



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the reaction mechanism of tRNA seleno-modification enzyme SelU [an abstract of entire text]
Author(s)	碓井, 拓哉
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/95492
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Usui_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

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点でユニークである。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、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査した。結果として、SelU がゲラニル化された tRNA に特異的かつ強固に結合することが明らかとなり、生体内で SelU は常にゲラニル化 tRNA と結合した状態で存在し、セレン化反応を待機していることが示唆された。

次に、SelU の反応機構を詳細に解明するため、SelU-tRNA 複合体の X 線結晶構造解析を行った。SelU-tRNA 共発現系を用いたサンプル調製および AlphaFold2 による予測構造を分子置換に活用することで、SelU-tRNA^{Gln} 複合体の構造を 3.1 Å の分解能で決定した。この解析により、全長 SelU の初めての構造だけでなく、基質 tRNA との相互作用様式も明らかになった。さらに、構造中から SelU の各ドメインに、保存性の高いアミノ残基で形成されたポケットを同定し、変異体による tRNA 結合実験やリガンド結合実験を通じて、各反応段階における重要残基を特定した。これらの結果を基に、SelU の独自の 2 段階反応機構を提案した。