

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明

2 研究者氏名: 濡木 理

3 研究のねらい:

遺伝子に蓄えられた遺伝情報は、遺伝暗号の翻訳過程における精密な酵素反応の集積により、正確にタンパク質として翻訳され、生命に必須な機能を発揮する。特にトランスファーRNA (tRNA) が、mRNA 上のコドンに特異的なアミノ酸を対応づけることによって、正確な遺伝暗号の翻訳が保証されている。tRNA 自体にはアミノ酸を選択的に結合する能力はなく、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) がアミノ酸と tRNA を厳密に認識し、正しい組み合わせのアミノアシル tRNA を合成している。aaRS が tRNA を正確に認識するためには、tRNA が正しい長さにプロセシングを受け、様々な転写後修飾を受けて、tRNA が成熟する必要がある。本研究では、tRNA のプロセシング、転写後修飾、アミノアシル化に働く酵素と tRNA (前駆体) の複合体の X 線結晶構造解析を行い、遺伝暗号翻訳のメカニズムを原子分解能のレベルで解明することを目指した。さらに、各ステップで、酵素群が機能的統合により超分子複合体 (プロセソーム、モディフォソーム、アミノアシルソーム) を形成することを想定し、これを同定し構造解析することを目的として研究を遂行した。

4 研究成果:

(1) プロセシング過程における tRNA 前駆体の適切な切断・修復の構造的基盤

tRNA は L 字型の高次構造をしており、L 字の一方の末端には、アンチコドンという領域があり、コドンと塩基特異的に水素結合を形成する。一方、tRNA のもう一方の末端である 3' 末端には CCA (C74-C75-A76) という決まった配列があり、アミノアシル tRNA 合成酵素が末端のアデニンに特異的なアミノ酸を結合させる。これにより、tRNA はコドンというヌクレオチド配列の情報をアミノ酸配列の情報に変換するアダプター分子として働くことができる。tRNA は 5' 末端にリーダー配列、3' 末端にトレーラー配列と呼ばれる余分な配列が結合した状態で転写される。プロセシングの第一段階で、RNaseP (リボザイム) がリーダー配列をまるごと切断し、RNaseE などのエンドヌクレアーゼがトレーラー配列を途中で切断する。次に残ったトレーラー配列を RNasePH などのエキソヌクレアーゼが 1 ヌクレオチドごとに切断していくが、RNasePH が切り込みすぎて CCA 配列 (あるいはその一部) を失ってしまった場合、CCA 付加酵素という RNA ポリメラーゼの 1 種が CCA を修復する。また、古細菌の多くと真核生物においては、ゲノム上に tRNA の CCA 配列はコードされていないため、CCA 付加酵素が tRNA の 3' 末端に *de novo* に CCA 配列を付加する必要がある。

我々は *Aquifex aeolicus* 由来の RNasePH の結晶構造を 2.3Å 分解能で決定した (図1) (*J. Biol. Chem.*, 2003)。RNasePH は加リン酸分解により RNA をトリミングしていく酵素である。その結晶構造から、RNasePH は 6 量体で、活性部位に加リン酸分解に必要な無機リン酸が結合していた。活性部位を形成するクレフトは、単鎖 RNA が入り込めるだけの幅で、その深さは、ちょうど tRNA の 3' 末端の単鎖部分の 4 ヌクレオチド分であった。このことから、tRNA 前駆体の 3' 末端のトレーラー配列 (単鎖) がクレフトに入り込んでその底に結合している無機リン酸により加リン酸分解を受け、ちょうど成熟 tRNA の 3' 末端の単鎖 4 ヌクレオチドに到達したところで加リン酸分解が終了することが示唆された。

