戦略的創造研究推進事業 発展研究(SORST)

研究終了報告書

研究課題「遺伝暗号翻訳装置の機能的統合および機能的分散の構造的基盤の解明」

研究期間:平成18年4月1日~ 平成20年3月31日

研究者氏名 濡木 理 (東京大学医科学研究所・教授) 1. 研究課題名

遺伝暗号翻訳装置の機能的統合および機能的分散の構造的基盤の解明

2. 研究実施の概要

核酸に刻まれた遺伝情報は、極めて特異性の高い酵素化学反応の集積により正確にアミノ酸 配列に変換され、機能を持つタンパク質として発現する。遺伝暗号の翻訳に働く酵素群は、タ ンパク質、RNA のダイナミックな構造変化を伴いながら、高精度・高特異的な化学反応を触媒 し、タンパク質を合成する。本研究では、まず遺伝暗号翻訳のアダプター分子として働くトラ ンスファーRNA(tRNA)のプロセシングおよび転写後化学修飾の過程に注目し、それぞれの過程 で働く CCA 付加酵素 (RNA ポリメラーゼ) および MnmA チオ化ウリジン合成酵素と tRNA (前駆体) との複合体について、各反応ステップの複数の結晶構造(スナップショット)を決定すること で、高精度・高特異的な化学反応を触媒する動的なメカニズムをムービーとして原子分解能で 明らかにした(*Nature* 2006, *Nature* 2006)。これらの動的過程では、核酸とタンパク質が協同 的に構造を変化させながら活性化して行き、正確な化学反応を可能にしていた。さらに、真核 細胞やその祖先となる古細菌の翻訳系酵素は、複数のタンパク質が(超分子) 複合体を形成し、 統合された化学反応 (チャネリング反応) を触媒すると考えられる。本研究では、第2に、tRNA の化学修飾や間接的なアミノアシル化に働くチャネリング複合体(TusE・tRNA・MnmA、TYW1-4、 box C/D snoRNP)、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) 超分子複合体 (MARS) の再構成と予備 的な結晶化に成功し、構造研究を推進している。また、古細菌において3つの連続した化学反 応を触媒してGln-tRNA^{Gln}を合成するGatDEアミド基転移酵素とtRNA^{Gln}との複合体のX線結晶構 造解析を行い、統合された連鎖反応の触媒機構、さらにアンモニア分子を輸送する分子トンネ ルを明らかにした(Science 2006)。第3に、真核細胞の MARS を構成する aaRS は、タンパク質 合成に働くのみならず、細胞の状態に応じて細胞外に分泌され、細胞死、免疫系の活性化、細 胞の分化に働く。我々は、ヒト由来トリプトファン tRNA 合成酵素(hTrpRS)が、細胞外に分泌 され、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導し、血管新生を抑制する原子メカニズムを報告した (Nat. Struct. Mol. Biol. 2003)。本研究ではさらに、マクロファージの活性化やがん細胞の 浸潤制御に働くヒト由来リジル tRNA 合成酵素(hLysRS)、血管新生抑制や顕著な抗腫瘍活性を 持つ p43 タンパク質の大量調製系を確立し、予備的な結晶化に成功している。今後は、本構造 解析により、超分子複合体構成因子が分散して細胞外で他機能を果たすメカニズムの構造的な 基盤を解明していく。一方、真核細胞の aaRS が他機能を果たすために細胞外に分泌される機構 は未だ明らかでない。本研究の第4の課題として、タンパク質が細胞内から膜を隔てた細胞外 へ輸送される一般的なメカニズムを解明するために、細胞膜(真核細胞では小胞体膜)を介し た新生ペプチドの輸送を行うトランスロコン(超分子複合体)を構成する膜タンパク質、SecYE と SecDF の X 線結晶構造解析を行い、構造決定に成功した。真核細胞では小胞体、ゴルジ体を 経た積荷タンパク質は輸送小胞に包まれて輸送され、細胞膜上で開口放出される。本研究では、 輸送小胞と細胞膜の融合を誘起する Sec4p (Rab) GTPase とその GEF 因子である Sec2p の複合体 の結晶構造解析に成功し、Sec2pによるSec4pの動的な活性化機構を解明した(Structure 2007、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007)。さらに、より一般的な膜輸送として、金属トランスポー ターの結晶構造解析に成功し、金属イオンにより輸送孔の開閉が制御される仕組みを明らかに した (Nature 2007)。

