

論文内容の要旨

論文題目 セレノシステインの合成および組み込み過程の構造基盤

(Structural basis for synthesis of selenocysteine and its incorporation into proteins)

氏名 伊藤 弓弦

セレノシステインは21番目のアミノ酸として知られ、システインの硫黄がセレン (Se) に置き換わったアミノ酸である (図 1) セレノシステインは修飾アミノ酸とは異なり、翻訳の過程でタンパク質に組み込まれる特別なアミノ酸あり、ヒトを含む真核生物、古細菌、細菌に広く存在し、おもに酸化還元酵素の触媒活性部位を形成する。

セレノシステインの tRNA ($tRNA^{Sec}$) は終止コドン UGA に相補的なアンチコドン UCA を有する (図 2)。セレノシステインは複数の酵素の働きにより tRNA 上で合成される (図 3)。セレノシステイン専用のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は存在せず、セリンの aaRS である SerRS が $tRNA^{Sec}$ にセリンを結合してセリル $tRNA^{Sec}$ (Ser- $tRNA^{Sec}$) を合成する。細菌においてはセレノシステイン合成酵素 (SecS) が $tRNA^{Sec}$ 上でセリンをセレノシステインに変換する。真核生物/古細菌においては *O*-ホスホセリル tRNA キナーゼ (PSTK) が $tRNA^{Sec}$ 上でセリンをリン酸化し、Sep-tRNA:Sec-tRNA 合成酵素 (SepSecS) がリン酸化セリンをセレノシステインに変換する。細菌と真核生物/古細菌に共通して、セレノリン酸合成酵素 (SPS) が合成するセレノリン酸がセレンの活性化供与体としてセレノシステイン合成に用いられる。セレノシステインを結合した $tRNA^{Sec}$ (Sec- $tRNA^{Sec}$) には専用の翻訳伸長因子 EF-Sec が結合する。EF-Sec は mRNA のセレノシステイン挿入配列 (SECIS) を認識してリボソーム上の UGA コドンに Sec- $tRNA^{Sec}$ を結合させる。これにより、SECIS に依存した UGA コドンの読み替えが達成され、セレノシステインがタンパク質に組み込まれる。細菌 EF-Sec は単独で Sec- $tRNA^{Sec}$ と SECIS mRNA に同時に結合するが、真核生物/古細菌では SECIS mRNA の結合には別のタンパク質が必要である。

X 線結晶構造解析によりセレノシステインの合成、組み込みを担うタンパク質、RNA の立体構造を決定し、各段階の反応機構や基質特異性を解明することを目的として研究を行った。

