

学位論文(要約)

ヒト核酸結合タンパク質の結晶構造解析  
(Structural analyses of human nucleic acid binding proteins)

平成 25 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

加藤 めぐみ

指導教員 濡木 理

## Abstract

核酸結合タンパク質は生体内で多様な役割を担っており、生命現象の根幹を担っているといっても過言ではない。本研究では、翻訳の正確性に寄与する核酸結合タンパク質である tRNA 修飾酵素 TYW5 および病原微生物由来の構成成分を認識するパターン認識受容体である DDX41 に着目し、X 線結晶構造解析を用いて、構造及び機能を解明することを目指した。

### ・ tRNA 修飾酵素 TYW5 の X 線結晶構造解析

ワイブトシンは真核生物の tRNA<sup>Phe</sup> のアンチコドン隣接部位である 37 位に存在する高次修飾塩基であり翻訳の正確性に寄与している。ワイブトシン誘導体は真核生物から古細菌まで広く存在し、多くの種特異的な分子構造を持っている。さらに、ヒトを含む一部の真核生物には、より高度な修飾をうけたヒドロキシワイブトシンの存在が知られていたが、詳しい反応機構は長らく未解明のままであった。近年、鉄イオン Fe(II) と 2-オキソグルタル酸 (2-OG) 依存的にヒドロキシワイブトシンを合成する新規酵素 TYW5 が発見された。本研究では、アポ型および補因子結合型の TYW5 の結晶構造をそれぞれ 2.5 及び 2.8 Å 分解能で決定した。TYW5 の触媒ドメインは jmjC を有するタンパク質に特徴的なβ-ジェリーロール構造を有していた。また TYW5 は C 末端側のヘリックスバンドルを介して二量体をとっており、この二量体化によって形成された正に帯電した大きなパッチが tRNA 結合に関与していることが示唆された。類縁の jmjC ドメインを有するタンパク質との構造比較および構造に基づいた変異体解析の結果、TYW5 による tRNA 認識には保存された Arg 残基が重要であることが示唆された。

### ・ DDX41 の結晶構造解析

cyclic-diGMP (c-diGMP) はヌクレオチドが 2 つのリン酸ジエステル結合により結合した環状構造をとる小分子で、細菌ではセカンドメッセンジャーとして機能することが報告されている。さらに近年、DEAD-box 型ヘリケースである DDX41 が細菌感染によって生じた c-diGMP を直接認識し、ER 上に存在する受容体 STING 依存的な経路を活性化し、I 型インターフェロンの産生に関与することが明らかになった。本研究では X 線結晶構造解析を用いて、DDX41 による c-diGMP 認識及びシグナル伝達反応機構の解明を目指した。現在までにコンストラクションの改変及び発現・精製系の確立を行い、

得られたタンパク質を用いて結晶化スクリーニングを行った。最終的にヒト由来 DDX41 DEADc ドメインにおいて分解能 3 Å を超えるデータセットを与える結晶を得た。

Nucleic acid binding proteins plays a variety of fundamental roles in the cell. In this study, I focused on the tRNA modification enzyme, TYW5, which contributes to an accurate translation, and intracellular pathogen sensor DDX41, aiming to unravel the structure and function of nucleic acid binding proteins using X-ray crystal structure analysis.

• Structural analysis of tRNA modification enzyme, TYW5

Wybutosine (yW) is a hypermodified nucleoside found in position 37 of tRNA<sup>Phe</sup>, and is essential for correct phenylalanine codon translation. yW derivatives widely exist in eukaryotes and archaea, and their chemical structures have many species-specific variations. Among them, its hydroxylated derivative, hydroxywybutosine (OHyW), is found in eukaryotes including human, but the modification mechanism remains unknown. Recently, we identified a novel Jumonji C (JmjC)-domain-containing protein, TYW5 (tRNA yW-synthesizing enzyme 5), which forms the OHyW nucleoside by carbon hydroxylation, using Fe(II) ion and 2-oxoglutarate (2-OG) as cofactors. In this work, we present the crystal structures of human TYW5 (hTYW5) in the free and complex forms with 2-OG and Ni(II) ion at 2.5 and 2.8 Å resolutions, respectively. The structure revealed that the catalytic domain consists of a β-jellyroll fold, a hallmark of the JmjC domains and other Fe(II)/2-OG oxygenases. hTYW5 forms a homodimer through C-terminal helix bundle formation, thereby presenting a large, positively-charged patch involved in tRNA binding. A comparison with the structures of other JmjC-domain-containing proteins suggested a mechanism for substrate nucleotide recognition. Functional analyses of structure-based mutants revealed the essential conserved Arg residues participating in tRNA recognition by TYW5.

