

論文の内容の要旨

論文題目 アラニル tRNA 合成酵素による G:U 塩基対依存的 tRNA 選択機構
の構造基盤

(Structural basis for the G:U base pair dependent tRNA selection mechanism of
alanyl-tRNA synthetase)

氏名 永沼 政広

DNA 上にはさまざまなタンパク質のアミノ酸配列が暗号化されており、3 つ組の塩基配列(コドン)が 1 アミノ酸残基に一致する。20 種の標準型アミノ酸にはそれぞれ対応する tRNA が存在し、コドンとアミノ酸残基を対応付ける仲介役となっている。20 種のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS)が対応しあうアミノ酸と tRNA を正確に認識し、アミノアシル tRNA を生成する(アミノアシル化)。このように、aaRS はコドン-アミノ酸残基の対応付けにおいて重要な触媒反応を担っている。そのために、厳密なアミノ酸や tRNA 認識の保障機構を備えている。tRNA は L 字型の三次構造を持つ分子であり、その塩基配列には構造的特徴を持つアイデンティティ塩基配列がある。アイデンティティ塩基配列は多くの場合アクセプターアームやアンチコドン配列などに複数点在し、それらが協調して aaRS に選択されるための目印となっている。

アラニンの tRNA (tRNA^{Ala})のアイデンティティ決定因子はアクセプターステムの中心にある G3:U70 塩基対であり、アラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS)によって認識される。AlaRS は U70 塩基を C70 塩基に置換した tRNA^{Ala}をアミノアシル化できず、G3:U70 を導入した非対応型の tRNA をアミノアシル化できるようになる。これは tRNA^{Ala}のアイデンティティは 1 つの塩基対によって強く支配されることを表している。

AlaRS は N-末端側からアミノアシル化、“tRNA 認識”、“校正反応”、二量体化ドメインの 4 つの機能ドメインから構成される。現在までにアミノアシル化-tRNA 認識ドメインと基質になるアミノ酸を含む断片の結晶構造が報告され、アミノアシル化活性部位によるアミノ酸認識様式は解明された。しかしながら、AlaRS がどのように tRNA^{Ala}と相互作用し、G3:U70 塩基対を認識しているのかは不明なままである。

本研究では、まず AlaRS をアミノアシル化、“tRNA 認識”、“校正反応”ドメインから構成される断片

(AlaRS- Δ C)と二量体化ドメインの断片(AlaRS-C)へ2断片化し、それぞれの結晶構造を決定した。AlaRS- Δ Cの構造から校正反応ドメインはアミノアシル化ドメインに対して、既知のaaRS構造におけるものとは異なる位置に配置されていることが明らかになった。また、AlaRS-Cはヘリックスルーパーヘリックス(HLH)のC末端側に球状のサブドメインを持つ構造だった。さらにHLHはロイシンジッパー様構造を形成して二量体化していた。AlaRS- Δ C及びAlaRS-Cの構造から二量体全長AlaRSの構造モデルを提唱した。次に、AlaRS•tRNA^{Ala}複合体を結晶化し、得られたX線回折データを基にAlaRS- Δ C及びAlaRS-Cの構造を用いた分子置換法で位相を求め、AlaRS•tRNA^{Ala}複合体の結晶構造を解明した(図1)。

