

## AlphaFold2 の予測モデルによるタンパク質-tRNA 複合体の構造決定

碓井拓哉<sup>1</sup>, 大江花<sup>1</sup>, 中村彰良<sup>2</sup>, 尾瀬農之<sup>1,3</sup>, 姚閔<sup>1,3</sup><sup>1</sup>北海道大学大学院 生命科学院 生命科学専攻, <sup>2</sup>国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門,<sup>3</sup>北海道大学大学院 先端生命科学研究院 先端融合科学研究部門

## Structure determination of protein-tRNA complex using AlphaFold2 predicted model

Takuya USUI<sup>1</sup>, Hana OE<sup>1</sup>, Akiyoshi NAKAMURA<sup>2</sup>, Toyoyuki OSE<sup>1,3</sup>, and Min YAO<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Bioproduction Research Institute, AIST,<sup>3</sup>Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

## Abstract

tRNA は転写後修飾を含む様々な成熟化を受けて機能を発揮する。2-セレノウリジン合成酵素（酵素 S）は超疎水性の S-ゲラニル中間体の形成を経て 3 種類の tRNA (tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>) のアンチコドン 1 位のウリジンをセレン修飾する酵素である。これまで酵素 S の構造は未知であり、酵素 S が全く性質の異なる 2 段階の反応を触媒できる分子機構も明らかではなかった。本研究では、tRNA との共発現系を用いた複合体の調製や予測構造を利用した分子置換法によって、酵素 S と tRNA の複合体の構造決定に成功し、反応機構に関する知見を得ることができた。

## 1. はじめに

tRNA は mRNA のコドンと対応するアミノ酸をリボソームへ運ぶことで、タンパク質の合成に関与する、生命に必要な構成要素である。tRNA は DNA から転写された後、化学修飾を含む様々なプロセッシングにより成熟化して機能する。現在 100 種類以上の修飾が発見されており [1,2], 修飾部位に応じて、tRNA の三次構造の安定化 [3], 紫外線ダメージからの防御 [4], 翻訳時のリーディングフレームの維持 [5] などに寄与している。中でも tRNA のアンチコドン部位には最も多様かつ高頻度に修飾が見つかっており、コドン認識に影響するため、タンパク質合成における正確かつ効率的なコドンの解読に寄与している [6]。

生命における必須な“毒”であるセレン [7] を利用した塩基修飾として、5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン (mnm5Se2U) と 5-カルボキシルメチルアミノメチル-2-セレノウリジン (cmnm5Se2U) 修飾が見ついている。これらの修飾は真正細菌 [8,9], 古細菌 [10], 真核生物 [11-13] の生物ドメイン全てで発見されており、グルタミン酸、グルタミン、リジンを運搬する tRNA (tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>) のアンチコドン 1 位で同定されている。(c)mnm5Se2U は硫黄修飾を受けた前駆体ウリジン (mnm5S2U, cmnm5S2U) から合成され、mRNA のコドンと tRNA のアンチコドンの親和性を変化させることで、タンパク質の翻訳効率を制御すると考えられている [14,15] (Fig. 1)。

本研究対象である 2-セレノウリジン合成酵素（酵素 S, Enzyme S）は tRNA のセレン修飾を触媒する酵素であり、近年酵素 S による Se 修飾の反応中間体として S-ゲラニル

誘導体 (mnm5geS2U, cmnm5geS2U) の存在が明らかになった [16] (Fig. 2)。この発見より、酵素 S は、ゲラニルリン酸 (GePP) を用いてウリジン 2 位の硫黄をゲラニル化して (c)mnm5geS2U を合成し、その後、セレノリン酸 (SePO<sub>3</sub>) を基質として、脱離基状態のゲラニル化硫黄 (geS) を Se に置換するという 2 段階の反応で Se 修飾を触媒すると思われる [17-19] (Fig. 2)。

また、この 2 段階反応に対応して酵素 S は、N 末端のロダナーゼドメインと P-loop を含む機能未知の C 末端ドメインの 2 つのドメインから構成されている [20] (Fig. 2)。両ドメインとも触媒活性に必要であるが [21], 各ドメインがどのように協調的に機能し、全く性質の異なる 2 種類のリガンドを利用して、セレン修飾反応を触媒しているのかは明らかではない。そこで本研究では、酵素 S と tRNA 複合体の構造解析による 2 段階の反応機構解明を目的として実験を進めた。