• Structural analysis of intracellular pathogen sensor, DDX41

cyclic-diGMP (c-diGMP) is a small cyclic molecule, which two guanine bases linked in a heterocyclic configuration via two phosphodiester bonds, acting as a secondary messengers in bacteria. Recent study revealed that DEAD-box helicase, DDX41 is a main intracellular sensor that directly binds to c-diGMP and trigger the type I interferon host immune response via

STING. In this study, to reveal the detailed c-diGMP recognition and signal transduction mechanism, we tried structural analysis of DDX41 DEADc domain which plays a major role in c-diGMP recognition. Initially, we established the expression and purification methods of human DDX41. Next, we searched for crystallization conditions and then optimized it. Finally, we obtained the crystal of DDX41 DEADc domain by sitting drop vapor diffusion crystallization method, and it provide over 3 Å resolution diffraction image.



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、非公開

## 略号，記号

### アミノ酸の略号

A, Ala	alanine	アラニン
C, Cys	cystein	システイン
D, Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
E, Glu	glutamic acid	グルタミン酸
F, Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
G, Gly	glysinie	グリシン
H, His	histidine	ヒスチジン
I, Ile	isoleucine	イソロイシン
K, Lys	lysine	リジン
L, Leu	leucine	ロイシン
M, Met	methionine	メチオニン
N, Asn	asparagine	アスパラギン
P, Pro	proline	プロリン
Q, Gln	glutamine	グルタミン
R, Arg	arginine	アルギニン
S, Ser	serine	セリン
T, Thr	threonine	スレオニン
V, Val	valine	バリン
W, Trp	tryptophan	トリプトファン
Y, Tyr	tyrosine	チロシン

### 核酸の略号

A	adenosine	アデノシン
C	cytidine	シチジン
G	guanosine	グアノシン
U	uridine	ウリジン
yW	wybutosine	ワイブトシン
OHyW	hydroxywybutosine	ヒドロキシワイブトシン
o <sub>2</sub> yW	hydroperoxywybutosine	ヒドロペロキシワイブトシン
OHyW*	undermodified hydroxywybutosine	中間体ヒドロキシワイブトシン
imG-14	demethylwyosine	イソワイオシン
m <sup>1</sup> G	1-methylguanosine	1-メチルグアノシン
yW-86	yW minus 86	
yW-72	yW minus 72	

その他の略号・第一章

DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
tRNA	transfer RNA	転移 RNA
mRNA	messenger RNA	伝達 RNA
rRNA	ribosomal RNA	リボソーム RNA
ncRNA	non-coding RNA	ノンコーディング RNA
snRNA	small nuclear RNA	核内低分子 RNA
snoRNA	small nucleolar RNA	核小体低分子 RNA
AdoMet	S-adenosyl-L-methionine	S-アデノシルメチオニン
acp	aminocarboxypropyl	アミノカルボキシプロピル
2-OG	2-oxoglutarate acid	2-オキソグルタル酸
jmjC	jumonjiC	
TRM	tRNA methyltransferase	
PPM	protein phosphatase methyltransferase	
TYW	RNA yW synthesizing protein	
JMJD2A	Jumonji domain-containing protein 2	
AlkB	Alkane hydroxylase B	
FIH	factor inhibiting hypoxia inducible factor -1	
Hif1a	hypoxia inducible factor 1	
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
PMSF	phenyl-methylsulfonyl fluoride	
DTT	dithiothreitol	ジチオスレイトール
$\beta$ ME	2-mercaptoethanol	2-メルカプトエタノール
CBB	coomassie brilliant blue	クマシーブリリアントブルー
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside	イソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトシド
PEG	poly ethylene glycol	ポリエチレングリコール
PAGE	polyacrylamide electrophoresis	ポリアクリルアミド電気泳動
PCR	polymerase chain reaction	
MAD	multi-wavelength anomalous dispersion	多波長異常分散
RMSD	root-mean square deriation	

