みにれびゅう

tRNA ジヒドロウリジン合成酵素の分子機構

田中　良和[1,2]，陳　明皓[2]，姚　閔[1,2]

1.　はじめに

RNA は DNA から転写反応により生成される核酸分子であるが，転写されたたままの状態では正確に機能することはできず，適切な修飾を受けて初めて機能を発現できるようになる．これまでに，メチル化やアセチル化，チオ化など 100 種類以上の RNA の修飾が報告されており[1]，各々の修飾は，それに対応する RNA 修飾酵素により特異的に導入される．報告されている RNA 修飾の多くはトランスファー RNA（tRNA）の修飾である．tRNA は約 76 塩基の RNA 分子で，タンパク質合成の際にメッセンジャー RNA の遺伝暗号に対応するアミノ酸をリボソームに運搬する重要な役割を持つ．61 種類のコドンに対応するために大腸菌は 48 種類の tRNA を持っているが，導入される修飾の種類や位置は tRNA の種類により異なる．したがって，RNA 修飾酵素は修飾を入れるべき tRNA を特異的に認識し，目的の修飾を目的の位置に正確に導入する．しかし，その一方で，ほぼすべての tRNA に普遍的に導入される修飾も存在する．20 位付近のウリジン（U）が還元されたジヒドロウリジン（D），54 位の U がメチル化されたチミジン（T），55 位の U が修飾されたシュードウリジン（Ψ）である．tRNA はクローバーリーフ構造と呼ばれる特徴的な立体構造を形成しているが，これらの修飾がほぼすべての tRNA の決まった位置に導入されていることから，20 位付近は D ループ，54 位付近は T ループ（もしくは TψC ループ）と呼ばれている．特異的に修飾を導入する酵素とは異なり，これらの普遍的な修飾を導入する酵素は，構造の異なるさまざまな tRNA に修飾を導入しなければならない．本稿では，ジヒドロウリジン合成酵素（dihydrouridine synthase：Dus）に着目し，Dus がどのようにしてさまざまな tRNA を認識して D 修飾を導入するのかを，筆者らの研究成果を中心に紹介する．

[1] 北海道大学大学院先端生命科学研究院　[2] 北海道大学大学院生命科学院（〒060-0810　札幌市北区北 10 条西 8 丁目）
Molecular basis of tRNA dihydrouridine synthase
Yoshikazu Tanaka[1,2], Minghao Chen[2] and Min Yao[1,2]（[1]Faculty of Advanced Life Sciences, Hokkaido University, [2]Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University, Kita-10 Nishi-8, Sapporo 060-0810, Japan）

2.　D 修飾と Dus

D 修飾が導入されると RNA の柔軟性が向上することが示されている一方で[2]，悪性腫瘍から抽出した tRNA に多くみられるなど，D 修飾は疾患との関連性も示唆されている[3,4]．D 修飾はウラシル塩基の C5-C6 間の二重結合に水素を二つ付加して還元することにより合成される（**図 1**）．Dus はフラビンモノヌクレオチド（FMN）の還元力を利用して，このウラシル塩基の還元反応を触媒する．酵母においては，D 修飾は tRNA の 16，17，20，20A，20B，47 位に発見されているが，どの位置に D 修飾が導入されるかは tRNA の種類により異なる[5]．これらの異なる位置の D 修飾を導入するために，酵母は 4 種類の Dus（Dus1p，Dus2p，Dus3p，Dus4p）を持っており，Dus1p は 16，17 位，Dus2p は 20 位，Dus3p は 47 位，Dus4p は 20A，20B 位の D 修飾を担当する．それぞれの Dus は複数の種類の tRNA を認識し，各々の酵素が担当する位置に D 修飾を導入する[5,6]．

さらに，Dus は D 修飾以外の修飾を受けた tRNA，すなわちある程度成熟した tRNA のみを基質として認識するという興味深い性質を有する[7]．一般に tRNA 修飾酵素の研究には *in vitro* で合成された RNA が用いられるが，この興味深い性質により Dus の研究では合成 RNA を用いることができない．そのため，D 修飾という普遍的な修飾を導入する酵素であるにも関わらず，Dus の研究の進度はほかの tRNA 修飾酵素に比べて遅かった．D 修飾の存在は