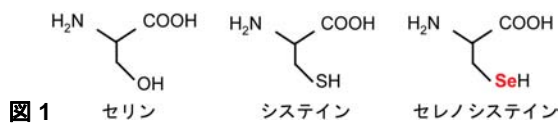


図 1

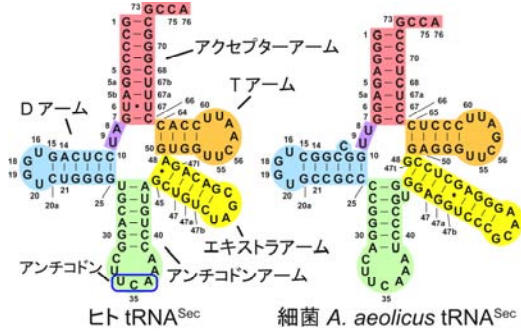


図 2. tRNA^{Sec} の 2 次構造

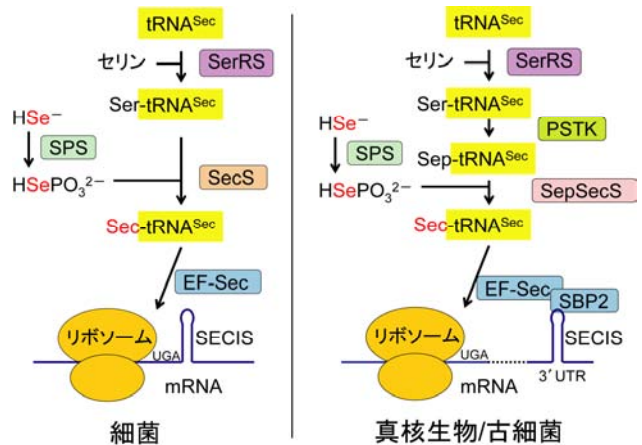


図 3. セレノシスチンの合成と組み込み機構

真核生物（ヒト）の tRNA^{Sec}

tRNA^{Sec} は既知の tRNA 中で最大である。長いエキストラアームはセリンの tRNA (tRNA^{Ser}) と共通であるが、アクセプターステムと T ステムが合計で 13 塩基対(真核生物/古細菌では 9 + 4, 細菌では 8 + 5) で通常の tRNA の 12 塩基対 (7 + 5) より長い (図 2)。また D ステムが通常より長く、D ループは短い。このような特異な 2 次構造のため tRNA^{Sec} の立体構造の予測は困難であった。本研究ではヒトの tRNA^{Sec} の立体構造を決定した (図 4)。全体は L 字構造で通常の tRNA と同様であったが、3 次構造的相互作用は大きく異なっていた。通常の tRNA では D アームを中心に複雑な 3 次構造的相互作用が存在するのに対し、 tRNA^{Sec} の D アームは単純なヘアピン構造で、D ループ・T ループ間の相互作用は存在するが、長い D ステムがアーム間の相互作用に全く寄与せず、その配向は通常の tRNA と異なっていた。

古細菌のセリル tRNA 合成酵素 (SerRS)

SerRS は tRNA^{Ser} と tRNA^{Sec} にセリンを結合する。細菌 SerRS の立体構造と tRNA^{Ser} 認識機構が解明されているが、真核生物 SerRS の立体構造は不明である。本研究では真核生物 SerRS と類似の古細菌 *Pyrococcus horikoshii* SerRS の立体構造を決定した (図 5)。全体構造は細菌 SerRS と同様であった。真核生物/古細菌 SerRS は細菌 SerRS と同様にエキストラアームを中心に tRNA^{Ser} と相互作用すると考えられる。しかし、真核生物/古細菌 SerRS は細菌 SerRS と異なり、 tRNA^{Ser} のアクセプターステムの塩基配列を認識しない。古細菌 SerRS の変異体解析から、 tRNA^{Ser} への特異性はエキストラアームとの強固な相互作用のみにより達成されていることが示唆された。

SerRS と tRNA^{Sec} の複合体

細菌の SerRS・ tRNA^{Ser} 複合体の立体構造により、SerRS の N 末端ドメインと tRNA^{Ser} の長いエキストラアームの相互作用が tRNA^{Ser} 特異性を担うことが明らかになっている。しかし、SerRS が tRNA^{Ser} と tRNA^{Sec} の両方を基質にする分子基盤は不明であった。本研究では古細菌 *Methanopyrus kandleri* SerRS と細菌 *Aquifex aeolicus* tRNA^{Sec} の複合体、および *A. aeolicus* SerRS 単独の立体構造

を決定した (図 6, 7). *M. kandleri* SerRS は異常型 SerRS で, N 末端ドメインの構造が通常と全く異なる. SerRS の N 末端ドメインが tRNA^{Sec} の長いエキストラアームおよび D ループ・T ループ接触面と相互作用を形成していた. これは細菌 SerRS と tRNA^{Ser} の相互作用と同様である. 一方, tRNA^{Sec} のアクセプターアームは SerRS の触媒活性部位から大きく離れていた. 実際には SerRS の N 末端ドメインが動き, アクセプターアームの末端を触媒活性部位に結合すると考えられる. SerRS は tRNA^{Ser} と tRNA^{Sec} に共通の長いエキストラアームを結合し, ドメイン間の柔軟性を利用して, アクセプター-T ステムの長さが異なる tRNA^{Ser} と tRNA^{Sec} の両方を基質にすると考えられる.



