

論文内容の要旨

論文題目 遺伝暗号拡張の構造的基盤
(Structural basis of genetic code expansion)

氏名 小林 隆嗣

生物では、タンパク質は遺伝暗号表に基づいて 20 種類の標準アミノ酸から合成されるが、それらの官能基の種類は限られる。有用なタンパク質を人為的に作るうえでは、アミノ酸の官能基の種類のはたしは重大な制限である。より多様な官能基をもつタンパク質は、様々な新しい機能をもつと期待される。そこで、非天然型アミノ酸を含む非標準アミノ酸をタンパク質に導入する研究が行われ、遺伝暗号を改変ないし拡張することにより、様々な非標準アミノ酸を、様々な長さのタンパク質に部位特異的に導入する方法が開発された。

遺伝暗号を拡張するには、特定のtRNAとアミノ酸とをATPの加水分解を利用して結合させる酵素であるアミノアシルtRNA合成酵素 (aaRS) のtRNAおよびアミノ酸特異性を、細胞内とは異なるもの (aaRS*, tRNA*とする) に改変し、翻訳系へと導入する。このときに、規則正しい遺伝暗号の対応付けを保つために、aaRS*とtRNA*は、多くの種類の内在性のaaRSやtRNAと相互作用しない性質 (直交性) をもつことが保証されていなければならない。同時に、アミノ酸認識に関しても、非標準アミノ酸を特異的に認識し、他の標準アミノ酸は認識しない性質を持つ必要がある。Schultzらは、古細菌*Methanocaldococcus jannaschii*由来のチロシルtRNA合成酵素 (TyrRS) と、対応するtRNA (tRNA^{Tyr}) が、大腸菌内で直交であることを見出し、非天然型アミノ酸である*O*-メチルチロシン特異的なTyrRS変異体の作成に初めて成功した。一方、真核生物においては、横山茂之らが*Bacillus stearothermophilus*由来TyrRSと真正細菌*Bacillus stearothermophilus*由来tRNA^{Tyr}を用いて、動物細胞で3-ヨードチロシンをアンバーコドン特異的に導入することに成功している。

TyrRS・tRNA^{Tyr}対の直交性は古細菌/真核生物と真正細菌の間でのTyrRSのtRNA認識機構の違いに由来している。古細菌および真核生物のtRNA^{Tyr}は、特徴的なC1:G72 塩基対、A73、アンチコドンを、真正細菌では、アンチコドン、A73のほか、古細菌/真核生物とは全く逆のG1:C72

塩基対と特徴的な長いバリアブルアームをそれぞれアイデンティティ決定因子として持つ。その中でもtRNAの1:72塩基対が、真正細菌型と古細菌/真核生物型のTyrRSにおいて直交性の鍵となっている。これまでに、真正細菌*Thermus thermophilus* TyrRS•tRNA^{Tyr}複合体の立体構造が決定され、TyrRSはtRNAのアクセプターステム、アンチコドンループに加えて、C末端のtRNA認識ドメインで長いバリアブルアームを認識していること、G1:C72およびA73認識機構が示された。ヒトのmini-TyrRSについても単体の立体構造が決定された。しかし、古細菌/真核生物型TyrRSとtRNA^{Tyr}との複合体の立体構造は決定されていなかった。一方、アミノ酸特異性の改変の結果得られた変異体が、なぜもとの基質であるチロシンを認識せず、非天然型アミノ酸をよく認識するのかについても、非天然型アミノ酸とTyrRS変異体との立体構造が決定されていないために、構造的基盤は解明されていなかった。

そこで本研究では、これらの遺伝暗号の拡張に用いられた2種類のTyrRSと基質との複合体のX線結晶構造解析を通じて、遺伝暗号拡張の構造的基盤を明らかにした。

古細菌*Methanocaldococcus jannaschii*由来TyrRS•tRNA^{Tyr}•チロシン複合体のX線結晶構造解析によるtRNA認識機構の解明 (第2章)