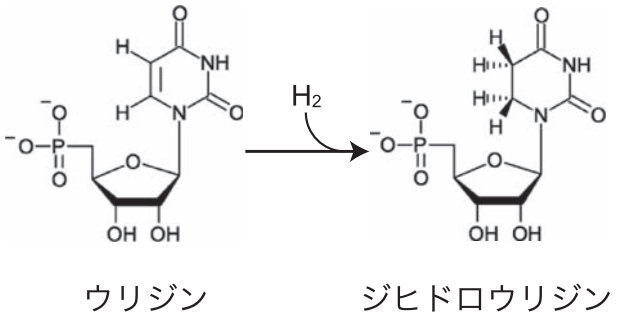


図 1　ウリジンとジヒドロウリジンの化学構造

1965年には報告されていたが[8]，2002年に大腸菌のノックアウト株を用いてDusが同定されるまで，37年もの時間を要したことからもその遅さが伺える[9]．

3. Dus-tRNA複合体の構造解析の経緯

Dusの結晶構造は，2004年にParkらのグループによりタンパク質の立体構造を網羅的に決定するプロジェクト（構造ゲノム科学プロジェクト）の一環として決定された[10]．明らかになった構造は，β-バレル構造のN末端ドメインと，ヘリックスバンドル構造のC末端ドメインの二つのドメインから構成されており，N末端ドメインの中心に存在するくぼみの底にはFMNが結合していた．これらの構造的特徴から，N末端ドメインが機能ドメインでC末端ドメインがRNA結合ドメインと推察された．その後，DusがtRNAをどのように認識して結合するのかを明らかにするため，我々はDusとtRNAの複合体の構造解析を目指したが，長きにわたり結晶を得ることはできなかった．2008年になり，上述した「Dusは修飾を受けたRNAだけを基質として認識する」ということが報告され，複合体の結晶が得られない理由がわかった．我々は，基質として認識されない*in vitro*で合成したRNAを用いて複合体の結晶を得ようとしていたのである．当時，結晶構造解析を得意とするいくつものグループがDus-tRNA複合体の結晶化にチャレンジしていたが，どこも成功しなかった．おそらく，同様の手法でトライしていたためだろう．その後，我々は，安定なtRNA複合体を形成できるDusを求め，さまざまな生物由来のDusを調製したのだが，その過程で偶然にも*Thermus thermophilus*由来のDusを大腸菌に過剰発現させると，菌体内で自発的にDus-tRNA複合体を形成するということを発見した[11]．後にわかることだが，この複合体はtRNAの修飾塩基であるU20とDusの活性残基であるCys93とが共有結合で連結された複合体であり，この安定な複合体を用いることで我々はDus-tRNA複合体の結晶構造を初めて決定することができた[12]．

4. Dus-tRNA複合体の構造

tRNAはDusのNおよびC末端ドメインの間に挟まれる形で結合していた（**図2A**）．その際，DusはtRNAのDループ（D-loop）とTループ（T-loop）の領域を主に認識していた．DループとTループは二次構造を記した際には遠く離れているが，実際はループ同士がkissing loop相互作用と呼ばれる相互作用を複数の塩基間で形成し，近接して存在している．Dusは正に帯電したドメイン間のくぼみを使ってこの領域を認識していた．そして，N末端ドメインに存在する活性ポケットには，修飾を受ける塩基（U20）が深く挿入されていた．

tRNAが結合してもDusにはそれほど目立った構造変化はなかった．一方，Dusに結合したtRNAの構造をフリーのtRNAの構造と比較すると，基質塩基であるU20を含むDループの領域に大きな構造変化がみられた（図2B）．まず，基質となるU20がDusの活性部位に入るために大きく外に飛び出していた．さらに，U16，U17が大きく外に飛び出しDusと結合していた．驚いたことに，U20，およびU16，U17がこれほどに大きな構造変化をしていたにも関わらず，その間に存在するG18，G19はkissing loop相互作用を形成したままであった．過去の報告によると，

