



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structural insight into tRNA channeling on bacterial Asn-transamidosome [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	鈴木, 干城
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11553号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57300
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tateki_Suzuki_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 鈴 木 干 城

審査担当者	主 査	教 授	姚 関
	副 査	教 授	小布施 力史
	副 査	特任教授	田 中 勲
	副 査	准教授	田中 良和

学 位 論 文 題 名

Structural insight into tRNA channeling on bacterial Asn-transamidosome

(真正細菌型 Asn-トランスアミドソームにおける tRNA チャネリング機構の構造基盤)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

アミノ酸とそれに対応する tRNA の正確な対応(アミノアシル tRNA の合成)はタンパク質合成の正確性を保証する上で重要なプロセスである。このプロセスは通常、1 種類のアミノ酸に対して 1 対 1 に対応するアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) によって触媒される。しかしながら、一部の真正細菌と古細菌はアスパラギン (Asn) と tRNA^{Asn} を対応させる AsnRS を保持しておらず、Asn-tRNA^{Asn} を直接合成することができない。それゆえ、これらの生物では 2 段階の反応を経て Asn-tRNA^{Asn} を合成する。初めにアスパラギン酸 (Asp) に特異的な AspRS が tRNA^{Asp} のみならず tRNA^{Asn} も認識することで、ミスチャージされた Asp-tRNA^{Asn} を合成する。次に、3 つのサブユニット GatC、GatA、GatB により構成されるアミド基転移酵素 GatCAB の働きによりミスチャージされた Asp-tRNA^{Asn} が正しい組み合わせの Asn-tRNA^{Asn} に校正される。近年の研究により、AspRS、GatCAB、tRNA^{Asn} は 3 者複合体を形成し、この複合体上で 2 段階反応が進行することが明らかになった。この複合体は Asn-トランスアミドソームと名付けられ、ミスチャージされた Asp-tRNA^{Asn} が細胞質中へ放出され、リボソームにおいてアスパラギンを指定するコドンにアスパラギン酸が対応して、タンパク質の誤翻訳が起きることを防いでいると考えられる。

AspRS の立体構造は N 末端のアンチコドン結合ドメインと C 末端の触媒ドメインにより構成されている。これに加えて、真正細菌型 AspRS は古細菌型には存在しない GAD ドメインと呼ばれる 16kDa ほどの配列が触媒ドメインに挿入されている。真正細菌型 AspRS については AspRS-tRNA 複合体を含め、多く結晶構造が解析されているが、GAD ドメインの詳細な機能は分かっていない。また、現在までに古細菌型の Asn-トランスアミドソームの結晶構造が解析され、活性型と不活性型ユニットから構成されると報告されているが、真正細菌型の構造は未だ解明されていない。本研究では、Asn-tRNA^{Asn} 合成反応の分子機構と反応における GAD ドメインの機能を明らかにするため、緑膿菌由来の AspRS-tRNA^{Asn} 2 者複合体と Asn-トランスアミドソームの結晶構造解析を行い、それぞれ 3.3 Å、3.7 Å 分解能での結晶構造を得ることができた。

AspRS-tRNA^{Asn} 複合体においては、AspRS はダイマーを形成し、各プロトマーに 1 分子ずつ tRNA^{Asn} が結合していた。また、tRNA^{Asn} の CCA 末端は AspRS の活性部位に位置しており、結晶構造はアミノアシル化反応状態を表していた。一方、Asn-トランスアミドソームは 1

分子の AspRS ダイマー、2 分子の GatCAB、2 分子の tRNA^{Asn}により構成されていた。2 つの tRNA^{Asn} のアンチコドンは AspRS により、D-T ループは GatB により認識され、CCA 末端は GatB の活性部位に位置していた。このことから、Asn-トランスアミドソームの結晶構造はアミド基転移反応状態を表していると考えられる。既に構造解析された古細菌型の Asn-トランスアミドソームも同様に 1 分子の AspRS ダイマー、2 分子の GatCAB、2 分子の tRNA^{Asn}により構成されているが、そのうち 1 分子の tRNA^{Asn}は真正細菌型と同様にアミド基転移反応状態である。もう一方の分子は AspRS によるアンチコドン認識は同様だが、CCA 末端がディスオーダーし、アクセプターステムが GatA と GatB の境界にトラップされ、不活性型ユニットを形成している。古細菌型 Asn-トランスアミドソームの AspRS に真正細菌型 Asn-トランスアミドソーム中の AspRS を重ね合わせると、GAD ドメインと古細菌型 Asn-トランスアミドソームの GatCAB との間に立体障害を生じることが明らかになった。このことから、GAD ドメインが存在するため、真正細菌型の Asn-トランスアミドソームでは、不活性型ユニットが形成できないことが示唆された。

真正細菌型 Asn-トランスアミドソームによる Asn-tRNA^{Asn}合成の反応モデルを提案するため、解析した 2 つの AspRS の構造を比較した。その結果、アミノアシル化反応状態とアミド基転移反応状態の GAD ドメインと触媒ドメインに存在するヘリックスバンドルの位置が変化することが確認できた。この変化により活性部位がアミド基転移反応状態で開いた構造となり、tRNA^{Asn}の CCA 末端が AspRS のアミノアシル化反応活性部位から GatCAB のアミド基転移反応活性部位へ移動できるようになると考えられる。次に、アミノアシル化反応状態における GatCAB のモデル作成を行った。GatCAB が tRNA の D-T ループを認識することを利用して、Asn-トランスアミドソーム中の GatCAB の構造を AspRS-tRNA^{Asn}複合体にモデリングした。その結果、GatCAB と AspRS の間に立体障害が生じることから、トランスアミドソームがアミノアシル化反応状態からアミド基転移反応状態に変化するには GatCAB の構造変化が必要であることが明らかになった。GatCAB がどのような構造変化をしようかを調べるため、解析した Asn-トランスアミドソーム中の GatCAB の結晶構造と既知の GatCAB の結晶構造を比較したところ、GatB にはヒンジが存在することが明らかになった。このヒンジを用いて GatB は tRNA の D-T ループを認識する状態を維持しながら、CCA 末端をアミド基転移反応部位に受け入れることができるように構造変化することが示唆された。

これらの構造比較から次のような Asn-tRNA^{Asn}合成の反応モデルを提案した。まず、AspRS、GatCAB、tRNA^{Asn}が Asn-トランスアミドソームを形成する。AspRS のアミノアシル化反応により Asp-tRNA^{Asn}が合成されると、GAD ドメインと触媒ドメインのヘリックスバンドルの位置が変化することにより、活性部位が開いた構造になる。すると、アンチコドンの認識は維持されたまま、Asp が結合した CCA 末端は GatCAB の活性部位に移動できるようになる。その後、GatB はヒンジを使って構造を変化させ、D-T ループの認識は維持されたまま、立体障害を生じることなく CCA 末端を認識してアミド基転移反応を触媒し Asn-tRNA^{Asn}を合成する。

以上、本研究では緑膿菌由来の Asn-トランスアミドソームの結晶構造解析により、真正細菌型の Asn-トランスアミドソームが 1 分子の AspRS ダイマー、2 分子の GatCAB、2 分子の tRNA^{Asn}により形成した 2 つの活性型ユニットから構成されていることを明らかにした。さらに、AspRS-tRNA^{Asn}複合体の構造も得られ、各反応状態の構造から、Asn-トランスアミドソームによる Asn-tRNA^{Asn}合成の反応の過程での tRNA 受け渡す反応機構を提唱した。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。