

論文内容の要旨

論文題目 高度好熱菌アルギニル tRNA 合成酵素の X 線結晶構造解析および変異体解析によるアルギニン tRNA の主要アイデンティティ決定因子 A20 の認識機構の研究

氏名 嶋田 陸

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は、アミノ酸と tRNA とを ATP を利用して結合する酵素であり、それぞれのアミノ酸に対応して一般に 20 種類存在する。正確な遺伝情報の翻訳は、aaRS によるアミノ酸と tRNA の厳密な基質認識に依存している。aaRS は、分子量や四次構造が変化に富むが、それは aaRS がクラス I, クラス II の二つの異なる祖先から派生したことから、対応するアミノ酸や tRNA の認識を厳密に行うために、独自のドメイン構成を保持していることに起因する。aaRS は正しい tRNA を識別するため、tRNA 上の特定のヌクレオチド残基 (アイデンティティ決定因子) を認識してその tRNA をアミノアシル化することが知られている。tRNA^{Arg}では、D ループの A20 とアンチコドンの C35 が主要なアイデンティティ決定因子である。C35 は他のアミノ酸に対応する tRNA にも分布しているが、A20 は tRNA^{Arg} に特異的である。A20 は、原核生物、古細菌から真核生物までほとんどの生物種において保存されており、tRNA^{Arg} の普遍的なアイデンティティ決定因子であると考えられる。本研究では、構造未知のアルギニル tRNA 合成酵素 (ArgRS) の X 線結晶構造解析および変異体解析を行い、ArgRS による tRNA^{Arg} の主要アイデンティティ決定因子 A20 の認識機構の研究を行った。

高度好熱菌由来の酵素は熱安定で結晶化に有利であることが知られているため、高度好熱菌 ArgRS 遺伝子をクローニングし、その組み換え酵素を使用して結晶化を試みた。まず高度好熱菌の菌体より、4 段階のカラムクロマトグラフィーを経て ArgRS を精製した。

続いて、精製した ArgRS の部分アミノ酸配列に基づき PCR プライマーを設計し、そのプライマーを用いて PCR を行い、ArgRS 遺伝子断片を含む DNA 断片を調製した。調製した DNA 断片をプローブとして ArgRS 遺伝子全長を含む DNA 断片をクローニングした。遺伝子の全塩基配列を決定した結果、高度好熱菌 ArgRS は 592 アミノ酸残基からなり分子量は 66,212 であった。高度好熱菌 ArgRS は他生物種 ArgRS と 16-40 %の相同性を示し、最も高い相同性を示したのは、古細菌 *Pyrococcus horikoshii* ArgRS であった (相同性 40%)。高度好熱菌 ArgRS 遺伝子を発現ベクター pK7 にクローニングし、大腸菌を用いた発現系により、ArgRS を大量発現させた。大量発現した ArgRS を、熱処理と 2 段階のカラムクロマトグラフィーにより精製し、結晶化スクリーニングを行った。その結果、PEG8000 とエチレングリコールを沈殿剤として用いた条件で、結晶構造解析に適する高分解能結晶を得た。この結晶は空間群 $P6_3$ に属し、格子定数は $a = b = 156.1$, $c = 87.2$ Å であった。この結晶は再現性が非常に悪いが、種結晶化法を用いることで安定して結晶を得ることができた。K₂PtCl₄, および UO₂(CH₃COO)₂ をそれぞれ浸潤させた 2 種類の重原子置換結晶、および ArgRS 中のメチオニンをセレノメチオニンで置換したセレノメチオニン化結晶を調製した。これらの 3 種類の重原子置換結晶を利用して、重原子同形置換法により位相問題を解決し、高度好熱菌 ArgRS の結晶構造を 2.8 Å 分解能で決定した。その後、放射光施設 SPring-8 (播磨) において低温条件 (100 K) で得られたデータを使用して、構造モデルを 2.3 Å 分解能で精密化した。ArgRS はクラス I aaRS に特徴的な Rossmann fold を触媒ドメインに持つ一方、C 末端のアンチコドン結合ドメインがサブクラス Ia に特徴的なヘリックスバンドル構造であることから、サブクラス Ia に属することが判明した。

