

論文内容要旨 (和文)

氏 名 横澤 潤二



超好熱好気性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来プロリル-tRNA

論 文 題 目 合成酵素によるプロリン tRNA の分子認識機構

[背景、目的]

タンパク質合成は全ての生物に備わる最も基本的かつ起源の古いと考えられる生命反応である。アミノアシル-tRNA 合成酵素 (ARS) と tRNA は遺伝暗号を対応するタンパク質配列に変換する「翻訳」に直接関わる分子種であり、ARS は対応するアミノ酸種 tRNA とアミノ酸のみを正しく認識してアミノアシル化すると同時に、他のアミノ酸種 tRNA とアミノ酸を厳密に識別する。この分子機構 (tRNA アイデンティティ) は翻訳の正確さを最も左右し、従って ARS と tRNA は生命誕生初期の分子種の一つと考えられている。従って tRNA アイデンティティの解明は生体分子進化を考えるうえで有用な研究の一つと言える。tRNA アイデンティティは大腸菌の系ではほぼ解明されており、真核生物もある程度研究が進んでいるが、古細菌についての報告例は少ない。古細菌のプロリン tRNA の構造は、真正細菌と真核生物の両方の特徴を併せ持ち、*Methanococcus jannaschii* ではプロリル-tRNA 合成酵素 (ProRS) がシステイン tRNA をもアミノアシル化すること、また真核生物には ProRS 遺伝子の一部がグルタミル-tRNA 合成酵素の遺伝子と重複しているものがあることなどから、プロリン tRNA アイデンティティは三生物界の分子進化を考える上で興味深い。そこで日本で発見され、全ゲノム配列が解明された超好熱好気性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 のプロリン tRNA アイデンティティを解明し、三生物界の分子進化を考察することを目的に研究を進めてきた。

[実験方法]

A. pernix の ProRS 遺伝子をクローニングし大腸菌内で大量発現させ、プロリル化活性を有する野生型および 6xHis タグ融合型 ProRSAP を精製することに成功した。その ProRSAP-N-His の諸性質 (活性温度、pH、熱安定性) を [^{14}C] Pro を用いたプロリル化アッセイにより求めた後、認識部位を探る実験に必要な野生型及び各種変異体プロリン tRNA を T7 RNA ポリメラーゼによる試験管内転写により作製し、PAGE により精製して得た。それらを用いたプロリル化アッセイを行い、野生型と変異体プロリン tRNA のプロリン受容能を比較検討して認識部位を決定した。

[結果及び考察]

クラス II ARS に属する ProRS はアミノ酸配列の特徴から、連続したモチーフ 1、2、3 と C-末端側のアンチコドン結合ドメインとの間に 180 残基程度の内部ドメインがある Bacteria-like タイプと、C-末端に 80 残基程度の C-末端ドメインのある Eukaryote/Archaea-like タイプの 2 つのグループに分けられる。*A. pernix* ProRS (ProRSAP) もその配列相同性から eukaryote/archae-like タイプに属しており、そのアミノ酸配列は真核生物よりと言える。この傾向がプロリン tRNA アイデンティティにも当てはまるのか興味を持たれたので、*A. pernix* と大腸菌及び酵母の野生型及び変位型プロリン tRNA のプロ



リル化アッセイを行った。その結果、ProRSAP によるプロリン tRNA の認識部位はアンチコドンの G35、G36 とすぐ隣の G37、アクセプター末端塩基対の G1 と C72、そして識別位塩基と呼ばれる位置の A73 であることが解った。

大腸菌では C1-G72 塩基対の G72 が単独で強い認識部位であるのと報告されていたのに対し、*A. pernix* では G1-C72 塩基対全てが強く認識されていた。更に ProRSAP による大腸菌のプロリン tRNA (C1-G72) とその G1-C72 変異体のプロリル化アッセイを行ったところ、予想通り G1-C72 変異体のプロリン受容能が大幅に増大していた。従って ProRSAP にとってアクセプターステム末端塩基対が G1-C72 であることが必要であることを示唆している。実際に ARS 画分と tRNA 画分による異種生物間プロリル化では、大腸菌とは互いに異種生物間プロリル化が検出されなかったが、上記のようにアクセプターステム末端塩基に対する互いの ProRS の認識の仕方が異なっていたことが原因と結論できる。