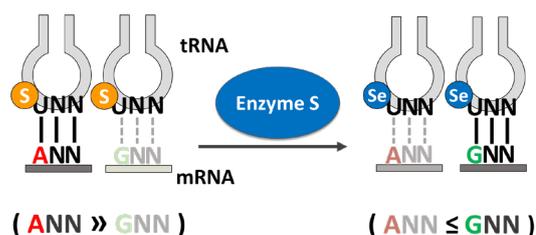
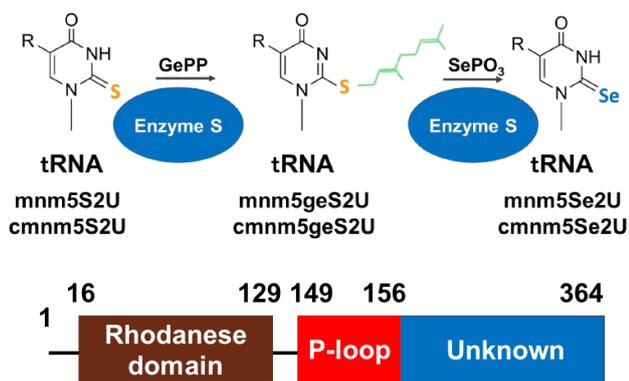


Figure 1 Affinity change between mRNA codons and tRNA anticodons by tRNA Se modification.

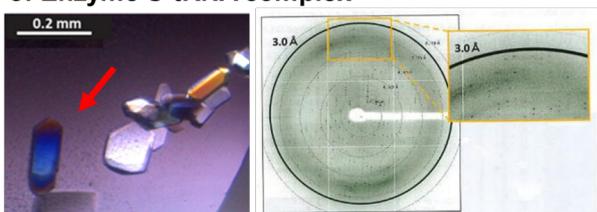


**Figure 2** Top: 2-selenouridine synthesis by Enzyme S. R represents a methylaminomethyl group (mnm) or a carboxymethylaminomethyl group (cmnm). Bottom: Sequence analysis of Enzyme S from *E. coli*.

## 2. 酵素 S-tRNA 複合体の大量調製および結晶化

はじめに、酵素 S-tRNA 複合体を構造解析するために、サンプルの大量調製に取り組んだ。酵素 S は tRNA と強く結合してほとんど解離しないという特徴を持ち、精製時には生体内で 3 種類の tRNA (tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>) が酵素 S に結合するため、高純度の複合体精製が困難であった。そこで、tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Lys</sup> との共発現系を利用し、生体内で特定の tRNA の存在比を偏らせることで、高純度複合体の精製を試みた。そのうち、tRNA<sup>Gln</sup> との共発現系から Ni アフィニティークロマトグラフィ、ゲルろ過クロマトグラフィ、陰イオン交換クロマトグラフィの 3 段階で精製した酵素 S-tRNA 複合体のサンプルのみで結晶化

### The crystals and X-ray diffraction of Enzyme S-tRNA complex



#### Crystallographic statistics

Beamline	PF BL5A
Space group	C2
Unit cell (Å, °)	$a = 209.0, b = 64.7, c = 165.4,$ $\alpha = 90, \beta = 124.8, \gamma = 90$
Resolution (Å)	50 – 3.10 (3.29 – 3.10)
Observed total/Unique ref.	122453 / 32686 (19793 / 5223)
Completeness (%)	99.4 (99.5)
$R_{\text{merge}}$ (%)	6.3 (58.7)
$I/\sigma$ (I)	16.62 (2.12)
Redundancy (%)	3.74 (3.80)

**Figure 3** Enzyme S-tRNA complex crystals and crystallographic statistics. The values for the highest-resolution shells are shown in parentheses.

