

学 位 論 文 題 名

Structural and functional analysis of tRNA-dependent amidotransferase GatCAB

(tRNA 依存アミド基転移酵素 GatCAB の構造機能解析)

学位論文内容の要旨

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は、20 種のアミノ酸と対応する tRNA を正しく結合させてアミノアシル tRNA を生成する。フランシス・クリックによるアダプター仮説の提唱以来、aaRS は 20 種類のアミノ酸に対応し 20 種類存在すると思われてきた。しかし、様々なゲノム解析の結果、古細菌と多くの真正細菌にはグルタミンとそれに対応する tRNA (tRNA^{Gln}) を結び付けるグルタミル tRNA 合成酵素 (GlnRS) が存在しないことが明らかになった。これらの生物では、誤った組み合わせの $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ を一旦合成し、その後アミド基転移酵素 (Glu-AdT) の働きにより、正常な $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ に変換する。 Glu-AdT による $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ の合成は 3 種類の反応で行われる。 Glu-AdT は誤って対合した $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ のみを正しく識別し、ATP を用いたリン酸化反応により $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ を活性化する。次いで、アンモニアを用いたアミド基転移反応により、活性化した $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ を $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ に変換する。興味深いことに、 Glu-AdT はアミド基転位反応に用いるアンモニアをグルタミンの加水分解反応により生成している。 Glu-AdT は、これらの反応を正確に制御することにより厳密な校正反応を行う。真正細菌の Glu-AdT は GatC , GatA , GatB の 3 つのサブユニットからなり (GatCAB)、古細菌では GatD , GatE の 2 つのサブユニットからなる (GatDE)。アミノアシル化反応において、別生物種で異なる反応経路が使われることも、また異なる分子が関与することも、他には例がなく大変興味深い現象である。本酵素の構造機能解析は、遺伝暗号の起源という生命の誕生に直接関わる重要なイベントに構造生物学の基盤を与えるものとして大変重要である。

本研究では、黄色ブドウ球菌由来 GatCAB の大量調製系を構築後、結晶化を行い、 GatCAB の立体構造を 2.5 Å 分解能で決定することに成功した。さらに、グルタミン加水分解反応の基質である Gln との複合体の立体構造解析を行い、 GatA に存在するグルタミン加水分解反応

サイトを特定することに成功した。また ADP と GatCAB の複合体の立体構造解析にも成功し、GatB のリン酸化・アミド基転移反応サイトを同定した。同定した GatA と GatB の 2 つの反応サイトは、お互いの反応がカップリングしているにもかかわらず 30Å も離れていた。しかし、本研究では 2 つのサイトが分子内のチャンネルで連結していることを明らかにし、このチャンネルがアンモニアの輸送を担うアンモニアチャンネルであると提唱した。さらに、GatCAB および基質である tRNA^{Gln} の変異体を作成し結合実験を行い、GatB の C 末端ドメインが tRNA^{Gln} 認識に重要であること、および GatCAB が tRNA^{Gln} の U1-A72 base pair と D-loop を認識していることを明らかにした。しかし、認識に重要である GatB の C 末端ドメインの電子密度が観察出来ないなど、GatCAB の詳細な tRNA^{Gln} 認識機構の解明には至らなかった。

その後、本研究では GatCAB の結晶化条件の最適化を続けることで、最終的に GatCAB の立体構造を 1.9Å 分解能で決定し、唯一モデル構築が出来なかった GatB の C 末端ドメインの立体構造を明らかにすることに成功した。この C 末端ドメインには真正細菌で高く保存された Lys-rich loop が存在し、tRNA 認識に関与することが変異体解析によって明らかになった。より詳細な tRNA 認識機構を議論するために、すでに構造解析が行われている古細菌型 Glu-AdT である GatDE と tRNA^{Gln} 複合体の立体構造情報を用い、GatCAB/tRNA^{Gln} 複合体モデルを作成した。また、小角 X 線散乱により作成した複合体モデルの妥当性を評価した。作成した複合体モデルと一次構造比較から、GatB に存在する 3₁₀ ターンが tRNA^{Gln} の U1-A72 base pair を認識することが示唆された。その後、3₁₀ ターンの変異体を調製し活性測定を行ったところ、野生型の GatCAB は厳密に U1-A72 base pair の tRNA のみを認識するのに対し、3₁₀ ターン変異体は tRNA 認識が緩くなり、G1-C72 base pair の tRNA にも活性を示した。以上の結果から、GatCAB は GatB の 3₁₀ ターンと C 末端ドメインの Lys-rich loop の 2 カ所で tRNA^{Gln} を厳密に認識していることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中	勲
副査	教授	小布施	力史
副査	教授	綾部	時芳
副査	准教授	姚	関

学位論文題名

Structural and functional analysis of tRNA-dependent amidotransferase GatCAB

(tRNA 依存アミド基転移酵素 GatCAB の構造機能解析)

