

で、変性タンパク質の隔離に成功しない理由を野生型 GroEL との動的性質の差として詳細に解析できる。静的解析、動的解析の両方を駆使することで、この変異体はシャペロニンの反応機構解明に必要な不可欠な情報を近いうちに提供できると信じている。

## 謝辞

本稿作成に当たり、東京工業大学の元鳥史尋先生、京都産業大学の吉田賢右先生には未発表の研究データを紹介させていただくことにご快諾いただき、大変感謝いたします。本稿の筆者らの成果は兵庫県立大学の町田幸大博士をはじめとする鳥取大学工学部生物応用工学科の学生・卒業生諸君との研究の成果です。この場を借りて感謝いたします。

- 1) Horwich, A.L., Farr, G.W., & Fenton, W.A. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 1917–1930.
- 2) Xu, Z., Horwich, A.L., & Sigler, P.B. (1997) *Nature*, **388**, 741–750.
- 3) Ranson, N.A., Farr, G.W., Roseman, A.M., Gowen, B., Fenton, W.A., Horwich, A.L., & Saibil, H.R. (2001) *Cell*, **107**, 869–879.
- 4) Viitanen, P.V., Donaldson, G.K., Lorimer, G.H., Lubben, T.H., & Gatenby, A.A. (1991) *Biochemistry*, **30**, 9716–9723.
- 5) Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K., & Horwich, A.L. (1994) *Nature*, **371**, 614–619.
- 6) Miyazaki, T., Yoshimi, T., Furutsu, Y., Hongo, K., Mizobata, T., Kanemori, M., & Kawata, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 50621–50628.
- 7) Cliff, M.J., Limpkin, C., Cameron, A., Burston, S.G., & Clarke, A.R. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 21266–21275.
- 8) Madan, D., Lin, Z., & Rye, H.S. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 32003–32013.
- 9) Farr, G.W., Furtak, K., Rowland, M.B., Ranson, N.A., Saibil, H.R., Kirchhausen, T., & Horwich, A.L. (2000) *Cell*, **100**, 561–573.
- 10) Elad, N., Farr, G.W., Clare, D.K., Orlova, E.V., Horwich, A.L., & Saibil, H.R. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 415–426.
- 11) Nojima, T., Murayama, S., Yoshida, M., & Motojima, F. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 18385–18392.
- 12) Tang, Y.C., Chang, H.C., Roeben, A., Wischniewski, D., Wischniewski, N., Kerner, M.J., Hartl, F.U., & Hayer-Hartl, M. (2006) *Cell*, **125**, 903–914.
- 13) Farr, G.W., Fenton, W.A., & Horwich, A.L. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5342–5347.
- 14) Machida, K., Fujiwara, R., Tanaka, T., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., & Kawata, Y. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 1344–1354.

溝端 知宏, 河田 康志  
(鳥取大学大学院工学研究科・医学系研究科)

The two faces of Janus: Recent studies on the characteristics of *E. coli* GroEL and its apical domain  
Tomohiro Mizobata and Yasushi Kawata (Graduate School of Engineering and Graduate School of Medical Science, Tottori University, 4-101 Koyama-cho Minami, Tottori 680-8552, Japan)

## ピロリジン翻訳の直交性のメカニズム

### 1. はじめに

生体内において、遺伝暗号翻訳の正確性は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) が tRNA に特異的なアミノ酸を付加させることによって保たれている。L 字型構造をした tRNA は mRNA 上のコドンとアミノ酸を対応させるアダプターとして働き、その一端 (アンチコドン) でコドンと塩基対を形成し、aaRS が tRNA の特異的な配列や構造を認識してもう一方の端 (CCA 末端) にアミノ酸を結合する。そのため、アミノ酸の特異性は tRNA の構造とそれを認識する aaRS に依存している。遺伝情報を規定するコドンは 64 種類存在し、それぞれ 20 種類のアミノ酸をコードしているが、例外的に三つの終止コドン UAG (アンバー), UGA (オパール), UAA (オーカー) には、それに対応する tRNA も aaRS も存在せず、翻訳過程においてこれらは、tRNA 様の解離因子に認識され、30S リボソームの A サイトに取り込まれて、ペプチド鎖の遊離と翻訳の終結が起こる。

