

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370037
 研究課題名（和文） GatCAB におけるグルタミナーゼとキナーゼ反応のカップリング機構の
 解明
 研究課題名（英文） The coupling mechanism of glutaminase and kinase in GatCAB

研究代表者
 姚 閔（YAO MIN）
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授
 研究者番号：40311518

研究成果の概要：GatCABのアンモニアチャネルの開閉に重要と推定した残基の変異体調製に成功し、*in vivo*アッセイによって、E125が直接アンモニアの輸送に参与していることが検証された。SAXSを用いて得られた溶液中の構造情報は、tRNA^{Gln}のU1-A72がcradleドメインで、D-loopがC-tailドメインで認識することを示唆した。また、GatCABの1.9Å分解能での構造解析に成功し、tRNA認識に重要であるGatBのC-tailドメインの構造を明らかにし、GatBに特徴的な配列を見出した。更にGatCABとtRNA^{Gln}変異体のアッセイを行い、GatBのcradleドメインの₃₁₀-helixとC-tailドメインに保存されたGlyがtRNA^{Gln}認識に重要であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：蛋白質結晶学、構造生物学、コンピュータ科学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

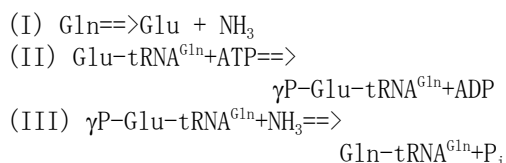
キーワード：GatCAB、グルタミナーゼ、キナーゼ、アンモニアチャネル、X線構造解析

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の正確な翻訳のためには、はじめに tRNA とアミノ酸との間の正確な対合が必要であり、それを司る酵素がアミノアシル tRNA 合成酵素である。正確な翻訳のためには、20 種類の対合に対応した 20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) が存在すると考えられていた。しかし、実際には、古細菌と多くの真正細菌には Gln の対合を触媒する酵素が存在しない^(1, 2)。これらの生物では、グルタミン酸の対合を司るアミノアシル tRNA 合成酵素 (GluRS) が Glu-tRNA^{Glu} のみならず

Glu-tRNA^{Gln} をも形成してしまう⁽³⁾。次いでミスチャージした Glu-tRNA^{Gln} は、amidotransferase (Glu-AdT) の働きにより、正常な Gln-tRNA^{Gln} に変換される。

真正細菌型 Glu-AdT は GatC、GatA、GatB の 3 つのサブユニットからなり (GatCAB 複合体)、また、古細菌型 Glu-AdT は GatD、GatE の 2 つのサブユニットからなる (GatDE 複合体)^(4, 5)。一方、真核生物と一部の真正細菌には GlnRS が存在しており、正常な Gln-tRNA^{Gln} が直接形成される。Glu-AdT の反応機構はこれまでの研究から、



以上の経路を経て進行することが明らかになっている。この過程において、本酵素は基質であるミスチャージした $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ を、大変よく似た $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ や $\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}$ から正確に識別している。また (I) と (II) の反応はカップリングしており、(II) が起きなければ (I) の反応もまた起きない⁽⁶⁾。このように本酵素の構造機能解析は、アミノアシル tRNA の厳密な認識機構の解明、グルタミンの加水分解反応とアミノアシル tRNA のリン酸による活性化反応のカップリング機構の解明を含んでおり、生命の理解にとって基本的に重要である。

クリックの tRNA アダプター仮説は、アミノ酸と tRNA の正確な対合を前提条件とする。それを司るアミノアシル tRNA 合成酵素は、生命にとって普遍的な酵素であると見なされていた。ところが、Dieter Soell のグループは、アミノアシル tRNA の合成過程に多様性があること、中でも $\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ の合成は、3 種の生物ドメイン (古細菌、真正細菌、真核生物) で異なる分子が関与していることを Nature 誌に発表した。翻訳の過程において、生物ドメイン間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、本酵素の構造・機能の解明は、生命の誕生と分子進化の観点から非常に興味深いものと考えられた。そこで我々のグループは、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* MU50 由来の真正細菌型 GatCAB の構造解析に着手し、GatCAB-Mg、GatCAB-Gln-Mg、GatCAB-Mg-ADP-AIF₄、GatCAB-Mn および GatCAB-Asn-Mg 複合体の構造解析に成功し、さらに変異体の tRNA 結合実験を行い、グルタミナーゼ部位、キナーゼ部位および tRNA 結合部位を特定し、30Å 離れた 2 つの活性部位 (グルタミナーゼ部位とキナーゼ部位) の間に分子内部のアンモニアチャンネルが存在していることを Science 誌に発表した⁽⁷⁾。一方、濡木理グループは、アメリカ、フランスの共同研究者と共に、古細菌型 Glu-AdT である GatDE-tRNA^{Gln} 複合体の構造を、我々と同時掲載の形で発表した⁽⁸⁾。2 つの酵素を比べると、両者はグルタミナーゼ活性を持つサブユニットを全く異にするのにもかかわらず、2 つの反応部位が長いチャンネルでつながっていることなど共通する点もある。しかし、いずれの構造からも、反応のカップリング機構については明らかにできず、その解明は今後の課題として残された。