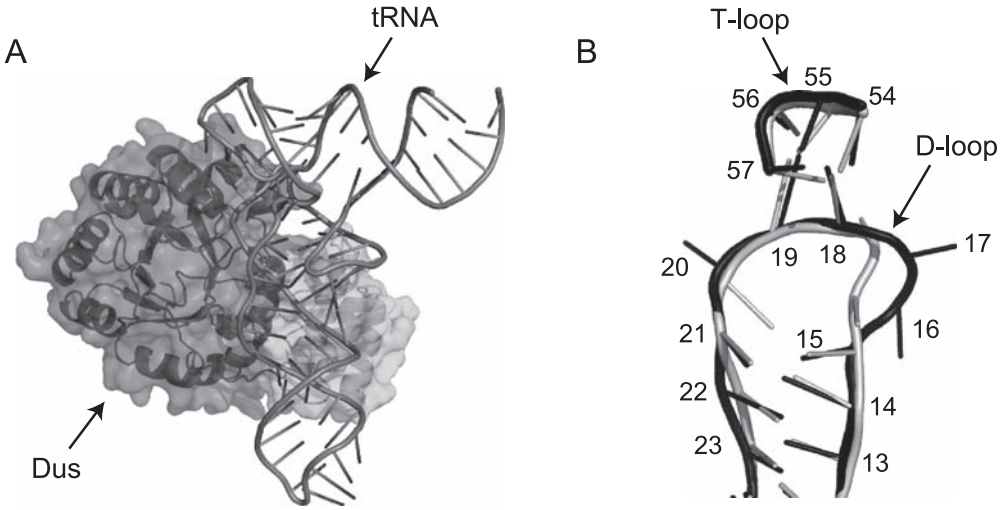


図2 DusとtRNAの複合体の結晶構造
（A）*T. thermophilus* DusとtRNA複合体の構造．表面が表示されている分子がDusで，リボン表示の分子がtRNAである．（B）tRNAの構造変化．Dusと結合したtRNAを黒で，フリーのtRNA分子を灰色で表している．

このDループとTループ間の相互作用はtRNAに種々の修飾が導入されることにより安定化される[13,14]．上述のとおり，Dusは修飾を受けてある程度成熟したtRNAだけを基質として認識し，結合することができることを考え合わせると，Dusは種々の修飾により安定化されるDループ／Tループ間の相互作用を目印として用い，適切に修飾されたtRNAだけを選別して結合していると考えられる．修飾が導入されていないtRNAの場合は，U20を活性部位へと引っ張り込んだ際にkissing loop相互作用が崩壊し，Dusと安定な相互作用を形成できないのだろう．興味深いことに，Trm5という，これもまた修飾されたtRNAのみを特異的にメチル化する酵素も，Dusと同様に，修飾により安定化されたDループ／Tループ相互作用を認識する[15]．この領域の安定化を修飾の有無の目印として用いるのはDusに限った話ではなく，もしかしたら類似したタンパク質が共通に用いる，普遍的な戦略なのかもしれない．

5. 活性部位の詳細な構造と反応機構

Dus-tRNA複合体の結晶構造からは，Dusがある程度修飾を受けたtRNAだけを認識する分子機構がわかった．しかし，構造解析の分解能は3.75Åと低く，この構造をもとに詳細な反応機構を記述することはできなかった．そこで我々は，Dus-tRNA複合体をRNaseAで消化してDusとtRNA断片の複合体を調製し，その結晶構造解析を行った．結合するtRNAが小さくなったことにより，結晶の分解能は1.95Åまで改善され，これにより活性ポケット中で，基質RNAがどのように認識されるのかを知ることができた．

明らかになった構造には，G18～A21の4塩基のtRNAの断片が結合していた（**図**3A）．驚いたことに，基質塩基であるU20のC5はDusのCys93の側鎖と共有結合を形成していた（図3B）．一般に，tRNAに結合するタンパク質は厳密にtRNAを認識するため，ある程度の大きさを持ったRNA断片でなければタンパク質には安定に結合しないが，Dusの場合は期せずして形成されたU20とCys93の間の共有結合により，4塩基まで細分化された後もしっかりとタンパク質の活性部位に捕捉されていたのである．活性ポケット中で基質塩基U20は，ウラシル環をFMN補因子のイソアロキサジン環と平行に配向させる形でFMNとCys93の間に結合し，周辺に存在するAsn90，Arg178が水素結合を形成してU20を認識していた．しかし，U20と直接相互作用を形成したのはこれらの残基およびFMNだけで，活性ポケット内部には大きな空間が残されていた．興味深いことに，この空間は，L字形の謎の電子密度によって埋められていた（図3B）．この謎の分子は，U20のウラシル塩基と相互作用する一方で，活性ポケットに存在する残基とも相互作用していた．すなわち，DusはL字形の謎の分子を介して間接的にU20を認識していたのである．その後，我々は大腸菌由来のDusAの結晶構造解析を行ったが[16]，同様に活性部位中には有意な大きさの電子密度が観測され，この謎の分子を介した相互作用はDusファミリータンパク質に共通に用いられているものと推察される．