しかし、非常にまれに、終止コドンはサプレッサー tRNA と呼ばれる特殊な tRNA によってアミノ酸へと読み替えられる (リコーディング)。サプレッサー tRNA のほとんどは Gln や Tyr, Leu, Trp に対応する tRNA のアンチコドン部分が修飾され、終止コドンと対合する tRNA に変化したものである (構造的には普通の tRNA と同じ)。こういった修飾によるサプレッサー tRNA への転換はタバコモザイクウイルスやマウス白血病ウイルスが変異タンパク質を作る際に起こる現象として知られている<sup>1,2)</sup>。それとは対照的に、21 番目と 22 番目のアミノ酸であるセレノシステイン (Sec), ピロリジン (Pyl) には終止コドンに対応

して構造全体が特殊化したサプレッサー tRNA が存在する。Sec は、オパール終止コドンにコードされるアミノ酸であり、mRNA の下流にステム・ループ構造をした selenocysteine insertion sequence (SECIS) がある場合に、tRNA<sup>Sec</sup> 上で多段階反応を経て合成される<sup>3,4)</sup>。一方、メタン古細菌と一部の真正細菌に存在するピロリジン (Pyl) は、アンバー終止コドンにコードされるアミノ酸であり、リジンの ε 位のアミド結合部分にカルボキシルピロリンが結合した特徴的な構造をしている。

メタン古細菌のメチル基転移酵素中では、Pyl がメチル基と反応中間体を形成することによって、酵素反応が進むことが示唆されており、メタン生成によりエネルギーを獲得しているそれらの生物にとっては、生育に必要なアミノ酸といえる<sup>5)</sup>。Pyl はクラス IIc に属する aaRS であるピロリジル tRNA 合成酵素 (PylIRS) によってアンバーコドンのサプレッサー tRNA<sup>Pyl</sup> に直接転移される。興味深いことに、真正細菌の tRNA<sup>Pyl</sup> は特殊な構造を持つミトコンドリア tRNA (特にウシ由来ミトコンドリア tRNA<sup>Sec</sup>UGA) と二次構造上の特徴が類似していることが知られている<sup>6-8)</sup>。すなわち tRNA<sup>Pyl</sup> は、普遍的に保存されている TΨC ループ中の T54Ψ55C56 という配列を欠失し、長いアンチコドンシステム (6 塩基対) を持ち、L 字型構造のコアを形成する D ループ (5 塩基)、可変ループが著しく短い (3 塩基) という特徴を持っている<sup>9)</sup>。このことは PylIRS が終止コドンに対応する特殊なサプレッサー tRNA だけを他の tRNA から特異的に認識し、修飾アミノ酸を転移させる (翻訳の「直交性<sup>脚注1)</sup>」を有する)、aaRS としては他に例を見ない酵素である可能性を示唆している。

近年、天然で使われる 20 種類のアミノ酸以外の全く新しいアミノ酸を創作し、人工タンパク質を合成する試みが行われている。広い基質結合溝を持つ PylIRS はこのような取り組みに利用されており、PylIRS が認識できるような蛍光ラベルや光クロスリンク修飾、翻訳後修飾を受けたアミノ酸を合成し、生体内で特定の塩基配列にコードさせる研究が進んでいる<sup>10)</sup>。このように終止コドンにアミノ酸を導入できる直交性を持った天然のシステムは、幅広い工業、医療、創薬への応用が期待されている。

本研究では、真正細菌 *Desulfitobacterium hafniense* 由来 PylIRS (DhPylIRS) の単体構造および、その tRNA との複

脚注 1: 直交性とは aaRS が自分に特異的なアミノ酸および tRNA 以外の基質とは反応することなく、その tRNA も自分に特異的なアミノ酸や aaRS 以外と反応しない活性を示す。

合体構造の X 線結晶構造解析を行うことによって、Pyl 転移反応における直交性のメカニズムとアンバーコドンのリコーディングシステムを分子レベルで解明することを目指した。

## 2. DhPylIRS の X 線結晶構造解析

本研究で用いた DhPylIRS はメタン古細菌由来のものとの相同性は 39% ほどだが、メタン古細菌由来のものとも最も異なる点は、その遺伝子が Pyl 合成系の遺伝子 *pylBCD* によって N 端フラグメント (PylIRSn) と C 端フラグメント (PylIRSc) に分断されている点である。この PylIRSc は N 端側がメタン古細菌由来のものよりも約 100 残基短いかかわらず、そのみで *in vitro* アミノアシル転移活性を持つことが知られている<sup>11)</sup>。このことを踏まえて結晶化のターゲットとして PylIRSc を用いた。

