

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770093

研究課題名(和文) tRNA再生酵素 - 基質複合体のX線結晶構造解析

研究課題名(英文) X-ray Crystallography of tRNA recycling enzyme:substrate complex

## 研究代表者

伊東 孝祐 (Ito, Kosuke)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：20502397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：tRNA再生酵素は、翻訳が正常に終了しなかった際に生じるペプチジルtRNAを、ペプチドとtRNAに分離してtRNAを正常にリサイクルさせる役割を担う。本研究で我々は、tRNA再生酵素とtRNAのCCA-acceptor-T Cドメイン(tRNA再生酵素が認識する基質のtRNA部位領域)との複合体の結晶構造を決定した。その結果、我々は塩基配列が様々であるtRNAの認識を、1種類のtRNA再生酵素で行える構造基盤を明らかにした。さらに我々は、得られた立体構造と酵素学的な機能解析結果、およびドッキングシミュレーションにより、tRNA再生酵素:Peptidyl-tRNA複合体モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：tRNA recycling enzyme cleaves the ester bond between the peptide and the tRNA of peptidyl-tRNA molecules, which are produced by aborted translation, to recycle tRNA for further rounds of protein synthesis. Here we have determined the crystal structure of the tRNA recycling enzyme in complex with the tRNA CCA-acceptor-T C domain, the enzyme-binding region of the tRNA moiety of the substrate. The structure provided insights into how tRNA recycling enzyme accepts the diverse sequences of the elongator-tRNAs as substrate components. Furthermore, we proposed an authentic tRNA recycling enzyme:peptidyl-tRNA complex model, based on the present structure and the enzymatic studies' results.

研究分野：構造生物学

キーワード：tRNA再生酵素 ペプチジルtRNA 翻訳 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

tRNA は遺伝情報の解釈を担う生体分子である。タンパク質合成は、リボソーム中でこの tRNA 上にペプチドが伸長し、終始コドンが存在するとペプチドが tRNA から切り離されて正常に終了する反応である。しかし、生体内では実際、ストレスやウイルス感染、アミノ酸飢餓、mRNA の損傷などにより、タンパク質合成は異常終了する。この場合 tRNA は、伸長途中のペプチドが結合したままのペプチジル tRNA として細胞質に放出されるが、ペプチジル tRNA の状態では tRNA はその機能を発現することが出来ない。そのため、ペプチジル tRNA の蓄積によりタンパク質合成システムは停止へと追いやりられ、生命はその活動を維持することが出来なくなる。tRNA 再生酵素(ペプチジル tRNA 加水分解酵素)は、このペプチジル tRNA をペプチドと tRNA に分離することで、tRNA をタンパク質合成の材料としてリサイクル可能な状態にし、タンパク質合成の停滞を解消する(図 1) (Heurgué-Hamard, V., *et al.*, *EMBO J.*, 1996, 15:2826-2833)。tRNA 再生酵素は、脊椎動物からバクテリアに至るまで存在しており、あらゆる種のタンパク質合成に無くてはならない必須タンパク質である。

生体内では 1 つのアミノ酸に対して 2 種類以上の tRNA が存在するため、タンパク質合成には通常 40 種以上の tRNA が使用されている。また、ペプチドのアミノ酸配列は翻訳する遺伝情報により様々である。すなわち、生体内のペプチジル tRNA 分子種は、ペプチド部位および tRNA 部位ともに配列も形も様々である。一方、現在までの酵素学的解析により、tRNA 再生酵素はペプチジル tRNA のペプチド部位と tRNA 部位の両方を認識していることがわかっている。それにも関わらず、上記の如く多様なペプチジル tRNA 分子種全てを、なぜ 1 種類の tRNA 再生酵素で認識できるのか、その基質認識多様性の仕組みは分かってない。また tRNA 再生酵素は、ペプチジル tRNA と構造が類似しているにも関わらず、タンパク質合成の材料であるアミノアシル tRNA を tRNA に誤変換することは無い。その基質認識特異性の仕組みも分かってない。まして、以上の多様性と特異性という相反する 2 つの特性をどの様に同時に兼ね備えるのか、その分子基盤は全く不明である。

