

論文内容要旨 (和文)

平成 15年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学 講座

氏 名 岩 城 隼



論文題目 Studies on the Structure and Function of Tyrosine tRNA and Tyrosyl-tRNA Synthetase from Hyperthermophilic Archaeon, *Aeropyrum pernix* K1
(超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1由来チロシン tRNA およびチロシル-tRNA 合成酵素の構造と機能に関する研究)

生体内のタンパク質合成システムにおいて、DNA の遺伝暗号をタンパク質のアミノ酸配列に正しく反映させるためには、それぞれのコドンに対応した tRNA にアミノ酸を正確にアミノアシル化することが必要であり、この重要な反応を担うのがアミノアシル-tRNA 合成酵素 (ARS) である。ARS は、地球上の全生物に共通する存在する酵素であり、分子進化の早い時代から存在していた酵素の一つであると考えられている。ARS と同様に古くから存在していると考えられる、遺伝暗号とアミノ酸を媒介するアダプター分子 tRNA は、バリアブルアームの長さによって2つのクラスに分けられる。その多くはバリアブルアームの短いクラス I tRNA に、セリンとロイシン tRNA は長いバリアブルアームをもつクラス II tRNA に分けられる。この分類は生物界を通して保存されているが、唯一の例外であるチロシン tRNA は、古細菌および真核生物ではクラス I、真正細菌においてはクラス II tRNA に分類される。チロシン tRNA はもう一つの構造的特徴を有し、真正細菌では他の多くの tRNA にみられる G1-C72塩基対をもつものに対して、古細菌と真核生物ではユニークな C1-G72塩基対をもつ。チロシル-tRNA 合成酵素 (TyrRS) は、これらのチロシン tRNA の特徴を塩基 (対) 特異的に強く認識することで高い基質特異性を示しているが、分子進化の過程で全く異なる分子認識機構をどのように獲得してきたのかは大変興味深い。

大きく3つに分けられる生物界のうち古細菌は、真正細菌と真核生物の特徴を併せ持ち、太古地球に類似した極限の環境で生育する種も多いことから始原菌とも呼ばれる。この古細菌のなかで超好熱好気性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1は、クレンアーキオータとして初めて全ゲノム配列が決定され、超好熱古細菌では大変珍しい絶対好気性であることから、扱い易い研究対象として大変優れている。よって、*A. pernix* 由来 TyrRS (*A. pernix* TyrRS) によるアミノ酸および tRNA の分子認識を、他生物種の分子認識機構と比較検討する事は、生物の分子進化をたどる手がかりの一つになると考えられる。本研究では、反応速度論的解析および X 線結晶構造解析を行うことで、*A. pernix* TyrRS による分子認識機構を明らかにすることを目的とした。

A. pernix ゲノムから *A. pernix* TyrRS 遺伝子を PCR 法を用いて分離し、クローニングして大腸菌内での大量発現系を確立した。従来の BL21 (DE3) 株を用いた場合にはほとんど発現が確認出来なかったが、大腸菌のレアコドンに対応する tRNA を共発現させる BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を用いることで、1L 培養液から約25 mg の *A. pernix* TyrRS を得ることに成功した。これらの結果は、古細菌と大腸菌でのコドン使用の大きな相違に起因していることを示唆している。これまで、大腸菌内で発現させた TyrRS は核酸が強固に結合していることが知られており、精製には複数のカラムクロマトグラフィーの行程を必要としていた。しかし、*A. pernix* TyrRS

(10pt 2,000字程度 2頁以内)

が熱に大変安定であることを利用して、95 °C、1 h の熱処理および *A. pernix* TyrRS に強い親和性を持つシバクロンブルーアフィニティーカラムを用いることで、これまでより簡便な精製法を確立した。*A. pernix* TyrRS においても大腸菌由来の核酸の強固な結合が確認されたが、この手法により核酸を完全に除去でき、反応速度論的解析のための定量的なアミノアシル化反応および X 線結晶構造解析を行うための結晶化に適した *A. pernix* TyrRS を得ることに成功した。

