



AUA コドンの解読に不可欠な tRNA^{Ile} アグマチニル化修飾の分子基盤

1. はじめに

タンパク質合成過程において、mRNA 上のコドンは tRNA を介してアミノ酸へと変換される。その際、tRNA は自身のアンチコドンを用いて塩基対合によりコドン进行を認識する。したがって、遺伝暗号を正確に解読するには、tRNA アンチコドンがそれに対応するコドンのみを忠実に認識することが求められる。tRNA には様々な修飾ヌクレオチドが含まれており、なかでも、アンチコドン 1 文字目に存在する修飾は正しいコドンの認識を可能にし、遺伝情報の正確な発現を保障するという重要な役割を担っている。

原核生物には、イソロイシンのコドン (AUU, AUC, AUA) に対応する 2 種類の tRNA^{Ile} (tRNA^{Ile1} と tRNA^{Ile2}) が存在する。このうち、AUA コドンを解読する tRNA^{Ile2} は、tRNA^{Met} と同じ CAU アンチコドン配列を有している。この配列はメチオニンのコドン AUG と相補的である。そのため、tRNA^{Ile2} の転写産物は、あたかも tRNA^{Met} のように振る舞い、AUG コドンを誤って解読するとともに、メチオニル tRNA 合成酵素によって認識され、誤ってアミノアシル化 (メチオニン付加) されることが知られている^{1~3)} (図 1a)。これでは、AUA コドンをイソロイシンとして解読できず、原核生物の生育に重大な問題をきたしてしまう。そこで原核生物は、tRNA^{Ile2} のアンチコドン 1 文字目のシチジン (C34) を化学修飾し、これら諸問題に対処している^{1~5)}。つまり、C34 の修飾により、tRNA^{Ile2} は AUA コドンを認識できるようになり、かつ、イソロイシル tRNA 合成酵素によりアミノアシル化 (イソロイシン付加) されるようになる (図 1a)。このように、アンチコドン 1 文字目に存在する修飾シチジンは tRNA^{Ile2} にイソロイシン

受容能および AUA コドン特異性を付与するという役割を担っており、タンパク質を正確に作り上げる上で欠かすことのできない重要な修飾ヌクレオチドである。

C34 の修飾形態は真正細菌と古細菌で異なる。真正細菌では C34 がリシンで修飾されライシジンに変換されているのに対し⁴⁾、古細菌ではポリアミンのアグマチンで修飾された 2-アグマチニルシチジン (agm²C) として存在している^{1,5)}。図 1b に agm²C と A との塩基対合様式を示しているが、agm²C とライシジンの化学構造は類似しており、ライシジンもこれと同様の対合様式で A を認識する。ライシジンは tRNA^{Ile} ライシジン合成酵素 (TilS) により ATP 依存的に合成される^{6~8)}。TilS は ATP を使って C34 をアデニル化によって活性化した後、リシンにこのアデニル化中間体を求核攻撃させライシジンを産生する。一方、agm²C の生合成は tRNA^{Ile}-agm²C 合成酵素 (TiaS) により ATP およびアグマチン依存的に触媒される¹⁾。TiaS と TilS にはアミノ酸配列の相同性がないため、TiaS は TilS と異なるしくみで C34 を修飾することが推定されていた。しかしながら、TiaS には既知の ATP 結合モチーフが存在しないばかりか、そのドメイン構成もほとんど不明であり、修飾反応を触媒するしくみが明らかではなかった。我々は、TiaS と tRNA^{Ile2} との複合体の構造を解析し、tRNA^{Ile2} 特異的にアグマチンが導入されるしくみを解明した⁹⁾。

