

学位論文題名

Crystal structure analysis of putative rRNA
methyltransferases from *Staphylococcus aureus*

(黄色ブドウ球菌由来rRNAメチル基転移酵素の結晶構造解析)

学位論文内容の要旨

全ての生命で蛋白質翻訳を司るリボソームは、リボソーム蛋白質とリボソーム RNA (rRNA) から構成される。リボソームの生合成過程において、rRNA は切断、巻き戻し、修飾などの過程を経て成熟する。rRNA の修飾は、真核生物においては、修飾部位周辺と塩基対を形成するガイド RNA の助けにより、リボースの 2'ヒドロキシル基のメチル化やウリジンのシュードウリジル化が導入される。真正細菌においては、部位特異的に働く修飾酵素の働きにより修飾が導入される。rRNA の修飾酵素は、1つの酵素が1つの修飾を担当すると考えられていたが、近年、複数箇所に修飾を導入する酵素も発見され、修飾酵素の基質認識、修飾酵素の進化の研究が加速しつつある。本研究においては、黄色ブドウ球菌由来機能未知蛋白質 SAV1081 を対象として、立体構造を解析し類似構造との比較から機能の推定を行った。

SAV1081 は、NCBI が蛋白質を機能ごとに分類する目的で作製した COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) データベースの COG1092 に分類されている。COG1092 には機能が明らかとなっている大腸菌由来の2つの rRNA のメチル基転移酵素 YccW と YcbY が属しており、その他の蛋白質も RNA のメチル化に関与していると類推される。YccW は 23S rRNA の 1962 番目のシチジンの 5 位のメチル化を行う。YcbY は 23S rRNA における 2 つのグアノシンのメチル化に関与している。YcbY は 2 つのメチル基転移ドメインを有し、N 末端側のドメインが 23S rRNA の 2445 番目のグアノシンの 2 位のメチル化、C 末端側のドメインが 23S rRNA の 2069 番目のグアノシンの 7 位のメチル基修飾に関与している。COG1092 に属しているのは YcbY の C 末端側のメチル基転移ドメインである。SAV1081 は YccW、YcbY とそれぞれ 26%、19% の一次配列相同性を有しているが、SAV1081 がどちらの働きを持つかは明らかになっていない。

SAV1081 は大腸菌発現系で大量発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製した。精製した蛋白質を用いて蒸気拡散法にて結晶を作製し、シンクロトン放射光施設にて X 線回折実験を行った。SAV1081 の結晶を用いて 2.1Å の回折データ収集し、分子置換法によって構造決定を行った。

SAV1081 の構造は、N 末端側から PUA ドメイン、EEHEE ドメイン、メチル基転移ドメインによって構成されている。SAV1081 のメチル基転移ドメインにはメチル基転移反応の反応産物である AdoHcy が結合していた。AdoHcy の結合サイトには特徴的な β -ヘアピンが形成されていた。類似構造との比較から、 β -ヘアピンはメチル基供与体である AdoMet、もしくは反応産物である AdoHcy との結合によって形成されることが判明した。

SAV1081 の全体構造は YccW の構造と非常に類似している。YccW は SAV1081 と同じドメイン構成をしており、全体構造は非常によく重なる。しかし、YccW は活性部位に触媒残基 Cys340 を持つのに対して、SAV1081 ではこ

の残基が Asn333 に置換されている。YccW が触媒するシチジン 5 位のメチル化にはシステインが必須であるが、SAV1081 の活性部位周辺には代役となるシステインは見つからなかった。解析した SAV1081 の構造中では Asn333 の側鎖は活性部位の AdoHcy の方を向いており、また黄色ブドウ球菌が属するグラム陽性菌では Asn333 が保存されていることから、Asn333 が別の触媒反応の活性発現に関与することが示唆された。

COG1092 に属する蛋白質のうち、構造解析されている *Thermus thermophilus* 由来の TTHA1280 と *Pyrococcus horikoshi* 由来の PH1915 と YccW は溶液中で 2 量体を形成することが知られている。また結晶中においても共通の会合様式により 2 量体を形成している。一方、YcbY は溶液中で単量体を形成していることが知られている。SAV1081 の結晶中には TTHA1280、PH1915、YccW に見られる会合様式が見られなかった。またゲルろ過クロマトグラフィーを用いた会合状態の解析によって、SAV1081 は溶液中で単量体として存在していることが判明した。

34 個の COG1092 蛋白質のアミノ酸配列から系統樹を作製し、系統樹に基づき COG1092 蛋白質を 5 つのグループに分けた。これら 5 つのグループを、活性残基 Cys の有無、 β ヘアピンの有無、溶液中での会合状態から 2 つのサブグループに分類した。その結果、SAV1081 は YccW よりもむしろ YcbY と共通する特徴を備えていることがわかった。また COG1092 に属する蛋白質が、YccW と同じ機能を有するシチジンの 5 位のメチル基転移酵素を起源として、(1) 活性残基システインの欠落、活性部位における β ヘアピンの獲得、会合状態の変換、(2) N 末端側の PUA ドメインの欠落、(3) 新たなメチル基転移ドメインとの融合という過程を経て、YcbY に代表されるグアノシンの 7 位のメチル基転移酵素へと進化したという仮説を提唱することができた。

学位論文審査の要旨

主査	特任教授	田中	勲
副査	教授	出村	誠
副査	教授	姚	関
副査	准教授	田中	良和

学位論文題名

Crystal structure analysis of putative rRNA methyltransferases from *Staphylococcus aureus*