3. 研究構想

研究開始時には、1. tRNA の成熟 (プロセシングと転写後修飾) とアミノアシル化に働く RNA・ タンパク質複合体の構造解析を行い高特異的な酵素反応機構を解明すること、さらに 2. 真核 細胞アミノアシルソーム超分子複合体 (MARS;9種類のアミノアシル tRNA 合成酵素と3種類の 補因子タンパク質から構成)のX線結晶構造解析を行うことにより一連の統合された機能を効 率よく遂行する構造的基盤を解明すること、また 3. この超分子複合体の構成要素が細胞の状 態と呼応して機能的に分散し異常細胞のプログラム死・免疫系の活性化・組織の再形成に働く 構造的基盤を解明し、自然免疫機構に基づく副作用のない抗がん剤を提案することを目標とし た。1 に関しては tRNA プロセシング酵素と tRNA 前駆体、tRNA 修飾酵素と未修飾 tRNA、アミノ アシル tRNA 合成に働く酵素と tRNA の複合体のX線結晶構造解析とこれに基づく変異体解析を 行い、特異的酵素反応の動的なメカニズムを時間分解能で明らかにした。2 に関しては、ソウ ル大学の Kim 博士との共同研究により、牛肝臓から超遠心、tRNA 結合カラム、抗体カラム、イ オン交換カラムを用いて MARS を精製したが、組成の不均一性から結晶化には至っていない。し かし、真核生物の祖先である古細菌において複数の aaRS と翻訳伸長因子 EF-1a がチャネリング 複合体を形成することが共同研究先のオハイオ大学 Ibba 博士により明らかになり、MARS のプ ロトタイプとして構造研究を進め、チャネリング複合体の再構成に成功している。3 に関して は、hLysRS や p43 の大量調製系を確立し、構造研究を進めている。さらに、hLysRS や hTrpRS (トリプトファニル tRNA 合成酵素)、p43 をアフィニティービーズに結合し、これを用いて細 胞抽出液から標的分子を単離・同定し、シグナル伝達機構を解明する計画であったが、Kim 博 士により Two-hybrid システムを用いて、それぞれの標的タンパク質が推定されたため、これら を大量調製し、ミクロ熱量計、表面プラズモン共鳴装置、GST プルダウンを用いた結合解析を 行う計画に変更した。さらに、MARS の構成因子が分散し細胞外へ分泌される機構は未解明であ り、蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いて生細胞内で1分子イメージングを行う計画で あったが、さらに本研究ではその輸送機構そのものに強い興味が生じたため、タンパク質や分 子のより一般的な膜輸送機構を解明すべく、トランスロコンやトランスポーター、開口放出に 働くタンパク質の構造機能解析に着手した。 4. 研究実施内容

(1) 実施の内容

1. 遺伝暗号翻訳系酵素による高精度・高特異的な化学反応触媒機構の時分解構造解析

tRNAの成熟およびアミノアシル tRNA 合成を触媒する酵素と tRNA(前駆体)との複合体について、各反応ステップの複数の結晶構造(スナップショット)を決定することにより、高精度・高特異的な化学反応を触媒する動的なメカニズムをムービーとして原子分解能で明らかにした。

1-1. RNA のチオ化修飾の原子メカニズム (*Nature*, 2006)

硫黄はあらゆる生体分子に含まれており、酸化還元反応や求核置換反応、金属配位、分子認 識など様々な生命化学現象を担っている。一方、硫黄は反応性が極めて高く、この硫黄原子を 水分子等と反応させることなく、生体分子の決まった部位に正確に結合させる高特異的な化学 反応の酵素触媒機構は謎であった。ウリジンの2位のカルボニル基がチオ化された2-チオウリ ジン(s²U)という修飾塩基は tRNA^{Glu}や tRNA^{Iys}、tRNA^{Gln}のアンチコドン1字目に存在し (s²U34)、このチオ基は正確なコドンの認識および特異的なアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS)による認識に必須である。tRNA へのチオ基の導入は、酵素 IscS がシステインから チオール基を過硫化基(-S-S-H)の形で受容し、TusA、TusBCD、TusE という新規の酵素群 が硫黄をリレー方式に受け渡し、最終的に酵素 MnmA が tRNA にチオ基の修飾を行う。本研 究では MnmA と tRNA^{Glu}の3種類の複合体の結晶構造を解析することによって、この3つの 構造が、tRNA の初期結合段階、前反応段階、アデニル化中間状態であることを明らかにし、 チオ化反応のスナップショットを撮ることに成功した(図1)。これらの3段階を通じて、活性 部位付近のαへリックスが構造変化してβシートとループ構造になり、フリップアウトした U34 をさらに活性ポケットの奥に押し込んで、これをアデニル化中間体にする。触媒残基の2 つのシステイン残基は前2段階では分子内ジスルフィド結合を形成して不活化しているが、最

終段階で還元活性型となり硫黄を 受け取って、これが U34 のアデニ ル化活性化された 2 位のカルボニ ル炭素を求核置換攻撃する。さらに 興味深いことに、

構造変化したβシ ートとループ構造は酵素の活性部 位に蓋をして一種の反応器を形成 し、水分子等の侵入を妨げ、反応性 の高い硫黄を正確にウリジンの定 位置に結合させていることが明ら かとなった。実際に s²U を人工的に 有機合成するには保護基の付加と 脱保護を含む何段階もの反応ステ ップを必要とする。酵素は巧妙に化 学反応の場を形成することによっ て、この困難な化学反応を成し遂げ

tRNAの初期結合段階 図 1.

