論文内容の要旨

論文題目　高度好熱菌由来バリル tRNA 合成酵素の機能・構造解析

氏名　深井　周也

アミノアシル tRNA 合成酵素（aaRS）は，アミノ酸を対応する tRNA に特異的に結合させる反応（アミノアシル化反応）を触媒する酵素群である．アミノアシル化反応は，アミノ酸とアデノシン３リン酸（ATP）からアミノアシルアデニル酸（aa-AMP）とピロリン酸を生成する反応と，aa-AMP のアミノアシル部分を，tRNA の 3'末端のアデノシン（A76）に転移させる反応の二つの反応からなる．aaRS は，各アミノ酸に対応して 20 種類存在し，触媒ドメインの違いに基づいて，クラス I および II の二つのクラスに大別されている．正確なタンパク質合成は，アミノ酸および tRNA の二つの基質に対する aaRS の高い特異性によって保証されている．

aaRS は，アミノ酸結合ポケットへの親和性の差によって，目的のアミノ酸とそれ以外のアミノ酸とを識別する．ところが，大きさの似たアミノ酸同士では，親和性の差が一段階の識別には不充分である．代表的な例は，イソロイシンとバリンであり，その差は CH_3 基一つである．そのため，イソロイシル tRNA 合成酵素（IleRS）のアミノアシル化触媒部位は，本来の基質であるイソロイシンだけでなくバリンも認識してしまい，バリルアデニル酸（Val-AMP）やバリル $tRNA^{Ile}$（$Val\text{-}tRNA^{Ile}$）を間違って生成してしまう．しかし，この誤りは，IleRS が Val-AMP および $Val\text{-}tRNA^{Ile}$ だけを，$tRNA^{Ile}$ の結合に依存して加水分解することによって訂正される．この校正反応は，「(amino acid) editing」と呼ばれる．アミノ

アシル化反応における大まかなアミノ酸認識を「目の粗いふるい（coarse sieve）」，校正反応における緻密なアミノ酸認識を「目の細かいふるい（fine sieve）」に例えて，二段階のアミノ酸識別機構は「二重ふるい選択（double-sieve selection）」と呼ばれる．アミノ酸の「二重ふるい選択」は，IleRS と近縁の酵素であるバリル tRNA 合成酵素(ValRS)でも行われる．ValRS が校正反応で排除するのは，バリンと大きさが同じであるが，一方のγ位に CH_3 基ではなく OH 基を持つトレオニンである．そのため，ValRS の第二のふるいは，「大きさ」で見分けるふるいではなく，「側鎖の化学的性質（親水性・疎水性)」を見分けるふるいである(図１)．

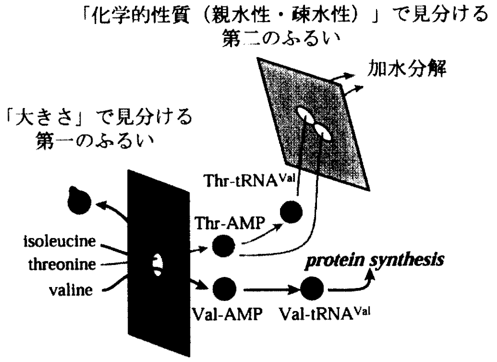

図１．ValRSによるアミノ酸の二重ふるい選択機構

一方，aaRS は，「アイデンティティー決定因子」と呼ばれる特定のヌクレオチド残基を認識して，tRNA を識別する．$tRNA^{Val}$ の主要なアイデンティティー決定因子は，アンチコドン 2 文字目と 3 文字目にあたる A35 と C36 である．本研究では，ValRS•$tRNA^{Val}$•Val-AMP アナログ三重複合体の X 線結晶構造解析を行い，「ValRS によるアミノ酸の二重ふるい選択機構」および「$tRNA^{Val}$ の主要アイデンティティー決定因子 A35，C36 の認識機構」を立体構造に基づいて明らかにした．さらに，ValRS の C 末端の coiled coil ドメインと $tRNA^{Val}$ の D ループ・TΨC ループとの相互作用の重要性を示すために，coiled coil ドメインと $tRNA^{Val}$ の両方について立体構造に基づく変異体解析を行った．