(黄色ブドウ球菌由来rRNAメチル基転移酵素の結晶構造解析)

mRNA から蛋白質への翻訳を司るリボソームは、蛋白質と RNA (rRNA) から構成されている。リボソームの生合成過程において、rRNA は、転写後、さまざまな化学修飾を経て成熟するが、真正細菌においては、RNA 塩基の修飾は、部位特異的に働く修飾酵素の働きによって行われる。

大腸菌の YcbY 蛋白質は、23S rRNA における 2069 番目のグアノシンと 2445 番目のグアノシンの両方のメチル化修飾に関与している。YcbY は2つのメチル基転移ドメインを持ち、N 末端側のドメインが 2069 番目のグアノシンの 7 位のメチル化、C 末端側のドメインが 2445 番目のグアノシンの 2 位のメチル化を行う。YcbY のように2つのメチル基転移ドメインを保有する RNA 修飾酵素は珍しく、真正細菌プロテオバクテリア門 (グラム陰性菌) の一部にしか保存されていない。真正細菌フィルミクテス門 (グラム陽性菌) に属する黄色ブドウ球菌においては、YcbY の N 末端側ドメイン、C 末端側ドメインそれぞれのホモログ蛋白質、SAV1444 と SAV1081 が、ゲノム上に存在するが、その機能は明らかになっていない。本研究では、黄色ブドウ球菌由来の2つの蛋白質 SAV1444, SAV1081 を対象として、立体構造解析と機能解析を行った。

SAV1444 と SAV1081 は大腸菌発現系で大量発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製した。精製した蛋白質を用いて蒸気拡散法にて結晶化し、シンクロトロン放射光施設にて X 線回折実験を行った。SAV1444 と SAV1081 それぞれの結晶について 1.6 Å, 2.1 Å の回折データ収集し、分子置換法によって構造を決定した。SAV1444 の酵素活性は、³H 標識されたメチル基供与体 AdoMet を用いて評価した。基質となる RNA は、in vitro で RNA ポリメラーゼを用いて合成した。活性測定の結果、SAV1444 は YcbY の N 末端側ドメインと同様、23S rRNA の 2445 番目のグアノシンにメチル基を転移する活性を持つことが明らかとなった。

SAV1444 の構造は、N 末端側の THUMP ドメインと C 末端側のメチル基転移ドメインによって構成されており、2つのドメインに挟まれた領域は、分子中央に幅広く浅い溝を形成していた。SAV1444 のメチル基転移ドメインにはメチル基供与体の AdoMet が結合しており、それは細長い溝の一部に埋没していた。AdoMet が結合している溝は分子中央の溝とつながっており、また、メチル基の傍らには修飾される塩基が入るのに十分な空間が残されていた。分子中央の溝には塩基性アミノ酸が密集しており、この溝が RNA 結合部位であることが示唆された。分子中央の溝からは塩基性アミノ酸が密集する2本の帯が、THUMP ドメインを囲むように延びており、また、これらの塩基性アミノ酸は保存されていた。THUMP ドメインは、RNA の塩基対部分の修飾を導入する酵素が共通して保有している。SAV1444 の基質となる 23S rRNA の 2445 番目のグアノシンも塩基対部分に存在することから、THUMP ドメインが RNA 塩基対をほどくジッパーのような役割を担っていることが予想された。

SAV1081 は、YcbY の C 末端側ドメインのホモログであると同時に大腸菌の YccW 蛋白質のホモログでもある。YccW は 23S rRNA の 1962 番目のシチジンの 5 位のメチル化を行う。SAV1081 は YccW、YcbY とそれぞれ 26%、19% の一次配列相同性を有しているが、SAV1081 がどちらの働きを持つかは明らかになっていない。SAV1081 の構造は、N 末端側から PUA ドメイン、EEHEE ドメイン、メチル基転移ドメインによって構成されていた。SAV1081 のメチル基転移ドメインには、メチル基転移反応の反応産物である AdoHcy が結合していた。AdoHcy の結合サイトには特徴的な β -ヘアピンが形成されていた。類似構造との比較から、 β -ヘアピンはメチル基供与体である AdoMet、もしくは反応産物である AdoHcy との結合によって形成されることが判明した。SAV1081 の全体構造は YccW の構造と非常に類似していたが、YccW は活性部位に触媒残基 Cys340 を持つのに対して、SAV1081 ではこの残基が Asn333 に置換されていた。さらに YccW が触媒するシチジン 5 位のメチル化にはシステインが必須であるが、SAV1081 の活性部位周辺には代役となるシステインは見つからなかった。また YccW は溶液中で 2 量体を形成することが知られており、結晶中においても共通の会合様式により 2 量体を形成している。一方、YcbY は溶液中で単量体として存在している。SAV1081 の結晶中には YccW に見られる会合が見られず、またゲルろ過クロマトグラフィーを用いた会合状態の解析によって、SAV1081 は溶液中で単量体として存在していることが判明した。

以上、本研究は、X 線結晶構造解析法により黄色ブドウ球菌由来の 2 つの蛋白質の解析を行い、SAV1444 の構造を解明して、それが 23S rRNA の 2445 番目のグアノシンにメチル基を転移する活性を持つことを明らかにし、さらに SAV1081 についても構造を決定し、その構造から rRNA メチル基転移酵素としての機能の推定を行ったものである。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。