前反応段階 アデニ tRNA の硫化の反応機構

ていることを、我々は初めて明らかにした。 MnmA は TusE から硫黄を受け取り、これを活性 化された tRNA の U34 の 2・カルボニル基に転移す る。前述のように MnmA は tRNA と共同して化学 反応チャンバーを形成しているが、複合体外表面か らこの活性中心に到達する孔があいている。一方、 TusE の活性残基は C 末端のループ領域にある Cys であり、本研究ではこの Cys 残基が先ほどの孔に差 し込まれ硫黄が MnmA に受け渡されると考えてい る (図 2)。実際、TusE・tRNA^{Glu}・MnmA の 3 者複 合体の結晶化に予備的に成功しており(分解能 5Å)、 結晶を改善して、本チャネリング複合体の構造決定 を行う。





図 2. TusE・tRNA^{Glu}・MnmA チャネリング複合体の モデルと結晶

1-2. 鋳型に依存しない RNA 重合反応の原子メカニズム (Nature, 2004; Nature, 2006)

tRNAのアミノ酸が結合する 3'末端には、あらゆる生物で保存された CCA(シチジン、シチ ジン、アデニン)という配列があり、アミノアシル化だけでなくリボソームにおけるペプチジ

ル転移反応にも必須な役 割を果たしている。この CCA 配列は、CCA 付加酵 素という RNA ポリメラー ゼの一種が、鋳型 DNA を 使うことなしに、修復およ び新規に重合する。我々は、 真性細菌 Aquifex aeolicus 由来の CCA 付加 酵素とプライマーとなる tRNA 前駆体(末端が CC)、 および基質である ATP の 3 者複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定した。 その結果、本酵素は、鋳型 DNA の代わりに酵素のア ミノ酸残基で構成された 「タンパク質性の鋳型」に



図3 CCA 付加酵素によるダイナミックな RNA 重合反応機構

よって、基質となる CTP や ATP を固定し、tRNA の末端が伸縮することで、鋳型なしでも特 異的に CCA 配列を結合させることができることを明らかにした。さらに我々は、古細菌 *Archaeglobus fulgidus* 由来の CCA 付加酵素とプライマーとなる各反応段階のミニへリックス tRNA (CCA, CA, A が欠けているもの)と NTP との複合体 [mini-D (D; ディスクリミネータ ー), mini-DC, mini-DC+CTP, mini-DCC, mini-DCC+ATP, mini-DCCA の計 6 つのステージ] の結晶構造を解明し、CCA 付加反応のダイナミクスを解明することに成功した(図3)。その 結果、第一段階、第二段階で CTP が付加する際には、ポリメラーゼドメインが構造変化して閉 じた構造をとり、プライマー末端もフリップして CTP を受け取ることにより、酵素・プライマ ー・CTP のダイナミクスで NTP の基質特異性が決定されていた。これに対し、mini-DCC ス テージ以降はポリメラーゼドメインが一貫して閉じた構造をとっており、ポケットの静的な構 造で ATP を認識することが明らかになった。さらに C 末端のドメインが tRNA に特徴的 な TΨC ループを認識することが明らかとなった。さらにポリメラーゼドメインの首振り と呼応して Arg224 の側鎖のコンフォメーションが変わることで、C 付加と A 付加が制御され ていることが明らかとなった。

2. チャネリング(超分子)複合体の構造解析による統合された連鎖反応触媒機構の解明

真核細胞や古細菌の翻訳系酵素は、複数のタンパク質が(超分子)複合体を形成し、連鎖的な化学反応を統合して触媒する(反応のチャネリング)。チャネリング(超分子)複合体のX 線結晶構造解析により連鎖反応触媒機構の構造的基盤を解明した。

2-1. 古細菌 tRNA 依存性アミド基転移酵素による Gln-tRNA^{Gln}の合成機構 (*Science*, 2006)

古細菌において Gln・tRNA^{Gln} は、非識別性グルタミル tRNA 合成酵素 (ND・GluRS) によってミスチャージされ た Glu・tRNA^{Gln} に、tRNA 依存性アミド基転移酵素 (GatDE; ヘテロ2量体) がアミノ基を転移することによ り合成される。その際、GatD サブユニットはグルタミナ ーゼとして働いて L・グルタミンあるいは L・アスパラギン からアンモニアを生成し、GatE サブユニットは Glu・tRNA^{Gln} を ATP を用いてリン酸化し γ -phosphoryl・Glu・tRNA^{Gln}を生成し、最後にアンモニアが これを求核攻撃して Gln・tRNA^{Gln}が生成する。我々は



図 4. GatDE・tRNA 複合体の結晶構造

Methanothermobacter thermautotrophicus 由来の GatDE とtRNA^{Gh} との複合体の結晶構造 解析を行い、得られた立体構造に基づき変異体の反応速度論的解析を行うことで,GatD グル タミナーゼ、GatE キナーゼ、GatE アミドトランスフェラーゼ活性が協同して Gln-tRNA^{Gh} を作り出すメカニズム、GatE による tRNA の識別機構、および GatD と GatE の活性部位を

つなぐ分子トンネルによりアンモニアが運搬さ れることを明らかにした(図4)。

また、ND-GluRS がミスチャージした Glu-tRNA^{Gln}が GatDE を経ずにリボソームへ運 ばれると遺伝暗号に誤りが生ずる。本研究では、 *M. thermautotrophicus*の ND-GluRS の結晶構 造を決定し (GluRS と GlnRS の新たな分子進化 機構を解明することに成功)、GatDE・tRNA^{Gln} 複合体とドッキングさせることで、ND-GluRS により作られた Glu-tRNA^{Gln}が直接 GatDE に渡 される、チャネリング複合体ができることを示唆 した (図5)。



図 5. ND-GluRS とチャネリング複合体の結晶構造

2-2. 古細菌における新規 Sec-tRNA^{Sec} 合成機構の構造的基盤(Nucleic Acids Res., 2008)

