

論文内容の要旨

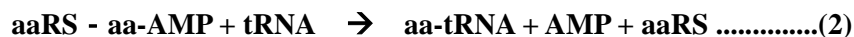
論文題目 Crystal Structure of Mammalian Mitochondrial Seryl-tRNA Synthetase : Implication for the Dual Mode Recognition

(哺乳動物ミトコンドリアのセリル tRNA 合成酵素の結晶構造解析)

氏名 サリン チムナロン

【序論】

アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS) は転移 RNA (tRNA)の 3'末端に、対応するアミノ酸を結合させる反応を触媒している酵素であり、20 アミノ酸それぞれにに対応する 20 種類の aaRS が存在する。この反応はアミノアシル化反応と呼び、2 段階の反応からなっている。



aaRS は対応するただひとつのアミノ酸と 1 セットの tRNA を厳密に識別する。この認識の厳密さそのものが翻訳の正確さを制御していると考えられている。しかし、tRNA のすべてが共通の L 字構造をとっていること知られており、aaRS は数十種類もの tRNA 群の中から対応する tRNA のみを特異的に認識できるように、tRNA 上に特異的な目印が存在することが明らかになり、これを tRNA アイデンティティと呼ぶ。多くの場合、tRNA アイデンティティは tRNA のアンチコドン、および 73 位の識別塩基 (discriminator)と呼ばれる残基、またはアクセプターステム上の残基に存在している。

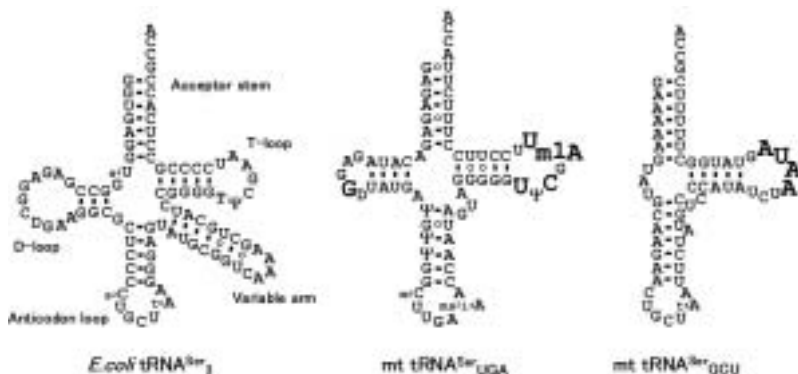


図1. tRNA^{Ser}の二次構造の比較。大腸菌(左) tRNA^{Ser} は長いバリアブルアームを持っているのに対し、ウシミトコンドリア tRNA^{Ser} (中央と右)には欠如している。太字は変異体解析より推測された認識部位

しかし、セリル tRNA 合成酵素(SerRS) は tRNA^{Ser} のアンチコドンもアクセプターステムも認識しておらず、代わりに、tRNA^{Ser} の特徴的な長く伸びたバリアブルアーム(variable arm, 図 1.)を強く認識していることが生化学的解析および共結晶構造解析によって明らかにされている。結晶構造によると、SerRS は二量体を形成し、片方のサブユニットが N 末端領域にある長いヘリックスアームを使って tRNA^{Ser} のバリアブルアームを認識し、もう片方のサブユニットはアミノアシル化を触媒している。

しかし、ミトコンドリアの中に存在する二つの tRNA^{Ser} (mt tRNA^{Ser})はこの特徴的な長いバリアブルアームを全く持っていない。さらに、mt tRNA^{Ser}_{GCU} (コドン AGC と AGU に対応) については、D アームが完全になくなっており (図 1.) これらの mt tRNA^{Ser} を一体どのようにして SerRS が認識しているのかが非常に興味深いことである。本研究室では、以前、ウシ肝臓からミトコンドリア SerRS (mt SerRS)を単離精製し、配列を決定することに成功している。さらに、tRNA 変異などを用いて解析して結果、mt SerRS は二つの mt tRNA^{Ser} の T ループを代わりに認識しており、一方、mt tRNA^{Ser}_{UGA} には T ループと D ループの相互作用が必要であることも明らかになった。この結果から、我々は、mt SerRS は二つの基質 tRNA を違った認識様式をしていると考え、初めてデュアルモード認識様式 (dual mode recognition) を提唱した。更なる詳細な分子メカニズムを解明するために、本研究では、ウシミトコンドリアの SerRS の結晶構造を 1.65 Å の高分解能で決定した。

【結晶化及び構造決定】

様々な結晶化条件を試し、最適化した結果、1.65 Å の高分解能の結晶がポリエチレングリコール 8000 と硫酸リチウムの組み合わせの沈殿剤によって得られた (図 2.)。シンクロトロン放射から得られたデータを分子置換法によって構造決定を行った。