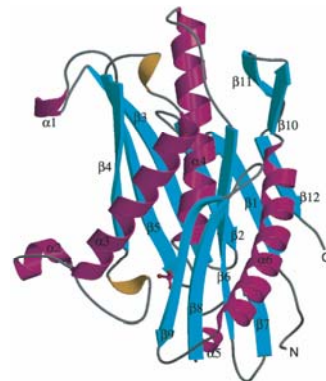
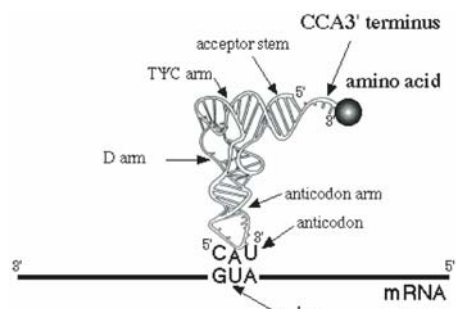


図1 RNasePH の構造

プロセッシングの最終段階でアミノ酸結合末端である CCA 配列を修復する CCA 付加酵素は、DNA の鋳型を必要とせず、tRNA の末端にこの CCA という決まった配列の RNA を結合させる。我々は、真性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の CCA 付加酵素とプライマーとなる tRNA 前駆体 (末端が CC)、および基質である ATP の 3 者複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定した (図2) (*Nature*, 2004)。その結果、本酵素は、鋳型 DNA の代わりに酵素のアミノ酸残基で構成された「タンパク質性の鋳型」によって、基質となる CTP や ATP を固定し、tRNA の末端が伸縮することで、鋳型なしでも特異的に CCA 配列を結合させることができることを明らかにした。

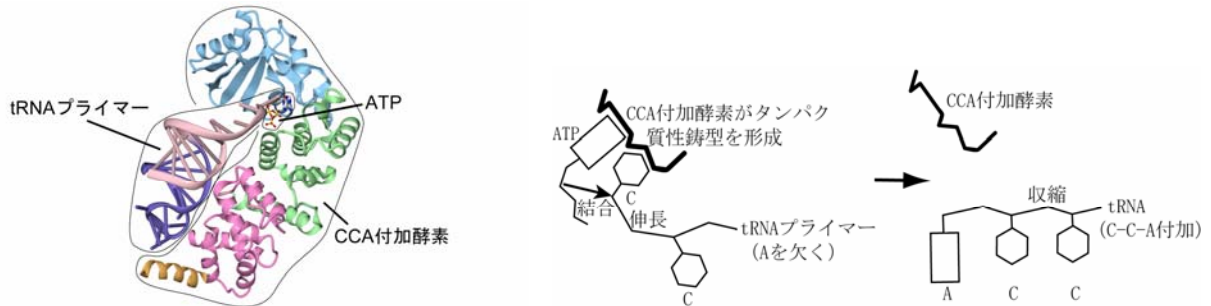


図 2. CCA 付加酵素と tRNA プライマーと ATP の複合体の結晶構造 (左) と鋳型非依存性重合反応のメカニズム

CCA 付加酵素は、古細菌由来のクラス I 酵素と、真核細胞および真性細菌由来のクラス II 酵素に分類される。我々は、クラス I に属する *Archaeoglobus fulgidus* 由来の CCA 付加酵素の結晶構造を決定し、クラス I とクラス II の CCA 付加酵素は、触媒ドメイン以外は、全く異なる構造を持つことを明らかにした (*EMBO J.*, 2004)。我々はさらに、*A. fulgidus* 由来のクラス I CCA 付加酵素とミニヘリックス tRNA (CCA, CA, A それぞれが欠けているもの) と NTP との複合体の結晶構造解析に成功した (図3)。本酵素は、Tail domain によって、tRNA に特徴的な TΨC ループに存在する TΨC 配列を認識していることが明らかになった。確かに、この Tail domain を欠失した変異体酵素は tRNA との結合能を失った (論文準備中)。

