

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22870001

研究課題名（和文）ピロリ菌由来アミノアシル tRNA 間接合成経路の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis for the indirect aminoacyl-tRNA synthesis pathway from *H. pylori*

研究代表者

中村 彰良 (NAKAMURA AKIYOSHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・博士研究員

研究者番号：10583891

研究成果の概要（和文）：

アミノアシル tRNA 間接合成経路に関与する GatCAB の構造機能解析およびタンパク質間相互作用の解明を目的とした。本研究ではピロリ菌由来 GatCAB に加え、黄色ブドウ球菌由来 GatCAB, 古細菌由来 GatCAB をターゲットに X 線結晶構造解析とタンパク質間相互作用解析に取り組んだ。その結果、古細菌由来 GatCAB の立体構造を 2.5Å 分解能で決定することに成功した。古細菌由来 GatCAB とバクテリア由来 GatCAB の立体構造比較から、古細菌 GatCAB に特有の tRNA 認識機構を解明し、バクテリア由来 GatCAB との tRNA 認識機構の違いを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

We have been focusing on the structural and functional analysis of GatCAB, which has an important role in an indirect pathway of aminoacyl-tRNA synthesis. We have determined the crystal structure of an archaeal GatCAB at 2.5 Å resolution. The structural comparison of the archaeal GatCAB and the bacterial GatCAB suggested that a  $3_{10}$  helix in the bacterial GatCAB is crucial for recognition the U1-A72 pair in tRNA<sup>Gln</sup>, and the absence of the helix in the archaeal GatCAB enables the enzyme recognize aa-tRNA with G1-C72 base-pairs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：アミノアシル tRNA 合成酵素, tRNA, X 線結晶構造

## 1. 研究開始当初の背景

通常アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)は、アミノ酸を厳密に認識するために、20 種類のアミノ酸に対応し 20 種類存在する。しかし、多くの真正細菌には、グルタミン(Gln)とそれに対応する tRNA(tRNA<sup>Gln</sup>)を認識するグルタミンイル tRNA 合成酵素(GlnRS)が存在しないことが明らかになった。これらの生物では 2 段階の反応を経て Gln-tRNA<sup>Gln</sup> を合成する。始めに、グルタミン酸に特異的なグルタミル tRNA 合成酵素(GluRS)が tRNA<sup>Gln</sup> をも認識することで、ミスチャージした Glu-tRNA<sup>Gln</sup> を合成する。次いでアミド基転移酵素 GatCAB の働きにより、ミスチャージされた Glu-tRNA<sup>Gln</sup> が正常な Gln-tRNA<sup>Gln</sup> に校正される。この 2 段階の Gln-tRNA<sup>Gln</sup> の合成経路は、GlnRS による直接合成経路に対し、間接合成経路と呼ばれている。さらに、一部の真正細菌には Asn-tRNA<sup>Asn</sup> を直接合成する AsnRS を持たない生物も存在し、これらの生物では Gln-tRNA<sup>Gln</sup> の 2 段階合成と同様の間接経路により Asn-tRNA<sup>Asn</sup> を合成している。このアミノアシル tRNA の間接合成経路は、より正確で効率の良い直接合成経路を獲得する以前、初期の生命が新たなアミノ酸を遺伝暗号に利用するためにまず獲得した経路であると考えられている。そのため、現在まで残っている Gln-tRNA<sup>Gln</sup> と Asn-tRNA<sup>Asn</sup> の間接合成経路は、遺伝暗号進化の「化石」として注目されており、この間接合成経路に関与する因子の構造機能解明は生命の誕生と翻訳における分子進化の観点から非常に特徴的で興味深い。

本研究はこれまでに、バクテリア由来 GatCAB の立体構造解析および機能解析を行い、バクテリア型 GatCAB は基質 tRNA の一番目のベースペアと D-loop のサイズを厳密に認識していることを明らかにした(Fig. 1A)。しかし、その後の研究により、古細菌が持つ GatCAB (古細菌型 GatCAB)は基質 tRNA の 1 番目のベースペアは認識せず、D-loop および V-loop のサイズを認識していることが明らかになった(Fig. 1B)。バクテリア型 GatCAB と古細菌型 GatCAB は高い相同性を示すにもかかわらず、基質 tRNA の認識機構が大きく異なることは非常に興味深い現象である。しかし現状では、バクテリア型 GatCAB と古細菌型 GatCAB において、なぜ基質 tRNA の認識機構に違いが生じるかは全く明らかになっていない。この違いを明らかにすることで、GatCAB と基質 tRNA の共進化関係に対し新たな知見を提供することが期待される。