2. TiaS-tRNA^{Ile2} 複合体の結晶構造

我々は、古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 TiaS について、TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP 複合体 (3 者複合体) と TiaS-tRNA^{Ile2}-AMPcPP-アグマチン複合体 (4 者複合体) の結晶構造を決定した。TiaS は TCK (Thr18-Cyt34 キナーゼ) ドメイン、FL (フェレドキシン様) ドメイン、OB (OB フォールド) ドメイン、ZR (ジンクリボン様) ドメインと名づけた四つのドメインから構成されていた (図 2a)。3 者複合体と 4 者複合体の全体的な構造は類似しているが、これら複合体の構造を詳しく解析した結果、アグマチンの有無で C34 の構造が大きく異なっていることが分かった。この構造の違いについては後ほど詳述する。また、本稿では特に記述がない限り、3 者複合体の構造について解説する。

3. tRNA^{Ile2} の認識機構

TiaS の ZR ドメインは、tRNA アクセプターシステムの主溝と相互作用していた (図 2a)。そこではアクセプターシステムの G1 と G2 が Arg369 の側鎖と、また、C71 が Ser361 の主鎖カルボニルと水素結合を形成していた (図 2b)。

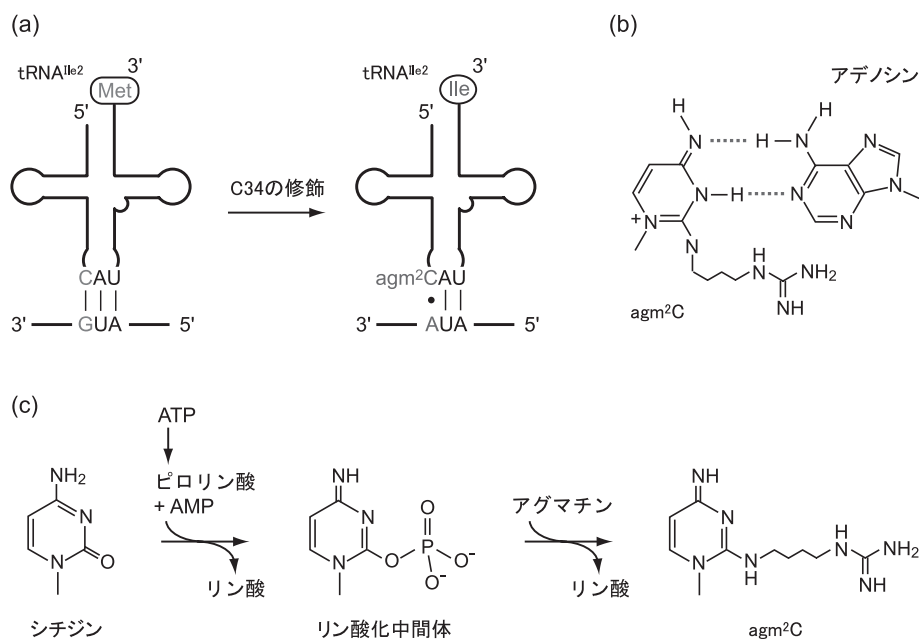


図1 古細菌 tRNA^{Ile2} に存在する agm²C の役割とその生合成反応スキーム

- (a) tRNA^{Ile2} の転写産物はメチオニンの AUG コドンと塩基対合するとともに、その 3' 末端にメチオニンを受容する。C34 が化学修飾された成熟型 tRNA^{Ile2} は、イソロイシンの AUA コドンと認識し、その 3' 末端にイソロイシンを受容する。古細菌では、アグマチンで修飾され agm²C となり、A とゆらぎ (wobble) 塩基対合する。コドンは右から左への表記になっている。
- (b) agm²C の化学構造と A との対合様式。
- (c) agm²C の生合成反応スキーム。TiaS は C34 の 2 位カルボニルをリン酸化して活性化したあと、アグマチンに求核攻撃させ、agm²C を産生する。