Dusの酵素活性発現機構を理解するために，活性部位の残基の変異体を作製し，その酵素活性を野生型と比較した．ここでは，その詳細の記述は避けるが，変異体解析に

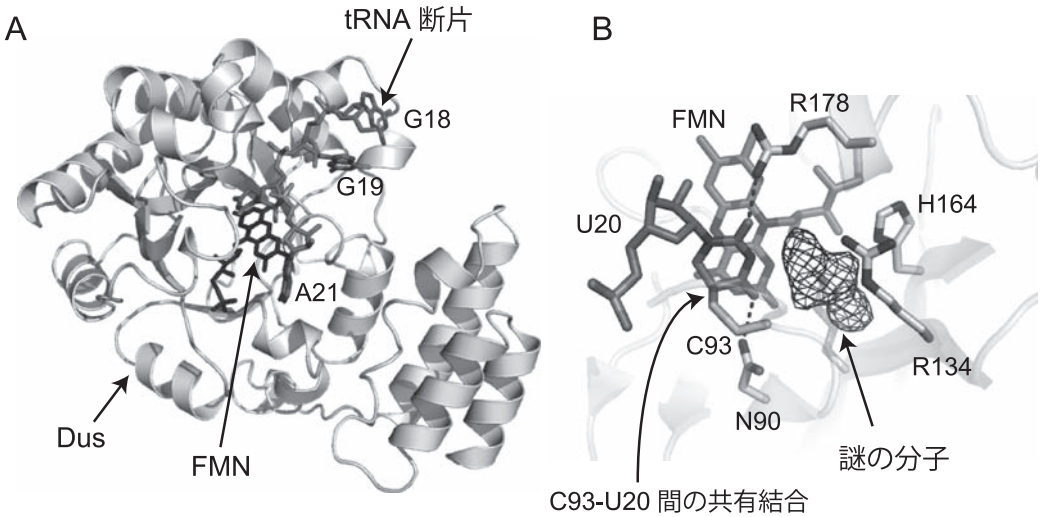


図3 DusとtRNA断片の複合体の高分解能の結晶構造（分解能1.95Å）
（A）Dus-tRNA断片複合体の構造．Dusはリボン図で表示し，tRNA断片はstickで表示している．黒いstickはFMNを表す．（B）活性部位の拡大図．U20とCys93は共有結合を形成していた．L字形の謎の分子の電子密度はU20とポケット内の残基（R134，H164）の間に結合していた．

