

論文内容の要旨

論文題目 tRNA 修飾酵素 アーケオシン tRNA グアニン
トランスグリコシラーゼの機能・構造解析

氏名 石谷 隆一郎

tRNA, rRNA, snRNA 等の機能を持つ RNA には多種多様の修飾塩基 (ACGU 以外のヌクレオチド残基) が見出されているが, 生命現象におけるその意義が近年ようやく明らかにされつつある. 例えば真核生物の rRNA に非常に多く見出されるシュドウリジンなど, 多くの RNA 修飾の役割は不明であったが, 近年の研究からこれらの修飾塩基の一部は RNA の高次構造の形成と安定化に重要であることが明らかになってきた.

RNA の構造を安定化している修飾サイトは, 通常, RNA のドメイン間の相互作用など, 高次構造的な相互作用 (tertiary interaction) に関わっており, その結果, これらの修飾サイトは RNA の高次構造に埋もれて存在している. このような RNA の高次構造的な相互作用は, 比較的小さく単純な構造を持つ tRNA にも多く存在している. 特に, バリアブル・ループ, D アームの一部で構成される, tRNA の L 字型構造の中心部分 (コア; 図 1) には, 高次構造的な相互作用が形成されており, 多くの修飾塩基がこの「コア」に埋もれている. 従って, これらの高次構造を補強する修飾を行う tRNA 修飾酵素は, 最終的な折り畳みとは異なる構造を持つ, 標的サイトが露出した状態の tRNA を認識して修飾を行っている と推測

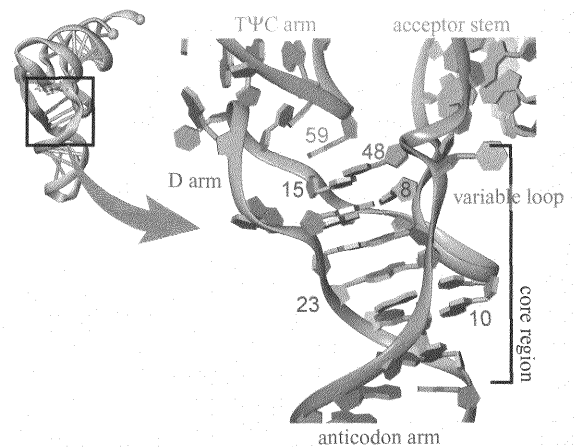


図 1. tRNA コアの構造

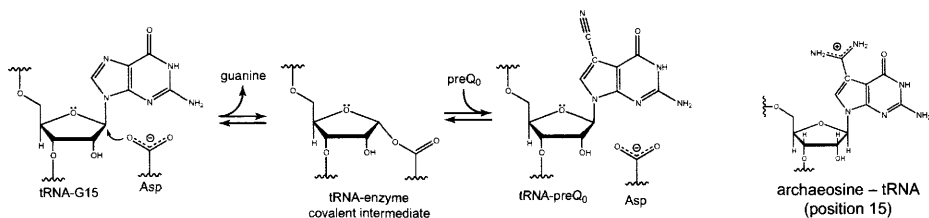


図 2. ArcTGT が触媒する塩基交換反応と、修飾塩基アーケオシンの化学構造

される。

アーケオシン (7-formamidino-7-deazaguanosine; 図 2) は、古細菌の tRNA の D ループ上 15 位に存在する修飾塩基である。D ループ上の 15 位はバリアブル・ループ上の 48 位と塩基対を形成し、さらに TΨC ループ上の 59 位とスタックしている (図 1)。そのため、アーケオシンはこれら 3 つのループ間の相互作用を補強する楔のような役割をしていると考えられている。

アーケオシン tRNA グアニントランスグリコシラーゼ (ArcTGT) は、このアーケオシンの tRNA への導入に関わっている修飾酵素である。ArcTGT はヌクレオチド残基の塩基部分のみをすげ替える「塩基交換反応」により、tRNA 15 位グアニル酸残基のグアニンとアーケオシン前駆体 preQ₀ 塩基を入れ替える (図 2)。さらに、tRNA 上に導入された preQ₀ にアンモニアが付加することで、アーケオシンが完成する。ArcTGT の標的サイトは tRNA のコア構造に埋もれており (図 1)、通常の L 字型状態の tRNA では、ArcTGT は標的サイトにアクセスすることが出来ない。そのため ArcTGT は何らかの構造変化を起こした tRNA に結合し、preQ₀ 塩基を導入していると推測される。tRNA の変異体解析の結果から、ArcTGT による tRNA 認識には正規の L 字型の構造は必要ではなく、高次構造の一部が形成できないような tRNA 変異体でも効率よく認識されることが分かっている。また、ArcTGT は tRNA の配列に関係なく、位置特異的に D ループ上の 15 位を認識して修飾を導入すると推測されているが、これらの具体的なメカニズムは不明であった。

