

平成22年 6月 2日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770077

研究課題名 (和文) tRNA 37 位修飾反応の構造的基盤

研究課題名 (英文) Structural Basis of tRNA modification at position 37

研究代表者

伊藤 拓宏 (ITO TAKUHIRO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70401164

研究成果の概要 (和文)：tRNA 37 位の G (G37) の N1 位にメチル基を導入する酵素である TRM5 と基質 tRNA、メチル基供与体 AdoMet との複合体を X 線結晶構造解析により明らかにした。TRM5 は D1 と D2-D3 に分かれて基質 tRNA を認識していた。tRNA の L 字型が安定化していることを D1 が認識したときにはじめて D2-D3 が G37 にメチル基を導入していた。すなわち、TRM5 は tRNA 成熟化のクオリティチェックをしていると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：The crystal structure of the TRM5•tRNA•AdoMet complex was determined. TRM5 is the enzyme that transfers a methyl moiety from a methyl-donor AdoMet to the N1 position of G37 in tRNA. TRM5 has two structural domains, D1 and D2-D3, to recognize a substrate tRNA. We clarified that D2-D3 transfers methyl moiety to G37, only when D1 recognizes the establishment of the L-shaped tRNA structure. Therefore, TRM5 may function as a checkpoint for the quality of the tRNA maturation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質、核酸、tRNA、修飾塩基、X線結晶構造解析、立体構造

1. 研究開始当初の背景

tRNA には生体内に存在する修飾 RNA の 80% もの修飾 RNA が存在しており、大腸菌で tRNA 全体の 11%、酵母で 17% ものヌクレ

オシドが修飾されている。このうち、アンチコドン隣位 (37 位) に対する修飾は、アンチコドン 1 字目 (34 位, ゆらぎ位置) に対する修飾と並んで、傑出して多い。G37 の N¹ の

メチル化 (m^1G37) は、細菌・古細菌・真核生物の間に共通して存在する数少ない修飾の一つであり、細菌・真核生物両方において、その欠損が著しい生育阻害を起こすことが知られている。 m^1G37 は、アミノアシル tRNA とリボソーム上 A サイトとの結合と、ペプチジル tRNA と P サイトの結合の両方を強化する機能を持ち、それによってフレームシフトを防止することが知られている。古細菌と真核生物においては、TRM5 と呼ばれる酵素が m^1G37 修飾を担っている。研究開始時においては、TRM5 の反応機構解明に向けて古細菌 *M.jannaschii* 由来 TRM5 (MjTRM5) の X 線立体構造解析が完了しており、TRM5 は I 型メチル基転移酵素であることを見出していた。また、NMR 法などにより N 末端側のドメインが他のドメインに対してフレキシブルであると予測していた。

真核生物と古細菌の tRNA の 37 位には、3 環性構造を持つ修飾塩基群 (ワイベース) が存在する。酵母においてワイベースの基本骨格である 3 環性構造は、TYW1 と呼ばれるラジカルサム酵素が TRM5 によって生成された m^1G37 に 2 つの炭素を導入することによって生成されることが見出されていた。ワイベースの機能的重要性に加えて、TYW1 の担う反応自体の特殊性 (3 環性構造の生成) に着目して、TYW1 の反応機構を明らかにすべく、古細菌 *Phorikoshii* 由来 TYW1 ホモログ (PhTYW1) の X 線立体構造解析を行い、報告していた。

近年 tRNA 修飾酵素の立体構造が数多く明らかにされてきているが、そのうち tRNA (全長または一部) との複合体の立体構造が解明されているのはたったの 5 種類にすぎない。また前述の通り 34 位と 37 位が最も頻繁に修飾されるが、34 位の修飾酵素と tRNA (全長または一部) との複合体の立体構造は既に 2 例

報告されており、34 位が tRNA 末端にあるという特性を生かして、34 位をアンチコドンループ外側に引き出して効率良く認識していた。一方、37 位の修飾酵素と tRNA の複合体の立体構造は解明されておらず、34 位より tRNA 内部に位置する 37 位を修飾酵素がどのように認識しているのかは不明である。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究は TRM5 と TYW1 による tRNA 認識機構と反応機構、およびこれらの酵素の連続反応機構について X 線結晶構造解析を主な手法として解析を行い、tRNA37 位の修飾反応について新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

X 線結晶構造解析の最初のターゲットとして、①TRM5-tRNA (複数種の tRNA) および②TYW1-tRNA、③TRM5-TYW1 の 3 種類の 2 者複合体を考えた。立体構造より得られた反応機構に関する知見は、生化学的な実験で検証することにより、より確かなものとする。

