

トランスファーRNA メチル化酵素の分子進化*

Molecular Evolution of Transfer RNA Methyltransferases*

堀 弘幸**

Hiroyuki HORI**

2004年10月現在までに、さまざまなRNA分子種から102種類におよぶ修飾ヌクレオシドが発見されている。既知の修飾ヌクレオシドはすべて、転写後修飾により生合成されるが、そのうち70%以上にメチル基転移反応が関与するものと推定される。RNA修飾ヌクレオシド生合成に関わるメチル化酵素は、その遺伝子が未発見なものも多い。しかしながら、それでも3000以上の遺伝子がRNAメチル化酵素(候補)遺伝子としてデータベースに登録されている。

これほど多様に細分化されたRNAメチル化酵素群を包括的にとらえ、その概念を統一することは可能であろうか?また、その分子進化を追跡できないであろうか?このような観点から、我々はtRNAメチル化酵素をモデルとして構造・機能解析を進めてきた。RNA修飾ヌクレオシドはtRNA中にもっとも多く、タンパク質合成系を円滑かつ正確に動作させるために必須の因子である。ゆえに、tRNA修飾は、タンパク質合成系とならんで、もっとも起源の古い生命現象のひとつだと考えられている。よって、tRNAメチル化酵素の解析は、RNA修飾系のもっとも基本的な形態を解明することにつながるであろう。

本稿では、tRNAメチル化酵素の分子進化について最新の知見を加えて、解説する。

Key words: tRNA methyltransferase, RNA modification, Molecular evolution, RNA recognition

1. はじめに

これまでに、さまざまなRNA分子種から102種類におよぶ修飾ヌクレオシドが報告されているが、その大部分はトランスファーRNA(tRNA)中に発見されてきた^[1,2]。事実、データベース(<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/>)を検索すると、81種類の修飾ヌクレオシドがtRNAで確認され、うち59種類がtRNAでのみ発見されていることがわかる。これらの修飾ヌクレオシドは、

* 本稿は、「tRNAメチル化酵素スーパーファミリー、SPOUT酵素群の基質RNA選択性とタンパク質構造」生化学 75, 301-305 (2003)、「tRNA修飾と修飾酵素:その機能と分子進化」細胞工学 22, 939-944 (2003)の二つの総説をもとに、第27回日本分子生物学会年会・ワークショップ「RNAメチル化酵素の構造と機能の変遷」の発表内容を加筆しました。

** 愛媛大学・工学部・応用化学科 (Dept. of Applied Chemistry, Fac. of Eng., Ehime Univ.)
hori@eng.ehime-u.ac.jp, Tel: +81-89-927-8548 Fax: +81-89-927-9941

原稿受理 平成16年10月25日

すべて、転写後修飾により導入される^[3-5]。なかでも、メチル化はもともと基本的な修飾形態のひとつであり、複雑な修飾ヌクレオシドでもメチル基転移がその生合成経路として関与することが多い^[6]。図1に代表的なメチル化ヌクレオシドの塩基部分をしめした。生体内でのメチル基転移反応は、メチル基供与体の種類にもとづいて分類することが可能である^[6]。メチル化ヌクレオシド生合成の場合、真正細菌の一部にみられる m^5U の修飾をのぞけば、すべてメチル基供与体に S-アデノシル-L-メチオニン (AdoMet) を用いている^[3,4]。すなわち、ほぼすべての RNA メチル化酵素は、AdoMet 依存性メチル基転移酵素である。