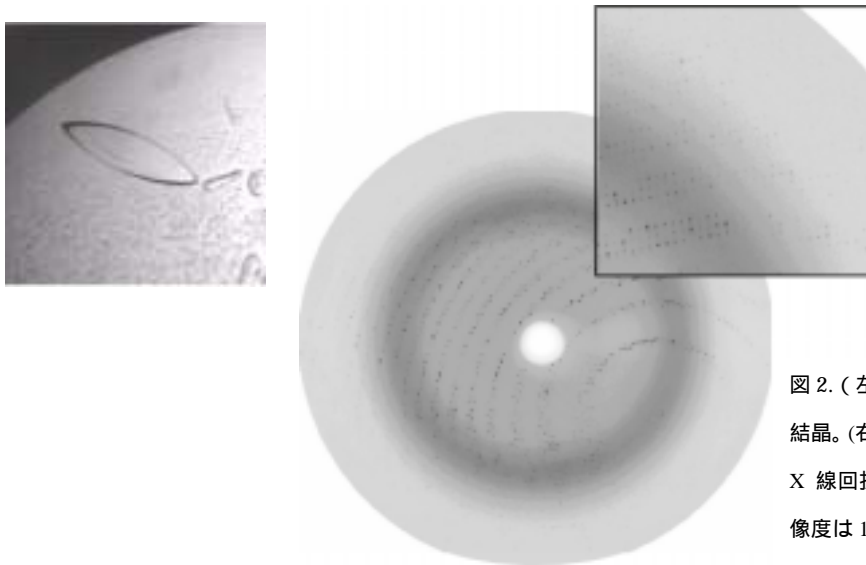


図 2. (左) mt SerRS の高分解能の結晶。(右) シンクロトロンによる X 線回折像。最も外側の円周の解像度は 1.57 Å。

【mt SerRS の立体構造】

アミノ酸配列の比較から、mt SerRS は N 末端と C 末端それぞれに延長がみられ、

さらに tRNA の識別に関わる長いヘリックスアームにはほとんど相同性がない。この事実から、mt SerRS は全く違う形の N 末端ドメインを持っているのではないかと推測されていた。しかし、予想と反して、mt SerRS も長いヘリックスアームを持っていることを構造から明らかになった(図 3.)。全体の、バクテリア SerRS に対する相同性は約 30%であるのにも関わらず、非常によく似た構造を持っていることがわかった。

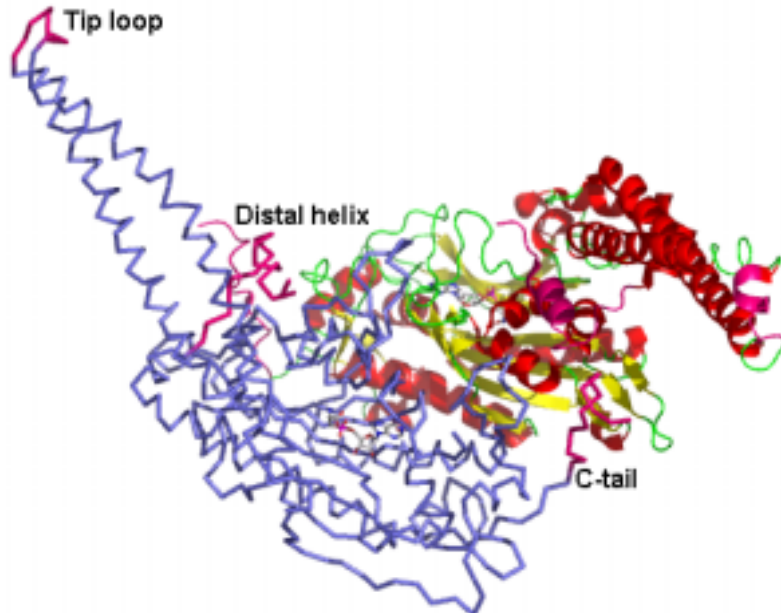


図 3. 決定された 1.65 Å の二量体の mt SerRS の結晶構造を C α トレースおよびリボンで表している。ミトコンドリア SerRS に特徴的なチップループ、ディスタルヘリックス、及び C テールが見られる(ピンク色の C α トレース)。

しかし、mt SerRS に見られない特徴が 3 つあることを発見した。一つ目は、長いヘリックスアームの先端に非常に極性に富んだアミノ酸残基(グルタミンとアスパラギン)からなるループが存在している。これをチップループ(tip loop)と呼ぶことにする。現在はこのループの役割は未知で解析中である。二つ目は、N 末端に追加された一本のヘリックスである。これをディスタルヘリックス(distal helix)と呼ぶ。ディスタルヘリックスは長いループ(~25 Å)を介して N 末端に付加されており、空間的な配置が、2 本さ DNA に結合するタンパク質が持つ HLH モチーフ(helix-loop-helix motif) に似ていることから、ディスタルヘリックスは基質 tRNA と結合する可能性が示唆される。最後の三つ目は、C 末端に長く伸びた延長である。これを C テール(C-tail)と呼ぶ。C テールは一本の β -シートを含んでおり、これが二量体のインターフェースの一部を形成していることがわかった。これらの三つの特徴は哺乳動物ミトコンドリア SerRS の間で高く保存されており、奇妙な mt tRNA^{Ser} の認識になんらか関わっていると考えられ、これを検証するために、SerRS の変異体解析を行った。

