

研究成果報告書

(国立情報学研究所民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		tRNA修飾酵素によるアンチコドンウリジンのチオ化修飾機構の分子的基盤			
研究テーマ (欧文) AZ		Structural basis for the chemical modification of tRNA anticodon uridine			
研究氏 代 表 者	カタカナ CC	姓)ヌマタ	名)トモユキ	研究期間 B	2007 ~ 2009 年
	漢字 CB	沼田	倫征	報告年度 Y	2009
	ローマ字 CZ	Numata	Tomoyuki	研究機関名	産業技術総合研究所
研究代表者 CD 所属機関・職名		独立行政法人 産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 ・ 研究員			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください)					
<p>遺伝情報の翻訳過程において、tRNAはmRNAにコードされたヌクレオチド配列情報をアミノ酸配列情報に変換するアダプター分子として機能する。従って、tRNAによる正しいコドンの認識は、適正な蛋白質を合成する上で極めて重要である。tRNAによるコドンの認識は、コドン-アンチコドン間の塩基対の形成によりなされているが、その際、tRNAのアンチコドンに存在する修飾ヌクレオチドが、正しいコドンの認識に重要な役割を果たすことが知られている。特に、tRNAのアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオチドは、コドン第三塩基との対合に関わることから、コドンの縮重と密接に関わっている。適正な蛋白質合成を行うためには、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応するtRNAが、プリン塩基で終了するコドンのみを特異的に認識し、コドンの揺らぎを制限することが不可欠とされている。グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応するtRNAでは、アンチコドン一文字目のウリジンを5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン等に変換することで、この問題に対処しており、この制御システムは、全ての生物において高度に保存されている。5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンの5位のカルボキシメチルアミノメチル化修飾には、二種の酵素(GidAとMnmE)が関与し、両酵素は複合体を形成することが知られており、さらに、葉酸化合物由来の炭素原子とグリシンがカルボキシメチルアミノメチル基の骨格を形成することが推定されている。しかしながら、その詳細な修飾反応メカニズムについては良く分かっていない。本研究では、GidAとMnmEのX線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行い、カルボキシメチルアミノメチル化修飾反応における両酵素の役割を解明することを目的とする。</p> <p>本研究では、<i>Aquifex aeolicus</i>由来GidAの結晶化および構造解析を行った。まず、GidAの大腸菌内における大量発現系を構築し、各種クロマトグラフィーを用いた精製スキームを確立した。精製した酵素を用いて結晶化条件をスクリーニングした結果、幾つかの条件でGidAの結晶を得ることに成功し、SAD法によってその結晶構造を決定した。その結果、GidAにはフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が補酵素として結合しており、変異体解析と併せFADのフラビン環結合部位周辺がGidAの活性部位であることが明らかとなった。FAD結合部位近傍には種間で高度に保存されたシステインが存在していた。このシステインをセリンに置換した変異体を作製し、<i>gidA</i>欠損大腸菌変異株を用いた<i>in vivo</i>相補実験から、このシステインがカルボキシメチルアミノメチル化反応において触媒残基として機能することを明らかにした。カルボキシメチルアミノメチル化反応にはGidAおよびMnmEが関与し、両酵素は複合体を形成することが報告されている。しかしながら、tRNAが両酵素とそれぞれ相互作用するのか、また、どちらか一方の酵素のみと特異的に相互作用するのかは明らかではない。そこでゲルシフト解析を行ったところ、tRNAがGidAと強固に相互作用することが明らかとなり、GidA・MnmE複合体中において、GidAが主にtRNAとの結合に関わることを示唆した。GidAには活性部位を中心とした広範な塩基性領域が存在しており、変異体解析から、この領域がtRNAとの結合に関わることを明らかとなった。これらの結果から、修飾反応過程においてtRNAのアンチコドン一文字目のウリジンは、触媒に関わるシステイン残基の近傍に配置されることが示唆され、GidAがチミジル酸合成酵素と類似の機構でウリジンの5位を修飾すると考えられる。</p>					
キーワード FA	tRNA	転写後修飾	修飾酵素	結晶構造解析	

(以下は記入しないでください)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA						
研究機関番号 AC					シート番号						

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい）									
雑誌	論文標題 GB	Conserved cysteine residues of GidA are essential for biogenesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine at tRNA anticodon							
	著者名GA	Osawa et al.	雑誌名GC	Structure					
	ページGF	713 ~ 724	発行年GE	2	0	0	9	巻号 GD	17
雑誌	論文標題 GB	Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the tRNA-modification enzyme GidA from <i>Aquifex aeolicus</i>							
	著者名GA	Osawa et al.	雑誌名GC	Acta Crystallogr. Sect. F					
	ページGF	508 ~ 511	発行年GE	2	0	0	9	巻号 GD	65
雑誌	論文標題 GB								
	著者名GA		雑誌名GC						
	ページGF	~	発行年GE					巻号 GD	
図書	著者名HA								
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページ HE	
図書	著者名HA								
	書名HC								
	出版者HB		発行年HD					総ページ HE	

欧文概要EZ

The 5-carboxymethylaminomethyl modification of uridine (cmnm⁵U) at the anticodon first position occurs in tRNAs that read split codon boxes ending with purine. This modification is crucial for correct translation, by restricting codon-anticodon wobbling. Two conserved enzymes, GidA and MnmE, participate in the cmnm⁵U modification process. Here we determined the crystal structure of *Aquifex aeolicus* GidA at 2.3 Å resolution. The structure revealed the tight interaction of GidA with FAD. Structure-based mutation analyses allowed us to identify two conserved Cys residues in the vicinity of the FAD-binding site, which are essential for the cmnm⁵U modification *in vivo*. Together with a mutational analysis of MnmE, we propose a novel mechanism for the cmnm⁵U modification process, where GidA, but not MnmE, attacks the C6 atom of uridine, by a mechanism analogous to that of thymidylate synthase. We also present a tRNA-docking model, which provides structural insights into the tRNA recognition mechanism for efficient modification.