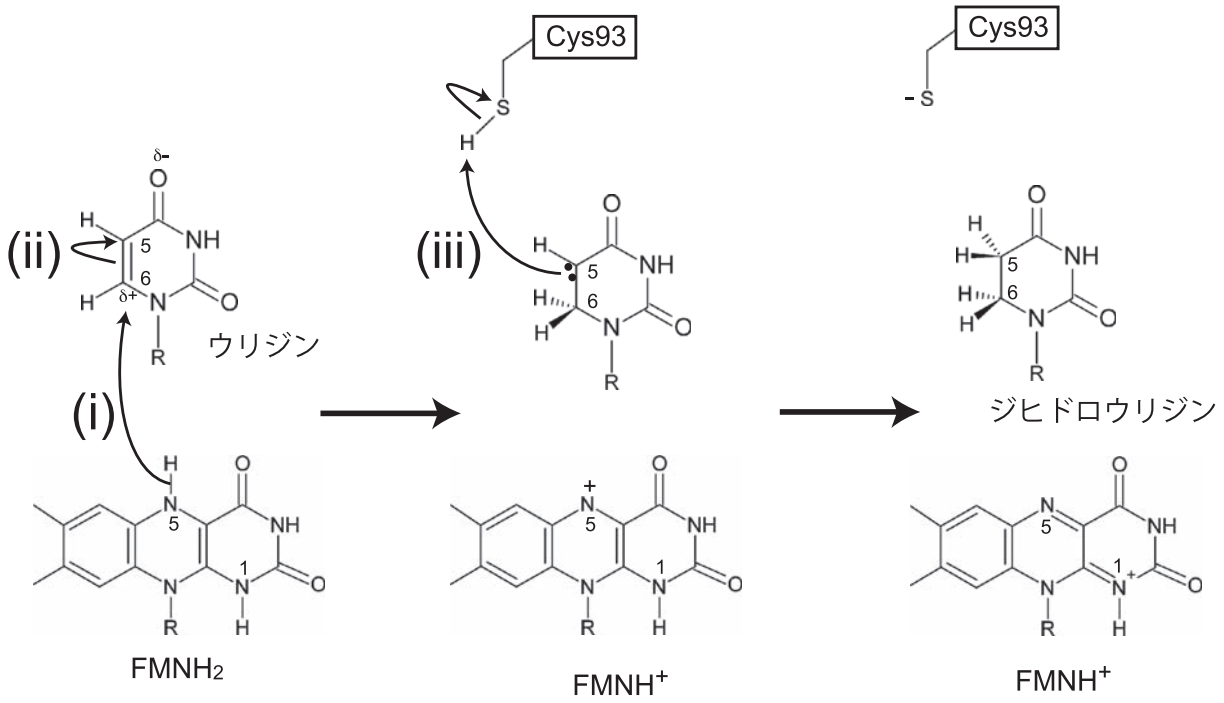


図 4　結晶構造と変異体解析から提案された Dus の反応様式
(i) まず，還元型 FMN の N5 位からウラシル環の C6 位にヒドリドイオンが転移する．(ii) これにより，C5–C6 間の二重結合が単結合になり，電子対が C5 位置に移動する．(iii) この電子対が Cys93 の側鎖の先端の水素原子に求核攻撃し，プロトンが Cys93 からウリジンに転移する．

より得られた各々の残基の役割と，結晶構造中での基質塩基と FMN および活性残基の位置関係を考え合わせ，**図 4** のような活性発現機構が提案された．変異体解析の詳細は文献 7 を参照されたい．

6.　まとめと残された課題

以上の一連の結晶構造解析と変異体解析をまとめると，(i) Dus は T ループと D ループ間の相互作用の強さを目印にして，種々の修飾が導入された tRNA のみを認識して結合する．(ii) 活性ポケット中で基質塩基は Asn90，Arg178 により水素結合を形成して直接認識されるほか，L 字形の謎の分子を介して間接的に認識される．(iii) Cys93 が C5 位へのプロトン供与体，還元型 FMN が C6 位へのヒドリド供与体として働く．

残された課題は，謎の分子の同定と，なぜ Cys93 と U20 が共有結合を形成していたのかを解明することである．Dus と類似したウリジンの酸化・還元反応を触媒する酵素においては，ウラシル塩基はアスパラギン，セリンにより認識されていることから[17]，謎の分子はアミド基やヒドロキシ基を有する分子と予想される．今後，NMR などを用いて同定したいと考えている．Cys93-U20 間の共有結合については，提唱された反応機構中では，このような分子が形成されることはないため，この構造は反応中間体ではないと考えられる．一度この共有結合が形成されると，これを切断することはできず，反応がさらに進むことはない．おそらく，*T. thermophilus* 由来の Dus を大腸菌で発現させたことにより，tRNA の認識・結合までは適切に行われたものの，本来は起こらないような反応が活性部位中で起こったのだと考えられる．事実，大腸菌由来 Dus を大腸菌中で大量発現させても，このような共有結合は形成されない．本来とは異なる反応が起こり，それにより偶然形成された tRNA と Dus の安定な複合体を利用することにより，長きにわたり得られなかった複合体の結晶構造が得られ，分子機構を理解できた．人によってはこの複合体をアーティファクトと呼ぶかもしれないが，上記の一連の研究結果は，このような予期せぬ結果をうまく生かせば生命現象を深く理解することができることを示す良い例であると思う．

謝辞

酵素活性の測定は東京大学大学院工学系研究科　鈴木勉教授の研究室にて行われました．鈴木勉教授をはじめ，ご指導・ご協力いただきました研究室の方々に深く感謝いたします．

1) Rozenski, J., Crain, P.F., & McCloskey, J.A. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 196–197.

