

研究課題別評価書

1. 研究課題名

RNAによる生命反応制御機構の構造的基盤の解明

2. 氏名

沼田 倫征

3. 研究のねらい

遺伝情報の翻訳過程において、tRNAはmRNAにコードされたヌクレオチド配列情報をアミノ酸配列情報に変換するアダプター分子として機能する。従って、tRNAによる正しいコドンの認識は、適正な蛋白質を生合成する上で極めて重要である。tRNAによるコドンの認識は、コドン-アンチコドン間の塩基対の形成によりなされているが、その際、tRNAのアンチコドンに存在する修飾ヌクレオチドが、正しいコドンの認識に重要な役割を果たすことが知られている。特に、tRNAのアンチコドン-文字目に存在する修飾ヌクレオチドは、コドン第三塩基との対合に関わることから、コドンの縮重(揺らぎ)と密接に関わっている。5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンは、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応するtRNAのアンチコドン-文字目に存在する修飾ヌクレオチドであり、これらtRNAのアンチコドンが正確にコドンを認識し結合する上で不可欠である。つまり、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンは、リボソームにおける蛋白質合成反応において、誤ったアミノ酸の取り込みを抑制するという重要な役割を担っている。5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンの5位のカルボキシメチルアミノメチル化修飾には、二種の酵素(GidAとMnmE)が関与する。両酵素は複合体を形成することが知られており、さらに、葉酸(THF)化合物由来の炭素原子とグリシンがカルボキシメチルアミノメチル基の骨格を形成することが推定されている。しかしながら、その詳細な修飾反応メカニズムに関してはあまり理解されていない。本研究では、GidAとMnmEのX線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析から、カルボキシメチルアミノメチル化修飾反応における両酵素の役割を解明することを目的とする。

4. 研究成果

v(1) GidAの構造解析

本研究では、高度好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 GidA の結晶構造解析を行った。まず、GidA の大腸菌内における大量発現系を構築し、各種クロマトグラフィーを用いた精製スキームを確立した。精製した酵素を用いて結晶化条件をスクリーニングした結果、幾つかの条件で GidA の結晶を得ることに成功し、単波長異常分散法によってその結晶構造を決定した(図 1a)。その結果、GidA にはフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が補酵素として結合しており、変異体解析と併せ FAD のフラビン環結合部位周辺が GidA の活性部位であることが明らかとなった(図 1b)。FAD 結合部位近傍には種間で高度に保存されたシステイン(Cys48)が存在していた(図 1b)。Cys48 をセリンに置換した変異体を作製し、gidA 欠損大腸菌変異株を用いた *in vivo* 相補実験から、Cys48 がカルボキシメチルアミノメチル化反応において触媒残基として機能することを明らかにした。

カルボキシメチルアミノメチル化反応には GidA および MnmE が関与し、両酵素は複合体を形成することが報告されている。しかしながら、tRNA が両酵素とそれぞれ相互作用するのか、また、どちらか一方の酵素のみと特異的に相互作用するのかは明らかではない。そこでゲルシフト解析を行ったところ、tRNA が GidA と強固に相互作用することが明らかとなり、GidA と MnmE が形成する複合体において、GidA が主に tRNA との結合に関わることを示唆した。GidA には活性部位を中心とした広範な塩基性領域が存在しており、変異体解析から、この塩基性領域が tRNA との結合に関わるということが明らかとなった。これらの結果から、修飾反応過程において tRNA のアンチコドン-文字目のウリジンが、触媒に関わる Cys48 の近傍に配置されることが予想され、GidA がチミジル酸合成酵素と類似の反応メカニズムでウリジンの5位を修飾することを示唆した。