Arg369 をアラニン残基に置換した変異体では、agm²C 合成活性がほぼ消失することが明らかとなり、この相互作用の重要性が確認された。一方、tRNA のアンチコドンアームは、TCK ドメイン、FL ドメインおよび OB ドメインと結合していた (図 2a)。3 者複合体中において、修飾を受ける C34 はアンチコドンループからフリップアウトし、FL ドメインに形成されたポケットに結合していた。このポケットにおいて、C34 は Arg217 の側鎖と π -カチオン相互作用を形成するとともに、Gly215 の主鎖カルボニルと水素結合を形成し塩基特異的に認識されていた (図 2c)。Arg217 をアラニン残基に置換した変異体では、agm²C 合成活性がほぼ消失していた。また、アンチコドンループを構成する U36 と A37 は OB ドメインに配置され、主鎖との水素結合によりそれぞれ塩基特異的に認識されていた (図 2d)。U36 と A37 をそれぞれ他のヌクレオチドに置換した tRNA^{Ile2} 変異体ではアグマチン受容活性が消失することからも、この相互作用の重要性が確認された。

古細菌の tRNA^{Ile2} と tRNA^{Met} は同じアンチコドンループ

配列を有しており、両者の一次構造は非常に類似している。ただ、遺伝暗号を正確に解釈するには、TiaS が tRNA^{Ile2} のみを特異的に修飾することが求められる。TiaS は tRNA^{Ile2} のアクセプターステムおよびアンチコドンアームと相互作用することから (図 2a)、tRNA^{Ile2} の当該領域が tRNA^{Met} との識別に関わることが推定された。そこで、TiaS が tRNA^{Ile2} と tRNA^{Met} を選別するしくみを解明するために、様々な tRNA^{Ile2} 変異体を作製しアグマチン受容活性を測定した。まず、tRNA^{Ile2} のアクセプターステムとアンチコドンシステムをそれぞれ tRNA^{Met} の相当配列に置換したところ、アクセプターステムを入れ替えた tRNA^{Ile2} 変異体で活性が消失していた。したがって、tRNA^{Ile2} と tRNA^{Met} との選別において、TiaS はアクセプターステムを識別することが明らかになった。さらに、tRNA^{Ile2} のアクセプターステムの各塩基対について調べたところ、アクセプターステムの上位二つの GC 塩基対 (G1-C72 と G2-C71) をそれぞれ tRNA^{Met} タイプ (A1-U72 もしくは C2-G71) に置換した変異体で、アグマチン受容活性がほぼ消失した。