4. 研究成果

本研究課題において着目した TRM5 と TYW1 のうち、TRM5 と基質 tRNA、メチル基供与体 AdoMet との複合体を X 線結晶構造解析により明らかにした。tRNA については 2 種類の tRNA ($tRNA^{Leu}$ と $tRNA^{Cys}$) について立体構造を決定した (図 1)。TRM5 は D1 と D2-D3 という 2 つのドメインに分かれて基質 tRNA を認識しており、ドメイン間のリンカーは 2 次構造をもっておらず、比較的フレキシブルであった。D2-D3 ドメインは触媒ドメインであり、D2-D3 のみでメチル基導入部位である G37 位を正しく認識し、メチル基を導入しうることが明らかになった。D1 は

tRNA の L 字の肩の部分、すなわち T ループと D ループの会合部位の形状を認識していた。D1 の tRNA 認識部位の変異体および tRNA の変異体を用いてメチル基転移活性測定を行い、酵素の至適温度において D1 が活性に不可欠であることが示された。このような TRM5 の活性化メカニズムは tRNA の一連の修飾反応が一定の制御をもってなされていることを示している。すなわち、tRNA の L 字型が安定化するために必要な修飾が初めに導入され、その完了を TRM5 の D1 が認識したときに G37 のメチル化が導入されるといった機構である。G37 のメチル化はアミノアシル化の活性化やリボソームの翻訳反応の活性化を促すため、TRM5 は tRNA 成熟化のクオリティチェックをしているともいえる。これらの結果を投稿論文にまとめて発表した。この系に加えて TYW1 を含む複合体の結晶化を行うことはできなかった。

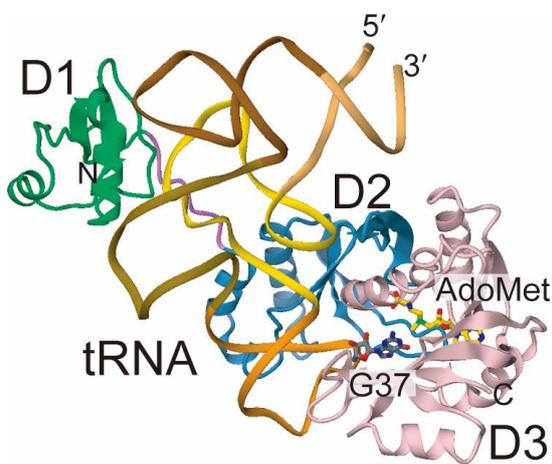


図 1 TRM5•tRNA•AdoMet 3 者複合体の結晶構造

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 2 件)

- ①Goto-Ito, S., Ito, T., Kuratani, M., Bessho, Y. and Yokoyama, S. (2009) Tertiary structure checkpoint at anticodon loop modification in tRNA functional maturation. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 1109-1115.
- ②Goto-Ito, S., Ito, T., Ishii, R., Muto, Y., Bessho, Y. and Yokoyama, S. (2008) Crystal Structure of Archaeal tRNA (m1G37) methyltransferase aTRM5. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, **72**, 1274-1289.

[学会発表] (計 5 件)

- ①Takuhiko Ito, Tertiary structure checkpoint in tRNA functional maturation、23rd tRNA workshop、2010年1月29日、Averio, Portugal
- ②伊藤(後藤)桜子、tRNA 37 位のグアノシンに対するメチル基転移酵素(Trm5)は、tRNA 成熟プロセスにおける tRNA L 字型立体構造のチェックポイントとして働く、第 11 回日本 RNA 学会年会、2009 年 7 月 28 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター
- ③伊藤拓宏、tRNA37 位のグアノシンに対するメチル基転移酵素 (TRM5) による tRNA 認識機構、BMB2008、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートアイランド
- ④伊藤(後藤)桜子、tRNA 37 位のグアノシンに対するメチル基転移酵素 (TRM5) による tRNA 認識機構の立体構造学的研究、第 10 回日本 RNA 学会年会、2008 年 7 月 25 日、札幌コンベンションセンター
- ⑤伊藤拓宏、tRNA アンチコドン隣位 (37 位) のグアノシンに連続的に働く修飾酵素の立体構造学的研究、第 10 回日本 RNA 学会年会、2008 年 7 月 23 日、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 拓宏 (ITO TAKUHIRO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号 : 70401164