2. 研究の目的

我々は、2 つの反応のカップリングは、アンモニアチャンネルの開閉により制御されているとの仮説を提唱している⁽⁷⁾。本申請課題では、この仮説を検証するために、ヘテロ 3 量体 GatCAB と、キナーゼ反応の基質であるミスチャージしたアミノアシル tRNA ($\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$) および ATP アナログ、さらにはグルタミナーゼ反応基質グルタミンの 6 元複合体の結晶構造解析を実施する。得られた構造を、基質結合前の構造と比較することにより、カップリング制御機構の解明を行う。

本研究は、アミノ酸代謝にかかわる分子 (GatA) が、アンモニアチャンネルを介して、タンパク質合成に使われていることを示す初めての構造生物学的な研究であり、カップリング機構を解明することの学術的意義は極めて高い。プロテオーム解析が進み、多くの蛋白質が単独ではなく相互に関連して機能していることが明らかにされてきている現在、6 元複合体の構造解析は、今後の構造生物学を先駆けするものとしても極めて重要な研究である。

ヘテロ 3 量体酵素 GatCAB と、 $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ 、グルタミンおよび ATP アナログの 6 元複合体の結晶構造解析を行うことで、 $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ 認識機構が明らかにされる。次いで、決定した構造をもとに、活性に関与するアミノ酸残基を推定し、これを置換したタンパク質を発現して構造機能解析することで、この酵素の複雑な反応機構を明らかにできる。また、 $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ 結合前後の立体構造を比較することで、 $\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ の結合が引き起こす構造変化を直接観察することができ、アンモニアチャンネルの開閉によりカップリング反応を制御しているかどうかを高分解能で解析することが可能になる。立体構造解析に成功して明らかになった分子内部のアンモニアチャンネルは、これまでに知られているアンモニアチャンネルが疎水性アミノ酸により構成されているのとは異なり、親水性アミノ酸により構成されていた⁽⁷⁾。このことから、GatCAB が持つアンモニアチャンネルの機構解明は未知の制御機構の解明につながると考えられる。

また、本研究で対象とする黄色ブドウ球菌は、近年、院内感染の原因菌として社会的問題になっている菌である。同じく耐性菌が問題になっている緑膿菌や、胃炎、胃がんなどを引き起こすとされるピロリ菌も、タンパク質合成に GatCAB を利用している。一方、人間を含む真核生物は GatCAB を持たないため、GatCAB は抗生物質のターゲットとして世界中に注目されている。このように本研究の成果は、医用への展開という側面においても重要な意義がある。

※参考文献

1. Wilcox, M., *et al.* (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 61, 229-362
2. Sturauch, MA., *et al.* (1988). *J. Bacteriol.*, 170, 916-920
3. Ibba, M., *et al.* (1997). *Trends. Biochem. Sci.*, 22, 39-42
4. Curnow, AW., *et al.* (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 229-236
5. Tumbula, DL., *et al.* (2000). *Nature*, 407, 106-110
6. Feng, L., *et al.* (2005). *J. Biol. Chem.*, 280, 8150-8155
7. Nakamura, A., Yao, M., *et al.* (2006). *Science*, 312, 1954-1958
8. Oshikane, H., Sheppard, K., *et al.* (2006). *Science*, 312, 1950-1954