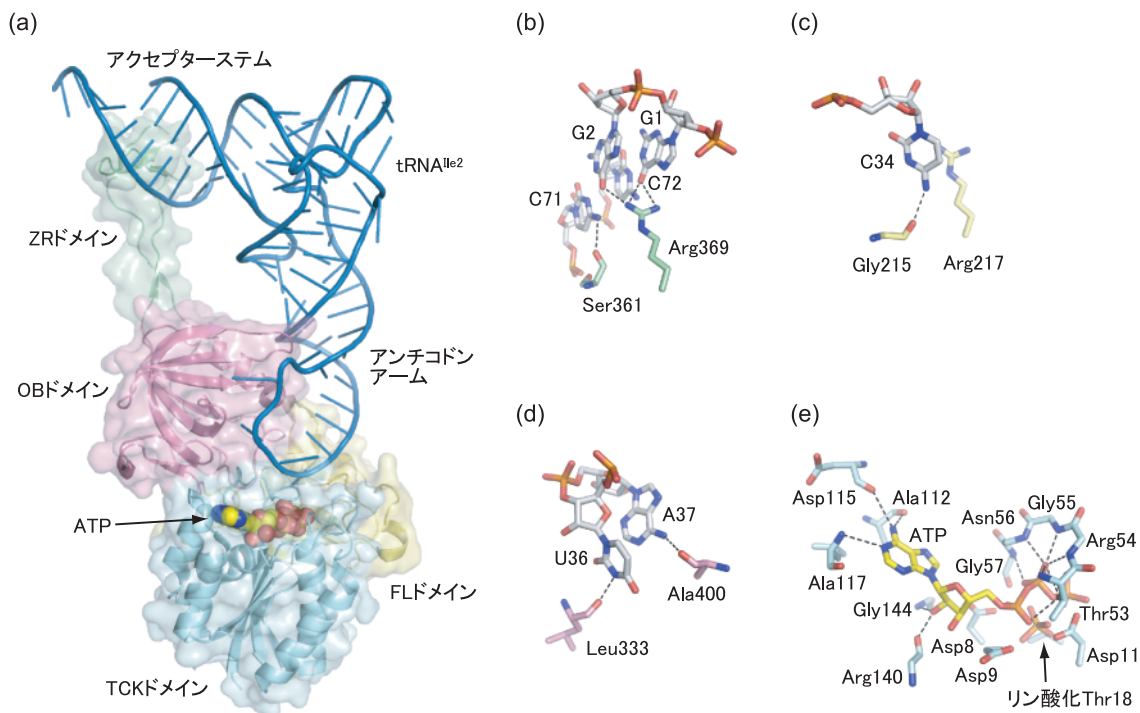


図 2

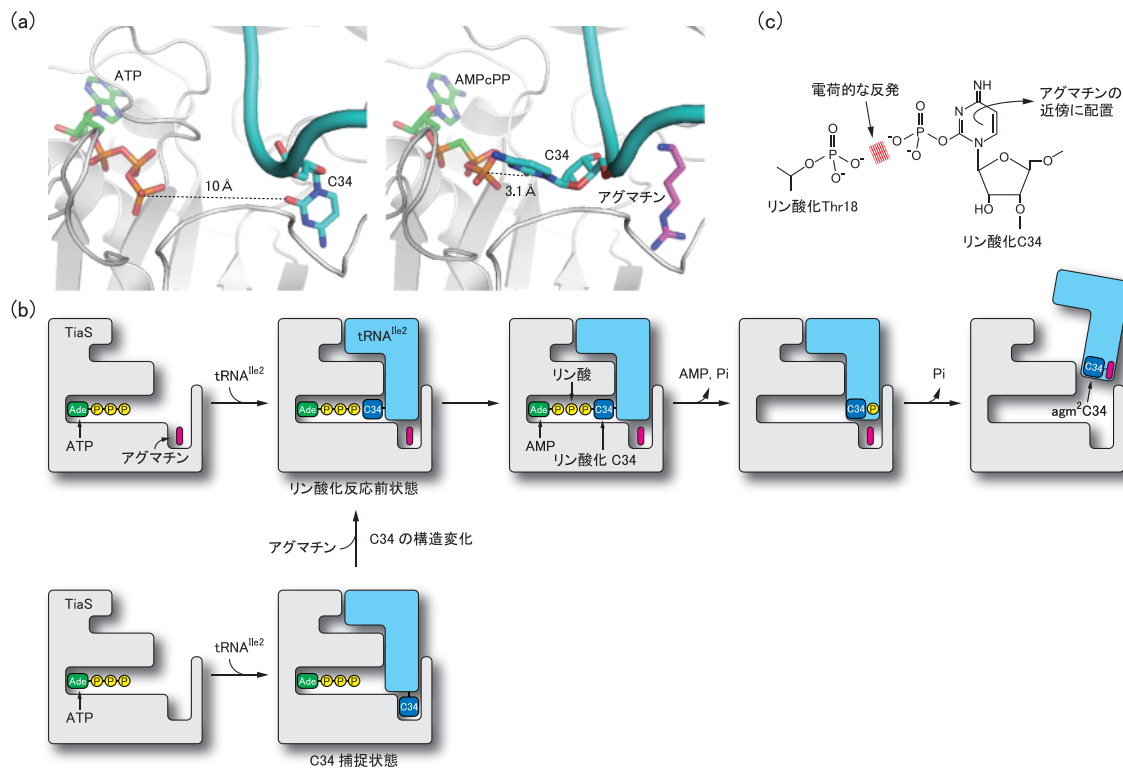


図 3

古細菌では、これら二つの GC 塩基対は高度に保存されており、前述のとおり TiaS の ZR ドメインによって配列特異的に認識されている (図 2b)。したがって、TiaS はアクセプターステムの G1-C72 と G2-C71 塩基対を認識し、tRNA^{Ile2} を選択することが明らかとなった。TiaS が tRNA のアクセプターステムを見分け tRNA^{Ile2} と tRNA^{Met} を選別するしくみは、ライシジンを合成する酵素 TisS が両者を識別するメカニズムとよく類似している⁷⁾。