高度好熱菌 ArgRS の立体構造と、構造既知である大腸菌グルタミニル tRNA 合成酵素と tRNA^{Gln} との複合体の立体構造とを、共通の Rossmann-fold に基づき重ね合わせ、高度好熱菌 ArgRS と tRNA の結合モデルを構築した (図 1)。結合モデルにより、ArgRS に特有の N 末端ドメインが tRNA^{Arg} の A20 を、ヘリックスバンドルドメインが C35 をそれぞれ認識することが示唆された。また結合モデルにおいて、A20 や C35 の近傍の酵素表面には、生物種間における相同性の高い残基が集中していた (図 2)。そこで、特に N 末端ドメイン上の保存残基 (Tyr-77, Asn-79) が、A20 の認識にどのように関与しているかを調べるため、これらの残基と tRNA^{Arg} の A20 の双方に変異を導入し、アルギニル化における酵素反応速度論定数を測定した (表 1)。まず初めに、A20, G20, U20, C20 をそれぞれ持つ tRNA^{Arg} を *in vitro* 転写反応により調製した。これらの tRNA に対する野生型 ArgRS によるアルギニル化の反応速度論定数を測定したところ、高度好熱菌 ArgRS は A20 を持つ tRNA^{Arg} はアルギニル化するが、他の tRNA^{Arg} バリエーションはほとんどアルギニル化しないことが判明した (1/1000 以下に活性が低下)。したがって高度好熱菌においてもやはり tRNA^{Arg} の A20 は

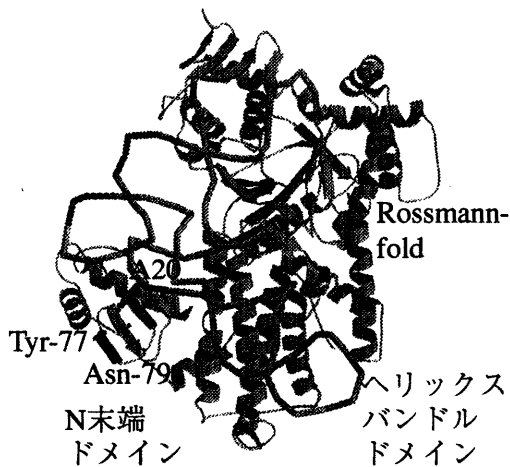


図1 高度好熱菌ArgRSとtRNAの結合モデル

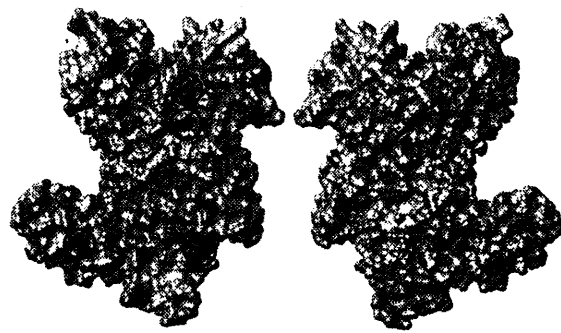


図2 ArgRS表面の保存残基 保存残基を丸で示す。

表1 野生型および変異体 ArgRS による tRNA^{Arg} バリエントに対するアルギニル化活性

Protein	A20	G20	C20	U20
Wild type <i>V_{max}/K_m, relative</i>	1	n.d.	n.d.	n.d.
Y77F	0.47	n.d.	n.d.	n.d.
Y77A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N79A	0.013	n.d.	n.d.	n.d.
N79D	0.74	0.51	n.d.	n.d.
N79Q	0.02	0.035	n.d.	n.d.
N79E	0.17	0.099	n.d.	0.022
N79K	0.0042	n.d.	n.d.	0.0073
N79R	0.0046	0.0032	n.d.	0.0058

A20 = tRNA^{Arg} (A20), G20 = tRNA^{Arg} (G20), C20 = tRNA^{Arg} (C20), U20 = tRNA^{Arg} (U20),

n.d. = not detectable

主要なアイデンティティ決定因子であることが確認された。

Tyr-77 に対応するアミノ酸残基は、ほとんどの生物種の ArgRS (A20 を持つ tRNA^{Arg} を持つ生物種では全て) においてチロシンあるいはフェニルアラニンである。したがってこのアミノ酸残基は、スタッキングによって A20 の認識に関与していると考えられる。まず、Tyr-77 をアラニンに置換した場合にはアルギニル化活性は著しく低下した。このことからこの残基が A20 の認識に重要な役割を果たしていることが示された。一方、Tyr-77 をフェニルアラニンに置換した変異体では、アルギニル化の効率はほとんど低下しなかった。この結果は、Tyr-77 による A20 の認識にはスタッキング相互作用が重要であるという仮説を支持する。