2）Dalluge, J.J., Hashizume, T., Sopchik, A.E., McCloskey, J.A., & Davis, D.R.（1996）*Nucleic Acids Res*., **24**, 1073–1079.
3）Kuchino, Y. & Borek, E.（1978）*Nature*, **271**, 126–129.
4）Kato, T., Daigo, Y., Hayama, S., Ishikawa, N., Yamabuki, T., Ito, T., Miyamoto, M., Kondo, S., & Nakamura, Y.（2005）*Cancer Res*., **65**, 5638–5646.
5）Xing, F., Hiley, S.L., Hughes, T.R., & Phizicky, E.M.（2004）*J. Biol. Chem*., **279**, 17850–17860.
6）Bishop, A.C., Xu, J., Johnson, R.C., Schimmel, P. & de Crecy-Lagard, V.（2002）*J. Biol. Chem*., **277**, 25090–25095.
7）Rider, L.W., Ottosen, M.B., Gattis, S.G. & Palfey, B.A.（2009）*J. Biol. Chem*., **284**, 10324–10333.
8）Madison, J.T. & Holley, R.W.（1965）*Biochem. Biophys. Res. Commun*., **18**, 153–157.
9）Bishop, A.C.（2002）*J. Biol. Chem*., **277**, 25090–25095.
10）Park, F., Gajiwala, K., Noland, B., Wu, L., He, D., Molinari, J., Loomis, K., Pagarigan, B., Kearins, P., Christopher, J., Peat, T., Badger, J., Hendle, J., Lin, J., & Buchanan, S.（2004）*Proteins*: *Structure*, *Function*, *and Bioinformatics*, **55**, 772–774.
11）Yu, F., Tanaka, Y., Yamamoto, S., Nakamura, A., Kita, S., Hirano, N., Tanaka, I., & Yao, M.（2011）*Acta Crystallogr. Sect. F*, *Struct. Biol. Cryst. Commun*., **67**, 685–688.
12）Yu, F., Tanaka, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Nakamura, A., Hirano, N., Yao, M., & Tanaka, I.（2011）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 19593–19598.
13）Derrick, W.B. & Horowitz, J.（1993）*Nucleic Acids Res*., **21**, 4948–4953.
14）Perret, V., Garcia, A., Puglisi, J., Grosjean, H., Ebel, J.P., Florentz, C., & Giege, R.（1990）*Biochimie*, **72**, 735–743.
15）Goto-Ito, S., Ito, T., Kuratani, M., Bessho, Y., & Yokoyama, S.（2009）*Nat. Struct. Mol. Biol*., **16**, 1109–1115.
16）Chen, M., Yu, J., Tanaka, Y., Tanaka, M., Tanaka, I., & Yao, M.（2013）*Acta Crystallogr. Sect. F*, *Struct. Biol. Cryst. Commun*., **69**, 834–838.
17）Bjornberg, O., Jordan, D.B., Palfey, B.A., & Jensen, K.F.（2001）*Arch. Biochem. Biophys*., **391**, 286–294.

著者寸描

●田中良和（たなか　よしかず）

北海道大学大学院先端生命科学研究院准教授．博士（工学）．

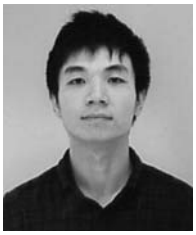
■略歴　2004年東北大学大学院工学研究科博士後期課程修了，04～06年北海道大学博士研究員，06～08年東京大学博士研究員，08～12年北海道大学テニュアトラック特任助教．12年より現職．

■研究テーマと抱負　構造情報に基づいた生体高分子の分子機構の解明．

■ホームページ　http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/

■趣味　ゴルフ．

●陳　明皓（ちん　みんはお）



北海道大学大学院生命科学院修士2年．

■略歴　1989年中国桂林に生る．13年北海道大学理学部高分子機能科学科卒業．同大学院生命科学院入学，現在に至る．

■研究テーマと抱負　tRNA転写後修飾酵素の構造解析．一人前の研究者になれるよう，日々勉強中．

■趣味　スポーツ，ボードゲーム．

●姚　閔（やお　みん）

北海道大学大学院先端生命科学研究院教授．博士（理学）．

■略歴　1995年北海道大学大学院理学研究科にて博士学位を取得後，ESRFの訪問研究者（マックサイエンス(株)社員），97年大阪大学蛋白質研究所研究員，98年北海道大学助手，准教授を経て，2012年より現職．

■研究テーマと抱負　専門はX線構造生物学であり，翻訳の制御と分子機構の研究に取り組んでいる．X線構造生物学により漢方生薬の有効成分の作用機構を解明することが学生時代からの夢である．

■趣味　旅行．