



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the reaction mechanism of tRNA seleno-modification enzyme SelU [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	碓井, 拓哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16275号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95491
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Usui_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学）氏名 碓井 拓哉

学位論文題名

Study on the reaction mechanism of tRNA seleno-modification enzyme SelU
(tRNA セレン化修飾酵素 SelU の反応機構の研究)

セレン (Selenium, Se) は、ほとんどの生物種にとって必須であると同時に毒性を示す元素である。他の微量元素と比較して摂取適正量の範囲が非常に狭いため、ヒトの健康を考える上でも詳細な研究が欠かせない。Se が生体内で機能するために、タンパク質ではセレノシステイン、RNA ではセレノウリジンの形で取り込まれることが広く知られる。tRNA の 2-セレノウリジン修飾 (R5Se2U) は、全生物ドメインで保存されている唯一のセレノヌクレオシドであり、tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Lys} のアンチコドン 1 位で同定されている。この修飾は、硫黄修飾を受けた 2-チオウリジン (R5S2U) を前駆体として合成される。R5Se2U は正確な U-A または U-G 塩基対の形成を保証する機能をもつとともに、R5S2U よりも効率的に G を認識し、mRNA のコドンと tRNA のアンチコドン間の親和性を変化させる。さらに、R5Se2U のレベルは環境中のセレン濃度に敏感に依存しており、Se の供給状況に応じて翻訳効率を調節する可能性が示唆されている。

tRNA 2-セレノウリジン合成酵素 (SelU) は、tRNA の Se 修飾を触媒する酵素である。近年、SelU による Se 修飾の反応中間体として、超疎水性修飾である 2-ゲラニルチオウリジン (R5geS2U) の存在が報告された。このことから、SelU はまずゲラニルニリン酸 (GePP) を基質としてウリジン 2 位の硫黄 (R5S2U) をゲラニル化し、R5geS2U を生成する。その後、セレノリン酸 (SePO₃³⁻) を基質としてゲラニルチオール基 (geS) を脱離基として Se に置換する、2 段階の反応を触媒する。このようなゲラニル化を脱離に利用する反応は、他の tRNA 成熟化酵素では報告例がなく、非常に独自である。しかし、SelU がどのようにしてこのユニークな中間体を利用するのかは未解明である。SelU は、N 末端ドメイン (ロダネーゼドメイン, RHD) と P-loop を含む C 末端ドメイン (CTD) の 2 つのドメインから構成され、両ドメインが触媒活性に必要とされる。これまでの研究では、SelU のリガンドおよび tRNA 認識や、各段階の酵素活性測定が行われてきたが、構造情報は SelU の RHD (PDBID:3G5J) のみに限定されており、包括的な反応機構の議論には至っていない。この問題を解決するため、私は SelU-tRNA 複合体の X 線結晶構造解析および生化学的解析を通じて、大腸菌由来 SelU の反応機構の解明を試みた。

まず、SelU が tRNA との結合状態と、その修飾反応の関係を調べた。大腸菌で発現した SelU は、tRNA と複合体を形成した状態で精製されるため、より正確な生化学実験に向けた単体 SelU の調製をチャレンジした。SelU に結合する tRNA がほとんどゲラニル化されているとの報告に基づき、大腸菌培養時に亜セレン酸ナトリウム (SePO₃³⁻ 前駆体) を添加することで tRNA のセレン化反応を促進し、tRNA を解離させることを試みた。その結果、亜セレン酸ナトリウムの添加により tRNA の解離が促進される様子は、精製サンプルの SDS-PAGE および尿素 PAGE で確認された。ゲラニル化後のセレン化活性を失う SelU 変異体では tRNA の解離が見られなかったことから、tRNA の解離はセレン化が促進された結果であることが示された。さらに、ゲラニル化の活性を失う SelU 変異体においては、亜セレン酸ナトリウムの添加有無に関わらず、単体 SelU が調製された。これらの結果は、SelU がゲラニル化された tRNA と特異的かつ強固に結合することを示し、SelU が生体内で常にゲラニル化された tRNA と結合の状態が存在し、セレン化の反応を待機していることを示唆された。

