

論文の内容の要旨

論文題目 tRNA 修飾酵素 TYW2 による AdoMet 依存的アミノカルボキシプロピル基転移
活性の構造的基盤

指導教員 濡木 理 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 17 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻
海津 正賢

【背景】

RNA の翻訳後修飾は生体反応の維持において大変重要な役割をもち、古細菌、原核生物、真核生物の 3 生物界において 100 以上もの異なった化学的修飾が存在することが報告されている。これらの化学的修飾の大部分は tRNA における修飾であり、様々な化学的特性を RNA 残基に対して付加している。とりわけ、tRNA のアンチコドン領域には、数々の翻訳後修飾を受けた塩基が存在しており、遺伝暗号翻訳の正確性保持に寄与していると考えられている。

ワイブトシン (yW) は三環構造と大きな側鎖を有する高次塩基修飾であり、真核生物のフェニルアラニル tRNA (tRNA^{Phe}) のアンチコドン 3' 側隣接部位である 37 位に存在する。yW は、リボソーム上のコドン・アンチコドン対合を強化することで翻訳の正確性に寄与し、フレームシフトを防ぐ役割を有している。近年の研究により、酵母における yW 生合成経路が S-アデノシルメチオニン (AdoMet) を補因子とする多段階反応であることが報告された。この反応は、AdoMet 依存 tRNA メチル化酵素 Trm5 により 37 位のグアノシンがメチル化され N¹-メチルグアノシン (m¹G) が合成されることに始まる。続いて、酵素 TYW1 (tRNA-yW-synthesizing protein 1) により、AdoMet 由来の 5'-デオキシアデノシルラジカルを反応開始因子とするラジカル連鎖反応を経て m¹G から三環構造を持つ imG-14 が合成された後、TYW2 により新たな環構造に AdoMet 由来の α -アミノ- α -カルボキシプロピル基 (acp 基) が付加され、塩基 yW-86 が合成される。さらに、TYW3 により、N4 位に対して AdoMet 依存的メチル化が起こり、yW-72 が合成される。最終段階では、TYW4 によるメチル化及びメトキシカルボニル化を経て、yW が合成される。

このうち、TYW2 は、メチル基供与体として代表的な補因子である AdoMet のメチル基ではなく acp 基を、三環構造をもつ塩基 imG-14 の C7 位に転移し大きな側鎖をもつ塩基 yW-86 を合成する。これまでの報告から、yW-86 による修飾は -1 フレームシフトを防ぐ重

要な働きを有していることが知られている。こうした AdoMet を補因子とした acp 基転移機構は、ジフサアミド、ノカルデシン、ジアシルグリセリルホモセリンなどの生合成過程においても報告されているが、その詳細な機構は未解明であった。

これまでに yW の誘導体であるワイオシン (Y) 塩基の存在は、様々な古細菌においても報告がなされている。さらには、真核生物 TYW1 及び TYW2 の遺伝子配列と高い相同性を持つものが古細菌のゲノム中に存在しており、これらの知見は、真核生物同様、古細菌においても、Y 誘導体塩基修飾が同様の機構により生成される可能性を示すものである。しかしながら、古細菌 tRNA^{Phe} のアンチコドン部位に Y 塩基が存在するという実験的報告はこれまでになく、古細菌ホモログタンパク質である TYW2 の生体系における役割は未解明であった。そこで、本研究では、古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 及び *Methanococcus jannaschii* 由来の TYW2 ホモログタンパク質に着目し、これらのタンパク質が真核生物同様に AdoMet の acp 基転移による yW-86 の合成を触媒するかを検証するとともに、X 線結晶構造解析により AdoMet を補因子とする acp 基転移機構についての詳細を原子レベルで明らかにすることを目的とした。