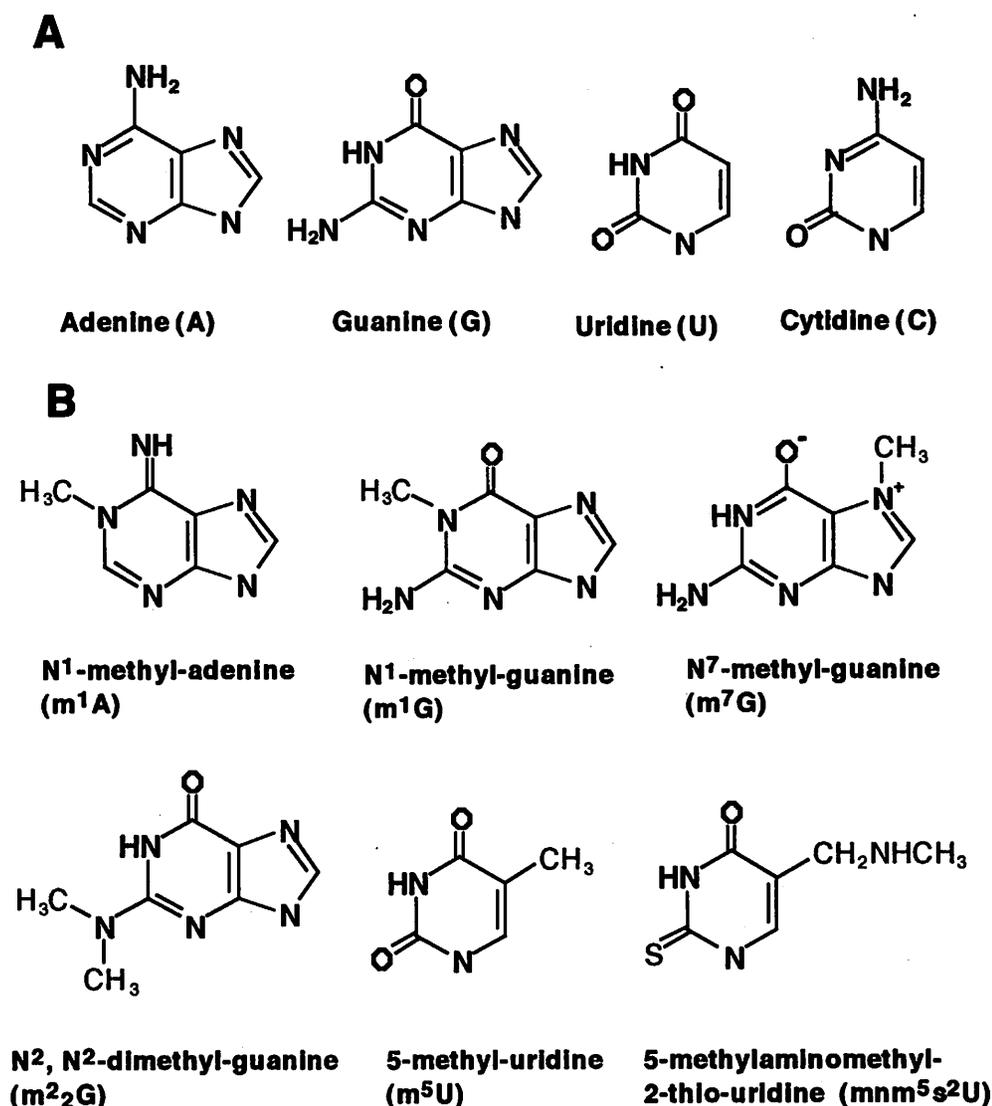


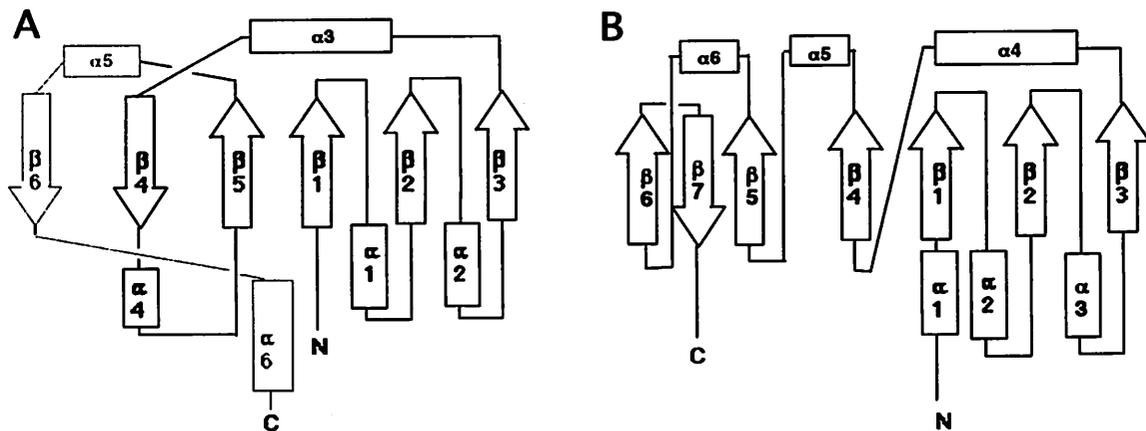
図1 代表的なメチル化塩基。ヌクレオシドのうち、塩基部分を構造で示した。修飾ヌクレオシドには、塩基部分の修飾のほかに糖 (リボース) 部分の修飾が存在し、塩基・糖の両方がメチル化されているものもある。名称とその略号を表記した。A: 修飾前のRNAに含まれる4つの塩基 B: 代表的なメチル化塩基。修飾部位は、ハーフトーンで示した。

