

論文内容要旨 (和文)

平成 16 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 岡本 幸司



論文題目 超好熱好気性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来バリル-およびグリシル-tRNA 合成酵素によるバリンおよびグリシン tRNA の分子認識に関する研究

遺伝情報に基づいたタンパク質合成の正確性は、各アミノ酸種のアミノアシル-tRNA 合成酵素 (ARS) が対応するアミノ酸種 tRNA とアミノ酸のみを厳密に認識し、両者を的確に結合させることで維持されている。この ARS による tRNA の認識と識別の分子機構は、tRNA アイデンティティとよばれ、真正細菌である大腸菌の系では、アミノ酸種によって程度の差はあるものの、かなりの部分が解明されており、大腸菌以外の真正細菌や真核生物についても、ある程度解明されてきている。しかし、進化系統的に謎が多い、第三の生物界に分類される古細菌については、殆ど解明されていないのが現状である。そこで私は、全ゲノム配列が解析された超好熱好気性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 を研究対象とし、20 種のアミノ酸種 ARS のうち Class I ARS に属するバリル-tRNA 合成酵素 (ValRS) と Class II に属するグリシル-tRNA 合成酵素 (GlyRS) に着目した。

ValRS によるバリン tRNA の認識部位は、真正細菌である大腸菌と *Thermus thermophilus*、真核生物である酵母の系で報告されている。最も詳細に解明されている大腸菌においては、バリン tRNA の識別位塩基 A73 とアンチコドンの 2 文字目 A35 と 3 文字目 C36 がともに強い認識部位であり、さらにアクセプターステムの G3-C70、U4-A69 塩基対を認識しているという結果が得られている。*T. thermophilus* では、X-線結晶構造回折実験から A35 および C36 がともに強いデターミナントであることが解明されている。酵母については、部分的ではあるが、A73 と A35 が認識部位であることが明らかにされている。一方、GlyRS によるグリシン tRNA の認識部位に関しては、真正細菌である大腸菌と *T. thermophilus*、真核生物では酵母の系において詳細に解明されている。大腸菌と *T. thermophilus* の系では、U73、C35、C36、G1-C72 および C2-G71 が GlyRS による認識部位である。一方、真核生物である酵母の系では、A73、C35 および C36 が認識部位であることは、真正細菌の系と同様であるが、アクセプターステムに関しては真正細菌の系とは異なり、C2-G71 および G3-C70 が認識部位である。このように、大腸菌や酵母を初めとして真正細菌や真核生物でバリンおよびグリシン tRNA の認識部位が解明されているが、古細菌については未解明である。従って、本研究は、古細菌として初めてバリンおよびグリシン tRNA の認識

(10pt 2,000 字程度 2 頁以内)

部位を解明し、真正細菌または真核生物の tRNA アイデンティティーと比較することで、その分子認識機構の進化を明らかにすることを目的に研究を行うことにした。

部位特異的に変異を導入したバリンおよびグリシン tRNA 変異体と大腸菌内で発現させた His-tag 融合型の ValRS および GlyRS を用い、それぞれについてアミノアシル化反応を行った結果、*A. pernix* の ValRS は、バリン tRNA の A73 を殆ど認識していなかったが、A35 および C36 をともに強く認識していた。また、アクセプターステムの G3-C70 および C4-G69 塩基対は認識に関与していなかった。これらの結果を大腸菌の系と比較すると、大腸菌の ValRS は、バリン tRNA のアンチコドン を強く認識し、さらに識別位塩基を含めたアクセプターステム領域を認識し、複雑な認識機構によって、バリン以外のアミノ酸種 tRNA を識別している。一方、*A. pernix* の ValRS は、バリン tRNA の識別位塩基を含めたアクセプターステム領域を殆ど認識せずに、アンチコドンのみを認識し、大腸菌の系に比べ非常にシンプルな認識機構で、その他アミノ酸種 tRNA を識別している。従って、本研究から、ValRS によるバリン tRNA の認識機構が、生物種の違いによって大きく異なることを示すことができた。また、現在までに、アンチコドンのみを認識している ARS の例は、全生物界のどのアミノ酸種についても報告されていない。従って、*A. pernix* の ValRS はアンチコドンのみを認識する ARS として初めての例であり、これまでに報告されていない、新奇な tRNA アイデンティティーを解明することができた。一方、*A. pernix* の GlyRS によるグリシン tRNA の認識部位は、アンチコドンの C35 および C36 がともに強い認識部位であった。アクセプターステム領域に関しては、A73 と G1-C72 塩基対は認識に関与せず、C2-G71 および G3-C70 塩基対が認識部位であった。*A. pernix* のグリシン tRNA の認識部位を、他の生物界である真正細菌および真核生物の系と比較すると、アンチコドンの認識機構に関しては全ての生物界で共通であるが、アクセプターステムの認識機構を考慮すると、*A. pernix* のグリシン tRNA アイデンティティーは真核生物タイプであると考えられる。ただし、真正細菌および真核生物の系で、認識部位であった識別位塩基を *A. pernix* の系では認識部位でなかったことと、生物が進化するにつれてより複雑化していくことを考慮すると、*A. pernix* のグリシン tRNA アイデンティティーは、真核生物寄りであり且つ進化の流れの根元にあるのではないかと考えられる。