A. pernix TyrRS の立体構造を明らかにするために結晶化を試みた。結晶化の手法はハンギングドロップ蒸気拡散法を用い、一般的な沈殿剤として知られる硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール 6000、ヘキサメチレングリコールおよびイソプロピルアルコールのいずれかを含む Hepes-NaOH もしくは Tris-HCl 緩衝液により pH 6.0 から 8.5 の間で検討した。その結果、硫酸アンモニウムを含む条件で正方晶系の結晶が観察できた。いずれの pH においても結晶の形成は見られたが、中性付近では多数の小さい結晶が形成され、アルカリ性側では小数の大きな結晶を形成する傾向があった。X 線結晶構造解析に適した結晶は、1.5 M 硫酸アンモニウムおよび 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) の存在下で得られ、キシリトールを凍結保護剤として用いてクライオ条件下でのデータ収集を行った結果、分解能 2.15 Å の良質なデータが得られた。結晶は正方晶系の空間群 $P4_32_12$ に属し、格子定数は $a = b = 66.1$ 、 $c = 196.2$ Å、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。アミノ酸配列の相同性が 42% と高く、これまでに構造が解かれた古細菌の *Methanococcus jannaschii* 由来 TyrRS を開始モデルとして分子置換法によりモデルを作製し、精密化を行った後に構造を決定した。この構造から、*A. pernix* TyrRS はホモダイマー構造をとることが明らかとなった。

チロシン tRNA アイデンティティーは、真正細菌である大腸菌、真核生物である酵母および古細菌である *M. jannaschii* の系において明らかにされている。それによると、真正細菌ではアンチコドン U35 とクラス II tRNA 特有のバリアブルアームを強く認識し、一方の真核生物および古細菌ではアンチコドン G34 とユニークな C1-G72 塩基対を強く認識している。*A. pernix* TyrRS による *A. pernix* の各種 tRNA 変異体を用いた反応速度論的解析を行った結果、*A. pernix* の系では真核生物および古細菌と同様に C1-G72 塩基対を強く認識するが、アンチコドンの認識は比較的弱く、G34 と U35 に比べて A36 の認識はさらに弱いことを明らかにした。アンチコドン変異体の活性低下は K_m の増加が原因で k_{cat} の減少はほとんど確認されなかったことから、アンチコドンの認識は反応速度に直接ではなく酵素と tRNA 複合体の安定化という形で強く寄与していることが示唆された。*A. pernix* TyrRS によるアンチコドンの認識は、真正細菌や真核生物の系とは異なっており、同じ古細菌である *M. jannaschii* の系とも異なることから、*A. pernix* は古細菌の中でも独自に進化してきたものと考えられ大変興味深い。

論文内容要旨 (英文)

平成 15 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学 講座

氏 名 岩城 隼



論文題目 Studies on the Structure and Function of Tyrosine tRNA and Tyrosyl-tRNA Synthetase from Hyperthermophilic Archaeon, *Aeropyrum pernix* K1

Tyrosine tRNA identity and crystal structure of tyrosyl-tRNA synthetase from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1 (*A. pernix* TyrRS) was studied.

A. pernix TyrRS gene was cloned and the enzyme was overexpressed in *Escherichia coli*. The expressed protein was strikingly thermostable. Therefore, the enzyme was affinity purified by the use of Cibacron Blue chromatography following the heat treatment at 90 °C. The high affinity of *A. pernix* TyrRS to Cibacron Blue, which can bind enzymes requiring adenylic cofactors such as NAD⁺, NADH and ATP, enabled a one-step chromatography purification. This purification method is extremely rapid and facile as compared with the conventional methods using several chromatographic steps. The purified *A. pernix* TyrRS was remarkably soluble. Crystals suitable for X-ray diffraction studies were obtained under optimized crystallization conditions in the presence of 1.5 M ammonium sulfate using the hanging-drop vapour-diffusion method. The crystals belonged to the tetragonal space group P4₃2₁2, with unit-cell parameters a = b = 66.1, c = 196.2 Å, and diffracted to beyond 2.15 Å resolution at -173 °C. The crystal structure was solved using the molecular-replacement method with *Methanococcus jannaschii* TyrRS as the starting model. *A. pernix* TyrRS was 81.6 kDa homodimeric protein comprising two 364 amino acid residue. The crystal contained one molecule per asymmetric unit; therefore, the dimerization axis of *A. pernix* TyrRS appeared to coincide with the crystallographic axis.

The tyrosine tRNA identity was determined using many tRNA transcripts *in vitro* by the reaction with overexpressed *A. pernix* TyrRS. The unique C1-G72 base pair, which was not present in the other amino acid species tRNAs and a discriminator base A73 in the acceptor region was strongly recognized similar to that of archaeal and eukaryotic TyrRSs. Anticodon bases were weak recognition sites, especially A36. The anticodon recognition mode by *A. pernix* TyrRS was diversified from that by other TyrRSs.