RNA メチル化酵素は基質 RNA 選択性が厳密であるので、同じメチル化ヌクレオシドでも RNA 分子種や修飾部位が異なれば、別の酵素によって生合成されることが多い。したがって、生体内に存在するすべてのメチル化ヌクレオシドを維持するためには、非常に多くの遺伝子が必要である。事実、真正細菌ゲノムでは、その1%以上が RNA 修飾酵素をコードするために使われており、RNA メチル化に関連した遺伝子群がもっとも多い^[3,4]。

それでは、これほど多様化・細分化した RNA メチル化酵素は、どのように分子進化してきたのであろうか？本稿ではとくに tRNA 修飾に視点をおき、最新の知見を概説する。

2. RNA メチル化酵素群に発見された新規触媒ドメイン

先に述べたように大部分の RNA メチル化酵素は、AdoMet 依存性メチル基転移酵素である。従来、AdoMet 依存性メチル基転移酵素は基質によって分類されるのが通例であった。たとえば、RNA メチル化酵素の場合、tRNA メチル化酵素、rRNA メチル化酵素、Cap メチル化酵素などと分類することが多かった^[6]。これは、どの酵素も同じ触媒ドメインをもち、共通の反応機構でメチル基を転移していると信じられていたからである。実際、1990 年代後半までに解析され



トレフォイル・ノット構造

(*T. thermophilus* TrmH (SpoU))

古典的ロスマン・フォールド

(Catechol-O-methyltransferase)

図2 RNAメチル化酵素にみられる二種類の触媒ドメイン 両者の差異を明確にするために、トポロジーモデル図であらわした。四角・矢印は、 α -ヘリックス・ β -シート構造を各々表している。A: TrmHの触媒ドメイン。ノット部分はハーフトーンで表してある。B: カテコール-O-メチル化酵素の古典的ロスマンフォールド型触媒ドメイン

た幾つかの AdoMet 依存性メチル基転移酵素は、共通の触媒ドメイン（現在では古典的ロスマンフォールド型ドメインと呼ばれている）をもち、活性中心はいずれも、システイン残基であった¹⁶⁾。

ところが、2002 年以降、我々を含めた内外の研究グループが、tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH]^[7-11]、tRNA (m¹G37) methyltransferase [TrmD]^[12-14]、23S rRNA (Gm2251) methyltransferase [RrmA]^[15]などの X 線結晶構造解析を行ったところ、これらの酵素は全く新規な触媒ドメイン（トレフォイルノット型ドメイン）をもっていることが明らかとなった。すなわち、RNA メチル化酵素のなかには、従来知られていたメチル化酵素とは、異なる起源をもつメチル化酵素が含まれていたのである。現在では、トレフォイルノット型構造の触媒ドメインをもつ RNA メチル化酵素群は、SPOUT (SpoU-TrmD Super-family) と呼ばれている¹⁶⁾。図 2 に、トレフォイルノット構造と古典的ロスマンフォールド構造をトポロジーモデルで比較した。

さらにアミノ酸配列を比較してみたところ、トレフォイルノット型ドメインをもつ RNA メチル化酵素群 (SPOUT) は、SpoU ファミリー^[8,17,18]と TrmD ファミリー^[19-23]に大別できることがわかった (図 3)。SpoU ファミリーは、TrmH や RrmA、RmlB、TSR などを含む RNA リボースのメチル化酵素群で、TrmD ファミリーは、現在 TrmD のみが既知のグアニン塩基のメチル化酵素である。