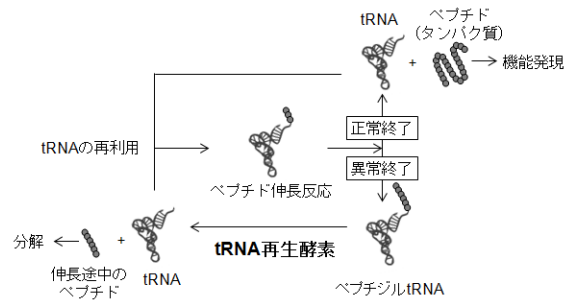


図 1 tRNA 再生酵素の役割

## 2. 研究の目的

本研究では、解析が困難であった tRNA 再生酵素-基質(ペプチジル tRNA)類似体複合体の立体構造を、申請者が立案・開発した構造が安定な tRNA フラグメントを使用することで決定する。さらに、その構造を精査することで、生体内に多種類存在する tRNA の再生が 1 種類の tRNA 再生酵素により行われる仕組みを明らかにする。また tRNA 再生酵素は、タンパク質合成の材料となるアミノアシル tRNA を tRNA に誤まって誤変換することはしないが、本研究ではその特異性の仕組みも明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の手順で行った。

### (1) tRNA 再生酵素・tRNA フラグメント複合体の結晶化

tRNA は柔軟性に富む分子であるため結晶化には適さない。そこで申請者らは、tRNA 分子全体ではなく、tRNA 再生酵素と相互作用する部分のみから構成される構造が安定な tRNA フラグメントの合成を検討した。合成は、*in vitro* 転写系で行った。また、tRNA 再生酵素は、大腸菌由来のものを大腸菌を使用して大量発現させた。結晶化の条件検討は、以上の二者(tRNA 再生酵素と tRNA フラグメント)を混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。

### (2) X 線回折データの収集

X 線回折データの収集は、本学の X 線回折装置、および国内の放射光共同利用施設(高エネルギー加速器研究機構(筑波)の Photon Factory、および財団法人高輝度光科学研究センター(播磨)の SPring-8)にて行った。

### (3) 立体構造計算

(2) で収集した X 線回折データをもと

に立体構造計算を行った。計算は、tRNA 再生酵素単独の構造をもとに分子置換法で行った。

#### (4) 酵素機能解析

構造解析で分かった tRNA と相互作用している tRNA 再生酵素のアミノ酸残基に変異を導入し、活性測定を行った。そして、構造と機能の相関について解析した。なお、tRNA 再生酵素はアミノアシル tRNA の N 末端にペプチド結合が 1 つ存在するアセチル-アミノアシル tRNA を基質とすることが報告されている。そこで本研究では、放射性同位体アミノ酸をチャージしたアミノアシル tRNA を合成し、そのアミノアシル tRNA に無水酢酸を反応させたアセチル-アミノアシル tRNA を基質として活性測定を行った。もし tRNA 再生酵素により基質がアセチル-アミノ酸と tRNA に分離されれば、エタノール沈殿の上清に放射活性が増えるため、tRNA 再生酵素の酵素活性を定量することができる。

### 4. 研究成果

#### (1) tRNA 再生酵素・tRNA フラグメント複合体の結晶化

まず、構造が安定な tRNA フラグメントの合成を *in vitro* 転写系を利用して検討し、tRNA 再生酵素との共結晶化を試みた。その結果、CCA-acceptor-TΨC ドメインのみからなる tRNA フラグメント (図 2) を仕様することで微結晶を得ることができた。



図 2 tRNA CCA-acceptor-TΨC ドメイン

次に、結晶化の最適化検討を行った。その結果、100 mM acetate buffer pH 5.2、20%(w/v) 1,4-butanediol、30 mM glycyl-glycyl-glycine を結晶化試薬として使用することで、X 線結晶構造解析に適した良質な結晶を得ることができた (図 3)。

#### (2) X 線回折データの収集

X 線回折データの収集は SPring-8 の

BL41XU にて行った。その結果、良好な回折データが得られ、計算の結果、分解能 2.4 Å、空間群 P6<sub>1</sub>、格子定数 a = b = 55.1 Å、c = 413.1 Å であることがわかった (図 4)。