このような構造変化を起こした RNA を位置特異的に認識するシステムは、ArcTGT に限らず、他の RNA 修飾システムにも存在する。例えば、真核生物の核小体において rRNA, snRNA の修飾に携わる snoRNP 複合体は、最終的な高次構造とは異なる構造を取った rRNA, snRNA を認識し、標的サイトを修飾する。さらに、snoRNP 複合体は位置特異的に標的サイトを認識することで、1 つのシステムにより、rRNA, snRNA に非常に多く存在する標的サイトに同様に修飾を導入することが出来る。ArcTGT による RNA 認識メカニズムの解明は、このような RNA 修飾システムの理解のための構造生物学的な基盤を与えるものと考えられる。

本論文では、まず、リガンド・フリー ArcTGT あるいは小分子リガンドとの複合体の X 線結晶構造解析を行い、ArcTGT によるグアニン等の小分子リガンドの認識機構を解明した。さらに、ArcTGT・tRNA 複合体の X 線結晶構造解析を行い、「tRNA 修飾酵素による構造変化した tRNA の認識機構」および、「蛋白質による位置特異的な核酸認識の機構」を立体構造に基づいて明らかにした。また、リガンド・フリー ArcTGT、小分子リガンドとの複合体、tRNA との複合体そ

それぞれの触媒サイトの構造を比較することで、塩基交換の反応機構についても議論した。

まず、非常に熱安定で構造解析に有利な超高度好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 ArcTGT の大量調製と結晶化を行った。大腸菌内で大量発現させた ArcTGT (発現系は東工大・生命理工・岡田研究室より恵与) を熱処理と3段階のカラムクロマトグラフィーにより精製したうえで、結晶化を試みた。その結果、シンクロトロン放射光 (SPring-8 BL44XU) を光源として最高で 2.0 Å 分解能程度まで回折する結晶を得ることに成功した。この結晶は空間群 $P4_32_12$ に属し、格子定数は $a=b=99.28$ Å, $c=363.74$ Å であった。さらに、ArcTGT セレノメチオニン置換体の大量調製と結晶化を行い、多波長異常分散法による位相決定を行った。最終的には、分解能 2.2 Å までの反射を用いて $R_{\text{work}} = 22.7\%$ ($R_{\text{free}} = 26.1\%$) まで構造精密化を行うことができた。また、ArcTGT の結晶にグアニン, preQ₀, グアノシン, デオキシグアノシン類似体 (東京医科歯科大・杉山弘先生より恵与) をそれぞれ浸潤させることで、各々のリガンドとの複合体の結晶構造を決定した。その結果、リガンド・フリー ArcTGT の構造では触媒部位付近の残基 97-106 が disorder していたが、小分子リガンドが結合することで構造変化が起こり、残基 97-106 は α ヘリックスを形成することが明らかになった(図3)。また、ArcTGT・リガンド複合体の構造と QueTGT・preQ₁ 複合体の構造と比較することで、ArcTGT と QueTGT のリガンド認識の違いが ArcTGT に特異的なヘリックス $\alpha 9$ により引き起こされていることを突き止めた。さらに、上記のリガンドとの複合体に加え、さらにグアノシン, デオキシグアノシン類似体との複合体の構造とも比較することで、求核触媒残基であると考えられてきた Asp95 が、塩基交換反応において酸塩基触媒として働いている可能性を示唆した。

一方、*P. horikoshii* 由来 tRNA^{Val}_{UAC} を、T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写反応とゲル