DhPylIRS (PylIRSc) 単体の結晶化に際して、DhPylIRS を大腸菌で過剰発現させて調製し、結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶から、大型放射光施設 Photone Factory において 2.5 Å の分解能で回折データを収集し、セレンメチオニン置換体結晶を用いた多波長異常分散 (MAD) 法により位相を決定し、DhPylIRS の構造を解明した。構造解析の結果 DhPylIRS は構造解析に成功した三つの晶系すべてが二量体構造をとっており、DhPylIRS が溶液中でも二量体で tRNA を認識することが示唆された。DhPylIRS はすでに触媒ドメインの構造が解析されている古細菌型 PylIRS<sup>12)</sup> の構造とは非常に類似した構造をしており、Pyl の系が古細菌と細菌の間で水平伝播したことが示唆された。また、古細菌型 PylIRS と三つの晶系の DhPylIRS 構造を重ね合わせて比較すると活性部位付近の Y217 を含むループが大きくシフト (約 9 Å) していることがわかった。基質を結合している古細菌型 PylIRS の構造では、基質を包み込むように大きくシフトしていたため、このループは基質認識によって大きく構造変化することが示唆された。

## 3. PylIRS-tRNA<sup>Pyl</sup> 複合体の X 線結晶構造解析

次に、複合体結晶の作成に際しては DhPylIRS を *in vitro* 転写を通じて調製し、DhPylIRS と 1.1 対 1 のモル比で混合して結晶化を行った。大型放射光施設 SPring-8 において、得られた結晶から 3.1 Å の分解能で回折データを収集し、DhPylIRS の構造モデルを用いた分子置換法によって、DhPylIRS-tRNA<sup>Pyl</sup> 複合体の構造を明らかにした。複合体中で PylIRS は、二量体で tRNA<sup>Pyl</sup> を認識していた。驚くべきことに、PylIRS は多くの aaRS の tRNA 認識アイデンティ

ティーであるアンチコドン認識せず、その代わりに、アミノ酸受容ステムとDループを良く認識していた(図1a, 1d, 1e)。この結果はDhPylRS<sup>Pyl</sup>に対するPylRSのフットプリンティング実験において、アミノ酸受容ステムとDループがヌクレアーゼによる分解を受けづらいという結果やtRNAのアンチコドンに変異を導入してもPylRSによるPyl転移活性がおちないという結果とも一致する<sup>9)</sup>。

DhPylRSのtRNA<sup>Pyl</sup>の認識領域は二量体分子にまたがっており、PylRSの構造をその基質認識に応じて六つの領域に分けてみると、tRNAのCCA末端付近をモチーフ2が、バルジドメイン(別分子)、C末端領域、tRNA結合ドメインからなるU字型の溝がアミノ酸受容ステムを、触媒ドメイン(別分子)、C末端領域、tRNA結合ドメインからなるコア結合面がDループをよく認識していた(図1b)。

それぞれの相互作用を見てみると、まずクラスII aaRSの共通構造であるモチーフ2は複合体構造においてアミノ酸受容ステムに沿って大きく構造変化することにより、Q164の主鎖のアミド基とE162の主鎖のカルボニル基でtRNAの決定因子ディスクリミネーター(G73)を特異的に認識していた(図1c)。

次にU字型の溝は正電荷を帯びた窪みを形成しており、その窪みに沿うように負電荷を帯びたtRNAのアミノ酸受容ステムが結合していた(図2c)。ここではG4が特異的に認識されており、特にそれを認識するK16は生物種間で保存され、この部分の変異がtRNAの結合を弱めることが知られている<sup>12)</sup>(図1d)。次にDループの認識を見ると、コア結合面では、tRNA結合ドメインがDステムの塩基対の間に沿って相互作用していた。その中でG10, A26a, G9がPylRSによって特異的に認識されており、特にそれらを認識する生物種間で保存されたR140, R144の変異はtRNAの結合を弱めることが知られている<sup>12)</sup>(図1e)。しかし、これらを除くtRNAとPylRSの相互作用のほとんどは、広範囲にわたるtRNAのリン酸骨格とタンパク質側鎖間の塩基非特異的な相互作用だった。この結果とtRNA<sup>Pyl</sup>とミトコンドリアtRNA<sup>ser</sup>のキメラtRNAがPylRSによって認識されるという以前の報告<sup>13)</sup>から、その三次構造がaaRSによる認識機構に重要であると考えられた。

