

## 学 位 論 文 題 名

X-ray crystal structure analysis of dihydrouridine  
synthase in complex with tRNA

(ジヒドロウリジン合成酵素-tRNA複合体のX線結晶構造解析)

## 学位論文内容の要旨

Posttranscriptional modification is a critical step for maturation of transfer RNAs (tRNAs), and plays various important cellular roles such as stabilization of the structured tRNA, fidelity control of translation, and metabolic response to the environment. Dihydrouridine modification is widely conserved in most tRNAs, but little is known about its physiological roles. It has been proposed that dihydrouridine modification enhances conformational flexibility of tRNA, and the amount of dihydrouridine in the tRNAs of thermophilic organisms is usually low.

Dihydrouridine synthase (Dus) is responsible for catalyzing the reduction of uridine in tRNA site-specifically. So far, the Dus family has been identified from *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Human Dus has been reported to be involved in the pulmonary carcinogenesis. Recently, biochemical analyses showed that Dus is a flavin-dependent enzyme, which requires NADPH or NADH for its enzymatic activity. The crystal structure of the Dus from *Thermotoga maritima* has been reported, and important residues for its activity were determined by using the Dus homolog from *E. coli*. Kinetic analysis of Dus2 from *Saccharomyces cerevisiae* showed that other tRNA modifications are required for rapid uracil reduction, and a cysteine residue located at the active site likely protonates the uracil ring. However, molecular details of the tRNA recognition and catalytic mechanisms of Dus are still unknown.

In the present study, I explored the tRNA recognition and reaction mechanisms of Dus by crystallography approach. Crystal structures of *Tth*Dus, in complex with tRNA, and in complex with tRNA fragment were determined at 1.7 Å, 3.51 Å, and 1.95 Å resolutions, respectively.

The structure of *Tth*Dus consists of two domains: N-terminal domain (Leu2–Pro249), and helical domain (Ser250–Glu318). The N-terminal domain adopts  $\alpha/\beta$  barrel structure, and the helical domain consists of four helices. An FMN cofactor was captured at active site of the N-terminal domain. A

putative catalytic residue, Cys93, faced the isoalloxazine ring of FMN. An extension of 24 residues at the C-terminus and a region (residues Ala171–Ile180) located around the active site were disordered.

In the structure of *TthDus*–tRNA complex, *TthDus* makes extensive interactions with tRNA through shape and charge complementarity. The N-terminal domain of *TthDus* interacts with T-loop and D-loop of tRNA. The helical domain of *TthDus* interacts with D-stem and anticodon stem of tRNA. The region, which was disordered in the structure of *TthDus*, formed a short  $\alpha$ -helix to stabilize tRNA through protruding into the major groove between D-stem and anticodon-stem. The substrate nucleotide U20 intruded deeply into the active site, and located between Cys93 and FMN cofactor with the uracil ring parallelling to the isoalloxazine ring of FMN. The high resolution structure of *TthDus*–tRNA fragment complex suggested that Cys93 covalently connects with U20, and an unknown adapter molecule is found at active site and seems to participate in the substrate recognition and reaction. Mutation analyses also revealed the significance of Cys93 residue and the unknown adapter molecule.

Moreover, over 20 residues were selected for mutational analysis in order to reveal tRNA recognition based on the complex structures. Taking account of all the results, it is indicated that *Dus* distinguishes the overall structure of modified tRNA, and the target nucleotide is tightly bound at the active site through adjusting D loop to correctly put the target nucleotide into the active site. Also, we proposed a catalytic mechanism of *Dus* in which Cys93 provides the proton to C5 of the uracil ring while a hydride is transferred from N5 of reduced FMN to C6 of the uracil.

# 学位論文審査の要旨

主査	准教授	姚	関
副査	教授	田中	勲
副査	教授	出村	誠
副査	教授	河野	敬一
副査	准教授	相沢	智康
副査	特任助教	田中	良和

## 学位論文題名

### X-ray crystal structure analysis of dihydrouridine synthase in complex with tRNA

(ジヒドロウリジン合成酵素-tRNA複合体のX線結晶構造解析)