4. 触媒ドメイン

今回の構造解析から TiaS のドメイン構成が分かり、N 末端側に位置する TCK ドメインに ATP が結合していることが明らかとなった (図 2a)。TiaS は ATP を塩基特異的に認識し、特徴的な 2 本のループ (P1 および P2 ループ) を用いて ATP の三リン酸と強固に結合していた (図 2e)。一方、TiaS の構造決定とほぼ同時期に、共同研究者である東京大学・鈴木勉教授のグループによる生化学的な実験から¹⁰⁾、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 (図 1c)。P1 ループには保存されたアスパラギン酸残基 (Asp8, Asp9, Asp11) が存在し、これらは ATP の三リン酸を取り囲むように配置されていた (図 2e)。これらをアラニン残基に置換した変異体では、ATP の加水分解活性および agm²C 合成活性がともに消失しており、このドメインが C34 のリン酸化に関わることが示唆された。

さらに今回の研究から、TiaS は ATP を利用して自身の Thr18 をリン酸化していることが判明した (図 2e)。このように、TiaS の N 末端ドメインは、自身の Thr18 と基質 tRNA の C34 の双方をリン酸化する活性を有していることから、我々はこのドメインを TCK (Thr18-Cyt34 キナーゼ)

ドメインと命名した。Thr18 は TiaS ファミリーで高度に保存されており、変異体解析の結果、ATP の加水分解および agm²C 形成に不可欠であることが明らかとなった。リン酸化 Thr18 は P1 ループを構成する残基であり、ATP の γ リン酸近傍に配置されている。リン酸化 Thr18 の生理的な役割については現在のところ解明されていないが、触媒反応に不可欠なマグネシウムイオンの配位や、後述するように C34 のリン酸化後に起こる tRNA アンチコドン領域の構造変化に関わると我々は考えている。

5. agm²C 形成機構

TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP 複合体 (3 者複合体) と TiaS-tRNA^{Ile2}-AMPcPP-アグマチン複合体 (4 者複合体) では、C34 の結合位置がアグマチンの有無で大きく異なっていた (図 3a)。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位置し、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この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。TiaS は C34 の 2 位カルボニル基を ATP の γ リン酸基でリン酸化することから¹⁰⁾ (図 1c)、 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 のリン酸化が起こりえない non-productive な状態といえる。

古細菌におけるアグマチンと tRNA^{Ile2} の正確な細胞内濃度は知られていない。しかしながら、プトレシンやスペルミジンといった古細菌に豊富に含まれるポリアミンはアグマチンを介して生合成されることから、アグマチンの細胞内濃度は tRNA^{Ile2} のものよりも高いと推定される。また、TiaS がアグマチンと tRNA^{Ile2} に対して同程度の親和性を示

図 2 TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP 複合体の結晶構造

- (a) 3 者複合体の全体構造。
- (b) ZR ドメインとアクセプターステムの相互作用。
- (c) FL ドメインと C34 の相互作用。
- (d) OB ドメインと U36 および A37 の相互作用。
- (e) TCK ドメインと ATP の相互作用。

図 3 agm²C の形成機構

- (a) TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP 複合体 (左図) と TiaS-tRNA^{Ile2}-AMPcPP-アグマチン複合体 (右図) における活性部位の構造の比較。
- (b) アグマチン濃度に依存した二通りの agm²C 合成経路。
- (c) リン酸化 C34 とリン酸化 Thr18 との間の負電荷どうしの反発の模式図。この電荷的な反発によって、リン酸化 C34 は弾き飛ばされ、アグマチンの近傍に再配置されると考えられる。

