

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603018

研究課題名（和文） RNAメチル基転移酵素による非天然官能基ポスト標識技術の開発と応用

研究課題名（英文） Application of an effective post-labeling method using RNA methyltransferases and synthetic AdoMet-derivatives.

研究代表者

別所 義隆 (BESSHO YOSHITAKA)

独立行政法人理化学研究所・機能解析第2研究チーム・チームリーダー

研究者番号：70242815

研究成果の概要（和文）：

tRNAメチル基転移酵素と人工補酵素のAdoMet類似体を用いて、メチル基以外の非天然官能基がtRNA分子に高効率で取り込まれる技術を開発した。tRNA分子に転移される非天然官能基末端を蛍光標識することで、tRNA基質の均一な蛍光標識試料を準備し、tRNA・タンパク質複合体の蛍光結晶を作成した。大型放射光SPring-8のマイクロビームBL32XUビームラインにて、レーザー照射により結晶からの蛍光発色を観測し、微小結晶X線回折測定法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

We utilized a chemical biology approach to develop a site-specific RNA labeling method, in which nucleic acids can be covalently modified at nucleotide precision using engineered methyltransferases and synthetic analogs of their cofactor, AdoMet. By conjugating fluorescent probes to the extended group of the synthetic AdoMet, we successfully developed the core technologies to incorporate fluorescent labels into microcrystals of complexes of tRNA and its maturation enzymes, which cannot be observed by visible light, and the instrument to detect the fluorescent label incorporated into the sample crystal. A microcrystal X-ray diffraction method was developed, using the fluorescent microcrystals of the complex of the post-labeled tRNA and its maturation enzymes and the co-axial microscope installed on the micro-focus beamline BL32XU of the SPring-8 synchrotron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生体分子工学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：(1) 生物・生体工学 (2) バイオテクノロジー (3) 酵素反応 (4) タンパク質 (5) メチル基転位酵素 (6) tRNA (7) 人工補酵素 (8) S-アデノシルメチオニン

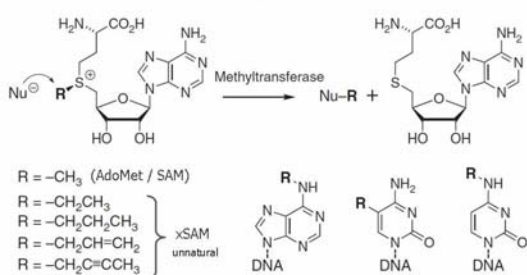
## 1. 研究開始当初の背景

メチル基転移反応を触媒する酵素の多くは、AdoMet を補酵素として用い、DNA、RNA、糖、タンパク質など、生体高分子の様々な部位を修飾する。一部の DNA メチル基転移酵素には、人工合成 AdoMet 類似体から、エチル基やプロピル基などの非天然官能基を導入する能力があると知られている (Fig.1)。我々は、RNA メチル基転移酵素を用いて、これらの非天然の低分子官能基が tRNA 分子に対しても取り込まれることを確認した。

tRNA は転写後にさまざまな修飾を受けて正しく折りたたまれ成熟する。RNA メチル基転移修飾は、様々なヌクレオチド修飾のなかでも、最も基本的な酵素反応である。それらは、基質 RNA を構造特異的に認識するため、DNA メチル基転移酵素と比べ種類数が多い。そのため、エチル基などの低分子官能基だけでなく、通常は立体障害のため転移が困難と思われる、より分子量の大きい官能基も、導入の可能性があると考えた。そこで、RNA メチル基転移酵素を用いて tRNA 分子に、高分子非天然官能基の取り込みを試みた。リトアニアの Klimasauskas グループとの共同研究で、メチル基の代わりに、特定の 20 炭素単位の官能基 (GABA) を結合させた AdoMet 類似体を化学合成した。

tRNA の 26 位 (セントラルコア領域) を修飾する Trm1 メチル基転移酵素を使用して、20 炭素単位の官能基が直接に tRNA 基質に取り込む実例を確認した。GABA 官能基の末端に反応性の高いアミノ基を導入し、NHS エステル結合により、ビオチンの取り込みにも成功した。これは、酵素を必要としない単純な化学反応なので、ビオチンの代わりに Cy3、Cy5 などの高輝度蛍光化合物を取り込ませれば、部位特異的な標識技術として一般化出来る可能性が高い。また、クロスリンクを促進する官能基を取り込ませれば、高分子接合体 (conjugate) 作成技術にも応用できる。

Fig. 1. Direct transfer of extended groups from synthetic SAM-derivatives.