tRNA<sup>Pyl</sup>の構造を見てみると、特筆すべきことに、tRNA<sup>Pyl</sup>は通常のtRNAとは著しく異なる二次構造を持つにもかかわらず、リボソームで働きうるL字型構造をとっていた(図2a)。tRNA<sup>Pyl</sup>と通常のtRNAの構造を持ったtRNA<sup>Phe</sup>を比較してみると、驚くべきことに特殊な二次構造を持つにもかかわらず、tRNA<sup>Pyl</sup>はリボソームで働き

うるL字型構造とCCA末端、アンチコドンの位置関係を保障していたが、その代わりにコア領域は異常にコンパクトな構造となっていた(図2b)。通常のtRNAでは、このコアが突出しているためPylRSがアクセスしようとするとぶつかってしまう。複合体中でPylRSはコア結合面によってtRNA<sup>Pyl</sup>のコンパクトなコアにぴったりはまるように結合しており、形状相補的にアンバーサプレッサーtRNAを他のtRNAから識別していることが示唆された。このコンパクトなコア構造はDループ、可変ループの配列が、通常のtRNAに比べて異常に短いために生じていたが、このままでは高次構造上でアンチコドンが上側に移動してしまう。そのためtRNA<sup>Pyl</sup>では、それを埋め合わせるように、アンチコドンステムが通常のtRNAに比べて1塩基対長くなっていた。こうしてtRNA<sup>Pyl</sup>はリボソームで働きうるような普遍的なtRNAの構造を保ちつつ、直交性を生み出すための特徴的な構造を作り上げていた。

加えて、今回明らかとなったPylRS-tRNA複合体の構造を他のaaRSと比較してみるとクラスI aaRSがtRNAのアミノ酸受容ステムを副溝側から認識し、クラスII aaRSが主溝側からtRNAを認識するに対して、PylRSは、正面からtRNAと結合していることが分かった(図2c)。PylRSはコンパクトなコアに沿って正面からtRNAと相互作用することで、aaRSの中でも最小単位(288aa長)でtRNAを認識していた。以上のことから、PylRSはクラスIとクラスIIのどちらにも属さないような新たな方法でtRNAを認識するaaRSであることが構造解析によって明らかとなった。

#### 4. PylRSのアミノ転移活性の検証

次に、これらの構造解析を踏まえてDhPylRSが*in vivo*、*in vitro*において、他のセンスコドンに対応するtRNAが存在している条件でも直交性を持って機能するかどうかを検討した。トリプトファン合成酵素遺伝子(TrpA)にアンバーコドンを導入して作成した遺伝子欠損株の生育をDhPylRS, tRNA<sup>Pyl</sup>遺伝子で相補させた*in vivo*アミノ酸転移実験では、トリプトファンの代わりにPylの基質アナログである*N*-ε-cyclopentylloxycarbonyl-L lysine (CYC)を含んだ培地で欠損株の生育が見られた(図3a)。このことからDhPylRSが生体内で直交性を持ってCYCをtRNA<sup>Pyl</sup>に転移し、TrpAタンパク質全長が発現したことが分かった。加えて*in vitro*における実験では、tRNAのCCA末端のAのα位のリン酸を<sup>32</sup>P(RI)ラベルし、他のセンスコドンに対応するtRNAが存在している状態でアミノ酸転移反応を