本研究から、全ての生物が共通して普遍的に有している ARS が、生物種の違いにより tRNA の認識機構が異なることを明らかにし、その認識機構の違いがアミノ酸種によって固有のものであることを解明することができた。

論文内容要旨 (英文)

平成 16 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 岡本 幸司



論文題目 Study on the molecular recognition of valine tRNA and glycine tRNA by valyl- and glycyI-tRNA synthetase from a hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix* K1

The ability of aminoacyl-tRNA synthetases (ARSs) to recognize the cognate tRNA(s) from a pool of various tRNAs is crucial for maintain translational fidelity. The recognition mechanisms of tRNA(s) by ARS (so called "tRNA identity") have already been elucidated in eubacteria and eukaryoto. However, little is known about tRNA identity in archaea. Therefor, we focused on valyl- and glycyI-tRNA synthetase (ValRS and GlyRS) from a hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. To elucidate the recognition sites of valine tRNA and glycine tRNA for ValRS and GlyRS from *A. pernix* (ValRSAP and GlyRSAP), we examined valylation and glycylation activities by using *in vitro* mutant valine tRNA and glycine tRNA transcripts and the recombinant his-tagged ValRSAP and GlyRSAP.

The discriminator base A73 was involved in recognition by ValRSAP. Substitution of A35 or C36 of the anticodon with the other nucleotides led to a significant decrease of valylation activity as compared with the wild type. Mutation at G3-C70 or C4-G69 of the acceotor stem did not involve in recognition. These results show that the valine tRNA identity differs from *A. pernix* system to bacterial system because ValRSAP does not recognize A73, G3-C70 and C4-G69.

Substitution of C35 and C36 of the anticodon with the other nucleotides led to a significant decrease of glycylation activity as compared with wild type. Mutation at G1-C72 of the acceptor stem did not decrease glycine-charging activity, but mutants of C2-G71 or G3-C70 reduced the glycylation activity. Regarding A73, no impaired incorporation of glycine was observed to each glycine tRNA mutant. These results show that the glycine tRNA identity of *A. pernix* is thought to be eukaryotic because GlyRSAP recognizes C2-G71 and G3-C70, and does not recognize G1-C72.

(12pt シングルスペース 300 語程度)

論文内容要旨 (英文)

平成 16 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 岡本 幸司

論文題目 Study on the molecular recognition of valine tRNA and glycine tRNA by valyl- and glycyI-tRNA synthetase from a hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix* K1

The ability of aminoacyl-tRNA synthetases (ARSs) to recognize the cognate tRNA(s) from a pool of various tRNAs is crucial for maintain translational fidelity. The recognition mechanisms of tRNA(s) by ARS (so called "tRNA identity") have already been elucidated in eubacteria and eukaryoto. However, little is known about tRNA identity in archaea. Therefor, we focused on valyl- and glycyI-tRNA synthetase (ValRS and GlyRS) from a hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum perix* K1. To elucidate the recognition sites of valine tRNA and glycine tRNA for ValRS and GlyRS from *A. pernix* (ValRSAP and GlyRSAP), we examined valylation and glycylation activities by using *in vitro* mutant valine tRNA and glycine tRNA transcripts and the recombinant his-tagged ValRSAP and GlyRSAP.

The discriminator base A73 was involved in recognition by ValRSAP. Substitution of A35 or C36 of the anticodon with the other nucleotides led to a significant decrease of valylation activity as compared with the wild type. Mutation at G3-C70 or C4-G69 of the acceptor stem did not involve in recognition. These results show that the valine tRNA identity differs from *A. pernix* system to bacterial system because ValRSAP does not recognize A73, G3-C70 and C4-G69.

