

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03637

研究課題名(和文) 4者複合体の構造解析による transsulfursome の tRNA 変換機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a tRNA conversion mechanism of transsulfursome by the structural analysis of quaternary complex

研究代表者

姚 閔 (Yao, Min)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：40311518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質が遺伝暗号通りに正しく翻訳されるためには、原料となるアミノアシル tRNA(aa-tRNA)が正確に合成されている必要がある。その合成役割を担うのが合成酵素(aaRS)である。しかし、メタン生成古細菌では、transsulfursomeと呼ばれる3者複合体(SepRS、SepCys、SepCysS)がCys-tRNA(Cys)の合成を行う。

本研究では、私達はX線結晶構造解析法、X線小角散乱法、電子顕微鏡観察、生化学的手法を用いて transsulfursomeとtRNA から成る4者複合体の構造・機能解析によって、Cys-tRNA(Cys)合成の動的なプロセスの分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

transsulfursomeは、aaRS誕生の足跡に残された化石酵素である。得られた分子機構は遺伝暗号に関わる酵素の誕生と進化の理解を大きく前進させると期待できる。

また、リンカーで繋がった3つのドメインが異なる分子にそれぞれ結合して複雑な反応を可能にする本システムは、簡単な系からより複雑な系へ進化する過程の理解も前進させた。

さらに、リン酸化セリンを部位特異的にタンパク質に導入する技術は、ヒトの病気と密接に関係する研究にとって非常に重要であり、transsulfursomeの作用機序の解明は「タンパク質へのリン酸化セリンの自在な取り込み」を達成する上で非常に大きな一歩になる。

研究成果の概要(英文)：To translate the protein according to the genetic code on the ribosome, the aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) must be synthesized correctly. Generally, the aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) directly catalyzes this synthesis. However, in methanogenic archaea, a ternary complex called transsulfursome (SepRS, SepCys, SepCysS) synthesizes Cys-tRNA(Cys) in an indirect pathway. In this study, we analyzed the relationship of structure and function of transsulfursome-tRNA complex by using X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering, electron microscopic observation, and biochemical methods. Taken results together, we understood the dynamic molecular mechanism for the Cys-tRNA(Cys) synthesis of the transsulfursome.