図 4. ヒト tRNA^{Sec} 図 5. 古細菌 *P. horikoshii* SerRS



図 6. SerRS•tRNA^{Sec} 複合体の全体構造と tRNA^{Sec} 拡大図

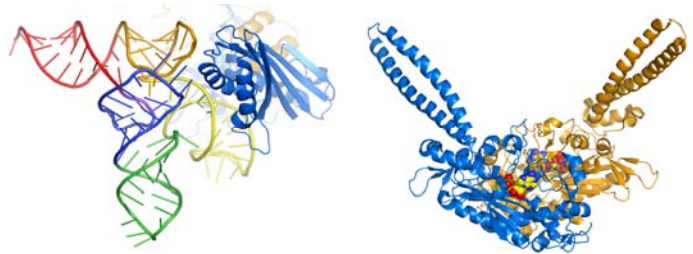


図 7. 細菌 *A. aeolicus* SerRS

O-ホスホセリル tRNA キナーゼ (PSTK) と tRNA^{Sec} の複合体

PSTK は真核生物/古細菌に特有の酵素で, Ser-tRNA^{Sec} をリン酸化する. 細胞内にはセリンを結合した tRNA^{Ser} (Ser-tRNA^{Ser}) が大量に存在するため, Ser-tRNA^{Sec} への特異性は極めて重要であるが, これまでその構造基盤は不明であった. 本研究では古細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* PSTK と *M. kandleri* tRNA^{Sec} の複合体の立体構造を決定した (図 8). PSTK はホモ 2 量体を形成し, サブユニットあたり 1 つの tRNA^{Sec} が結合していた. サブユニットは 2 つのドメインからなり, 触媒活性部位を含む N 末端ドメインが tRNA^{Sec} のアクセプターアームと相互作用していた. C 末端ドメインは tRNA^{Sec} に特徴的な長い D ステムおよび D ループ・T ループ接触面と強固な相互作用を形成しており, この相互作用が Ser-tRNA^{Sec} への特異性を達成すると考えられる.

セレノリン酸合成酵素 (SPS)

SPS はセレン化水素 (H₂Se) に ATP のリン酸基を結合してセレノリン酸を合成する酵素で, 細菌, 真核生物/古細菌において高度に保存されている. セレンと硫黄は性質が類似するため, 両者の区別は困難である. SPS はセレンを厳密に識別できる唯一の酵素で, セレン代謝の起点を担う重要な酵素であるが, その立体構造は不明であった. 本研究では細菌 *A. aeolicus* SPS の立体構造を決定した (図 9). ATP の結合様式は多数の金属イオンを介する特徴的なものであった. SPS は自身にセレノシステイン残基 (Sec13) を有し, 変異体解析により Sec13 が活性に必須であることが明らかになった. Sec13 がセレン化水素の結合および ATP と反応を担うと考えられる.



図 8. PSTK•tRNA^{Sec} 複合体の全体構造と tRNA^{Sec} 拡大図



図 9. SPS 全体構造

セレノシステイン合成酵素 (SecS)

SecS は細菌固有の酵素で、セレノリン酸を用いて tRNA 上でセリンをセレノシステインに変換する。SecS は分子量 500 kDa に達する巨大なホモ 10 量体を形成するため構造解析が困難であり、その立体構造は不明であった。また、PSTK と同様、大量に存在する Ser-tRNA^{Ser} を基質とせず、Ser-tRNA^{Sec} のみを特異的に結合する構造基盤は極めて重要である。本研究では細菌 *A. aeolicus* の SecS の立体構造を決定した (図 10)。SecS は 5 つの 2 量体単位が環状に配列してホモ 10 量体を形成していた。また、tRNA^{Sec} との複合体の構造を低分解能で決定した (図 11)。SecS のホモ 10 量体に 10 個の tRNA^{Sec} が結合し、分子量 800 kDa を超える巨大複合体を形成していた。SecS の N 末端ドメインが tRNA^{Sec} の特徴的な D アームと相互作用しており、これが tRNA^{Sec} への特異性を達成していると考えられる。1 つの tRNA^{Sec} に対する結合面と触媒活性部位が、SecS の 4 つのサブユニットにまたがっており、SecS が多量体化する意義が明らかになった。

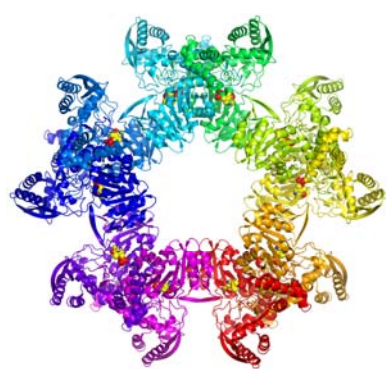


図 10. SecS 全体構造



図 11. SecS•tRNA^{Sec} 複合体の全体構造と tRNA^{Sec} 拡大図



図 12. 細菌 EF-Sec 全体構造

細菌のセレノシステイン特異的翻訳伸長因子 (EF-Sec)

細菌の EF-Sec は Sec-tRNA^{Sec} と SECIS mRNA に同時結合して Sec-tRNA^{Sec} をリボソームに運ぶ。細菌 EF-Sec の C 末端側の部分構造は知られていたが、全体の立体構造は不明であった。本研究では、細菌 *A. aeolicus* EF-Sec の立体構造を決定した (図 12)。EF-Sec の N 末端側の 3 つのドメインは Sec-tRNA^{Sec} を、C 末端側の 4 つのドメインが mRNA 結合を担う。EF-Sec の全体構造に基づき、EF-Sec とリボソームの相互作用、およびリボソーム上での Sec-tRNA^{Sec} と SECIS mRNA の位置関係を推定した。