

論文内容の要旨

論文題目 Structures of tRNA modification enzymes and their mechanisms ensuring accurate translation

(tRNA 修飾酵素群の立体構造および正確な翻訳を保障する機構)

氏名 倉谷 光央

tRNA はコドン配列に従ってアミノ酸を対応付ける分子で、転写後修飾を受ける。一般的にアンチコドンループ上の修飾塩基は機能面で、D、T 両ループ上など L 字型三次構造の内部に埋もれるものは構造面で重要である。コドン 3 文字目と対合する tRNA₃₄ 位には最も多種類の修飾塩基が存在する。幾つかの修飾は対合するコドンを変える性質を持ち、例えばコドン 3 文字目の A と G の区別は遺伝暗号を維持するために必須であるが、イノシン、リジン、シュードウリジンなどの修飾塩基導入により達成される。他にも修飾塩基は、正確なアミノアシル化を保障したり、フレームシフトを防止したりすることで正確な翻訳を維持する。そのため修飾が未完了の tRNA が翻訳系に入ると遺伝暗号を乱しうる。生体内で酵素が tRNA 修飾を完結する過程を解明するため、tRNA 修飾酵素の立体構造と、tRNA 構造が酵素活性に与える影響とを解析した。

真性細菌において、TadA は tRNA^{Arg}₃₄ 位のアデノシン残基を脱アミノ化してイノシンを導入する。*Aquifex aeolicus* 由来 TadA の X 線結晶構造を 1.8 Å 分解能で決定した。TadA は $\alpha/\beta/\alpha$ の三層構造をした 1 つのドメインから構成され、二量体を形成していた。構造既知のヌクレオチド類に働く脱アミノ化酵素と活性中心の構造は同一であり、亜鉛を用いた脱アミノ化機構を用いると考えられた。一方、TadA ではより大きな活性ポケットが二量体面に作られていた。酵母由来のシトシン脱アミノ化酵素では 3 本のヘリックス同士の相互作用によって二量体が形成されていたのに対し、TadA ではそのうち 1 本がループに置換してお