3. 研究の方法

(1) GatCAB と tRNA^{Gln} の調製

蛋白質 GatCAB と tRNA^{Gln} の大量調製は、我々が既に確立した方法により高速クロマトグラフィーシステムを用いて行う。

(2) ndGluRS の調製

Glu-tRNA^{Gln} の合成に必須な蛋白質 ndGluRS の大量発現系で既に成功したが、純度の高い ndGluRS の大量調製はクロマトグラフィーにより数々の精製条件を試行していく。また、調製した ndGluRS のアミノアシル化活性を、¹⁴C-グルタミン酸を利用して行い、ndGluRS の最適な反応条件を検討する。

(3) Glu-tRNA^{Gln} と GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln}) の調製

精製した ndGluRS を用いて Glu-tRNA^{Gln} を調製する方法は既に確立したが、アミノアシル tRNA の不安定性という問題を解決するため、tRNA^{Gln} のアミノアシル化効率および GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln}) 複合体の精製法の改善に努める。

(4) GatCAB 変異体の調製

我々が提案したアンモニアチャネル制御機構を解明するために、アンモニアチャネルの開閉に重要と推定された残基 GatB-E125 (ゲート役)、GatB-R190、GatB-D126 (センサー役)、GatA-T175 の変異体の大量発現と調製を行う。行う際に、発現系には既に作成した GatCAB のプラスミドを用いて、quick-change 法を使用し、精製は既に確立した方法により高速クロマトグラフィーシステムを用いて行う。

(5) 活性測定による反応機構の検証

推定したアンモニアチャネル制御機構を検証するために、大腸菌 *in vivo* 活性測定系を利用する。Glu-tRNA^{Gln} を合成する ND-GluRS を大腸菌で発現させると、Glu-tRNA^{Gln} は大腸

菌には毒性を示すため大腸菌は生育できない。しかし、同時に GatCAB を発現させると、Glu-tRNA^{Gln} は Gln-tRNA^{Gln} へ変換され毒性が回避される。大腸菌 *in vivo* 活性測定系は大腸菌に ND-GluRS と GatCAB 変異体を共発現し、GatCAB 変異体の機能が阻害されると、大腸菌の生育が遅くなることを利用して変異箇所の評価を行うことによって活性の測定を行う。

(6) GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln}) 複合体の結晶化および X 線結晶構造解析

ゲルシフトアッセイにて決定した複合体形成条件をもとに、GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln}) を大量調製し、結晶化スクリーニングを行う。その際、自動蛋白質結晶化システムを用いて少量のサンプル(100nl/condition)で大量の条件を、短時間に自動的にスクリーニングする。何らかの初期結晶が得られた場合には、結晶化スケールをアップして、pH、沈殿剤濃度と複合体の濃度の3次元で結晶化条件の最適条件を探索し、場合によってはサンプル調製法の再検討を行い、回折実験が可能な良質な単結晶を作成する。良質な単結晶が得られた場合には、シンクロトロン放射光施設

(SPring-8、PF)にてクライオ条件下で X 線回折実験を行う。その際の予備実験は、X 線回折装置を用いて行う。

(7) GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln})-Glu-ATP アナログ複合体の結晶化と結晶条件の最適化

蛋白質 GatCAB、Glu-tRNA^{Gln}、ndGluRS の調製は既に確立した方法により、高速クロマトグラフィーシステムおよび RNA 専用高速クロマトグラフィーシステムを用いて行う。最適条件を用いて、ndGluRS により合成した Glu-tRNA^{Gln} と GatCAB の複合体の大量調製を行う。そして、純度の高いサンプルを用いて結晶化条件の最適化を行い、より良質な結晶を作製する。また、GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln}) の複合体を結晶化する際には、共結晶やソーキングなどの方法を利用して、最終目的である GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln})-グルタミン-ATP アナログの複合体の結晶作製を行う。回折実験に適用できる結晶を得た場合は、シンクロトロン放射光施設にてデータ収集し、構造解析へと進める。

(8) X 線結晶構造解析

良質な単結晶が得られた場合には、シンクロトロン放射光施設にてクライオ条件下で X 線回折実験を行う。その際の予備実験は、X 線回折装置を用いて行う。良質な高分解能回折データの収集は同様に放射光施設を利用する。構造因子の初期位相は、現在得られている GatCAB 単体の構造情報を利用した分子置換法より決定し、我々が開発した自動精密化プログラム LAFIRE を用いて構造精密化を行う。