【古細菌 TYW2 による acp 基転移機構】

我々は、古細菌由来 TYW2 ホモログタンパク質 *P. horikoshii* PH0793 タンパク質及び *M. jannaschii* MJ1557 について、大腸菌を用いた大量発現系の構築、精製を行い、これらの古細菌ホモログタンパク質が、真核生物由来 TYW2 同様、AdoMet の acp 基を tRNA^{Phe}-imG-14 に転移する活性を有するかを LC/MS 解析を用いた *in vitro* での再構成実験により検証した。基質 tRNA には Δ TYW2 酵母株から精製したアンチコドン隣接部位 37 位に修飾塩基 imG-14 をもつ酵母 tRNA^{Phe}-imG-14 を用いた。本項目は、東京大学大学院工学系研究科の鈴木勉教授と野間章子博士に、LC/MS 解析による acp 基転移活性の測定をお願いし、共同研究として行われたものである。精製 PH0793 及び MJ1557 タンパク質を用いた再構成実験の結果、AdoMet 存在下において tRNA^{Phe}-imG-14 に AdoMet の acp 基が転移することにより生じる塩基である yW-86 に相当するピークが生成することを LC/MS 解析により確認した。これらのピークは、AdoMet 非存在下での再構成実験では生成しなかった。これらの結果から、古細菌由来 TYW2 ホモログタンパク質が、真核生物由来 TYW2 同様、AdoMet の acp 基を tRNA^{Phe}-imG-14 に転移する触媒活性を有することが示された。

さらに上記の結果が、AdoMet の acp 基の基質への転移に起因すべきものであることを検証すべく、acp 基が ¹⁴C 放射線同位体標識された AdoMet を用いて、PH0793 タンパク質による tRNA^{Phe}-imG-14 への acp 基転移活性を測定した。LC/MS による解析の結果と同様、PH0793 タンパク質は AdoMet の acp 基を基質 tRNA^{Phe}-imG-14 に転移する活性を有していることが示された。以上から、古細菌由来ホモログタンパク質 PH0793 及び MJ1557 が、真核生物由来 TYW2 同様、AdoMet の acp 基を tRNA^{Phe}-imG-14 に転移する活性を有することが明らかになった。本結果に基づき、*P. horikoshii* PH0793 タンパク質を PhTYW2、*M. jannaschii* MJ1557

タンパク質を MjTYW2 と名付ける。

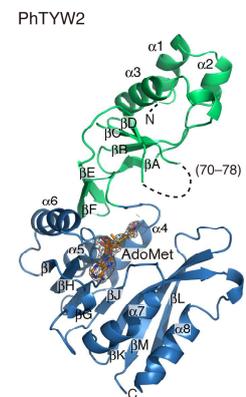
この結果は、ワイオシン誘導体が真核生物同様、古細菌由来 tRNA^{Phe} の 37 位にも存在する可能性を強く示唆するものである。これまで、古細菌 tRNA には修飾塩基 imG-14, imG, mimG, imG2 が存在することは知られていたが、yW-86 を含む C7 位に大きな側鎖を持つワイオシン誘導体の存在は報告されていない。興味深いことにワイオシン誘導体に特徴的な UV 吸収を示し yW-86 の分子量に一致する N₄₂₂ と名付けられた未確認のヌクレオチドが、ある種古細菌に存在することが報告されており、ヌクレオチド N₄₂₂ は、古細菌 TYW2 によって生成される yW-86 である可能性が高いと考えられる。本研究結果から、古細菌においても Y 塩基修飾が Phe コドンの-1 フレームシフトを防ぐ役割を有し、翻訳の正確性に寄与する可能性が高いことが示唆された。

【acp 基転移における構造生物学的基盤】

我々は、AdoMet を補因子とする acp 基転移の詳細な機構を解明するために、PhTYW2 及び MjTYW2 について、AdoMet またはその反応産物である MeSAdo との複合体状態で結晶化した。結晶化に用いたタンパク質は上記項目同様に精製した。サーチモデルとして既知の PhTYW2 アポ構造(PDB ID 2FRN)を用い、最終的に X 線回折実験から、PhTYW2-AdoMet 複合体、PhTYW2-MeSAdo 複合体、MjTYW2-AdoMet 複合体について、それぞれ、2.3 Å、2.5 Å、2.0 Å 分解能での構造決定に成功した。