り、活性ポケットが広がっていた。活性ポケットの中には保存された残基が集まっており、これらが tRNA 結合に関わると推定して tRNA 結合モデルを作成した。

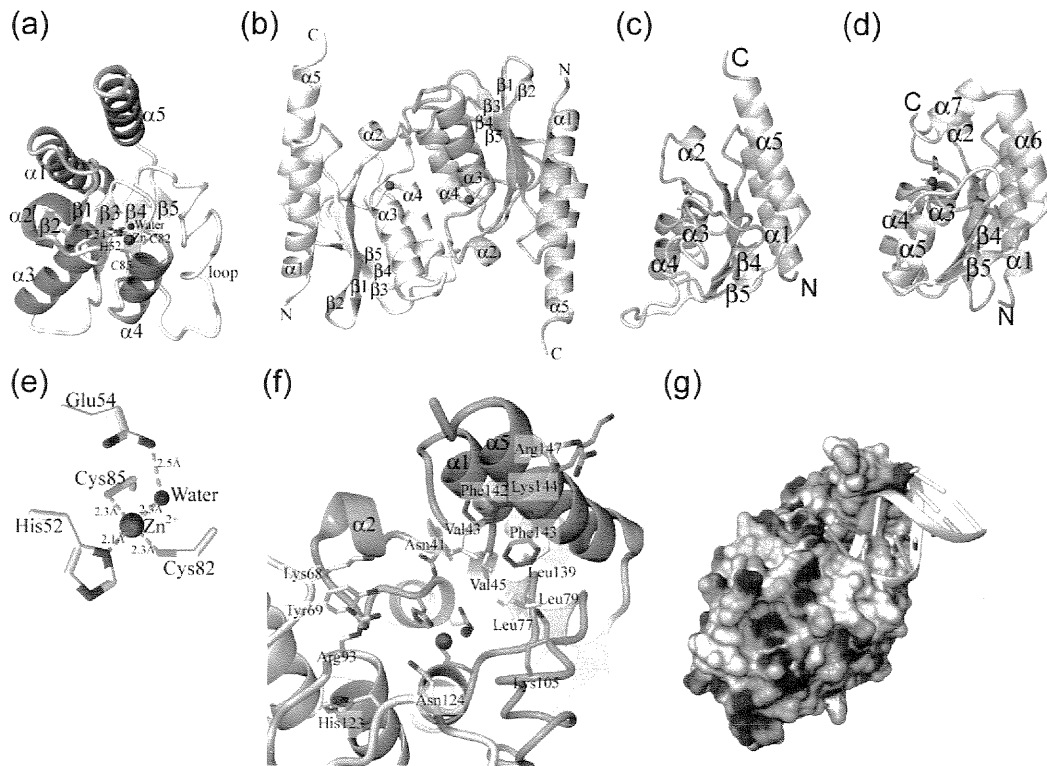


図1：TadAの結晶構造 (a) 単量体の構造。αヘリックスを水色、βシートを茶色で示す。(b) 二量体の構造、各サブユニットを水色と桃色で表した。(c, d) 単量体の構造比較。TadA(c)と酵母由来シトシン脱アミノ化酵素(d)。アミノ酸配列相同性が低いC端部分を緑色で、相同性が高いN端部分を桃色で表した。(e) 活性中心における亜鉛配位様式。水素結合を点線で表し、距離を併記した。(f) 活性ポケット内に存在する保存された残基。(g) tRNA (リボンモデルで示す) と、TadA (表面電荷モデルで示す) とのドッキングモデル。

真性細菌型の遺伝暗号を持つ真性細菌、ミトコンドリア等では、tRNA^{Leu}₂₃₄位のシチジン残基はリジンに修飾される。修飾酵素である Tils は N 型 ATP 加水分解酵素ファミリーに属し、一段階目の ATP を用いたシチジン残基のアデニル化、二段階目のリジン付加によりリジンを合成する。Tils の単体構造と、変異体実験に基づく保存残基の役割が既に報告されていた。本研究で Tils と基質 ATP、Mg²⁺、及びリジンとの複合体の X 線結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定した。Tils の N 端ドメインに活性部位があり 2 つの入り口を持つ。ATP、リジンはそれぞれ別々の入り口に結合していた。N 型 ATP 加水分解酵素間で共通の PP モチーフ内において、保存性の高いアスパラギン酸残基は Mg²⁺配位に関わることを示した。ATP のアデノシン部分の識別は他の N 型 ATP 加水分解酵素と同様であった。ATP のリン酸部分が Mg²⁺とは相互作用できない位置にあるなど、基質同士は離れて結合していたため、本構造は Tils による基質の初期結合状態を表すと考えた。Tils の単体構造、及び他の N 型 ATP 加水分解酵素との構造比較に基づき、tRNA が結合すると ATP のβ-及びγ-リン酸部分が tRNA とぶつかって反対側に移動する構造変化が起こり、Mg²⁺との相互作用が引き起こされる結

