

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝暗号翻訳マシナリーの構造基盤の解明
(X-ray crystallographic analysis of translational machinery)

氏名 野澤 佳世

背景

生体内において、遺伝暗号翻訳の正確性は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) が tRNA に特異的なアミノ酸を付加させることによって保たれている。L 字型立体構造をした tRNA は mRNA 上のコドンとアミノ酸を対応させるアダプターとして働き、そのアンチコドンでコドンと塩基対を形成し、CCA 末端に aaRS が付加した特異的なアミノ酸を結合している。通常、遺伝情報を規定する

64 種類のコドンはそれぞれ、20 種類のアミノ酸をコードしており、対応する tRNA も aaRS も存在しない 3 つの終止コドン UAG (amber)、UGA (opal)、UAA (ochre) においては翻訳反応が終結する。しかし非常にまれに、これらの終止コドンはサプレッサー tRNA と呼ばれる特殊な tRNA によってアミノ酸へと読み替えられる (リコーディング)。メタン古細菌と一部の真正細菌に存在する 22 番目のアミノ酸ピロリジン (Pyl) は、amber 終止コドンにコードされる例外的なアミノ酸であり、専用の aaRS であるピロリジル tRNA 合成酵素 (PylRS) によってサプレッサー tRNA^{Pyl} に直接転移され、翻訳される (図 1)。このことから PylRS は、終止コドンに対応する tRNA を認識し、そこに嵩高い Pyl を転移させる

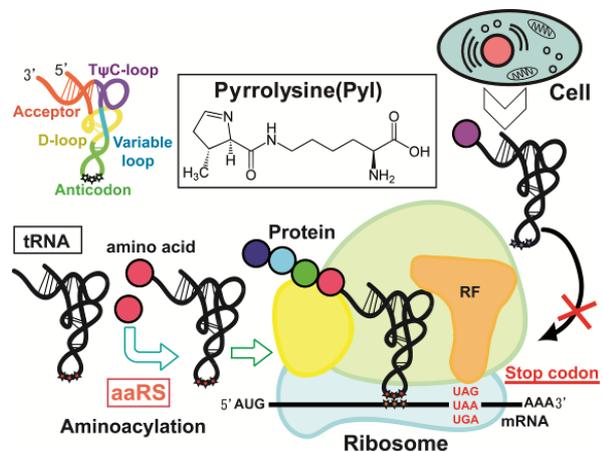


図 1 Pyl 翻訳過程の模式図

aaRS としては他に例を見ない酵素と言える。また興味深いことに、その tRNA^{Pyl} も tRNA の共通配列の多くを欠いており (Theobald-Dietrich *et al.*, 2004, Watanabe *et al.*, 1994)、これまでにこのように終止コドン翻訳のために構造全体が特殊化したサプレッサー tRNA の構造は報告されておらず、こうした特殊な tRNA がどのようにして PylRS に認識され、リボソームで機能するかは不明だった。近年、PylRS を利用して天然には存在しない全く新しいアミノ酸 (蛍光ラベルや光クロスリンク修飾を受けたアミノ酸) をタンパク質に組み込み、工学や医学に有用な人工タンパク質を合成する試みが行われている (Mukai *et al.*, 2008)。こうしたタンパク質工学にとっても、PylRS が他のアミノアシル化反応に干渉せず終止コドンに直接アミノ酸を導入できる機構 (直交性の機能) の解明が、長い間待たれていた。

DhPylRS・DhtRNA^{Pyl} 複合体の X 線結晶構造解析と機能解析

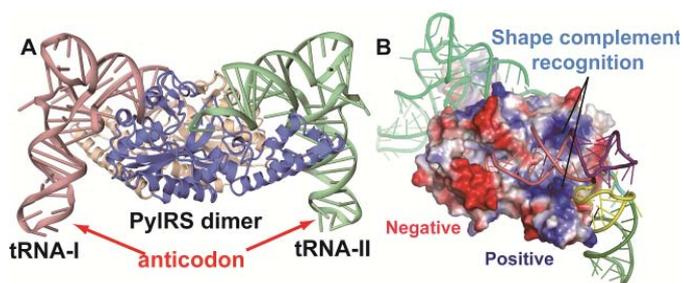


図 2 DhPylRS・DhtRNA^{Pyl} 複合体の結晶構造

本研究では、aaRS の中でも最小単位長 (288 アミノ酸) にあたる真正細菌 *Desulfitobacterium hafniense* 由来 PylRS (DhPylRS) と tRNA^{Pyl} (DhtRNA^{Pyl}) をターゲットとして、その単体構造、DhtRNA^{Pyl} との複合体構造をそれぞれ 2.5 Å, 3.1 Å の分解能で決