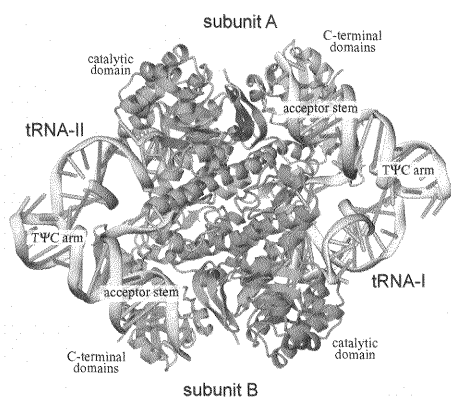


図4. ArcTGT・tRNA 複合体の全体構造。

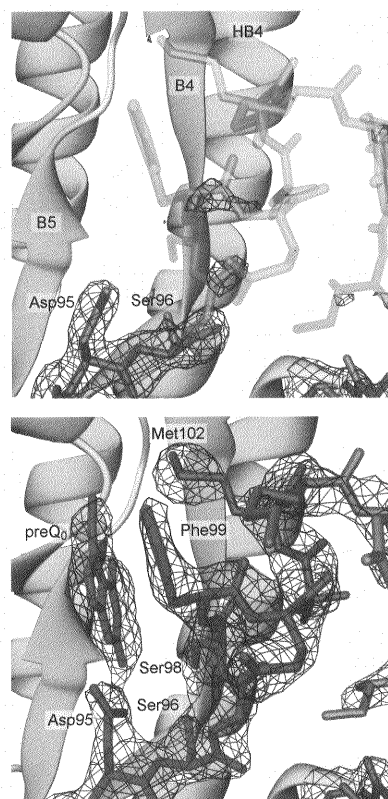


図3. リガンド・フリー ArcTGT (上図) と preQ₀ との複合体 (下図) における触媒サイトの構造。

精製により大量調製し、ArcTGT と複合体を形成させ結晶化を試みた。その結果、シンクロトロン放射光 (SPring-8 BL41XU) を光源として分解能 3.3 Å まで回折する結晶を得ることに成功した。この結晶は空間群 $R32$ に属し、格子定数は $a=b=230.8$ Å, $c=269.3$ Å ($\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$) であった。さらに上記のリガンド・フリー ArcTGT の構造をモデルとした分子置換法により位相決定を行った。最終的には、分解能 3.3 Å までの反射を

用いて $R_{\text{work}}=22.5\%$ ($R_{\text{free}}=28.8\%$) まで構造精密化を行うことができた (図4).

複合体の構造解析の結果, ArcTGT は大きく構造変化を起こした tRNA に結合することが明らかになった (図5). この構造変化した tRNA は, 単に変性してしまうのではなく, 修飾の標的部分が露出するように tRNA の 2 次構造, 3 次構造が組み変わった「オルタナティブ」な L 字型構造をとっていた. このオルタナティブ型 tRNA では, D アームの構造が完全に破壊され U8 位から U22 位が tRNA 本体から飛び出し, そのうち U8 位から U17 位が ArcTGT に認識されていた. 一方, 正規の L 字型 tRNA では D アームを中心にコア構造が構成されているが, オルタナティブ型 tRNA では, 元 D ステムの一部とバリエブル・ループにより新たなステム構造「VD ステム」が形成され, 新たなコア構造を形成していた. さらに, ArcTGT による配列非特異的かつ位置特異的な tRNA 15 位の認識は, tRNA バックボーン

の糖とリン酸を 1 残基ずつ認識することで達成されていた. すなわち, ArcTGT の C 末端ドメインは tRNA のアクセプター・ステムのバックボーンを正確に認識し, 飛び出した D アームの付け根の部分 U8 位を酵素に対して正確に位置づけていた. さらに ArcTGT は, U8 位から A14 位の (一本鎖になった RNA の) バックボーンを 1 残基ずつ認識し, ポリヌクレオチド鎖の長さを測ることで, 正確に G15 位を触媒部位に位置づけていた. ArcTGT の C 末端ドメインは真核生物・古細菌の RNA 修飾酵素に広く見出される PUA ドメインを含んでいる. PUA ドメインの機能は未知であったが, 本論文の構造解析の結果から, 位置特異的な tRNA 認識において, アクセプター・ステムを酵素に対して正確な位置に結合させるという重要な役割を担っていることが明らかになった. ArcTGT の PUA ドメインは rRNA, snRNA のシュードウリジン化に関わる snoRNP の触媒コンポーネントである Cbf5p の PUA ドメインと特に相同性が高く, Cbf5p の PUA ドメインも同様に RNA ステムを認識することで位置特異的な RNA 認識に関わっている可能性が示唆される. 一方, tRNA との複合体における ArcTGT の触媒部位の構造から, 保存された Asp249 残基が求核触媒残基である可能性が示された (図6). 変異体の活性測定の結果や, 他の類似の反応を触媒する酵素の触媒部位の構造などからも, Asp249 残基が求核触媒残基である可能性が強く示唆された.

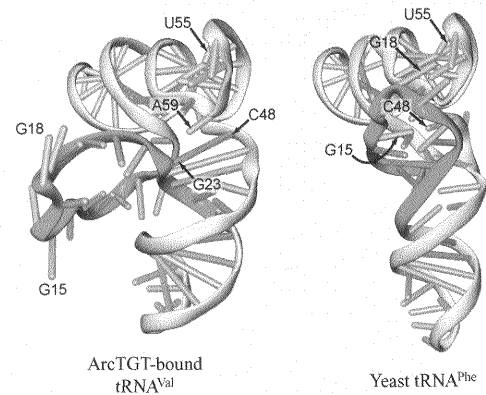


図5. ArcTGT に結合した tRNA の構造変化

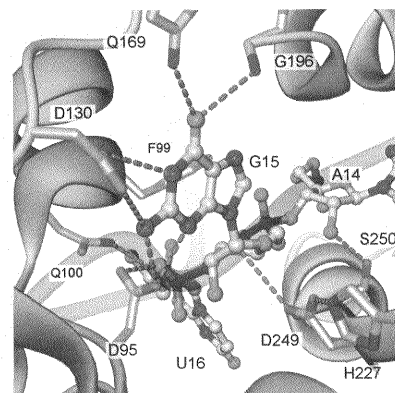


図6. ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造