古細菌では Cys・tRNA^{Cys} やSec・tRNA^{Sec}も前翻訳的な アミノ酸変換反応により合 成される。Sec・tRNA^{Sec}は、 a-SerRS によりミスチャージされた Ser-tRNA^{Sec}のセリン残基が PSTK(<u>phosphoserine tRNA kinase</u>)によりリン酸化され、SepSecS によ り Se が求核攻撃して Sec・tRNA^{Sec} を生成する。本研究では、SepSecS の 結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定し、変異体解析により触媒機構を解明した (図 6)。SepSecS は PSTK やさらに a-SerRS とチャネリング複合体を 形成して3段階の連鎖的な反応を統合して触媒すると考えられる。今後、 tRNA^{Sec} を含めたチャネリング複合体の構造解析を推進する。

また同様に、Cys・tRNA^{Cys}は SepRS と SepCysS が触媒する2 段階の反応により合成される。 本研究では SepCysS・tRNA^{Cys}

複合体の結晶化に成功し、4.0 Å 分解能の回折データを収集しているため、 今後結晶を改善して構造解析を完了する。さらに、SepRS・SeptRNA^{Cys}・SepcysS チャネリング複合体の構造解析に挑戦する。

tRNA^{Cy}





図 7. SepCysS・tRNA^{Cys} 複合 体の結晶

2-3. tRNA の化学修飾に働くチャネリング複合体の構造機能解析 (J. Mol. Biol., 2007)

また、tRNA の最も複雑な修飾塩基で あるワイブトシン (yW) は TYW1-4 の 触媒する 5 段階の連鎖的化学反応で合 成される (図 8)。本研究では、TYW1

の結晶構造を解明することに成功し(図8)、2つの鉄硫黄クラスターが協同してラジカル反応を触媒し、複雑な3員環塩基を合成するメカニズムを明らかにした。TYW1以降の化学反応はTYW2-4がtRNA^{Phe}とチャネリング複合体を形成して連鎖的に触媒することが示唆されている(図8)。本研究では、東京大学の鈴木博士との共同研究によりTYW2-4の大量調製とチャネリング複合体の再構



図 8. yW の合成経路(上)、TYW1の結晶構 造(左下)とTYW チャネリング複合体(右下)

成に成功しており、本複合体のX線結晶構造解析 とそれに基づく変異体解析により連鎖的化学反応 のチャネリングの構造的基盤を解明していく。

さらに、真核細胞や古細菌では、メチル化酵素 Fibrillarin が Nop5p やリボソームタンパク質 L7ae と複合体を形成し、さらにガイド RNA とリボヌクレオプロテイン複合体を作り、tRNA や rRNA や siRNA など様々な種類の非翻訳 RNA にメチル化修飾を入れるマシーナリー box C/D snoRNP を形成している。この際、Fib., Nop., L7ae は基質 RNA に存在する box C と box D という塩基配列を認識し、ガイド RNA が基質 RNA のメチル化部位周辺と水素結合を作り、正確にメチル化 を行う。本研究では、古細菌由来の box C/D snoRNP と tRNA^{Trp} 前駆



体(アンチコドンループ内のイントロンに2対のbox C/D 配列を持ち、図9. Box C/D snoRNPの結晶 アンチコドンループ内の2カ所のヌクレオシドがメチル化されるため、ガイドRNAと基質RNA の両方の働きをする)に関して予備的な結晶化に成功しており(図9)、さらにタンパク質や RNAの設計を改良し、高分解能結晶を作成し、X線結晶構造解析を行っている。

3. ほ乳類 aaRS および AIMP の細胞死・免疫系活性化・組織形成機構の構造研究 ヒト由来トリプトファニル tRNA 合成酵素 (hTrpRS)の血管新生抑制機構の構造基盤 (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004)

我々は hTrpRS スプライスバリアントが 血管上皮細胞の細胞死を引き起こすことに より血管新生の抑制に働くこと、さらにその 細胞死誘導活性は tRNA アンチコドン認識 ドメインへの8アミノ酸残基の挿入(M3) によって発現していることを明らかにしてき た(図 10)。最近、米スクリプス研究所の Schimmel 博士らにより、hTrpRS のスプライ スバリアント T2 は VE-Cadherin に結合し、



VE-Cadherin と VEGF の結合を阻害することにより、AKT を介

したサバイバルシグナルを遮断し、細胞のアポトーシスを誘導することが提唱された(図10)。今後、hTrpRSとVE-Cadherinの標的断片との複合体のX線結晶構造解析を行うことで、hTrpRSによる細胞死誘導機構の構造的基盤を解明する。

4. 分子が細胞内から膜を介して細胞外へ輸送されるメカニズムの構造的基盤

真核細胞の aaRS が他機能を果たすために細胞外に分泌される機構の解明に端を発して、よ り一般的にタンパク質や生体分子が細胞内から膜タンパク質を介して細胞外へ輸送される機構 を原子分解能レベルで明らかにした。

4-1. 新生ペプチドの分泌に働くトランスロコン装置の構造解析(論文改訂中)

リボソームで合成された新生ペプチドはトランスロコン装置を介して細胞膜(真核細胞では 小胞体膜)を通過し、細胞外(小胞体内腔)へ分泌される。SecYE(真核細胞の Sec61 に相当) は分子モーターである SecA により駆動され新生ペプチドを輸送するチャネルであり、SecDF は輸送された分泌タンパク質をリフォールディングしたり新生膜タンパク質の膜への組み込み に働く。本研究では SecYE と Fab 断片の複合体の X 線結晶構造解析に成功し、SecYE と SecA の相互作用様式に関する新規の知見を得た。また、SecDF の結晶構造解析に予備的に成功した。

