

6. おわりに

最近の臨床研究では、EGCGを主な成分とする緑茶カテキンの経口投与による前立腺がんの予防作用が示されたが¹⁵⁾、疫学データには、緑茶飲用とがん予防作用との相関性に否定的な報告もある。今後、緑茶カテキン感受性遺伝子の解明が、緑茶カテキンの効き方の違い（例えば、EGCG感受性がんと耐性がん）の理解に繋がり、緑茶カテキンが機能性素材として、より安全で効果的に活用されることを期待したい。

本稿で紹介した筆者らの研究は、九州大学大学院農学研究大学院食糧化学研究室において行われました。本研究室のスタッフ、多くの学生さん、田辺三菱製薬下村猛博士ならびに野菜茶業研究所山本（前田）万里博士をはじめ研究を力強くサポートして頂いた皆様に深くお礼申し上げます。

- 1) Ermakova, S., Choi, B.Y., Choi, H.S., Kang, B.S., Bode, A.M., & Dong, Z. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 16882–16890.
- 2) Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D., Hou, Z., Ju, J., & Lu, G. (2006) *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 170–175.
- 3) Chow, H-H., Cai, Y., Hakim, I.A., Crowell, J.A., Shahi, F., Brooks, C.A., Dorr, R.T., Hara, Y., & Alberts, D.S. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 3312–3319.
- 4) Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., & Yamada, K. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380–381.
- 5) Menard, S., Castronovo, V., Tagliabue, E., & Sobel, M.E. (1997) *J. Cell. Biochem.*, **67**, 155–165.
- 6) Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., & Tachibana, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 3050–3058.
- 7) Umeda, D., Tachibana, H., & Yamada, K. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 628–635.
- 8) Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., & Tachibana, H. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 172–176.
- 9) Shammas, M.A., Neri, P., Koley, H., Batchu, R.B., Bertheau, R.C., Munshi, V., Prabhala, R., Fulciniti, M., Tai, Y.T., Treon, S.P., Goyal, R.K., Anderson, K.C., & Munshi, N.C. (2006) *Blood*, **108**, 2804–2810.
- 10) Fujimura, Y., Yamada, K., & Tachibana, H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 524–531.
- 11) Sano, M., Suzuki, M., Miyase, K., Yoshino, K., & Maeda-Yamamoto, M. (1999) *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1906–1910.
- 12) Tachibana, H., Sunada, Y., Miyase, T., Sano, M., Maeda-Yamamoto, M., & Yamada, K. (2000) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 452–454.
- 13) Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., Chikumoto, T., Kawahara, H., Kawakami, Y., Sano, M., Miyase, T., Tachibana, H., Nagai, H., & Kawakami, T. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 4486–4492.
- 14) Fujimura, Y., Umeda, D., Yano, S., Maeda-Yamamoto, M., Yamada, K., & Tachibana, H. (2007) *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., **364**, 79–85.

- 15) Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., & Corti, A. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 1234–1240.

立花 宏文

(九州大学大学院農学研究大学院生物機能科学部門
食糧化学分野)

Green tea polyphenol receptor and the signaling pathway
Hirofumi Tachibana (Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan)

アミノアシル tRNA タンパク質転移酵素の 基質認識、反応触媒の分子機構の解明

1. はじめに

生体における特定のタンパク質の空間的-時間的分解は、翻訳後の遺伝子発現に重要な役割を担っている。原核生物、真核生物に共通してタンパク質の分解のしやすさはタンパク質のアミノ末端残基によって支配されている（Nエンド則）。Nエンド則は染色体の分離、細胞死、一酸化窒素の探知などに関与するタンパク質の分解に関与していることが知られており、高次生命現象の制御に関わっている¹⁻⁸⁾。原核生物、真核生物ともにNエンド則によるタンパク質分解経路に至る初期段階で、タンパク質のアミノ末端に不安定化アミノ酸を付加するアミノアシル tRNA タンパク質転移酵素が関与している。この酵素は特定のアミノアシル tRNA を認識し、tRNA の 3'末端に付加されたアミノ酸を、特定のアミノ酸をアミノ末端に有するタンパク質のアミノ末端へ転移する酵素である。不安定化アミノ酸がアミノ末端へ付加されたタンパク質はタンパク質分解複合体によって分解を受ける。これまでに真核生物では Arg-tRNA^{Arg} を基質供与体として、N末端がアスパラギン酸/グルタミン酸残基であるタンパク質を受容体とするアルジニル tRNA 転移酵素、真正細菌では Leu-tRNA^{Leu}/Phe-tRNA^{Phe} を供与体として、N末端がリジン/アルギニン残基であるタンパク質を受容体とするロイシル/フェニアラニル tRNA 転移酵素（LF 転移酵素）が知られている。また、最近では、これらの酵素群に属するが、アミノ酸の供与基質、受容基質の特異性の異なるものが見いだされてきている⁹⁾。しかしながら、これらの酵素の基質認識、反