定した (図 2)。結晶構造中で DhPylRS は二量体を形成しており、それぞれの分子が DhtRNA^{Pyl} を認識していた。特記すべきことに DhPylRS・DhtRNA^{Pyl} 間の結合の多くは、塩基性側鎖と tRNA のリン酸骨格の間に形成された広範囲な非特異的静電相互作用であり、aaRS の tRNA 認識アイデンティティであるアンチコドンの認識はなく、通常見られる塩基特異的な相互作用もほとんどなかった。複合体を構成する DhtRNA^{Pyl} を見てみると、驚くべきことに、特殊な配列を持つにもかかわらず、DhtRNA^{Pyl} はリボソームで働きうる L 字型構造とアクセプター、アンチコドンの位置関係を保障しつつ、異常にコンパクトなコア構造を持っていた (図 3)。DhPylRS はこの DhtRNA^{Pyl} のコンパクトなコア構造にぴったりとはまり込むように結合することで、形状相補的にサプレッサー tRNA^{Pyl} を他の tRNA から識別していることが示唆された。DhtRNA^{Pyl} はこの特徴的なコア構造を作り出すために短い D ループ、可変ループ、T_ψC ループを密にフォールディングさせると同時に、1 塩基対長いア

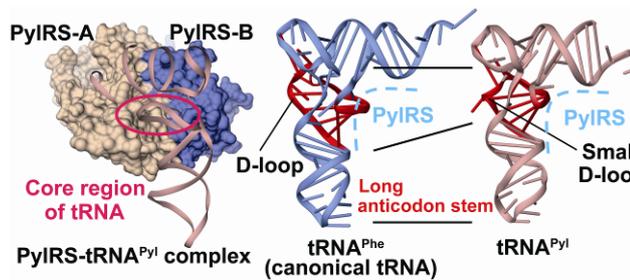


図 3 tRNA^{Phe} と DhtRNA^{Pyl} のコア構造

ンチコドンシステムを持つことで、高次構造上でアンチコドンが引き上げられてしまうのを埋め合わせていた。こうして DhPylRS は普遍的な tRNA として機能するための構造と他のアミノアシル化反応に干渉しない直交性を生み出す特徴的な構造を併せ持っていた。また、通常 aaRS は tRNA のアクセプターステムを副溝側から認識するクラス I aaRS と主溝側から認識するクラス II aaRS に分けられるが、DhPylRS はそのどちらとも異なり、コア領域に沿って正面から tRNA を結合していた (図 4)。このことから、DhPylRS は塩基特異的な相互作用をほとんど伴わずに tRNA を正面から結合することで、最小単位長で機能する、aaRS としては全く新規な酵素であることが示唆された。また本研究では最終的に、構造解析に用いた DhPylRS が *in vitro*、*in vivo* において直交性を持って機能することを検証した。*in vitro* におけるアミノ酸転移実験では、DhPylRS は他のセンスコドンに対応する tRNA が存在している条件であっても DhPylRS 特異的にアミノ酸転移反応を行うことが示唆された。加えて、トリプトファン合成酵素遺伝子 (TrpA) にアンバー終止コドンを導入して作成した大腸菌の遺伝子欠損株の生育を DhPylRS、DhPylRS 遺伝子で相補させた *in vivo* アミノ酸転移実験においても DhPylRS は生体内で問題なく機能することが確かめられた。以上の実験結果から、DhPylRS は形状相補的にサブレッサー DhPylRS を認識することで直交性を維持して機能していることが明らかとなった (Nozawa *et al.*, 2009)。