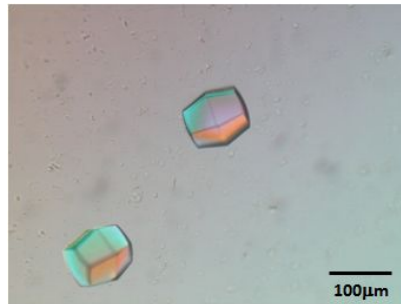


図 3 tRNA 再生酵素・tRNA CCA-acceptor-TΨC ドメイン複合体の結晶

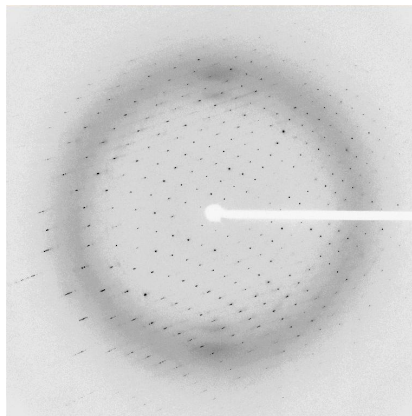


図 4 tRNA 再生酵素・CCA-acceptor-TΨC ドメイン複合体の回折斑点

#### (3) 立体構造計算

得られた回折データから分子置換法により立体構造計算を行い、構造を決定することに成功した (図 5)。

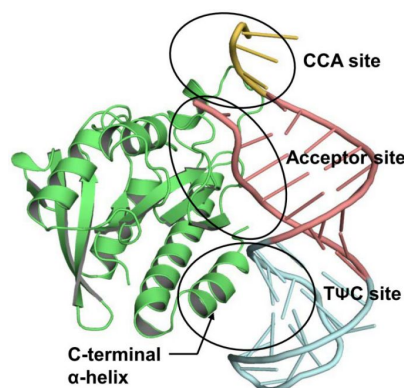


図 5 tRNA 再生酵素・CCA-acceptor-TΨC ドメイン複合体の全体構造

#### (4) 酵素機能解析および構造機能についての考察

Pth は、3ヶ所で tRNA と相互作用していた。1つ目の場所では、tRNA の CCA 末端と活性部位を覆うループ（以下 CCA サイト）とが相互作用していた（図 6）。2つ目の場所では、tRNA の acceptor stem 部位と Pth の活性部位近くのプラスチャージに電荷を帯びた領域（以下 Acceptor サイト）とが相互作用していた（図 7）。3つ目の場所では、tRNA の T $\Psi$ C arm の副溝に Pth の C 末端ヘリックス部位（以下 T $\Psi$ C サイト）とが相互作用していた（図 8）。この T $\Psi$ C サイトにおける相互作用は、今まで予測・報告されていない結果であり、現在までに部位特異的変異体を使用した酵素活性測定が行われていなかった。そこで、我々は T $\Psi$ C サイトで tRNA と相互作用が観察されたアミノ酸を変異させて活性測定を行った。

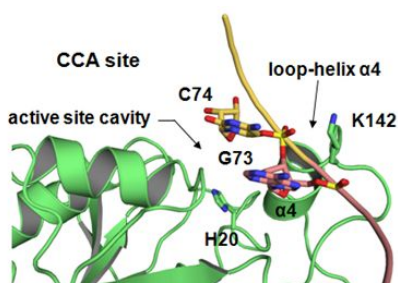


図6 CCAサイトとtRNAの相互作用

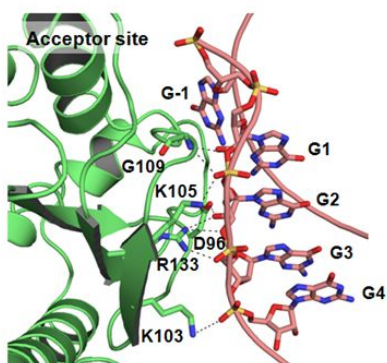


図7 AcceptorサイトとtRNAの相互作用

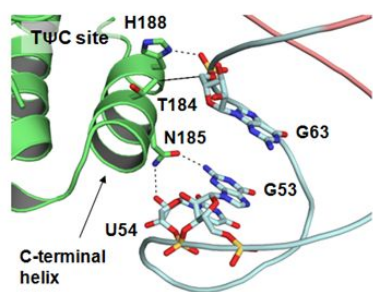


図8 T $\Psi$ CサイトとtRNAの相互作用

T $\Psi$ C サイトにおいて、tRNA と相互作用していたアミノ酸残基は、Asn185 と His188 であったので、我々はこれらのアミノ酸をそ

れぞれアラニンに置換した変異体、および両方とも置換した変異体を作製して活性測定をおこなった。その結果を表 1 に示す。

表 1 活性測定の結果

Pth variants	<i>k</i> <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	<i>K</i> <sub>m</sub> ( $\mu$ M)	relative <i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub>
WT	11.7 $\pm$ 0.65	4.71 $\pm$ 0.77	100
N185A	5.80 $\pm$ 0.80	13.4 $\pm$ 2.36	17.8
H188A	7.93 $\pm$ 0.53	17.12 $\pm$ 2.03	18.6
N185A-H188A	8.70 $\pm$ 0.83	26.9 $\pm$ 3.95	13

表 1 の様に、N185A、H188A 変異体ともに活性が 1/5 程度に低下した。N185A/H188A double mutant では 1/10 近くまで活性が低下した。これらの結果は、N185 や H188 を介した tRNA の T $\Psi$ C arm と tRNA 再生酵素の C 末端ヘリックスとの相互作用が、酵素機能発現において重要な役割を果たすことを示している。