熱安定で結晶化に有利であり，また横山研究室で早くから研究が進められていたことから，結晶化には高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の ValRS を用いることにした．まず，*T. thermophilus* HB8 株から精製された ValRS の N 末端のアミノ酸配列に基づいて，PCR プライマーを設計し，*T. thermophilus* ValRS 遺伝子断片を含む DNA 断片を調製した．その DNA 断片を最初のプローブにして，サザンブロット解析によって *T. thermophilus* ValRS 遺伝子の単離を行った．遺伝子の全塩基配列を決定した結果，*T. thermophilus* ValRS は 862 アミノ酸残基からなり分子量は 98,774 であった．次に，*T. thermophilus* ValRS の遺伝子を，T7 プロモーターを用いた発現ベクターにつなぎ，大腸菌内で大量発現させた．大量発現させた ValRS は，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た．一方で，横山研究室の関根により単離された *T. thermophilus* $tRNA^{Val}$ (CAC)遺伝子を用いて，T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写系を確立し，転写産物をカラムクロマトグラフィーにより精製した．基質存在下および非存在下で *T. thermophilus* ValRS の結晶化を試みた結果，$tRNA^{Val}$ (CAC)と

Val-AMP アナログ（*N*-[L-valyl]-*N'*-adenosyldiaminosulfone, Val-AMS）存在下で，良質の結晶を得た．大型放射光施設 SPring-8 の BL41XU における低温（100 K）での回折測定では，最高 2.5 Å 分解能までの回折を観測することができた．この結晶の空間群は $P4_22_12$ であり，格子定数は，$a=b$=411.8 Å，c=81.97 Å であった．K_2PtCl_4 および $NaAuCl_4$ 誘導体を用いた重原子同形置換法により位相を決定し，30-2.9 Å 分解能の回折を用いて ValRS•$tRNA^{Val}$•Val-AMS 複合体の構造を精密化した（R_{work}=25.1 %，R_{free}=28.3 %）．一方，基質非存在下でも ValRS の結晶を得て，SPring-8 の BL44XU における低温（100 K）での回折測定で，4.0 Å 分解能までの回折データを収集した．複合体での ValRS の構造をサーチモデルとして分子置換法による位相決定を行い，ある程度の質の電子密度を得たが，構造の精密化までには至らなかった．

決定した *T. thermophilus* ValRS•$tRNA^{Val}$•Val-AMS 複合体の結晶構造（図２）では，Val-AMS は，「第一のふるい」として機能するアミノアシル化ドメインに結合していた．IleRS と比較することによって，イソロイシンに特徴的なδ-CH_3 の位置する場所に，ValRS では Pro 残基（Pro^{41}）の側鎖が突き出していて，イソロイシンを排除していることが明らかになった（図３）．一方，「第二のふるい」として機能する校正反応ドメインには，$tRNA^{Val}$ の 3'末端のアデノシンが特異的に認識されていた．IleRS と ValRS の校正反応ドメインは，うまく重ね合わせることができ，IleRS•バリン複合体の結晶構造とあわせて，post-transfer editing（aa-tRNA の加水分解）の状態のモデルを構築し，アミノアシル部分が結合するポケットを突き止めた．ValRS では，アミノアシル部分が結合するポケットは親水性の残基が集まっており，トレオニンに特徴的な $O_\gamma H$ を認識していることが強く示唆された（図４）．さらに，*T. thermophilus* IleRS および *S. aureus* IleRS•*E. coli* $tRNA^{Ile}$•mupirocin 複合体の結晶構造との比較から，間違って tRNA

