

論文の内容の要旨

論文題目 リボソームタンパク質 L11 メチル基転移酵素の X線結晶解析

氏名 上西 達也

タンパク質のメチル化は、原核生物の走化性の制御や真核生物のクロマチンのリモデリングなど、細胞内の多様な局面で重要な役割を果たしている翻訳後修飾である。しかしながら、メチル基転移の多くのものについては、依然として生物学的意義や機能発現機構は知られておらず、近年の研究によりその詳細がようやく明らかにされ始めたところである。タンパク質合成を担う細胞内小器官であるリボソームは、50 以上のタンパク質を含んでおり、これらリボソームタンパク質のメチル化は、進化的に広く保存されている普遍的な現象である。大腸菌 PrmA は、リボソームタンパク質のメチル化活性が認められている数少ない酵素の 1 つであり、Lys 残基に富んだ L11 の特定の 3 カ所 (N 端の Ala1 および Lys3 と Lys39) のアミノ基に、補酵素 S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) からメチル基を転移する。また、他の AdoMet 依存性メチル基転移酵素とは異なり、1 つのアミノ基に対して 3 回までメチル化を行うため (通常は 1 回)、最大で 9 つのメチル基が転移される。

L11 は多機能なリボソームタンパク質であり、特に、23S リボソーム RNA の高度に保存されている領域と複合体を形成し、翻訳の延長因子 EF-G および EF-Tu の GTPase 活性を制御していることから、長年にわたって重点的に研究が行われてきた。近年、この複合体の X線結晶解析が行なわれ、RNA と強固に結合する C 端ドメインに対し、可動性の分子スイッチとして働く N 端ドメインが、L11 の機能発現に中心的であることが示唆された。一方、翻訳のトランスロケーションと呼ばれる過程において、L11 と EF-G との間に架橋構造が形成されることが、低温電子顕微鏡法によって明らかにされており、リボソームの 50S サブユニットの結晶構造に含まれる L11 の分子モデルから、PrmA による N 端のメチル化部位が、EF-G に最も接近することが推測される。したがって、今までに報告はないものの、PrmA によるメチル化が、L11 と延長因子との間の相

相互作用に重要な役割を果たしている可能性がある。

本研究では、PrmA が L11 の特定のアミノ基を特異的に認識し、トリメチル化する機構を明らかにする目的で、大腸菌 PrmA とアミノ酸配列上で 38% の identity を有する高度好熱菌ホモログの X 線結晶解析を、単体および AdoMet との複合体について行った。

高度好熱菌 PrmA の精製試料は、理化学研究所・構造プロテオミクス研究推進本部より供与を受けた。まず、ゲルろ過および放射性同位元素標識された AdoMet を用いた測定法により、高度好熱菌 PrmA が、L11 に結合し、メチル基を転移することを、それぞれ確認した。

次に、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を試みた。硫酸アンモニウムを沈澱剤とする条件で予備的な多結晶が得られ、さらに 1,6-hexanediol を添加剤として用いることにより、X 線回折実験に適した単結晶を得た。Propylene glycol を抗凍結剤に用いて、シンクロトロン放射光施設 SPring-8 の BL44B2 ビームラインで低温回折強度測定を行ったところ、この結晶は空間群 C2 に属し、格子定数は、 $a=81.75 \text{ \AA}$ 、 $b=75.69 \text{ \AA}$ 、 $c=61.93 \text{ \AA}$ 、 $\beta=130.45^\circ$ であった。

Au 誘導体結晶を用いた多波長異常分散法により得られた初期位相から、 2.2 \AA の分解能で電子密度を求めたところ、アミノ酸残基の主鎖および側鎖を明確に識別することができた。続いて分解能 $50.0-1.9 \text{ \AA}$ までの native 結晶の X 線回折データに移行し、最終的には R_{work} および R_{free} がそれぞれ 23.2% および 25.0% に収束するまで精密化を行った。次に、単体の結晶を AdoMet 溶液に浸漬することにより複合体の結晶を作製し、単体と同様に回折強度測定を行った。単体の分子モデルを用いた剛体近似法により、AdoMet 複合体の単位格子内での位置および配向を決定し、分解能 $50.0-2.3 \text{ \AA}$ までの X 線回折データを用いて構造を決定した ($R_{\text{work}}=20.4\%$ 、 $R_{\text{free}}=25.8\%$)。