応触媒機構はこれまで明らかにされていなかった。我々は、アミノアシル tRNA タンパク質転移酵素の反応機構および基質認識の分子機構を明らかにすることを目的とし、大腸菌由来の LF 転移酵素とアミノアシル tRNA アナログとの複合体、さらに反応産物ペプチドとの複合体構造の解析を行った^{10,11)}。

2. アミノアシル tRNA の認識機構

真正細菌の LF 転移酵素は、アミノ酸供与体として Leu-tRNA^{Leu} あるいは Phe-tRNA^{Phe} を特異的に認識し、他方、アミノ酸の受容体基質として、N 末端にアルギニンあるいはリジンをもつタンパク質を認識して、ペプチド結合形成反応を触媒する。このペプチド結合形成反応では、アミノ酸受容体タンパク質の N 末端の α アミノ基が、アミノアシル tRNA のカルボニル炭素を求核攻撃して、正四面体中間体を経てペプチド結合を形成する。我々は大腸菌由来の LF 転移酵素単体、またアミノアシル tRNA アナログであるピューロマイシン (Pm) との複合体の構造を X 線結晶構造解析によって決定した¹⁰⁾ (図 1)。ピューロマイシンは、アミノアシル tRNA のアナログとして、アミノアシル tRNA の酵素への結合を阻害することが報告されている。LF 転移酵素は N 末端ドメインと C 末端ドメインの二つのドメインから構成されるコンパクトな構造をとる (図 1a)。C 末端ドメインは、六つの α ヘリックスに囲まれた八つの β 鎖から構成される GNAT フォールドをとっている。基質であるアミノアシル tRNA の 3'末端アミノ酸に相当するピューロマイシンの *p*-メトキシベンジル基は、C 末端ドメインの深い疎水的ポケットにはまり込んでいる (図 1b)。またこの疎水ポケットは、Gly155-Glu156-Ser157-Met158 からなる C 字型構造で縁取られており、*p*-メトキシベンジル基はその縁からポケットへ頭を突っ込む形をとっている (図 1b)。なお、アミノアシル tRNA の 3'CCA 末端の A76 塩基に相当するピューロマイシンの 6-*N,N*-ジメチルアデニンは、別の疎水結合で酵素に固定されており、特異的な水素結合による認識はない。

このピューロマイシンとの複合体構造をもとに、LF 転移酵素の特異的なアミノ酸供与体である Leu-tRNA^{Leu} あるいは Phe-tRNA^{Phe} のロイシンあるいはフェニルアラニンの LF 転移酵素の疎水的ポケットへの結合モデルを構築した (図 1c)。このモデルではアミノ酸の α , β 炭素がピューロマイシンの対応する炭素原子と重なるようにモデルが組み立てられている。このモデルから疎水的なロイシン、フェニルアラニンともに疎水的なポケットに結合することができ、ま

た C 字型のポケットの縁とも全く立体的障害が生じないことが明らかになった。一方、イソロイシンやバリンなど、疎水的なアミノ酸ではあるが、そのアミノアシル tRNA が LF 転移酵素のアミノ酸供与基質とならないものでは、 β 炭素から分岐した側鎖 (メチル基) が C 字型の縁と立体障害を生じ、疎水的なポケットに結合できないことが明らかになった。これらの結果は LF 転移酵素がアミノアシル tRNA のうち、疎水的かつ β 炭素に枝分かれがないアミノ酸を受容したものを特異的にアミノ酸供与体基質として認識するというをよく説明する。したがって、LF 転移酵素のアミノアシル tRNA の 3'末端部位が結合する疎水的なポケットの形と大きさがアミノ酸供与体基質の特異性を決定していることが明らかになった。

