

## 論文内容の要旨

論文題目      tRNA アンチコドン隣位 (37 位) に対する連続的な修飾反応機構に関する構造生物学的研究  
(Structural and functional analysis of the enzymes involved in the modification cascade on tRNA position 37, the position 3'-adjacent to the anticodon)

氏名            伊藤 (後藤) 桜子

mRNA 上の情報が正確にタンパク質へ翻訳されるためには、リボソーム上で mRNA 上のコドンと tRNA 上のアンチコドンとの正確な対合が不可欠である。3 文字のコドンと 3 文字のアンチコドンが正確に対合せずにフレームシフトが起こると、目的タンパク質が正しく合成されない。tRNA アンチコドン 3 文字目の 3' 側隣位 (tRNA 37 位) は、リボソーム上で、コドン 1 文字目とアンチコドン 3 文字目の対合に対してスタックする位置に存在する。tRNA 37 位の塩基は、非常に頻繁に tRNA 修飾酵素によって修飾されており、これらの修飾は、翻訳時のフレームシフトを防止するために重要であることが知られている。導入された修飾がフレームシフトを防止する機構には、概して次の 2 点が考えられている。まず、37 位の塩基において、塩基対形成を担う水素結合に関与する原子が修飾されることによって、37 位とコドン 1 文字目との誤った塩基対形成が防止されている。また、37 位には、しばしばかさ高い修飾が入ることが知られており、これらの修飾は、コドン 1 文字目とアンチコドン 3 文字目の対合にスタックして対合を強化したり、空間的な自由度を制限したりすることによってシフトを防止している。

私は、tRNA37 位のヌクレオシドに対する 2 つの tRNA 修飾酵素について、X 線結晶構造解析を基盤とした研究を行った。TRM5 は 37 位のグアノシン (以下 G37) の N1 原子にメチル基を付加する酵素である (図 1)。TRM5 が触媒する修飾 (以下 m<sup>1</sup>G37) は、真核生物と古細菌においては、37 位がグアノシンであるほぼ全ての tRNA に導入される。m<sup>1</sup>G37 が導入された複数種の

tRNA のうちの一部の tRNA については、更に TYW1 以下 4 つの酵素が連続的に働いて、m<sup>1</sup>G37 からワイ塩基と呼ばれるかさ高い 3 環性塩基群を導入する。私は、tRNA G37 に対するこの連続的な修飾反応に着目して、その連続反応の 1 番目と 2 番目の酵素である TRM5 と TYW1 の両者の立体構造を決定し、また、TRM5 については tRNA との複合体の立体構造も決定した。

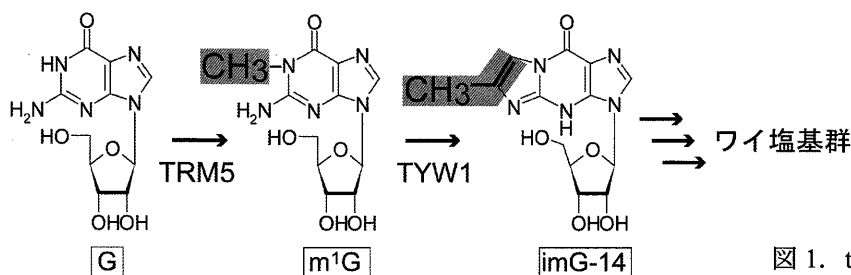


図 1. tRNA 37 位に対する修飾反応

## 1. TRM5

TRM5 は、メチル化酵素としては最も広く存在する I 型メチル化酵素に分類され、S-アデノシル-L-メチオニン（以下 AdoMet）をメチル基供与体として、基質へのメチル基転移反応を行う。本研究においては、超好熱古細菌 *M. jannaschii* 由来 TRM5（以下 *M. jannaschii* TRM5）と AdoMet のアナログ（sinefungin）との複合体の立体構造と、*M. jannaschii* TRM5 と *M. jannaschii* tRNA<sup>Leu</sup>, AdoMet の複合体の立体構造を、それぞれ分解能 2.2 Å, 2.8 Å で決定した。