次に、SelU の反応機構を詳細に理解するために、SelU-tRNA 複合体の X 線結晶構造解析による可視化を実施した。SelU-tRNA 共発現系の利用することによるサンプル調製や AlphaFold2 による予測構造を分子置換に利用することで、SelU-tRNA^{Gln} 複合体の構造を 3.1Å 分解能で決定した。この構造は全長 SelU の初めての分子構造だけではなく、基質 tRNA との相互作用様式も明らかにした。構造中の tRNA アンチコドン 1 位 (U33) はゲラニル基の電子密度が観察され、解かれた結晶構造は反応中間体のスナップショットであった。SelU の RhD は典型的なロダネーゼドメインの特徴を有していた。機能未知であった CTD は α ヘリックス富んだ構造であり、両者は一つの α ヘリックスで繋がれていた。SelU と tRNA は分子全体で結合しており、RhD が tRNA のアンチコドンステムループを認識し、CTD はアンチコドンループ以外と複数個所で結合していた。このような多数の結合は SelU と tRNA の強固な複合体を形成するという特徴と一致する。POCASA (POcket-CAvity Search Application) を利用し、得られた SelU の構造からポケットをサーチしたところ、RhD および CTD のそれぞれで、非常に保存性の高い残基で形成されるポケットを同定した。RhD のポケットは非常に高い疎水性を示し、tRNA U33 のゲラニル基を認識していた。CTD のポケットは非常に大きく、SelU 分子を貫通し、P-loop はポケット内部に内包されていた。また、tRNA^{Gln} の variable loop の U45 を認識していた。両ポケットは約 40Å 離れており、直接の相互作用ができない。

さらに、各ドメインのポケットの役割を理解するために、SelU の推定重要残基に変異を導入し、解析を実施した。RhD の U33 認識領域の近傍には保存された 97-CXRGGXRS-104 モチーフが存在し、このモチーフ内の残基をアラニン置換した変異体を作製し、培養時に亜セレン酸ナトリウムを添加して tRNA の結合状態を解析した。その結果、反応における重要残基を同定することに成功した。構造情報および変異体解析の結果は、RhD がセレノ化の活性中心として機能することを示している。

CTD のポケットの機能を理解するため、AutoDock4.2 を用いたドッキングシミュレーションにより、CTD における GePP の結合様式を推定した。さらに、ドッキングモデルを基に CTD の保存性が高いアミノ酸残基の変異体解析をおこなった。これらの結果は、CTD ポケットが GePP を認識し、ゲラニル化における活性中心として機能することを示唆している。

以上の結果を総括すると、SelU はゲラニル化された tRNA と特異的かつ強固に結合し、生体内で安定した中間体を形成していることが示唆された。このような安定した中間体の存在は、生体内で希少なリガンドである SePO_3^{3-} を認識した際に迅速な反応を促進する可能性がある。また、SelU-tRNA 複合体の結晶構造解析および変異体の解析から、SelU の RhD が 2 段階目のセレノ化反応の活性中心として機能することが示された。また、CTD は 1 段階目のゲラニル化反応の活性中心として機能することが示唆された。これらの知見を基に、SelU は 40Å 以上離れた 2 つの活性中心を用いて、2 段階の反応を触媒する反応機構を提案した。

Selenium (Se) is an essential yet toxic element for most organisms. Due to its narrow range of proper intake compared to other trace elements, detailed studies are crucial for considering human health. Se is incorporated into biopolymers as selenocysteine in proteins and 2-selenouridine in tRNAs. The 2-selenouridine modification (R5Se2U) in tRNA is conserved across all domains of life, identified at the first position of the anticodon of tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln}, and tRNA^{Lys}. This modification is synthesized from 2-thiouridine (R5S2U), a sulfur-modified precursor. R5Se2U functions to ensure accurate U-A or U-G base pair formation and recognizes G more efficiently than R5S2U, altering the affinity between the mRNA codon and the tRNA anticodon. Furthermore, the R5Se2U is highly sensitive to selenium concentration in the environment, so Se-modification potentially regulates translational efficiency depending on Se availability.

tRNA 2-selenouridine synthase (SelU) catalyzes the Se modification of tRNA. Recently, 2-geranylthiouridine (R5geS2U) has been reported as a reaction intermediate during Se modification mediated by SelU. Thus, SelU first uses geranyl diphosphate (GePP) as a substrate to geranylate the sulfur at the 2-position of uridine (R5S2U), producing R5geS2U. Subsequently, SelU uses selenophosphate (SePO_3^{3-}) as a

substrate to replace the geranylthiol group (geS) with selenium. This reaction, which uses geranylation for leaving group substitution, is highly unique and has not been reported in other tRNA maturation enzymes. However, how SelU utilizes this unique intermediate remains unclear. SelU consists of two domains: an N-terminal rhodanese domain (RHD) and a C-terminal domain (CTD) containing a P-loop motif, and both are required for catalytic activity. Although previous studies have reported how SelU recognizes tRNAs and uses other ligands, the catalytic activities associated with each step, as well as structural information of the rhodanese domain (PDBID: 3G5J) of SelU only, the detailed mechanism underlying the catalytic reaction remains unclear. To address this issue, we carried out X-ray crystallography and biochemical analysis.

