

論文の内容の要旨

論文題目 クラス I のアミノアシル tRNA 合成酵素による基質の認識機構

氏 名 中 間 崇

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は, ATP によるアミノ酸の活性化と活性化されたアミノ酸の tRNA への結合の 2 段階からなる反応によって, アミノ酸をそれに対応する tRNA に特異的に結合させる酵素である. aaRS はタンパク質に含まれる各アミノ酸に対応する形で 20 種類存在し, これらは平行 β -sheet を持つ Rossmann fold を触媒ドメインとするクラス I と逆平行 β -sheet を触媒ドメインとするクラス II の 2 つに大別することができる. それぞれのクラスに含まれる aaRS はアミノ酸配列上の相同性からさらに 3 つずつのサブクラスに分類することができる (Ia, Ib, Ic および IIa, IIb, IIc) .

aaRS には, 複数種存在するアミノ酸あるいは tRNA の中から特異的なアミノ酸あるいは tRNA だけを選択することが遺伝情報の正確な発現のために要求されている. 本研究はこの aaRS による基質の厳密な認識機構を解明することを目的としている.

クラス Ia の aaRS の 1 つであるシステイニル tRNA 合成酵素 (CysRS) はアミノ酸が基質として活性部位に結合する段階で本来の基質であるシステインと形や化学的性質が似ているセリンをほぼ完全に識別することができることが報告されている. また, CysRS はもう 1 つの基質であるシステイン tRNA ($tRNA^{Cys}$) と結合するときにアンチコドンの塩基やアクセプターステムに存在する Discriminator と呼ばれる塩基を認識しているが, それに加えて $tRNA^{Cys}$ の三次構造の形成に関わっている塩基対も $tRNA^{Cys}$ の認識に重要な役割を果たしていると考えられている. これらの認識機構を高次構造の面から明らかにするために私は高

度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株由来の CysRS を用いて X 線結晶構造解析を行った。位相決定はセレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法によって行い、最終的には 2.3 Å までの分解能の原子モデルを得ることができた。結晶の非対称単位中で CysRS は図 1a に示すような 2 量体を形成していた。CysRS は他のクラス I の aaRS と同様に Rossmann fold からなる触媒ドメインを持ち、他のクラス Ia および Ib の aaRS に共通して存在している Connective Polypeptide ドメインおよび Stem Contact Fold ドメインや他のクラス Ia の aaRS に共通して存在している α -helix-bundle ドメインも持ち合わせていた。さらに CysRS には他のクラス Ia の aaRS にはみられない構造として N 末端側に逆平行 β -sheet 構造が、C 末端側に α - α - β - β 構造がそれぞれみられた。これらの機能を推測するためにクラス Ia の aaRS で tRNA との複合体の結晶構造が明らかになっている酵母のアルギニル tRNA 合成酵素の系をもとにして tRNA^{Cys} との結合モデルを構築した (図 1b)。その結果、N 末端側の逆平行 β -sheet 構造は tRNA^{Cys} の三次構造の形成に関わっている塩基対 (15:48 および 13:22:46) の、もう一方のポリペプチド鎖の C 末端側の α - α - β - β 構造はアンチコドンの塩基の近くにそれ