転写後の修飾はtRNA成熟の過程に重要なステップであり、様々な重要な細胞制御の役割を担っている。例えばtRNA構造の安定化、翻訳精度の制御および環境への応答などがある。Dihydrouridine修飾はあらゆる生物種のtRNAの中に広く存在しているが、その生理的な役割についてはほとんど知られていない。Dihydrouridine synthase (Dus)はtRNAの特定位置のウリジンを還元する反応を触媒する酵素であり、酵母と大腸菌のDusからDus family (Dus1, Dus2, Dus3, Dus4) が同定され、また、ヒト由来のDusが肺発癌に関係していることも報告された。近年の研究により、Dusがフラビンに依存する酵素であり、その酵素活性にはNADPHまたはNADHを必要とすることが明らかされた。また、酵母由来のDus2の反応速度の研究により、修飾されたtRNAのDihydrouridine合成率が修飾されていないtRNAの数百倍であることがわかった。しかし、DusのtRNA認識機構と触媒反応のメカニズムは不明のままである。

本研究では、X線構造解析により、*Thermus thermophilus* 由来のジヒドロウリジン合成酵素 Dus (*TthDus*)、Dus-tRNA 複合体 (*TthDus*-tRNA)、Dus-tRNA fragment 複合体 (*TthDus*-tRNAf) のそれぞれ 1.7, 3.51, 1.95 Å 分解能の構造を得ることができた。*TthDus* の構造が、N 末端ドメイン (NTD; Leu2-Pro249)、helical ドメイン (HD, Ser250-Glu318) の2つのドメインからなり、NTDは $\alpha/\beta$  barrel 構造であり、HDは4つの $\alpha$ -ヘリックスからなっている。1分子に1つ FMN 分子が NTD にある活性部位に結合している。NTD の活性部位付近の残基 Ala171-Ile180 と C 末端領域の 24 残基はディスオーダーしている。*TthDus* の NTD は tRNA の D-, T-ループ、HD が D-, anticodon-ステムと相互作用している。単独の構造ではディスオーダーしている領域 Ala171-Ile180 が tRNA 複合体では短い $\alpha$ -ヘリックスを形成し、tRNA と相互作用している (Arg178)。また、酵母由来の Dihydrouridine 修飾以外の塩基修飾がなされた単独 tRNA 構造と比較したところ、D-loop の U16, U17, U20 の大きな構造変化が見られたにもかかわらず、修飾された D-, T-ループの構造はそのまま保たれている。この D-, T-ループの

構造は他の修飾により安定化されることがよく知られているので、Dus が修飾された tRNA に対する修飾の効率がよいのは、安定な D-, T-ループの構造が tRNA 認識に重要であるという理由が考えられる。

高分解の Dus-tRNA<sup>f</sup> の構造は活性部位の詳細を示している。基質である U20 が活性部位に入り込んで、Cys93 と FMN にサンドイッチされる。U20 のウリジン環は FMN イソアロキサジン環と平行に配置され、 $\pi$ スタッキングしている。興味深いことは、複合体の活性部位では、U20 と Dus family によく保存されている 4 つのプラスチャージを持つ残基の間に 1 つの unknown 分子の電子密度が明瞭に存在することが発見された。また、Cys93 側鎖の S 原子が U20 の C5 原子と共有結合距離に位置している。

tRNA の認識機構の詳細を明らかにするために、複合体の構造に基づいて、tRNA と相互作用している 20 以上の残基の変異体を作成し、tRNA との結合実験を行い、各残基の tRNA 結合に対する影響を調べた。その結果、直接的に U20 と相互作用している Asn90, Cys93, Arg178 以外に、unknown 分子とコンタクトしている Lys132, Arg134, His164, Arg166 が tRNA との結合には不可欠であることが分った。以上の結果から、unknown 分子は tRNA 認識にとっても重要と言え、次のような tRNA 認識機構を提案した。Dus は tRNA の全体構造、特に、修飾により安定な構造を形成している D-,T-loop を認識して tRNA と結合している。そして、修飾ターゲット U20 が活性部位に入り込んで、FMN, unknown 分子、活性部位の残基と相互作用し、修飾反応が行われる。また、FMN, U20, Cys93 の原子間の距離から、修飾反応のメカニズムも提案した。まず、NADPH により FMN が還元される。そして、還元された FMN が U20 の C5 原子にプロトンを渡す。一方、Cys93 の S 原子が U20 の C6 に水素原子を提供して、Dihydrouridine 修飾が完成される。

以上、本研究では X 線構造解析によってジヒドロウリジン合成酵素 Dus, Dus-tRNA 複合体, Dus-tRNA fragment 複合体のそれぞれの 1.7, 3.51, 1.95Å 分解能の構造を得ることに成功した。構造情報をもとに Dus 変異体を調製し、その tRNA 結合解析を行うことによって、各残基の tRNA 認識における役割を解明し、Dus が新規な cofactor を用いて基質を認識することを明らかにした。さらに、酵素活性を比較することにより、Cys93 と FMN を用いた活性発現機構を提案した。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。