

論文内容の要旨

論文題目 アミノアシル tRNA 合成酵素の立体構造および特異的基質認識機構

(Structures and specific substrate recognition mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases)

氏名 福永 流也

ゲノム DNA にコードされた遺伝情報は mRNA への転写を経て、コドン表 (遺伝暗号表) に従ってタンパク質のアミノ酸配列へと翻訳される。この過程で tRNA は mRNA 中のコドンとタンパク質中のアミノ酸残基とをつなぐアダプター分子として働く。アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) がそれぞれに特異的なアミノ酸を対応する tRNA に特異的に結合させる (アミノアシル化反応) ことによってコドン表は成立している。従って aaRS によるアミノ酸および tRNA の特異的認識はタンパク質合成におけるコドン表の忠実性を保証するために必須である。いくつかの aaRS ではそのアミノアシル化ドメインが誤ったアミノ酸を認識して誤産物アミノアシル tRNA が生成されてしまう。そのような aaRS においては校正反応ドメインが存在し、それがただちに誤産物を加水分解 (校正反応) してそのエラーを除去することで、正確なアミノアシル化が達成されている。本研究ではコドン表に忠実なタンパク質合成の仕組みを理解すること、また aaRS やコドン表の進化について理解すること、さらにはコドン表の拡張の可能性を探ること、を目的とした。そのために X 線結晶構造解析と生化学的解析を行い、aaRS の立体構造を解明し、また aaRS によるアミノアシル化反応および校正反応におけるアミノ酸や tRNA に対する特異的認識機構を解明した。バリン tRNA 合成酵素 (ValRS)、イソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS)、ロイシル tRNA 合成酵素 (LeuRS)、アラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS)、AlaRS の校正反応ドメインのホモログタンパク質である AlaX、ホスホセリル tRNA 合成酵素 (SepRS)、Sep-tRNA:Cys-tRNA 変換酵素 (SepCysS)、を研究対象とした。

1. **ValRS** ValRS はスレオニンが反応した誤産物に対して校正反応活性を持つ。高度好熱真正細菌 *Thermus thermophilus* ValRS 校正反応ドメインと校正反応基質アナログ (Thr-AMS) の複合体の X 線結晶構造を 1.7 Å 分解能で決定した。Lys270, Thr272, Asp279 の親水性側鎖によるスレオニンの親水性側鎖に対する特異的認識機構を解明した。

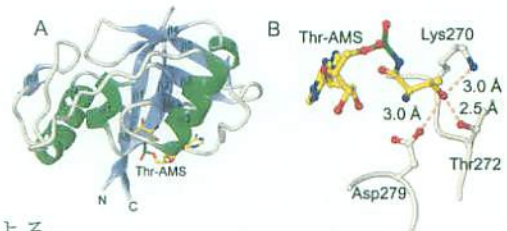


図 1: ValRS 校正反応ドメインの構造 (A)全体構造. (B)Thr-AMS 認識様式.

2. **IleRS** IleRS はバリンが反応した誤産物に対して校正反応活性を持つ。 *T. thermophilus* IleRS の校正反応ドメインと校正反応基質アナログとの複合体の X 線結晶構造を 1.6-2.0 Å 分解能で決定した。post-transfer editing の基質アナログ (Val-2AA) および pre-transfer editing の基質アナログ (Val-AMS) とでは同じ結合部位に共通のアデノシン部分が逆向きになって結合していた。また pre-transfer editing の際には Trp227 側鎖がフリップして結合部位がリアレンジされていた。一方2つの基質アナログ間でバリン側鎖は約 120°回転していたが、ともに主に His319 と Thr233 の側鎖による van der Waals 相互作用により特異的に認識されていた。IleRS における高い pre-transfer editing 活性はこのような特別な基質結合様式によることが明らかとなった。

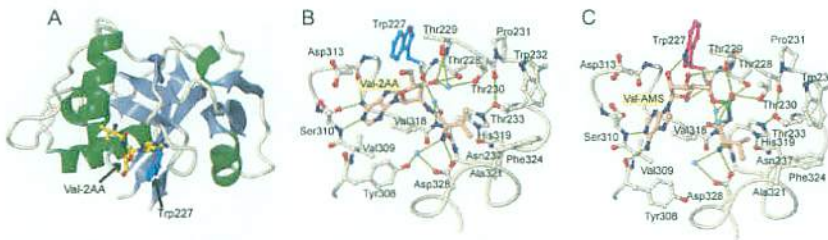


図 2: IleRS 校正反応ドメインの構造 (A)Val-2AA との複合体全体構造. (B)Val-2AA 認識様式. (C)Val-AMS 認識様式.