*M. jannaschii* TRM5 は 3 つの立体構造ドメイン（D1, D2, D3）からなっていた（図 2）。D1 は種間でアミノ酸配列保存性が低い領域、D2 は種間でアミノ酸配列が保存されている領域、D3 は TRM5 のみならず I 型メチル化酵素間でアミノ酸配列が保存されている領域に相当していた。AdoMet または sinefungin の電子密度が D3 内に確認されて、TRM5 による AdoMet 認識機構が明らかになった（図 2 (d)）。

tRNA 認識の際に、TRM5 は大きな構造変化を起こすことが見出された。TRM5 単体の結晶構造においては、D1 は D3 と相互作用していたが、tRNA との複合体の結晶構造においては、D1 は D3 から離れて、D2-D3 に結合している tRNA に対して、別部位から結合していた。また、NMR 法を用いた解析により、D1 断片と D2-D3 断片はほとんど相互作用しないことがわかった。よって、生体内で、D1 は D2-D3 に対して独立に動いており、tRNA が D2-D3 に結合すると、D1 も tRNA に結合するように動くと考えられる。tRNA は、37 位が存在するアンチコドンループ部分の構造を緩めることによって、G37（図 2 (b) の緑色スティック）を活性部位に入れていた。G37 は tRNA 本体に対して外側にフリップしており、メチル基転移を受ける N1 原子が、AdoMet のメチル基に向かい合う位置に存在した。G37 が活性部位に入ると、単体構造で一定の構造をとって

いなかったループが、G37を活性部位に固定する形に構造をとり（図2(b)中に紫で示した）、ループ中のアルギニン残基145番が、37位の塩基を認識していた。D1は、L字型tRNAの中心構造（以下コア）を認識しており、tRNAが正確にL字型構造をとっていることを確認していると考えられる。

TRM5の全長とD2-D3のtRNAへのメチル基転移活性を調べた。メチル基供与体濃度が十分に高い条件で基質tRNAに対する反応速度定数を測ったところ、D2-D3は全長よりもtRNAに対する結合( $K_m$ 値)が7倍弱く、反応回転数( $k_{cat}$ 値)は13倍高いことがわかった。D1はコアに結合してD2-D3のtRNAに対する結合を強化し、同時に、L字型構造をとっていることを確認するために反応回転数を下げると考えられる。

以上の結果は、tRNAに対する修飾反応が、ランダムではなく秩序を保って行われている可能性を示す例として興味深い。 $m^1G37$ などの機能的な修飾は、立体構造維持のための修飾が行われたことを確認した上で初めて起こるような制御がなされているのかもしれない。

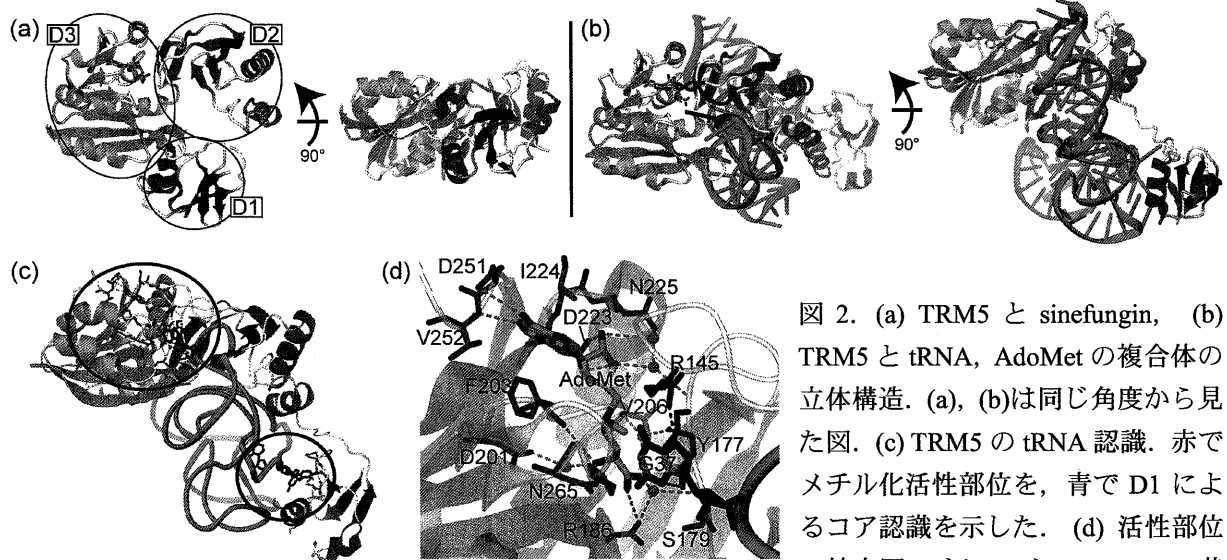


図2. (a) TRM5とsinefungin, (b) TRM5とtRNA, AdoMetの複合体の立体構造. (a), (b)は同じ角度から見た図. (c) TRM5のtRNA認識. 赤でメチル化活性部位を、青でD1によるコア認識を示した. (d) 活性部位の拡大図. オレンジでAdoMet, 黄緑でG37認識残基を示した.