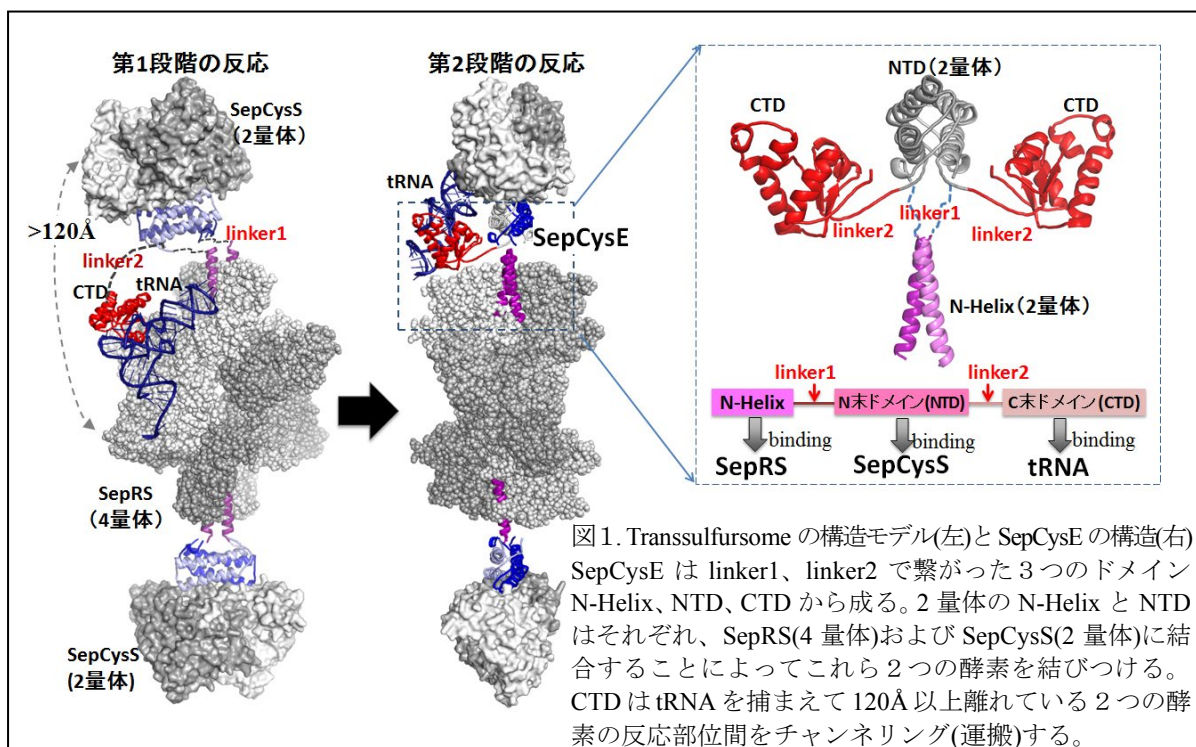
研究分野：構造生物学

キーワード：Cys-tRNA(Cys) transsulfursome アミノアシルtRNA合成 間接合成経路 X線結晶解析 クライオ電子顕微鏡 小角散乱

1. 研究開始当初の背景

リボソーム上で、タンパク質が遺伝暗号通りに正しく合成されるためには、前提として、原料となるアミノアシル tRNA(aa-tRNA)が正確に合成されている必要がある。その役割を担うのがアミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)であり、20 種のアミノ酸に対して少なくとも 20 種の aaRS が存在していると考えられていた。しかし、近年、一部のアミノ酸に対応する aaRS が欠如している例が発見され、そのような系では、目的の aa-tRNA は、aaRS で直接合成されるのではなく、ミスチャージ中間体を経た 2 段階の反応 (間接合成) で作られることが明らかにされてきている。このような間接合成系は、遺伝暗号の発展段階を今に残す化石として、学術的に非常に貴重なものと考えられている。

これまでに知られている間接合成系としては、ミスチャージ中間体である Glu-tRNA^{Gln} を経て Gln-tRNA^{Gln} が合成される例、Asp-tRNA^{Asn} を経て Asn-tRNA^{Asn} が合成される例、Sep-tRNA^{Cys} を経て Cys-tRNA^{Cys} が合成される例がある。こうした系が進化の過程で生き残るには、ミスチャージ中間体がリボソームに取り込まれて、誤ったタンパク質が合成されてしまうことを防ぐ、何らかの仕組みの存在が必須であると考えられる。我々は、X 線結晶構造解析を中心とした研究により、Gln-tRNA^{Gln} と Asp-tRNA^{Asn} について、2 段階の反応で働く 2 つの酵素とミスチャージ中間体である tRNA との間で 3 者複合体が形成されることで、中間体が複合体から離れることなく最終産物にまで合成される反応機構を遺伝暗号進化と結びつけて議論してきた^[1,2]。本研究の対象は、古細菌における Cys-tRNA^{Cys} の生合成であり、間接合成系として第 3 番目の例である。この場合、1 つ目の酵素であるリン酸化セリン tRNA 合成酵素 (SepRS) が tRNA^{Cys} にリン酸化セリン(Sep)を結合させて Sep-tRNA^{Cys} (ミスチャージ中間体) を合成し、次いで、2 つ目の酵素 SepCysS がこれを Cys-tRNA^{Cys} に変換する^[3]。我々は、これまでの研究により、①この系の活性には 2 種の酵素以外に第 3 のタンパク質 SepCysE が必須であること^[4,5]。②SepCysE が 2 つの酵素をつなぎとめ 3 者複合体 (Transsulfursome と命名) を形成すること^[4,5]。③SepCysE は、3 つのドメインから構成され、それぞれが、SepRS、SepCysS、tRNA に結合すること (図 1)。④3 つのドメインは、約 10 残基からなる 2 つのリンカー鎖でつながっており、これによる Transsulfursome の構造の柔軟さが酵素反応にとって重要であること^[6]などを突き止めている。