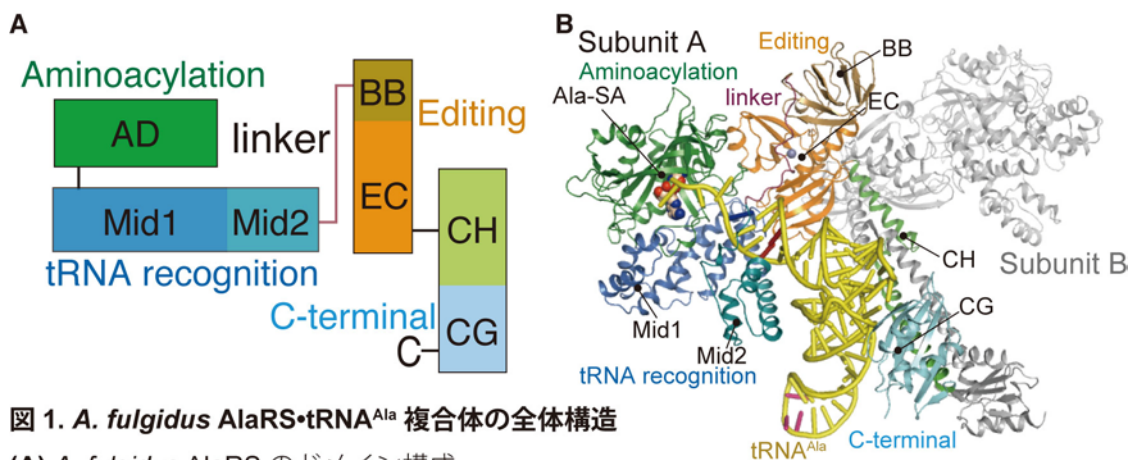


図1. *A. fulgidus* AlaRS•tRNA^{Ala} 複合体の全体構造

(A) *A. fulgidus* AlaRS のドメイン構成。

(B) *A. fulgidus* AlaRS•tRNA^{Ala} 複合体構造のリボンモデル。

略語：Aminoacylation domain, AD; β -barrel subdomain,

BB; Editing core subdomain, EC; C-terminal helical subdomain, CH; C-terminal globular subdomain, CG.

AlaRS•tRNA^{Ala} 複合体の構造解析により、AlaRSによるtRNA^{Ala}との相互作用を特定し、G3:U70塩基対認識に依存するtRNA^{Ala}選択機構を明らかにした。AlaRSはC末端ドメイン間の相互作用によって二量体化していた。tRNA^{Ala}はAlaRS二量体に対して一つ結合し、他のaaRS•tRNA複合体には見られない独特な結合様式でAlaRSによって取り囲まれていた。tRNA^{Ala}のアクセプターステムは、tRNA認識ドメインによって主溝、副溝の両側からしっかりと挟みまれ、L字型の肩をC末端ドメインに押さえられていた。この時、tRNA認識ドメインは構造変化を伴っていた(図1B&2)。

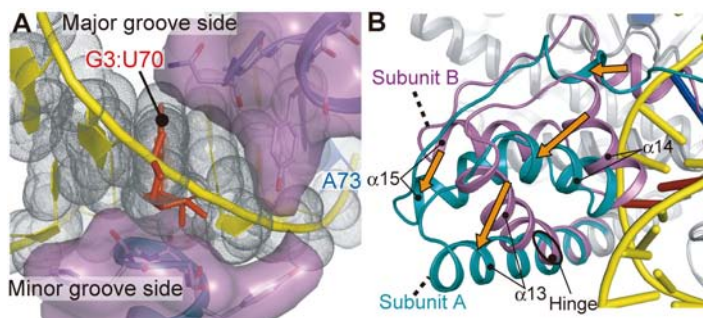


図2. アクセプターステムの認識

(A) tRNA認識ドメインによって挟み込まれたアクセプターステム。

(B) tRNA認識ドメインの構造変化。

G3とU70は非対称的な塩基対を形成しており、主溝側にU70の4-カルボニル基、副溝側にG3の2-アミノ基が水素結合を作らずに突き出していて、tRNA認識ドメインに保存されたアミノ酸残基Asn359とAsp450がそれぞれ相互作用していた(図3)。