## 2. 研究の目的

RNA メチル基転移酵素と化学合成 S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) 類似体を使用し、RNA 分子に非天然官能基を導入する技術を開発する。多くの RNA メチル基転移酵素の立体構造を分析し、非天然官能基導入の一般化を目指す。さらには、導入アミノ基に NHS プローブをエステル結合させる既存技術と組み合わせ、tRNA の塩基を部位特異的に標識する。

酵素を利用したポスト標識技術は、修飾塩基を含む生体内 tRNA や rRNA に、部位特異的に効率良く蛍光化合物を取り込ませることが可能となる。メチル基転移酵素による標識技術の応用例として、微小結晶から効率良く、X線回折像を得る技術を開発する。

## 3. 研究の方法

GABA 20 炭素単位の非天然 AdoMet 類似体は、個々のメチル基転移酵素の活性能と、RNA 基質に対する立体障害の程度を見積もるためには都合が良いが、末端アミノ基へ NHS 化合物の標識導入の後には、官能基が大きすぎて、酵素連続反応の阻害や、構造解析のための結晶化不成功の要因にもなると考えられる。そこで、リトアニアの Klimasauskas グループ (研究協力者、海外共同研究者) と協力し、20 炭素よりも短い側鎖の非天然 AdoMet 類似体を作成し、複数種類の tRNA メチル基転移酵素の tRNA 基質に対する官能基転移活性を調べた。エチル基やプロピル基に直接アミノ基が繋がる形で化学合成することは難しいので、炭素 4 原子単位で AdoMet 類似体を準備した。求核反応を促進させるため、AdoMet の硫黄原子付近で sp<sup>2</sup> 混成軌道が含まれるように工夫した。複数の AdoMet 類似体の取り込み活性をデータベースに整理し、メチル基転移酵素の分類群と相関関係を探索した。

転移に成功した非天然官能基が、酵素・基質複合体においてどのように立体障害を回避しているか分析するため、複数 tRNA メチル基転移酵素の X線結晶構造を決定し、それらの補酵素位置を特定した。結晶モデルから、AdoMet 複合体構造が得られていない酵素について、酵素・補酵素複合体を結晶化し、X線構造を決定した。メチル基転移酵素と AdoMet 補酵素の構造分析から、非天然官能基の結合方向について考察した。

非天然官能基を転移した tRNA に、NHS エステル反応により、Cy3、Cy5、ローダミンなどの蛍光色素を導入した。蛍光標識した tRNA と成熟化酵素複合体の結晶化に成功し、

蛍光結晶を大型放射光 SPring-8 のマイクロビーム・BL32XU ビームラインにて評価した。

#### 4. 研究成果

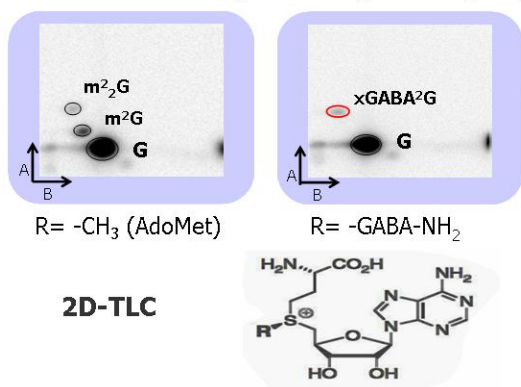
tRNA メチル基転移酵素を用いて tRNA へ高分子非天然官能基の取り込みを試みるため、メチル基の代わりに、特定の 20 炭素単位の官能基 (GABA) を結合させた AdoMet 類似体を新たに有機化学合成し、tRNA のセントラルコア領域 26 位のグアノシンを修飾する Trm1 メチル基転移酵素が、GABA 官能基を tRNA 基質に直接に取り込むことを確認した (Fig.2)。取り込み効率は 40% 以上であり、生成物を利用した応用実験に十分な収率であった。さらに tRNA の各領域を修飾する代表的なメチル基転移酵素を 4 種類選び、同じ GABA 転移反応を試みた所、2 つの酵素で人工官能基が tRNA に取り込まれた。

また、転移反応の効率改善のため、メチル基転移酵素の立体構造上の補酵素位置を特定することを目的として、Trm1 メチル基転移酵素・AdoMet 基質複合体の結晶化し X 線回折像を得ることで構造解析に成功した。また、人工官能基を転移出来るメチル基転移酵素の種類数を増やすため、Trm4 メチル基転移酵素と Fmu メチル基転移酵素、真正細菌型 Trm1 メチル基転移酵素、大腸菌 MnmC メチル基転移酵素の結晶も作成し、それぞれ X 線構造解析に成功した。結晶構造モデルから、メチル基転移酵素の触媒ポケットにて、人工官能基がどのように立体障害を避けられるかを分析し、特定の転移効率の低い酵素において変異体デザインの情報とした。