上記の如く、本構造解析により、tRNA 再生酵素は CCA サイト、Acceptor サイト、T $\Psi$ C サイトにおいて多くの核酸と相互作用していることが明らかになった。また、tRNA 再生酵素は、高度に保存されている G53 以外については、tRNA のリン酸バックボーンとリボースのみを認識し、塩基とは相互作用していないことも同時に明らかになった。この基質認識様式こそが、塩基配列が様々である tRNA の認識を、1 種類の tRNA 再生酵素で行える構造基盤であると考えられる。

さらに我々は、得られた立体構造と酵素的な機能解析結果、およびドッキングシミュレーションにより、tRNA 再生酵素・ペプチジル tRNA 複合体モデルを構築した（図 9）。その結果、tRNA 再生酵素はセリンプロテアーゼ・アシル中間体と構造が類似していることが示唆された。そのため、tRNA 再生酵素はセリンプロテアーゼ・アシル中間体の加水分解と類似した機構で反応が進行することが考えられる。

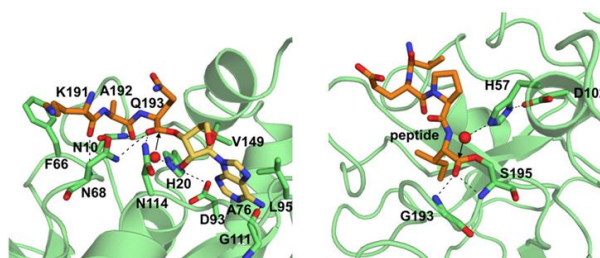


図 9 (左) tRNA 再生酵素・ペプチジル tRNA 複合体モデル、(右) セリンプロテアーゼ・アシル中間体

## 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) Matsumoto A., Shimizu Y., Takemoto C., Ueda T., Uchiumi T., and Ito K. (2013) Crystallization and preliminary X-ray analysis of peptidyl-tRNA hydrolase from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69 (Pt 3), 332-335. doi: 10.1107/S1744309113003424 査読有

2) Ito K., Murakami R., Mochizuki M., Qi H., Shimizu Y., Miura K., Ueda T., and Uchiumi T. (2012) Structural basis for the substrate recognition and catalysis of peptidyl-tRNA hydrolase. *Nucleic Acids Res.* 40(20), 10521-10531. doi: 10.1093/nar/gks790 査読有

[学会発表](計6件)

1) 上原祐二、伊東孝祐、村上僚、松本愛弥、三好智博、清水義宏、竹本千重、横川隆志、上田卓也、内海利男「立体構造解析に基づいたペプチジル tRNA 加水分解酵素の酵素学的機能解析」第9回 無細胞生命科学研究会、ポスター P-1、2014/10/8-9、大阪大学医学部 銀杏会館 (大阪)

2) 伊東孝祐、村上僚、望月正弘、斉浩、清水義宏、三浦謹一郎、上田卓也、内海利男「Peptidyl-tRNA hydrolase の基質認識および触媒反応の構造基盤」第15回 日本RNA学会年会(2013)、(口頭)O-47、2013/7/24-7/26、愛媛県県民文化会館ひめぎんホール(松山)

3) 伊東孝祐、村上僚、望月正弘、斉浩、清水義宏、三浦謹一郎、上田卓也、内海利男「Peptidyl-tRNA hydrolase の基質認識および触媒反応の構造基盤」第35回日本分子生物学会年会(2012)、(ポスター)1P-0239、12/11-12/14、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(博多)

4) 伊東孝祐、村上僚、望月正弘、斉浩、清水義宏、三浦謹一郎、上田卓也、内海利男「Peptidyl-tRNA hydrolase の基質認識および触媒反応の構造基盤」第7回 無細胞生命科学研究会(2012)、(ポスター)P1、11/17-11/18、愛媛大学(松山)

5) 村上僚、伊東孝祐、望月正弘、斉浩、清水義宏、三浦謹一郎、上田卓也、内海利男「立体構造に基づくペプチジル tRNA 分解酵素の酵素学的機能解析」第53回新潟生化学懇話会、ポスターセッションプログラムP3、2012/6/30、新潟大学(新潟)

6) 松本愛弥、伊東孝祐、竹本千重、内海利男「*T. thermophilus* ペプチジル tRNA 加水分解酵素のX線結晶構造解析」第53回新潟生化学懇話会、ポスターセッションプログラムP4、2012/6/30、新潟大学(新潟)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/uchiumi-ito/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 孝祐 (Ito Kosuke)  
新潟大学・自然科学系・助教  
研究者番号: 20502397

(2)研究分担者

-

(3)連携研究者

-