

氏名	たき た てい すけ 滝 田 禎 亮
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 892 号
学位授与の日付	平 成 8 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学位論文題目	The Structure and Functions of the Lysyl-tRNA Synthetase of <i>Bacillus stearothermophilus</i> (<i>Bacillus stearothermophilus</i> のリシル tRNA 合成酵素の構造と機能)
論文調査委員	(主 査) 教 授 外村辨一郎 教 授 左右田健次 教 授 佐々木隆造

論 文 内 容 の 要 旨

アミノアシル tRNA 合成酵素は、遺伝情報をタンパク質の構造情報に翻訳する過程で、厳密な基質認識により翻訳の精度を保証している重要な酵素である。各生物はタンパク質を構成する20種のアミノ酸のそれぞれに特異的なARSを少なくとも1種以上有しているが、構造の類似したアミノ酸及びそれが結合するtRNAを厳密に識別する高い基質特異性の発現機構については未だ不明の点が多く、その解明が待たれている。本論文は、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来のリシル tRNA 合成酵素 (L-lysine : tRNA^{Lys} ligase (AMP forming); EC6.1.1.6) (以下, LysRS) を対象とし、基質との相互作用の特徴を解析し、また、LysRS の一次構造を明らかにした結果をまとめたものであり、その主な内容は以下のとおりである。

1. 著者は、*Bacillus stearothermophilus* NCA1503 の菌体抽出液から数種のカラムクロマトグラフィーを用いることにより、精製倍率約1,100倍、回収率約30%の好条件で、電気泳動的に単一のLysRS標品を得ることに成功した。この高純度LysRSを用いて、分子量、アミノ酸組成、紫外吸収スペクトル等を明らかにし、さらに、酵素反応の基本的な諸量を明らかにした。

2. 著者は、LysRS の3種類の基質の内、L-リシンとATPの酵素への結合を次の3種の方法を用いて測定した：放射性標識した基質と酵素との結合を直接測定する平衡透析法、基質結合に際して観測されるLysRSのトリプトファン残基由来の蛍光の変化を指標とする蛍光滴定法、並びに、LysRSのATP-PPi交換反応に対する基質濃度及び阻害物質の影響を解析する速度論的方法。これらの異なる測定方法による結果は一致して、L-リシンは単独でLysRSに結合するが、ATP単独では酵素に結合せず、L-リシンが共存する場合にのみATPはLysRSに結合することを明らかにした。即ち、LysRSに対するL-リシンとATPの結合はL-リシンが先に結合する定序順列型であることが初めて示された。

3. 著者は、上記トリプトファン残基由来の蛍光変化を指標として、LysRSとL-リシンの結合及びLysRS・L-リシン複合体に対するATPの結合の速度を、ストップフロー法により測定した。LysRS

へのL-リシンの結合は極めて速く、用いた装置の不感時間(約3msec)以内に反応が完了することを明らかにした。LysRS・L-リシン複合体に対するATPの結合速度は測定可能であり、その反応速度数の解析から、この反応が少なくとも2段階からなることを明らかにし、各段階の速度パラメーターを求めた。

4. 著者は、ガラス繊維濾紙上にLysRS・L-リシン~AMP複合体が効率よく捕捉できることを初めて明らかにし、この複合体の安定性を測定した。

5. 著者は、放射性標識L-リシンのtRNAへの取込み量の測定、放出されるAMPの複合酵素系を用いる連続的測定、及び、上記LysRS・L-リシン~AMP複合体からtRNAへのL-リシンの転移量の測定を併用して、リシルtRNAの合成反応を解析し、各段階の速度パラメーターを求めた。

6. 著者は、L-リシンの数種の類縁体を用いて、L-リシンに対して行ったと同様の測定を行い、LysRSの基質認識機構の一端を解析した。この過程で、極めて安定なLysRS・L-リシンヒドロキサマイト-AMP複合体が生成することを初めて明らかにし、その結合当量を決定した。また、一旦生じたLysRS・5-ヒドロキシ-L-リシン~AMPから、5-ヒドロキシ-L-リシンはtRNAに転移されることなく系から除外され、いわゆる「校正機構」がLysRSにも存在することが証明された。

7. 著者は、LysRS構造遺伝子をクローン化し、その1,479残基の塩基配列を確定し、それに基づきLysRSの一次構造(493アミノ酸残基)を推定した。このアミノ酸配列は、別にLysRSのペプチド分析から得た部分配列を全て含み、また、既知の大腸菌由来のLysRSの一次構造と53%の相同性を有していた。

論文審査の結果の要旨

アミノアシルtRNA合成酵素(以下、ARS)は、遺伝情報をタンパク質の構造情報に翻訳する過程で、厳密な基質認識により翻訳の精度を保証している重要な酵素であり、構造の類似したアミノ酸及びそれが結合するtRNAを正確に識別する高い基質特異性を備えている。しかし、この高い基質特異性の発現機構については未だ不明の点が多い。本論文は、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来のリシルtRNA合成酵素(以下、LysRS)を対象とし、基質特異性発現の分子機構を解明することを目的として、基質との相互作用の特徴を解析し、また、LysRSの一次構造を明らかにした結果をまとめたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 著者は、*Bacillus stearothermophilus* NCA1503の菌体抽出液から精製倍率約1,100倍、回収率約30%の好条件で、電気泳動的に単一のLysRS標品を得る精製法を構築した。これにより本酵素の詳細な研究の基礎が確立された。

2. 著者は、LysRSの3種類の基質の内、L-リシンとATPの酵素への結合を測定原理の異なる3種の方法を用いて測定した。それらの結果の解析は一致して、LysRSに対するL-リシンとATPの結合はL-リシンが先に結合する定序順列型であることを明らかにした。これは、全てのARSを通じて、アミノ酸基質が先に結合する定序順列型が速度論的手法で証明された最初の例である。

3. 著者は、LysRSのトリプトファン残基由来の蛍光変化を指標として、LysRSとL-リシンの結合及び、LysRS・L-リシン複合体に対するATPの結合の速度を、ストップフロー装置を用いる迅速反応測

定法により測定した。この ATP の結合は、反応速度定数の濃度依存性の解析から、少なくとも 2 段階からなることを明らかにし、各段階の速度パラメーターを求めた。基質結合の遷移相の一部を明らかにすることにより、本酵素反応の特徴をより鮮明に示すことに成功した。

4. 著者は、L-リシンの数種の類縁体を用いて、L-リシンに対して行ったと同様の測定を行い、LysRS の基質認識機構の一端を解析した。LysRS はタンパク質を構成するアミノ酸に対しては結合の段階で厳しい選択性を示すが、類縁体に関しては特異性が低いところがある。しかし、5-ヒドロキシ-L-リシンの場合、一旦生じた LysRS・5-ヒドロキシ-L-リシン~AMP 複合体から、5-ヒドロキシ-L-リシンは tRNA に転移されることなく系から除外されることが明らかにされた。厳密な基質特異性発現の為のいわゆる「校正機構」が LysRS にも存在することが初めて証明された。

5. 著者は、LysRS 構造遺伝子をクローン化し、その 1,479 残基の塩基配列を確定し、それに基づき LysRS の一次構造 (493 アミノ酸残基) を推定した。これにより、本酵素の構造解析のための一つの基礎が確立された。

以上のように本論文は、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来のリシル tRNA 合成酵素について、酵素化学的、生化学的、及び、分子生物学的手法を用いて基礎的で重要な知見を明らかにしたものであり、酵素化学並びに生化学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 8 年 2 月 19 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。