

## tRNA 依存的アミノ酸システインの生合成複合体の分子機構

姚 閔, 陳 美容

### 1. はじめに

一般的に、生体内ではタンパク質の合成に用いられる20種類のアミノ酸の合成経路が存在している。リボソーム上でタンパク質が合成される際には、mRNAのコドンに対応するそれらのアミノ酸 (amino acid: aa) がアミノアシルtRNA (aminoacyl tRNA: aa-tRNA) によって、リボソームに運ばれる。タンパク質合成の精度を保証するため、20種のアミノ酸に対応するaa-tRNAにも20種のアミノアシルtRNA合成酵素 (aminoacyl tRNA synthetase: aaRS) が存在しており、それぞれのtRNAに、それぞれのアミノ酸を正確に付加する (直接合成)<sup>1, 2)</sup>。一方、何らかの理由 (生存環境や、進化などの原因かもしれない) で、あるアミノ酸合成経路を持っていない生物が存在する。その生物では、合成経路のないアミノ酸はaa-tRNAからの分解によって産生される。この場合は、aa-tRNAの合成も通常と異なり、aaRSを利用する直接合成経路ではなく、複数の酵素によって2段階の反応が起こる間接合成経路が用いられる。その間接合成経路では、他のアミノ酸がミスチャージした (間違った) aa-tRNAが合成され、その後、校正酵素によって正しいアミノ酸に修正される。現在、Glu-tRNA<sup>Glu</sup>、Asp-tRNA<sup>Asp</sup>、およびCys-tRNA<sup>Cys</sup>の3種類のaa-tRNAの間接合成経路が発見されている<sup>3-5)</sup>。ここでは、我々が最近明らかにしたCys-tRNA<sup>Cys</sup>の間接合成経路の反応機構について紹介する。

### 2. 間接経路におけるCys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成と合成複合体 Transsulfursome

一部の古細菌は生体内にCys合成酵素が存在せず、Cys-

tRNA<sup>Cys</sup>合成酵素も持っていない。これらの生物では、遊離状態のCysがCys-tRNA<sup>Cys</sup>から分解され、Cys-tRNA<sup>Cys</sup>も2段階の間接合成経路によって合成される<sup>5, 6)</sup> (図1)。この2段階の間接合成では、まずphosphoseryl-tRNA synthetase (SepRS) がtRNA<sup>Cys</sup>にリン酸化されたセリン (Sep) を付加し、ミスチャージした中間体Sep-tRNA<sup>Cys</sup>を生成する。次に校正酵素SepCysS (Sep-tRNA:Cys-tRNA synthetase) がSドナーから硫黄を受け取り、中間体Sep-tRNA<sup>Cys</sup>のSepのO<sup>7</sup>をS<sup>7</sup>に置換してSepをCysに変換する<sup>5)</sup>。この2段階の合成では、中間体として生産されるSep-tRNA<sup>Cys</sup>が生体内で遊離されると、リボソームにおける翻訳は正しく行われなくなり、タンパク質の合成の正確さが問題となる。よって、Glu-tRNA<sup>Glu</sup><sup>7)</sup>、Asp-tRNA<sup>Asp</sup><sup>8)</sup>の間接合成と同様に、第1段階と第2段階の反応をそれぞれ触媒する酵素が複合体を形成し、2段階の反応が終了しないとtRNA<sup>Cys</sup>を遊離させないと考えられる。しかし、*in vitro*結合実験の結果、第1段階と第2段階の反応をそれぞれ触媒するSepRSとSepCysSはtRNAの存在に関係せず、相互作用しないことがわかった。また、*in vitro*の合成実験では、SepRSとSepCysSを用いた反応系ではCys-tRNA<sup>Cys</sup>が合成されず、この間接経路には他の因子が必要であることが示唆された<sup>9)</sup>。共同研究者であるLouisiana State大学 (当時Yale大学) のLiu博士は、Pull-downアッセイなどによって、間接経路を用いたCys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成において24kDaの新規因子を発見し、SepCysE (SepRS/SepCysS pathway enhancer) と名づけた<sup>10)</sup>。このSepCysEは間接経路におけるCys-tRNA<sup>Cys</sup>合成に必要であり、このような間接経路を有する菌によく保存され、菌の生存にも必須である。しかし、SepCysEと類似性の高いタンパク質は他に存在せず、SepCysEの機能および構造についてはまったく未知であり、この因子が関与するCys-tRNA<sup>Cys</sup>合成の分子機構も不明であった。我々は、古細菌*Methanocaldococcus jannaschii*由来のSepRS、SepCysS、新規因子SepCysEの複合体のX線結晶構造解析を行い、得られた構造情報を手がかりとしたアプローチで、SepCysEが介在することで、SepRSとSepCysSが複合体を形成し、Cys-tRNA<sup>Cys</sup>合成の一連の反応を完成することを明らかにした (図1)。この三者複合体はSepRS:SepCysS:SepCysE=4:4:4, 540kDaであり、これをTranssulfur-someと命名した<sup>11)</sup>。

