



tRNA 転写後修飾メカニズムの分子的基盤解明

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 主任研究員 沼田 倫 征

はじめに

遺伝情報の発現過程において、mRNA上のコドンはtRNAを介して対応するアミノ酸へと解読される。つまり、tRNAはコドンというヌクレオチド配列の情報をアミノ酸へと変換するためのアダプター分子として機能している。遺伝暗号を正確に解読するには、tRNAのアンチコドンが、対応するコドンのみを特異的に認識しなければならない。その際、tRNAのアンチコドン1文字目に存在する修飾ヌクレオチドが、正しいコドン-アンチコドン塩基対合の形成において不可欠であることが知られている。すなわち、アンチコドン1文字目の修飾ヌクレオチドは、正しいコドンの認識、ひいては正確なタンパク質合成を保証するという重要な役割を担っている。筆者らは、遺伝暗号を正確に解読する際に重要な役割を担うtRNAアンチコドン1文字目の転写後修飾に着目し、その反応機構の解明を目的に研究を行ってきた。

1. 2-チオウリジンの形成機構

グルタミン酸、リジン、グルタミンtRNAのアンチコドン1文字目のウリジン(U34)は、全ての生物において修飾を受け2-チオウリジン(s^2U)となる(図1A)。 s^2U は、これら3つのtRNAが、特異的なアミノアシルtRNA合成酵素によってアミノアシル化される際の認識部位として機能するとともに、tRNAのアンチコドンがmRNA上のコドンと正確に対合するために不可欠である。また、この修飾が欠損するとヒトでは重篤な疾患を引き起こすことが知られている。ウリジンに導入される硫黄は遊離システインに由来しており、過酸化硫黄(触媒システイン残基に硫黄原子が付加した状態)となって硫黄伝達タンパク質間を移動し、tRNAチオ化修飾酵素に転移する。大腸菌では酵素MnmAがtRNAのチオ化反応を触媒するが、硫黄原子をtRNAの目的部位に導入するしくみはこれまで解明されていない。筆者らは、MnmAとtRNAとの複合体の結晶構造解析とそれに基づいた変異体解析により、U34への硫黄転移反応メカニズムを解明した。

MnmAとtRNA^{Glu}との複合体を結晶化したところ、晶系の異なる二つの複合体結晶(晶系IとII)が得られ、それらの構造をそれぞれ決定した(図2)。MnmAは3つのドメインからなり、tRNAのアンチコドンアームおよびDステムと相補的な構造をとることで、tRNAと相互作用していた。さらに、

MnmAは基質となるtRNAのアンチコドン1文字目と2文字目のウラシルを水素結合によって認識することにより、他のtRNAから3つのtRNAのみを特異的に識別することを明らかにした。

MnmAのN-末端ドメインにはATP結合モチーフが存在していたことから、tRNAのチオ化修飾反応がATP依存であることが推定された。そこで、MnmAをtRNAおよびATPとの3者複合体で結晶化したところ、晶系が全く異なる結晶(晶系III)を得た。その結晶構造を決定した結果、その構造はU34の2位カルボニル酸素にアデニル基が付加した反応中間体であることが明らかとなった。また、活性部位には保存された2つのシステイン残基(Cys102とCys199)が存在しており、これらを各々セリンに置換した変異体はtRNAに対するチオ化修飾活性を消失していた。2つのシステインの空間的配置と変異体を用いた生化学的な解析から、Cys199が硫黄伝達システムから硫黄を受け取り、過酸化硫黄となることで、さらに、この硫黄がアデニル化中間体を求核攻撃することで、 s^2U が形成するという反応機構モデルを提唱した。

