

RNA 修飾酵素の結晶構造解析 Crystal structure analysis of RNA modification enzyme

沼田倫征*, 大澤拓生

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, 〒305-8566 つくば市東 1-1-1

Tomoyuki Numata and Takuo Osawa

Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan.

1 はじめに

原核生物には、イソロイシンコドン (AUU, AUC, AUA) に対応する二種類の tRNA (tRNA^{Ile1} と tRNA^{Ile2}) が存在する。この内、AUA コドンを解読する tRNA^{Ile2} のアンチコドン配列 (CAU) は、メチオニンコドン (AUG) を解読する tRNA^{Met} のアンチコドン配列と同じであり、AUG コドンと配列相補的な関係にある。このため、未修飾の tRNA^{Ile2} は、メチオニンコドンを誤って解読する。この誤翻訳を防止し、tRNA^{Ile2} のアンチコドンと AUA コドンが正しく塩基対合できるよう、アンチコドン 1 文字目のシチジン (C34) は転写後修飾される。古細菌では、C34 がアグマチンで修飾され 2-アグマチニルシチジン (agm²C) として存在する (図 1a) [1]。agm²C は酵素 TiaS によって ATP 依存的に形成される[1]。しかしながら、TiaS には一次構造上、既知の ATP 結合モチーフが存在せず、修飾反応を触媒する仕組みは不明であった。本研究では、agm²C 形成機構の解明を目的に、TiaS の構造機能解析を行った[2,3]。

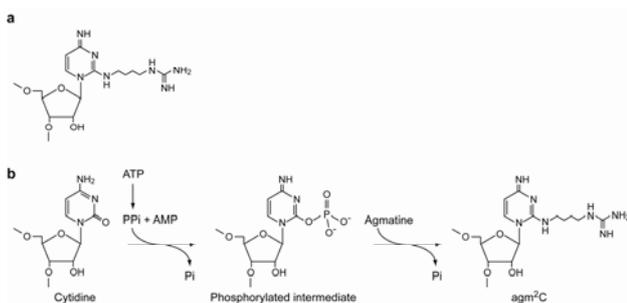


図 1: 2-アグマチニルシチジン(agm²C)の化学構造と生合成反応スキーム

2 実験

大腸菌 C41(DE3)株を宿主として、古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 TiaS の組換えタンパク質を調製した。また、T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写によって *A. fulgidus* 由来 tRNA^{Ile2} を合成した。得られたサンプルを用いて、TiaS, tRNA^{Ile2}, ATP からなる 3 者複合体の結晶および TiaS, tRNA^{Ile2}, AMPcPP (非加水分解性 ATP アナログ), アグマチ

ンからなる 4 者複合体の結晶を調製した。Photon Factory の BL-17A にて回折実験を行い、まず、セレンメチオニン標識タンパク質を用いた単波長異常分散法によって TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP 複合体 (3 者複合体) の結晶構造を 2.9Å 分解能で決定した。次に、TiaS-tRNA^{Ile2}-AMPcPP-アグマチン複合体 (4 者複合体) の結晶構造を分解能 3.1Å で決定した。

3 結果および考察

3 者複合体の結晶構造から、TiaS は TCK ドメイン、FL ドメイン、OB ドメイン、ZR ドメインから構成されており、ATP は TCK ドメインに結合していることが明らかとなった (図 2)。また、生化学的な実験から、TiaS は ATP を AMP とピロリン酸に加水分解し、生じたピロリン酸の ATP γ リン酸に由来するリン酸基を使って C34 の 2 位カルボニル基をリン酸化し活性化することが明らかとなった (図 1b) [4]。ATP の三リン酸周辺には、保存された三つのアスパラギン酸残基が存在し、これらを Ala に置換した変異体では、ATP の加水分解活性および agm²C 合成活性がともに消失していた。以上の結果より、TCK ドメインは TiaS の触媒ドメインであり、C34 のリン酸化に関わることが明らかとなった。

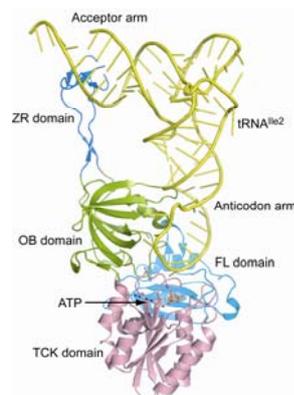


図 2: TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP 複合体 (3 者複合体) の結晶構造

本研究では、3 者複合体構造に加え、TiaS、tRNA^{Ile2}、AMPcPP およびアグマチンからなる 4 者複合体の結晶構造も決定した。興味深いことに、3 者