に成功し、3.7 Å 分解能の結晶を得た。また、結晶化の添加物スクリーニングにより、10 % (v/v) の propyleneglycol を添加することで結晶の質が改善されることが分かり、最高分解能 3.1 Å の複合体結晶の作製に成功した (Fig. 3)。

## 3. 酵素 S-tRNA 複合体の構造解析の位相問題

タンパク質の X 線結晶構造解析では、回折実験で失われるパラメータである位相を計算する必要がある。現在最も一般的な計算方法である分子置換法は、類似構造をサーチモデルとして利用し、位相を計算する手法である。酵素 S は N 末端ドメインしか構造が解けておらず、類似タンパク質構造も存在しないことから、Molrep や Phaser などのプログラムを利用した分子置換法による位相決定は難航していた。さらに、セレノメチオニンで標識した酵素 S と tRNA の複合体サンプルは、ネイティブの酵素 S で得られていたほとんどの条件で結晶化しなかった。ソーキングや共結晶化による重原子導入でも、結晶が損傷し、位相決定に利用できる良質な回折データを得ることができなかった (Fig. 4)。

## 4. AlphaFold2 による予測構造を利用した位相決定および精密化

2021 年 7 月にタンパク質の立体構造を非常に高精度で予測するプログラム AlphaFold2 が公開された [22]。AlphaFold2 の予測構造を分子置換法に利用することで位相決定に成功したという報告 [23] を参考に、我々も AlphaFold2 から予測される酵素 S の構造を分子置換法に利用することを試みた。AlphaFold2 で予測した酵素 S は予測の信頼値である pLDDT 値が全体的に高く、高精度な予測が期待された (Fig. 5)。酵素 S の予測モデルをサーチモデルとして、Molrep を利用して位相計算した時点で

### Soaking

Heavy atom compound	Resolution	Heavy atom compound	Resolution
BaCl <sub>2</sub>	8.0 Å	NiCl <sub>2</sub>	4.5 Å
YCl <sub>3</sub>	6.0 Å	CrCl <sub>3</sub>	4.5 Å
CoCl <sub>2</sub>	4.0 Å	(CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Pr	7.0 Å
CuCl <sub>2</sub>	7.5 Å	Nal	5.0 Å
MnCl <sub>2</sub>	6.0 Å	CsCl	5.0 Å
SrCl	7.5 Å	BaPt(CN) <sub>4</sub>	4.5 Å

### Co-crystallization

Heavy atom compound	Resolution	Heavy atom compound	Resolution
BaCl <sub>2</sub>	7.0 Å	SrCl	8.0 Å
MnCl <sub>2</sub>	6.5 Å	CsCl	8.0 Å
Nal	6.0 Å	NaBr	10.0 Å
CoCl <sub>2</sub>	Salt	BaPt(CN) <sub>4</sub>	6.0 Å
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> ]Cl <sub>3</sub>	9.0 Å		

**Figure 4** Introducing heavy atom into crystals by soaking or co-crystallization.

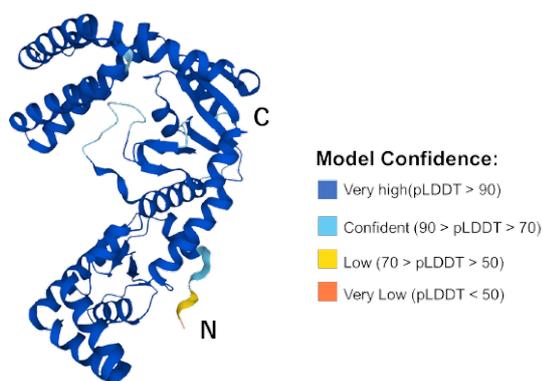


Figure 5 Structure of Enzyme S predicted by AlphaFold2.

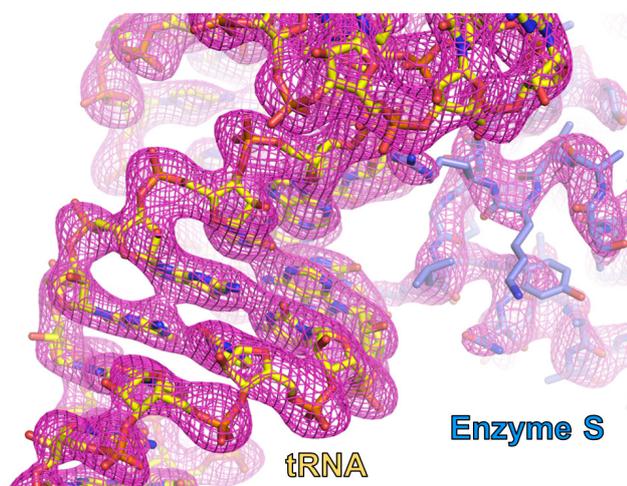


Figure 6 2Fo-Fc difference map and partial the structure of the Enzyme S-tRNA complex. The map is contoured at  $2.0 \sigma$ .