一連の構造解析において、筆者らは、結晶系が異なる3つの構造を決定した。これらの構造を比較した結果、活性部位近くに存在する酵素の“可変部位”と名づけた領域が、晶系Iでは α ヘリックスを、一方、晶系IIとIIIでは β ヘアピン構造を形成しており、反応の進行と構造変化が密接に関連していることを見出した。これらの構造を吟味し、晶系IはtRNAと酵素が結合した初期の状態、晶系IIはアデニル化反応直前の状態を反映しており、その後、アデニル化反応中間体(晶系III)を経て、チオ化修飾反応が進行することを示唆した。酵素側の構造変化に加えてU34の構造も変化しており、初期結合状態では、U34はGln151と水素結合することによって、2位のカルボニル酸素が反応からブロックされているが、アデニル化反応前に

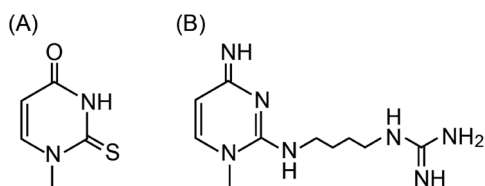


図1 2-チオウリジン(A)と2-アグマチニルシチジン(B)の化学構造

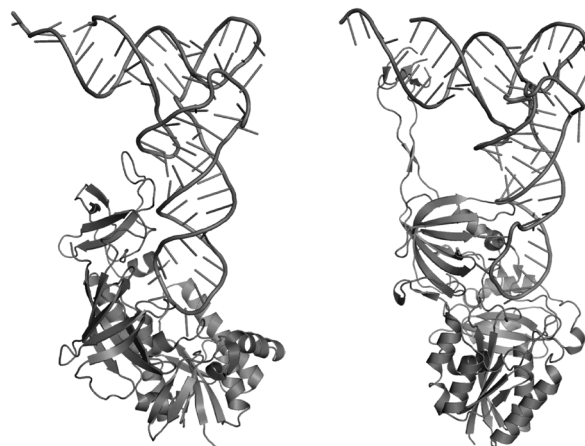


図2 MnmA-tRNA^{Glu}複合体(晶系I)の結晶構造

図3 TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP複合体の結晶構造

なると、酵素の構造変化に伴って塩基が約120°回転し、反応を受けやすい構造をとることが明らかとなった。MnmAの“可変部位”は反応の進行に伴い α ヘリックスから β ヘアピン構造へと転移し、酵素の活性部位はtRNAがアクセスしやすい“開いた構造”から化学反応に適した“閉じた構造”へと変化すると考えられ、硫黄転移反応時には、“閉じた構造”を形成することによって、過硫化硫黄を溶媒から隔離し、正確なチオ化反応を遂行できる環境を作っていることが示唆された。

2. 2-アグマチニルシチジンの形成機構

原核生物において、イソロイシンのAUAコドンはtRNA^{Ile2}により解読される。tRNA^{Ile2}のアンチコドンの配列はCAUであり、メチオニンコドンと配列相補的である。このため、修飾を受けていないtRNA^{Ile2}は、メチオニンコドンを誤って解読してしまう。この誤った翻訳を防止すべく、アンチコドン1文字目のシチジン(C34)は転写後修飾され、その結果、tRNA^{Ile2}がAUAコドンを正しく認識できるようになる。真正細菌では、C34がリジンで修飾されることが20年以上も前から明らかとなっており、その反応を触媒する酵素も同定されている。一方、アーキアにおける修飾形態は長い間謎のままであったが、最近になりポリアミンの一種であるアグマチンで修飾され2-アグマチニルシチジン(agm²C)に変換されていることが明らかとなった(図1B)。agm²CはtRNA^{Ile2}のAUAコドンの認識に不可欠であると同時に、イソロイシルtRNA合成酵素がtRNA^{Ile2}をアミノアシル化する際の認識部位として機能することも報告されている。修飾されていないtRNA^{Ile2}はメチオニルtRNA合成酵素によって誤ってアミノアシル化されることから、agm²CはtRNA^{Ile2}のイソロイシン受容能およびAUAコドン特異性を決定する重要な修飾ヌクレオシドであり、正しいタンパク質合成に欠かすことができない。agm²Cの形成は、酵素TiaSがATP依存的に触媒する。しかしながら、そのアミノ酸配列中には既知のATP結合モチーフが存在せず、反応を触媒するしくみは不明であった。そこで、TiaSの構造機能解析を通して、tRNA^{Ile2}にアグマチンが導入されるしくみの解明を試みた。