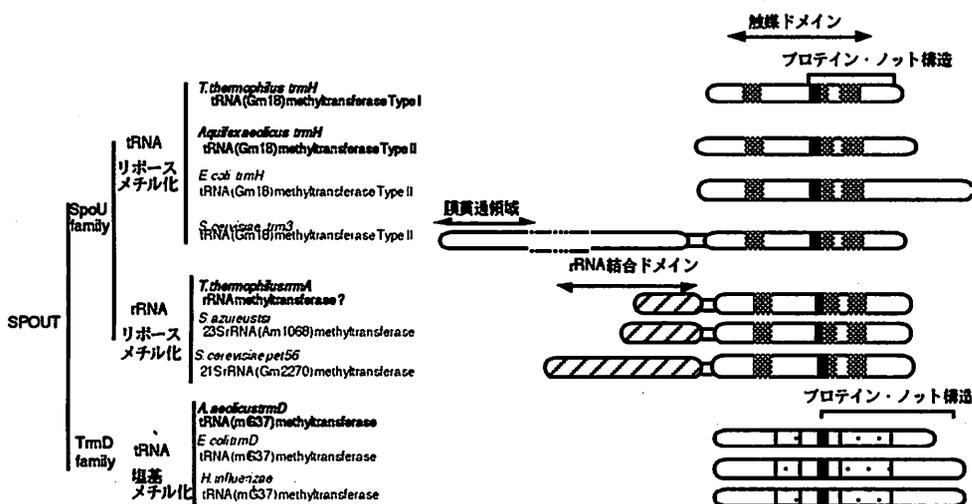


図3 SPOUT酵素群の分類 各酵素の大きさのアミノ酸配列・ドメイン構造をモデル化して表示した。名称を濃く表示してある酵素は、我々のグループが解析した。

SpoU ファミリーの原型はどうやら、tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH]らしい(図3)。いくつかの tRNA メチル化酵素は、この tRNA メチル化酵素に RNA 結合ドメインが結合することによって、基質 RNA 選択性が変化して分子進化したと考えることができる。また、真核生物に見られる Trm3^[24]は、真正細菌型酵素の N 末端に膜貫通領域が結合し、細胞内での局在性が制御されたタイプと解釈することができるだろう。さらに、我々は SpoU ファミリーの原型を探る目的で、生命進化のもっとも初期に分岐した真正細菌、*Aquifex aeolicus* の TrmH を分析してみた^[9]。意外なことに、この酵素は、基質選択性の狭いタイプ II 型酵素であった(図3)。なぜ、原始的な細菌が特定の tRNA をメチル化する酵素をコードしているのか?あるいは、この基質選択性はタンパク質構造のどこに由来するのか?という問題はいまだに解決していない。

3. SpoU ファミリーと TrmD ファミリーの比較

それでは、SpoU ファミリーと TrmD ファミリーの起源はどちらが古いのであろうか?この疑問に答えるべく、我々は *Aquifex aeolicus* をはじめとする超好熱菌ゲノムにコードされる遺伝子群の機能を比較検討しているが、現在までのところ、明確な答えは得られていない。両ファミリーに含まれる酵素群は、少なくとも、かつて地球環境が高温であった時代には、タンパク質合成に必須の因子であったはずであり、おそらくとも両者とも化学進化の過程で獲得されたものであろうと筆者は考えている。

そこで、機能以外にタンパク質構造の視点からも、SpoU ファミリーと TrmD ファミリーを比較することに着手した。

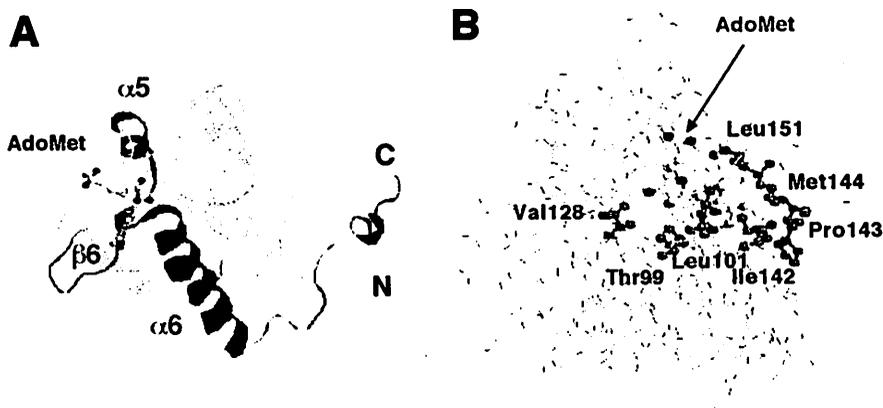


図4 TrmHのAdoMet結合部位 A:TrmHのリボンモデル上に、AdoMetをボール・アンド・スティックモデルで表示した。プロテイン・ノットは濃い色で示した。 B: AdoMetと直接、会合している残基を表示した。残基番号をアミノ酸略号とともに表記した。