3. アミノ酸受容体の認識機構

LF 転移酵素のアミノ酸受容基質である N 末端にアルギニン、あるいはリジンをもつタンパク質の LF 転移酵素による認識機構、およびペプチド結合形成触媒機構を明らかにするため、実際のアミノアシル tRNA (Phe-tRNA^{Phe}) の 3'末端部分と同じ構造をもつ、フェニルアラニルアデノシン (rA-Phe) を化学合成し、LF 転移酵素との複合体の構造を解析した¹¹⁾ (図 2a)。rA-Phe のベンジル基はピューロマイシンの *p*-メトキシベンジル基と同様に C 字型の縁をもった疎水的なポケットに入り込んでおり (図 2b)、二つの複合体構造では、アナログのアミノ酸側鎖はよく重なりあった。一方、リボースの部分は二つの構造では重なりあわず、その結果、フェニルアラニルアデノシンのアデニン塩基は LF 転移酵素と弱い疎水的な相互作用を示し、rA-Phe のアデノシン部分はアミノ酸部分と比較して非常に動きやすい構造であった。

LF 転移酵素によるアミノ酸受容基質認識、ペプチド結合触媒機構を明らかにするため、LF 転移酵素とフェニルアラニンが α カゼイン断片 (R-Y-L-G-Y-L) の N 末端のアルギニン残基へ転移された、短い反応産物ペプチドとの複合体の解析を行った⁹⁾。

反応産物ペプチドは N 末端のフェニルアラニン、および α カゼイン断片の N 末端のアルギニンを除いて配列非特異的にそのペプチド主鎖が認識されている (図 2c)。 α カゼイン断片の N 末端のアルギニンの側鎖は、疎水的なポケットに隣接する負電荷を帯びたポケットに入り込んでおり、Glu156 と強い水素結合を形成している。よって、LF 転移酵素は疎水的なポケットに隣接した負電荷を帯びたポケットによって、選択的に N 末端にアルギニンやリ

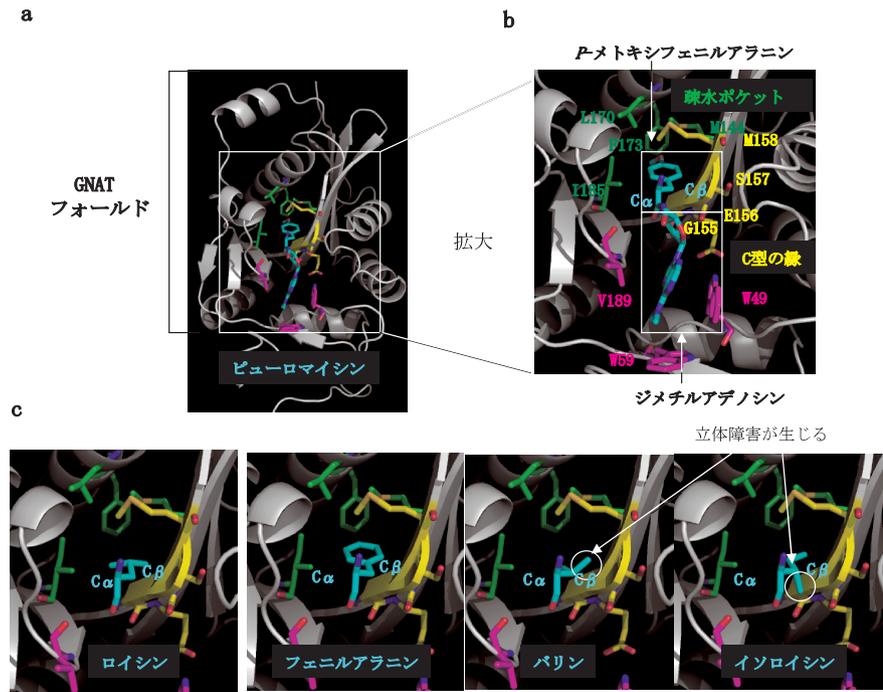


図1 LF 転移酵素の構造

(a)大腸菌由来 LF 転移酵素とピューロマイシン (シアン) との複合体全体構造. (b)LF 転移酵素によるピューロマイシンの認識. (a)のピューロマイシン結合部分の拡大図. *p*-メトキシフェニルアラニンは疎水的なアミノ酸 (緑) で構成されるポケットによって, ジメチルアデノシンの塩基部分の疎水的相互作用で認識されている (マゼンタ). ポケットの縁は C 字型構造をとる (黄色). (c)疎水的ポケットへのアミノ酸結合 (左から Leu, Phe, Val, Ile) モデル. Val と Ile の場合には β 炭素から分岐しているメチル基と C 字型の縁との間で立体障害が生じる.