すなわち、研究の進んでいる Gln-tRNA^{Gln} の系、Asn-tRNA^{Asn} の系が、2つの酵素から成る系であるのに比べて、古細菌の Cys-tRNA^{Cys} の合成系は、2つの酵素を結びつける第3のタンパク質 SepCysE が存在しているという点に大きな特徴がある。これまでの研究で、この系は、前2者の系と比べてもさらに原始的な形態を担っていると考えられ、その働きの詳細を解明することは、遺伝暗号の誕生に関わる aaRS の発展の歴史を紐解く上で非常に重要である。

2. 研究の目的

これまでの研究で Transsulfursome を構成する各分子の性質、特に SepCysE の特異な性質を明らかにしてきたが、その性質が実際の酵素反応でどのように使われているのか、その詳細はまだ明らかにできていない。柔軟なリンカーでつながった3つのドメインのそれぞれが、2つの酵素 (SepRS、SepCysS) と1つの基質(tRNA)のそれぞれに結合し、おそらくはリンカーの柔軟性を利用して、120 Å 以上も離れた2つの活性部位の間の基質 tRNA のチャンネルング (運搬) を可能にしていると推定している (図 1)。しかし、本研究ではその詳細を解明するために、Transsulfursome と基質 tRNA から成る 4 者複合体の構造を決定すると共に、特にクライオ電子顕微鏡単粒子解析を利用して、Transsulfursome の各成分の動きを捉え、動的構造に対する2つのリンカーの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

Transsulfursome 上の tRNA の運搬を明らかにするため、各反応段階のみ反映できるの Transsulfursome 変異体の作製を試みた。SepRS、SepCysS、SepCysE、tRNA の変異を入れ、Transsulfursome と tRNA の結合強度を解析しながら、変異体の再設計・調製を繰り返した結果、SepCysE の linker1 と linker2 を短くした変異体以外に、目的に応じる3類のタンパク質の変異体と1種類の tRNA 変異体を得ることができた。それらのサンプルについて、小角 X 線散乱 SEC-SAXS を利用し、溶液中の会合体の解析も行い、結合状態も評価した。得られた各段階を反映する変異体を用いて、結晶構造解析のために結晶化を行い、単粒子解析のクライオ電顕測定のためにグリッドの作製も試みた。さらに、HS-AFM や、ネガティブ染色 TEM の測定によって、各状態の Transsulfursome の構造変化を解析し、Transsulfursome の各成分の動きを捉え、tRNA 運搬の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

まず、本研究開始段階まで、得られた結果 (図 1) を、変異体の活性解析によって検証し、まとめて Nature Communication と生化学雑誌に掲載することができた^[6,7]。

推定している Transsulfursome 上の tRNA の運搬機構を明らかにするため、第1と第2反応状態を反映する Transsulfursome-tRNA 複合体を作製し、SEC-SAXS 測定により結合状態も評価したが、図 2 に示しているように、

Transsulfursome の単体と tRNA との複合体の回折曲線が僅かの違いしかないため、溶液中の構造解析が困難であることが分かった。

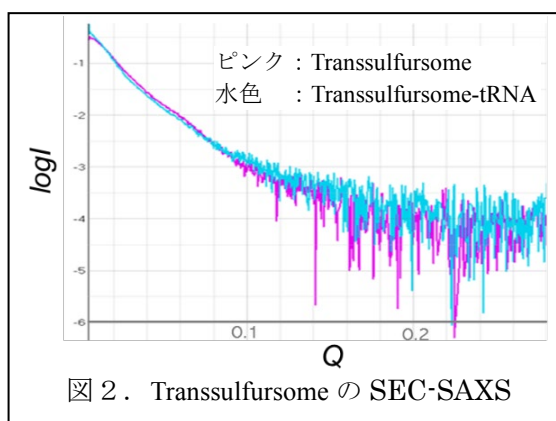


図 2. Transsulfursome の SEC-SAXS

第1段階のtRNAとの結合様式を明らかにするため、SepRS-SepCysE(NH)-tRNA^{Cys}-SepCysE(CTD)複合体の結晶化を試みた結果、2種類の結晶を得ることができたが、現在、その条件を最適化している。

