

氏 名	きた ばたけ まこと 北 真 真
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1734 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	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌グルタミンイル tRNA 合成酵素：ドメイン間の機能的相互作用

論文調査委員 (主 査)
教 授 山 岸 秀 夫 教 授 宮 田 隆 教 授 岡 穆 宏

論 文 内 容 の 要 旨

筆者は、大腸菌の tRNA^{Gln} とグルタミンイル tRNA 合成酵素 (GlnRS) の相互認識の問題を、伝統的に行われてきた分子遺伝学的なアプローチに加え、新しい分子生物学的手法を取り入れることによって研究した。すなわち、遺伝学的な変異体スクリーニングにより分離した株を、PCR や酵素精製などの技術を駆使して多角的に分析し、GlnRS の内部にある三つのドメイン (アンチコドン認識、アクセプター・ステム結合、アミノ酸活性化部位) が互いに緊密な連携をとりあっていることを示した。

そのための最初のステップとして、GlnRS の温度感受性株から偽復帰株を取るという方法を用い、*glnS* 遺伝子内部に変異を持つ大腸菌変異株を多数分離した。これらの株よりコロニーサイズを指標として、増殖速度がもとの温度感受性株とほぼ等しいもののみが選択された。*glnS* のこの温度感受性株は許容温度においても、野生株よりも遅い増殖速度を示し、その増殖速度は野生型 *glnS* を外部より導入することにより相補出来る。このことは増殖速度がその株の持つ変異 *glnS* の活性に比例していることを表している。そこで同程度の増殖速度を持つ偽復帰株を選ぶことによって、活性がもとの温度感受性株とほぼ等しい偽復帰株を選抜した。この段階で野生型に戻った真の復帰株は除かれ、*glnS* の二重変異株が選択されたことになる。

それらをグルタミン tRNA の変異株である su^{+2} を持つ λ phage とクロス・ストリークすると、 su^{+2} に対するチャージングに変化の見られるクローンが観察された。増殖速度や野生型 *lacZ* の発現を調べると、変異株 #1 の持つ GlnRS は 30°C において、野生型の tRNA^{Gln} に対してもとの温度感受性株と同様のチャージング活性が観察されたが、 su^{+2} に対しては温度感受性株の約 3 分の 1 の効率でしかチャージ出来ないことが分かった。tRNA^{Gln} と su^{+2} では、アンチコドンが CUG から CUA に変化しているだけであり、この GlnRS 変異株はグルタミン tRNA のアンチコドンの三文字目の違いを見分けていることになる。

#1 株が示す su^{+2} に対する特徴的な識別の原因を調べるため、*glnS* 遺伝子をクローニングし、塩基配

列より変異の位置を同定した。変異の位置はアンチコドン認識部位ではなく、それとは遠く離れたアクセプター・ステム結合部位 (C171G) であった。このことは、生体内でのアミノアシルーションにおいて GlnRS がダイナミックな構造変化を行っていることを示唆している。さらに、もとの温度感受性株の持つ E222K 変異と、C171G 変異による GlnRS の性質の変化を詳しく調べるために変異 GlnRS をプラスミドより大量発現させ検討した。その結果、E222K 株は単独で su^+3 に対して温度感受性のミスチャージング活性を示すが、C171G が二重変異として導入されることにより、その活性は消失していることが分かった。このプラスミドを使って変異 GlnRS を精製し、生化学的に解析したところ、E222K はグルタミンに対する K_m が非常に高く、C171G の導入によりそれは緩和されることが示された。

以上の結果より、野生型 GlnRS 株に対して E222K, C171G の変異が入ることによって酵素の性質が大きな影響を受け、tRNA に対する認識を変化させることが明らかにされた。具体的には、E222K 株に対し C171G 変異が新たに導入されることで、温度耐性に代表される構造の安定化が起こり、続いてアクセプター・ステムの認識とアンチコドンの認識が同時に厳しくなり、アミノ酸への親和性も回復する。この論文ではグルタミニル tRNA 合成酵素遺伝子 (*glnS*) の二つの変異が tRNA 認識に与える影響を解析し、GlnRS 酵素の構造変化と関連させて考察している。

論文審査の結果の要旨

GlnRS はアミノアシルアデニレート形成に tRNA を必要とすることが知られている。しかも、ジヌクレオチド結合部位からは 30-40Å 離れた位置にあるにも関わらず、この反応にはアンチコドンの認識が必要とされる。このことは活性部位から離れたアイデンティティ要素が、グルタミンの活性化反応とアミノアシルーション反応に、GlnRS と tRNA の全体的な構造変化を通じて影響を与える、ということを示している。30Å 離れた位置の相互認識が、触媒反応に影響を与えるメカニズムはどのようなものか、この問題は現在のところアミノアシルーションにおける主要な問題として残されている。本研究は温度感受性酵素から遺伝学的に二重変異体を取り、多角的な解析を行うことにより、GlnRS 内部での各ドメイン間の立体的相互作用というべき相関関係を明らかにしている。

E222K 株に対して C171G 変異が導入された場合の効果は、(1)温度感受性の回復 (2) su^+3 へのミスチャージングの是正、これはアクセプター・ステムの識別特異性の向上を示す (3) su^+2 アンチコドンの識別特異性の向上 (4)アミノ酸親和性の上昇。この四点である。いずれも GlnRS の機能および基質特異性が向上している点が注目される。(2)-(4)の各ステップはそれぞれのドメインで行われるものであり、一つの変異の導入がこの三つのドメインの基質特異性を一時に改善するという知見は、各ドメインが機能的に深い相関関係にあるということを示している。

重要な先行研究には、 $tRNA^{Tyr}CUA(su^+3)$ のミスチャージングの問題と、 $tRNA^{Gln}UCA(su^+2op)$ を用いた実験がある。前者はアクセプター・ステム結合部位についての研究であり、後者はアンチコドン認識ドメインについての研究であったが、一つの変異 GlnRS を仲立ちとして、両者の機能構造の複雑な連関が明らかになることとなった。すなわち D235N 変異株である。D235N 変異株は su^+3 へのミスチャージング活性を示すと同時に、野生型 GlnRS がチャージすることの出来ない $tRNA^{Gln}UCA(su^+2op)$ をチ

ャージする活性を持っていた。この二つは、D235N という一つの変異が入ることにより、アクセプター・ステムに対する認識が緩み、同時にアンチコドンに対する識別特異性が鈍っているという二つの効果が現れることを示している。この発見以来、GlnRS のアンチコドン認識部位とアクセプター・ステム認識部位にはなんらかの機能的相関関係があるのではないかと考えられていた。本論文の研究は、E222K からの二重変異株を得るという巧妙な方法で、この仮説を検証している。さらに本研究により得られた変異株では、D235N と大きく異なり、各ドメインの機能が同時に、特異性を上げ、性能を向上させるという結果が得られている。つまり今回の結果が得られたことで、GlnRS のアンチコドンに対する認識とアクセプター・ステムに対する認識は呼応しており、N 末の立体構造の小さな変化により、双方が同じ影響を受ける、ということが明らかになった。

本研究では、伝統的な変異体解析を応用することで、セントラルドグマの中核を占めるアミノアシルレーションにおける、酵素のダイナミックな構造変化が明らかにされた。また、遠く離れた異なるドメイン同士が、機能する上で密接な相互作用を持っていることが示された。これらの事実は、アミノアシルレーションの研究の上で重要な進展であるばかりでなく、広い一般の酵素反応における基質特異性とドメインの高次構造の関係として、重要な発見である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 8 年 1 月 24 日、主論文および参考論文に報告されている研究書類を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。