

令和元年6月4日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18532

研究課題名(和文) タンパク質合成におけるアミノ酸の高精度選択機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of amino-acid selection in protein synthesis

研究代表者

森 義治 (Mori, Yoshiharu)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：90646928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではアミノ酸をtRNAに結合させるタンパク質であるアミノアシルtRNA合成酵素を研究対象とした。このタンパク質はタンパク質合成の精度を保証するために必要である。間違ったアミノ酸を結合させることはタンパク質の品質を下げることから、適切なアミノ酸のみを結合させなければならないが、この機構はよく分かっていなかった。本課題では、アミノアシルtRNA合成酵素において適切なアミノ酸のみがなぜ選択されるのかということに対する分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の研究結果を出すにあたって、計算生物学における様々な手法を用いた。例えば分子科学分野における分子動力学シミュレーションや量子化学計算、バイオインフォマティクスにおける配列解析を行った。これらの手法の融合により、物理化学的および生物学的な理解を同時に得ることができるようになった。

また本課題の対象となったタンパク質は細菌に対する抗生物質の対象となっており、アミノ酸の結合機構を理解することは、このような薬物の作用機序に対する新しい理解をもたらすことになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aminoacyl-tRNA synthetase (AARS) catalyzes the aminoacylation of tRNA. The aminoacylation of tRNA is needed before protein synthesis in ribosomes. Therefore the function of AARS is important.

In this study, we used a threonyl-tRNA synthetase (ThrRS) to study threonine binding to ThrRS and its molecular insights. This enzyme selects a threonine molecule and the threonine molecule binds to ThrRS. Similar amino acids such as valine and serine are not bonded to a tRNA corresponding to threonine. We studied the selection mechanism of a threonine molecule in ThrRS using molecular dynamics simulations, quantum chemical calculations, and a multiple sequence alignment. We found that several amino acid residues are highly conserved and that these amino acid residues contribute the free energy profile of the ligand binding in threonyl-tRNA synthetase.

We revealed the molecular mechanism of the selection of a threonine molecule in ThrRS using several theoretical and bioinformatics methods.

研究分野：生物物理学

キーワード：スレオニルtRNA合成酵素 分子動力学シミュレーション 配列解析 共変異解析 結合親和性 結合自由エネルギー リガンド選択性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 【研究対象】 tRNA にアミノ酸を結合させるタンパク質：アミノアシル tRNA 合成酵素

分子生物学のセントラルドグマは、DNA に存在する遺伝子は mRNA（メッセンジャーRNA）に転写され、リボソームにおいてタンパク質が合成され翻訳が行われる、ということを述べている。この際、遺伝暗号に従って mRNA に tRNA（トランスファーRNA）が結合しタンパク質が合成されていく。それぞれの tRNA には対応するアミノ酸が結合されているが、このようにアミノ酸を tRNA に結合させる酵素はアミノアシル tRNA 合成酵素（AARS）とよばれている（図 1）。

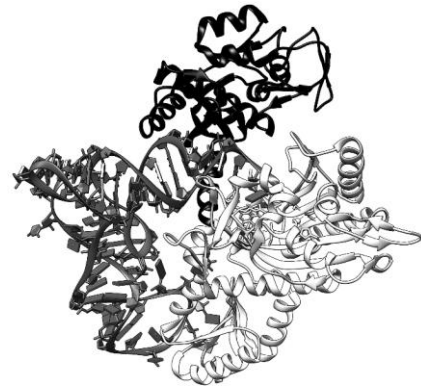


図 1 スレオニル tRNA 合成酵素の立体構造

(2) アミノアシル tRNA 合成酵素におけるアミノ酸の高精度選択機構

アミノアシル tRNA 合成酵素における生物学的な課題は、あたえられたアミノ酸を対応する tRNA に正確に結合させることである。例えばスレオニンに対応する tRNA に結合させるアミノアシル tRNA 合成酵素（スレオニル tRNA 合成酵素：ThrRS）は、スレオニンと構造や性質が似ているバリンやセリンを tRNA に結合させてしまうことを防がなくてはならない。