図4は、TrmHのAdoMet結合部位を単一サブユニットの上に表示したものである^[10]。AdoMet結合部位は、トレフォイルノット(プロテイン・ノット)構造の上に位置する(図4A)。また、結合したAdoMetは、フリーのAdoMetに比べて、アデノシン部分とメチオニン部分が反った形になっており、酵素への結合に伴って、構造が規定されていることがわかる。これらは、海外のグループが報告したTrmDの解析結果と全く同じであった^[12,13]。このようなAdoMetの結合様式は、古典的ロスマンフォールド型酵素で発見されておらず、おそらくSPOUT酵素群に特徴的なものと考えられる。しかしながら、AdoMet結合部位を構成するアミノ酸残基は、SpoUファミリーとTrmDファミリーで全く異なっていた。図4Bは、SpoUファミリーに含まれるTrmHのAdoMet結合部位のアミノ酸残基を表示したものであるが、ほとんど水素結合がなく疎水的相互作用によってポケットを構成していることがわかる。このような結合様式は、高温環境下ではとくに有利に働くはずであるが、アミノ酸配列の比較から、大腸菌や酵母、ヒトなど常温生物でも保存されていることがわかっている^[8,11,16]。

さらに、TrmHのRNA結合部位を推定するためにドッキングモデルを作成してみると驚くべくことがわかった(図5)^[10]。SpoUファミリーとTrmDファミリーのRNA認識部位は全く異なっていたのである。

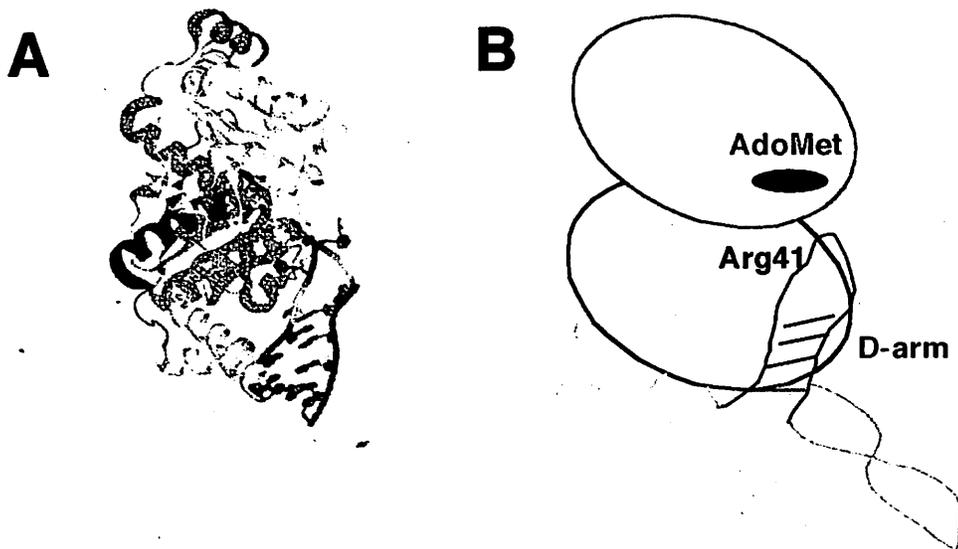


図5 TrmH二量体構造とtRNAのドッキングモデル A: TrmH二量体のリボンモデル上に、tRNAをおいたドッキングモデル。tRNAはリボース・リン酸骨格を薄い灰色で示してあり、D-アーム部分を太く描いてある。B: TrmH-tRNA複合体の概念図