北海道大学大学院先端生命科学研究院 (〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目)

Molecular basis of synthase complex for tRNA-dependent amino-acid cysteine biosynthesis

Min Yao and Meirong Chen (Faculty of Advanced Life Sciences, Hokkaido University, Kita-10 Nishi-8, Sapporo 060-0810, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900512

© 2018 公益社団法人日本生化学会

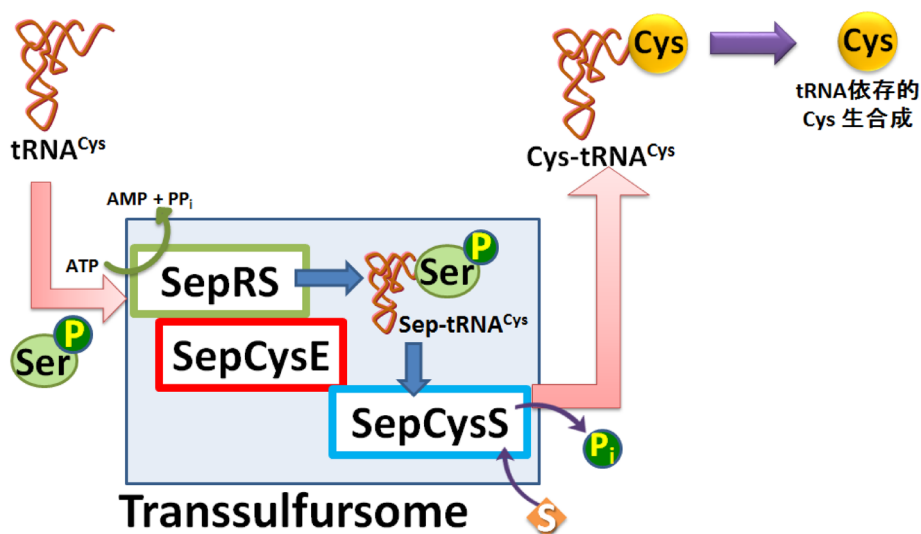


図1 TranssulfursomeによるCys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成

生体内にCys生産酵素が存在しない一部の古細菌では、アミノ酸CysがCys-tRNA<sup>Cys</sup>から分解され、そのCys-tRNA<sup>Cys</sup>合成も2段階の間接経路によって合成される。2段階の一連の反応を担うのはSepRS, SepCysE, SepCysSからなる複合体Transsulfursomeである。

### 3. SepCysEの構造・機能の解析

我々は、まず、大腸菌の発現系を用いて、SepCysEと第2段階の反応を触媒するSepCysSをそれぞれ大量調製した。そして、精製した両タンパク質を1:1 (mol比)の割合で混合し、ゲルろ過クロマトグラフィー (size exclusion chromatography: SEC) の精製ステップを通して、両タンパク質の結合を確認し、SepCysE-SepCysS複合体を再構築した。このSepCysE-SepCysS複合体の結晶化・X線構造解析を行い、2.8 Å分解能での構造を得ることができた<sup>10)</sup>。得られたSepCysE-SepCysS構造では、二量体のSepCysSとそれに結合しているSepCysEのN末端I34~F102残基 [SepCysE N-terminal domain: SepCysE(NTD)] しか見えなかった (図2中)。このSepCysE(NTD)がSepCysSの活性部位であるPLP結合部位から離れ、二量体の形で二量体のSepCysSと結合している。SepCysE(NTD)-SepCysS構造情報に基づいて作製したSepCysEの変異体解析を行い、SepCysE(NTD)のみSepCysSと相互作用することを明らかにした。おそらく、結晶中のSepCysE(NTD)以外の部分は、結合のパートナーがないため、ディスオーダーしてしまったと考えられた。