すこと¹⁰⁾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“リン酸化反応前状態”の構造をとると考えられる (図 3b). 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まえ, 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¹⁰⁾, 常に C34 をリン酸化しうる能力を持つ. 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と考えられる. 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. つまり, アグマチンが酵素反応の ON/OFF を制御していると考えられることもでき, アグマチン濃度依存的に細胞の増殖を調節するシステムが古細菌に存在しているのかも知れない. C34 はリン酸化された後, リン酸化 Thr18 との間の負電荷どうしの反発によってアグマチンの近傍に移動してくることが予想され (図 3c), 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.

6. お わ り に

古細菌と真正細菌は C34 をそれぞれ agm²C とライシジンに変換し, AUA コドンの解読に対応している. これら修飾ヌクレオシドの化学構造はよく類似しているものの, その形成に関わる酵素 TiaS と TilS にはアミノ酸配列の相同性がなく, 両者は異なるタンパク質ファミリーに属している. 実際, これら二つの酵素はそれぞれ C34 をリン酸化とアデニル化によって活性化するなど, 全く異なるしくみで修飾反応を触媒している. しかし一方で, TiaS と TilS はともに tRNA のアクセプターステムの配列を認識し, tRNA^{Ile2} と tRNA^{Met} を選別するという共通点を併せ持つことも明らかとなった. このように, 両酵素は構造的に見ても全く異なるタンパク質ではあるが, tRNA^{Ile2} を認識するしくみや最終的にそれらが作り出す修飾シチジンの化学構造はよく類似している. これはまさに収斂進化の結果であると考えられ, 分子進化を考察する上で大変興味深い知見である. 以上のように, 古細菌と真正細菌は, それ

ぞれの進化の過程において, TiaS による agm²C 形成もしくは TilS によるライシジン形成という偶然にも類似したシチジン修飾システムを独自に確立し, AUA コドンを効率よく解読するしくみを獲得したと捉えることができる.

謝辞

本研究に携わった当研究室の大澤拓生博士に感謝します. また, 共同研究者である東京大学大学院工学系研究科・鈴木勉先生ならびに鈴木研究室の木村聡氏, 寺坂尚絃氏に心より御礼申し上げます.

- 1) Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2010) *Nat. Chem. Biol.*, 6, 277–282.
- 2) Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T., & Yokoyama, S. (1988) *Nature*, 336, 179–181.
- 3) Köhrer, C., Srinivasan, G., Mandal, D., Mallick, B., Ghosh, Z., Chakrabarti, J., & Rajbhandary, U.L. (2008) *RNA*, 14, 117–126.
- 4) Muramatsu, T., Yokoyama, S., Horie, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S., & Miyazawa, T. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 9261–9267.
- 5) Mandal, D., Köhrer, C., Su, D., Russell, S.P., Krivos, K., Castleberry, C.M., Blum, P., Limbach, P.A., Söll, D., & Rajbhandary, U.L. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 2872–2877.
- 6) Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., & Suzuki, T. (2003) *Mol. Cell*, 12, 689–698.
- 7) Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y., & Suzuki, T. (2005) *Mol. Cell*, 19, 235–246.
- 8) Nakanishi, K., Bonnefond, L., Kimura, S., Suzuki, T., Ishitani, R., & Nureki, O. (2009) *Nature*, 461, 1144–1148.
- 9) Osawa, T., Kimura, S., Terasaka, N., Inanaga, H., Suzuki, T., & Numata, T. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1275–1280.
- 10) Terasaka, N., Kimura, S., Osawa, T., Numata, T., & Suzuki, T. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1268–1274.

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
RNA プロセッシング研究グループ)

Molecular basis for tRNA^{Ile} agmatinylation essential for AUA codon decoding

Tomoyuki Numata (Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)