このようなことを達成するため、アミノアシル tRNA 合成酵素においてアミノ酸結合反応が起こる場では、通常アミノ酸の形に対応する「アミノ酸結合サイト」が存在する。さらに間違っただアミノ酸が tRNA に結合してしまった場合には、酵素の別の部位でそれを取り除く反応を触媒する「校正サイト」も存在する。このような機構により tRNA へのアミノ酸のつけ間違いが生じる可能性は低くなるようになっている（図 2）。

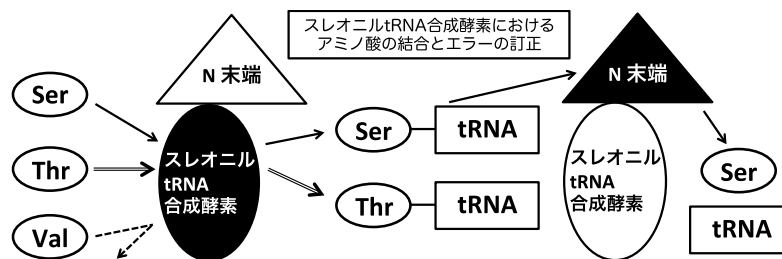


図 2 スレオニル tRNA 合成酵素におけるスレオニンの選択的結合

2. 研究の目的

(1) 「アミノ酸結合サイト」での結合エネルギーの評価

まずアミノ酸や類似アミノ酸の化合物に対するそれぞれのサイトでの親和性、つまり結合エネルギーを評価することを目的とする。それぞれのアミノ酸に対応する tRNA に正しいアミノ酸を結合させる場合や不適切な化合物を除去するためには、この反応の触媒として働くアミノアシル tRNA 合成酵素における特定の分子選択性を評価する必要があるからである。

(2) 「アミノ酸結合サイト」における選択的結合の分子機構

さらにその親和性を決定するアミノアシル tRNA 合成酵素中のアミノ酸残基を特定することを目的とする。結合エネルギーの相違がそれぞれのアミノ酸やその化合物において見られるのはなぜか、つまり酵素に存在するどのようなアミノ酸が特定の分子選択性を決定しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全原子モデルに基づく分子動力学シミュレーションにより分子論的な解明を行う

生体分子の構造変化や相互作用を理解する際には、原子間の距離などを計算し、その変化をみることにより相互作用の知見を得ることができる。生体分子におけるイオン性相互作用および水素結合、さらに水分子と生体分子間の相互作用を理解するためにも、それらに関わっている原子が含まれていることが必要不可欠であり、全原子モデルに基づく分子動力学シミュレーションを実行する必要がある。

(2) 高効率な構造サンプリング手法に基づくリガンド結合に関する自由エネルギー計算

アミノ酸や有機小分子のような分子がタンパク質と結合する場合には、その途中に遷移状態があることが多い。途中に高いエネルギー障壁が存在することにより十分な構造サンプリングができず、結合エネルギーの正確な評価ができなくなる。このような困難を克服するために多くの分子シミュレーションにおける構造サンプリング法が開発されてきた。このような方法として例えばアンブレラサンプリング法があり、分子構造の探索を高効率で行うことができる(図3)。タンパク質に対するアミノ酸やその化合物の結合前、反応中、結合後のいずれをも正確に取り扱うことができる。