TiaS, tRNA^{Ile2}, ATPからなる3者複合体の結晶を調製し、その複合体構造を決定した(図3)。TiaSは4つのドメイン(ドメインI-IV)から構成されており、tRNAのアンチコドンアームはドメインI, II, IIIと、一方、アクセプターシステムはドメインIVと相互作用していた。また、ATPはドメインIに結合していた。さらに、構造に基づいた変異体解析の結果、TiaSのドメインIVとアクセプターシステムとの特異的な水素結合が、tRNA^{Ile2}特異性に重要であることが分かった。

次に、生化学的な実験から、TiaSが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を明らかにした。3者複合体において、ATPの周辺には保存された3つのAsp残基が配置されていた。これらをAla残基に置換した変異体では、ATPの加水分解活性およびagm²C形成活性がともに消失しており、ドメインIがC34のリン酸化に関わることが示唆された。しかしながら、3

者複合体において、C34はATPの γ リン酸から10Åも離れた位置(ドメインII)に結合していた。これは、3者複合体構造がC34のリン酸化反応を触媒できないことを意味する。では、いったいTiaSはC34をどのようにリン酸化しているのだろうか？

そこで、TiaS, tRNA^{Ile2}, AMPcPP, アグマチンからなる4者複合体の結晶構造を決定した。二つの構造を比較したところ、4者複合体中におけるアグマチンの結合部位は、3者複合体中におけるC34の結合部位と完全にオーバーラップしていることが明らかとなった。その結果、4者複合体中では、C34がドメインIIに結合できず、AMPcPPのすぐ近くに配置されることが分かり、この部位でTiaSがC34をリン酸化すると結論付けた。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と予想され、その場において、アグマチンがリン酸化C34を求核攻撃しagm²Cが形成すると考えられる。

おわりに

RNAはたった4種類の塩基から構成された比較的単純な生体高分子であるが、生物はそれを転写後修飾することで化学的な多様性をもたらす。特に、tRNAアンチコドン領域に含まれる修飾ヌクレオシドは正確なコドンの認識という点において、非常に重要な役割を担っている。本研究では、s²Uやagm²Cといった修飾ヌクレオシドが形成されるしくみを解明しており、正しいタンパク質合成を可能にするという生物にとって極めて重要なシステムの一部を明らかにしたものである。

謝辞 本研究は、東京工業大学大学院生命理工学研究科ならびに産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門にて行われたものです。本研究を行う機会を与えていただくとともに、終始多大なご指導、ご鞭撻をいただきました東京大学教授・濡木 理先生に深甚なる感謝の意を表します。本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご支援くださいました東京大学教授・鈴木勉先生に厚く御礼申し上げます。学生時代よりご指導、ご鞭撻いただきました九州大学名誉教授・山崎信行先生に心より御礼申し上げます。本奨励賞にご推薦くださいました学生時代の恩師である九州大学教授・木村 誠先生に深く御礼申し上げます。また、木村 誠先生には、公私にわたり多くの激励とご支援を賜るとともに、研究の楽しさについてご指導いただき、私がライフワークとして研究職を選択するきっかけを与えていただきました。この場をお借りして、心より御礼申し上げます。タンパク質の結晶構造解析に関して丁寧にご指導いただきました九州大学准教授・角田佳充先生、東京大学准教授・深井周也先生に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行に多大なご協力をいただきました当研究室の大澤拓生博士、稲永英子氏、そして、東京大学・鈴木 勉教授研究室の池内与志穂博士、木村聡博士、寺坂尚紘氏に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、多くのご助言を賜るとともに、研究室の立ち上げにおいて研究資金面で多大なご支援をいただきました科学技術振興機構さきがけ「RNAと生体機能」の関係者の皆様、特に、東京大学名誉教授・野本明男先生ならびにアドバイザーの先生方に心より御礼申し上げます。