

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655145

研究課題名(和文)蛋白質を用いた修飾 tRNA の調製法の開発

研究課題名(英文) development of preparation of modified tRNA using protein

研究代表者

田中 良和 (TANAKA, Yoshikazu)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・准教授

研究者番号：20374225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌体内で構成させた tRNA - 蛋白質複合体を用いて、目的の成熟 tRNA を簡便かつ高純度に調製する系を構築することを目指す。まず、大腸菌由来 tRNA(Met) アセチルトランスフェラーゼ (E. coli TmcA) の変異体のうち、tRNA との結合活性の高い K205A 変異体を用いて、大腸菌体内から tRNA(Met) を調製する系を確立した。更に、その結晶化を行い、6 程度の分解能の回折を与える結晶を得た。更に、セレン導入蛋白質と tRNA(Gln)、tRNA(Glu)、tRNA(Lys) の共発現系を構築し、生体内で形成される蛋白質 - tRNA 複合体から高純度の tRNA を調製した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to establish conventional method to prepare highly pure modified tRNA from E. coli cell using tRNA-protein complex spontaneously formed in the cells. First, I established preparation system for tRNA(Met) using E. coli tRNA(Met) acetyltransferase. For this purpose, I selected K205A mutant, which has high affinity for tRNA. Moreover, crystals of the purified tRNA(Met) were obtained. The crystals diffracted about 6-angstrom resolution at synchrotron radiation facility. Furthermore, co-expression system of selenium introducing enzyme with tRNA(Gln), tRNA(Glu), and tRNA(Lys) in E. coli were constructed, and pure tRNAs were prepared from the tRNA-protein complex spontaneously formed in the E. coli cell.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：tRNA 精製 修飾 結晶化 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

tRNA が正確に機能を発現するには、種々の修飾が導入される必要がある。tRNA に関する研究を行う上で、目的の tRNA を調製することは避けられないが、修飾を受けた活性のある tRNA (成熟 tRNA) は、相補的な配列の DNA を固定したカラムを用いて生細胞から精製される。しかし、この方法は、非特異的に結合する他の RNA 分子を選り分けるための繊細な条件設定が必要なため、汎用的な方法であるとは言いがたく、そのため、多くの研究は、未修飾の合成 tRNA を用いて行われている。その場合、tRNA が修飾を受けていないため、十分な活性を示さない等の問題が生じることがある。生体内で起こる反応を正確に理解するためには、成熟 tRNA を用いる必要があるが、上記の通り、その調製は難しいため、簡便に成熟 tRNA を調製する手法が望まれていた。

2. 研究の目的

上記の通り、成熟 tRNA を調製する事は困難なため、本来ならば成熟 tRNA を用いなければならない研究が、未修飾の tRNA を用いて行われているのが現状であり、その場合、本来とは異なる結果が得られる可能性がある。本研究では、このような問題を打開するため、tRNA と安定な複合体を形成する蛋白質を大量発現させ、生体内で自発的に形成した tRNA-蛋白質複合体を精製し、そこから目的の tRNA を調製する系を構築することを目指した。

3. 研究の方法

(1) tRNA-蛋白質共発現系の構築：先行研究において構築された T7 プロモーターを用いた発現ベクターを用いて、大腸菌内で目的の tRNA とそれに結合する蛋白質を共発現させる系を構築する。蛋白質の発現には、ベクターに組み込まれているマルチクローニングサイトを利用するが、tRNA の発現には、後に、tRNA-蛋白質複合体を精製する事を考慮し、蛋白質には His タグを融合させる。tRNA の遺伝子は、tRNA 用の発現ベクターの XbaI/Bpu1102I サイトに挿入する。両末端には制限酵素の認識配列が付加されるが、これらは大腸菌内の tRNA 成熟系により適切に削除されるので問題はない。

(2) tRNA-蛋白質複合体の調製：蛋白質、tRNA の発現には T7 プロモーターを用いるため、大腸菌は BL21(DE3)株を用いる。共発現用に構築されたベクターを大腸菌に導入して LB 培地で培養し、IPTG の添加により蛋白質および tRNA の発現を誘導する。大腸菌を超音波破碎し、上清を回収する。Ni アフィニティークロマトグラフィーにより、蛋白質-tRNA 複合体回収する。目的の tRNA が結合している事を、Urea PAGE にて確認する。十分な量の tRNA が確認された場合は、蛋白質-tRNA 複合体に高濃度の塩を添加し、tRNA