A. pernix プロリン tRNA の A73 変異体全てのプロリン受容能が減少したが、C73 は他の 2 種 (G73、U73) と比較すると若干ではあるが常にプロリン受容効率がよかった。更に ProRSAP による酵母のプロリン tRNA (C73) とその C73A 変異体のプロリル化において、予想通り C73A 変異体のプロリン受容能は増大したが、野生型 (C73) のプロリン受容活性もある程度検出され、大腸菌の野生型プロリン tRNA (C1-G72) とその変異型 (G1-C72) のときほどの差は無かった。実際に *A. pernix* K1 の ARS 画分による酵母の tRNA 画分のアッセイでは明らかなプロリン受容活性が検出されたので ProRSAP は C73 に対する識別が少し緩いのかも知れない。

A. pernix プロリン tRNA の G35 または G36 変異体は全てそのプロリン受容活性がほとんど検出されなかった。35 位と 36 位が揃って G であるのはプロリン tRNA のみであるので、ProRSAP による認識には比較的重要であったと考えられる。また 37 位の G は *A. pernix* のプロリン tRNA アイソアクセプター間で保存されていないので認識には関与していないと予想したが、G37A に置換するとアミノ酸受容活性が大幅に減少したので ProRSAP に強く認識されていると言える。G37 が認識部位なら唯一 37 位が A であるプロリン tRNA (cgg) は ProRSAP によって認識されないはずなので、細胞内では転写されていない可能性もある。実際にコドン-アンチコドンのよろめき仮説を考えればプロリン tRNA (cgg) が存在しなくても菌株は生育できる。またデータベースではプロリン tDNA (cgg) のイントロンは 40~83 番目の 44bp であるが、それを 39~82 番目と考えると tRNA 構造は変化せずに 37 位は G となるので、スプライシング後の実際のプロリン tRNA (cgg) の 37 位は G である可能性も高い。

ProRSAP によるプロリン tRNA 上の主な認識部位が解ったが、実際に *A. pernix* の細胞中にはプロリン tRNA 以外にも A73、G1-C72 塩基対の tRNA がいくつか存在し、そのうち G35 または G36 である tRNA は二種類だけである。よって G35 と G36 に対する認識の方がより強いのか、又はそれら全てを同時に認識して tRNA を捕らえることにより始めてアミノアシル化が可能となるのかも知れない。しかし、現在のアミノアシル化のタイムコースの結果からはアクセプターステム末端領域とアンチコドンの変異体同士のプロリル化効率を明確に判別することは困難なので、今後は変異導入実験結果の反応速度論的解析により k_{cat}/K_m 値を求め、ProRSAP による認識の強さをより詳細に比較することが望ましいだろう。また現在野生型 ProRSAP の結晶化を進行中である。tRNA との結晶化が成功すれば、酵素側の認識部位および活性部位の解明に繋がるのでプロリン tRNA アイデンティティーの進化の解明に更なる有力な情報が得られることが期待できる。

論文内容要旨 (英文)

氏 名 横澤 潤二



Molecular recognition mechanism of proline tRNA by prolyl-tRNA synthetase
論 文 題 目 from hyperthermophilic and aerobic archaea, *Aeropyrum pernix* K1

[INTRODUCTION]

Transfer RNA (tRNA) and aminoacyl-tRNA synthetase (ARS) exist in most cells and are very important key molecules to connect genetic code with protein synthesis in translation. Accurate translation is most dependent on their two system, synthesis of amino acid-specific aminoacyl-tRNA and the editing of mischarged aminoacyl-tRNA. ARSs and tRNAs are specific to amino acids. One ARS at least exist toward each of 20 amino acids except for particular organisms that possess a dual amino acid-specific ARS or the system of tRNA-dependent amino acid synthesis. Tertiary structure of each tRNA molecule is universally thought to fold into a similar L-shaped. In spite of the structural similarity, a tRNA is combined with a cognate amino acid through a specific features of this structure are accurately recognized by its own peculiar ARS, and other tRNAs and amino acids is strictly discriminated in the cell. Although these tRNA identities have been widely investigated in eubacterial system, the reports have been a few in archaea.