4-2. 輸送小胞の細胞膜での開口放出に働く Sec4p・Sec2p 複合体の構造解析 (*Structure* 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007)

真核細胞では、小胞体内体腔に放出されたタンパク質は、ゴルジ体を経て分泌小胞により輸送 され、細胞膜上で開口放出される。本研究では、輸送小胞と細胞膜の融合を誘起するSec4p(Rab) GTPase とそのGEF 因子であるSec2pの複合体の結晶構造解析に成功した(図11)。Sec2pは コイルドコイルからなる新規のGEFドメイン を持ち、その非対称性から、Sec2p二量体あた り1分子のSec4pが結合していた。複合体形 成に伴って、Sec2pのコイルドコイルが湾曲し、 一方Sec4pのSwitch I、II領域が大きく構造 変化して平滑な疎水性接着面を作り、その結果 Switch I領域とGDPの水素結合が壊れて GDPが解離する、というグアニンヌクレオチ ド交換反応の動的なメカニズムが明らかになった。

図 11. Sec2p・Sec4p 複合体の結晶構造

解析 (Nature 2007)

より一般的に分子が膜を通過して輸送されるメカニ ズムを解明するために、金属トランスポーターの結晶 構造解析を行った。マグネシウム輸送体には、CorA、 MgtA/B、MgtE の 3 つのファミリーが知られるが、 MgtE は真正細菌、古細菌に広く保存され恒常的に発 現している構造未知のマグネシウムトランスポーター である。本研究では、高度好熱菌由来の MgtE の 3.5 Å 分解能での X 線結晶構造解析に成功した (図 12)。 MgtE は細胞質側に 2 つの CBS ドメイン (ほ乳類由来 の膜チャネルやトランスポーターに保存)と新規 Nmgte ドメインを持ち、CBS ドメインで分子が2量 体化しており、Mg²⁺が CBS ドメインと Nmgte ドメイ ンの境界に結合していると、トランスポーターの入り 口は閉じた状態になっているが、Mg²⁺が不足すると Nmgte ドメインが約 120°回転し、入り口が開くこと で、金属イオン濃度により輸送孔の開閉が制御されて いることが明らかになった。



4-3. マグネシウムトランスポーターの構造



(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

1. 遺伝暗号翻訳系酵素による高精度・高特異的な化学反応触媒機構の時分解構造解析に 関しては、ラウエ法による時分割X線結晶構造解析が成功に至っていない今日においては、 各反応ステップのスナップショットを集めてムービーとして視覚化する本研究は極めてユ ニークで世界的に注目されており、2006年度は2報のNatureArticleとして取り上げられ、 2007年3月29日号のNatureには"Animated Crystallography"として本研究が紹介され た。また、CCA付加反応の動的機構に関しては、著名なアメリカの教科書「Molecular Biology of the Cell(細胞の分子生物学)」(第6版)にムービーが掲載されている(濡木研究室の ホームページ:http://www.x-ray.bio.titech.ac.jp/に動画が掲載)。あらゆる生命機能が タンパク質や核酸が動的に相互作用することで発現することを考えると、本研究は純粋な 基礎研究であるが、生命現象の本質的な理解に必須な概念を提供するものであり、知的財 産の蓄積に寄与すると考えられる。

2. チャネリング(超分子)複合体の構造解析による統合された連鎖反応触媒機構の解明に 関しては、古細菌特異的に前翻訳的アミノ酸変換によりアミノアシル tRNA を合成する、 GatDE・tRNA^{Gln}・ND-GluRS や SepRS・tRNA^{Cys}・SepCysS、aSerRS・PSTK・tRNA^{Sec}・SepSecS な どのチャネリング複合体の結晶構造から、連鎖的な高特異的酵素反応により遺伝暗号が正 確に翻訳される機構が解明されるとともに、遺伝暗号の進化機構も明らかになり、教科書 の内容を書き換えることも期待される。また、TusE・tRNA^{Glu}・MnmA チャネリング複合体、 TYW1-4 チャネリング複合体の構造決定により、連鎖的な化学反応により効率的な化学修飾 が達成されるメカニズムの構造的基盤が明らかになり、酵素学に新たな知見を与えるとと もに、酵素工学の分野での産業応用に資することができると期待される。さらに、box C/D snoRNP とガイド・基質 RNA 複合体の構造解析からは、真核細胞に特異的な非翻訳 RNA とタ ンパク質が連携した細胞高次機能の発現機構が解明され、リボヌクレオプロテイン複合体 における非翻訳 RNA の機能の詳細が明らかになると期待される。このようなチャネリング 複合体に関しては、遺伝暗号翻訳系のタンパク質に関して国際的にも注目され始めており、 生化学的にはチャネリング複合体の存在が報告されてきているが、未だ構造が解かれた例 はない。