また、SepCysE-SepCysSを第2段階の反応ユニットとして、共発現により大量調製し、tRNA<sup>Cys</sup>との複合体の構造解析を試みた。その結果、2.62 Å分解能でSepCysE-SepCysS-tRNA<sup>Cys</sup>の構造解析に成功し、初めてCys-tRNA<sup>Cys</sup>間接合成経路の第2段階の反応におけるtRNA結合様式を示すことができた<sup>11)</sup>。TranssulfursomeとtRNAの化学量論比がTranssulfursome:tRNA<sup>Cys</sup>=1:2 (SepRS:Sep-

CysE:SepCysS:tRNA<sup>Cys</sup>=4:4:4:2) というゲルシフトアッセイの結果と一致して、SepCysE-SepCysS-tRNA<sup>Cys</sup>複合体の構造では、二量体の複合体SepCysE-SepCysSが1個のtRNA<sup>Cys</sup>と結合している (図2右)。この第2段階の反応では、tRNA<sup>Cys</sup>のアンチコドンが認識されず、他の部分がSepCysE-SepCysSの三つの領域と次のように相互作用している。①SepCysSの領域 (P333~E367) がtRNA<sup>Cys</sup>のアクセプターループと相互作用してtRNA<sup>Cys</sup>のU73を正確に認識する。②SepCysSのN末端ループ (L16~L30) がtRNA<sup>Cys</sup>のTΨCループと結合している。③SepCysEのC末端ドメイン [SepCysE(CTD)] がtRNA<sup>Cys</sup>のエルボーと結合している。興味深いことに、tRNA<sup>Cys</sup>と結合しているSepCysE(CTD)は13残基程度の長いリンカー (linker2) でSepCysE(NTD)とつながり、tRNA<sup>Cys</sup>のみと相互作用しているのに対して、tRNA<sup>Cys</sup>が結合していないSepCysE(CTD)は構造が見えず、ディスオーダーしていた。

さらに、Transsulfursome上で、Cys-tRNA<sup>Cys</sup>がどのように合成されたかを明らかにするため、四者複合体SepRS-SepCysE-SepCysS-tRNAの構造解析を試みたところ、SepRS-SepCysE-SepCysSの結晶が得られ、3.1 Å分解能での解析に成功した<sup>11)</sup>。図2左に示すように、得られた複合体の構造では、四量体を形成しているSepRSと4個のSepCysEのN末端ヘリックス [SepCysE(NH), M1~K24] しか見えなかった。その4個のSepCysE(NH)が形成している2個の二量体が、それぞれSepRSの四量体の両側に配置されているアンチコドン認識ドメイン (二量体) と結合している。このSepRS-SepCysE-SepCysS結晶のSDS-PAGEを確認したところ、結晶中に三つのタンパク質の全

