

古細菌に特異的な tRNA 修飾ヌクレオシドの生合成機構解明

沼田 倫征

(産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門)

研究の目的

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 (agm^2C) として存在する¹⁾ (図 1a)。 agm^2C 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、 agm^2C 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)}。

方法

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 BL17A にて回折実験を行い、まず、セレノ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。

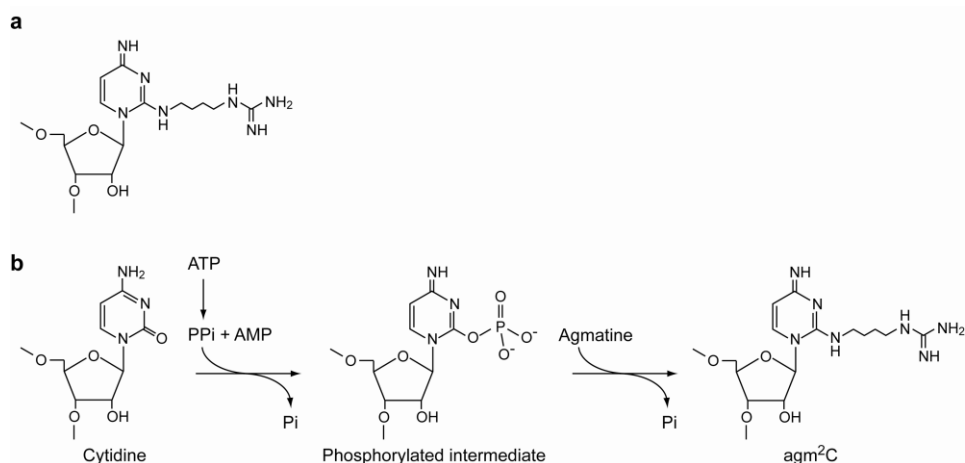


図 1 : 2-アグマチニルシチジン (agm^2C) の化学構造と生合成反応スキーム

結果

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⁴⁾(図1b)。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 agm^2C 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。

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のリン酸化が起これないnon-productiveな状態といえる。

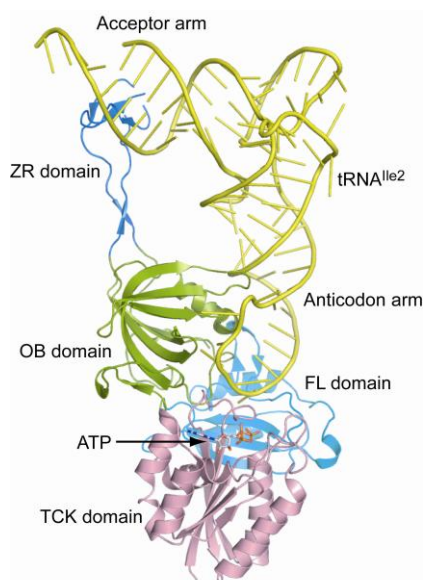


図2: TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP複合体(3者複合体)の結晶構造

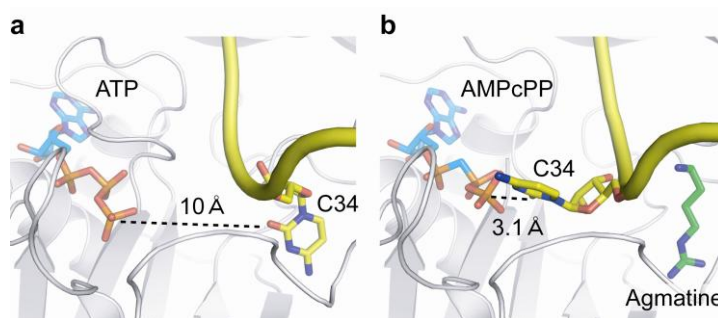


図3: 3者複合体(a)と4者複合体(b)における活性部位の構造の比較

結論

(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ことが考えられる。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 agm²C が形成すると考えられる。

文献

- 1) Ikeuchi, Y. et al. (2010) Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 277-282.
- 2) Osawa, T., Inanaga, H., Kimura, S., Terasaka, N., Suzuki, T., and Numata, T. (2011) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an archaeal tRNA-modification enzyme, TiaS, complexed with tRNA^{Ile2} and ATP. *Acta Crystallogr. Sect. F* **67**: 1414-1416.
- 3) Osawa, T., Kimura, S., Terasaka, N., Inanaga, H., Suzuki, T., and Numata, T. (2011) Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 1275-1280.
- 4) Terasaka, N., Kimura, S., Osawa, T., Numata, T., and Suzuki, T. (2011) Biogenesis of 2-agmatinylcytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 1268-1274.