## 2. 研究の目的

アミノアシル tRNA 間接合成経路に関与する GatCAB に注目し、GatCAB の構造機能解析および GatCAB を中心としたタンパク質間相互

作用解析を行い、アミノアシル tRNA 間接合成経路に関する構造基盤を構築することを目指した。その中で、同じ GatCAB であるにも関わらず、バクテリア由来 GatCAB は Glu-tRNA<sup>Gln</sup> と Asp-tRNA<sup>Asn</sup> の両方をアミド化するのに対し、古細菌由来 GatCAB は Asp-tRNA<sup>Asn</sup> を特異的にアミド化することが明らかになった。この違いは両者の tRNA 認識機構の違いによると考えられており、バクテリア由来 GatCAB は tRNA<sup>Gln</sup> と tRNA<sup>Asn</sup> を第一塩基対と D-loop により識別するのに対し、ArGatCAB は第一塩基対を認識せず、tRNA<sup>Asn</sup> の D-loop および variable-loop を認識することが報告されている。しかし、両者の tRNA 認識機構の違いは明らかになっていない。そこで、未だ明らかになっていない古細菌型 GatCAB の立体構造解析を行い、古細菌型 GatCAB 特有の tRNA 認識機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では様々な生物由来の GatCAB の立体構造を X 線結晶構造解析により原子レベルで明らかにするとともに、生化学実験、ゲルろ過分析、ITC から得られたタンパク質間相互作用情報を立体構造と組み合わせることで、アミノアシル tRNA 間接合成経路に関する構造基盤を構築する。

特に、バクテリア由来 GatCAB と古細菌由来 GatCAB の tRNA 認識機構の解明に関しては、未だ明らかになっていない古細菌由来 GatCAB の立体構造を明らかにし、バクテリア型 GatCAB と古細菌型 GatCAB の立体構造比較から解明を目指す。

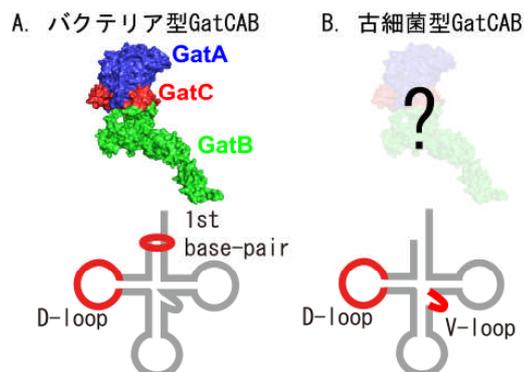


Fig. 1 バクテリア型GatCABと古細菌型GatCABのtRNA認識機構の違い

## 4. 研究成果

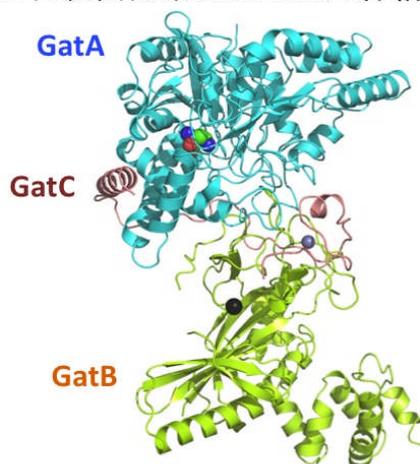
現在までに、バクテリア由来 GatCAB の立体構造は明らかになっているが、古細菌由来 GatCAB は未だ明らかにはされていない。そこで、本研究では古細菌の 1 種である *M. thermautotrophicus* 由来 GatCAB の X 線結晶

構造解析に取り組み、2.5Å 分解能で構造解析をすることに成功した (Fig. 2, 3).