Substitution of C35 and C36 of the anticodon with the other nucleotides led to a significant decrease of glycylation activity as compared with wild type. Mutation at G1-C72 of the acceptor stem did not decrease glycine-charging activity, but mutants of C2-G71 or G3-C70 reduced the glycylation activity. Regarding A73, no impaired incorporation of glycine was observed to each glycine tRNA mutant. These results show that the glycine tRNA identity of *A. pernix* is thought to be eukaryotic because GlyRSAP recognizes C2-G71 and G3-C70, and does not recognize G1-C72.



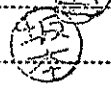
(12pt シングルススペース 300 語程度)

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成19年2月21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 典日 
副 査 西田 雄三 
副 査 坂本 政臣 
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 岡本 幸司

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由来バリル-およびグリシル-tRNA合成酵素によるバリンおよびグリシンtRNAの分子認識に関する研究

3. 学位論文公聴会

開催日 平成19年 2月 13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19年 1月24日 ~ 平成19年 2月 13日
最終試験 平成19年 2月13日 ~ 平成19年 2月 13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

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	岡本 幸司
学位論文の審査結果の要旨			
<p>本研究は、古細菌として初めてバリンおよびグリシンtRNAの認識部位を解明し、真正細菌と真核生物のtRNAアイデンティティと比較することで、分子認識機構の進化を明らかにすることを目的に研究をおこなった。</p> <p>部位特異的に変異を導入した古細菌<i>Aeropyrum pernix</i>のバリンおよびグリシンtRNA変異体と大腸菌内で発現させたHis-tag融合型のバリン-tRNA合成酵素 (ValRS) およびグリシン-tRNA合成酵素 (GlyRS) を用い、それぞれについてアミノアシル化反応を行った結果、ValRSは、バリンtRNA のA73を殆ど認識していなかったが、A35およびC36をともに強く認識していた。アクセプターステムのG3-C70およびC4-G69塩基対は認識に関与していなかった。これらの結果を大腸菌の系と比較すると、大腸菌のValRSは、バリンtRNAのアンチコドンを強く認識し、さらに識別位塩基を含めたアクセプターステム領域を認識し、複雑な認識機構によって、バリン以外のアミノ酸種tRNAを識別しているのは大きく異なっていた。<i>A. pernix</i>のValRSは、バリンtRNAの識別位塩基を含めたアクセプターステム領域を殆ど認識せずに、アンチコドンのみを認識し、大腸菌の系に比べ非常にシンプルな認識機構で、その他アミノ酸種tRNAを識別していた。本研究から、ValRSによるバリンtRNAの認識機構が、生物種の違いによって大きく異なっていることを明らかにすることができた。現在までに、アンチコドンのみを認識しているアミノアシル-tRNA合成酵素 (ARS) は、どのアミノ酸種についても報告されておらず、<i>A. pernix</i>のValRSはアンチコドンのみを認識するARSとして世界で初めての例であり、新奇なtRNAアイデンティティをもつことを解明した。一方、<i>A. pernix</i>のGlyRSによるグリシンtRNAの認識部位は、アンチコドンのC35およびC36がともに強い認識部位であった。アクセプターステム領域に関しては、A73とG1-C72塩基対は認識に関与せず、C2-G71およびG3-C70塩基対が認識部位であった。<i>A. pernix</i> のグリシンtRNAの認識部位を、他の生物界である真正細菌および真核生物の系と比較すると、アンチコドンの認識機構に関しては全ての生物界で共通であるが、アクセプターステムの認識機構を考慮すると、<i>A. pernix</i> のグリシンtRNAアイデンティティは真核生物タイプであると考えられた。真正細菌および真核生物の系で、認識部位であった識別位塩基を<i>A. pernix</i> の系では認識部位でなかったことと、生物が進化するにつれてより複雑化していくことを考慮すると、<i>A. pernix</i> のグリシンtRNAアイデンティティは、真核生物寄りであり且つ進化の流れの根元にあるのではないかと推測できる。</p> <p>本研究から、全ての生物が共通して普遍的に有しているARSが、生物種の違いによりtRNAの認識機構が異なることを明らかにし、その認識機構の違いがアミノ酸種によって固有のものであることを解明することができた。</p> <p>本研究は、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すでに論文として公表されており、あと2編の論文として発表される予定である。</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、岡本幸司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岡本幸司氏に博士 (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>			