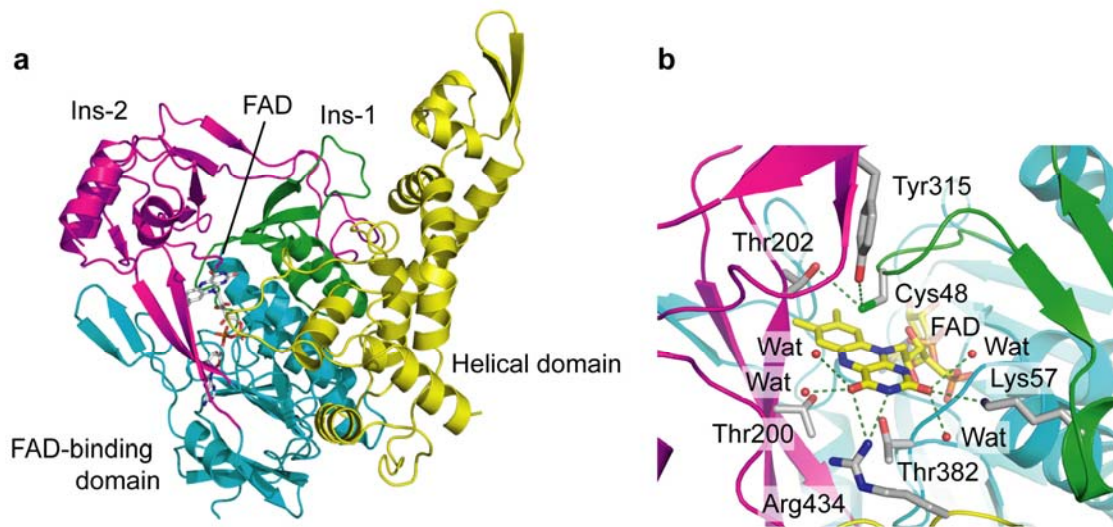


図 1. GidA の結晶構造。全体構造(a)と活性部位の詳細構造(b)を示す。FAD のフラビン環の上に位置する Cys48 が触媒残基である。

(2) MnmE の構造解析

高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 MnmE を大量精製、結晶化し、その結晶構造を決定した(図 2a)。構造解析の結果、MnmE は三つのドメイン(N 末端ドメイン、ヘリカルドメイン、GTPase ドメイン)から構成されており、N 末端ドメインを介して二量体化することが明らかとなった。立体構造の相同性から、MnmE の二量体化した N 末端ドメインの構造は、THF 結合モジュールと類似することが明らかとなった。構造を詳細に解析した結果、N 末端ドメイン同士が会合する分子境界付近に、深いクレフトが形成されており、そのクレフトに強い電子密度が観察された。N 末端ドメインが THF 結合モジュールと類似していること、さらに、カルボキシメチルアミノメチル化修飾には THF 誘導体が炭素源として利用されることを勘案すると、この電子密度の正体がカルボキシメチルアミノメチル化修飾に利用される THF 化合物であることが推定された。そこで、質量分析法によって、MnmE に結合している物質を解析したところ、5,10-メチレン THF 及びその分解産物である THF が検出された。これらの結果より、カルボキシメチルアミノメチル化修飾には 5,10-メチレン THF が基

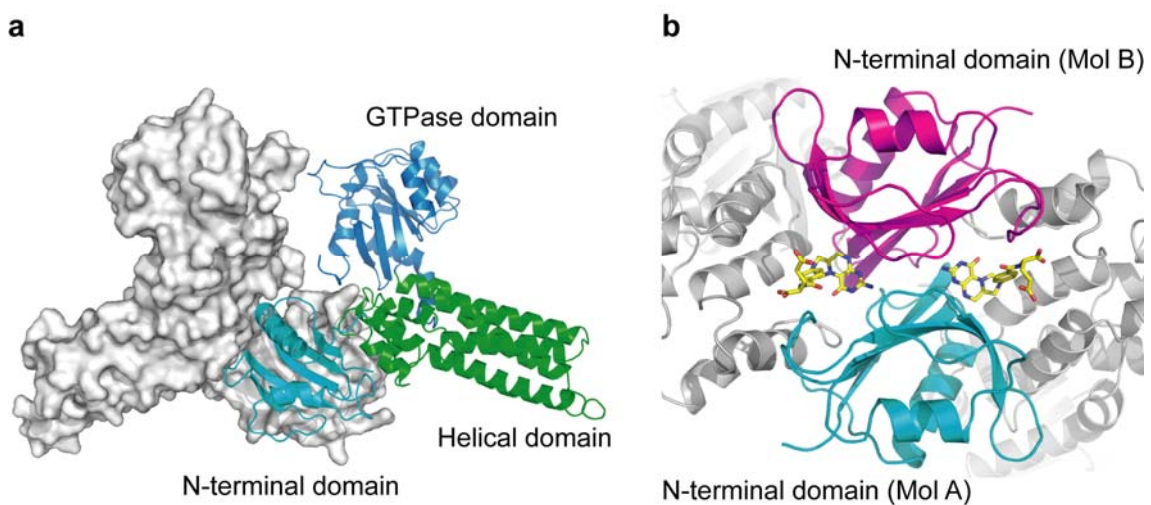


図 2. MnmE の結晶構造。(a) MnmE の二量体構造。N 末端ドメインを介して二量体化している。(b) 5,10-メチレン THF との相互作用部位。

質として利用されることを示唆した。また、MnmE の結晶を 5,10-メチレン THF を含む溶液に浸潤させ、複合体の結晶構造を決定するとともに(図 2b)、*mnmE* 欠損大腸菌変異株を用いた *in vivo* 相補実験から、5,10-メチレン THF 近傍に位置する保存されたリジン残基が、カルボキシメチルアミノメチル化修飾に不可欠であることを示した。ただ、このリジン残基の役割は、現段階では明らかになっておらず、その解明は今後の大きな課題である。