Rf/sig 7.96 (Tf/sig 7.48) となり、tRNA に特徴的な塩基対の電子密度を確認できた。これにより、タンパク質 1 分子の予測モデルから tRNA との複合体の位相決定が可能であることが明らかになった。その後、構造再構築と精密化を進めることで  $R_{\text{free}}$  値を 0.3 以下まで下げることができた (Fig. 6)。

## 5. 酵素 S-tRNA の複合体構造

今回構造決定に成功した tRNA との複合体は、酵素 S の初めての分子構造であり、基質 tRNA との相互作用様式を明らかにした。まず、酵素 S と tRNA は分子全体で結合する構造をとっており、酵素 S と tRNA がほとんど解離しないという実験結果を解釈することができた。また、得られた複合体の構造では、tRNA が tRNA<sup>Gln</sup> であり、そのアンチコドン 1 位のウリジンはゲラニル化されていた。従って、結晶構造は反応中間体であることが明らかになった。

## 6. まとめと今後の展望

tRNA との共発現系を利用した高純度複合体精製や AlphaFold2 の予測モデルを分子置換法に利用することで、世界で初めて酵素 S および tRNA との複合体構造を

明らかにできた。このことより、AlphaFold2 を含む Deep Learning を用いた構造予測の技術革新は目覚ましいものであることを改めて実感した。現時点の構造情報から考えられる反応機構は複数あり、正確な反応機構を提唱するためにはさらなる実験が必要である。今後は構造から推定した重要残基に変異を加えた変異体を作製する。そして、ITC による基質との相互作用解析や、HPLC を利用した酵素活性測定によって重要残基を同定し、tRNA のセレン修飾の反応機構を解明したい。

## 7. 謝辞

結晶化や位相決定にご尽力くださった加藤公児助教 (現 JASRI 職員) や当時の修士学生の小野さやか様に深くお礼申し上げます。また、日頃より実験の相談等や計算科学によるサポートをして下さった研究室の先輩である博士後期課程 3 年の石坂優人様にもお礼申し上げます。本研究では、Photon Factory の BL-1A, BL-5A, AR-NW12A および SPring-8 の BL41XU を用いて X 線回折実験を行いました。お力添え下さったビームラインスタッフの皆様にご心より感謝申し上げます。また、研究費をご提供して下さいました北海道大学物質フロンティアを開拓する Ambitious リーダー育成プログラムにもこの場をお借りして御礼申し上げます。

## 引用文献

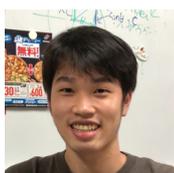
- [1] W. A. Cantara, P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey, K. A. Harris, X. Zhang, F. A. Vendeix, D. Fabris, and P. F. Agris, *Nucleic Acids Res.* **39**, D195 (2011).
- [2] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach, A. Kotter, M. Helm, and J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **46**, D303 (2017).
- [3] Y. Motorin & M. Helm, *Biochemistry* **49**, 4934 (2010).
- [4] G. F. Kramer, J. C. Barker, B. N. Ames, *Journal of Bacteriology* **170**, 2344 (1988).
- [5] G. R. Bjork, J. M. B. Durand, T. G. Hagervall, R. Leipuvien, H. K. Lundgren, K. Nilsson, P. Chen, Q. Qian, J. Urbonavičius *FEBS. Lett.* **452**, 47 (1999).
- [6] L. Han, E. M. Phizicky, *RNA*. **24**, 1277 (2018).
- [7] T. H. Jukes, *J Appl Biochem.* **5**, 4 (1983).
- [8] A. J. Wittwer, L. Tsai, W. M. Ching, T. C. Stadtman. *Biochemistry* **25**, 5 (1984).
- [9] A. J. Wittwer, T. C. Stadtman, *Arch Biochem Biophys.* **248**, 50 (1986).
- [10] W. M. Ching, A. J. Wittwer, L. Tsai, T. C. Stadtman, *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 57 (1984).
- [11] W. M. Ching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3010 (1984).
- [12] T. Mizutani, T. Watanabe, K. Kanaya, Y. Nakagawa, and T. Fujiwara, *Mol. Biol. Rep.* **26**, 167 (1999).
- [13] T. N. Wen, C. Li, C. S. Chen, *Plant. Sci.* **57**, 185 (1988).
- [14] A. J. Wittwer, W. M. Ching, *Biofactors* **1**, 27 (1989).
- [15] G. Leszczynska, M. Cypryk, B. Gostynski, K. Sadowska,

