

論文内容要旨 (和文)

平成 18 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学講座

氏 名 土屋 渉

印

論 文 題 目 超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来トリプトファン
-tRNA 合成酵素の機能と構造に関する研究

タンパク質生合成過程において、最も重要な段階である tRNA へのアミノアシル化反応は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) によって触媒される。ARS による対応する tRNA とアミノ酸に対する高い基質特異性は、タンパク質の正確な翻訳反応を保つために必須の性質である。この厳密な基質認識を保持するために、ARS の立体構造が非常に重要な関与を持つことが、近年盛んに行なわれている、タンパク質の X 線結晶構造解析によって明らかにされてきている。トリプトファン-tRNA 合成酵素 (TrpRS) において、その tRNA アイデンティティは、いくつかの真正細菌 (*Escherichia coli* および *Bacillus subtilis*) および真核生物 (*Saccharomyces cerevisiae* および human) のシステムにおいてのみ既に解明されており、古細菌由来 TrpRS に対する報告はなされていない。そのため、私は古細菌由来の TrpRS における tRNA アイデンティティを解明し、三大生物界、真正細菌、真核生物および真正細菌での TrpRS の分子進化の過程に対する理解を深めるため、超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来の TrpRS (apTrpRS) について tRNA に対する認識メカニズムを解明することを目的に研究を行った。

これまでにいくつかの真正細菌および真核生物由来の TrpRS に対する X 線結晶構造解析が行なわれており、既にその結晶構造が詳細に明らかとなっている。また、基質との複合体構造が明らかにされたものについては、その TrpRS による基質に対する相互作用について詳細な解析が行なわれ、基質認識メカニズムが解明されている。しかしながら、古細菌由来の TrpRS に対する X 線結晶構造解析はいまだなされておらず、その構造は全く明らかになっていない。そのため、私は古細菌由来の apTrpRS について、結晶化実験および X 線結晶構造解析を行なった。また、基質に対する認識メカニズムを解明するため、基質であるトリプトファンとの複合体の結晶構造解析についても行なうこととした。X 線結晶構造解析の結果、apTrpRS の構造は、2.0 Å の分解能で解くことに成功した。この apTrpRS の結晶構造は、真正細菌と真核生物由来の TrpRS の両方と共通する構造的性質を持ち合わせており、古細菌の TrpRS が真正細菌と真核生物の TrpRS の中間的な性質を持つことが明らかとなった。一方で、これまでには報告され

氏 名 土屋 涉

ていない、古細菌 TrpRS に独特な性質も見られた。また、明らかとなった apTrpRS の結晶構造から tRNA との結合モデルを構築したところ、その結合様式は、apTrpRS がトリプトファン tRNA のアクセプターステム部位とアンチコドンの 1 塩基目および 2 塩基目を認識するという、tRNA アイデンティティ実験のデータと非常に良く一致した結果が得られた。この tRNA アイデンティティと X 線構造解析の結果は、古細菌由来 TrpRS の詳細な tRNA 認識メカニズムを提案する。

論文内容要旨 (英文)

平成 18 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学講座

氏 名 土屋 渉

印

論 文 題 目 超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来トリプトファン
-tRNA 合成酵素の機能と構造に関する研究

In a biosynthesis process of protein, aminoacylation of the tRNA which is most important step is catalyzed by aminoacyl-tRNA synthetases (ARSs). The substrate specificity of cognate amino acids and tRNAs by ARSs is essential to keep the accuracy of the translation reaction of the protein. It has been clarified to contribute so that a three-dimensional structure of ARSs may maintain this strict substrate recognition by the crystal structure analysis of various ARSs. In tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS), the tRNA identity is already determined in bacterial (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*) and eukaryotic (*Saccharomyces cerevisiae* and human) system, but has not been clarified about archaeal TrpRS. Therefore, we investigated the recognition mechanism of tRNA^{Trp} by archaeal TrpRS from hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix* K1, to gain insight into the molecular evolution of TrpRS among the three domains, eubacteria, eukarya and archaea.

The crystal structures of TrpRS are already solved about some bacterial and eukaryotic TrpRSs, and it is clarified about interaction between the substrates in detail. However, the report of the X-ray crystal structure analysis of archaeal TrpRSs had not been performed. Therefore, we carried out the crystallization and crystal structure analysis of ligand-free and Trp-bound conformations, respectively, about *Aeropyrum pernix* K1 TrpRS (apTrpRS). These apTrpRS structures show that archaeal TrpRSs has a similar structure to not only eukaryotic TrpRSs but also bacterial TrpRSs. On the other hand, the substrate recognition mechanism which is peculiar to

archaeal TrpRSs is observed in apTrpRS. Furthermore, the fitting model of apTrpRS and tRNA gave the finding, which supports the experimental data of tRNA identity that we determined that apTrpRS recognized the tRNA^{Trp} anticodon and acceptor stem regions by base specificity. The results of tRNA identity and X-ray crystal structure analysis of apTrpRS suggest that the tRNA recognition mechanism of archaeal TrpRS in detail.

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	土屋 渉
学位論文の審査結果の要旨			
<p>本論文は日本で発見され、日本でそのゲノム配列が決定された超好熱性古細菌である <i>Aeropyrum pernix</i> K1由来のトリプトファン-tRNA合成酵素(TrpRSAP)のトリプトファンtRNAの分子認識機構を分子生物学的手法で解明し、その結果をさらにTrpRSのX線結晶解析で構造生物学的に立証したものである。第1章は、本研究の背景となっているアミノアシル-tRNA合成酵素(ARS)およびtRNAの機能と、ARSによるtRNA認識と識別の分子機構のレビュー、並びにTrpRSによる基質認識をレビューしている。第2章は、<i>A. pernix</i> K1のトリプトファンtRNA前駆体の構造を、クローニングして発現精製したスプライシングエンドヌクレアーゼを用いて、イントロンの切り出し部位を同定し、RNaseIによるマッピングにより前駆体の二次構造を推定した。また逆転写反応によりトリプトファンtDNAを作製し、その塩基配列を同定して、データベースに記載されているトリプトファンtRNA配列の誤りを指摘した。第3章では、クローニングして発現精製したTrpRSAPによるトリプトファンtRNAの分子認識機構を<i>in vitro</i>転写反応系で作製した多くのトリプトファンtRNA変異体を用いて反応速度論的に解析し、認識部位を解明した。第4章では、TrpRSAPのX線結晶構造解析を行い、第3章の実験結果をまさに結晶の構造から証明することができた。第5章では、第3章の研究結果から、TrpRSAPはトリプトファンtRNAに4塩基アンチコドンを導入しても活性があるという事実を活用して、TrpRSAP変異体によるタンパク質へのトリプトファンアナログの導入に向けての研究を行った。</p> <p>本論文の第3章部分は、<i>Journal of Biochemistry</i>(Vol. 145, 2009年)に掲載される(Web公開済)。第4章部分は既に投稿論文として完成しており、投稿直前の状況である。第2章についても投稿論文としてまとめつつある状況である。</p> <p>本研究はTrpRSAPのトリプトファンtRNA認識を分子学的手法並びにX線結晶構造解析によって解析した優れた研究であると審査委員全員が評価し、合格と判定した。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>最終試験は公聴会の場で行われ、研究内容の発表後に質疑応答が行われた。専門的な様々な角度からの質問に対して的確な説明、応答があり、土屋渉氏は研究背景の基礎知識を含めて、専門領域に対して深い知識を有していると判断され、公聴会後の審査委員会で、審査委員全員一致で土屋渉氏に博士(理学)の学位を授与することは妥当であるとの結論に達し、合格と判定した。</p>			