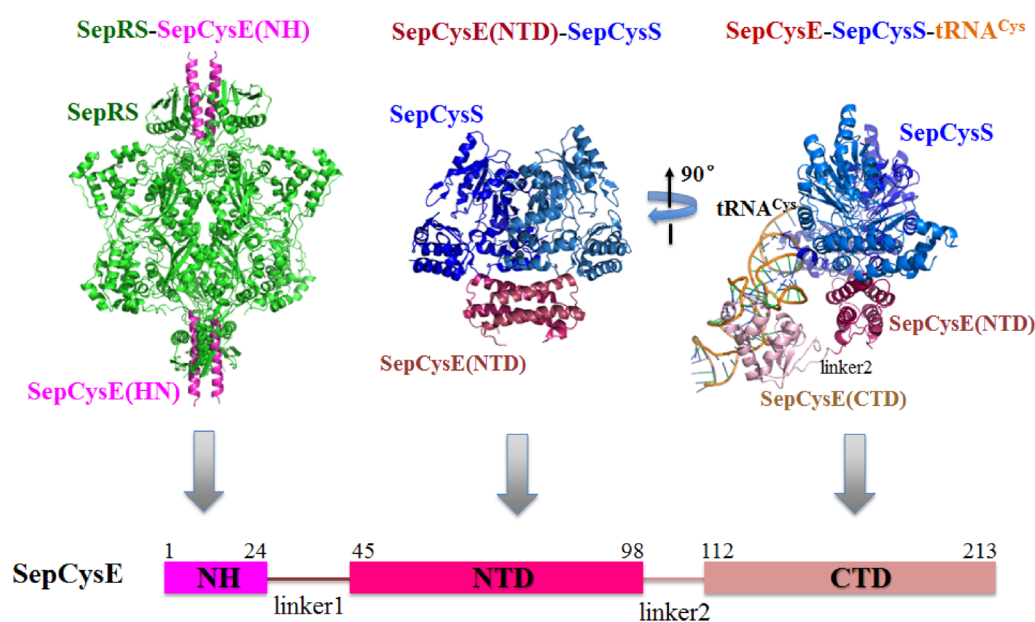


図2 Transsulfursomeの構造解析の結果

(左) Transsulfursomeの構造解析によって得られたSepRSとSepCysEのN末端ヘリックス (NH) の四量体 (dimer of dimer) 構造であるSepRS-SepCysE(NH) (PDBID: 5X6C). (中央) SepCysEとSepCysS複合体解析によって得られたSepCysEのN末端側ドメイン (NTD) とSepCysSの二量体複合体 (PDBID: 3WKR, 3WKS). (右) SepCysE-SepCysS-tRNA<sup>Cys</sup>の結晶構造. 二量体のSepCysE-SepCysSが一つの基質tRNAと結合している (PDBID: 5X6B). このSepCysE-SepCysS-tRNA<sup>Cys</sup>構造は中央のSepCysE(NTD)-SepCysS構造を2回回転の対称軸で90°回転させたビューである.

長が存在していることがわかった. また, 結晶のパッキングを確認すると, SepCysE(NH)の両側にSepCysE(NTD)-SepCysSの二量体構造を充填できるスペースが十分ある. よって, SepCysE(NH)以外のSepCysEの部分とSepCysSがフレキシブルのため, ディスオーダーして, 電子密度を観測することができなかったと考えられる. つまり, SepRS-SepCysE(NH)が第1段階の反応を触媒するユニットとして機能し, 第2段階の反応のユニットSepCysE(NTD)-SepCysSとSepCysEの19残基程度の長いリンカー (linker1) でつながり以外にほとんど相互作用していないことが示唆された.

上述したTranssulfursomeの部分構造解析の結果と結合アッセイの検証を合わせて, Cys-tRNA<sup>Cys</sup>間接合成経路におけるSepCysEは酵素活性を持たず, 三つのドメインNH, NTD, CTDそれぞれがSepRS, SepCysS, tRNAに結合する役割を分担し, NHとNTDが二量体, CTDが単量体で機能することが明らかになった. また, この三つのドメインはほとんど相互作用せず, 単に2個の長いリンカー (linker1, linker2) でつながっている (図2).

#### 4. Cys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成に必要である Transsulfursomeの柔軟な構造

Transsulfursomeの部分構造解析と結合・活性などの生化学

実験から, SepCysEの機能, 構造がわかった. しかし, Transsulfursomeの全体構造や, 2段階の反応過程は謎のままである. そこで, 我々は明らかにした構造情報に基づいて作製した変異体の活性測定を行い, また, TranssulfursomeのX線小角散乱や, 電子顕微鏡観察を加え, Transsulfursomeの構造とCys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成機構に関する知見を得ることができた.

Transsulfursomeの溶液中の構造を調べるため, SepCysE(CTD)を削除したTranssulfursomeを用いて放射光施設PF (Photon factory) にてX線小角散乱 (size exclusion chromatography + Small angle X-ray scattering: SEC-SAXS) の回折データを得た. 一方, 得られた構造の2回回転の対称を利用して, SepCysE(NTD)-SepCysSをSepRS-SepCysE(NH)の両側に配置するようなTranssulfursomeをモデリングした. さらに, そのモデルから計算したSAXS回折データを測定値にフィッティングしながら, SepCysE(NTD)-SepCysSを並進あるいは回転してモデルを修正した. その結果, 図3に示すように, SepRS-SepCysE(NH)の両側にあるSepCysE(NTD)-SepCysSが回転しても, 計算した回折データは測定したもののから大きくずれない ( $\chi^2=1.2\sim1.3$ ). これは, SepCysEのNHとNTDの間にリンカーが存在するため, SepCysE(NTD)-SepCysSが柔軟に動くことができ, 溶液中にさまざまな状態のTranssulfursomeが混合していることを示唆している. こ