## その他の略号・第二章

DDX41	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	
c-diGMP	cyclic di GMP	
c-diAMP	cyclic di AMP	
CDNs	cyclic di nucleotides	
dsDNA	double strand DNA	
STING	stimulator of IFN genes protien	
TBK1	TANK binding kinase1	
IRF3	interferon regulatory factor 3	
PAMPs	pathogen-associatedmolecularpatterns	病原体関連分子パターン
DAMPs	damage-associated molecular patterns	傷害関連分子パターン
PRR	pattern recognition receptor	パターン認識受容体
TLR	Toll-like receptor	Toll 様受容体
RLR	RIG-I like Receptor	RIG-I 様受容体
CLR	C-type lectin Receptor	C 型レクチン受容体
cGAS	cyclic GMP-AMP Synthase	
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5	
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine	

## 序章 核酸結合タンパク質

## 序章

遺伝情報は、遺伝情報の本体である DNA から RNA に転写され、タンパク質へと翻訳されることで発現する。この DNA→RNA→タンパク質という情報の流れは、すべての生物に共通でありセントラルドグマとよばれ生命の根幹を担っている。このような遺伝情報発現の際に、DNA や RNA といった核酸は単独では機能せず、核酸とタンパク質が協調的に働くことで遺伝情報が正しく発現される。遺伝情報は、必要な時に、必要な場所で、必要な量を発現させなければならない。この複雑な制御機構をひとつひとつひも解くと、核酸とタンパク質の相互作用によって生み出されており、核酸結合タンパク質はまさに本質的な生命活動に関わっているといえよう。

例えば、DNA から RNA に変換される転写の過程では、ssDNA に RNA ポリメラーゼが結合し、DNA 配列に相補的な RNA が合成される。転写の終結には、 $\rho$  因子という補助因子が必要な場合もあり、RNA 結合タンパク質である  $\rho$  因子が転写産物に結合することで鋳型 DNA と mRNA 間の対合が阻害され転写が終結することが知られている。また転写の制御も転写因子と呼ばれる一群の DNA 結合タンパク質によって制御されている。転写された pre-mRNA はタンパク質・RNA 複合体であるスプライソソームによって触媒されるスプライシングにより mRNA として成熟する。mRNA がタンパク質に変換される翻訳過程では、50 種以上のタンパク質とリボソーマル RNA (rRNA) からなる巨大複合体であるリボソームが中心的な役割を担っている。核酸結合タンパク質に着目してセントラルドグマの流れを追ってみてきたが、ここに述べたものは核酸結合タンパク質のほんのごく一部であり、他にも多くの核酸結合タンパク質が生体内で機能している。例えば、DNA 結合タンパク質には、DNA ポリメラーゼなどの DNA 複製・修復・組換えに関わるもの、ヒストンやウイルスキャプシドタンパク質などの DNA パッケージングに関わるもの等が存在している。このような DNA 結合にはヘリックス・ターン・ヘリックスドメインや Zn フィンガードメイン、ロイシンジッパーと呼ばれるいくつかの代表的なモチーフや構造が知られている。RNA 結合タンパク質には、先述した転写終結やスプライシングのほかに mRNA の輸送や分解といった mRNA 品質管理機構、rRNA や tRNA の生合成にも関与するほか、小分子 RNA による遺伝子発現制御である miRNA, siRNA, piRNA 経路にも関与している。このように核酸結合タンパク質は、生命現象の根幹にかかわる重要で多彩な役割を担っている。

一方、細菌やウイルス感染によって生じた外部からの核酸は、自然免疫系によって認識される。細胞内の非自己核酸の認識には、RIG-I や MDA5 といった RNA ヘリケース

が関与していることが知られている．このように核酸結合タンパク質は転写・翻訳の制御のみならず，感染防御など生体内で多様な機能に関与している．本研究では，2つの核酸結合タンパク質に着目し，主に X 線結晶構造解析を用いてその構造と機能を解明することを目指した．

## 本研究の目的

本研究では，2つの核酸結合タンパク質に着目した．第一章では，翻訳の正確性に寄与する核酸結合タンパク質である TYW5 に着目した．TYW5 は tRNA 修飾を担う酵素であり，tRNA のリボソームにおけるコドン-アンチコドン対合を強化することでフレームシフトを防ぎ，誤翻訳を防いでいる．また第二章では，自然免疫機構に関与する DDX41 に着目して研究を進めた．DDX41 は RNA ヘリケースファミリーに属し，細菌由来の小分子である c-diGMP を認識することで I 型インターフェロンの産生を上昇させる．また DDX41 は細胞内の B 型 DNA の認識に関与しているとの報告もあり，一つの分子が2つのリガンドを認識している可能性が示唆されている．本研究では，生体内で多様な機能を有する核酸結合タンパク質の構造と機能を解明することを目指した．