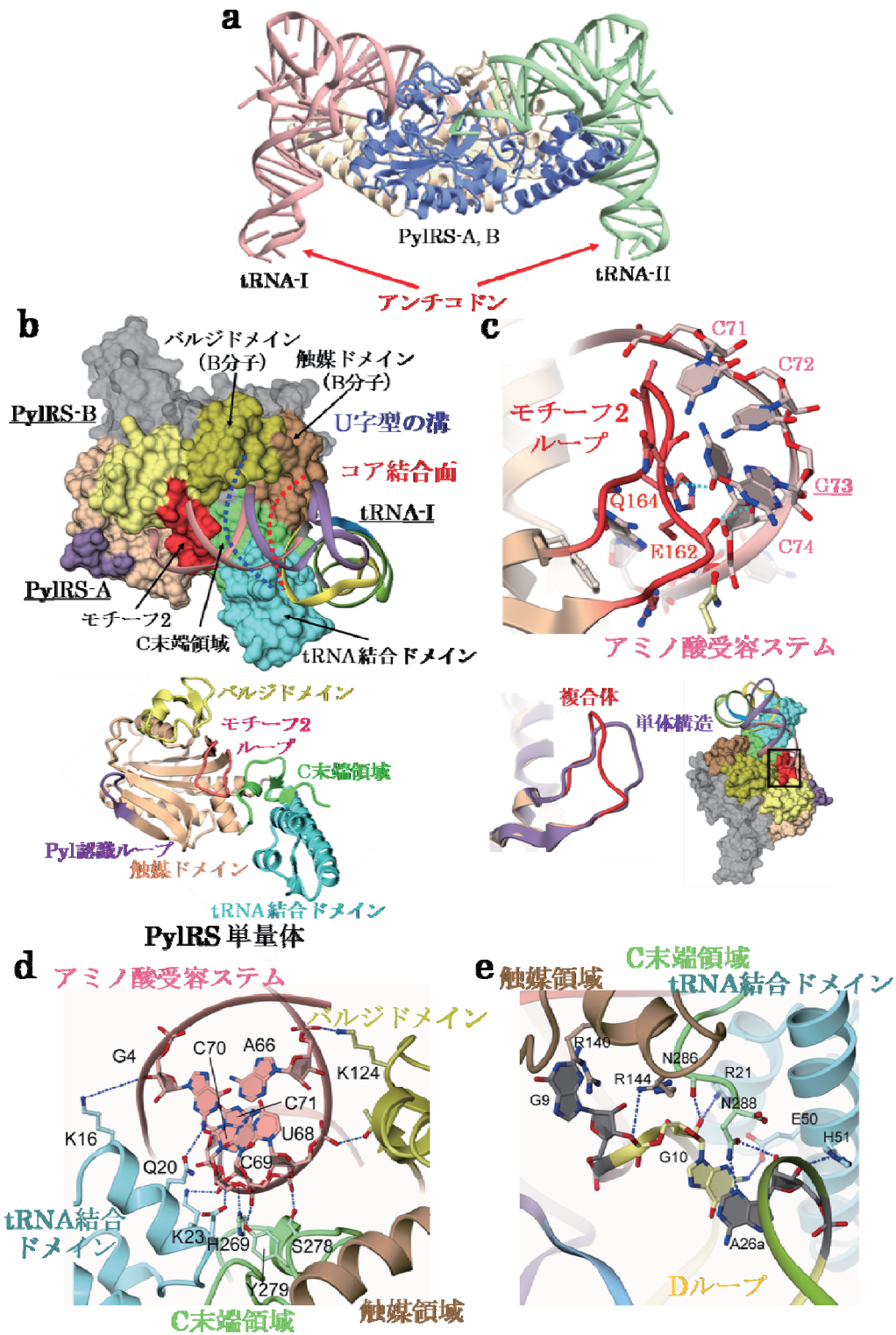


図1 PyIRS・tRNA<sup>Pyl</sup>複合体の結晶構造  
 全体構造(a), tRNA<sup>Pyl</sup>に対するPyIRSの六つのドメイン構成(b), モチーフ2ループによるアミノ酸受容ステムの認識(c), U字型の溝によるアミノ酸受容ステムの認識(d), コア結合面によるDループの認識(e)