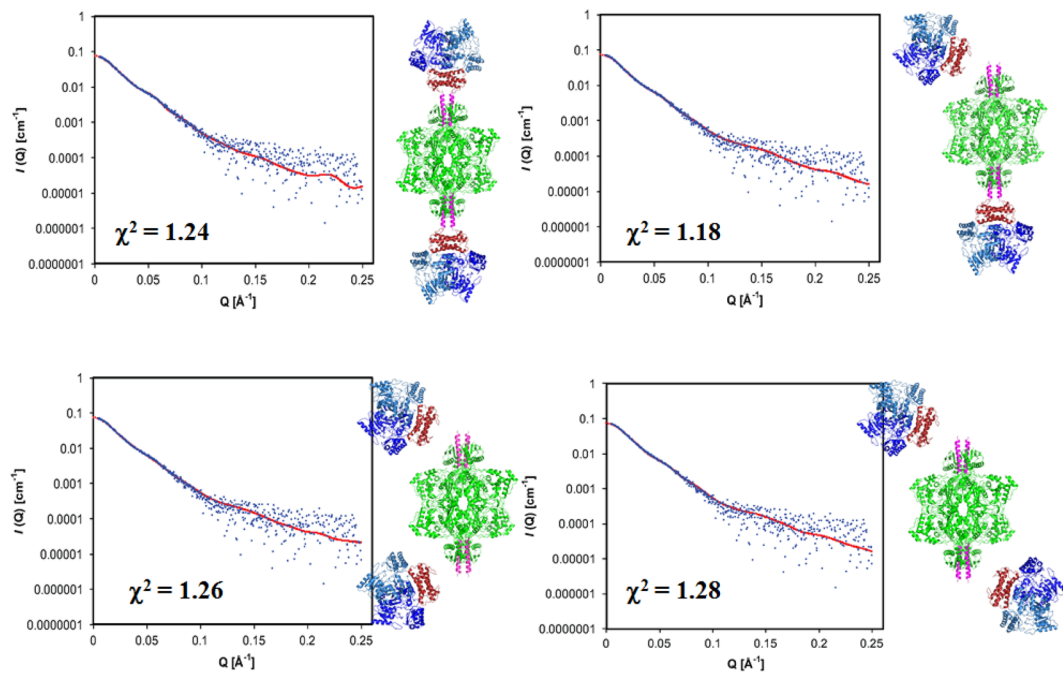


図3 SEC-SAXS回折データへのシミュレーションによるtranssulfursomeのモデリング

点はSEC-SAXSの実測回折データであり、曲線は右側に描いたtranssulfursomeモデルから計算した回折データである。 $\chi^2$ 値は実測値と計算値が一致しているかどうかを評価するものであり、値が小さいほど一致している。

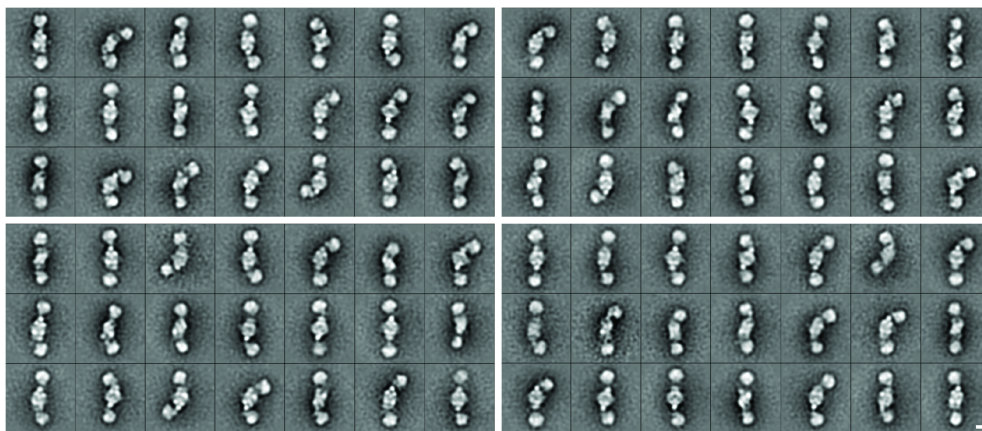


図4 ネガティブ染色電子顕微鏡により観察したTranssulfursomeの構造変化

それぞれの単粒子の画像は、ネガティブ染色電子顕微鏡で得られた写真のそれぞれの粒子の画像を平均したものである。1行目の画像を例として、1列目、2列目、3列目、4列目がそれぞれI形、C形、S形、L形といえる。