触媒部位の構造分析から、新たに特定の 12 炭素単位の短鎖リンカーを結合させた AdoMet 類似体を有機化学合成し、Trm1 メチル基転移酵素が、新たな非天然官能基を tRNA 基質に直接に取り込むことを確認した。

さらに、人工官能基の応用例として、非天

Fig.2 MTase activity of Trm1 (tRNA-m<sup>2</sup>G26)



然官能基末端を蛍光標識することで、tRNA 基質の均一な蛍光標識試料を準備し、tRNA ・タンパク質複合体の蛍光結晶を作成した。大型放射光 SPring-8 のマイクロビーム・BL32XU ビームラインにて、レーザー照射により結晶からの蛍光発色を観測し、微小結晶 X 線回折測定法の高効率化に成功した。

#### 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 4 件)

- (1) "Substrate tRNA recognition mechanism of a multi-site-specific tRNA methyltransferase, *Aquifex aeolicus* Trm1, based on the X-ray crystal structure." Awai T, Ochi A, Ihsanawati I, Sengoku T, Hirata A, Bessho Y, Yokoyama S, and Hori H. *J Biol Chem*, 286(40):35236-35246, (2011). 査読あり
- (2) "Crystal structure of the bifunctional tRNA modification enzyme MnmC from *Escherichia coli*." Kitamura A, Sengoku T, Nishimoto M, Yokoyama S, and Bessho Y. *Protein Sci*, 20(7):1105-1113, (2011). 査読あり
- (3) "Structure of an archaeal homologue of the bacterial Fmu/RsmB/RrmB rRNA cytosine5- methyltransferase." Hikida Y, Kuratani M, Bessho Y, Sekine SI, and Yokoyama S. *Acta Crystallogr Sect D*, 66(Pt12):1301-1307, (2010). 査読あり
- (4) "Crystal structure of *Methanocaldococcus jannaschii* Trm4 complexed with sinefungin." Kuratani M, Hirano M, Goto-Ito S, Itoh Y, Hikida Y, Nishimoto M, Sekine S, Bessho Y, Ito T, Grosjean H, and Yokoyama S. *J Mol Biol*, 401(3):323-333, (2010). 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

(1) 第 4 回アストロバイオロジーワークショップ, 2011/11/27 (神戸) 「SPring-8/XFEL の新しい光に期待するタンパク質生合成システム・分子イメージング手法の開発」\*別所義隆

(2) 第 84 回日本生化学会大会, シンポジウム 1S2p, 2011/9/21 (京都) 「原始生命における核酸修飾と遺伝暗号」\*別所義隆

(3) *Thermophiles* 2011, 2011 Sep 11. (Montana USA) 「Multisite specific tRNA methyltransferase Trm1 from a hyper-thermophilic eubacterium, *Aquifex*

*aeolicus.*」 \*Takako Awai, Anna Ochi, Ihsanawati, Toru Sengoku, Satoshi Kimura, Takashi Yokogawa, Akira Hirata, Yoshitaka Bessho, Tsutomu Suzuki, Shigeyuki Yokoyama, Hiroyuki Hori.

(4) 第 24 回日本 Archaea 研究会講演会, 2011/9/3 (鶴岡) 「SPRING-8/XFEL の新しい光に期待する古細菌 RNA/RNP 分子イメージング手法の開発」 \*別所義隆

(5) 16th Annual meeting of the RNA society (RNA2011), 2011 Jun 16. (Kyoto Japan) 「Crystal structure of the bifunctional tRNA modification enzyme MnmC」 \*Aya Kitamura, Toru Sengoku, Madoka Nishimoto, Shigeyuki Yokoyama, Yoshitaka Bessho.

(6) 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), ワークショップ 2W21, 2010/12/8 (神戸) 「核酸化学修飾の役割と基本原材料」 \*別所義隆

(7) 8th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2010), 2010 Sep 14. (Portugal) 「The system-biological whole-cell project of a model organism, *Thermus thermophilus* HB8」 \*Yoshitaka Bessho, Akeo Shinkai, and Seiki Kuramitsu

(8) 第 11 回 RNA ミーティング, 2009/7/28 (新潟) 「ヒスチジル tRNA 合成酵素の G(-1)塩基認識機構」 \*別所義隆、東島今日子、柴田理恵、西本まどか、倉光成紀、横山茂之

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

別所 義隆 (BESSHO YOSHITAKA)  
独立行政法人理化学研究所・機能解析第 2 研究チーム・チームリーダー  
研究者番号：70242815

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

河野能顕 (KAWANO YOSHIAKI)  
独立行政法人理化学研究所・生命系放射光利用システム開発ユニット・専任技師  
研究者番号：70321750

Saulius KLIMASIAUSKAS

Laboratory of Biological DNA Modification,  
Institute of Biotechnology, Vilnius  
University, LITHUANIA (Professor)  
研究者番号：なし