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は、20 種のアミノ酸と対応する tRNA を正しく結合させてアミノアシル tRNA を生成する。フランシス・クリックによるアダプター仮説の提唱以来、aaRS は 20 種類のアミノ酸に対応し 20 種類存在すると思われてきた。しかし、様々なゲノム解析の結果、古細菌と多くの真正細菌にはグルタミンとそれに対応する tRNA (tRNA^{Gln}) を結び付けるグルタミニル tRNA 合成酵素 (GlnRS) が存在しないことが明らかになった。これらの生物では、誤った組み合わせの Glu-tRNA^{Gln} を一旦合成し、その後アミド基転移酵素 (Glu-AdT) の働きにより、正常な Gln-tRNA^{Gln} に変換する。Glu-AdT による Gln-tRNA^{Gln} の合成は 3 種類の反応で行われる。Glu-AdT は誤って対合した Glu-tRNA^{Gln} のみを正しく識別し、ATP を用いたリン酸化反応により Glu-tRNA^{Gln} を活性化する。次いで、アンモニアを用いたアミド基転移反応により、活性化した Glu-tRNA^{Gln} を Gln-tRNA^{Gln} に変換する。興味深いことに、Glu-AdT はアミド基転位反応に用いるアンモニアをグルタミンの加水分解反応により生成している。Glu-AdT は、これらの反応を正確に制御することにより厳密な校正反応を行う。真正細菌の Glu-AdT は GatC, GatA, GatB の 3 つのサブユニットからなり (GatCAB)、古細菌では GatD, GatE の 2 つのサブユニットからなる (GatDE)。アミノアシル化反応において、別生物種で異なる反応経路が使われることも、また異なる分子が関与することも、他には例がなく大変興味深い現象である。本酵素の構造機能解析は、遺伝暗号の起源という生命の誕生に直接関わる重要なイベントに構造生物学の基盤を与えるものとして大変重要である。

本研究では、黄色ブドウ球菌由来 GatCAB の大量調製系を構築後、結晶化を行い、GatCAB の立体構造を 2.5 Å 分解能で決定することに成功した。さらに、グルタミン加水分解反応の基質である Gln との複合体の立体構造解析を行い、GatA に存在するグルタ

ミン加水分解反応サイトを特定することに成功した。また ADP と GatCAB の複合体の立体構造解析にも成功し、GatB のリン酸化・アミド基転移反応サイトを同定した。同定した GatA と GatB の 2 つの反応サイトは、お互いの反応がカップリングしているにもかかわらず 30Å も離れていた。しかし、本研究では 2 つのサイトが分子内のチャンネルで連結していることを明らかにし、このチャンネルがアンモニアの輸送を担うアンモニアチャンネルであると提唱した。さらに、GatCAB および基質である tRNA^{Gln} の変異体を作成し結合実験を行い、GatB の C 末端ドメインが tRNA^{Gln} 認識に重要であること、および GatCAB が tRNA^{Gln} の U1-A72 base pair と D-loop を認識していることを明らかにした。しかし、認識に重要である GatB の C 末端ドメインの電子密度が観察出来ないなど、GatCAB の詳細な tRNA^{Gln} 認識機構の解明には至らなかった。

その後、本研究では GatCAB の結晶化条件の最適化を続けることで、最終的に GatCAB の立体構造を 1.9Å 分解能で決定し、唯一モデル構築が出来なかった GatB の C 末端ドメインの立体構造を明らかにすることに成功した。この C 末端ドメインには真正細菌で高く保存された Lys-rich loop が存在し、tRNA 認識に関与することが変異体解析によって明らかになった。より詳細な tRNA 認識機構を議論するために、すでに構造解析が行われている古細菌型 Glu-AdT である GatDE と tRNA^{Gln} 複合体の立体構造情報を用い、GatCAB/tRNA^{Gln} 複合体モデルを作成した。また、小角 X 線散乱により作成した複合体モデルの妥当性を評価した。作成した複合体モデルと一次構造比較から、GatB に存在する 3₁₀ ターンが tRNA^{Gln} の U1-A72 base pair を認識することが示唆された。その後、3₁₀ ターンの変異体を調製し活性測定を行ったところ、野生型の GatCAB は厳密に U1-A72 base pair の tRNA のみを認識するのに対し、3₁₀ ターン変異体は tRNA 認識が緩くなり、G1-C72 base pair の tRNA にも活性を示した。以上の結果から、GatCAB は GatB の 3₁₀ ターンと C 末端ドメインの Lys-rich loop の 2 カ所で tRNA^{Gln} を厳密に認識していることが明らかになった。

以上、本研究では、X 線結晶構造解析により、tRNA 依存アミド基転移酵素 GatCAB の構造・機能を解明し、遺伝暗号の起源と進化について重要な構造科学的基盤を与えた。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。