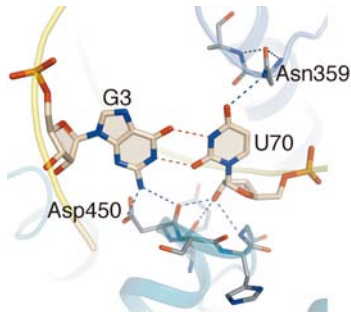


図3. G3:U70塩基対の認識

次に、野生型のAlaRSとG3:U70塩基対をA3:U70塩基対に置換したtRNA^{Ala}(tRNA^{Ala}/AU)との複合体構造を分解能4Åで決定した。この複合体は不活性型の構造をとっていることが期待される。この不活性型複合体構造において、野生型複合体構造と比較するとアクセプターステム全体の配置がわずかにずれていた(図4)。

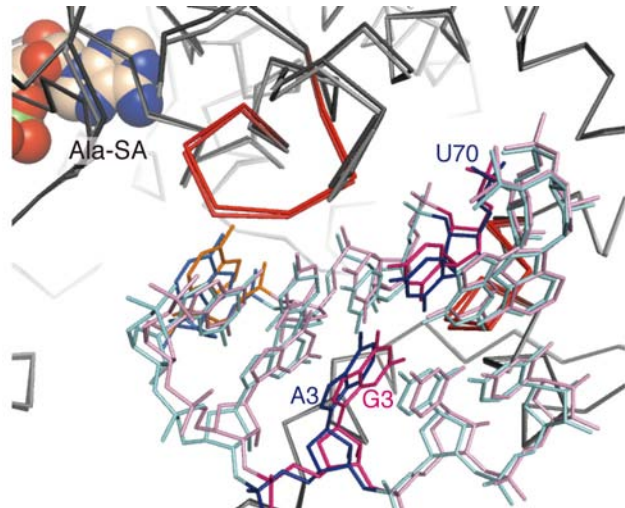


図4. G3:U70塩基対とA3:U70塩基対の比較

野生型tRNA^{Ala}のG3とU70をマゼンタ、A73をオレンジ、その他をピンクで示した。tRNA^{Ala}/AUのA3とU70を濃青、A73を青、その他を水色で示した。

さらに、Asn359やAsp450の役割を確かめるために変異体の活性測定を行った。Asn359やAsp450をアラニン置換(N359A, D450A)したが、アミノアシル化活性にはあまり影響しなかった(図5A)。しかし、D450AはG3:U70をワトソン-クリック型塩基対に置換したtRNAを野生型AlaRSに比べて効率的にアミノアシル化した(図5B)。

以上の結果から、AlaRSは非対称的なG3:U70塩基対を正しく配置することでその近くにある3'-末端をアミノアシル化でき、一方で対称的なワトソン-クリック型塩基対を持つアクセプターステムに対してはその結合の配置をずらすことによって3'-末端のアミノアシル化を回避することが示唆された。また、Asp450はC71リボースの2'-水酸基とも相互作用しており、D450A変異体ではアクセプターステムの結合の自由度が増したためにtRNA^{Ala}/AUをアミノアシル化すると考えられる。AlaRSはアクセプターステムを主溝、副溝の両側からしっかりと挟み込み、非対称的なG3:U70塩基対を正しい位置に厳密に配置することで排他的にtRNA^{Ala}を選択していた。

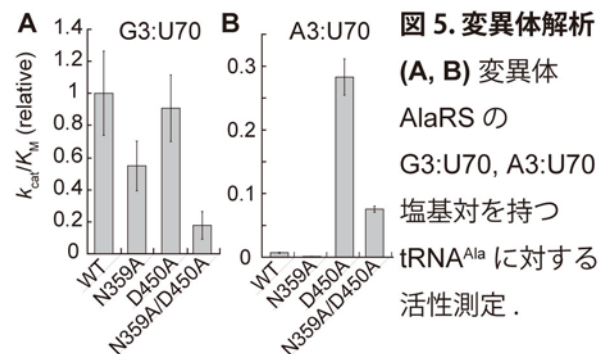


図5. 変異体解析 (A, B) 変異体AlaRSのG3:U70, A3:U70塩基対を持つtRNA^{Ala}に対する活性測定。