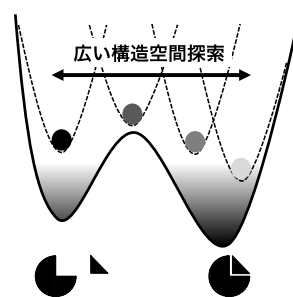


図3 アンブレラサンプリング法の概念図

(3) バイオインフォマティクスを使用した重要なアミノ酸残基の特定

分子動力学シミュレーションにより、いくつかのアミノ酸残基がスレオニンを安定化させていると推測された。そのようなアミノ酸残基が生物学的に重要であるかを理解するため、大腸菌やヒトを含む多くの生物種におけるスレオニル tRNA 合成酵素の配列に対してマルチプルアライメント作成を実行した。このような解析を行うことは研究計画時には想定していなかったが、分子動力学シミュレーションの結果およびバイオインフォマティクスの使用により、生物学的な重要な示唆を得たためこのような解析を続行して行った。

4. 研究成果

(1) スレオニル tRNA 合成酵素の高精度分子モデルの構築

本研究ではスレオニル tRNA 合成酵素に結合する過程で選択的にスレオニンを取り込む分子機構を、分子動力学シミュレーションとバイオインフォマティクスの方法により解析した。

初期構造として大腸菌由来のスレオニル tRNA 合成酵素の X 線結晶構造を用いて計算を行った。スレオニル tRNA 合成酵素分子は二量体を形成している。二量体的一方においては、アミノ酸結合部位にスレオニンが結合していないが、一方にはスレオニンが結合している。スレオニン結合部位には亜鉛イオンが存在し、いくつかのアミノ酸側鎖がその亜鉛イオンに配位しており、またリガンドとしてのスレオニンも亜鉛イオンに配位する(図4)。

この結合部位に関して分子動力学シミュレーションを安定的に行うことができるかどうかを確かめるため、複数の亜鉛イオンの力場を検証し、使用する力場を決定した。またこの力場が妥当であることを確かめるために QM/MM 計算により亜鉛を含む系の安定構造を計算し、力場による記述が妥当であることを確かめた。

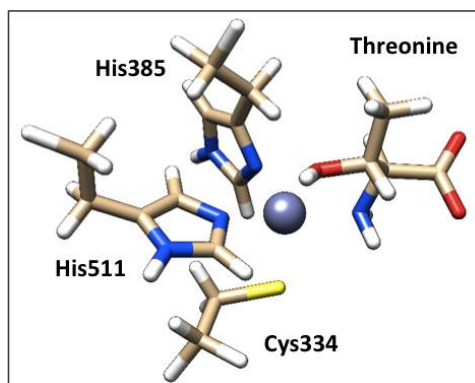


図4 ThrRS におけるスレオニン結合部位

(2) リガンドとしてのスレオニン結合の自由エネルギー計算とその結合機構

リガンドとしてスレオニンが結合している状態とそうでない状態における ThrRS に対して分子動力学シミュレーションを実行した。この際、アンブレラサンプリング法を用いることにより構造サンプリングを向上させた。

以上の結果を用いてスレオニンの結合自由エネルギーや ThrRS の結合部位における分子構造の解析を行った。結合部位にスレオニンが結合していた構造においては、スレオニンの結合自由エネルギーは結合時に低くなり、また外部と遷移状態との自由エネルギー差も小さいことが分かった。スレオニンが結合していなかった構造では外部にある状態と結合状態で自由エネルギー差はほとんどなかった。

遷移状態と安定状態における自由エネルギー差を理解するために、その反応座標に対応する分子構造を抽出した。この結果から、遷移状態ではアミノ酸結合サイトにおいて水分子が存在することが分かり、この水分子を取り除くこと(リガンド結合時)または水分子の侵入(リガンド解離時)が遷移状態のエネルギーを決めていることを理解することができた。

ふたつの構造の間でこのような差が生じる理由を理解するために、スレオニンと結合部位近傍のアミノ酸との距離分布を計算した。この結果スレオニンと近傍のアスパラギン酸との静電相互作用が安定化に寄与しているということが分かった。