古細菌*M. jannaschii*由来TyrRSとその対応するtRNAの発現系の構築、精製、結晶化を行い、高輝度放射光施設SPring-8を用いたX線回折実験によって、TyrRS•tRNA^{Tyr}•チロシン三者複合体の立体構造を1.95 Å分解能で決定した(図1)。*M. jannaschii* TyrRSはホモ二量体を形成しており、チロシン1分子がRossmannフォールドドメインに結合していた。二つのtRNA^{Tyr}分子はホモ二量体の二つのサブユニットに橋を架けるようにまたがっている。アクセプター末端部にあるC1はArg174と水素結合し、また水分子を介してArg132と水素結合することで認識される。一方、G72はLys175の側鎖と水素結合することによって認識

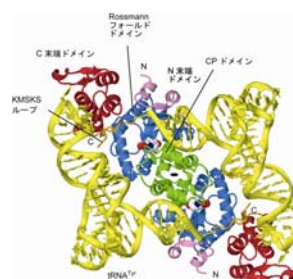


図1 *M. jannaschii* TyrRS 複合体の全体構造

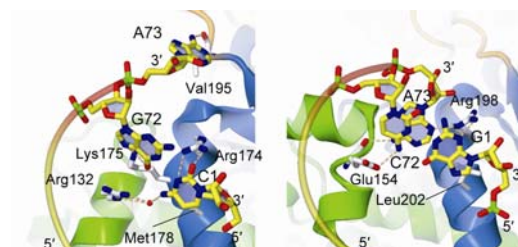


図2 tRNAアクセプター認識. (左) *M. jannaschii* TyrRS. (右) *T. thermophilus* TyrRS.

されている(図2)。Arg132, Arg174およびLys175は古細菌および真核生物由来TyrRSの間で高度

に保存されており，これら水素結合のネットワークによる厳密な認識が，TyrRSにおけるC1:G72 特異性の基盤と考えられる．A73 はステムから投げ出され，Val195 の主鎖により認識されている．一方，*T. thermophilus* TyrRSでは，tRNA^{Tyr}のG1 についてはあまり認識されておらず，C72 はGlu154 との1本の水素結合で認識されているのみである (図2)．さらに，A73 塩基部分はステムの延長上にある．これらの認識の違いから，G1:C72 塩基対をもつtRNAが*M. jannaschii* TyrRSに結合しようとしても，G1 の官能基はArg174 から遠く離れ，しかもC72 と水素結合できるような水素結合の受容基が全くないために，水素結合が形成されずに認識されないと考えられる．一方，*T. thermophilus* TyrRSでは，C1:G72 塩基対を認識できない．G72 の近傍には水素結合の供与基がないために，水素結合ができず，また*M. jannaschii* TyrRS でArg174 に対応する残基であるArg198 は，A73 とC1 を同時に認識することができない．以上の認識・識別の機構の違いが，真正細菌TyrRS・tRNA^{Tyr}対と古細菌/真核生物TyrRS・tRNA^{Tyr}対の直交性の源になっている．本研究ではまた，真正細菌TyrRSとは異なる，古細菌/真核生物型TyrRSに特徴的なアンチコドン認識機構を明らかにした (図3)．*M. jannaschii* TyrRSにおいて，tRNA^{Tyr}のアンチコドンの1文字目のG34 は，Phe261 とHis283 の環の間に入り込んでスタッキングし，Asp286 と水素結合によって認識されている．この

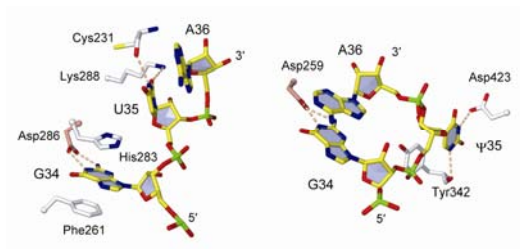


図3 tRNA アンチコドン認識. (左) *M. jannaschii* TyrRS, (右) *T. thermophilus* TyrRS.