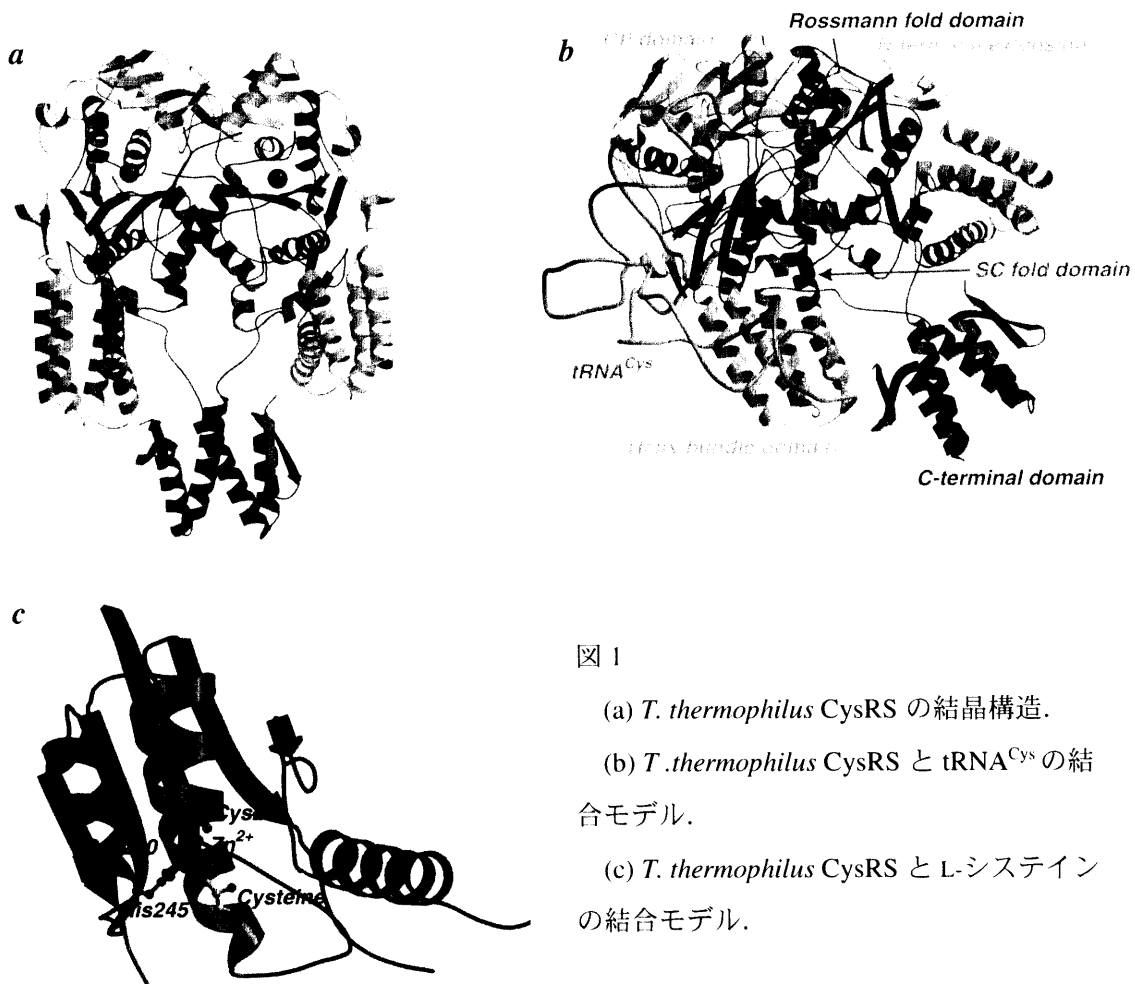


図 1

(a) *T. thermophilus* CysRS の結晶構造。

(b) *T. thermophilus* CysRS と tRNA^{Cys} の結合モデル。

(c) *T. thermophilus* CysRS と L-システインの結合モデル。

ぞれ配置されており、それぞれの認識に関わっている可能性があることが示唆された。このことに関する生化学的な実験結果は今のところ得られていないが、今後の生化学的解析あるいは tRNA^{Cys} との複合体の結晶構造解析によってその詳細が明らかになると思われる。一方、アミノ酸結合部位と思われるところに F_o-F_c map で 5σ以上という強い電子密度の存在が見られた。この近傍には全ての CysRS で保存されているシステイン残基 2 残基とヒスチジン残基 1 残基が存在していることから、この強い電子密度はこれらのアミノ酸残基に結合している亜鉛イオンによるものであると思われる。そこで、クラス Ia の aaRS でアミノ酸との複合体の結晶構造が明らかになっている *T. thermophilus* のイソロイシル tRNA 合成酵素の系をもとにして L-システインとの結合モデルを構築したところ、その亜鉛イオンの近くに基質となる L-システインの側鎖が配置されていた (図 1c)。現時点ではこれらのアミノ酸残基および亜鉛イオンの機能に関する生化学的な実験結果が得られてはいないが、この結合モデルからこれらのアミノ酸残基や亜鉛イオンは基質であるアミノ酸の識別に重要な役割を果たしているのではないかと推測される。