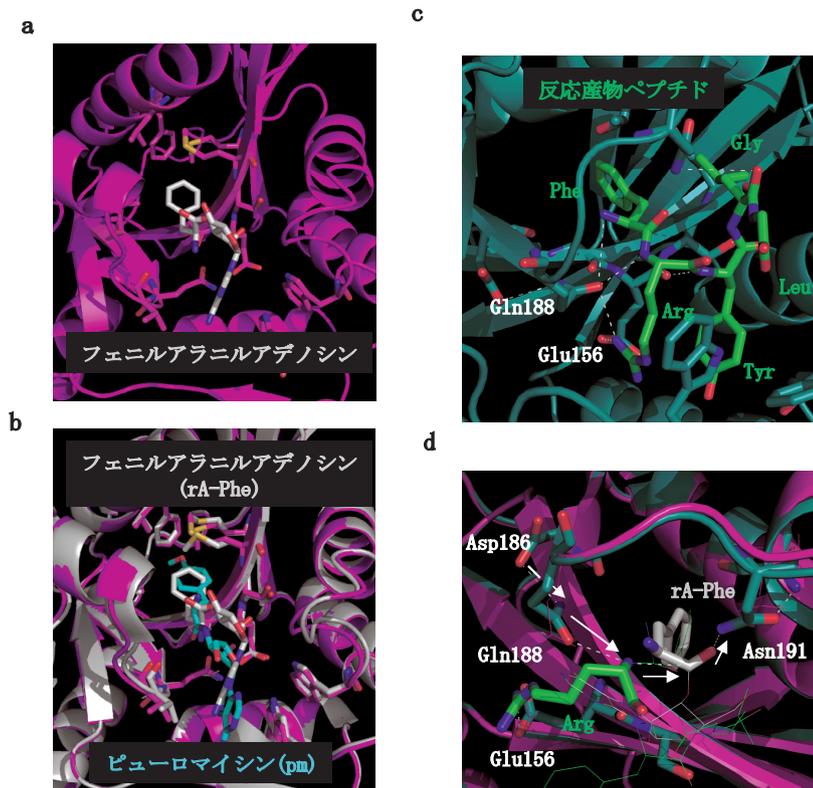


図2 LF 転移酵素の基質認識と反応触媒機構

(a)LF 転移酵素によるフェニルアラニルアデノシン (rA-Phe: 灰色) の認識. (b)図1(a)のピューロマイシン (シアン) との複合体と図2(a)の rA-Phe (灰色) との複合体構造の重ね合わせ. (c)LF 転移酵素と反応産物ペプチド (F-R-Y-L-G: 緑) との複合体構造. N 末端にアルギニンをもつアミノ酸受容基質は Glu156 によって認識. (d)LF 転移酵素とフェニルアラニルアデノシン複合体 (マゼンタ: rA-Phe は灰色) と反応産物ペプチドとの複合体 (青: ペプチドは緑色) 構造の重ね合わせ. 矢印は電子リレーを表す.

