

古細菌/真核生物型フェニルアラニル tRNA 合成酵素 (PheRS) の校正機構

## Amino Acid-editing Mechanism of Archaeal/eukaryal Phenylalanyl-tRNA Synthetase

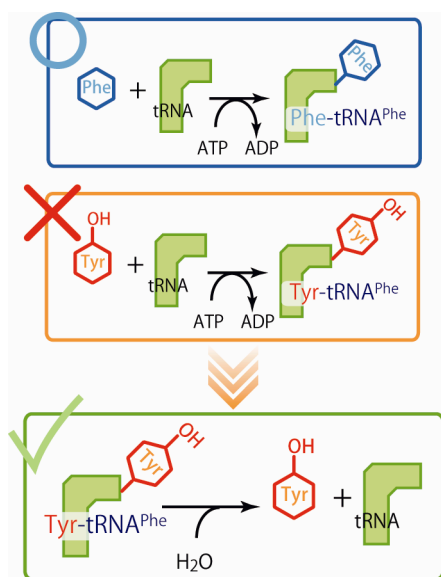
佐々木 浩<sup>1</sup>, 関根 俊一<sup>1,2</sup>, 横山 茂之<sup>1,2</sup>Hiroshi M. Sasaki<sup>1</sup>, Shun-ichi Sekine<sup>1,2</sup>, and Shigeyuki Yokoyama<sup>1,2</sup>( <sup>1</sup> 東京大学, <sup>2</sup> 理研 GSC )( <sup>1</sup> Univ. of Tokyo, <sup>2</sup> RIKEN GSC )e-mail: [h-sasaki@biochem.s.u-tokyo.ac.jp](mailto:h-sasaki@biochem.s.u-tokyo.ac.jp)

図 1. PheRS による正反応 (上), 誤反応 (中), 校正反応 (下)

tRNA は、アミノ酸と結合したアミノアシル tRNA として、翻訳時にリボソームで利用される。tRNA とアミノ酸との正しい対応関係を維持することは、遺伝暗号の正確な翻訳に欠かせない。この品質管理を行っているのが、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) である。aaRS はアミノ酸を対応する tRNA の 3' 末端に共有結合させる酵素である。ほぼ全ての生物は、20 種類の天然型アミノ酸に対応する 20 種類の aaRS を保有している。しかし、立体的・化学的に類似したアミノ酸同士の正確な識別は困難であり、いくつかの aaRS は本来の基質以外のアミノ酸を取り込み、誤った反応中間体やアミノアシル tRNA を合成してしまう。この問題を解決するため、誤反応を起こしうる aaRS は、活性ドメインとは別に「校正ドメイン」を進化的に獲得し、誤産物を加水分解して排除する「校正機構」を保持することで、翻訳の正確性を保証している。(図 1)。

フェニルアラニル tRNA 合成酵素 (PheRS) も校正機構を持つ aaRS の 1 種である。PheRS は  $(\alpha\beta)_2$  型で、 $\beta$  サブユニットが校正活性を担う。PheRS は、分子系統学的解析から真正細菌型と古細菌/真核生物型の 2 型に分類される。PheRS の校正機構については、真正細菌型での研究が進んでいた一方、古細菌/真核生物型については進展していなかった。興味深いことに、古細菌/真核生物型 PheRS の校正ドメインのアミノ酸配列は、次の 2 点で細菌型と異なっていた。第一に、古細菌/真核生物型 PheRS- $\beta$  は細菌型に保存されている B2, B8 ドメインが欠失しているため、全長が約 250 アミノ酸ほど短い。第二に、古細菌/真核生物型の B3/4 ドメインに対応する領域のアミノ酸配列は、細菌型と比較して明確な配列相同性が見られない。しかしこのような差異にも関わらず、出芽酵母 PheRS にも Tyr-tRNA<sup>Phe</sup> に対する校正機構が存在し、細菌型に対応するドメインが校正反応に関わることが報告されていた。

我々は、古細菌 *Pyrococcus horikoshii* PheRS- $\beta$  セレノメチオニン置換タンパク質を用い、校正ドメインを含む N 末端フラグメント (PheRS- $\beta^N$ ) の結晶構造を分解能 1.94 Å で決定した (図 2)。P. horikoshii PheRS- $\beta^N$  は B1, B3/4, B5 の 3 つのドメインからなり、このうち B3/4 が校正ドメインに対応している。古細菌/真核生物型と細菌