このドッキングモデルは、また、TrmH が従来知られていなかった触媒機構をもつことを提案した (図6) [10,11]。

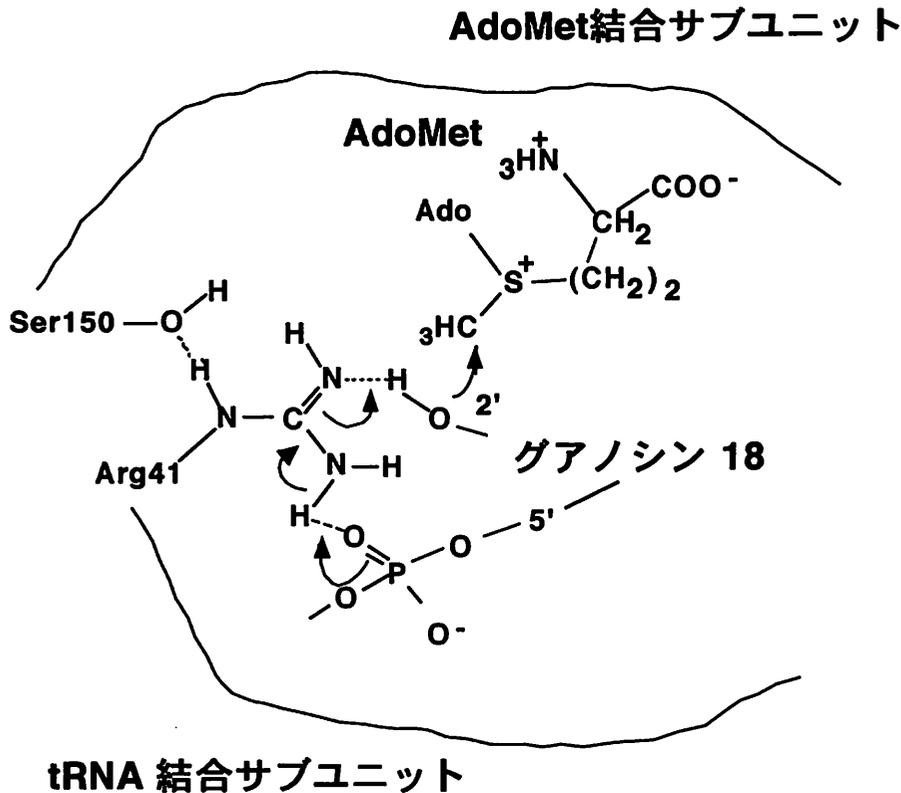


図6 TrmHの推定触媒メカニズム。 tRNA結合にともなって、グアノシン18の5'-リン酸基が活性中心のアルギニン41残基に接近し、活性化する。活性化されたアルギニン41残基は、AdoMet結合ドメインのセリン150残基に方向を規定されており、グアノシン18のリボース2'位を脱プロトン化する。脱プロトン化された2'位酸素原子は、AdoMetのメチル基を求核攻撃し、メチル基転移がおこる。

この我々が提案した触媒メカニズムでは、RNA 自身が脱プロトン化のトリガーとなる。これまで、種々の変異酵素を用いて解析をおこなったが、これ以上に有力な仮説はみつかっていない。また、試験管内分子進化の手法 (インビトロ・セレクション) の手法をもちいて、結合 RNA を単離したところ、よい親和性を示す RNA ほど良い基質となることがわかった^[25]。この事実も、この触媒メカニズムとよく整合する。基質自身がトリガーとなる触媒メカニズムは、TrmD はもちろん、他のいかなる RNA メチル化酵素にも見あたらない。活性中心のアルギニン残基は SpoU ファミリーに保存されているので、おそらく SpoU

ファミリーに共通かつ特有の反応メカニズムであろう^[8,10,11,16]。一方、海外のグループが明らかにした TrmD ファミリーの活性中心は、アスパラギン酸残基であった^[12,13]。TrmD がメチル基を転移するグアニン塩基の1位の窒素原子は比較的、反応性が高く、おそらくアスパラギン酸残基で脱プロトン化することが可能なのであろう^[9]。

これらの研究を通して、次のようなことがわかった。まず、従来、RNA メチル化酵素の触媒ドメインは共通で、その反応機構も同じであると信じられてきたが、実はそうではなく、様々なバリエーションがあることがわかった。すなわち、すべてのメチル化酵素の起源は同じではない。また、トレフォイルノット型構造に代表される新規触媒ドメインをもつ RNA メチル化酵素群も、触媒機構や RNA 結合メカニズムの全くことなる複数のファミリーからなっていることが判った。機能から推定すると、これらのファミリーが分岐した年代はかなり古く、生命進化がおこる以前の化学進化の過程ではなかったかと推定される。