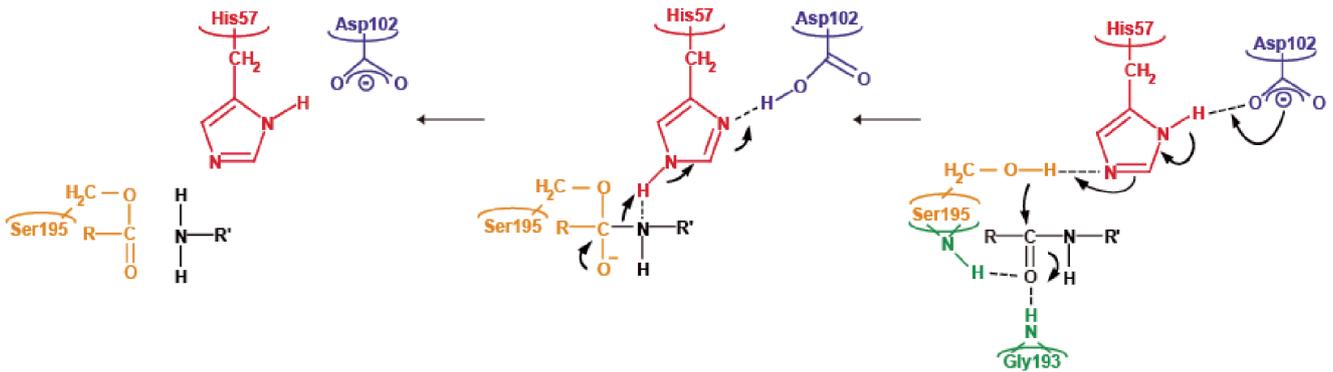
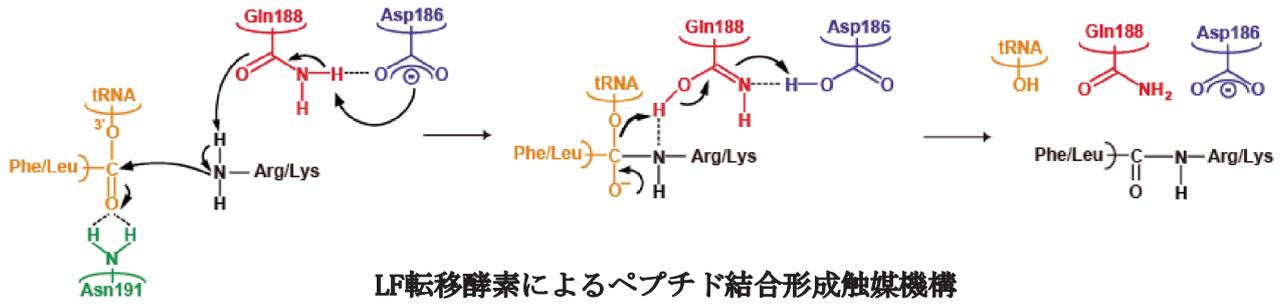


図3 LF転移酵素によるペプチド形成反応触媒機構（上図）とセリンプロテアーゼによるタンパク質分解過程におけるアシルセリン中間体形成の逆反応（下図）の類似性

ジンのような正電荷を有するアミノ酸をもつタンパク質をアミノ酸受容体基質として認識していることが明らかになった。

4. ペプチド結合形成機構

LF 転移酵素と rA-Phe の複合体，および反応産物ペプチドとの複合体構造の重ね合わせを行った（図 2d）．この重ね合わせでは，反応産物ペプチドのアルギニンの主鎖のアミド結合は rA-Phe のカルボニル炭素と近いところに位置しており，基質タンパク質の N 末端の α アミノ基がアミノアシル tRNA のエステル結合のカルボニル炭素を求核攻撃することを可能にしている．反応産物ペプチドのアルギニンの主鎖のアミド結合は Gln188 の ϵ 位の酸素原子と水素結合を形成していることから，Gln188 の ϵ 位の酸素原子が反応触媒に関与していることが示唆された．さらに，Gln188 の ϵ 位の窒素酸素原子は Asp186 の δ 位の酸素原子と水素結合を形成し，rA-Phe のカルボニル酸素は Asn191 の δ 位の窒素原子と水素結合をしている．これらのことか

ら，以下に述べるような LF 転移酵素によるペプチド結合触媒機構を考えることができる（図 3 上図）．

まず，Asp186 から Gln188 へ電子が移動し，その結果 Gln188 の ϵ 位の酸素原子が，基質タンパク質の N 末端の α アミノ基のプロトンを引き付けることが可能になる．この結果，基質タンパク質の N 末端の α アミノ基がアミノアシル tRNA のエステル結合のカルボニル炭素を攻撃できる求核基となりうる．Gln188 はプロトンを引き付けるという点で，一般塩基としての役割を果たしている．通常，Gln188 単独では一般塩基として働かないが，Gln188 と水素結合を形成する Asp186 から Gln188 へ電子が供与されることによって，一般塩基として働くと考えられる．また，Asn191 の δ 位の窒素酸素原子とアミノアシル tRNA のカルボニル基の酸素原子とは水素結合を形成している． α アミノ基のアミノアシル tRNA のエステル結合のカルボニル炭素を求核攻撃した後，反応は正四面体中間状態を経由して進行する．Asn191 の δ 位の窒素酸素原子とアミノアシル tRNA

のカルボニル基の酸素原子との水素結合は、この正四面中間を安定する役割を担っている。αアミノ基からGln188へ引き抜かれたプロトンはtRNAへと受け渡され、最終的に新たなペプチド結合が形成され、tRNAが解離する。後半の反応では、Gln188が一般酸触媒として働いている。したがって、LF転移酵素によるペプチド結合形成触媒反応は一般酸塩基触媒機構である。