3. ほ乳類 aaRS および AIMP の細胞死・免疫系活性化・組織形成機構の構造研究に関して は、ヒト由来トリプトファニル tRNA 合成酵素による血管新生抑制機構を、X 線結晶構造解 析と細胞生物学解析の両面から、原子分解能レベルで明らかにすることに成功した。これ は本来タンパク質合成に働くアミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)が、タンパク質合成以外 の高次細胞機能に働くメカニズムを解明した最初の例であり、このようなほ乳類 aaRS の機 能的分散による新規細胞機能に関しては、国内外で本研究課題に着目している研究者は、 他に米スクリプス研究所の Paul Schimmel 博士と共同研究者の Sunghoon Kim 博士のみであ るが、臨床研究レベルでもその抗腫瘍活性が注目され始めており、構造研究に基づくドラ ッグデザインにより、低浸襲性の抗がん剤の開発が可能になると信じている。また本研究 は以下のような発展が考えられる。たとえば、ヒト由来リジル tRNA 合成酵素(hLysRS)は 前炎症性サイトカインである TNFαにより細胞外への分泌が促進され、マクロファージや単 核球細胞に働きかけて TNFαの分泌を促すとともに、これらの細胞の遊走活性を上昇させる。 そのシグナル伝達経路にはMAPK やERK、p38kinase が関わっていることが示唆されていた。 以上により、hLysRS は自然免疫機構の活性化に働いていると考えられる。最近共同研究者 であるソウル大学の Kim 博士らは、hLvsRS が細胞接着分子ラミニンの受容体であるインテ グリンの N 末端部分と結合し、細胞遊走および前炎症性サイトカイン発現のシグナルを伝 達することが提唱された。本研究では、すでに hLysRS の大量調製に成功し、さらにインテ グリンの標的断片を大量調製し、hLysRS との複合体の X 線結晶構造解析を行うことにより、 hLysRS による自然免疫活性化機構の構造的基盤を解明する。また、ほ乳類 MARS(後述)を 構成する AIMP1/p43(後述)は、細胞外に分泌されると、血管上皮細胞に働きかけて血管新 生を抑制し、マクロファージに働きかけると炎症を誘導し、繊維芽細胞に対しては皮膚の 再構成に働くなど、7つのサイトカイン活性を持つ。また、抗がん剤 paclitaxel と併用す ることで、ヒトの胃がんを90%以上抑制する抗腫瘍活性を持つ。最近共同研究者である Kim 博士によって、AIMP1/p43 は 6-46 アミノ酸残基の部分が繊維芽細胞の増殖に必須であり、 101-114 アミノ酸残基の部分が血管上皮細胞のアポトーシス活性に必須であり、114-192 ア ミノ酸残基の部分が細胞遊走活性に必須であることが明らかになった。本研究では、 AIMP1/p43の様々な断片を大量調製することに成功しており、今後 GST プルダウン法や免疫 沈降法などを用いて、血管上皮細胞、マクロファージ、繊維芽細胞の膜画分からこれらの 断片に結合する標的レセプターを同定する。さらに、AIMP1/p43(断片)とこれらのレセプ ターの複合体の X 線結晶構造解析を行い、その抗腫瘍性サイトカイン活性の構造基盤を解 明する。hTrpRS、hLysRS および AIMP/p43 と標的レセプター(断片)の複合体の構造解析に よって、これらほ乳類の aaRS や補因子が、細胞のアポトーシス、自然免疫活性化、組織形 成に機能する構造的基盤が解明される。国際的には、本研究課題は極めて新しい知見に基 づく研究であり、従事する研究者の数もまだ少なく、ユニークな研究領域であるが、それ だけに斬新な研究成果が期待される。また、これらの因子が細胞の異常に対する自然治癒 機構や抗腫瘍活性に働くメカニズムが原子分解能レベルで明らかになることで、難行して いる抗がん剤開発に対し、非侵襲性あるいは副作用のない新規抗がん剤の開発が可能にな り、医療面での応用が期待される。

さらに、ほ乳類の 20 種類の aaRS のうち 8 種類は 3 種類の補因子タンパク質

(aaRS-interacting multifunctional protein; AIMP1/p43, AIMP2/p38, AIMP3/p18) とともに分 子 量 約 1 MDa の 超 分 子 複 合 体 MARS (multifunctional aaRS supramolecular complex) を形成し、効率的なタンパク質合成を 行っている (図 13)。高等真核細胞内の tRNA の濃 度は、原核細胞の 1/10 と低いため、aaRS 同士が 複合体を形成しお互いにコミュニケーション・活 性化し合いながら、効率的にアミノアシル tRNA

図 13. ほ乳類 MARS を合成する必要があるからである(現に1種類の aaRS に対応す るアミノ酸を供与するとすべての aaRS が活性化される)。本研究では、ソウル大学の Sunghoon Kim 博士との共同研究により、牛肝臓から超遠心分離、tRNA 結合カラム、抗体カ ラム、イオン交換カラムを用いて MARS を精製した

(図 13)。後述のように、MARS の構成タンパク質は

細胞の状況によって複合体から解離し、細胞外に分泌され細胞情報伝達機能を果たすため、 MARS の組成はどうしても不均一になり、このため現在のところ結晶は得られていない。そ こで、今後は8種類の aaRS に対応した tRNA をそれぞれ担体に結合したカラムや、それぞ れの aaRS および AIMP に対する抗体カラムを順次かけることで、組成の均一な MARS を調製 し、結晶化を行う計画である。また、各構成 aaRS の立体構造は、真正細菌、古細菌、真核 細胞を総合すれば、すべて決定されているので、MARS の電子顕微鏡解析(単粒子解析)を できるだけ高分解能で行い、この電子密度に既知の類似構造を当てはめて MARS の構造モデ ルを構築する研究を行う。このために AIMP1, 2, 3 単独の結晶構造解析も並行して行う。 MARS の立体構造(モデル)が得られたら、構造に基づいて変異を導入し、aaRS 同士がコミ ュニケーションして共活性化される機構を解明する。