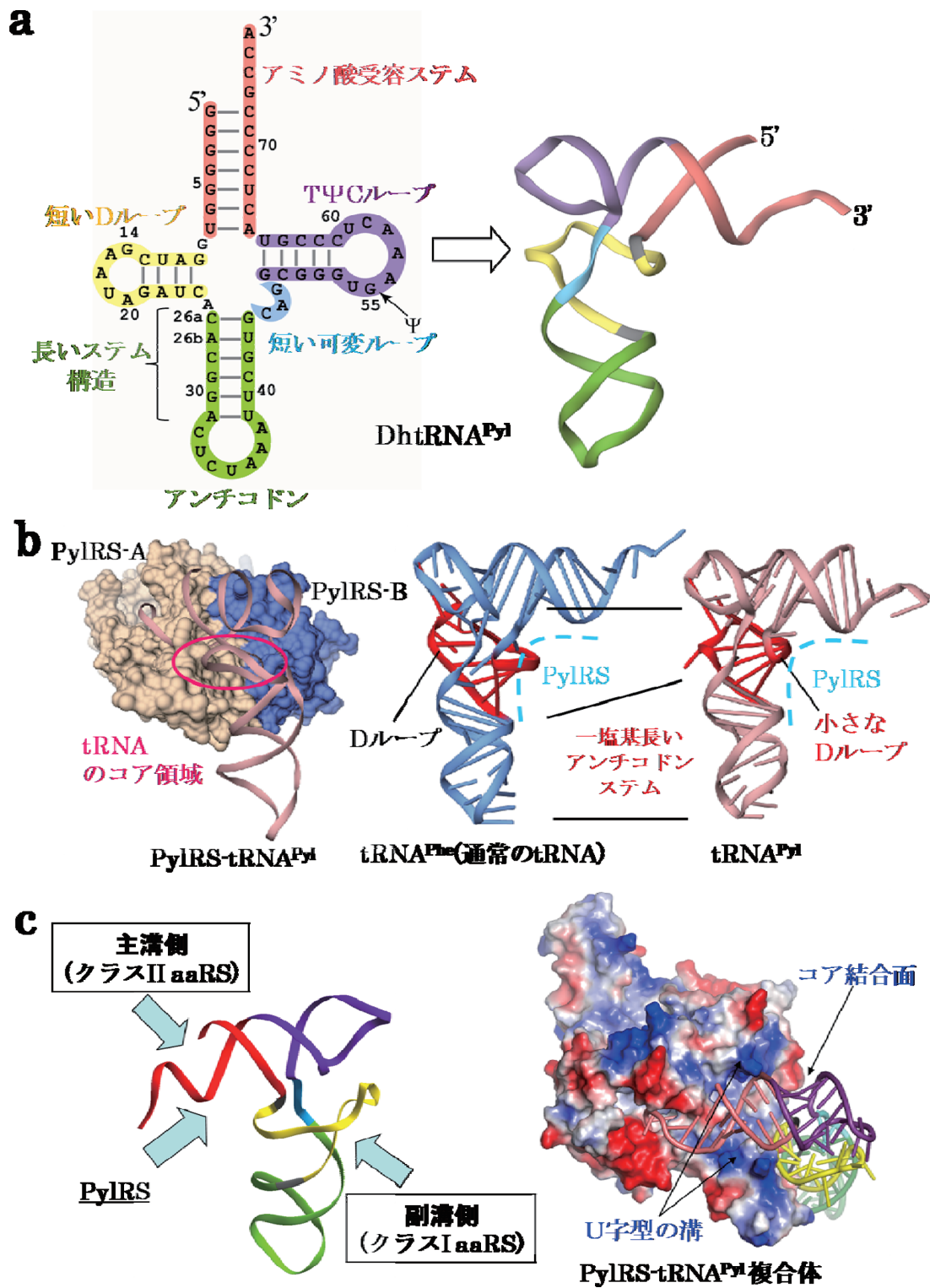


図2 tRNA<sup>Pyl</sup>の構造とPyIRSとの相互作用  
tRNA<sup>Pyl</sup>の二次構造と三次構造(a), tRNA<sup>Phe</sup>とtRNA<sup>Pyl</sup>の構造比較(b), PyIRSによるtRNA<sup>Pyl</sup>の認識様式(c)