複合体と 4 者複合体の構造では、C34 の結合位置がアグマチンの有無で異なっていた (図 3)。3 者複合体の構造では、C34 は FL ドメインに形成されたポケットに配置され、ATP の γ リン酸から距離にして 10Å 程度離れた場所に結合していた。一方、4 者複合体の構造では、FL ドメインに形成されたポケットにアグマチンが結合し、C34 は AMPcPP の γ リン酸近傍に配置されていた。したがって、 γ リン酸基のすぐ近くに C34 が配置された 4 者複合体の構造は、まさに C34 をリン酸化する直前の状態と考えることができる。これに対して、ATP γ リン酸から C34 が隔離されている 3 者複合体の構造は、C34 のリン酸化が起こりえない non-productive な状態と考えることができる。

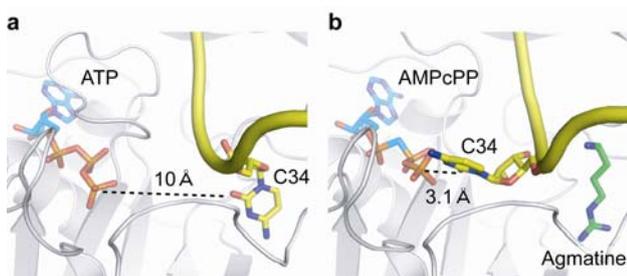


図 3: 3 者複合体(a)と 4 者複合体 (b)における活性部位の構造の比較

(i) 3 者複合体と 4 者複合体構造の比較、(ii) アグマチンと $tRNA^{Ile2}$ の推定される細胞内濃度、そして、(iii) TiaS のアグマチンや $tRNA^{Ile2}$ に対する親和性を考慮すると、TiaS は $tRNA^{Ile2}$ と相互作用する前に既にアグマチンと結合しており、 $tRNA^{Ile2}$ が結合すると同時に C34 は ATP γ リン酸の近傍に配置され、4 者複合体にみられる“リン酸化前状態”の構造をとると考えられる。一方、アグマチンの供給が追いつかない場合に限り、TiaS は C34 を FL ドメインに形成されたポケットに一時的に捕らえ、C34 を ATP から隔離することでリン酸化中間体の形成を抑制していると思われる。TiaS はアグマチンが存在しない場合でも ATP を加水分解することから、常に C34 をリン酸化しうる能力を持つ[4]。したがって、アグマチンが不足する条件下で、3 者複合体構造にみられる“C34 捕捉状態”を形成することは、リン酸化中間体の蓄積を防止するという観点から重要な意味を持つ。また、この場合、アグマチンの供給に伴ってアンチコドン領域の構造が変化し、C34 が ATP の γ リン酸近傍に配置されると考えられる。いずれの場合においても、アグマチンが結合することによって C34 が活性部位に配置され、リン酸化に適した構造を形成する。C34 はリン酸化された後、アグマチンの近傍に移動してくることが予想され、その場において、アグマチンがリン酸化 C34 を求核攻撃して agm^2C が形成すると考えられる。

4 まとめ

TiaS- $tRNA^{Ile2}$ -ATP 複合体 (3 者複合体) と TiaS- $tRNA^{Ile2}$ -AMPcPP-アグマチン複合体 (4 者複合体) の結晶構造を決定し、ATP を使って $tRNA^{Ile2}$ をアグマチンで化学修飾するしくみを解明した。

謝辞

X 線回折データの収集にあたり、数多くの技術的支援を賜りました PF ビームラインスタッフの皆様 に感謝いたします。

参考文献

- [1] Y. Ikeuchi *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **6**, 277-282 (2010).
- [2] T. Osawa *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. F* **67**, 1414-1416 (2011).
- [3] T. Osawa *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1275-1280 (2011).
- [4] N. Terasaka *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1268-1274 (2011).

成果

- 1 平成 25 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
- 2 平成 26 年度 農芸化学奨励賞

* t-numata@aist.go.jp