さらに最近、共同研究者であるオハイオ大学 Michael 博士により、真核生物の祖先であ る古細菌 (Methanothermobacter thermautotrophicus) におい て LeuRS, LysRS, ProRS と翻訳伸長因子 EF-1α がチャネリン グ複合体を形成し、お互いに反応を活性化することが報告され た。本研究では、この古細菌のチャネリング複合体を MARS の プロトタイプとして構造研究を進め、連鎖的なアミノアシル化 活性化機構の構造的基盤を

解明する。すでに、LeuRS と ProRS に関しては複合体を大量に 再構成することに成功しており(図14)、結晶化のスクリーニ ングを行っている。さらに、これに LysRS や EF-1 α を加え たチャネリング複合体を再構成し構造解析とそれに基づく変 異体解析を行う。

ほ乳類および古細菌の MARS の構造解析によって、超分子

図 14. 古細菌 MARS と部分構築 複合体を形成することで分子同士が互いにコミュニケーショ ンし、機能が統合・共活性化される一般的なメカニズムが明らかになり、国際的に注目さ れている超分子複合体の構造・機能相関の謎に解答を与え、高い国際的な評価を受けるこ とが期待される。

4. 分子が細胞内から膜を介して細胞外へ輸送されるメカニズムの構造的基盤では、まず トランスロコンの X 線結晶構造解析により、分子モーターSecA に駆動される新生ペプチド 膜輸送の未解決のメカニズムが明らかになるだけでなく、原核細胞から真核細胞まで共通 した分泌タンパク質や膜タンパク質の膜輸送・膜組み込みの分子機構が解明されることに なり、教科書を塗り替えるレベルの研究成果が期待される。また、金属トランスポーター の構造研究に関しては、1998 年 Mackinnon がカリウムチャンネル KcsA の結晶構造解析によ り「ナトリウムイオンよりもイオン半径の大きいカリウムイオンをどのようにして選択的 に通過させているのか」という問いに解答を与えノーベル化学賞を受賞した。Mg²⁺はイオン





半径は 0.72Å と極めて小さいが、水との親和性が高く水和半径は 5.3Å と金属イオンの中で は最大になる。我々の MgtE の構造解析によって、MgtE がどのように Mg²⁺だけを特異的に認 識し、脱水和して膜内を輸送するのかが明らかになる。また、MgtE が細胞質のマグネシウ ム濃度依存的にイオン透過孔の開閉を制御する機構を新規に解明したことは、国際的に高 い評価を得ている。41,000 ほどの立体構造が PDB に登録されている今日においても、膜タ ンパク質の構造はわずか 122 しか報告されておらず、トランスポーター等輸送に働く膜タ ンパク質の構造は未だ 50 余である。本研究で構造解析された 3 つの膜タンパク質の構造は その機能制御機構を説明するものであり、世界的に高く評価されると期待している。

6.	研究実施体制
----	--------

氏 名	所属	役職	研究項目	参加時期
濡木 理	東京大学大学	教授	すべての研究の総括、	平成 18 年 4 月~
	医科学研究所		構造解析	平成 20 年 3 月
深井周也	東京大学大学細	准教授	Sec4p・Sec2p 複合体	平成 18 年 4 月~
	胞生物学研究所		の X 線結晶構造解析	平成 19 年 5 月
石谷隆一郎	東京大学大学	准教授	CCA 付加酵素、	平成 18 年 4 月~
	医科学研究所		GatDE、ND-GluRS \mathcal{O}	平成 20 年 3 月
			X線結晶構造解析	
沼田倫征	産業技術総合	研究員	MnmA・tRNA 複合体	平成 18 年 4 月~
	研究所		の X 線結晶構造解析	平成 19 年 3 月
中西孝太郎	米国スローンケ	博士研究	MARS、ほ乳類 aaRS	平成 18 年 4 月~
	タリング研究所	員	の X 線結晶構造解析	平成 20 年 3 月
押鐘浩之	英国 MRC	博士研究	GatDE・tRNA 複合体	平成 18 年 4 月~
		員	の X 線結晶構造解析	平成 19 年 3 月
服部素之	東京工業大学	博士課程	MgtEのX線結晶構造	平成 18 年 4 月~
	大学院生命理	2年	解析	平成 20 年 3 月
	工学研究科			
佐藤裕介	東京工業大学	博士課程	Sec4p・Sec2p 複合体	平成 18 年 4 月~
	大学院生命理	2年	の X 線結晶構造解析	平成 20 年 3 月
	工学研究科			
荒磯裕平	東京工業大学	博士課程	SepSecSのX線結晶構	平成 18 年 4 月~
	大学院生命理	1年	造解析	平成 20 年 3 月
	工学研究科			

7. 研究期間中の主な活動

(1)ワークショ	ップ・	シンポ	ジウム等
----------	-----	-----	------

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2006年 10月 1-6日	AARS2006: 2006 International Conference on Aminoacyl- tRNA synthetases: From the Genetic Code to Human Disease & Medicine	アメリカ San Diego	約 400 名	aaRS・tRNA の基礎研究 と医療応用、人工遺伝暗号 に関する国際学会のオー ガナイズに加わった。