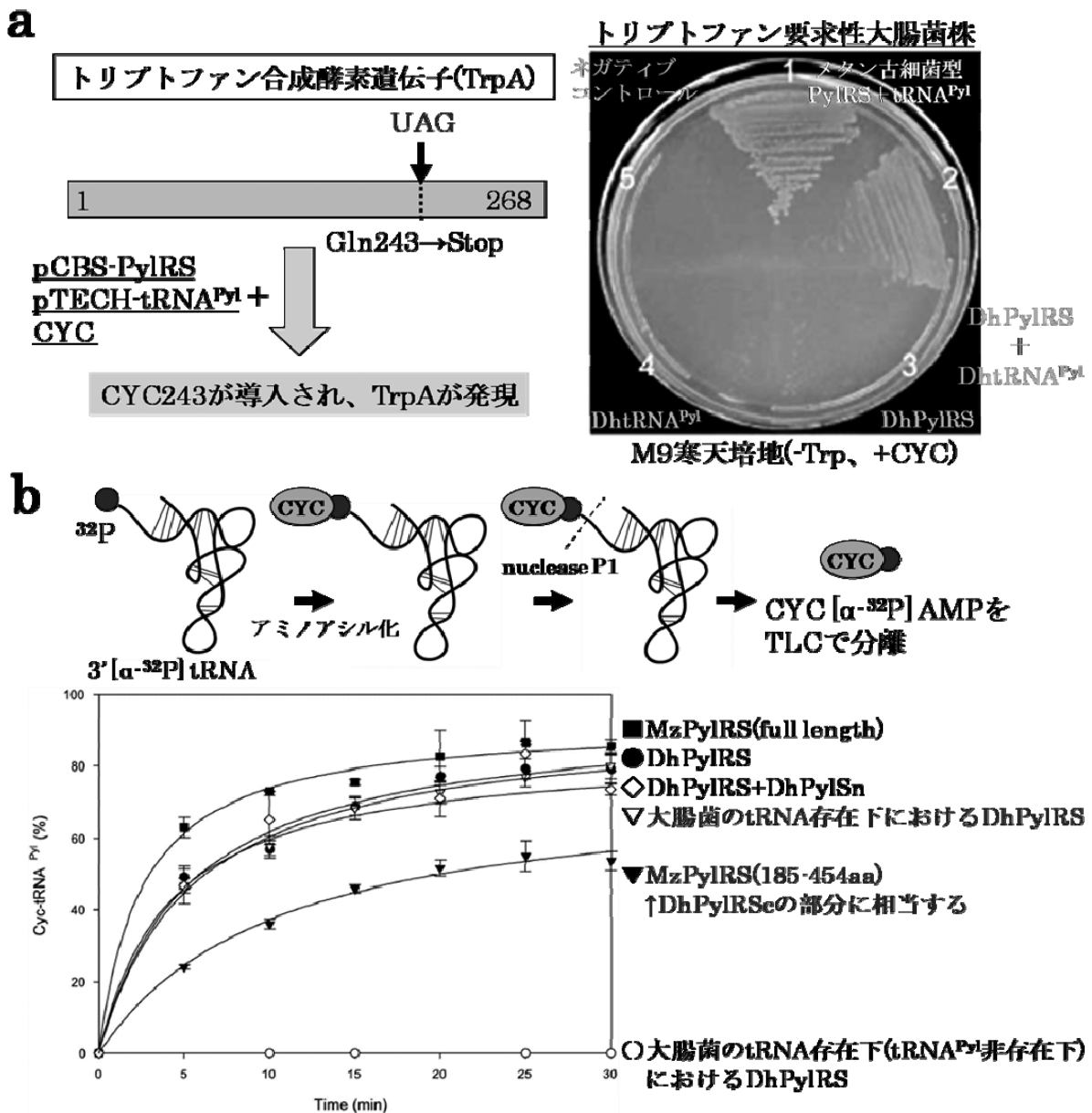


図3 PyIRSのCYC転移活性測定実験

*in vivo*におけるPyIRSのCYC転移活性測定実験(a), *in vitro*におけるPyIRSのCYC転移活性測定実験(b)

行った後、ヌクレアーゼP1で分解した末端のAを薄層クロマトグラフィーで分離・検出した。実験の結果、構造解析を行ったDhPylRSは*in vitro*においても直交性を持ってCYCをtRNA<sup>Pyl</sup>に転移した(図3b)。また、同時に行ったメタン古細菌型PylRSの転移実験において、メタン古細菌ではPylRSnに相当する部分を欠損させると活性が落ちることが示唆された。真正細菌型PylRSではPylRSnの有無に転移活性が左右されないことから、PylRSnの役割が

メタン古細菌と真正細菌で異なる可能性が示唆された。DhPylRSに関しては今回の構造解析により、tRNAに対するPylRSnの位置が予想され、この位置はtRNAのTΨCアーム付近であることが分った。このことからPylRSnは、tRNAのTΨCアームの認識に関与している可能性が示唆された。

