

論文内容の要旨

論文題目 tRNA の 3'末端プロセシング酵素の構造生物学的研究
(Structural and functional studies of tRNA 3' end processing enzymes)

氏名 石井 亮平

tRNA 分子は遺伝暗号の翻訳において mRNA とタンパク質を繋ぐ"アダプター分子"として中心的な役割を担っている。tRNA はおよそ 76 残基の RNA から構成される分子であり、共通の L 字型の立体構造を持つ。一般的に tRNA は 5'や 3'端に伸長配列をもった長い前駆体 tRNA として転写される。この 5'や 3'端の伸長配列の除去は複数のリボヌクレアーゼ (RNase) によって行われる。また全ての成熟 tRNA の 3'端は共通に CCA であるが、この CCA 配列は tRNA のアミノアシル化とそれに続くタンパク質合成に必須である。この CCA 配列は tRNA 遺伝子にコードされるか、もしくは 3'伸長配列が除去された後に酵素的に付加される。さらに、tRNA がアダプター分子として働くためには特異的な相互作用が必要になるが、そのために多数の修飾塩基が酵素的に導入される。したがって、前駆体 tRNA が機能を持った成熟 tRNA になるためには、5',3'伸長配列の除去、修飾塩基の導入、真核生物などイントロンが存在する場合にはイントロンの除去、CCA 配列の付加などの様々なプロセシングを受ける必要がある。

前駆体 tRNA の 5'伸長配列の除去は真性細菌、古細菌、真核生物で共通の反応によって触媒される。この反応はエンドリボヌクレアーゼである RNase P によって行われる。RNase P は前駆体 tRNA に作用して、成熟 tRNA の 5'末端に相当するヌクレオチド結合を特異的に切断する酵素である。RNase P はリボ核タンパク質複合体で活性部位は RNA にあるリボザイムである。前駆体 tRNA の 3'端のプロセシングについては、真性細菌、古細菌、真核生物の間や生物種によっ

て異なることが多いため、不明な点が多い。真性細菌の3'端のプロセシングの解析については、主として大腸菌を用いた系によって行われてきた。この結果から真性細菌の3'伸長配列の除去は複数のエンドリボヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼが関与する複雑な過程であることがわかった。大腸菌の系における tRNA の3'端プロセシング反応は、まず、長い3'伸長配列がエンドリボヌクレアーゼである RNase E や RNase III によって切断された後、redundant な活性をもつ6種のエキソリボヌクレアーゼ (RNase PH, T, D, II, BN, PNPase) によって CCA 末端までトリミングされる。この6つの RNase のうち RNase PH と T が最も活性が高い。最近、大腸菌以外の真性細菌でも3'端プロセシングが明らかになってきており、*Bacillus subtilis* や *Thermotoga maritima* ではエンドヌクレアーゼである tRNase Z が前駆体 tRNA に作用して、3'伸長配列を除去することも報告されている。この tRNase Z は真核生物や古細菌における3'端プロセシング反応においても、前駆体 tRNA の3'伸長配列を除去する役割を担っている。本研究ではこれらの tRNA 3' プロセシング酵素がどのように基質 RNA を認識しているかを明らかにするために、RNase PH と tRNase Z の2つの酵素を対象として X 線結晶構造解析を行った。

RNase PH

RNase PH は真性細菌の3'端プロセシング酵素の1つで、前駆体 tRNA の3'伸長配列を無機リン酸を共基質とした加リン酸分解によって分解し、成熟 tRNA を生じさせる酵素である。RNase PH のホモログは真性細菌、古細菌、真核生物に広く存在し、tRNA のプロセシング以外にも mRNA や rRNA の分解、プロセシングにも関与していることが報告されている。本研究では高度好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 RNase PH の発現系の構築、精製、結晶化を行い、大型放射光施設 SPring-8 を用いた X 線回折実験の結果、RNase PH と共基質である無機リン酸との複合体の構造を 2.3 Å 分解能で決定した (図 1)。RNase PH は α/β fold を取り、trimer of dimers からなるリング状の6量体を形成していた。この構造は