- P. Herman, G. Bujacz, E. Lodyga-Chruscinska, E. Sochacka and B. Nawrot, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2882 (2020).
- [16] C. E. Dumelin, Y. Chen, A. M. Leconte, Y. G. Chen, D. R. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **8**, 9 (2012).
- [17] P. Bartos, A. Maciaszek, A. Rosinska, E. Sochacka, B. Nawrot, *Bioorg. Chem.* **56**, 49 (2014).
- [18] G. Jäger, P. Chen, G. R. Björk, *PLoS ONE* **11**, e0153488 (2016).
- [19] M. Sierant, G. Leszczynska, K. Sadowska, P. Komar, E. Radzikowska-Cieciura, E. Sochacka, B. Nawrot, *FEBS Lett.* **592**, 2248 (2018).
- [20] M. D. Wolfe, F. Ahmed, G. M. Lacourciere, C. T. Lauhon, T. C. Stadtman, T. J. Larson, *J. Biol. Chem.* **3**, 1801 (2004).
- [21] D. Su, T. T. Ojo, D. Söll, M. J. Hohna, *FEBS Lett.* **586**, 717 (2012).
- [22] K. Tunyasuvunakool, J. Adler, Z. Wu, T. Green, M. Zielinski, A. Židek, A. Bridgland, A. Cowie, C. Meyer, A. Laydon, S. Velankar, G. J. Kleywegt, A. Bateman, R. Evans, A. Pritzel, M. Figurnov, O. Ronneberger, R. Bates, S. A. A. Kohl, A. Potapenko, A. J. Ballard, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, E. Clancy, D. Reiman, S. Petersen, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, E. Birney, P. Kohli, J. Jumper and D. Hassabis, *Nature* **596**, 590 (2021).
- [23] J. Pereira, A. J. Simpkin, M. D. Hartmann, D. J. Rigden, R. M. Keegan, A. N. Lupas, *Proteins* **89**, 1687 (2021).

(原稿受付：2022年9月21日)

## 著者紹介

碓井拓哉 Takuya USUI



北海道大学大学院 生命科学院  
博士後期課程1年  
〒060-0810 札幌市北区北10-西8  
TEL: 011-706-4479, FAX: 011-706-4481  
e-mail: usui.takuya.e8@elms.hokudai.ac.jp

略歴：2022年 北海道大学大学院 博士後期課程入学。

最近の研究：tRNA 修飾酵素の研究

趣味：ランニング, 料理, アニメ観賞

尾瀬農之 Toyoyuki OSE



北海道大学大学院  
先端生命科学研究院 教授  
〒060-0810 札幌市北区北10-西8  
TEL: 011-706-4905, FAX: 011-706-4481  
e-mail: ose.toyoyuki@sci.hokudai.ac.jp

略歴：2022年 北海道大学教授。博士（理学）。

最近の研究：感染・がん化に関わるシグナル伝達，生合成の蛋白質科学，水素原子に注目した生命科学。

趣味：穴場探し

姚閔 Min YAO



北海道大学大学院  
先端生命科学研究院 名誉教授  
〒060-0810 札幌市北区北10-西8  
TEL: 011-706-4479, FAX: 011-706-4481  
e-mail: yao@castor.sci.hokudai.ac.jp

略歴：2022年 北海道大学名誉教授。博士（理学）。

最近の研究：tRNA の成熟化酵素，有機材料を利用した蛋白質結晶の作製法の開発。

趣味：美食，家庭菜園