PhTYW2 (図) 及び MjTYW2 の全体構造は、N 末端ドメイン及びメチルトランスフェラーゼ(MTase)構造をもつ C 末端ドメインの 2 つの領域からなる。補因子の種類及び付加による全体構造の大きな変化は見られなかった。MjTYW2 の全体構造は、PhTYW2 の全体構造と概ね類似の構造であったが、MjTYW2 の N 末端ドメインは、PhTYW2 の $\alpha 1, \alpha 2$ に相当する 2 つのヘリックスを欠いていた。また、PhTYW2 の $\alpha 3$ に相当する部分を含む領域及び PhTYW2 の βC と βD 間に相当するループは PhTYW2 複合体構造同様、部分的にディスオーダーしていた。DALI サーバーによる類似構造検索の結果、PhTYW2 及び MjTYW2 は、他の AdoMet 依存性のクラス I に分類される MTase と高い構造類似性を有しており、特に、PhTYW2 の C 末端ドメインは、*M. jannaschii* 由来 tRNA (m^1G37) MTase Trm5、*P. horikoshii* 由来新規 MTase PH1915 タンパク質、*E. coli* 由来 23S rRNA(m^5C) MTase Rlm1、*P. horikoshii* 由来 tRNA(m^2G26) dimethyltransferase Trm1 と非常によく似た構造であった。

PhTYW2-AdoMet 複合体及び MjTYW2-AdoMet 複合体構造において、C 末端の MTase 構造中のポケットに AdoMet に対応すると考えられる電子密度が存在していた。従来の MTase において AdoMet の結合に重要とされるモチーフ I-III が TYW2 においても保存されており、TYW2 の AdoMet アデニル環及びリボース部分はモチーフ I-III の残基により認識されていた。しかしながら、TYW2 における AdoMet の acp 基の認識機構は従来の MTase における



様式とは異なり、クラス I MTase において AdoMet の acp 基がはまりこむ窪み (M cavity) にメチル基を収容する一方、AdoMet の acp 基は基質結合部位近傍 (A cavity) に位置していた。さらに、TYW2 と高い構造類似性を有するメチル化酵素 Trm5 の活性部位との比較から、TYW2 における保存された残基：(1) M cavity における His/Tyr 残基、(2) ヘリックス $\alpha 5$ の Pro 残基、(3) A cavity を構成する Asn 及び Arg 残基、の存在が acp 基の転移活性に重要であると示唆された。また、これらの残基を Ala に置換した変異体 による acp 基転移活性測定を行ったところ、野生型に比べ acp 基転移活性が消失しており、上記の結論を指示する結果であった。

次に、我々は TYW2 に良く似た反応(補因子 dcAdoMet からの ap 基転移)を触媒するスペルミジン合成酵素 SPDS との構造比較を行った。SPDS においても、M cavity は保存された Asp 残基によって部分的に占められており ap 基を収容することが出来ない。その結果、ap 基は結合部位近傍に位置しており、dcAdoMet のメチル基ではなく ap 基を基質に転移することを可能にしていると考えられる。こうしたことから、M cavity に存在する保存された Asp は、TYW2 の M cavity における保存された His/Tyr によって、AdoMet が acp 基を転移しやすい結合様式をとると同様の役割を担っていると考えられた。

さらに、最近報告された Trm5 と tRNA 複合体結晶構造の知見に基づき、TYW2 と tRNA のドッキングモデルを構築し、TYW2 の N 末端ドメインの中心部に存在する正電荷領域が基質 tRNA のアンチコドンステムループの認識に関与する可能性を示唆した。また、変異体解析の結果から、N 末端ドメインのディスオーダーしているループ構造中に存在する保存された Arg 残基が tRNA の認識に重要であることが示唆された。

以上のことから、本研究では、古細菌における TYW2 ホモログ蛋白質が、AdoMet 依存的な acp 基の転移活性を有することを初めて示すとともに、古細菌 TYW2-AdoMet 複合体の X 線結晶構造解析により、TYW2 が従来の MTase とは異なり、メチル基でなく acp 基を転移する構造的基盤を明らかにした。しかしながら、TYW2 による基質 tRNA の認識機構については依然未解明の点も多い。今後、X 線結晶構造解析による TYW2 と AdoMet 及び基質 tRNA 複合体構造決定をめざし、TYW2 による基質 tRNA の認識機構の詳細を明らかにしていきたいと考えている。