First, we investigated the relationship between the binding state of SelU to tRNA and its reaction activity. Since SelU expressed in *E. coli* is purified as a complex with tRNA, isolated SelU was prepared to enable more accurate biochemical experiments. Because most tRNA bound to SelU is geranylated, adding sodium selenite (a precursor of SePO_3^{3-}) during *E. coli* culture should promote the Se modification reaction and dissociate tRNA. We added sodium selenite, observed the dissociation of tRNA (confirmed by SDS-PAGE and urea PAGE analyses), and successfully purified the isolated SelU. Furthermore, tRNA dissociation was not observed using SelU mutants lacking Se modification activity, supporting the conclusion that tRNA dissociation is the completion of the Se modification reaction. In contrast, SelU mutants deficient in geranylation activity were purified without tRNA regardless of sodium selenite addition. These results indicate that SelU binds specifically and strongly to geranylated tRNA and exists as a complex with geranylated tRNA *in vivo*, poised for the Se modification reaction.

Next, to elucidate the detailed reaction mechanism of SelU, we visualized the SelU-tRNA complex using X-ray crystallography. By using a co-expression system for sample preparation and molecular replacement with the SelU structure predicted by *AlphaFold2*, the structure of the SelU-tRNA^{Gln} complex was determined at a resolution of 3.1 Å. This structure provides the first full-length model of SelU and insights into its binding mode with the substrate tRNA. Electron density corresponding to the geranyl group was observed at position U33 of the tRNA anticodon, indicating that the crystal structure captured a snapshot of the reaction intermediate. The N-terminal domain of SelU displayed characteristic features of a rhodanese-like domain, while CTD exhibited an α -helix-rich structure, connected to the RHD by an α -helix. SelU and tRNA were bound across the entire molecule each other. The RHD recognizes the anticodon stem-loop and the CTD interacts at multiple sites outside the anticodon loop. Such extensive interactions are consistent with the strong SelU-tRNA complex formation. Using *POCASA* (POcket-CAvity Search Application) program, two pockets with highly conserved residues were identified in the RHD and CTD of the SelU, respectively. The RHD pocket exhibited high hydrophobicity, recognizing the geranyl group of U33 in tRNA. The CTD pocket was large, spanning the SelU molecule, with the P-loop motif within its internal pocket. Additionally, the CTD pocket recognized U45 in the variable loop of tRNA^{Gln}. These two pockets were separated by approximately 40 Å, precluding direct interaction between them.

To further elucidate the roles of the pockets in each domain, site-directed mutagenesis was performed on predicted essential residues of SelU, followed by detailed analyses. A conserved 97-CXRGGXRS-104 motif was identified near the U33 recognition region of the RHD pocket. Mutants with alanine substitutions in this motif were prepared, and their tRNA binding states were examined by adding sodium selenite during culture. These experiments successfully identified critical residues involved in the reaction. Combined structural and mutational analyses revealed that the RHD serves as a seleno-modification domain of SelU.

Considering the CTD pocket process P-loop, the function of CTD was investigated through docking simulations with AutoDock4.2 to predict the binding of GePP. Based on the simulation results, mutational analyses on conserved residues in the CTD pocket were performed. The results indicate that the CTD pocket specifically recognizes GePP and serves as the active site for geranylation.

In summary, SelU forms a specific and stable complex with geranylated tRNA to stabilize the tRNA as an intermediate *in vivo*. This stable intermediate likely facilitates rapid reactions upon recognition of SePO_3^{3-} , a rare ligand *in vivo*. Structural and mutational analyses of the SelU-tRNA complex revealed that the RHD acts as the catalytic domain for the second seleno-modification reaction, and the CTD contributes to the first step of the geranylation reaction. Based on these findings, we propose a reaction mechanism for SelU that utilizes two spatially separated catalytic centres, approximately 40 Å apart, to carry out the two-step reaction.