(3) カルボキシメチルアミノメチル化修飾における GidA と MnmE の役割

これまでに、カルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる GidA と MnmE は複合体を形成すること、また最近になって、カルボキシメチルアミノメチル基の骨格は 5,10-メチレン THF 由来のメチレン炭素とグリシンから構成されることが報告されている。しかしながら、如何にして tRNA アンチコドン1文字目のウリジンに、このような非常に複雑な側鎖を導入しているのかといった機構は明らかではない。本研究における GidA と MnmE の構造機能解析から、(i) 主に GidA が tRNA との相互作用に関わること、(ii) GidA の触媒部位においてチミジル酸合成酵素と類似の反応メカニズムでウリジンの 5 位を修飾すること、(iii) MnmE に 5,10-メチレン THF が結合することが明らかとなっている。これらの結果に基づき以下の考察を行った。まず、MnmE の活性部位においてグリシンと 5,10-メチレン THF が反応し、イミン誘導体(カルボキシメチルアミノメチル基前駆体)を形成する。次いで、このイミン誘導体が GidA の触媒部位に輸送され、ウリジンに取り込まれて 5-カルボキシメチルアミノメチルウリジンが生成する。この仮説を検証するためには、GidA と MnmE との複合体の結晶構造を決定する必要があるが、現在のところ、良質な複合体結晶が得られておらず、その解明は今後の課題である。

5. 自己評価

tRNA アンチコドン1文字目のカルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる酵素 GidA と MnmE の構造機能解析を通して、これら酵素の役割を明らかにし、新しい反応メカニズムを提唱できたことは評価できると考えられる。しかし、その反応メカニズムを検証するためには、さらに様々な実験が必要であり、特に、GidA と MnmE との複合体構造さらには tRNA も含む三者複合体の構造情報の取得が不可欠である。これまでに複合体構造を解析すべく、その結晶化を行ってきたが、構造解析に適した良質な複合体結晶は得られていない。今後も引き続き果敢に結晶化に取り組み、複合体構造を決定することによって、反応機構を明らかにしたいと考えている。また当初、さきがけ研究では、tRNA の修飾メカニズムの解明に加えて、ncRNA や RNP の結晶構造解析も進める予定であった。しかしながら、これらについては結晶までは作製できたものの、分解能が悪く、結果として結晶構造を決定することが出来なかった。この点においては、当初の目標をあまり達成できておらず、反省すべき点である。

6. 研究総括の見解

mRNA 上のコドン認識には、tRNA 上のアンチコドンによる正しいコドン認識が求められる。その際、tRNA のアンチコドンに存在する修飾ヌクレオシドが、正しいコドンの認識に重要な役割を果たすことが知られている。特に、tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシドは、コドンの第三塩基との対合に関わるので、コドンの揺らぎと密接に関わっている。本研究では、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応する tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシド、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンの形成反応メカニズムを解明する目的で、関与する二種類の酵素(GidA と MnmE)のX線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った。その結果、主に GidA が tRNA との相互作用に関わること、GidA は触媒部位においてチミジル酸合成酵素と類似のメカニズムでウリジンの5位を修飾すること、MnmE に 5,10-メチレン THF が結合することなどを明らかにした。この成果により、新しい反応メカニズムを提唱することが出来たことは評価出来る。今後は、これら両酵素の複合体結晶、さらには tRNA も加えた三者複合体結晶を得て、さらなる解析を行い、検証する必要がある。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表 * Corresponding author

1. Osawa, T., Ito, K., Inanaga, H., Nureki, O., Tomita, K. and **Numata, T.*** (2009) Conserved cysteine residues of GidA are essential for biogenesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine at tRNA anticodon. *Structure* **17**, 713-724.
2. Osawa, T., Inanaga, H. and **Numata, T.*** (2009) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the tRNA-modification enzyme GidA from *Aquifex aeolicus*. *Acta Crystallogr. Sect. F* **65**, 508-511.

(2) 受賞

1. 財団法人手島工業教育資金団 平成 18 年度手島記念研究賞 (平成 19 年 2 月 28 日)

(3) 学会発表

1. 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNA 揺らぎ塩基の修飾に関わる酵素の構造機能解析(1)」日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡、2009 年 3 月
2. 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNA アンチコドンの修飾に関わる酵素 GidA において保存されているシステインは 5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン生合成に不可欠である」第 9 回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009 年 5 月

(B) 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ikeuchi, Y., Kimura, S., **Numata, T.**, Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T. and Suzuki, T. (2010) Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 277-282