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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主査	教　授	尾瀬　農之
	副査	教　授	相沢　智康
	副査	助　教	塚本　卓

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）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

微量元素セレンは，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報告されていた。

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 はまずゲラニル二リン酸（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（$SePO3^{3-}$）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（$SePO3^{3-}$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も関わらず，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 と結合の状態で存在し，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。この様な多数の結合は 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。

これらより，RNA のセレン修飾反応メカニズムを新たに提唱することができた。これらの新規発見から著者は、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る。