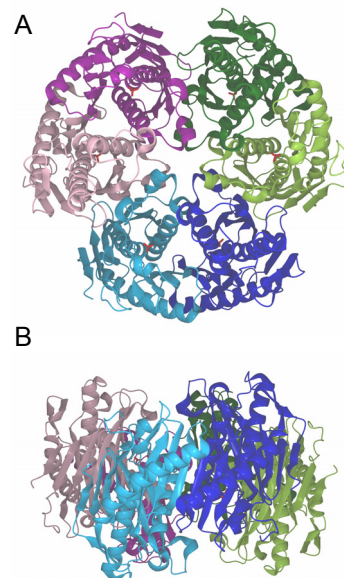


図 1: RNase PH の 6 量体の構造
(A) 3 回対称軸から見た図
(B) 2 回対称軸から見た図

すでに構造決定されていた PNPase のコア構造と良く似ていた。リン酸は 2 量体のインターフェイスの近くに形成された深いクレフトの奥に位置していた。このリン酸は真性細菌の RNase PH に保存された 3 つのアミノ酸 (Arg86, Thr125, Arg126) と相互作用していた (図 2A)。次にこれらのアミノ酸残基の役割を明らかにするために、それぞれの残基をアラニンに置換した変異体を作成し、RNA 加リン酸分解活性および tRNA 結合活性を調べた。また、活性の変化が RNase PH の立体構造の変化によるものかを調べるために変異体タンパク質の結晶化を行った。3 つの変異体タ

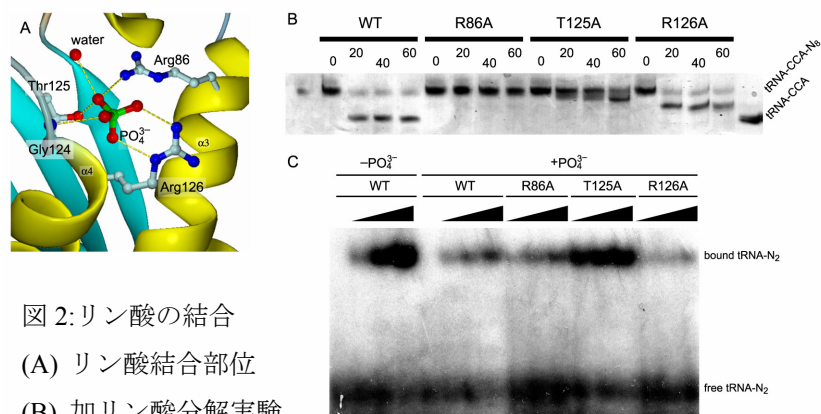


図 2:リン酸の結合
(A) リン酸結合部位
(B) 加リン酸分解実験
(C) RNA 結合実験

ンパク質は、どれも野生型と同じような構造を取っていた。しかし、RNA 分解活性と RNA 結合活性は、それぞれの変異体タンパク質で異なっていた。RNA 分解活性については、R86A 変異体は

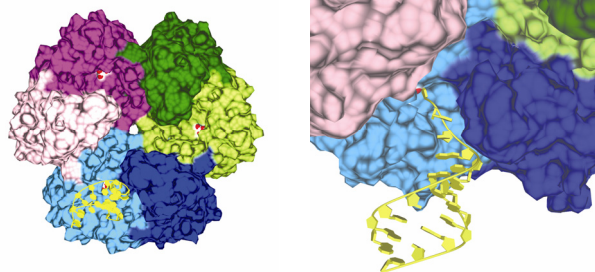


図 3:RNA との結合モデル

まったく活性を失っていたが、T125A 変異体と R126A 変異体は弱い活性を持っていた (図 2B)。RNA 結合能については R86A 変異体は野生型と同じ程度であったが、T125A 変異体は野生型より強く、リン酸非存在下と同程度、R126A 変異体は野生型より弱い結合能を示した

