

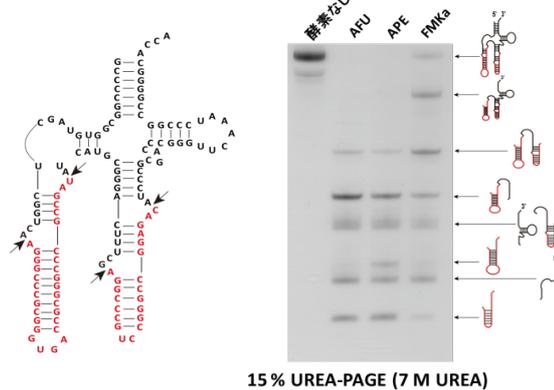


図 1 前駆体 MKA tRNA^{Glu} を用いたイントロン切断活性。赤色はイントロンを示している。BHL イントロンは D-ループに、BHB イントロンはアンチコドンループに存在している。矢印は切断箇所。

また、BHL イントロンを含む mini-helix RNA を基質とした場合、AFU EndA 及び FMka EndA はイントロンを切断することができなかった (図 2)。

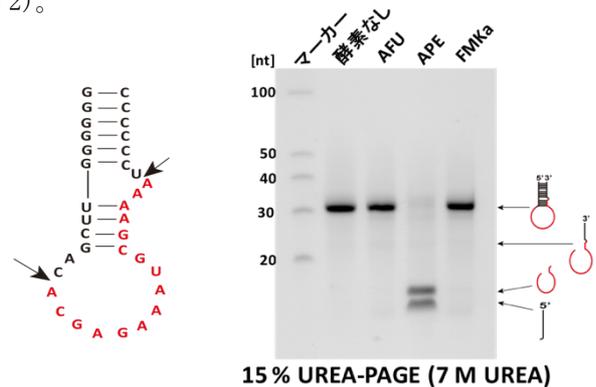


図 2 BHL モチーフを含む mini-helix RNA を用いたイントロン切断活性。赤色はイントロンを示している。矢印は切断箇所。

一方、FMka EndA の X 線結晶構造を 1.53 Å 分解能で決定した (図 3)。

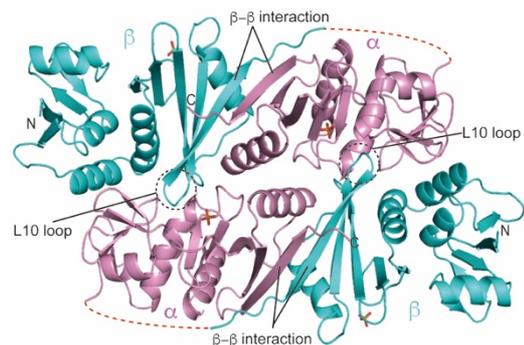


図3 サブユニット融合型 FMka EndA の X 線結晶構造のリボンモデル図。FMka EndA は活性型の二量体構造である。桃色は α ユニット、水色は β ユニット、赤点線は見えていないリンカー領域、 β - β interaction 及び L10 loop はユニット間相互作用に重要な部分を示している。

FMka EndA の全体構造は、既存の他の EndA と酷似しており、サブユニット同士の会合、基質認識および触媒反応に関する重要なアミノ酸残基も保存されていた。しかし、CSL に相当する特徴的な分子構造は存在しなかった。したがって、MKA EndA は $\alpha_2\beta_2$ EndA の中で唯一広範囲な基質認識機構を有していない EndA であると結論づけられた。さらに、以上の結果に基づき「RNA と EndA の共進化」についても考察することができた。本研究成果は、*Nucleic acids research* 誌に報告し愛媛大学の学報記事に研究トピックスとして掲載された。

(3) 酵母由来 tRNA メチル化酵素 Trm7-Trm734 複合体の活性発現メカニズムの構造基盤

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Phe}、tRNA^{Trp}、tRNA^{Leu(UAA)} の 34 位において、リボースの 2'-O 原子は、tRNA メチル化酵素 Trm7-Trm734 複合体によってメチル化修飾を受けることが知られている。また、Trm7 は触媒サブユニットとして機能しており、S-adenosyl-L-methionine (SAM) をメチル基供与体として用いている。しかしながら、Trm7-Trm734 の分子構造情報は利用できないため、「Trm7 がどのように Trm734 と相互作用し、基質・部位特異性を決定しつつ SAM を用いてメチル基転移反応を行うのか？」その活性発現メカニズムは不明である。そこで本研究では、Trm7-Trm734-SAM 三者複合体の X 線結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定し、また、Trm7-Trm734 および Trm7-Trm734-tRNA^{Phe} 三者複合体の溶液中における外形構造も X 線小角散乱実験によって推定した。Trm7 の N 末端側部分は典型的なロスマンフォールド型ドメインで構成され、そのクレフトに SAM が結合している。しかし、Trm7 の C 末端側の分子構造は、結晶中で disorder していたため、決定することができなかった。一方、Trm734 は 3 つの WD40 ドメインで構成され、分子表面の大部分が正電荷に分布していたため、tRNA との相互作用に寄与していることが考えられる。2 つの WD40 ドメインは上部の分子表面同士が相互作用することで、V 字型のクレフトを形成し、そのクレフトに Trm7 の N 末端側部分が挿入されている。また、溶液中において、Trm7-Trm734 はヘテロ二量体を形成し、tRNA^{Phe} が結合すると、分子の最大長が約 23 Å 延びている。現在、これらの構造情報に基づき生化学解析を行なっ

ている。今後、全ての結果を論文にまとめ、学術雑誌に報告する予定である。

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 3 件)