果リシジン合成の一段階目が開始すると考察した。二段階目のリシン付加反応に伴う構造変化についても推定した。

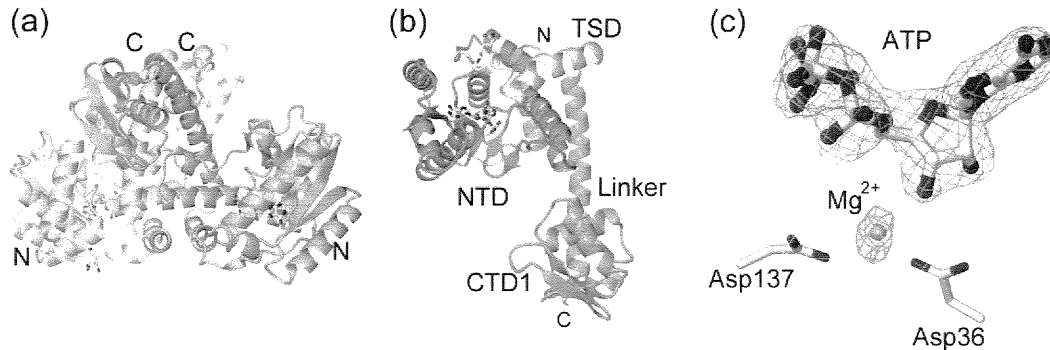


図 2: TiIS と基質 ATP、 Mg^{2+} 、及びリシンの複合体の立体構造

(a) TiIS の二量体構造、各サブユニットを水色と桃色で表す。(b) 単量体構造。ドメイン毎に色分けした。ATP 及びリシンはスティックモデルで表記した。(c) ATP (青、 5.5σ)、 Mg^{2+} (茶、 4σ) のオミット電子密度。 Mg^{2+} と Asp36、Asp137 の電子密度 (黄、 3σ) は連続していた。

TiIS の構造中、C253 と C312 との間にジスルフィド結合が存在していた。近年、*A. aeolicus* など高温で生育する幾つかの生物に限り、還元的な細胞質環境でもジスルフィド結合が維持され、タンパク質の構造安定化に寄与すると考えられつつある。C312A 変異体、C312S 変異体と野生型について、タンパク質の熱変性過程を示差走査型熱量計で測定した結果、野生型の変性中点は両変異体に比べて 18 度高かった。ジスルフィド結合による安定化のおかげで、TiIS は *A. aeolicus* の最高生育温度である 95 度でも変性しないと考えられる。

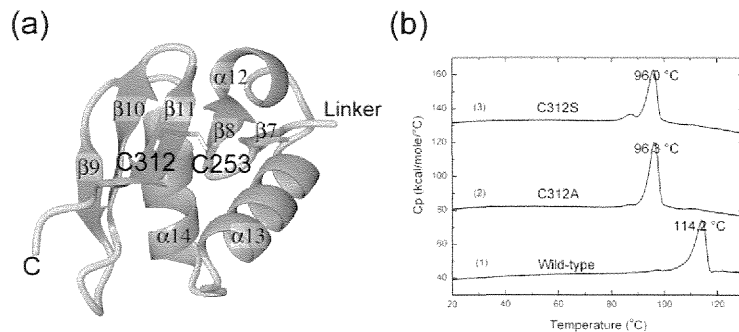


図 3: ジスルフィド結合による *A. aeolicus* TiIS 構造の安定化

(a) C 端ドメインの C253 と C312 との間に存在するジスルフィド結合を緑で示す。(b) 示差走査型熱量計による野生型、C312A、C312S 両変異体の熱変性曲線。変性中点の値も表示した。

転写直後の未修飾 tRNA の三次構造は崩れやすく、L 字型とほどけた構造を行き来しているが、成熟後に内部に埋もれるべき位置への修飾が蓄積するに伴い L 字型が安定化する。そのため崩れた状態の tRNA をよりよい基質とする修飾酵素は修飾過程の初期に、L 字型構造に効率よく修飾導入する酵素は後期に働くと考えられる。従って tRNA 構造が酵素活性に及ぼす影響を調べることで修飾過程を明らかにできると考えた。tRNA 構造変化の例として ArcTGT に結合した状態のラムダ型 tRNA が知られている。ラムダ型 tRNA への構造変化は T ループを露出させるため、T ループ上の残基に働く酵素の活性が影響を受ける可能性がある。TrmU54 と aTrm56 は、ともに *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet) を供与体として、T