Prolyl-tRNA synthetase (ProRS) belong to a family of Class II ARS that their catalytic domain consist of an antiparallel β sheet with a conserved three domains. From reports of sequence alignment based on the crystal structure analysis of *Thermus Thermophilus* ProRS, ProRS is divided into two groups, prokaryote-like and eukaryote/archaea-like type. Moreover, archaeon *Methanococcus jannaschii* ProRS is two amino acid-specific active enzyme, ProCysRS that can synthesize both proline-tRNA^{Pro} and cystein-tRNA^{Cys}. In eubacterial *E. coli* tRNA^{Pro} identity elements reported previously, G35 and G36 at the anticodon loop, and discriminator base A73 and G72 in the acceptor domain are major recognition elements by *E. coli* ProRS.

To investigate the recognition sites of tRNA^{Pro} for ProRS from archaeon, *Aeropyrum pernix* K1, we performed an *in vitro* aminoacylation experiment by using a various *A. pernix* tRNA^{Pro} mutants. *A. pernix* K1 is an aerobic and hyperthermophilic crenarchaeon, which optimally grows at 95°C. The complete genome sequence of *A. pernix* K1 has been determined in Japan. Here, we indicate that *A. pernix* tRNA^{Pro} identity sites are located in acceptor stem region and



anticodon and that the recognition elements of archaea and eubacteria are different in acceptor stem end.

[MATERIALS AND METHODS]

A. pernix ProRS were prepared by cloning and expression in *E. coli*. The ProRS gene was amplified by PCR from *A. pernix* genomic DNA, and the PCR product was cloned into plasmid pET30 and pET28. These vectors were transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3), after grows of the strain, harvesting, lysis were performed, the recombinant ProRS into the cell extract was purified by Ni²⁺-chlate-column (Amersham Bioscience). The substrate tRNA^{Pro}s were prepared by *in vitro* transcription. Based on sequences of *A. pernix* tRNA^{Pro} gene on data base, template DNAs of wild-type and point-mutated tRNA^{Pro} gene were amplified by PCR and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). After PCR amplification of their tRNA^{Pro} gene region, each tRNA^{Pro} substrates were synthesized by *in vitro* transcription using their PCR products as template and T7 RNA polymerase, and their transcripts were purified by denatured 12% PAGE. For a detection of aminoacylation reaction, [¹⁴C] proline was used to prolylation assay and radioactivity of [¹⁴C] proline-tRNA^{Pro} was measured by liquid scintillation counting.

[RESULTS AND DISCUSSION]

In this *in vitro* mutation study, the major recognition elements of tRNA^{Pro} by *A. pernix* ProRS were situated at the acceptor stem end region and anticodon. Single substitution at the second and the third position of the anticodon, G35 and G36 conserved in tRNA^{Pro} of three organisms of phylogenetic tree, most strongly affected the proline charging activity by *A. pernix* ProRS. The mutation of discriminator base A73, and G1-C72 base pair at acceptor stem end region also sufficiently decreased the prolylation efficiency of tRNA^{Pro}. A nucleotide A73 is conserved in stRNA^{Pro} in eukaryote and archaea. The major identity elements of tRNA^{Pro} in eubacterial *E. coli* are G35 and G36 at the anticodon loop, discriminator base A73, and only G72 of a C1-G72 base pair in the acceptor stem end. These result indicate the a only difference of recognition site between *A. pernix* and *E. coli* tRNA^{Pro} is due to nucleotides of position 1 and 72. In fact, cross-species prolylation reaction between *A. pernix* and *E. coli* was not little occurred, and *in vitro* tRNA^{Pro} transcript of *E. coli* which the C1-G72 base pair was substituted to G1-C72 pair increase the proline charging activity by *A. pernix* ProRS. Furthermore, all eubacterial tRNA^{Pro} possess a C1-G72 base pair. Therefore, these evidences suggests that the difference of recognition system by *A. pernix* and *E. coli* ProRS is caused to change of nucleotides at position 1 and 72 of tRNA^{Pro} during evolution among three organisms.

学位論文の審査及び学力確認の結果の要旨

平成18年2月20日

理工学研究科長 殿

論文博士論文審査委員会

主査長谷川 典巳.....

副査坂本 政臣.....

副査亀田 恭男.....

副査

副査

学位論文審査及び学力確認の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

氏 名横澤 潤二.....

2. 論文題目 (英文の場合は、その和訳を併記すること。)

超好熱好気性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来プロリル-tRNA 合成酵素によるプロリン
tRNA の分子認識機構

.....