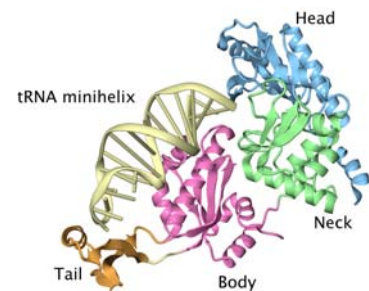


図 3 クラス I CCA 付加酵素と tRNA ミニヘリックスの複合体の結晶構造

## (2) 酵素による tRNA 修飾の構造的基盤

tRNA は転写後に様々な化学修飾を受ける。転写後修飾は、その部位により意義が異なってくる。tRNA のコア領域と呼ばれる D ループ、TΨC ループに導入された修飾は、tRNA の L 字型構造を安定化する働きを持つ。一方 tRNA のアンチコドンに導入された修飾は、アンチコドンが正しいコドンと塩基対を形成することを保証したり、aaRS による tRNA の正確な認識に働く。

我々は、古細菌の tRNA の D ループの G15 をアーケオシンにすげかえる ArcTGT (アーケオシン tRNA グアニトランスグリコシラーゼ) と tRNA の複合体の結晶構造を 3.3Å 分解能で決定した (*Cell*, 2003)。その結果、ArcTGT は tRNA の L 字型構造を λ 型に変形させ (図4)、D ループを活性部位に引っ張り込むことによって、奥まった G15 の塩基置換を触媒していることが明らかになった。

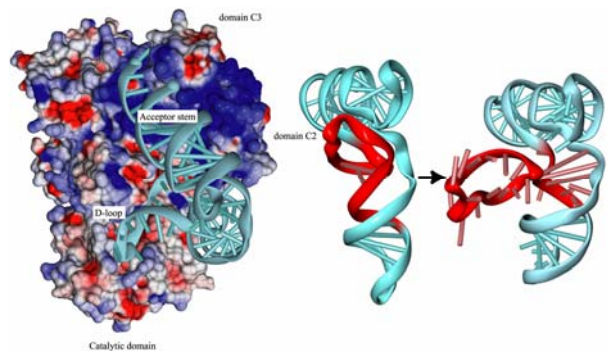


図 4 ArcTGT に結合した tRNA は L 型から λ 型に変化する

さらに我々は、tRNA の D ループの G18 の 2' OH (リボース) をメチル化する TrmH とメチル基供与体である S アデノシルメチオニン (AdoMet) の複合体の結晶構造を 1.85Å 分解能で決定した (図5) (*Structure*, 2004)。特徴的なことに、TrmH はこれまで解析されたメチル基転移酵素と異なり、

触媒ドメインに明確な結び目構造を持っている。結晶構造から、この結び目構造は、AdoMet 結合部位の形成とメチル化活性部位の構築に働いていることが明らかになった。さらに変異体解析の結果から、TrmH はこの結び目構造により2量体を形成し、一方のサブユニットの Arg41 が他方のサブユニットの活性部位に入り込み、tRNA の G18 が活性部位にはまると、G18 のリン酸基や Ser150 により脱プロトン化を受けて活性化し、G18 の 2' OH を脱プロトン化し、この 2' O が AdoMet のメチル基を求核攻撃するという「RNA 依存的なメチル化」機構を提唱した。