(9) X線溶液小角散乱法

溶液中の GatCAB-(Glu-tRNA^{Gln})状態を調べるためには、X線結晶構造解析を進めるとともに、小角X線散乱による解析も平行して行う。これにより、溶液中での分子間の配向やフレキシビリティについての情報が得られる。X線散乱実験は放射光施設にて行い、分子モデリングにはプログラム GASBOR を用いる。X線結晶構造解析から得られる詳細な構造情報と、小角X線散乱により得られる動的な構造情報を併せることにより、より詳細にその立体構造を理解する事が可能となる。

4. 研究成果

我々は、Glu-tRNA^{Gln}をGln-tRNA^{Gln}に変換するtRNA依存アミドトランスフェラーゼGatCAB複合体の構造解析に成功し、グルタミナーゼ部位、キナーゼ部位およびtRNA結合部位を特定、30Å離れた2つの活性部位（グルタミナーゼ部位とキナーゼ部位）の間に、分子内部のアンモニアチャンネルが存在していることをScience誌に発表した。このアンモニアチャンネルの開閉によりグルタミナーゼ反応とキナーゼ反応をカップリングする制御機構を解明するために、2007年度では、GatCABのアンモニアチャンネルの開閉に重要と推定された残基GatB-E125（ゲート役）、GatB-R190、GatB-D126（センサー役）、GatA-T175の変異体GatB-E125A、GatB-E125S、GatB-E125D、GatB-E125Q、GatB-R190D、GatB-R190D、GatB-D126A、GatA-T175A、GatA-T175Vの発現・可溶化に成功した。2008年度には、これらの変異体を用いてin vivo活性測定によりアンモニアチャンネル制御機構の解明を行った。

まず、初めに大腸菌in vivo活性測定系を構築した。その大腸菌in vivo活性測定系は大腸菌にND-GluRSとGatCAB変異体を共発現し、GatCAB変異体の機能が阻害されると、大腸菌の生育が遅くなることを利用して変異箇所の評価を行う。実際、活性測定を行った結果、アンモニアチャンネルを制御しているゲート(E125)は立体障害でアンモニアチャンネルを制御していると考えていたが、直接アンモニアの輸送に関与していることが示唆された。

2007年度、GatCABの結晶化条件の最適化により、GatCAB単体の1.9Å分解能での構造解析に成功し、tRNA認識に重要であると示唆されているGatBのC-tailドメインの構造を明らかにした(図1)。グルタミナーゼとキナーゼ反応のカップリング機構を解明するために、2008年度は、得られた全長の構造に基づいて、バイオインフォマティクス、変異体のアッセイおよびX線溶液小角散乱(SAXS)の解析によって詳細なtRNA^{Gln}認識機構の解明を行った。

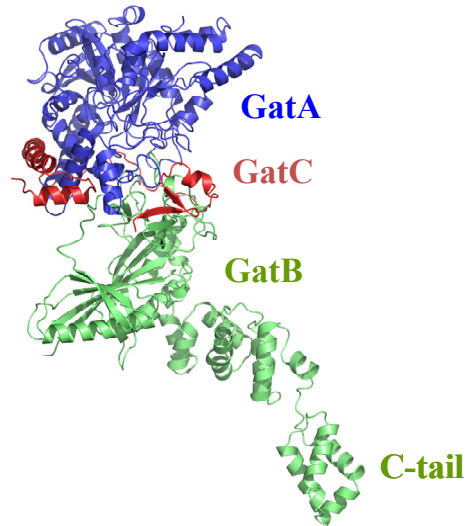


図1. GatCABの構造(1.9 Å)

GatCAB全長とGatDE-tRNA^{Gln}複合体の立体構造を重ね合わせることでGatCAB-tRNA^{Gln}複合体モデルを作成した。次に作成したGatCAB-tRNA^{Gln}複合体モデルにおいて、tRNA^{Gln}の認識に関与すると予想される部位に注目し一次構造比較を行ったところ、GatBにGatCABに特徴的な配列（cradleドメインにTurn(3₁₀ヘリックス)、C-tailドメインにGlyが保存されている)を見出すことに成功した。さらにGatCABとtRNA^{Gln}変異体を作成し、tRNA^{Gln}の認識をゲルシフトアッセイとアミドトランスフェラーゼアッセイで確認したところ、GatBのcradleドメインに存在する3₁₀ヘリックスとC-tailドメインに保存されたGlyがtRNA^{Gln}認識に重要であることが明らかになった (図2、論文準備中)。