のことを検証するため、我々は、ネガティブ染色電子顕微鏡解析法を用いて、単粒子の構造解析を試みた。得られた2次元の画像から、SEC-SAXSを利用してモデリングしたTranssulfursome全体構造が妥当であり、SepCysEのlinker1の柔軟さによって、さまざまな形 (I, L, S, C) のTranssulfursomeが存在することがわかった (図4)。これらのTranssulfursome複合体では、tRNA<sup>Cys</sup>にSepを付加する酵素SepRSの反応部位が、Sep-tRNA<sup>Cys</sup>をCys-tRNA<sup>Cys</sup>に校正する酵素SepCysSの反応部位から90~150 Å以上離れている (図5a, 左)。Cys-tRNA<sup>Cys</sup>合成の一連の反応を完成さ

せるため、ミスチャージされたSep-tRNA<sup>Cys</sup>はTranssulfursome上で、長距離の移動が必要である。そこで、Transsulfursomeモデルを報告されたSepRS-tRNA複合体<sup>12, 13)</sup>、および本研究で得られたSepCysE-SepCysS-tRNA<sup>Cys</sup>複合体とそれぞれ重ね合わせて、第1段階と第2段階の反応状態のTranssulfursome-tRNA複合体のモデルを作製し (図5a)、Sep-tRNA<sup>Cys</sup>の移動について考察した。第1段階の反応の場合は、SepRSがtRNA<sup>Cys</sup>のアンチコドンと厳密に認識し、アクセプター (反応部位) と結合している。また、ミスチャージしたtRNAが移動するときに、Transsulfursomeか