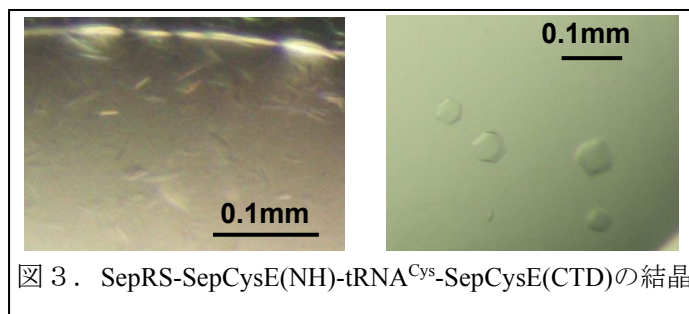


図3. SepRS-SepCysE(NH)-tRNA^{Cys}-SepCysE(CTD)の結晶

また、放射光施設 PF にて、凍結条件のスクリーニングを実施した。その結果、Transsulfursome-tRNA 複合体が沈殿しやすい、クライオ電子顕微鏡の測定に適切なグリッドの作製が困難であることが分かった。さらに、HS-AFM を用いて、Transsulfursome の動的な構造解析を試みた。RNA を観察することができなかったが、Transsulfursome が tRNA と結合すると、動きが抑えられた傾向を得られた。このように様々な解析法を用いて測定した結果、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法が Transsulfursome の単粒子解析に最も適切であることが分かった。そこで、第1段階の tRNA 結合状態を反映できる、SepSysS の3残基 (R344、R345、F347) を欠損した変異体 Transsulfursome (del_RRF) について、単体と tRNA との複合体という両条件で、透過型電子顕微鏡のネガティブ染色法 (硝酸ウランの使用) を用いて、単粒子解析した。得られた単粒子の画像を処理し、2次元の分子外形から、Transsulfursome (del_RRF) のサイズを見積もりした結果、tRNA 結合している Transsulfursome (del_RRF) が単体より曲っていることが分かった (図4)。これは、SepCysE(CTD) が第2段階の反応だけではなく、第1段階の反応でも SepRS への tRNA 結合を助けるためと考えられる。つまり、Transsulfursome の Cys-tRNA^{Cys} 合成反応の全過程では、2つのリンカーを利用して、SepCysE(CTD) が tRNA と結合し、第1段階の反応から第2段階の反応へ tRNA を運搬するという分子機構は、本研究の結果から示唆された。