我々の解析から明らかになったLF転移酵素によるペプチド結合形成反応触媒機構は、キモトリプシンをはじめとするセリンプロテアーゼによるタンパク質分解過程におけるアシルセリン中間体形成の逆反応に類似している¹²⁾(図3下図)。この比較ではキモトリプシンのアシル化されたセリン残基(Ser195)はLF転移酵素のアミノ酸供与基質であるアミノアシルtRNAに相当する。キモトリプシンにおけるアシルセリン中間体形成の逆反応において、一般塩基触媒としてのHis57が加水分解されたペプチドのαアミノ基からプロトンを引き抜き、それがアシル化されたSer195のカルボニル炭素を求核置換攻撃する。四面体型中間体はSer195とGly193の主鎖のアミド基から構成されるオキシアニオンホールによって安定化され、αアミノ基から引き抜かれたプロトンは、今度は一般酸触媒として働くHis57からSer195へ転移され、ペプチド結合が形成される。この反応においてHis57とAsp102の間での電子リレーが、His57が一般酸塩基触媒として働く助けとなっている。この逆反応において、LF転移酵素のAsp186, Gln188, Asn191はそれぞれキモトリプシンのAsp102, His57そしてオキシアニオンホールに対応していることがみてとれる。

5. おわりに

LF転移酵素によるペプチド結合形成反応はセリンプロテアーゼによるタンパク質分解過程におけるアシル中間体形成の逆反応と類似しており、この類似性は数年前にリボソームにおけるペプチド結合形成触媒機構として提唱されていた¹³⁾。しかしながら、現在では、リボソームにおけるペプチド結合触媒反応は、PサイトのペプチジルtRNAの2'水酸基を介したプロトンのシャトルによって進行すると考えられている¹⁴⁾。今回明らかになった、LF転移酵素による反応触媒機構はリボソームのそれとは本質的に異なることが示唆された。今後、リボソームのRNAやそれに配位する水分子が主体となるペプチド結合反応装置が、いかにしてタンパク質が主体となるペプチド結合形成酵素として変換されたかについての更なる知識が蓄積されることを

期待する。

- 1) Varshavsky, A. (1992) *Cell*, **69**, 725-735.
- 2) Varshavsky, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12142-12149.
- 3) Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K., & Vershavsky, A. (2001) *Nature*, **410**, 955-959.
- 4) Varshavsky, A. (2003) *Natl. Cell Biol.*, **5**, 373-376.
- 5) Hu, R.G., Sheng, J., Qi, X., Xu, Z., Takahashi, T.T., & Varshavsky, A. (2005) *Nature*, **437**, 981-986.
- 6) Mogk, A., Schmidt, R., & Bukau, R. (2007) *Trends Cell Biol.*, **17**, 165-172.
- 7) Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D.A., & Bukaku, B. (2006) *Nature*, **439**, 753-756.
- 8) Varshavsky, A. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 383-387.
- 9) Graciet, E., Hu, R.G., Piatkov, K., Rhee, J.H., Schwarz, E.M., & Varshavsky, A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3078-3083.
- 10) Suto, K., Shimizu, Y., Watanabe, K., Ueda, T., Fukai, S., Nureki, O., & Tomita, K. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5942-5950.
- 11) Watanabe, K., Toh, Y., Suto, K., Shimizu, Y., Oka, N., Wada, T., & Tomita, K. (2007) *Nature*, **18**, 867-871.
- 12) Steitz, T.A. & Shulman, R.G. (1982) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **11**, 419-444.
- 13) Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 920-930.
- 14) Rodnina, M.V., Beringer, M., & Wintermeyer, W. (2007) *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 20-26.

渡邊 和則¹, 董 雪松¹, 富田 耕造^{1,2}

(¹ 独) 産業技術総合研究所生物機能工学研究部門,

² 独) 科学技術振興機構

戦略的創造研究推進事業 PRESTO)

Molecular basis for peptide-bond formation by an aminoacyl-tRNA protein transferase

Kazunori Watanabe¹, Yukimatsu Toh¹, and Kozo Tomita^{1,2}

(¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Institute for Biological Resources and Functions, ²Japan Science and Technology Agency, Basic Research Program, PRESTO, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)