.....

3. 学位論文公聴会

開催日平成18年2月1日

場 所理学部先端科学実験棟2階多目的室(S201)

4. 審査年月日

論文審査平成18年1月25日 ~ 平成18年2月1日

学力確認平成18年2月1日 ~ 平成 年 月 日

5. 学位論文の審査及び学力確認の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査合格.....

(2) 学 力 確 認合格.....

6. 学位論文の審査結果の要旨(1,200字程度)

別紙のとおり

7. 学力確認の結果の要旨

別紙のとおり

氏名	横澤 潤二
学位論文の審査結果の要旨	
<p>第1章の序論では、研究の背景と目的が詳細に述べられている。tRNAは遺伝暗号とアミノ酸を結びつける媒介分子であり、アミノアシル-tRNA合成酵素(ARS)がtRNAとアミノ酸を認識して活性化されたアミノ酸をtRNAにチャージする。ARSは対応するアミノ酸種tRNAとアミノ酸のみを正しく認識してアミノアシル化すると同時に、他のアミノ酸種tRNAとアミノ酸を厳密に識別する。この分子機構は翻訳の正確さを左右し、進化上全ての生物に共通に備わっている不可欠な生体メカニズムであることから、ARSとtRNAは生命誕生初期の分子種の一つと考えられている。古細菌は太古の地球環境に似た極限環境下に生息し、中でも超好熱古細菌は進化系統樹上で最も原子生命体に近い生物群であるという解釈が一般的である。従って超好熱古細菌のtRNAアイデンティティの解明は生体分子進化を考えるうえで有力な研究の一つである。そこで、日本で発見され、全ゲノム配列が解明された超好熱好気性古細菌 <i>Aeropyrum pernix</i> K1 のプロリン tRNA アイデンティティを解明することにした。</p> <p>第2章では、<i>A. pernix</i> のプロリン-tRNA合成酵素(ProRS)画分を用いての様々な生物種のプロリン tRNA のプロリン化活性を測定することで、<i>A. pernix</i> の ProRS の認識機構を探った。その結果、古細菌特有のプロリン tRNA の構造 (G1-C72 塩基対) が関わっているらしいことを解明し、第4章の詳細なプロリン tRNA アイデンティティの研究へと発展させている。</p> <p>第3章では、<i>A. pernix</i> の ProRS 遺伝子をクローニングし大腸菌内で大量発現、野生型および 6xHis タグ融合型 ProRS を Ni²⁺-NTA アフィニティーカラムによる精製法の確立と、精製 ProRS の酵素化学的な諸性質 (活性温度、pH、熱安定性) を調べた結果についてまとめられている。</p> <p>第4章では、前章で確立した精製した ProRS と T7 RNA ポリメラーゼによる試験管内転写により作製した様々な野生型及び各種変異体プロリン tRNA を用いての tRNA 認識の分子機構を詳細に研究した結果について述べられている。それによると、ProRS によるプロリン tRNA の認識部位はアンチコドンの G35、G36 と隣接する G37、アクセプター末端塩基対の G1-C72、識別位塩基の A73 であることを明らかにすることができた。大腸菌では C1-G72 塩基対の G72 が単独で強い認識部位であったのに対し、<i>A. pernix</i> では G1-C72 塩基対全てが ProRS による認識に関わっており、大腸菌のプロリン tRNA (C1-G72) に G1-C72 を挿入することで、<i>A. pernix</i> の ProRS による認識を獲得させることに成功し、この結論を補強することができた。</p> <p>本研究成果は学術的に大きな価値があり、本論文を博士 (理学) 学位論文として合格と判定する。これらの研究の一部は既に国際的な学術雑誌に掲載されており、あと1編の論文として発表される予定である。</p>	
学力確認の結果の要旨	
<p>学力の確認は公聴会の席で、研究内容の発表後に質疑応答の形で行われた。研究の背景、基礎知識、専門知識についての質問に対して的確な説明、応答があり、横澤潤二氏は研究背景の基礎知識を含め、専門領域に対して深い知識を有しており、公聴会後の審査委員会で、審査委員全員一致で横澤潤二氏に博士 (理学) の学位を授与することは妥当であるとの結論に達し、合格と判定した。</p>	