一方、クラス I の aaRS とアミノ酸の活性化によって生成される反応中間体であるアミノアシル AMP (aa-AMP) の複合体の結晶構造がこれまでの間に複数報告されているが、aaRS による aa-AMP の認識機構の共通性に関してはほとんど議論されていなかった。そこで、私はクラス Ia の aaRS の 1 つであるイソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) の系の場合を調べるために、*T. thermophilus* HB8 株由来の IleRS の結晶構造をサーチモデルにした分子置換法により IleRS と Ile-AMP の非水解アナログである Ile-AMS との複合体の結晶構造を 3.0 Å までの分解能で決定した (図 2a)。この結晶構造によって明らかにされた IleRS による Ile-AMS の認識機構はイソロイシンの部分に関しては以前明らかにされた IleRS によるイソロイシンの認識機構とほぼ同様であった。また、この結晶構造と今まで報告されている他のクラス I の aaRS とアミノアシル AMP の複合体の結晶構造を比較するによって、クラス I の aaRS によるアミノアシル AMP を構成するアミノ酸、リン酸、リボース、アデニンのそれぞれを認識するアミノ酸残基あるいはその高次構造上での位置に関してクラス I 全体あるいは各サブクラスごとに共通性があることが明らかになった (図 2b)。その一方で、aa-AMP の認識に共通して関わっている aaRS のアミノ酸残基は結合能をほとんど変えないまま変化することがあり、その変化による違いを利用して真正細菌由来の aaRS だけを阻害する抗生物質も存在している。その 1 つが、真性細菌由来の IleRS を選択的に阻害する mupirocin (Pseudomonic acid A) である。Mupirocin は *Pseudomonas fluorescens* によって合成される化合物で、実際に海外では methicillin 耐性の *Staphylococcus aureus* (MRSA) などの治療に用いられている。しかし、真核生物由来の IleRS に似た第 2 の IleRS (Type II IleRS) の遺伝子をもつプラスミドによって mupirocin への耐性を獲得した MRSA の出現が問題とな

ってきている。この mupirocin と IleRS とイソロイシン tRNA の複合体の結晶構造は *S. aureus* の系ですでに報告されていたが、IleRS の mupirocin に対する感受性の生物種による違いに関しては今までほとんど議論されていなかった。私は *T. thermophilus* HB8 株由来の IleRS の結晶構造をサーチモデルにした分子置換法により IleRS と mupirocin との複合体の結晶構造を 2.5 Å までの分解能で決定した (図 2c)。この結晶構造と IleRS のアミノ酸配列の比較によって、mupirocin の結合に関わっているアミノ酸残基のうち、His581, Leu583 (残基名と残基番号は *T. thermophilus* IleRS のものである) に相当するアミノ酸残基が真正細菌 (または古細菌) 由来の IleRS と真核生物由来の IleRS, そして Type II IleRS とで異なっていることが明らかになった。これらのアミノ酸残基に関する IleRS の種々の変異体を作成し、これらの変異体について mupirocin に対する感受性を測定したところ、もともと *T. thermophilus* IleRS の mupirocin に対する感受性は大腸菌由来の IleRS の約 1/100 であったのであるが、mupirocin の認識に関わるアミノ酸残基をすべて真核型に変換した変異体では mupirocin に対する感受性が野生型の約 1/10 とさらに低下していた。また、mupirocin の認識に関わるアミノ酸残基をすべて Type II IleRS 型に変換した変異体でも mupirocin に対する感受性が野生型の約 1/10 に低下していた。これにより、mupirocin に対する感受性の違いを引き起こすアミノ酸残基を特定することに成功した。将来的にはここで明らかにされた認識機構が新薬の創製に役立つことが期待できると思われる。

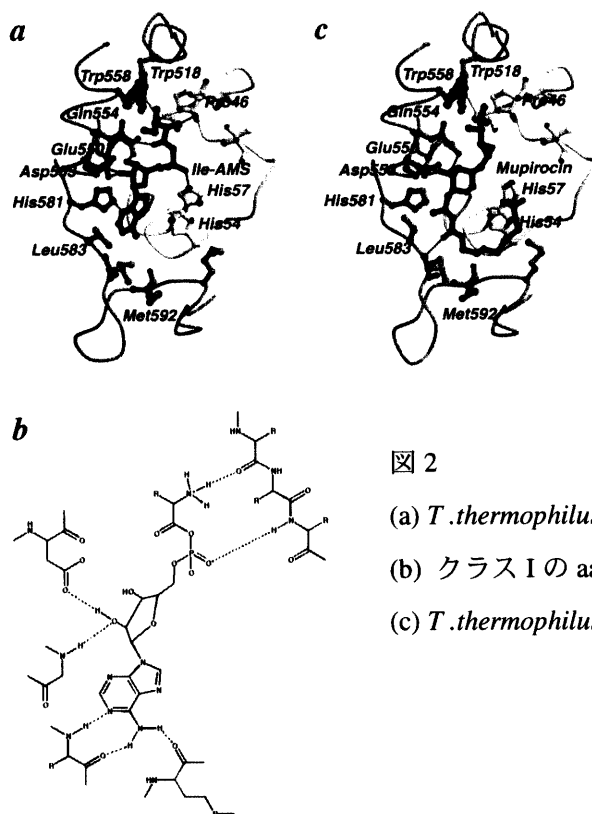


図 2

- (a) *T. thermophilus* IleRS による Ile-AMS の認識機構.
- (b) クラス I の aaRS の間で共通している aa-AMP の認識機構.
- (c) *T. thermophilus* IleRS による mupirocin の認識機構.