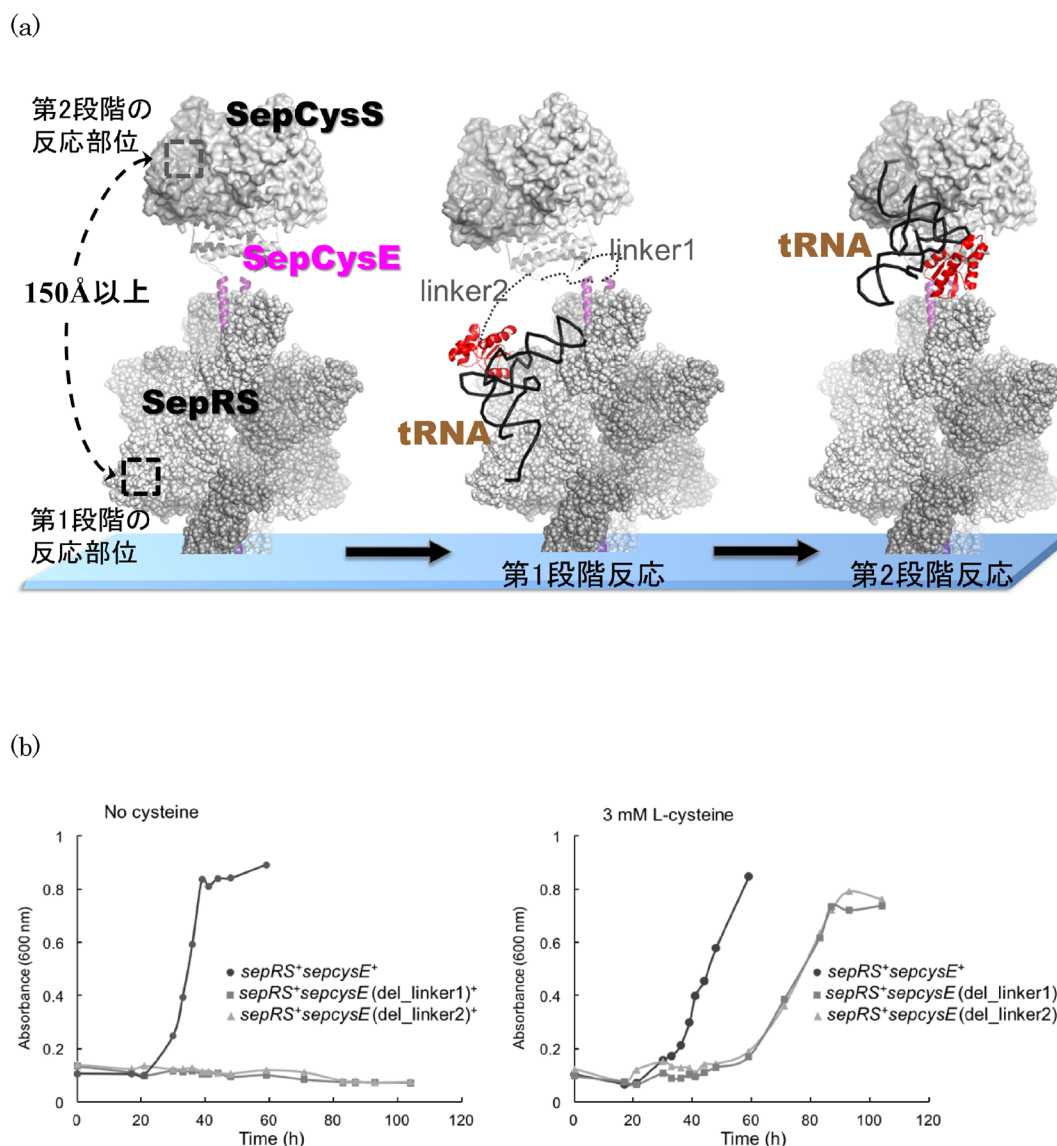


図5 TranssulfursomeによるCys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成

(a) TranssulfursomeによるCys-tRNA<sup>Cys</sup>の合成機構モデル。TranssulfursomeがSepCysEのリンカーの柔軟性を利用して150Å以上離れた二つの活性部位の間で基質tRNAを運搬し、一連の合成反応を行うと推定される。(b) *in vivo*でのSepCysEの二つのリンカーの重要性。(左) SepCysEのリンカーを欠損させた*M. maripaludis*変異株の成長は完全に失われた。(右)同様の株にCysを加えた場合には、60時間後に菌の成長が回復し始めた。

ら離れることができないため、第2段階の反応でtRNAと結合しているSepCysE(CTD)が第1段階の反応でもtRNAと結合していると考えられ、柔軟な長いlinker2がその動きの必要に応じるものである可能性がある(図5a, 中)。しかし、150Å以上離れた距離に対しては、linker2の長さが足りない。さらに、SepRSとSepCysSの間ではtRNAを授受しやすくするため、linker1の助けも考えられる。よって、このlinker1とlinker2はSepCysEの三つのドメインをつなげる役割だけではなく、Transsulfursomeの機能にも重要である。これは、*in vivo*の活性測定によって証明された。linker1とlinker2のどちらかでも欠損すると、Trans-

sulfursomeの合成機能が失われ、菌が生存できなくなった(図5b)。

## 5. まとめと今後の展開

我々は、これまでの研究で、Cys-tRNA<sup>Cys</sup>の間接合成経路における複合体Transsulfursomeの形成、およびそれを構成する各分子の性質、特にSepCysEの特異的な性質を明らかにしてきた。SepCysEの柔軟なリンカーでつながった三つのドメインがそれぞれ、二つの触媒酵素(SepRS, SepCysS)と一つの基質tRNAのそれぞれに結合する。お

そらく, Transsulfursomeがそのリンカーの柔軟さを利用することで, 150 Å 以上も離れた二つの活性部位の間での基質tRNAの運搬を可能にしていると推定される (図5a). しかし, その詳細はまだ明らかになっていない. また, 第2段階の反応のSドナーや, ミスチャージされていないtRNA<sup>Cys</sup>がなぜ第2段階の反応ユニットと結合できるのかななどの問題も残っている. 今後, その詳細を解明するために, Transsulfursomeと基質tRNAからなる四者複合体の第1段階と第2段階の反応での構造を決定するとともに, 特にクライオ電子顕微鏡単粒子解析を利用して, Transsulfursomeの各成分の動きを捉え, 動的構造に対する二つのリンカーの役割を明らかにしたい.

Transsulfursomeは, aaRS誕生の足跡を今に残す化石酵素であり, その分子機構の解明は, 遺伝暗号に関わる酵素の誕生と進化についての我々の理解を大きく前進させると期待される. また, リン酸化セリンを部位特異的にタンパク質に導入する技術は, ヒトの病気と密接に関係するセリンのリン酸化の研究にとって非常に重要であるが, SepCysEは, Sep付加反応の効率を上げる機能を有しており, その作用機序の解明は, 「タンパク質へのリン酸化セリンの自在な取り込み」を達成する上で非常に大きな一歩になると思われる.