4. 古典的ロスマンフォールド型 RNA メチル化酵素の分子進化

SPOUT 酵素群の発見以来、古典的ロスマンフォールド型の RNA メチル化酵素についても、その触媒メカニズムや基質 RNA 認識メカニズムを見直そうという動きが盛んになりつつある。

我々は、 m^7G の修飾に着目した。修飾塩基 m^7G は、tRNA のみならず、mRNA、rRNA、snRNA などの機能性 RNA すべてに含まれており、これらの修飾酵素間になんらかの関連があるかもしれない^[12]。そこで、 m^7G 修飾の起源を探るべく、*Aquifex aeolicus* のゲノムを探索し、aq065 遺伝子が tRNA (m^7G46) methyltransferase をコードしていることを発見した (図7) ^[26]。

我々が遺伝子同定を報告するよりも早く、海外のグループに大腸菌の該当遺伝子 (*yggH*) を報告されてしまった^[27]のは残念であったが、*Aquifex aeolicus* の aq065 遺伝子産物と大腸菌 *YggH* ではタンパク質の大きさや相同配列の位置が全く異なることが判った。相同配列は、おそらく AdoMet 結合部位を含む触媒ドメインの一部であろう^[27]。この意外な事実は、真正細菌の tRNA (m^7G46) methyltransferase 間でさえも、構造的な分子進化が起こったということを示している。さらに、mRNA Cap- m^7G -methyltransferase と比較したところ、tRNA の修飾酵素とは直接的な因果関係はなさそうであることも判った^[27]。つまり、古典

A

```

A. aeolicus aq065 ---21VEIGFGRGDFIVKLAKENPDKNFFGIEISQIS52---
E. coli YggH ---68LEIGFGMGASLVAMAKDRPEQDFLGIEVHSPG99---

A. aeolicus aq065 ---94NY...F...K...H...LTKPER114---
E. coli YggH ---141FF...H...A...N...IVQVPF161---

A. aeolicus aq065 ---121KLKLGGEIRIRTDNY135---
E. coli YggH ---168KLQLGGVFHMATDWE192---
    
```

B

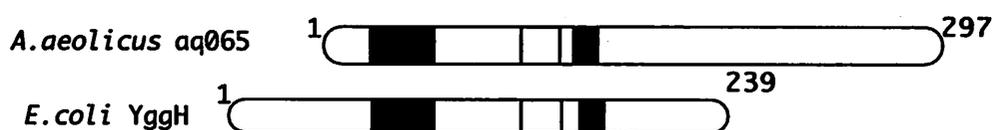


図7 *Aquifex aeolicus* aq065 と大腸菌 (*E. coli*) YggHのアミノ酸配列の比較。大腸菌YggHはtRNA (m⁷G46) methyltransferaseであることが、De Bieらによって報告された [27]。相同性の高い三つのアミノ酸配列モチーフ (A)と、タンパク質中での位置 (B) を比較した。この図は、Okamoto, H. et al *J. Biol. Chem.* 印刷中 (2004) [26] のFig. 1をもとに改変して作成した。

的ロスマンフォールド型 RNA メチル化酵素群にも相当複雑な構造的バリエーションが存在することが明らかとなった。今後は、X 線結晶構造解析を含めて、詳細な検討をおこなうことにより、これらのメチル化酵素群の進化的系統関係が明らかとなってくるであろう。

謝辞

本研究の一部は、平成14年度愛媛大学・工学部長裁量経費、「タンパク質分子進化の試験管内再現-RNA 修飾酵素の構造・機能進化」の助成を受けました。

また、本研究の大部分は、愛媛大学・工学部・応用化学科・応用生物化学研究室に在籍した数多くの卒論生、大学院生および東京大学、東京工業大学、理化学研究所の共同研究者によってなしとげられたものであり、遠藤弥重太教授には数多くの激励のことばをいただきました。ここに、慎んで謝意を表させていただきます。