(3) スレオニンの選択的結合機構と類似化合物の排除機構

スレオニンと他の類似したアミノ酸（セリン・バリンなど）は、ThrRS に対する結合能が異なる。そうでなければ、スレオニンに対応する tRNA には別のアミノ酸が結合してしまい、合成されるタンパク質は機能が働かなくなる可能性がでてきてしまう。このようにリガンドを区別している機構を理解するために、スレオニンの側鎖を変化させた複数の化合物を結合した状態における ThrRS での分子動力学シミュレーションを実行し、結合部位における分子構造の解析を行った。この結果より、スレオニン結合における化合物の選択においては、結合部位近傍の高度に保存された非極性アミノ酸残基が相互作用エネルギー的にも重要な寄与をしていることが分かった。

(4) ThrRS におけるリガンド選択に重要なアミノ酸の特定とその分子進化的特性

バイオインフォマティクスにおけるマルチプルアラインメントを使用した配列解析および立体構造の解析から、分子動力学シミュレーションの結果から重要だと推測されたアミノ酸は高度に保存されていることが分かった。リガンド結合の選択性に重要な ThrRS 中のアミノ酸は近傍の Thr, Ala および Gln 残基であった（図 5）。Thr は特によく保存されていたため、野生型のタンパク質とその Thr 変異体（Thr → Ala など）について結合自由エネルギー計算を行ったところ、Thr は結合エネルギーに影響を及ぼすことが分かった。一方 Ala, Gln 残基は、保存性は高くないが、バイオインフォマティクスによる共進化解析により他のアミノ酸残基と共変異していることが分かり、同様の変異体を使用した月号自由エネルギー計算でも結合エネルギーに影響を及ぼすことが分かった。

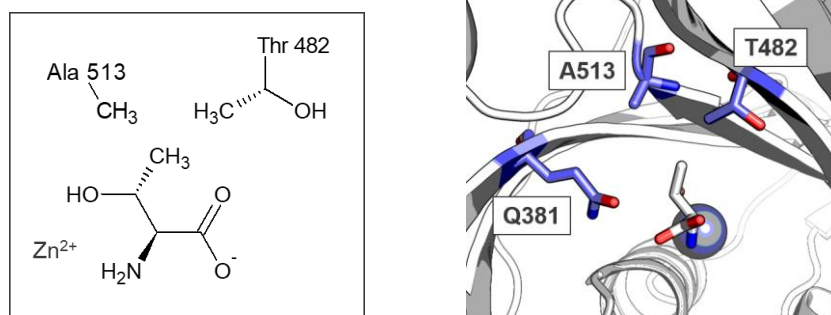


図 5 リガンドのスレオニン近傍における結合決定アミノ酸

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 11 件）

- ① 森義治「アミノ酸をリガンドとする酵素における選択的リガンド結合機構」
日本物理学会第 74 回年次大会, 2019 年
- ② 森義治「分子動力学法と配列解析を用いたタンパク質ーリガンド相互作用の研究」
第 8 回日本生物物理学会関東支部会, 2019 年
- ③ 森義治「ThrRS に対するスレオニンの結合親和性に関する研究：分子シミュレーションと配列保存性による解析」
第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年
- ④ 森義治「分子動力学法と配列解析による thrRS とスレオニンの結合親和性に関する研究」
日本薬学会第 138 年会, 2018 年
- ⑤ 森義治「スレオニル tRNA 合成酵素における天然リガンドと類似化合物との相互作用解析」
第 45 回構造活性相関シンポジウム, 2017 年
- ⑥ 森義治「スレオニル tRNA 合成酵素において高度に保存されたアミノ酸とその機能の物理化学的考察」
第 11 回分子科学討論会, 2017 年
- ⑦ Yoshiharu Mori, Amino-acid selection in aminoacyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations, The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, 2017
- ⑧ 森義治「アミノアシル tRNA 合成酵素での基質結合における自由エネルギー計算と分子構造からの考察」
第 30 回分子シミュレーション討論会, 2016 年
- ⑨ 森義治「Theoretical study on the molecular mechanism of amino-acid selection in threonyl-tRNA synthetase」
第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://researchmap.jp/y_mori/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。