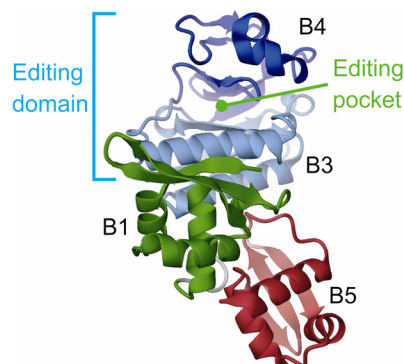


図 2. *P. horikoshii* PheRS- $\beta^N$  のリボンモデル

型の PheRS- $\beta$ を構造比較したところ、両者の校正ドメインは、コアを形成する2次構造のトポロジー、大きく開口しているポケット(校正ポケット)の存在、の2点で類似していたが、それぞれに特有の挿入/欠失領域の存在、校正ドメインの配向の違い、という差異を有していた。

さらに PheRS- $\beta^N$ の構造に基づく多重配列アラインメントを作成した結果、

校正ポケット周辺の保存残基パターンは細菌型とは著しく異なり、細菌型で校正機構に関わると報告されていた残基の大部分が古細菌/真核生物型では保存されていないことが分かった。

上記の解析結果から両者の基質認識・触媒機構が異なっていると考え、変異体解析により検証した。PheRS- $\beta$ 校正ポケット周辺に位置する16の保存残基にアラニン置換を導入した変異体 PheRSを調製し、2種類の生化学的解析により校正活性を測定した(図3)。この結果、Gln126, Glu127, Arg137, Leu168, Tyr189, Asn217, Arg223, Asp234の変異体で校正活性が低下していた。特に古細菌/真核生物に特有の残基である Asn217の変異体は完全に校正活性を失っており、Asn217が校正反応に必須であることを示していた(図3A)。さらに Leu202, Ser211, Asp234, Thr236の変異体では、Phe-tRNA<sup>Phe</sup>を誤って加水分解し、Tyr-tRNA<sup>Phe</sup>に対する基質特異性が失われていた(図3B)。重要性が明らかになった11残基のうち、8残基が古細菌/真核生物型特有の残基であり、校正機構が細菌型と本質的に異なることを示している。

以上の結果から我々は、細菌型と同じグローバルフォールドを持ち、共通祖先から派生したと推定される古細菌/真核生物型 PheRS校正ドメインが、細菌型とは異なる機構で、チロシン部位の認識、tRNA末端の認識、加水分解の触媒能を達成していることを解明し、その基質認識・触媒機構に関する合理的なモデルを提唱した(図4)。

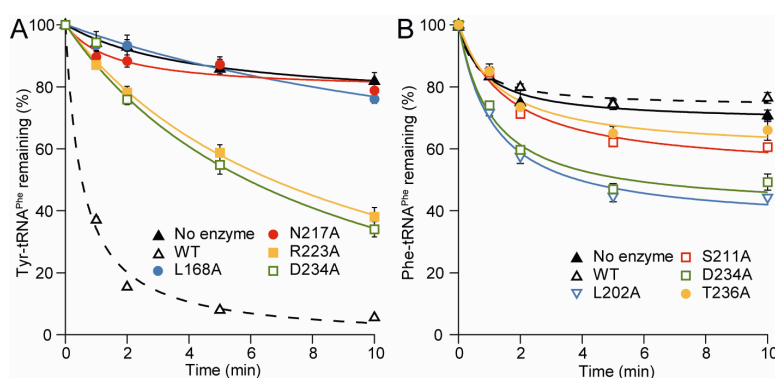


図3. PheRS- $\beta$ 変異体による Tyr-tRNA<sup>Phe</sup>加水分解活性 (A, 校正反応) と Phe-tRNA<sup>Phe</sup>加水分解活性 (B, 誤校正反応)

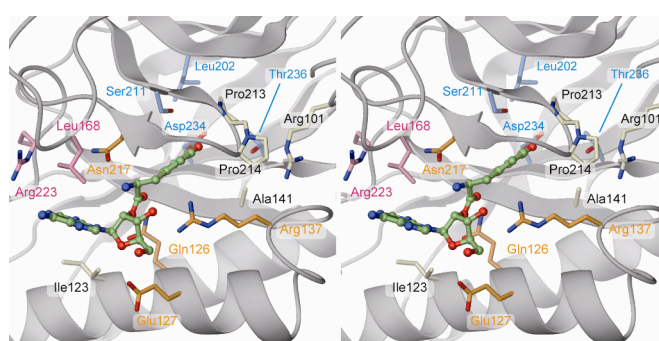


図4. 古細菌/真核生物型 PheRS校正ドメインによる基質認識モデル (立体視図)

## Reference

[1] Sasaki, HM., *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103:14744-9.