文献

- [1] Rozenski, J., McCloskey, J.A., and Crain, P.F. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 196-197
- [2] Motorin, Y., and Grosjean, H. (1998) in *Modification and Editing of RNA* (Grosjean, H. and Benne, R., eds) pp. 543-550, ASM Press, Washington, DC
- [3] Björk, G.R. (1992) In: *Transfer RNA in Protein Synthesis* (Hatfield, D.L., Lee, B. J. and Pirtle, R.M., eds), pp. 23-85, CRC Press, Boca Raton, FL
- [4] Björk, G.R. (1995). In: *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function* (Söll, D. and RajBhandary, U.L., eds), pp. 165-205, ASM Press, Washington, DC
- [5] Garcia, G. R., and Goodenough-Lashua D. M. (1998) In *Modification and Editing of RNA* (Grosjean, H. and Benne, R., eds) pp. 555-560, ASM Press, Washington,
- [6] Bålman, E. B., Blumenthal, R. M., and Cheng, X. (1998) In *S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structure and Functions* (Cheng, X. and Blumenthal, R. M., eds), pp. 1-32, World Scientific, Singapore
- [7] Hori, H., Yamazaki, N., Matsumoto, T., Watanabe, Y., Ueda, T., Nishikawa, K., Kumagai, I., and Watanabe, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 25721-25727
- [8] Hori, H., Suzuki, T., Sugawara, K., Inoue, Y., Shibata, T., Kuramitsu S., Yokoyama, S., Oshima, T., and Watanabe, K. (2002) *Genes Cells*, **7**, 259-272
- [9] Hori, H., Kubota, S., Watanabe, K., Kim, J. M., Ogasawara, T., Sawasaki, T., and Endo, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25081-25090
- [10] Nureki, O., Watanabe, K., Fukai, S., Ishii, R., Endo, Y., Hori, H., and Yokoyama, S. (2004) *Structure* **12**, 593-602
- [11] Watanabe, K., Nureki, O., Fukai, S., Ishii, R., Okamoto, H., Yokoyama, S., Endo, Y., and Hori, H. (2004) Submitted
- [12] Ahn, H. J., Kim, H. W., Yoon, H. J., Lee, B., Suh, S. S., and Yang, J. K. (2003) *EMBO J.* **22**, 2593-2603
- [13] Elkins, P. A., Watts, J. M., Zalacain, M., van Thiel, A., Vitazka, P. R., Redlak, M., Andraos-Selim, C., Rastinejad, F., and Holmes, W.M. (2003) *J. Mol. Biol.* **333**, 931-949
- [14] Liu, J., Wang, W., Shin, D. H., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S.-H. (2003) *Proteins* **53**, 326-328
- [15] Nureki, O., Shirouzu, M., Hashimoto, K., Ishitani, R., Terada, T., Tamakoshi, M., Oshima, T., Chijimatsu, M., Takio, K., Vassilyev, D. G., Shibata, T., Inoue, Y., Kuramitsu, S., and Yokoyama, S. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **58**, 1129-1137
- [16] Anantharaman, V., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2002) *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4**, 71-75
- [17] Persson, B. C., Jager, G., and Gustafsson, C. (1997) *Nucleic Acid Res.* **25**, 3969-3973
- [18] Gustafsson, C., Reid, R., Greene, P. J., and Santi, D. V. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 3756-3762
- [19] Byström, A. S., and Björk, G. R. (1982) *Mol. Gen. Genet.* **188**, 440-446
- [20] Byström, A. S., Hjalmarsson, K. J., Wikstrom, P. M., and Björk, G. R. (1983) *EMBO J.* **2**, 899-905
- [21] Hjalmarsson, K. J., Byström, A. S., and Björk, G. R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1343-1351
- [22] Holmes, W. M., Andraos-Selim C., Roberts, I., and Wahab, S. Z. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13440-13445
- [23] Redlak, M., Andraos-Selim, C., Giege, R., Florentz, C., and Holmes, W. M. (1997) *Biochemistry* **36**, 8699-8709
- [24] Cavaille, J., Chetouani, F., and Bachelier, J.-P. (1999) *RNA* **5**, 66-81
- [25] Harada, Y. *et al. unpublished data*
- [26] Okamoto, H., Watanabe, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., Endo, Y., and Hori, H. (2004) *J. Biol. Chem. in press*
- [27] De Bie, L. G., Roovers, M., Oudjama, Y., Wattiez, R., Tricot, C., Stalon, V., Droogmans, L., and Bujnicki, J. M. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 3238-3243