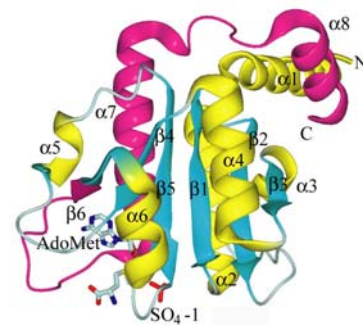


図5 TrmHの構造

tRNA<sup>Ile</sup><sub>2</sub> のアンチコドンは、未修飾のままでは CAU であり、メチオニンのコドン AUG と対合する。この場合、未修飾の tRNA<sup>Ile</sup><sub>2</sub> はメチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) によって認識され、メチオニンを運搬するため、問題は生じない。細胞内では、tRNA<sup>Ile</sup><sub>2</sub> のアンチコドン1次目の C はリジン(L)に修飾されており、アンチコドン LAU はイソロイシンのコドン AUA を認識する。さらに修飾された tRNA<sup>Ile</sup><sub>2</sub> は、イソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) に認識され、イソロイシンを運搬する。すなわち、この C34 から L34 への修飾により、tRNA<sup>Ile</sup><sub>2</sub> のコドン特異性とアミノ酸特異性がメチオニンからイソロイシンへ同時に切り替わることになる。我々は、tRNA<sup>Ile</sup><sub>2</sub> のアンチコドン1次目の C をリジン(L)に修飾するリジン合成酵素 (TilS) の結晶構造を 2.4Å 分解能で決定することに成功した(図6) (*Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005)。TilS のN末端の触媒ドメインは N 型ピロリン酸分解酵素と同じ構造を持っており、このことから、TilS は C34 の C2 をアデニル化し、活性化されたリジンがこの C2 を求核攻撃することによってリジンに修飾されることが予測された。TilS の網羅的な変異体解析を行うことにより、この反応機構および活性残基を同定することに成功した。



図6 TilSの結晶構造

tRNA<sup>Glu</sup> や tRNA<sup>Lys</sup> のアンチコドン1字目の U34 は2位のカルボニル基がチオ化された修飾を受けており、このチオ基は正確なコドンの認識および特異的な aaRS による認識に必須である。tRNA へのチオ基の導入は、酵素 IscS がシステインからチオール基を受容し、酵素 MnmA が tRNA にチオ基の修飾を行うが、最近の遺伝学的な解析によって、この2つの酵素の間に TusA、TusBCD、TucE という新規の酵素群が介在し、硫黄をリレー方式に IscS から MnmA まで受け渡すことが明らかになった。さらに TusBCD、TusE、MnmA は超分子複合体(モディフォソーム)を形成し、効率的な硫黄の転移に働いていることが示唆された。我々は、大腸菌の TusBCD の結晶構造を 2.1Å 分解能で決定することに成功した(図7) (*Structure*, 2006)。TusBCD は三量体からなるヘテロ6量体を形成し、変異体の遺伝学的解析の結果、TusD サブユニットの Cys78 が硫黄の転移に働いていることをつきとめた。さらに我々は、MnmA と tRNA<sup>Glu</sup> との複合体の結晶化に成功した(論文投稿中)。その結果、MnmA は U34 をフリップアウトさせ、ATP を用いてこれをアデニル化した後、活性化した硫黄が求核攻撃することでチオ化が起こることを明らかにした。また、MnmA の触媒ドメインはアンチコドン3塩基を特異的に認識している一方で、中央ドメインのループが tRNA の D ステムヘリックスのマイナーグループに入り込み、タンパク質の主鎖と RNA の主鎖が密接な水素結合を形成すると言う特徴的な RNA 認識機構を持つことが明らかとなった。この結晶構造解析では、我々は3種類の異なる反応ステージの結晶構造を決定し、チオ化反応のスナップショットを撮ることに成功した。



図7. TusBCDの結晶構造

### (3) アミノアシル tRNA 合成酵素の作用機序の構造的基盤

メチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) は、酵素単独の結晶構造が最初に解明されたアミノアシル tRNA 合成酵素の1つであり、膨大な生化学的な研究結果も集積しているながら、世界中の結晶学者が tRNA との複合体の結晶化に挑戦しているにもかかわらず、未だ結晶構造が報告されていない

かった。また、MetRS は他の aaRS に比べ、極めてシンプルなドメイン構造を持ちながら、initiator および elongator の2種の異なる tRNA<sup>Met</sup> を厳密に認識することができる。我々は、*Aquifex aeolicus* 由来の MetRS と elongator の tRNA<sup>Met</sup> との複合体の結晶構造を 2.4Å 分解能で決定した(図8) (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005)。その結果、MetRS による認識により、tRNA<sup>Met</sup> のアンチコドンループは大きく歪み、C34、A35、A38 からなる”triple base stack”なる構造を取り、MetRS の Trp 残基と Arg 残基が RNA を模倣する形でこれを認識していることが明らかになった。