以上のことから、DhPylRSは形状相補的にサプレッサーtRNA<sup>Pyl</sup>を認識することで直交性を保って機能するこ

とが明らかとなった。

## 5. おわりに

本研究では、サプレッサー tRNA が他の tRNA には見られないような非常に特殊な構造をとっていることを明らかにし、その特徴的な構造を PylRS が形状相補的に認識することによって直交性が維持される機構を解明することができた。近年、サプレッサー tRNA に非天然のアミノ酸を結合させる aaRS 変異体を作製し、非天然型アミノ酸をタンパク質に取り込ませるバイオテクノロジーが盛んになっている。本研究から、自然は 30 億年前からこのような遺伝暗号の読み替えを生命の中で行ってきたことが明らかとなった。この成果が、さらなる遺伝暗号の拡張と有用な機能を持ったタンパク質の合成技術の実現への手助けとなることを期待している。

- 1) Kuchino, Y. & Muramatsu, T. (1996) *Biochimie*, 78, 1007–1015.
- 2) Beier, H. & Grimm, M. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29, 4767–4782.
- 3) Xu, X., Carlson, B.A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R. S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. (2007) *Plos Biology*, 5, 96–105.
- 4) Yuan, J., Palioura, S., Salazar, J.C., Su, D., O'Donoghue, P., Hohn, M.J., Cardoso, A.M., Whitman, W.B., & Söll, D. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 18923–18927.
- 5) Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J. A., & Chan, M.K. (2002) *Science*, 296, 1462–1466.
- 6) Théobald-Dietrich, A., Frugier, M., Giegé, R., & Rudinger-Thiron, J. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32, 1091–1096.
- 7) Watanabe, Y., Kawai, G., Yokogawa, T., Hayashi, N., Kumazawa, Y., Ueda, T., Nishikawa, K., Hirao, I., Miura, K., & Watanabe, K. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 5378–5384.
- 8) Helm, M., Brulé, H., Friede, D., Giegé, R., Pütz, D., & Florentz, C. (2000) *RNA*, 6, 1356–1379.
- 9) Herring, S., Ambrogelly, A., Polycarpo, C.R., & Söll, D. (2007) *Nucleic Acids Res.*, 35, 1270–1278.
- 10) Mukai, T., Kobayashi, T., Hino, N., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371, 818–822.
- 11) Herring, S., Ambrogelly, A., Gundllapalli, S., O'Donoghue, P., Polycarpo, C.R., & Söll, D. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 3197–3203.
- 12) Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2008) *J. Mol. Biol.*, 378, 634–652.
- 13) Ambrogelly, A., Gundllapalli, S., Herring, S., Polycarpo, C., Frauer, C., & Söll, D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3141–3146.

野澤 佳世, 石谷 隆一郎, 濡木 理  
(東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻)

Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Pyl</sup> structure reveals the molecular basis of orthogonality  
Kayo Nozawa, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

## tRNA の硫黄修飾塩基の機能とその生合成機構

### はじめに

RNA は転写後にスプライシングや化学修飾などのプロセシングを経て成熟し、その機能を発揮する。tRNA はタンパク質合成において mRNA のコドンとアミノ酸を結び付けるアダプター分子として働く。tRNA には多数の転写後修飾が存在するが、なかでも硫黄修飾はコドン認識や立体構造の安定化などの役割を担っている。そのため、RNA に硫黄を導入する機構は生命の維持にとって欠くことのできない重要な機構である。

### 1. 硫黄修飾塩基 2-チオウリジン (s<sup>2</sup>U) の機能

現在までに 90 種類以上の化学修飾が tRNA 分子に見られている (<http://biochem.ncsu.edu/RNAmods/>)。修飾の形態はメチル化、アセチル化、硫黄化、アミノ酸付加、糖付加など実に様々であるが、本稿ではアンチコドンと T-ループにある 2-チオウリジン (s<sup>2</sup>U) の機能と生合成について概説する。

アンチコドンウォブル位 (34 位) の修飾はコドンの縮重を適切に制御し、正確なタンパク質合成に必須である。グルタミン酸、グルタミン、リジンの tRNA の 34 位はほぼすべての生物において、5-メチル-2-チオウリジン誘導体 (xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) に修飾される<sup>1)</sup>(図 1A) (5 位は生物種により異なる)。かさ高い 2-チオ基と 2'-水酸基の立体障害により C3'-endo 型が安定化される<sup>2)</sup>(図 1B)。これによりアンチコドンの xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U はコドン 3 文字目の A・G との対合を強め、C・U と対合するのを防ぎ、2-コドンボックスの正確な解読が可能になる。ヒトではミトコンドリアリジン tRNA の修飾欠損によりミトコンドリア病 (MERRF) が発症する