を解離させて回収する。X 線結晶構造解析をはじめとした各種分析手法を用いて、得られた tRNA の分子特性を解析する。

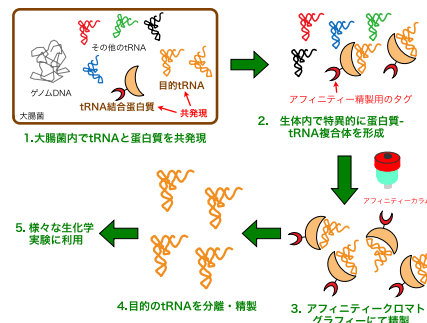


図 1. 本研究の概要

4. 研究成果

平成 24 年度は、tRNA(Met)に焦点を当て、調製系の構築、X 線結晶構造解析により分子特性の評価の系を構築した。野生型 E.coli TmcA よりも tRNA とのアフィニティーの高い K205 変異体を取得し、これを大腸菌 BL21(DE3)に大量発現させた。菌体内可溶性画分から、E.coli TmcA K205A 変異体の末端に付加した His Tag を用いて、tRNA-蛋白質複合体をアフィニティークロマトグラフィーにて精製し、さらにゲル濾過等により高純度に精製した。これに、塩を加える事で tRNA と E.coli TmcA を解離させ、tRNA のみを得る事ができた (図 2)。塩基の修飾により tRNA の構造の違いについての知見を得るために、得られた tRNA の結晶構造解析を試みた。結晶化スクリーニングの結果、リチウムイオンおよび PEG6000 を含む結晶化条件下で調製した tRNA の結晶を得る事ができた (図 3)。さらに、大型放射光施設にて X 線回折実験を行い、6Å 程度の分解能の回折を確認した。さらに、修飾による構造変化を議論するために、in vitro 転写により、修飾のない tRNA(Met)も調製し、その結晶も作製した。大型放射光施設にて X 線回折実験を行い、分解能 3.2Å の回折データを得る事ができた。得られた結晶の結晶学的パラメータは P2(1)2(1)2(1) a = 64.8 Å, b = 85.6 Å, c=94.2 Å であった。

12



図 2. tRNA(Met)の UREA PAGE の結果  
 レーン 1：生体外で合成した tRNA(Met)  
 レーン 2：大腸菌内から調製した tRNA(Met)



図 3. 大腸菌内から調製した tRNA(Met) の結晶

一連の実験を通し、野生型よりも高いアフィニティを持つ変異体を用いる事の有用性を示すことができた点は、本研究の大きな成果と考えている。また、研究開始当初は、大腸菌から精製した tRNA は修飾が均一ではなく、良好な結晶は得られないのではないかとこの可能性を危惧していたが、結晶を得ることができるということを示せた点も、大きな成果と言える。

平成 25 年度は、セレン導入蛋白質と tRNA の複合体に注目し、その解析を目指した。この蛋白質は tRNA(Gln), tRNA(Glu), tRNA(Lys) を基質とするため、これらの共発現系を構築した。tRNA の発現ベクターには pET22b, 蛋白質の発現には pCOLA を用いた。大腸菌中で形成した複合体を精製し、Urea PAGE により解析した結果、非常に高純度の tRNA が得られた。詳細についての知見を得るために、蛋白質-tRNA 複合体の結晶化を行ったところ、PEG3350 を含む条件下で結晶が得られた。クライオプロテクタントの添加などの結晶化条件の最適化の末、4Å の分解能の X 線回折データを収集する事に成功した。格子定数は  $a=90, b=104, c=130$   $\alpha=90, \beta=108, \gamma=90$  である事がわかった。分子置換法による構造解析を試みたが、有意な解は得られなかった。解析に向け、今後、良質な結晶を得る必要がある。

期間全体を通し、TmcA(K205A)変異体を用いた tRNA(Met)の調製系、およびセレン導入蛋白質を用いた tRNA(Gln), tRNA(Glu), tRNA(Lys)の調製系を構築した。これらの RNA はいずれも、Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いて大腸菌破砕液から簡便に得る事ができ、本研究の有用性が示された。さらに、生体内から得られたこれらの成熟 tRNA の詳細な解析に向け、各々の tRNA の結晶化および初期 X 線回折データの収集を行った。構造解析には至らなかったが、結晶学的パラメータを決定する事ができた。詳細な構造解析に向け、今後は、これらの結晶の改良を進める必要がある。