## 本論文の概要

本論文は解析対象としたタンパク質ごとに章を分けて記述し，序論である本章においては，核酸結合タンパク質の基本的な役割とともに，本研究の目的と概要を記述した．図表はそれぞれの章末にまとめた．

## 第一章の概要

ワイブトシンは tRNA のアンチコドン近隣に存在するかさ高い修飾塩基であり，翻訳の正確性に寄与している．高等真核生物の中には，ワイブトシンがヒドロキシル化されたヒドロキシワイブトシンの存在が知られており，新たに発見された蛋白質 TYW5 がその触媒活性を担う事が明らかになった．TYW5 は，そのアミノ酸配列から jmjC ドメインを有することが予想されていたが，現在まで jmjC ドメインを有するタンパク質がヌクレオチド鎖の認識に関わる報告はなく TYW5 はこの種のタンパク質でヌクレオチド鎖に結合する初の酵素と予想された．本研究では，TYW5 によるヒドロキシル化反応機構及び tRNA 認識の構造的基盤の解明のため，ヒト由来 TYW5 の立体構造を 2.8 Å 分



解能で決定した．得られた構造を元に計算した表面電荷分布及び立体構造に基づいた変異体解析の結果を基に，tRNA と TYW5 のドッキングモデルを作成し，新規の tRNA 認識モデルを提唱した．

## 第二章の概要

cyclic-diGMP (c-diGMP) はヌクレオチドが 2 つのリン酸ジエステル結合により結合した環状構造をとる小分子で，細菌ではセカンドメッセンジャーとして機能することが報告されている．さらに近年，DEAD-box 型ヘリケースである DDX41 が細菌感染によって生じた c-diGMP を直接認識し，ER 上に存在する受容体 STING 依存的な経路を活性化し，I 型インターフェロンの産生に関与することが明らかになった．本研究では X 線結晶構造解析を用いて，DDX41 による c-diGMP 認識及びシグナル伝達反応機構の解明を目指した．現在までにコンストラクションの改変及び発現・精製系の確立を行い，得られたタンパク質を用いて結晶化スクリーニングを行った．最終的にヒト由来 DDX41 DEADc ドメインにおいて分解能 3 Å を超えるデータセットを与える結晶を得た．

## 第一章 tRNA 修飾酵素 TYW5 の X 線結晶構造解析

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の  
同意が得られていないため、本章について  
は、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の  
同意が得られていないため、本章について  
は、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

## 第二章 DDX41 の X 線結晶構造解析

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の  
同意が得られていないため、本章について  
は、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の  
同意が得られていないため、本章について  
は、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については、非公開



## 引用文献

- Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., and Terwilliger, T.C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* *58*, 1948-1954.
- Agris, P.F., Vendeix, F.A., and Graham, W.D. (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *Journal of molecular biology* *366*, 1-13.
- Altwegg, M., and Kubli, E. (1979). The nucleotide sequence of phenylalanine tRNA<sup>2</sup> of *Drosophila melanogaster*: four isoacceptors with one basic sequence. *Nucleic acids research* *7*, 93-105.
- Bjork, G.R., Jacobsson, K., Nilsson, K., Johansson, M.J., Bystrom, A.S., and Persson, O.P. (2001). A primordial tRNA modification required for the evolution of life? *The EMBO journal* *20*, 231-239.
- Brown, J.W., Marshall, D.F., and Echeverria, M. (2008). Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in plant science* *13*, 335-342.
- Broz, P., and Monack, D.M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature reviews Immunology* *13*, 551-565.
- Bryson, K., McGuffin, L.J., Marsden, R.L., Ward, J.J., Sodhi, J.S., and Jones, D.T. (2005). Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic acids research* *33*, W36-38.
- Carlson, B.A., Kwon, S.Y., Chamorro, M., Oroszlan, S., Hatfield, D.L., and Lee, B.J. (1999). Transfer RNA modification status influences retroviral ribosomal frameshifting. *Virology* *255*, 2-8.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science (New York, NY)* *309*, 1559-1563.
- Chen, Z., Zang, J., Whetstone, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T.G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.H., Dai, S., *et al.* (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* *125*, 691-702.
- Clifton, I.J., McDonough, M.A., Ehrismann, D., Kershaw, N.J., Granatino, N., and Schofield, C.J. (2006). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. *J Inorg Biochem* *100*, 644-669.
- Clissold, P.M., and Ponting, C.P. (2001). JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends in biochemical sciences* *26*, 7-9.
- Dann, C.E., 3rd, Bruick, R.K., and Deisenhofer, J. (2002). Structure of factor-inhibiting

hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 15351-15356.