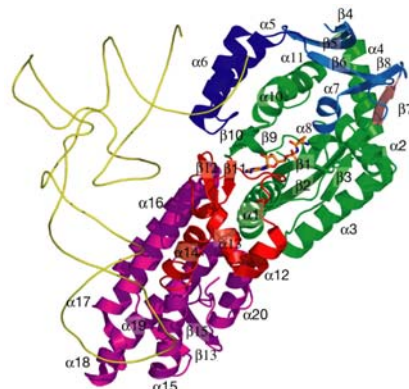


図8 MetRS と tRNA と Met-AMP の複合体の結晶構造

一方、ヒトなどほ乳類の aaRS は、タンパク質合成以外に、アポトーシス制御や免疫系の活性化など重要な細胞機能に働く多機能酵素であることが最近注目されている。ヒト由来トリプトファン tRNA 合成酵素(hTrpRS)は、スプライスバリエント(mini TrpRS)として発現されると、細胞外へ分泌され、血管内皮細胞のアポトーシスを促し、血管新生の抑制に働く。一方、近縁のヒト由来チロシル tRNA 合成酵素(hTyrRS)は、アポトーシスを起こした細胞で2断片に分解されると、その一方(mini TyrRS)は、血管新生を促進する。これら2つの近縁なアミノアシル tRNA 合成酵素が、本来のタンパク質合成とは異なる細胞機能を有し、しかも全く逆のサイトカイン活性を持つメカニズムの解明が待たれていた。我々は、ヒト由来 mini TrpRS の X 線結晶構造解析を行い、得られた結晶構造をバクテリア由来の TrpRS およびヒト由来 TyrRS の結晶構造と比較して、mini TrpRS に特徴的な4つの構造を発見した(図9; M1~M4)。さらに、これらの構造の変異体の生化学・細胞生物学解析を行うことで、mini TrpRS の tRNA を認識するドメインに挿入された 8 ペプチド(M3)が血管内皮細胞のアポトーシスさらに血管新生の抑制に必須であることを解明した(*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004)。

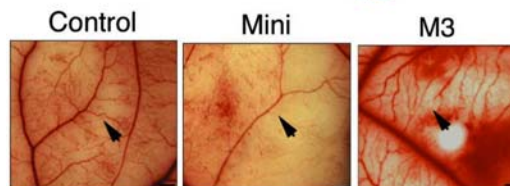
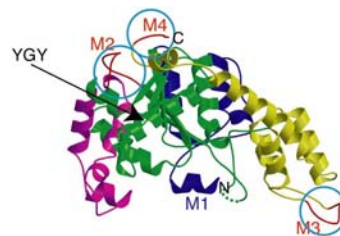


図9 hTrpRS の結晶構造(上)。tRNA 認識ドメイン内の 8 ペプチドを欠失した M3 変異体はアポトーシス活性を失った(下)。

本研究により、血管新生によって引き起こされる失明や癌細胞の増殖を抑制する薬剤のデザインが可能になると考えられる。

## 5 自己評価:

tRNA のプロセッシング、翻訳後修飾、アミノアシル化を触媒する酵素と tRNA(前駆体)の複合体に関しては、系統的かつ網羅的に構造解析を遂行し、その一般的な作用機序を原子メカニズムで明らかにすることができ、当初の研究目標の前半に関してはかなり達成できたと考えている。tRNA を介した遺伝暗号の翻訳は、すべての生物の生命維持にとって基本的なシステムであり、その研究分野はほぼ決着がついたと言われて久しいが、最近のゲノム解析の結果、まだまだ新しい研究課題があることが判明し、また盛り上がりを見せている。今後も tRNA の成熟過程、アミノアシル化過程に関して構造生物学を展開して行きたい。また、ヒト由来のアミノアシル tRNA 合成酵素は、遺伝情報の翻訳以外に、シグナル伝達の機能を持つに至り、細胞周期や自然免疫の制御に働くことが判明し、今後は医療的な応用にもらんだ構造生物学を遂行して行きたい。ただ、当初の研究目標の後半である超分子複合体(プロセソーム、モディフォソーム、アミノアシルソーム)の構造解析に関しては、本研究期間内では本格的に進めるに至らなかったため、今後、無細胞タンパク質合成系を用いた超分子複合体の再構築およびウシの肝臓から複合体の抽出を行い、構造解析を実現する予定である。