図２．*T. thermophilus* ValRS•$tRNA^{Val}$(CAC)•Val-AMS複合体の結晶構造

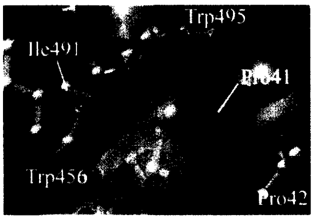

図３．「第一のふるい」として機能するValRSのアミノアシル化触媒部位

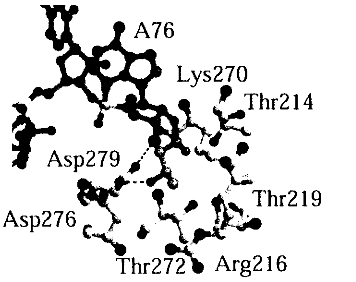

図４．「第二のふるい」として機能するValRSの校正反応触媒部位

に結合したアミノ酸をアミノアシル化ドメインから校正反応ドメインに運ぶ時に，tRNA の 3'アクセプターストランドの構造が変化するだけでなく，その動きに伴って校正反応ドメインの配向が変化することを指摘した．

$tRNA^{Val}$の認識に関しては，$tRNA^{Val}$のアンチコドンループは大きくほどけて helix bundle ドメインに結合し，A35 では 6-NH_2基と N7 原子が，C36 では 2-CO 基，N3 原子および 4-NH_2基が，それぞれ水素結合を介して ValRS に認識されていた（図５）．helix bundle ドメインに続くドメインは，アンチコドンステムのマイナーグルーブ側と相互作用していた．さらに，ValRS に特徴的な C 末端の領域は，coiled coil を形成しており，$tRNA^{Val}$の D ループと TΨC ループの二つのループと相互作用して，二つのループ間の相互作用を安定化していることが考えられた．そこで，まず ValRS について，coiled coil ドメインを欠失した変異体(Δ[795-862])と，$tRNA^{Val}$のリン酸基と水素結合している二つのアルギニン残基をアラニン残基に置換した変異体(R818A•R843A)の速度論的解析を行った．R818A•R843A 変異体では，tRNA に対する K_M 値が 30 倍に上昇したのに対して，Δ[795-862]変異体では，K_M 値が同様に上昇しただけではなく，k_{cat} 値も 1/20 に低下した．その結果，二つのアルギニン残基が，ValRS•$tRNA^{Val}$ 複合体の安定化に寄与していることが明らかとなり，それ以外の部分，特に $tRNA^{Val}$の G19•C56 塩基対と van der Waals 相互作用している部分が，例えば CCA 末端のアミノアシル化触媒部位でのポジショニングのような，触媒作用に関係する動きに寄与していることが示唆された．また，$tRNA^{Val}$の L 字型を壊すように設計した変異体 G18U, G19C および G18U•G19C においてもアミノアシル化活性の低下が認められ，L 字型の維持が活性に必要であることが明らかとなった．特に，G18U•G19C 二重変異体のアミノアシル化活性の低下は，ValRS の coiled coil ドメインを欠失した時の活性の低下と同程度であることから，coiled coil ドメインが D ループと TΨC ループのループ間相互作用を安定化していることを支持する結果となった．

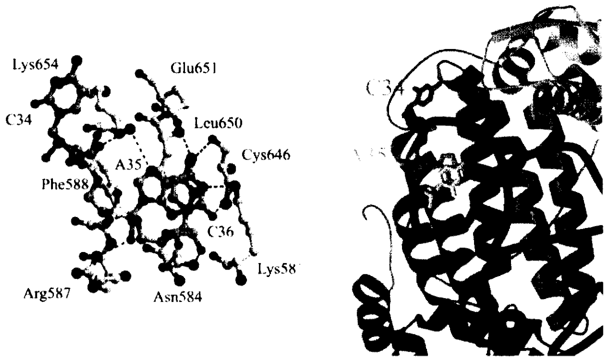

図５．ValRSによる$tRNA^{Val}$のアンチコドンループの認識