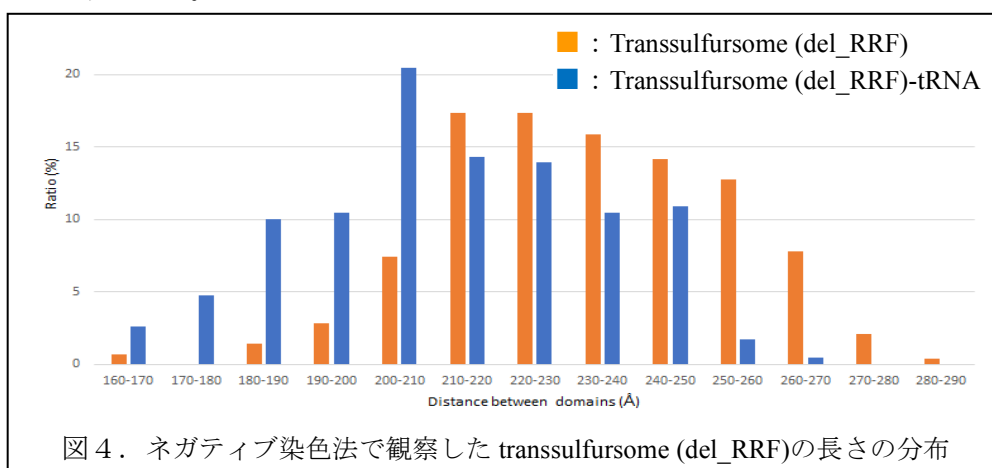


図4. ネガティブ染色法で観察した transsulfursome (del_RRF) の長さの分布

参考文献

- [1] Nakamura A., Yao M., *et al.*, (2006) *Science* 312, 1954-1958; [2] Suzuki T. *et al.*, (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 382-387; [3] Sauerwald A., *et al.*, (2005) *Science* 307, 1969-1972; [4] Liu Y., Nakamura A., *et al.*, (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 10520-14525; [5] 姚閔, 中澤祐人, (2015) *日本結晶学会誌* 57(4), 245-249; [6] Chen M. *et al.*, (2017) *Nature Communications*. 8, 1512-1532; [7] 姚閔, 陳美容, (2018) *生化学* 90(4), 512-518.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ye Yuxin, Chen Meirong, Kato Koji, Yao Min	4. 巻 519
2. 論文標題 The pH-dependent conformational change of eukaryotic translation initiation factor 5: Insights into partner-binding manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 186 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li Long, Adachi Motoyasu, Yu Jian, Kato Koji, Shinoda Akira, Ostermann Andreas, Schrader Tobias E., Ose Toyoyuki, Yao Min	4. 巻 75
2. 論文標題 Neutron crystallographic study of heterotrimeric glutamine amidotransferase CAB	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 193 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X19000220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 姚 関、陳 美容	4. 巻 第90巻 第4号
2. 論文標題 tRNA依存的アミノ酸システインの生合成複合体の分子機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 512-518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900512	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Meirong, Kato Koji, Kubo Yume, Tanaka Yoshikazu, Liu Yuchen, Long Feng, Whitman William B., Lill Pascal, Gatsogiannis Christos, Raunser Stefan, Shimizu Nobutaka, Shinoda Akira, Nakamura Akiyoshi, Tanaka Isao, Yao Min	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for tRNA-dependent cysteine biosynthesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1512-1532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01543-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yu Jian, Kato Koji, Tanaka Iso, Yao Min
2. 発表標題 Structural analysis platform for Native-SAD
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Min Yao, Meirong Chen, Satoru Kono, Isao Tanaka
2. 発表標題 Dynamic structure is required for transsulfuration on the Cys-tRNA(Cys) synthesis in indirect pathway
3. 学会等名 Asian Crystallographic Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 覚, 陳 美容, 于 健, 姚 閔
2. 発表標題 間接経路によってCys-tRNA ^{Cys} を合成するタンパク質複合体 transsulfurationにおけるtRNA channelingメカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Kono, Meirong Chen, Yume Kubo, Koji Kato, Min Yao
2. 発表標題 Study on the tRNA channeling mechanism of transsulfuration for Cys-tRNA(Cys) synthesis in indirect pathway
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姚閑
2. 発表標題 Attempting to adjust the elongation speed of the nascent chain elongation on ribosome
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姚閑
2. 発表標題 真核生物リボソームの生合成因子のマルチ機能の解析
3. 学会等名 第5回Ribosome Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姚閑
2. 発表標題 中性子回折によるアミド基転移酵素GatCABのアンモニア輸送機構解明の試み
3. 学会等名 平成30年度第1回構造生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姚閑
2. 発表標題 Nucleotide elongation in the reverse (3' -5') direction by TLP(Thg1-Like Protein)
3. 学会等名 第15回、中国生化学と薬理学学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 姚関
2. 発表標題 Challenging to visualize ammonia transposition in a channel of amidotransferase GatCAB using neutron macromolecular crystallography
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 姚関
2. 発表標題 SAXS解析によるtranssulfursome のダイナミクス研究の事例
3. 学会等名 第4回タンパク質X線溶液散乱講習会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 姚 関、陳 美容	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 7
3. 書名 生化学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾瀬 農之 (OSE Toyoyuki) (80380525)	北海道大学・先端生命科学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	田中 良和 (TANAKA Yoshikazu) (20374225)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	加藤 公児 (KATO Koji) (30452428)	北海道大学・先端生命科学研究院・助教 (10101)	