## 6 研究総括の見解:

研究期間の途中で研究場所が変わったにも関わらず驚異的な実験量をこなし、多くの複合体の結晶構造解析に成功して遺伝暗号翻訳機構の解明を行い大きな成果をあげた。鋳型非依存性 RNA ポリメラーゼ反応機構に関する論文は *Nature* 誌に掲載された。たんぱく質合同シンポジウムのアンケートでも、内容と量、現象への迫り方に圧倒されたという感想が見られ、客観的にも高い評価を得たと感じている。本人も指摘しているように超分子複合体の構造解析は端緒についたばかりなので、SORST での進展に期待したい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Y. Kise, S. W. Lee, S. G. Park, S. Fukai, T. Sengoku, R. Ishii, S. Yokoyama, S. Kim and O. Nureki  
“A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase”  
*Nature Struct. & Mol. Biol.*, **11**, 149–156 (2004).  
\* 2004 年 1 月 13 日付の日刊工業新聞、2004 年 5 月 21 日付の科学新聞に掲載される
  2. O. Nureki, K. Watanabe, S. Fukai, R. Ishii, Y. Endo, H. Hori, and S. Yokoyama  
“Deep knot structure for construction of active site and cofactor binding site of tRNA modification enzyme”  
*Structure*, **12**, 593–602 (2004).
  3. K. Tomita, S. Fukai, R. Ishitani, T. Ueda, N. Takeuchi, D. G. Vassylyev, and O. Nureki  
“Structural basis for template-independent RNA polymerization”  
*Nature*, **430**, 700–704 (2004).  
\* 2004 年 8 月 5 日付の日刊工業新聞に掲載される、*Nature Struct. & Mol. Biol.* 誌 News and Views で紹介される (Vol. 11, p807–808 (2004))
  4. K. Nakanishi, S. Fukai, Y. Ikeuchi, A. Soma, Y. Sekine, T. Suzuki, and O. Nureki  
“Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied with a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **21**, 7487–7492 (2005).
  5. K. Nakanishi, Y. Ogiso, T. Nakama, S. Fukai and O. Nureki  
“Structural basis for anticodon recognition by methionyl-tRNA synthetase”  
*Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 931–932 (2005)
- その他 国際 10 報、国内 8 報

### 受賞

1. 手島工業教育資金団手島記念研究賞(平成 17 年 2 月 22 日)

### 招待講演

1. O. Nureki “Structural basis for RNA maturation”  
Gordon Research Conference (2003, Newport, RI, USA)
2. O. Nureki “Structural genomics of genetic code translation systems”  
Second JSPS Forum in France (2003, Strasbourg, France)
3. O. Nureki and S. Kim  
“A Short Peptide Insertion Crucial for Angiostatic Activity of Human Tryptophanyl-tRNA Synthetase”  
ARS2004 (2004, Seoul, Korea)
4. O. Nureki “Structural Biology of tRNA Maturation”  
The Seventh R.O.C.-Japan Joint Seminar on Crystallography (2004, Tokyo, Japan)
5. O. Nureki “Structural biology on translation of genetic code using the third generation synchrotron, SPring-8” (Plenary Lecture)

The Tenth Symposium on Recent Advances in Biophysics (The Biophysics Society of Taiwan)  
(2005, Taiwan)  
その他 国内 7 件