3. **LeuRS** LeuRS はイソロイシンおよびメチオニンが反応した誤産物に対して校正反応活性を有する。また tRNA^{Lcu} には特徴的な長いバリアブルアームが存在する。超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* LeuRS 単体, および LeuRS•tRNA^{Lcu} 複合体の X 線結晶構造をそれぞれ 2.1 Å および 3.2 Å 分解能で決定した。LeuRS はアミノアシル化ドメイン, 校正反応ドメイン, C 端ドメインにより包み込むようにして tRNA^{Lcu} を結合していた。tRNA^{Lcu} の結合時には校正反応ドメインが約 20°回転し, tRNA と校正反応ドメインの衝突が回避されていた。LeuRS は C 端ドメイン tRNA^{Lcu} の長いバリアブルアームの先端の塩基を配列特異的に認識していた。さらに変異体解析により C 端ドメインは正しい産物である Ile-tRNA^{Ile} を校正反応基質として認識しないように働いていることも明らかとなった。LeuRS•tRNA^{Lcu} 複合体構造中で tRNA の 3'末端はアミノアシル化ドメインに入っていた。非対称単位中の 2 つの LeuRS•tRNA^{Lcu} 複合体構造間で tRNA の 3'末端の構造および校正反応ドメインの回転状態が異なっており, 一方が"アミノアシル化状態", 他方がそこから"校正反応状態"へ移る途中の段階の"中間状態"を表していると考えられた。"アミノアシル化状態"と"中間状態"とでは認識決定塩基, Ade73 の認識様

式が異なっていた。Ade73 の認識様式の変化をスイッチとして、アミノアシル化反応と校正反応が制御されていることが考えられた。

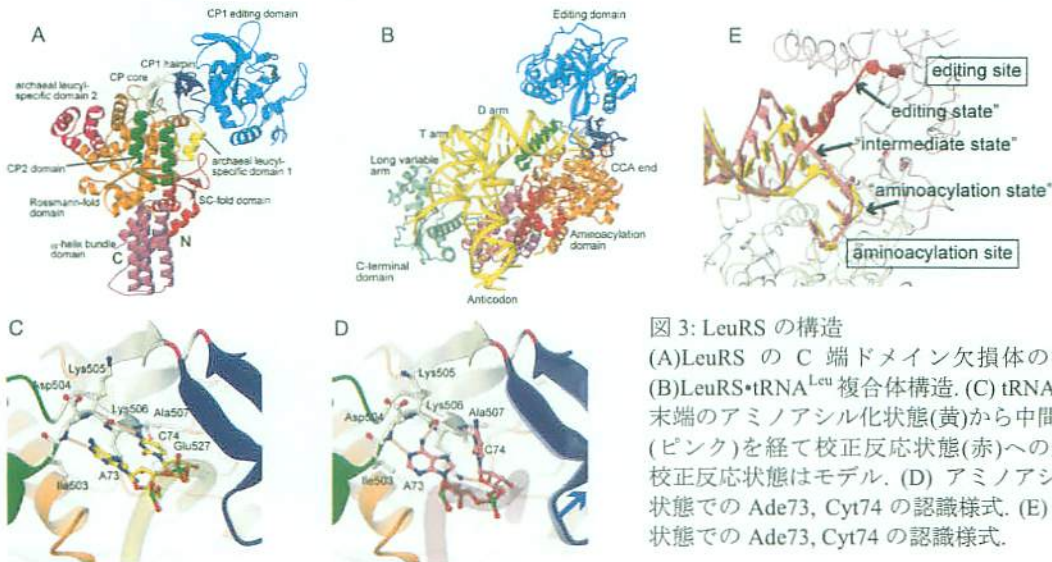


図 3: LeuRS の構造 (A) LeuRS の C 端ドメイン欠損体の構造. (B) LeuRS・tRNA^{Leu} 複合体構造. (C) tRNA の 3' 末端のアミノアシル化状態(黄)から中間状態(ピンク)を経て校正反応状態(赤)への遷移. 校正反応状態はモデル. (D) アミノアシル化状態での Ade73, Cyt74 の認識様式. (E) 中間状態での Ade73, Cyt74 の認識様式.