De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., Van Hoof, C., Waelkens, E., Merlevede, W., and Goris, J. (1999). Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* *38*, 16539-16547.

Dong, A., Xu, X., Edwards, A.M., Midwest Center for Structural, G., Structural Genomics, C., Chang, C., Chruszcz, M., Cuff, M., Cymborowski, M., Di Leo, R., *et al.* (2007). In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nature methods* *4*, 1019-1021.

Dunwell, J.M., Purvis, A., and Khuri, S. (2004). Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* *65*, 7-17.

Elkins, J.M., Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Seibel, J.F., Schlemminger, I., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Schofield, C.J. (2003). Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *The Journal of biological chemistry* *278*, 1802-1806.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *60*, 2126-2132.

Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P., and Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current opinion in structural biology* *20*, 313-324.

Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* *122*, 17-20.

Goto-Ito, S., Ishii, R., Ito, T., Shibata, R., Fusatomi, E., Sekine, S.I., Bessho, Y., and Yokoyama, S. (2007). Structure of an archaeal TYW1, the enzyme catalyzing the second step of wye-base biosynthesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *63*, 1059-1068.

Goto-Ito, S., Ito, T., Ishii, R., Muto, Y., Bessho, Y., and Yokoyama, S. (2008). Crystal structure of archaeal tRNA(m(1)G37)methyltransferase aTrm5. *Proteins* *72*, 1274-1289.

Goto-Ito, S., Ito, T., Kuratani, M., Bessho, Y., and Yokoyama, S. (2009). Tertiary structure checkpoint at anticodon loop modification in tRNA functional maturation. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1109-1115.

Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* *15*, 305-308.

Hatfield, D., Feng, Y.X., Lee, B.J., Rein, A., Levin, J.G., and Oroszlan, S. (1989). Chromatographic analysis of the aminoacyl-tRNAs which are required for translation of codons at and around the ribosomal frameshift sites of HIV, HTLV-1, and BLV. *Virology* *173*, 736-742.

Hausinger, R.P. (2004). FeII/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related

enzymes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *39*, 21-68.

Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic acids research* *34*, 721-733.

Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews Microbiology* *7*, 263-273.

Holm, L., and Sander, C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends in biochemical sciences* *20*, 478-480.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of immunology* *162*, 3749-3752.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* *455*, 674-678.

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788-792.

Ishitani, R., Yokoyama, S., and Nureki, O. (2008). Structure, dynamics, and function of RNA modification enzymes. *Current opinion in structural biology* *18*, 330-339.

Jankowsky, A., Guenther, U.P., and Jankowsky, E. (2011). The RNA helicase database. *Nucleic acids research* *39*, D338-341.

Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* *66*, 125-132.

Kalhor, H.R., Luk, K., Ramos, A., Zobel-Thropp, P., and Clarke, S. (2001). Protein phosphatase methyltransferase 1 (Ppm1p) is the sole activity responsible for modification of the major forms of protein phosphatase 2A in yeast. *Archives of biochemistry and biophysics* *395*, 239-245.

Kasai, H., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., and Nishimura, S. (1979). Isolation of hydroxy-Y base from rat liver tRNAPhe. *Nucleic acids research* *6*, 993-999.

Keith, G., and Dirheimer, G. (1980). Primary structure of *Bombyx mori* posterior silk gland tRNAPhe. *Biochemical and biophysical research communications* *92*, 109-115.

Kikuma, T., Ohtsu, M., Utsugi, T., Koga, S., Okuhara, K., Eki, T., Fujimori, F., and Murakami, Y. (2004). Dbp9p, a member of the DEAD box protein family, exhibits DNA helicase activity. *The Journal of biological chemistry* *279*, 20692-20698.

Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* *7*, 715-727.

Kobayashi, M., Kubota, M., and Matsuura, Y. (1999). Crystallization and improvement of crystal quality for x-ray diffraction of maltooligosyl trehalose synthase by reductive

methylation of lysine residues. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* *55*, 931-933.

Konevega, A.L., Soboleva, N.G., Makhno, V.I., Semenov, Y.P., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., and Katunin, V.I. (2004). Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions. *RNA* *10*, 90-101.

Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A.A., Luber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., and Cusack, S. (2011). Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* *147*, 423-435.

Kuchino, Y., Borek, E., Grunberger, D., Mushinski, J.F., and Nishimura, S. (1982). Changes of post-transcriptional modification of wye base in tumor-specific tRNA<sup>Phe</sup>. *Nucleic acids research* *10*, 6421-6432.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.

Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development* *16*, 1466-1471.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* *23*, 2947-2948.

Linder, P., and Jankowsky, E. (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nature reviews Molecular cell biology* *12*, 505-516.

Mattick, J.S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* *5*, 316-323.

McCloskey, J.A., Graham, D.E., Zhou, S., Crain, P.F., Ibba, M., Konisky, J., Soll, D., and Olsen, G.J. (2001). Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic Methanococcales. *Nucleic acids research* *29*, 4699-4706.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* *40*, 658-674.

McWhirter, S.M., Barbalat, R., Monroe, K.M., Fontana, M.F., Hyodo, M., Joncker, N.T., Ishii, K.J., Akira, S., Colonna, M., Chen, Z.J., *et al.* (2009). A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *The Journal of experimental medicine* *206*, 1899-1911.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology* *9*, 4-9.

- Mishina, Y., and He, C. (2006). Oxidative dealkylation DNA repair mediated by the mononuclear non-heme iron AlkB proteins. *J Inorg Biochem* *100*, 670-678.
- Miyauchi, K., Ohara, T., and Suzuki, T. (2007). Automated parallel isolation of multiple species of non-coding RNAs by the reciprocal circulating chromatography method. *Nucleic acids research* *35*, e24.
- Motorin, Y., and Grosjean, H. (2005). Transfer RNA modification. *Encyclopedia of Life Science*, 1-10.
- Ng, S.S., Kavanagh, K.L., McDonough, M.A., Butler, D., Pilka, E.S., Lienard, B.M.R., Bray, J.E., Savitsky, P., Gileadi, O., von Delft, F., *et al.* (2007). Crystal structures of histone demethylase JMJD2A reveal basis for substrate specificity. *Nature* *448*, 87-91.
- Niesen, F.H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols* *2*, 2212-2221.
- Noma, A., Ishitani, R., Kato, M., Nagao, A., Nureki, O., and Suzuki, T. (2010). Expanding role of the jumonji C domain as an RNA hydroxylase. *The Journal of biological chemistry* *285*, 34503-34507.
- Noma, A., Kirino, Y., Ikeuchi, Y., and Suzuki, T. (2006). Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA. *EMBO J* *25*, 2142-2154.
- Parvatiyar, K., Zhang, Z., Teles, R.M., Ouyang, S., Jiang, Y., Iyer, S.S., Zaver, S.A., Schenk, M., Zeng, S., Zhong, W., *et al.* (2012). The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature immunology* *13*, 1155-1161.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., *et al.* (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* *325*, 279-281.
- Rozenski, J., Crain, P.F., and McCloskey, J.A. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic acids research* *27*, 196-197.
- Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *58*, 1772-1779.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., and Yokoyama, S. (2006). Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell* *125*, 287-300.
- Suzuki, T., Ikeuchi, Y., Noma, A., Suzuki, T., and Sakaguchi, Y. (2007a). Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods in enzymology* *425*, 211-229.
- Suzuki, Y., Noma, A., Suzuki, T., Ishitani, R., and Nureki, O. (2009). Structural basis of tRNA modification with CO<sub>2</sub> fixation and methylation by wybutosine synthesizing enzyme

TYW4. *Nucleic acids research* *37*, 2910-2925.

Suzuki, Y., Noma, A., Suzuki, T., Senda, M., Senda, T., Ishitani, R., and Nureki, O. (2007b). Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA. *J Mol Biol* *372*, 1204-1214.

Takeuchi, T., Watanabe, Y., Takano-Shimizu, T., and Kondo, S. (2006). Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn* *235*, 2449-2459.

Terwilliger, T.C., and Berendzen, J. (1997). Bayesian correlated MAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *53*, 571-579.

Thiebe, R., and Zachau, H.G. (1968). A specific modification next to the anticodon of phenylalanine transfer ribonucleic acid. *European journal of biochemistry / FEBS* *5*, 546-555.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* *30*, 1022-1025.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* *66*, 22-25.

Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2007). Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol Biol* *364*, 215-230.

Waas, W.F., de Crecy-Lagard, V., and Schimmel, P. (2005). Discovery of a gene family critical to wyosine base formation in a subset of phenylalanine-specific transfer RNAs. *The Journal of biological chemistry* *280*, 37616-37622.

Ward, J.J., McGuffin, L.J., Bryson, K., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004). The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* *20*, 2138-2139.

Woodward, J.J., Iavarone, A.T., and Portnoy, D.A. (2010). c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* *328*, 1703-1705.

Yang, C.G., Yi, C.Q., Duguid, E.M., Sullivan, C.T., Jian, X., Rice, P.A., and He, C. (2008). Crystal structures of DNA/RNA repair enzymes AlkB and ABH2 bound to dsDNA. *Nature* *452*, 961-U964.

Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T., and Liu, Y.J. (2011). The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* *12*, 959-965.

Zhou, S., Sitaramaiah, D., Pomerantz, S.C., Crain, P.F., and McCloskey, J.A. (2004). Tandem mass spectrometry for structure assignments of wye nucleosides from transfer RNA. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* *23*, 41-50.

## 発表論文・外部発表

### [報文目録]

・ Kato M., Araiso Y., Noma A., Nagao A., Suzuki T., Ishitani R., Nureki O..

“Crystal structure of a novel JmjC-domain-containing protein, TYW5, involved in tRNA modification.”

*Nucleic Acids Res.*, 2011

・ Noma A., Ishitani R., Kato M., Nagao A., Nureki O., Suzuki T..

“Expanding roles of the Jumonji C domain as an RNA hydroxylase.”

*J. Biol. Chem.*, 2010

### [学会発表]

国際会議・シンポジウムにおける発表

Megumi Kato, Yuhei Araiso, Akiko Noma, Asutaka Nagao, Tsutomu Suzuki, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki.

X-ray crystallographic analysis of human novel tRNA hydroxylase, TYW5. (ポスター番号 PA-56),

23<sup>rd</sup> tRNA workshop, Aveiro conference center, Portugal, 2010 年 1 月

国内学会・シンポジウム等における発表

加藤 めぐみ, 荒磯 裕平, 野間 章子, 長尾 翌手可, 鈴木 勉, 石谷 隆一郎, 濡木 理

tRNA<sup>Phe</sup> 37 位に存在する修飾塩基ワイブトシンのヒドロキシル化に関わる酵素 TYW5 の X 線結晶構造解析 (ポスター番号 4P0064)

日本分子生物学会 第 32 回年会 パシフィコ横浜 2009 年 12 月

加藤 めぐみ, 荒磯 裕平, 野間 章子, 長尾 翌手可, 鈴木 勉, 石谷 隆一郎, 濡木 理

tRNA<sup>Phe</sup> 37 位に存在する修飾塩基ワイブトシンのヒドロキシル化に関わる新規酵素 TYW5 の X 線結晶構造解析 (ポスター番号 P-38)

第 12 回日本 RNA ミーティング 学術総合センター 一ツ橋記念講堂 2010 年 7 月

## 謝辞

本研究に際し、ご指導賜りました東京大学濡木理教授、石谷隆一郎准教授に篤く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究全般にわたって丁寧に御指導して下さった西増弘志助教、石井亮平特任助教に心から感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多くの方々のご助力を頂きました。東京大学大学院工学系研究科鈴木勉教授、野間章子博士、長尾翌手可博士には TYW5 の発現系及び機能解析の面で大変お世話になりました。また放射光実験の際には SPring-8 のスタッフ、PFAR のスタッフの皆様の惜しみない援助を頂きました。深く感謝致します。

そして有意義な討論、ご指導をいただいた濡木研究室の荒磯裕平博士、野澤佳世博士、濡木研究室の皆様に深く感謝致します。また、秘書の山崎利枝子さんには事務面で様々な便宜を図っていただきました。深く御礼申し上げます。

最後に、終始暖かい支援を頂いた家族に深く感謝します。

2013 年 12 月