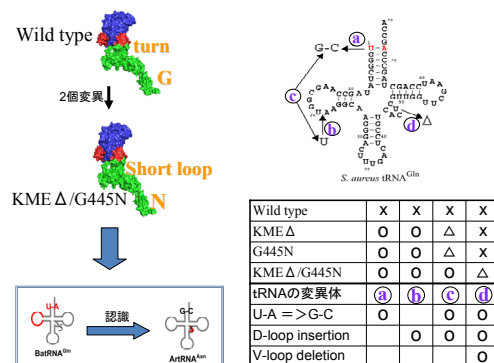


図2. GatCABとtRNA^{Gln}変異体のアッセイ

さらに、X線溶液小角散乱法(SAXS)を用い、溶液中でのGatCAB-tRNA^{Gln}複合体の立体構造情報を得ることを試みた。その結果、GatCAB単体とは大きく異なるGatCAB-tRNA^{Gln}複合体の分子外形をモデリングでき、GatBのみでtRNA^{Gln}を認識し、tRNA^{Gln}のU1-A72はcradleドメイン、D-loopはC-tailドメインで認識することが示唆された(図3)。

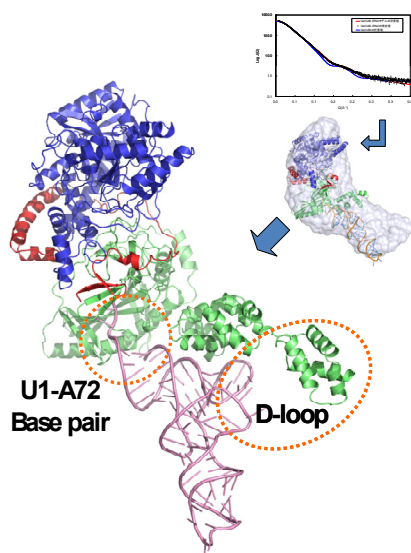


図3. GatCAB-tRNA^{Gln}複合体のモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yong-Gui Gao, Hiroaki Suzuki, Hiroshi Itou, Yong Zhou, Yoshikazu Tanaka, Masaaki Wachi, Nobuhisa Watanabe, Isao Tanaka, Min Yao, Structural and Functional Characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a Transcriptional Repressor Involved in l-Lactate and Sugar Utilization, *Nucl. Acid Res.*, 36, 7110-7123, 2008, 査読有
- ② Xiaodong Zhang, Takashi Nakashima, Yoshimitsu Kakuta, Min Yao, Isao Tanaka, Makoto Kimura, Crystal structure of an archaeal Ski2p-like protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Protein Sci.*, 17, 136-145, 2008, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 中村彰良、山根潤二、Zhou Qian、姚閔、田中勲：真正細菌型GatCABと古細菌型GatCABの比較、日本生物物理学会北海道支部例会、2009年3月9日、札幌市
- ② 中村彰良、山根潤二、姚閔、田中勲：真正細菌型GatCABのtRNA認識機構と分子進化、BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008年12月9-12日、神戸市
- ③ Akiyoshi Nakamura, Junji Yamane, Min Yao, Isao Tanaka: tRNA^{Gln} recognition loop in bacterial GatCAB, AARS2008 (International Conference on Aminoacyl-tRNA Synthetases: from Basic Mechanisms to Systems Biology), 7-11 September (2008), France
- ④ Akiyoshi Nakamura, Jyunji Yamane, Min Yao, Isao Tanaka: High resolution structure of bacterial GatCAB reveals the C-tail domain structure in GatB, XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008), 23-31 August (2008), Osaka
- ⑤ 中村彰良、山根潤二、姚閔、田中勲：真正細菌型GatCABが獲得したtRNA^{Gln}認識ループ、日本分子生物学会第8回春季シンポジウム、2008年5月25-27日、札幌市
- ⑥ 山根潤二、中村彰良、周勇、十亀弘子、辻下英樹、武本浩、姚閔、田中勲：黄色ブドウ球菌由来GatCABの高分解能X線結晶構造解析、日本結晶学会2007年度年会、2007年12月1-2日、東京都

[その他]

ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姚 閔 (YAO MIN)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：40311518

(2) 研究分担者 ※2008年度は連携研究者

田中 勲 (TANAKA ISAO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70093052

(3) 連携研究者

なし