【mt SerRS の変異体解析】

mt SerRS のヘリックスアーム上のアルギニン残基のアラニン置換やディスタルヘリックスの欠損及び C テールの欠如の変異体を作成し(図 3.)、ウシの肝臓から単離精製した 2 つの mt tRNA^{Ser} を使って、活性測定(aminoacylation assay)を行った。その結果(図 4.)、驚くべきことに、バクテリアなどの SerRS で tRNA 認識に使われるヘリックス

アーム上の極性残基は活性に影響は少なく、反対に、ディスタルヘリックスと C テールの欠損変異は大きく二つの tRNA に対して活性が低下していることがわかった。一方、K93A の変異体は mt tRNA^{Ser}_{UGA} にだけ、活性の低下をもたらした。これらの結果を考察すると、mt SerRS は特有のディスタルヘリックスおよび C テールを使って両方の基質 tRNA を認識しているのに対し、Lys 93 は片方の tRNA^{Ser}_{UGA} の認識にだけ使われていることが明らかになり、これが dual mode recognition の正体であることを明らかにした。この Lys 93 が T ループと D ループの相互作用をチェックしている可能性があると考えられる。

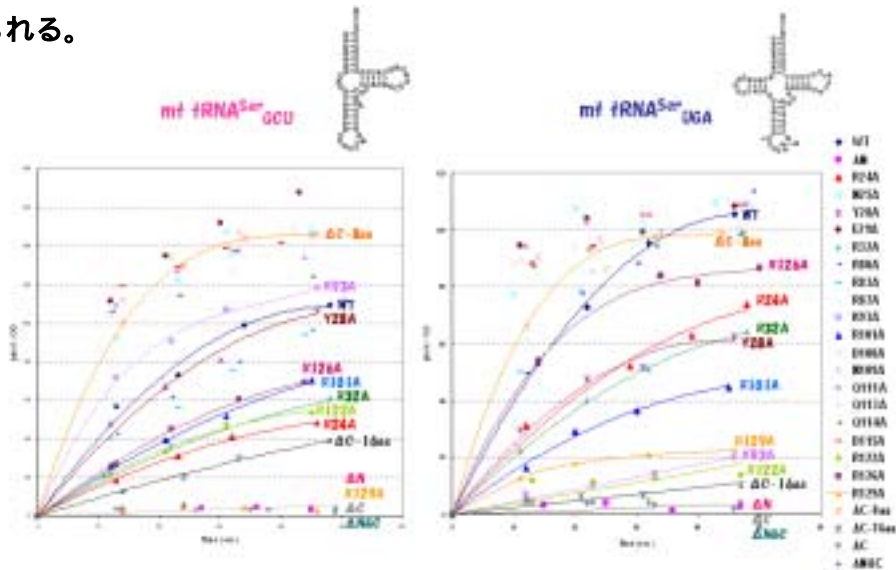


図 4. Aminoacylation assay

【SerRS の進化】

mt SerRS はどのように進化してきたのでしょうか？結晶構造からの情報によって、この問題の答えが見えてきた。セリンに対応するコドンは二つのボックス(コドン表上)に分かれており(AGC, AGU と UCA, UCG, UCC, UCU)、tRNA のアンチコドンを SerRS はアイデンティティ因子として利用することができないため、代わりに N 末端の長いヘリックスアームを使って、tRNA^{Ser} 特有の長いバリアブルアームを認識することにした(図 5.)。しかし、ミトコンドリアの中では、ゲノムの収縮に伴って mt tRNA が短縮し、バリアブルアームを失ってしまった。それを補うように mt SerRS は N 末端のディスタルヘリックス及び C テールの付加によって mt tRNA 上の新たなアイデンティティを見つけ出し、さらに、通常のクロバリーフ構造に近い tRNA^{Ser}_{UGA} を効率よくかつ正確に識別するために、Lys 93 が使われたと考えられる。詳細な認識メカニズムは mt SerRS と tRNA との共結晶構造を解くことで完全に明らかにされることでしょう。

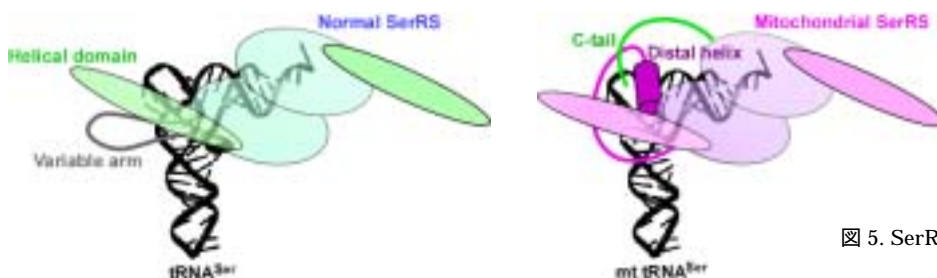


図 5. SerRS の分子進化モデル。