① Kaneta A, Fujishima K, Morikazu W, Hori H, and Hirata A “The RNA-splicing endonuclease from the euryarchaeon *Methanopyrus kandleri* is a heterodimer with constrained substrate specificity.” *Nucleic Acids Res* 46 (4) 1958-1972 (2018). DOI:10.1093/nar/gky003

② Sugino A, Usui T, Shimada T, Nakano M, Ogasawara H, Ishihama A, and Hirata A “A structural sketch of RcdA, a transcription factor controlling the master regulator of biofilm formation.” *FEBS Lett* 591 (13) 2019-2031 (2017). DOI:10.1002/1873-3468.12713

③ Hirata A, Nishiyama S, Tamura T, Yamauchi A, and Hori H. “Structural and functional analyses of the archaeal tRNA m²G/m²Gmethyltransferase aTrm11 provide mechanistic insights into site specificity of a tRNA methyltransferase that contains common RNA-binding modules.” *Nucleic Acids Res* 44 (13) 6377-6390 (2016). DOI: 10.1093/nar/gkw561

[学会発表] (計 16 件)

① 平田 章、岡田 圭祐、吉井 一晃、白石裕之、西條 慎也、米澤 健人、清水 伸隆、堀 弘幸、「真核生物 tRNA メチル化酵素 Trm7-Trm734 複合体の活性発現メカニズムの構造基盤、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 神戸国際会議場、2017 年 12 月

② 小西 智也、金井 保、跡見 晴幸、堀 弘幸、平田 章、「アーキア RNA ポリメラーゼの転写活性化型開始複合体の構造解析に向けての準備状況」、第 18 回極限環境生物学会年会 産業技術総合研究所 つくばセンター、2017 年 11 月

③ 臼井 孝典、金井 保、跡見 晴幸、堀 弘幸、平田 章、「芳香族アミノ酸の生合成遺伝子群の発現を制御する アーキア転写活性化因子 (Tar) の分子認識機構の解明」、第 18 回極限環境生物学会年会 産業技術総合研究所 つくばセンター、2017 年 11 月

④ 平田 章、「超好熱性アーキアの tRNA 修飾、特にメチル化修飾は高温環境下の生育にとって必須である」、第 30 回日本 Archaea

研究会 東北大学川内キャンパス、2017年9月

⑤ 平田 章、「tRNA成熟化機構に見られるアーキアの生存戦略」環境微生物系学会合同大会2017 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)、2017年8月

⑥ 伊藤亜沙子、山上龍太、河野 陽、平田 章、堀 弘幸、「大腸菌 tRNA(Gm18)メチル化酵素(TrmH)の X 線結晶構造とその基質 tRNA 選択システム」、第19回日本 RNA 学会年会 富山国際会議場、2017年7月

⑦ Hirata A, Nishiyama S, Tamura T, Yamauchi A, and Hori H “Structural and functional analyses reveal mechanistic insight into a site specificity of the archaeal tRNA m²G/m²₂G10 methyltransferase (aTrm11)” Extremophiles2016 Kyoto University, 2016年9月

⑧ Kawamura T, Hirata A, Ohno S, Nomura T, Nagano T, Nameki T, Yokogawa T, and Hori “Multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) from *Thermoplasma acidophilum*, a thermoacidophilic archaeon” tRNA 26th Conference, 2016年9月

⑨ 平田 章、「RNA成熟マシナリーの構造と機能の解明」、日本農芸化学会中四国支部支部創立15周年記念 第24回若手シンポジウム、2016年7月

⑩ 平田 章、西山 聖示、田村 俊浩、山内綾乃、堀 弘幸、「アーキア tRNA (m²G10/m²₂G10)メチル基転移酵素 arcTrm11 の基質認識機構に関する研究」、第29回日本 Archaea 研究会、2016年7月

⑪ 平田 章、「RNA関連酵素の構造機能解析による生命進化の解明と抗菌薬シード開発への挑戦」、生命機能科学応用開発グループ第3回講演会 愛媛大学 農学部、2016年7月

⑫ Takuma H, Ushio M, Minoji A, Kazayama N, Shigi A, Hirata A, Tomikawa A, Ochi A, and Hori H “Substrate tRNA recognition mechanism of eubacterial tRNA (m1A58) methyltransferase (TrmI)” RNA2016、2016年6月

⑬ Hirata A, Nishiyama T, Tamura A, Yamauchi A, and Hori H “Structural and functional analyses reveal mechanistic insight into a site specificity of the archaeal tRNA methyltransferase” RNA2016、2016年6月

⑭ 岡田圭祐、吉井一晃、平田 章、堀 弘幸、「真核微生物由来 tRNA(Gm34)メチル化酵素 Trm7-Trm734 の構造機能解析」、第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同年会(BMB2015)、2015年12月

⑮ 平田 章、西山 聖示、田村 俊浩、山内綾乃、堀 弘幸、「アーキア由来 tRNA^{m2}G10/m²₂G10 メチル化酵素 arcTrm11 の X 線結晶構造 ~tRNA 修飾酵素の部位特異性を決定している共通基本原理の統一的理解~」、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)、2015年12月

⑯ 平田 章、西山 聖示、田村 俊浩、山内綾乃、堀 弘幸、「アーキア tRNA (m²G10/m²₂G10)メチル化酵素 arcTrm11 の基質認識機構の解明」、第16回極限環境生物学会、2015年11月

[図書] (計1件)

① 平田 章 他、共立出版社、アーキア生物学、2017年、99-103

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://www.ehime-u.ac.jp/post-71283/>

<https://www.ehime-u.ac.jp/post-21283/>

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