のアスパラギン酸残基を様々な残基に置換したところ，アルギニン残基に置換することによって，遺伝暗号の拡張に用いるG34C tRNA^{Tyr} (アンバーサプレッサーtRNA) を，野生型酵素に比べて65倍強く認識し，かつ野生型tRNA^{Tyr}よりも強く認識することを示した (図4)．また，チロシン結合部位の構造比較も行い，アミノ酸認識の改変の可能性について論じた．

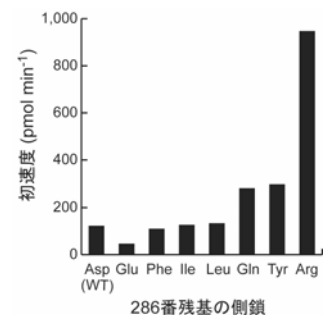


図4 286番残基の置換とG34C tRNA^{Tyr}アミノアシル化活性の変化

大腸菌 TyrRS 触媒ドメインのX線結晶構造解析による，アミノ酸活性化と非天然型アミノ酸認識機構の解明 (第3章)

野生型大腸菌 TyrRS の触媒ドメインと 5'-O-チロシルアデニル酸 (Tyr-AMP) アナログである Tyr-AMS との複合体, および 3-ヨードチロシン認識型変異体である, Y37V•Q195C 二重変異体 (37V195C 変異体) 大腸菌 TyrRS の触媒ドメインと Tyr-AMS, 3-ヨードチロシンもしくはチロシンとの複合体を調製し, 結晶化を行い, SPring-8 を用いた X 線回折実験により, それぞれ 2.7, 2.7, 2.0, 2.0 Å 分解能で立体構造を決定した (図

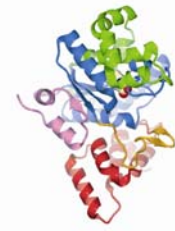


図5 大腸菌 TyrRS サブユニット構造

5). 野生型 TyrRS のチロシンとの複合体 (万有つくば研究所との共同研究により決定) と, 野生型酵素と Tyr-AMS の複合体との詳細な比較により, TyrRS のアミノ酸活性化において重要な働きをする KMSKS ループについて, ATP のアデニン環と Ile228 の主鎖部分との水素結合が形成されることで誘起される新しい状態である「半開」の状態をとっていることを明らかにした. また, 基質結合によって, 基質結合部位の構造変化により, チロシンと ATP が順序良く TyrRS に結合することを示した. これらの結果から, アミノ酸活性化における基質結合と KMSKS ループの動きとが協調することで, アミノ酸活性化反応が規則正しく進行していることを明らかにした. さらに,

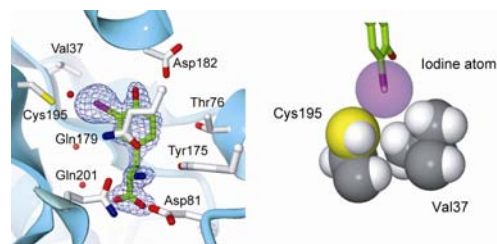


図 6 37V195C TyrRSに結合する 3-ヨードチロシン. (左) $2F_o - F_c$ オミット電子密度図, (右) CPKモデル

37V195C 変異体は, Val37 と Cys195 という 2つの残基が, もとのチロシンの認識と同様の, Asp182 とチロシンヒドロキシル基との間の水素結合を保ちながらも, van der Waals 相互作用によってヨード基を認識していた (図 6 左). 37 番残基と 195 番残基は, 周りの残基との van der Waals 相互作用によって強く固定され, 固いポケットを形成している. そして, 37 番残基の置換は, γ -メチル基がちょうどヨウ素原子と van der Waals 半径で接し, ヨウ素原子のための空間を作るために理想的な残基の大きさであることが明らかとなった (図 6 右). さらに, 37V195C 変異体の 195 番残基の置換体とチロシンもしくは 3-ヨードチロシンとの複合体の結晶化を行い, それらの立体構造を SPring-8 および実験室系における X 線回折実験により, 高分解能で決定した. その結果, 195 番残基の置換は, 元の基質のチロシンとの直接的な相互作用のみならず, 空いたポケットの隙間への水分子の侵入をも防ぐように働いていることが示され, 37V195C 変異体が 3-ヨードチロシンの認識に非常に適応した変異体であることが明らかとなった.