

## tRNA 修飾酵素の結晶構造解析 Crystal structure analysis of tRNA 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

$N^6$ -スレオニルカルバモイルアデノシン ( $t^6A$ ) は、ANN コドンを読取る tRNA の 37 位に存在する修飾ヌクレオシドで、ほぼ全ての生物に保存されており、tRNA のアミノアシル化やコドンの正確な認識など、タンパク質合成過程において重要な役割を担っていると考えられていた。しかしながら、最近になり、 $t^6A$  はさらに脱水環化されサイクリック  $t^6A$  ( $ct^6A$ ) として存在していることが分かり、 $t^6A$  ではなく  $ct^6A$  が遺伝暗号の読取過程において重要な役割を果たすことが明らかとなっている[1]。CsdL は ATP 依存的に  $t^6A$  を脱水環化して  $ct^6A$  を形成する酵素であり、そのアミノ酸配列はユビキチン活性化酵素 E1 とよく類似している[1]。ユビキチン活性化酵素 E1 は ATP を用いてユビキチンの C 末端をアデニル化し活性化する。したがって、CsdL は類似したしくみで  $t^6A$  を活性化すると推定される。しかしながら、CsdL が基質 tRNA を認識するしくみや反応機構などはよく分かっていない。本研究では、 $ct^6A$  形成機構を解明することを目的に、CsdL の結晶構造を解析した。

### 2 実験

大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を宿主として、CsdL の組換えタンパク質を調製した。得られたサンプルを用いて、結晶化条件をスクリーニングし、CsdL 単体の結晶を得た。PF の BL-17A において結晶の回折データを測定した。まず、ユビキチン活性化酵素 E1 をサーチモデルとした分子置換法によって、結晶の位相を決定しようと試みたが、この方法では CsdL の結晶構造を決定することはできなかった。そこで次に、大腸菌 B834(DE3)株を宿主として、セレノメチオン置換体タンパク質を調製した。ネイティブタンパク質と同様の条件で、セレノメチオン置換体タンパク質の結晶を調製し、単波長異常分散法によって結晶の位相を決定した。最終的に、ネイティブデータを用い、分解能 2.0 Å で CsdL 単体の結晶構造を決定した。続いて、CsdL の結晶を、ATP を含んだリザーバー溶液に浸潤し複合体を形成させ、CsdL-ATP 複合体の結晶構造を分解能 1.9 Å で決定した。

### 3 結果および考察

構造を解析した結果、CsdL はシングルドメインタンパク質であり、2 量体を形成することが判明した。CsdL の構造は N 末端領域および C 末端領域に分割することができ、N 末端領域はユビキチン活性化酵素 E1 の N 末端側の構造と非常に類似していることが明らかとなった。また、この N 末端側の領域は、ユビキチン活性化酵素 E1 と同様に、CsdL の 2 量体化に関わっている。一方、CsdL の C 末端領域の構造は、ユビキチン活性化酵素 E1 の C 末端領域の構造とは全く類似性を示さなかった。したがって、CsdL は、CsdL に特有の C 末端領域を用いて、基質 tRNA と特異的に相互作用することが推定された。

ATP との複合体の結晶構造を解析した結果、N 末端領域に存在するグリシンリッチモチーフの近傍に ATP が結合しており、ユビキチン活性化酵素 E1 と同じ位置で ATP と相互作用していた。CsdL における ATP の結合様式は、ユビキチン活性化酵素 E1 が ATP を認識するしくみとよく類似していた。したがって、CsdL はユビキチン活性化酵素 E1 と同様、基質 tRNA の目的部位をアデニル化して活性化することが強く示唆された。

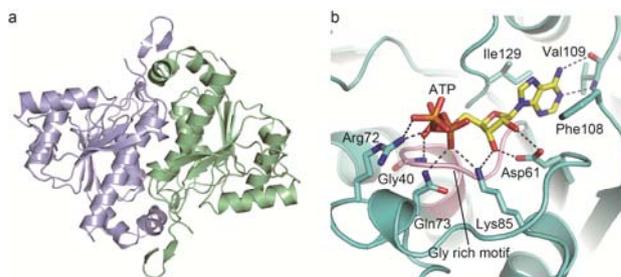


図 1: CsdL の結晶構造。  
(a): CsdL の 2 量体構造。  
(b): CsdL と ATP との相互作用機構。

### 4 まとめ

CsdL 単体および CsdL-ATP 複合体の結晶構造を決定した。CsdL の構造は、ユビキチン活性化酵素 E1 と類似した N 末端領域と全く類似性のない C 末端領域に分けることができる。N 末端領域は 2 量体化および ATP との相互作用に関わり、ユビキチン活性化

酵素 E1 と類似の機構（アデニル化）により、tRNA を活性化することが推定される。一方、ユビキチン活性化酵素 E1 と類似性を示さない C 末端領域は tRNA との結合に関わることが推定される。

#### 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] K. Miyauchi *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **9**, 105-111 (2013).

\* t-numata@aist.go.jp