ループ上の U54 と C56 をそれぞれメチル化する。L 字型 tRNA と、ArcTGT の存在下におけるラムダ型 tRNA を基質として活性測定した結果、ArcTGT により TrmU54 の活性は促進され、aTrm56 の活性は抑制された。aTrm56 と ArcTGT とを混合してゲル濾過にかけたところ両者は別々のピークとして溶出されたため、相互作用は aTrm56 の実効酵素濃度を低下させるほど強くなく、ArcTGT による活性抑制は tRNA の構造変化による間接的な影響であることが示唆された。一方、TrmU54 はゲル濾過の結果から、tRNA 存在下で ArcTGT と 3 者複合体を形成することが示された。これらの結果から TrmU54 は修飾初期に、aTrm56 は修飾後期に働くと考えられる。

aTrm56 は SpoU ファミリーに属する。SpoU ファミリーには 3 つの保存されたモチーフがあり、TrmH を用いた研究によりモチーフ内の幾つかの残基は活性に必須であることが示されているが、aTrm56 では一部分しか保存されていない。触媒機構について構造的な知見を得ることを目的として、aTrm56 と基質 AdoMet との複合体の X 線結晶構造を 2.48 Å 分解能で決定した。aTrm56 はノット構造を含む SPOUT ドメインとその C 端に付加されたβヘアピン構造とからなり、二量体を形成していた。AdoMet はノット構造の上に結合していた。AdoMet を含む活性ポケットは露出した T ループ全体を包みこむように結合するには浅すぎ、むしろ G19 と C56 塩基対がある L 字型の肩への結合に都合がよい深さだと考えられた。TrmH と構造を重ね合わせた結果、モチーフ I のアルギニン残基が aTrm56 では保存されていなかった。AdoMet の近傍に存在する aTrm56 の保存残基について、アラニン置換体を作成して活性測定を行なった。その結果 TrmH のアルギニン残基の位置と比較して、対応するαヘリックス上で 3 残基分上流にあるアルギニン残基が活性に必須であることが分かった。これらのアルギニン残基の側鎖は立体構造上類似した位置に存在するので、TrmH でも aTrm56 でも同様に働くと示唆される。

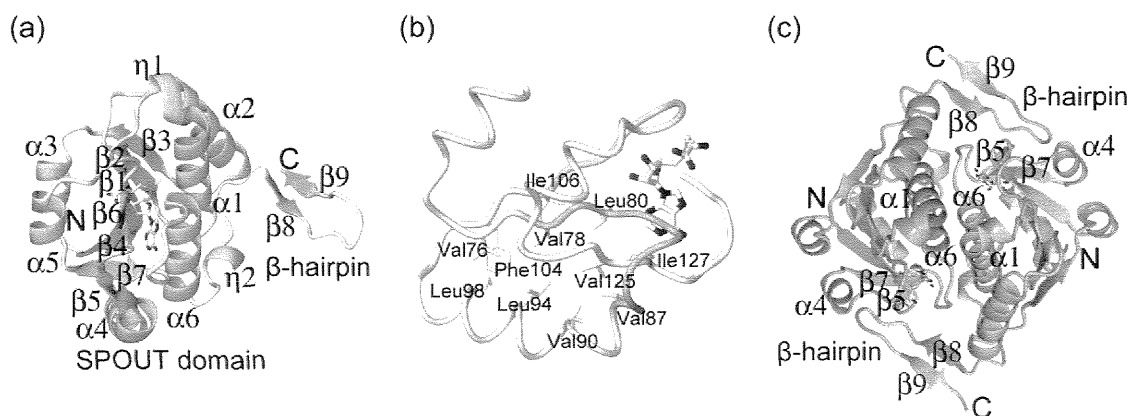


図 4 : aTrm56 の立体構造 (a) 単量体構造、αヘリックスを緑色、βシートを青色で示す。 (b) ノット構造と、その上での AdoMet の結合。AdoMet はスティックモデルで、aTrm56 はチューブモデルで示した。ノットの輪部分を桃色で、SpoU ファミリーで保存されたモチーフ II を緑色で示す。 (c) 二量体構造。両サブユニットを青色と桃色で示す。

総合して、tRNA 修飾酵素間の協調性、順序だった修飾過程が tRNA 修飾を完了させるために大事であることが示唆される。