## 謝辞

本稿で紹介した研究は, 北海道大学先端生命科学研究院の加藤公兎博士, 中澤祐人氏, 久保結女氏, 田中勲教授, 産総研の中村彰良博士, そしてLouisiana State大学 (当時Yale大学) のLiu博士との共同研究である. *in vivo* 活性測定では, Georgia大学Microbiology専攻のFeng氏; ネガティブ染色電子顕微鏡解析では, 当研究室 (現在東北大学) の田中良和博士, マックス・プランク研究所のLill氏, Gatsogiannis博士; SEC-SAXS測定・解析では, PF清水伸隆博士の協力をいただいた. ここに感謝の意を表す. また, X線回折データ収集でお世話になった放射光施設PF, SPring-8のビームラインスタッフに謝意を表す. また, 本研究は日本学術振興会科学研究費基盤研究(B) (15H04334, 17H03637) の助成を受けたものである.

## 文 献

- 1) Ibba, M. & Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 617–650.
- 2) Ling, J., Reynolds, N., & Ibba, M. (2009) Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**, 61–78.
- 3) Wilcox, M. & Nirenberg, M. (1968) Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 229–236.
- 4) Curnow, A.W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T.M., & Söll, D. (1997) Glu-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11819–11826.
- 5) Sauerwald, A., Zhu, W., Major, T.A., Roy, H., Palioura, S., Jahn, D., Whitman, W.B., John, R., Yates, J.R. 3rd, Ibba, M., et al. (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea *Science*, **307**, 1969–1972.
- 6) O'Donoghue, P., Sethi, A., Woese, C.R., & Luthey-Schulten, Z. (2005) The evolutionary history of Cys-tRNA<sup>Cys</sup> formation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 19003–19008.
- 7) Ito, T. & Yokoyama, S. (2010) Two enzymes bound to one transfer RNA assume alternative conformations for consecutive reactions *Nature*, **467**, 612–616.
- 8) Suzuki, T., Nakamura, A., Kato, K., Söll, D., Tanaka, I., Shepard, K., & Yao, M. (2015) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* transamidosome reveals unique aspects of bacterial tRNA-dependent asparagine biosynthesis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 382–387.
- 9) Hauenstein, S.I., Hou, Y.M., & Perona, J.J. (2008) Redundant synthesis of cysteinyl-tRNA<sup>Cys</sup> in *Methanosarcina mazei* *J. Biol. Chem.*, **283**, 22007–22062.
- 10) Liu, Y.-C., Nakamura, A., Nakazawa, Y., Asano, N., Ford, K.A., Hohna, M.J., Tanaka, I., Yao, M., & Söll, D. (2014) Ancient translation factor is essential for tRNA-dependent cysteine biosynthesis in methanogenic archaea *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 10520–10525.
- 11) Chen, M.-R., Kato, K., Kubo, Y., Tanaka, Y., Liu, Y., Long, F., Whitman, W.B., Lill, P., Gatsogiannis, C., Raunser, S., et al. (2017) Structural basis for tRNA-dependent cysteine biosynthesis *Nat. Commun.*, **8**, 1521.
- 12) Kamtekar, S., Hohn, M.J., Park, H.-S., Schnitzbauer, M., Sauerwald, A., Söll, D., & Steitz, T.A. (2007) Toward understanding phosphoseryl-tRNA<sup>Cys</sup> formation: the crystal structure of *Methanococcus maripaludis* phosphoseryl-tRNA synthetase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2620–2625.
- 13) Fukunaga, R. & Yokoyama, S. (2007) Structural insights into the first step of RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 272–279.

- 1) Ibba, M. & Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis *Annu.*

## 著者寸描

## ●姚 関 (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(マックスサイエンス(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。

## ●陳 美容 (ちん めえよん)



The Scripps Research Institute, Research Associate。博士(理学)。

■略歴 2016年北海道大学生命科学院にて博士学位を取得後、16年10月~17年3月北海道大学先端生命科学院博士研究員、17年4月より米国The Scripps Research Institute, Research Associate。

■研究テーマと抱負 専門はX線構造生物学と細胞生物学であり、tRNA成熟とアミノアシルtRNA合成酵素の制御と分子機構の研究を行っている。将来のテーマとして、X線構造生物学により、食べ物や環境など人類の健康に影響する分子機構を知りたい。

■趣味 スポーツ。