Asn-79 に対応するアミノ酸残基は、A20 を持つ tRNA^{Arg} を持つ生物種では完全に保存されており、*Saccharomyces cerevisiae* などの例外的な生物種では他のアミノ酸に置換されている。したがってこのアミノ酸残基が A20 に対する塩基特異性を決定しているアミノ酸残基であると考えられる。まず、Asn-79 をアラニンに置換した変異体では、アルギニル化

活性は著しく低下した。このことから、Asn-79 が A20 の認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、Asn-79 を他の極性アミノ酸残基に置換した変異体でも、アルギニル化活性は低下した。しかしその活性低下の程度は変化に富み、アスパラギン酸への置換ではほとんど活性が変化しなかった。A20 を持つ tRNA^{Arg} を持つ生物種ではこのアスパラギン残基が進化上完全に保存されていることを考えると、実験の結果は一見矛盾する。しかし興味深いことにこれらの多くの Asn-79 の変異体においては tRNA^{Arg} の 20 位のヌクレオチドに対する塩基特異性が広がっていた。特に N79D 変異体は G20 を A20 と同様に認識する。遺伝暗号の翻訳には高度な厳密性が要求される。生体内ではこのような変異体は、アルギニン以外のアミノ酸に対応する tRNA を誤ってアルギニル化する可能性が高いと考えられる。このことが選択圧となり Asn-79 は進化上高度に保存されてきたと推測される。

Tyr-77 と Asn-79 に周囲のいくつかのアミノ酸残基を加えて形成されたポケットに対して、変異体解析の結果を考慮し、アデノシンの認識モデルを作製したところ、このポケットはアデノシンの塩基がちょうど入る大きさであり、変異体解析の結果をよく説明した(図 3)。

本研究と同時期に、フランスのグループにより *S. cerevisiae* ArgRS の結晶構造解析プロジェクトが進行しており 1998 年に酵素単体の結晶構造が、2000 年に酵素と tRNA との複合体の結晶構造がそれぞれ発表された。*S. cerevisiae* では tRNA^{Arg} の 20 位は例外

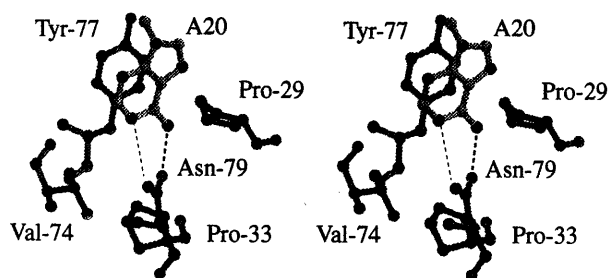


図 3 A20認識ポケットによるA20認識モデルの立体模式図

的にシチジンあるいはジヒドロウリジンで占められており、また生化学的な実験からは、これらのヌクレオチドは主要なアイデンティティ決定因子ではないことが示唆されている。しかし *S. cerevisiae* ArgRS と tRNA^{Arg} の複合体の結晶構造によると tRNA の 20 位のジヒドロウリジン (D20) は、*S. cerevisiae* ArgRS における相同な N 末端ドメインにより塩基特異的に認識されている。*S. cerevisiae* ArgRS における D20 の認識ポケットは *T. thermophilus* ArgRS の A20 の認識ポケットとドメイン上の位置が対応しており、元来 A20 を認識していた認識ポケットが D20 や C20 に対応するように変化したと考えられる。構造の比較から、A20 から D20 への認識の変化には、ドメインの回転と認識アミノ酸残基の変化 (保存アスパラギンからグルタミンへの置換を含む) が必須であることが判明した。

以上本研究では *T. thermophilus* ArgRS の立体構造解析および変異体解析により、進化上普遍的に保存されている tRNA^{Arg} の主要アイデンティティ決定因子 A20 の ArgRS による認識機構を構造および機能の両面から解明した。