(図 2C)。以上のことから、Arg86 残基は直接、加リン酸分解反応に関与し、Thr125 残基はリン酸結合、Arg126 残基は RNA 結合に関与していることが考えられた。また、リン酸結合部位が深いクレフトの奥にあることが RNase PH の基質特異性に関係していると考え、RNA との結合モデルを作成し、RNase PH の基質認識モデルを提案した (図 3)。

tRNase Z

tRNase Z は真核生物、古細菌や一部の真性細菌において tRNA の 3'端プロセッシングに関与するエンドリボヌクレアーゼで、前駆体 tRNA の 3'伸長配列を discriminator 塩基で切断する酵

素である。一方で、*Thermotoga maritima* 由来 tRNase Z は前駆体 tRNA を discriminator 塩基では無く CCA 末端で切断することが報告されている。本研究では、*Thermotoga maritima* 由来 tRNase Z の発現系の構築、精製、結晶化を行い大型放射光施設 SPring-8 を用いた X線回折実験の結果、2.6 Å 分解能で構造を決定した (図 4A) . tRNase Z の全体構造は metallo-β-lactamase fold に分類される αβ/βα sandwich fold を取っていた。基本的な構造は中心にそれぞれ 7 本の βストランドからなる 2 枚のβシートがあり、両側にそれぞれ 3 本の αヘリックスが配置したものである。tRNase Z は非結晶学単位中に存在する分子によって 2 量体を形成していた (図 4B)。実際に tRNase Z が溶液中でも 2 量体であることが、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって確認された。他の metallo-β-lactamase スーパーファミリーのタンパク質と同様に、このファミリーに特徴的な 5 つのモチーフは 2 枚のβシート片端に集中し、活性部位を形成していた。tRNase Z の構造は metallo-β-lactamase の構造と良く重ね合わせることができ、活性部位には metallo-β-lactamase と同様に金属イオンが存在していた (図 5)。決定した立体構造を元に tRNA との結合モデルを作成し、tRNase Z の RNA 結合モデルを提案した (図 6) .

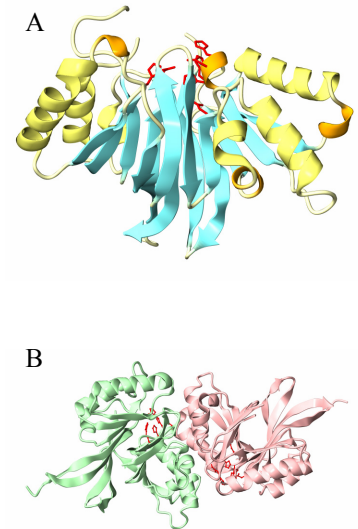


図 4:tRNase Z の立体構造 (A) 単量体の構造 (B) 2 量体の構造 モチーフのアミノ酸残基を赤で示した。

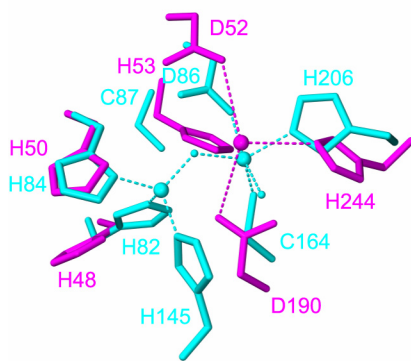


図 5:metallo-β-lactamase の活性部位との重ね合わせ tRNase Z を紫で、metallo-β-lactamase を水色で表示した。

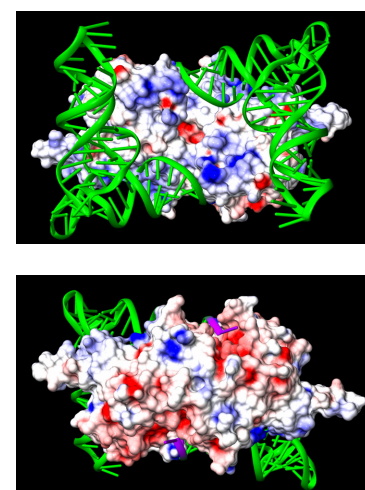


図 6:tRNA との結合モデル 表面電荷を酸性 (赤)、塩基性 (青) で示した。