Fig.2: 古細菌由来GatCABの結晶



Fig.3: 古細菌由来GatCABの立体構造

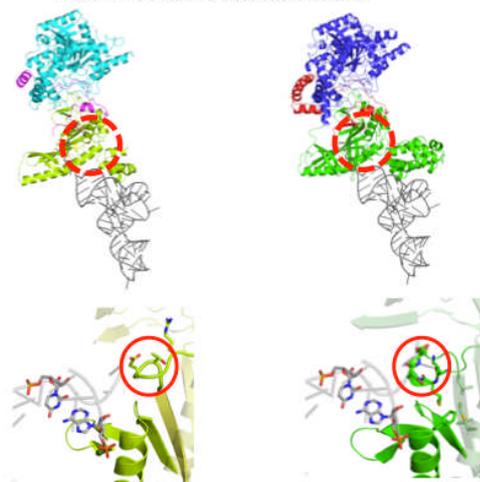


古細菌由来 GatCAB の立体構造はバクテリア由来 GatCAB と非常によく似ており、特に基質 tRNA を認識する GatB サブユニットに大きな違いは見いだせなかった。そこで、バクテリア由来 GatCAB および古細菌由来 GatCAB の tRNA 結合モデルを GatDE-tRNA 複合体の立体構造を利用して作成した。GatDE-tRNA 複合体において tRNA は GatE サブユニットのみと相互作用しており、また GatE と GatB は同じファミリーに属していることから、GatB を GatE に重ね合わせることでモデルを作成した。作成した両モデルの立体構造比較を行ったところ、バクテリア由来 GatCAB は1番目のベースペア付近に 3<sub>10</sub>ヘリックスが存在するのにに対し、古細菌由来 GatCAB は 3<sub>10</sub>ヘリックスに代わり短いループが存在していた。1次構造比較ではたった3残基の違いだが、立体構造比較を行うことで tRNA の認識部位における違いが明らかになった (Fig. 4).

バクテリア由来GatCABはGatBに存在する 3<sub>10</sub>ヘリックスで tRNAの第一塩基対を認識するのに対して、古細菌由来GatCABのGatBに

は 3<sub>10</sub>ヘリックスが存在せず、第一塩基対を認識しないことを明らかにした。一方、GatDEも tRNAの第一塩基対を認識することが生化学実験により明らかになっている。しかし、GatDEの立体構造解析によって、tRNAを認識するGatEには3<sub>10</sub>ヘリックスは存在しないことが明らかになっており、GatEはバクテリア由来GatBとは全く異なる方法でtRNAの第一塩基対を認識していることが示唆されている。このことから、GatBとGatEの共通の祖先は古細菌由来GatBと同様に3<sub>10</sub>ヘリックスを持たず、tRNAの第一塩基対を認識していなかったと考えられ、その後tRNAの進化と共に、tRNAの第一塩基対を認識するために、バクテリア由来GatCABとGatDEは独自に収束進化したことが示唆された。

Fig. 4: 古細菌由来GatCABとバクテリア由来GatCABのtRNA認識機構の違い



古細菌由来GatBでは第一塩基対の近くがループになっている

バクテリア由来GatBでは第一塩基対の近くに 3<sub>10</sub>ヘリックスがある

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中村彰良・周倩・朝野希美・姚閔・田中勲: 真正細菌型 GatCAB と古細菌型 GatCAB の構造比較, 第 12 回日本 RNA 学会年会, 平成 22 年 7 月 27 日, 一橋記念講堂(東京都)
- ② 周倩・中村彰良・朝野希美・姚閔・田中勲: 古細菌型 GatCAB と真正細菌型 GatCAB の比較, 第 60 回日本結晶学会年会, 平成 22 年 12 月 5 日, 大阪大学コンベンションセンター(大阪府)
- ③ Akiyoshi Nakamura: Structural and Functional analysis of GatCAB, Sapporo Symposium on Advanced Protein Crystallography (招待講演), 平成 24 年

3月17日, 北海道大学(札幌市)

- ④ Tateki Suzuki, Akiyoshi Nakamura, Min Yao, and Isao Tanaka: Asn-tRNA(Asn) synthesis in a Bacterial Transamidosome, Sapporo Symposium on Advanced Protein Crystallography, 平成24年3月17日, 北海道大学(札幌市)

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 彰良 (NAKAMURA AKIYOSHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・

博士研究員

研究者番号: 10583891