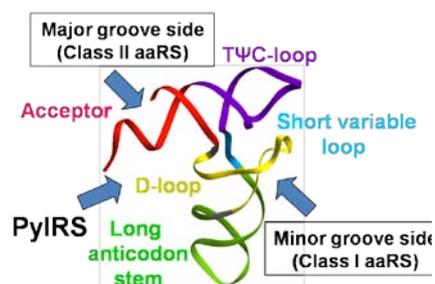


図 4 PylRS による tRNA^{Pyl} の認識

背景

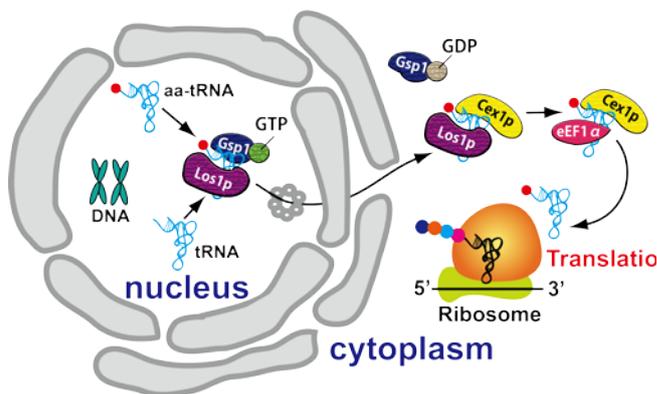


図 4 tRNA の核外輸送模式図

一方、すべての真核生物において遺伝暗号をタンパク質へ変換する tRNA は、核膜で隔てられた転写と翻訳の過程を空間的にリンクさせる分子でもある。ゲノムから転写された tRNA は、核内でプロセッシング、化学修飾、アミノ酸の付加を受けて成熟し、RanGTPase/Gsp1p とカップルした exportin-t (酵母では Los1p) や exportin-5 (酵母では Msn5p) といった専用の核外輸送体の働きで、細胞質のタンパク質合成系に送られる (図 4)。しかしこの時、Los1p は tRNA のプロセッシングやアミノ酸の有無に関係なく翻訳に不完全な tRNA をも輸送してしまうことが示唆されている (Steiner-Mosonyi and Mangroo, 2004)。近年の研究により、酵母の

Cex1p は核外輸送体からアミノアシル化された tRNA (aa-tRNA) を特異的に受け取り、翻訳伸長因子 eEF-1 α に受け渡すチャネリング機構を担うことが示唆された (Mcguire and Mangroo, 2007)。これは tRNA の核外輸送の過程で転写後、成熟した aa-tRNA だけが選択されて翻訳のマシナリーに運ばれる正確性の機構の中で Cex1p が重要な役割を果たしていることを示唆している。また、高等真核生物における Cex1p のホモログはテロメラーゼの発現制御 (Zhao *et al.*, 2005) や有糸分裂における中心体の分配 (Gong *et al.*, 2009)、脳神経タンパク質のネットワーク形成 (Schmidt *et al.*, 2007) など多岐にわたる高次生命現象に関わっている点で非常に重要である。

Cex1p の X 線結晶構造解析と機能解析

本研究ではプロテアーゼによる限定分解、生物種間の相同性を指標に Cex1p のディスオーダー部分を除去し、表面に露出したフレキシブルな残基に変異を導入する Surface Entropy Reduction 法を用いることで、その構造を 2.3Å の分解能で決定した (図 5)。構造解析から Cex1p はキナーゼ様ドメインと helix-loop-helix が帯状に 6 回連なった HEAT リピートで構成されていることが明らかとなった。既知構造との構造類似性の比較から Cex1p のキナーゼ様ドメインは受容体チロシンキナーゼの一つ RET キナーゼ (Knowles *et al.*, 2006) と似たコンフォメーションをとることが示唆されたが、Cex1p のキナーゼ様ド

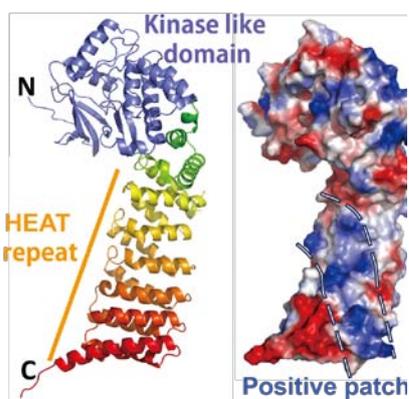


図 5 Cex1p の全体構造

メインは自己リン酸化に必要な A ループと ATP 結合ポケットを欠いており、不活性であることが示された。また、Cex1p を構成する HEAT リピートはタンパク質間の相互作用に重要なモチーフであり、Cex1p の表面電荷をしてみると、この領域が正電荷を帯びたパッチを形成していた。こうした構造は多くの核外受容体の tRNA の結合部位にも見られる特徴であり、Cex1p 変異体を用いた tRNA 結合実験からもその重要性が示唆された。これらの研究結果から、Cex1p が HEAT リピートを用いて tRNA のチャネリングを行う可能性が示唆された。