##### 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 9 件)

1. Nozomi Asano, Haruka Atsuumi, Akiyoshi Nakamura, Yoshikazu Tanaka, Isao Tanaka,

Min Yao, Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 1251-1256 (2014), 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2013.12.143

2. Takeshi Hayashi, Yoshikazu Tanaka, Naoki Sakai, Ui Okada, Min Yao, Nobuhisa Watanabe, Tomohiro Tamura and Isao Tanaka, SCO4008, a Putative TetR Transcriptional Repressor from *Streptomyces coelicolor* A3 (2), Regulates Transcription of *sco4007* by Multidrug Recognition, *J. Mol. Biol.* 425, 3289-3300 (2013), 査読有

DOI:10.1016/j.jmb.2013.06.013

3. Takeshi Hayashi, Yoshikazu Tanaka, Naoki Sakai, Nobuhisa Watanabe, Tomohiro Tamura, Isao Tanaka, Min Yao, Structural and genomic DNA analysis of a putative transcription factor SCO5550 from *Streptomyces coelicolor* A3(2): Regulating the expression of gene *sco5551* as a transcriptional activator with a novel dimer shape, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 28-33 (2013), 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2013.04.017

4. Minghao Chen, Jian Yu, Yoshikazu Tanaka, Miyuki Tanaka, Isao Tanaka and Min Yao, Structure of dihydrouridine synthase C (DusC) from *Escherichia coli*, *Acta Cryst.* F69, 834-838 (2013), 査読有

DOI:10.1107/S1744309113019489

5. Takamitsu Miyafusa, Jose M. M. Caaveiro, Yoshikazu Tanaka and Kouhei Tsumoto, Crystal Structure of Enzyme CapF of *Staphylococcus aureus* Reveals a Unique Architecture Composed of Two Functional Domains, *Biochem J.* 443, 671-680 (2013), 査読有

DOI:10.1042/BJ20112049

6. Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Toshiaki Takei, Kouhei Tsumoto, Sumire Endo and Kazushi Kinbara, Application of photoactive yellow protein as a photoresponsive module for controlling hemolytic activity of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin, *Chem. Commun.* 48, 4737-4739 (2012), 査読有

DOI:10.1039/c2cc18118e

7. Kentaro Tsukamoto, Hideyuki Arimitsu, Sadayuki Ochi, Keiji Nakamura, Yoshikazu Tanaka, Nipawan Nuemket, Koki Taniguchi, Shunji Kozaki and Takao Tsuji, P19 embryonal carcinoma cells exhibit high sensitivity to botulinum type C and D/C mosaic neurotoxins, *Microbiol. and Immunol.* 56, 664-672 (2012), 査読有

DOI:10.1111/j.1348-0421.2012.00490.x

8. Zuoqi Gai, Yumie Kitagawa, Yoshikazu Tanaka, Nobutaka Shimizu, Keisuke Komoda, Isao Tanaka, Min Yao, The binding

mechanism of eIF2 $\beta$  with its partner proteins, eIF5 and eIF2B $\epsilon$ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 515-519 (2012), 査読有  
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.05.155

9. Shunsuke Kita, Yoshikazu Tanaka, Nagisa Hirano, Satoshi Kimura, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki, Min Yao, and Isao Tanaka, Crystal structure of a putative methyltransferase SAV1081 from *Staphylococcus aureus*, *Protein & Pept. Lett.* 20, 530-537 (2012), 査読有, DOI:なし

[学会発表] (計 1 件)

1. Zuoqi Gai, Akiyoshi Nakamura, Yoshikazu Tanaka, Nagisa Hirano, Isao Tanaka, and Min Yao, Crystal structure analysis of a DING protein, International life-science symposium for young scientists, 3 March (2014), Faculty of Science, Hokkaido University (Sapporo, Japan)

[その他]

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 良和 (TANAKA, Yoshikazu)  
北海道大学大学院先端生命科学研究院・  
准教授  
研究者番号 : 20374225

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし