

論文の内容の要旨(修正後)

論文題目 tRNA 硫黄修飾酵素の機能と構造の研究

(Structural and functional studies on tRNA thiolation enzymes)

氏名 中川 裕文

DNA 上に書かれた遺伝情報は RNA への転写、タンパク質への翻訳という過程を通して解読される。翻訳の過程において転移 RNA (tRNA) は、核酸である mRNA に書かれたコドン情報とタンパク質を構成するアミノ酸とをつなげるアダプター分子として働く。tRNA はゲノムから転写後、5'や 3'の切断、イントロンの除去、CCA 末端の付加、様々な化学修飾を経て成熟化し、生体内で機能する。多様な修飾の中の 1 つにウリジンおよびその誘導体の 2 位の酸素原子を硫黄原子に置換する硫黄修飾(s^2U)がある(図 1)。多くの生物では tRNA 上のアンチコドン wobble 部位である 34 位に s^2U 修飾が見つかっており、翻訳の正確性や効率性に寄与する。*Thermus thermophilus* などの高度好熱菌においては T ループ 54 位のリボチミジン(5 メチルウリジン)にも 2 位の硫黄修飾(s^2T)が起こり、修飾によって tRNA の熱安定性が向上し高温環境での生育に重要な役割を果たす。

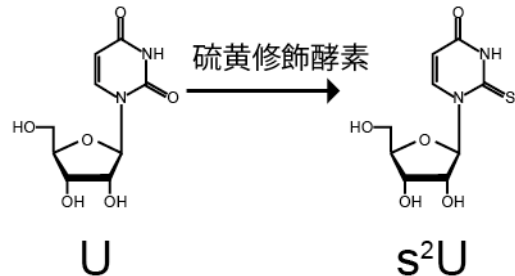


図1: ウリジンおよび2チオウリジン

アンチコドン 34 位への s^2U 修飾は真正細菌では MnmA という分子が担い、真核生物細胞質では Ncs6•Ncs2 複合体という分子が修飾を行う。古細菌においても Ncs6 が s^2U_{34} 修飾を行うと予想されている。一方で、T ループ 54 位の硫黄修飾は TtuA という分子が行う。Ncs6 と TtuA は tRNA 上の違う部位を修飾するが、5つの CXXC/H モチーフを持つ点や ATP ピロフォスファターゼに見られる PP モチーフを持つなど配列的に似ており、TtcA ファミリーと呼ばれるグループに含まれる。MnmA に関しては生化学的・構造生物学的知見が得られているが、TtcA ファミリーに含まれる TtuA と Ncs6 に関してはその知見が得られていない。そこで私はこれらの分子の詳細な機能を解明するために研究に取り組んだ。

超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の TtuA ホモログについて X 線結晶構造解析に

より分解能 2.1 Å でその構造を決定した (図 2(a)). *P. horikoshii* TtuA は 2 量体を形成しており, 各サブユニットは N 末側の亜鉛フィンガー(Znf1), ATP ピロフォスファターゼ触媒ドメイン, C 末側の亜鉛フィンガー(Znf2)から構成されていた. 触媒ドメイン内の 2 量体化サブドメインによって 2 量体を形成していた. 2 つの亜鉛フィンガーは過去に解かれた ATP ピロフォスファターゼには見られない TtuA 特徴的なドメインであった. 5 つの保存された CXXC/H モチーフのうち 4 つが Znf1 と Znf2 の亜鉛配位に関わっていた. 触媒ドメインの構造は, 構造既知の s²U 修飾酵素 MnmA よりも, 真正細菌で tRNA^{Leu} にリシジンを修飾する TilS という別の修飾酵素とより類似しており, TtuA と TilS は共通の 2 量体化サブドメインを持っていた. TtuA の活性部位と考えられるポケットには PP モチーフが存在し, その周辺のアミノ酸残基は TilS と共通であった. また, 活性部位の中には残りの 1 つの CXXC モチーフ上のシステイン残基を含めた合計 3 つのシステイン残基が存在した (図 2(b)). これら 3 つのシステイン残基は TtuA が共通に持つことから, 硫黄修飾反応の際に実際に重要な役割を果たす可能性が予想された. *P. horikoshii* TtuA の表面電荷を計算すると, 活性ポケット, 近くに存在する同じサブユニットの Znf2, 2 量体化領域, 別のサブユニットの Znf1 を含めた領域が正に帯電している傾向が見られたことから, この領域に tRNA が結合する可能性が示唆された.

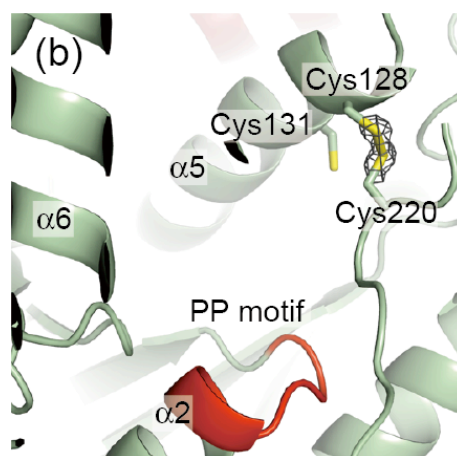
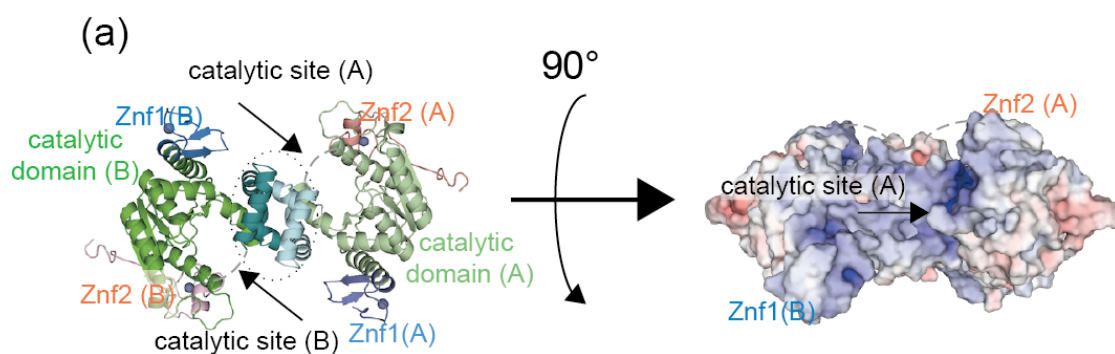


図 2: *P. horikoshii* TtuA の構造

(a) 全体構造. 左はリボンモデルで右は表面電荷で表した. リボンモデルでは Znf1 は青, 触媒ドメインは緑, Znf2 は赤で表した. 表面電荷は正の領域を青, 負の領域を赤で示した.
 (b) *P. horikoshii* TtuA の活性部位. PP motif を赤で, 3 つのシステイン残基をスティックモデルで示した.

T. thermophilus *ttuA* 欠損株に対し構造情報をもとに作成した TtuA 変異体を含んだプラスミドを形質転換し、培養した菌体から tRNA を精製しその s^2T 量を HPLC を用いて解析することで、変異体の修飾への影響を調べた。活性部位に存在した 3 つのシステイン残基に相当する残基をそれぞれセリン残基に置きかえたところ、すべての変異体において tRNA 上の s^2T の存在が大きく減少したことから、3 つのシステイン残基が協調して実際に硫黄転移の際に機能すると考えられる (図 3)。また予想された ATP 結合部位についてもアラニン置換体を作成し、変異体解析を行ったところいくつかの変異体では s^2T が存在しなくなり、他の変異体においてもその量が減少したことから、実際この部位が ATP の相互作用およびアデニル化反応に関与すると推測された。

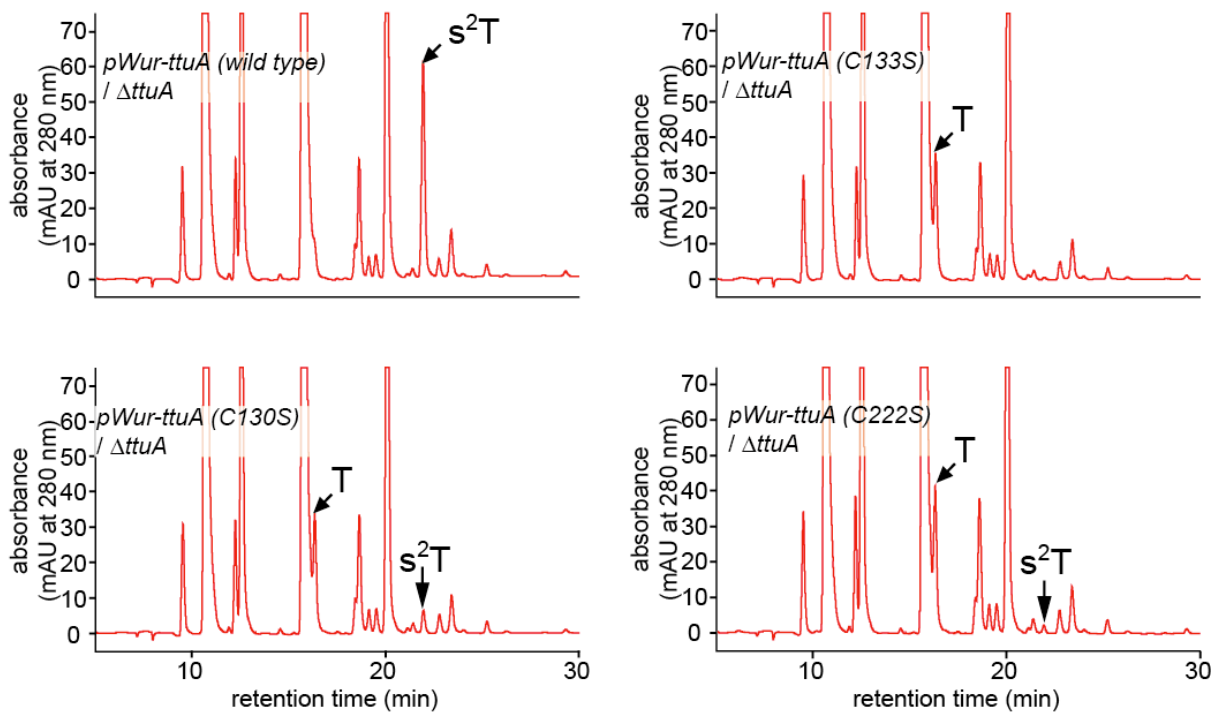


図 3: *T. thermophilus* を用いた TtuA の変異体解析

野生型 TtuA 形質転換体と活性部位上のシステイン残基変異体の HPLC 結果を示す。

真核生物細胞質・古細菌において s^2U34 修飾を担う Ncs6•Ncs2 複合体および Ncs6 ホモログに関して組み換えタンパク質の発現、精製条件を確立した。さらに、*P. horikoshii* 由来 Ncs6 ホモログについては結晶が得られる条件を見つけ、分解能 3.79 Å の X 線回折データを収集し、分子置換法により低分解能構造を決定した。Ncs6 は TtuA と同様の構造をしており、2 量体を形成し、各サブユニットは Znfl、触媒ドメイン、Znf2 の 3 つのドメインから構成されていた。TtuA と Ncs6 を比較したところ、TilS で tRNA の認識に関与している残基が Ncs6 では保存され同じ位置に存在するのに対し、TtuA では違う残基が存在していた。これらの違いが Ncs6 と TtuA の修飾される部位の違いに影響している可能性が考えられる。