PrmA は $\sim 40 \times 40 \times 80 \text{ \AA}$ の伸展した結晶構造を有し、N 端側と C 端側は特徴的な α ヘリックスによって連結されていた。アミノ酸配列から予測された通り、C 端のドメイン (AdoMet 結合ドメイン) は、AdoMet 依存性メチル基転移酵素に典型的なフォールドを含んでいた。すなわち、7 本のストランド ($\beta 1 \sim \beta 7$) によって構成される混成 β シートを核に、その両側を α ヘリックス (αX 、 αA 、 αB および αC 、 αD 、 αE) が 3 本ずつ裏打ちしており、逆平行のストランド $\beta 7$ が $\beta 5$ と $\beta 6$ の間に挿入されている点を除けば、Rossmann フォールドと構造的に類似していた。実際に、浸漬法により作製した AdoMet 複合体の結晶では、AdoMet に対応する電子密度を、このドメイン内に確認することができた。また、その位置は他の AdoMet 依存性メチル基転移酵素とよく一致しており、高度に保存されたアミノ酸残基が、水素結合あるいは疎水性相互作用を介して、AdoMet の認識に関与していた。

一方、PrmA タンパク質に特異的なアミノ酸残基と AdoMet との間にも相互作用が見出された。すなわち、完全に保存されている Phe99 が、AdoMet の正電荷を帯びた硫黄原子の近傍 (4.2 \AA) に存在し、cation- π 相互作用をしていた。これにより、PrmA 単体の結晶では電子密度に認められなかった Gly96 から Thr101 の 6 残基が、AdoMet 複合体ではループとして安定化していた。この領域は、PrmA タンパク質に特異的かつ極めて保存性が高く、Phe99 に因んで「F-loop」と名付けた。

AdoMet との cation- π 相互作用により, Phe99 は His104 とともに face-to-edge の van der Waals 相互作用が可能な位置に存在しており, さらに His104 のイミダゾール環は Trp247 のインドール環とも接触している. これにより AdoMet に隣接して作り出される, 直径 8~9 Å, 奥行き 4~5 Å の空間は, 非常に高度に保存されている 7 つのアミノ酸残基から構成されており, 「基質結合ポケット」であると考えられた. 詳細に見ると, PrmA 単体の結晶では見出されなかった水分子が, ほぼ完全に保存されている Asn191 および Leu192 と水素結合を形成することにより, この基質結合ポケット内で規則正しく配列していた. これらの水分子のうちの 1 つは, AdoMet の硫黄原子と転移されるメチル基とを結んだほぼ直線上に酸素原子を持ち, AdoMet 依存性メチル基転移酵素に共通する触媒機構である S_N2 の求核置換反応に, 極めて適した位置と配向であるため, メチル基が転移される基質の標的原子を模していると考えられた.

AdoMet 依存性メチル基転移酵素フォールドでは, AdoMet のメチルスルフォニウム基と直接の相互作用は存在しないと考えられているが, PrmA の場合には, N 端側に隣接して F-loop を有しており, Phe99 がメチルスルフォニウム基を押さえ込むように cation- π 相互作用をしている. 一方, メチル基を転移して生じる S-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) は, 硫黄原子上に正電荷を持たないため, この cation- π 相互作用はメチル化反応後に消失すると考えられる. したがって F-loop は, 1) Phe99 の cation- π 相互作用により AdoHcy に対して選択的に AdoMet と結合し, 2) 正電荷を持つ硫黄原子と緊密に相互作用することにより, 転移されるメチル基の配向を整え, 3) メチル基が基質に転移されると, cation- π 相互作用の分だけ相対的に, 生成した AdoHcy を放出しやすくなると考えられる. 前述したように, F-loop の構造安定化は, Phe99 と AdoMet との cation- π 相互作用を介して, 基質結合ポケットの形成と密接に関連しており, 以上から, F-loop は PrmA の基質特異性やトリメチル化反応の全体を制御する, 最も重要なスイッチ構造であると考えられる.

一方, N 端側と C 端側がヘリックスにより連結されることにより形成される PrmA の分子表面は湾曲しており, 全体が負電荷を帯びていた. PrmA の基質である L11 は, pI が ~10 の塩基性タンパク質であり, PrmA の分子表面の特徴的な形状および電荷は, L11 の結合に適していると考えられた. 実際に, 既知の L11 の結晶構造を用いて形状および電荷に基づいて結合モデルの作成を試みたところ, L11 の N 端に存在するメチル化部位が, PrmA の基質結合ポケット近傍に位置することが強く示唆された.