(12pt シングルスペース 300語程度)

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成18年2月20日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主 査 長谷川 典巳
副 査 西田 雄三
副 査 坂本 正臣
副 査
副 査

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

専攻名 地球共生圏科学専攻
氏 名 岩城 集

2. 論文題目 (英文の場合は, その和訳を併記すること。)

Studies on the Structure and Function of Tyrosine tRNA and Tyrosyl-tRNA Synthetase from
Hyperthermophilic Archaeon, *Aeropyrum pernix* K1
(超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1由来チロシンtRNAおよびチロシル-tRNA合成酵素の
構造と機能に関する研究)

3. 学位論文公聴会

開催日 平成18年 2月 1日
場 所 理学部先端科学時実験棟 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
最終試験 平成18年 2月 1日 ~ 平成 年 月 日

5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格
(2) 最終試験 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. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

別紙

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	岩城 隼
学位論文の審査結果の要旨			
<p>超好熱好気性古細菌 <i>Aeropyrum pernix</i> K1ゲノムからチロシル-tRNA 合成酵素 (TyrRS) 遺伝子をクローニングし、大腸菌BL21-CodonPlus (DE3)内での大量発現系と熱処理およびアフィニティー精製法を確立した。<i>A. pernix</i>のチロシルtRNAアイデンティティを調べるために、精製したTyrRS と試験管内転写反応で得られたtRNA変異体を用いて反応速度論的解析で行ったところ、<i>A. pernix</i>の系では真核生物および古細菌と同様にC1-G72塩基対を強く認識するが、アンチコドンの認識は真正細菌や真核生物の系だけでなく同じ古細菌である<i>Methanococcus jannaschii</i>の系とも異なっていることを明らかにした。アンチコドン変異体の活性低下は、Kmの増加が原因でkcatの低下はほとんど見られなかったことから、アンチコドンの認識は酵素とtRNA複合体の安定化という形で強く影響していることが示唆された。これらの結果を立体構造から考察するため、TyrRSの結晶化を行った。X線結晶構造解析に適した結晶は、1.5 M 硫酸アンモニウムおよび100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) の存在下で得られ、キシリトールを凍結保護剤として用いてクライオ条件下でのデータ収集を行った結果、分解能2.15 Åの良質なデータが得られた。アミノ酸配列の相同性が42%と高く、これまでに構造が解かれた<i>M. jannaschii</i>由来 TyrRSを開始モデルとして分子置換法により構造を決定することができた。多種のアミノ酸アナログをハイスループットにタンパク質へ導入するために、大腸菌細胞抽出物を用いた試験管内翻訳反応による部位特異的アミノ酸アナログ導入法について、TyrRSを用いて検討した。従来の方法では、化学的手法でアミノアシル化を行うが、目的のタンパク質を大量に得るためには、コスト、収量、合成時間において大きな困難を抱えている。<i>A. pernix</i>のTyrRSを用いてアミノ酸アナログを直接アミノアシル化することでこれらの問題の解消を試みた。大腸菌のARSに認識されない人工4塩基 tRNAの開発のために大腸菌、酵母および<i>A. pernix</i>由来のtRNAからユニークな特徴を有するものを選出し、それら全てのtRNAに<i>A. pernix</i> TyrRSの認識部位およびアミノ酸アナログの導入部位に対応するCCCG 4塩基アンチコドン挿入したtRNAをデザインした。目的の人工4塩基 tRNAをスクリーニングするために、CGGG 4塩基コドンを1カ所だけ遺伝子中に有し、終止コドンの後にヒスチジンタグの配列を有す放線菌由来キシラナーゼの活性ドメインを人工4塩基 tRNA存在下で試験管内翻訳反応により発現させ、抗キシラナーゼ抗体および抗 His-tag 抗体を用いた免疫染色により評価した。このスクリーニングにより、最も適した<i>A. pernix</i>由来トリプトファン tRNA変異体を獲得することができた。また、チロシンアナログをアミノアシル化する<i>A. pernix</i> TyrRS変異体の開発を行った。基質チロシンの水酸基と水素結合していると予想されるY39残基とD172残基に着目し、この2つのアミノ酸残基をそれぞれ任意に置換した6変異体を作製し、チロシンアナログ受容能を検討したところ、<i>A. pernix</i> TyrRS変異体の1つが10種以上のチロシンアナログ受容能を有していた。<i>A. pernix</i> TyrRSに対してアミノ酸の点変異を2箇所導入するだけで、tRNAへの基質特異性を保持したままチロシンに対する基質特異性のみを改変することに成功し、これまでより圧倒的に早く簡便に多種のチロシンアナログをアミノアシル化することができたため、この手法を用いることでチロシンアナログを部位特異的に導入した多種の人工タンパク質を容易に調製することが可能となった。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2編の論文として発表される。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>最終試験は公聴会の場で行われ、研究内容の発表後に質疑応答が行われた。様々な角度からの質問に対して的確な説明、応答があり、岩城隼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もち、公聴会後の審査委員会で、審査委員全員一致で岩城隼氏に博士(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>			