## 2. TYW1

TYW1は、TRM5によって生成された $m^1G37$ を基質として、2つの炭素原子を導入する環化反応を触媒してワイ塩基の基本骨格を形成する酵素である。TYW1は、アミノ酸配列上ラジカルAdoMet酵素に分類される。ラジカルAdoMet酵素とは、活性中心に鉄硫黄クラスターとAdoMetを持ち、電子の受け渡しによって生じた5'-デオキシアデノシルラジカルが、基質をラジカル化することによって反応を触媒する酵素群である。古細菌ゲノムに対して、酵母TYW1配列をクエリ

一として配列探索を行ったところ、ほぼ全ての古細菌において、TYW1 のラジカル AdoMet ドメインと高い相同性を持つ配列が見つかった。本研究においては、超好熱古細菌 *P. horikoshii* 由来 TYW1 (以下 *P. horikoshii* TYW1) の立体構造を、分解能 2.2 Å で決定した。

*P. horikoshii* TYW1 は、ラジカル AdoMet 酵素立体構造の特徴である“変型  $(\alpha/\beta)_8$  バレル構造”をとっていた。バレルの内部に、3つのシステイン残基が向かい合う部位が2箇所見出された。これらはラジカル AdoMet 反応における電子の授受に必要な鉄硫黄クラスターを保持する部位であると考えられた (図3)。このうちの1箇所を構成する3つのシステイン残基は、保存配列 (CxxxCxxC) に相当している。もう1箇所を構成するシステイン残基は、アミノ酸配列上では離れており、これらのシステイン残基の側鎖が向かいあうことは立体構造を明らかにすることにより初めて見出された。嫌気性条件下で *P. horikoshii* TYW1 上での鉄硫黄クラスターの再構成を試みた。紫外可視スペクトルにおいて、450 nm 付近の吸収ピークが現れたことから、その再構成を確認した。更に、鉄硫黄クラスターを再構成した *P. horikoshii* TYW1 の結晶を用いた X 線回折実験によって、2 箇所のクラスター部位に鉄由来と考えられるピークが存在することを確認した。得られた鉄由来の電子密度に従って、また、他のラジカル AdoMet 酵素における鉄硫黄クラスター、AdoMet、基質の位置を参考にして、*P. horikoshii* TYW1 のクラスター部位に鉄硫黄クラスターと、AdoMet、tRNA 37 位のメチル化グアノシンを配置したモデルを作成した。更に、立体構造から明らかになった *P. horikoshii* の分子表面の性質 (電荷と保存性) を参考にして tRNA に対する結合モデルを作成した (図3 (b), (c))。基質である 37 位のメチル化グアノシンは、典型的なアンチコドンループ構造と比較して外側に引き出される必要があることが示唆された。

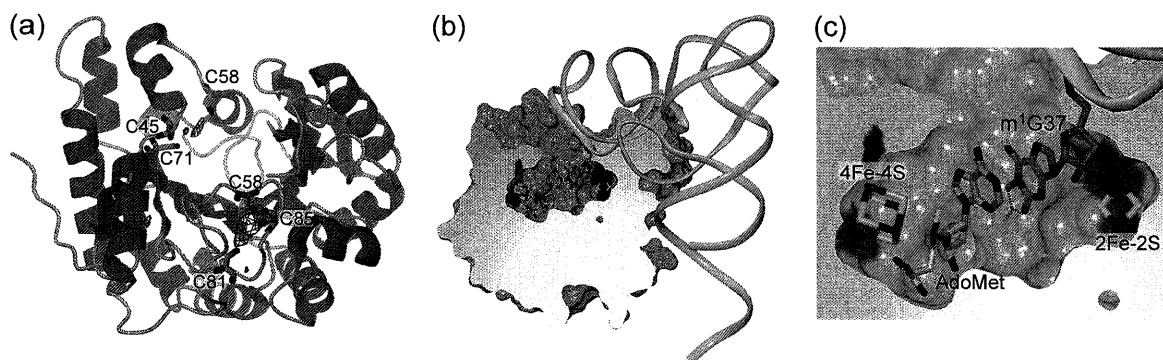


図3. (a)TYW1 立体構造. 鉄硫黄クラスターを示す異常分散マップ (3 $\sigma$ レベル) を赤で示した. (b)TYW1 と tRNA の複合体モデル. TYW1 は断面図で示した. (c) (b)の活性部位の拡大図. 鉄硫黄クラスターと AdoMet, m<sup>1</sup>G37 をモデルした.