4. **AlaX** AlaRS はセリンおよびグリシン反応した誤産物に対して校正反応活性を有する。AlaRS の校正反応ドメインのホモログタンパク質である AlaX は Ser-tRNA^{Ala} および Gly-tRNA^{Ala} を加水分解する trans-editing 活性を有する。P. horikoshii AlaX の X 線結晶構造を 2.7Å 分解能で決定した。AlaX は N ドメインと C ドメインの 2 つからなっていた。C ドメインに亜鉛を結合した校正反応活性部位があり、N ドメイン中の保存されたグリシンに富むループ (glycine-rich ループ) がその活性部位近くに位置していた。glycine-rich ループが校正反応の基質認識や触媒に関わっていることが考えられた。AlaX への Ser-tRNA^{Ala} および Gly-tRNA^{Ala} の結合モデルを作成した。

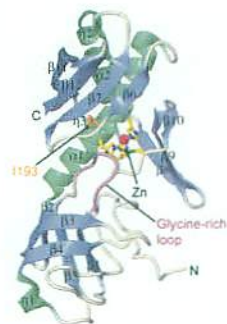


図 4: AlaX の構造

5. **SepRS** システイニル tRNA 合成酵素を欠くメタン生成古細菌においては非標準的な aaRS である SepRS がホスホセリン (Sep) を tRNA^{Cys} に結合させることで Cys-tRNA^{Cys} 合成の中間産物である Sep-tRNA^{Cys} を生成する。Sep-tRNA^{Cys} は別の酵素, SepCysS によって Cys-tRNA^{Cys} に変換される。超好熱古細菌 *Achaeglobus fulgidus* SepRS・tRNA^{Cys}・ホスホセリンの 3 者複合体の X 線結晶構造を 2.6 Å 分解能で決定した。SepRS は N 端伸長領域, アミノアシル化活性ドメイン, 挿入ドメイン, C 端のアンチコドン結合ドメインの 4 つの構造要素からなっていた。SepRS は結晶中でホモ 4 量体を形成し 2 分子の tRNA^{Cys} を結合していた。負電荷を帯びたホスホセリン側鎖がアミノアシル化活性ドメイン中の保存された α-ヘリックスのダイポールモーメントの正の帯電によって認識されていた。SepRS の大きな C 端のアンチコドン結合ドメインが tRNA^{Cys} のアンチコドンループを認識していた。SepRS α₄ 4 量体構

造とフェニルアラニルtRNA合成酵素の $\alpha_2\beta_2\gamma_4$ 量体構造の共通性からこの2つが共通祖先を有することが明らかとなった。構造に基づいてアンチコドン認識部位に変異を導入し、サプレッサーtRNA (tRNA^{Opal} および tRNA^{Amber}) を認識する改変 SepRS を創出した。これはコドン表を拡張しホスホセリンを加え、タンパク質翻訳時にホスホセリンを部位特異的に導入する技術に利用可能である。また改変 SepRS•tRNA^{Opal}•ホスホセリン3者複合体および改変 SepRS•tRNA^{Amber}•ホスホセリン3者複合体のX線結晶構造をそれぞれ3.2 および3.3 Å 分解能で決定し、改変 SepRS によるナンセンスアンチコドンの認識機構を解明した。

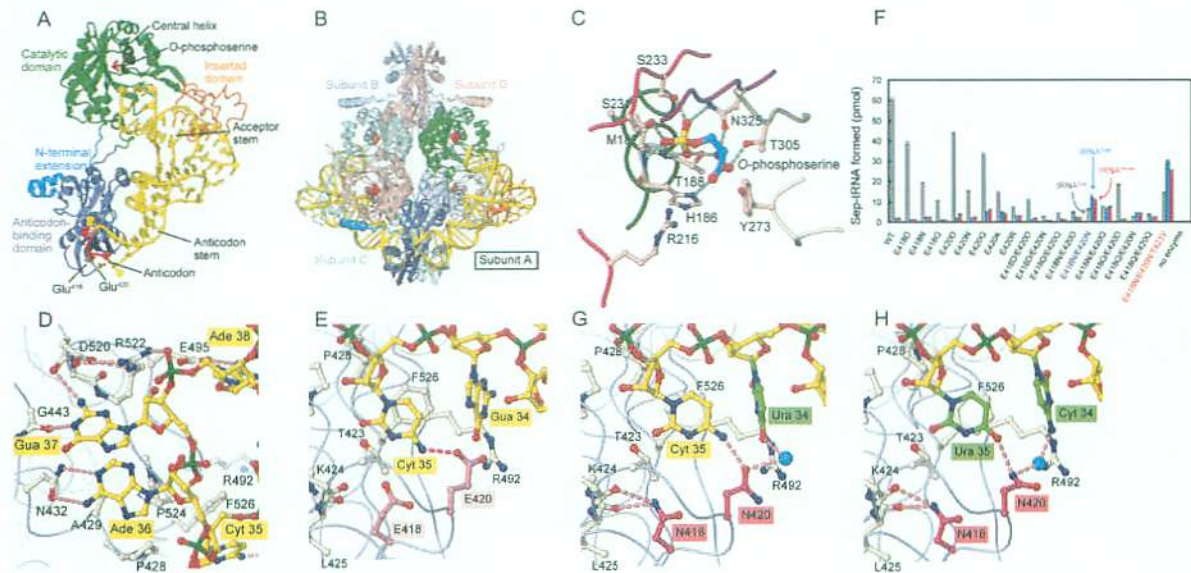


図 5: SepRS の構造

- (A) SepRS•tRNA^{Cys}•ホスホセリン複合体構造.
- (B) SepRS 4 量体構造. 2 分子の tRNA^{Cys} が結合.
- (C) ホスホセリン認識様式.
- (D) Ade36, Gua37 認識様式.
- (E) Gua34, Cyt35 認識様式.
- (F) SepRS の改変. E418N/E420N 変異体および E418N/E420N/T423V 変異体が tRNA^{Amber} および tRNA^{Opal} に対しホスホセリン結合活性を有する.
- (G) SepRS(E418N/E420N)による tRNA^{Opal}の Ura34, Cyt35 認識様式.
- (H) SepRS(E418N/E420N)による tRNA^{Amber}の Cyt34, Ura35 認識様式.

6. **SepCysS** *A. fulgidus* SepCysS の X 線結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定した。SepCysS は結晶中でホモダイマーを形成していた。活性部位ではピリドキサルリン酸がリジン側鎖に共有結合していた。2 量体境界面に存在する活性部位は大きく開いた塩基性のクレフトとなっており、Sep-tRNA^{Cys} を結合するのに都合のよいものとなっていた。SepCysS と Sep-tRNA^{Cys} の結合モデルを作成した。

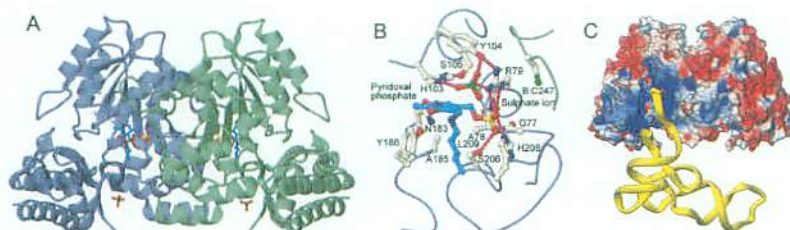


図 6: SepCysS の構造
 (A) SepCysS の 2 量体構造.
 (B) ピリドキサルリン酸結合様式.
 (C) 2 量体 SepCysS 表面電荷モデルへの Sep-tRNA^{Cys} のドッキングモデル.