2006 年	AsCA '06/CrSJ	筑波	約1000名	アジア、オーストラリアの
11 月	(アジア国際結晶学会)			国際結晶学会の運営委員
20-23日				を務めた。

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表(英文論文21件 邦文論文5件)

- "Structural insights into RNA-dependent eukaryal and archaeal selenocysteine formation" Y. Araiso, S. Palioura, R. Ishitani, R. L. Sherrer, P. O'Donoghue, J. Yuan, H. Oshikane, N. Domae, J. Defranco, D. Söll, <u>O. Nureki</u>.
 - Nucleic Acids Res. 36, 1187-1199 (2008).
- "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the cytosolic domain of a cation diffusion facilitator family protein" M. Hattori, Y. Tanaka, R. Ishitani, <u>O. Nureki</u>. *Acta. Crystallograph. Sect. F.* 63, 771-773 (2007).
- "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the cytosolic domain of a cation diffusion facilitator family protein" M. Hattori, Y. Tanaka, R. Ishitani, <u>O. Nureki</u>. *Acta. Crystallograph. Sect. F.* 63, 771-773 (2007).
- "Anticodon Recognition and Discrimination by the alpha-Helix Cage Domain of Class I Lysyl-tRNA Synthetase" J. D. Levengood, H. Roy, R. Ishitani, D. Söll, <u>O. Nureki</u>, M. Ibba. *Biochemistry* 46, 11033-11038 (2007).
- 5. "Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA" Y. Suzuki, A. Noma, T. Suzuki, M. Senda, T. Senda, R. Ishitani, <u>O.</u> <u>Nureki</u>
 - J. Mol. Biol. 372, 1204-1214 (2007).
- ○6. "Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter" M Hattori, Y. Tanaka, S. Fukai, R. Ishitani, <u>O. Nureki</u>

Nature 448, 1072-1075 (2007).

- "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the cytosolic domain of the Mg²⁺ transporter MgtE" Y. Tanaka, M. Hattori, S. Fukai, R. Ishitani, <u>O. Nureki</u> *Acta. Crystallograph. Sect. F.* 63, 678-681 (2007).
- "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the full-length Mg²⁺ transporter MgtE" M. Hattori, Y. Tanaka, S. Fukai, R. Ishitani, <u>O. Nureki</u> *Acta. Crystallograph. Sect. F.* 63, 682-684 (2007).
- "Crystallization and crystallographic analysis of yeast Sec2p, a guanine nucleotide-exchange factor for the yeast Rab GTPase Sec4p" Y. Sato, S. Fukai, <u>O. Nureki</u> *Acta. Crystallograph. Sect. F.* 63, 616-619 (2007).
- ○10. "Crystal structure of the Sec4p•Sec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state" Y. Sato, S. Fukai, R. Ishitani, <u>O. Nureki</u>
 Burge Neth Acad. Sci. USA 104, 8205, 8210 (2007).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 8305-8310 (2007).

- "Asymmetric coiled-coil structure with guanine nucleotide exchange activity" Y. Sato, R. Shirakawa, H. Horiuchi, N. Dohmae, S. Fukai and <u>O. Nureki</u> Structure, 15, 245-252 (2007).
- "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the catalytic domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase from the methanogenic archaeon Methanosarcina mazei" T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, <u>O. Nureki</u> and S. Yokoyama *Acta. Crystallograph. F*, 62, 1031-1033 (2006).
- "Functional categorization of the conserved basic amino acid residues in TrmH [tRNA (Gm18) methyltansferase] enzymes" K. Watanabe K, <u>O. Nureki</u>, S. Fukai, Y. Endo and H. Hori *J. Biol. Chem.*, 281, 34630-34639 (2006).
- 14. "Complete crystallographic analysis of the dynamics of CCA-addition" K. Tomita, R. Ishitani, S. Fukai and <u>O. Nureki</u> *Nature*, 443, 956-960 (2006).
- ○15. "Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code" H. Oshikane, K. Sheppard, S. Fukai, Y. Nakamura, R. Ishitani, T. Numata, L. R. Sherrer, L. Feng, E. Schmitt, M. Panvert, S. Blanquet, Y. Mechulam, Dieter Söll and O. Nureki

Science, 312, 1950-1954 (2006).

O16. "Snapshots of tRNA sulfuration via an adenylated intermediate" T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, T. Suzuki and <u>O. Nureki</u> *Nature*, **442**, 419-424 (2006).

17. "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the catalytic domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase from the methanogenic archaeon Methanosarcina mazei" T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, O. Nureki and S. Yokoyama

Acta. Crystallograph. F, 62, 1031-1033 (2006).

 "Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*" T. Tsukazaki, H. Mori, S. Fukai, T. Numata, A. Perederina, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, D. G. Vassylyev, <u>O. Nureki</u> and K. Ito

Acta Crystallographica F, 62, 376-380 (2006).

- "Crystallization and preliminary X-ray analysis of tRNA thiolation enzyme MnmA from Escherichia coli complexed with tRNA^{Glu,}" T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, T. Sasaki, T. Suzuki and <u>O. Nureki</u> Acta Crystallographica F, 62, 368-371 (2006).
- "Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa" T. Sengoku, <u>O. Nureki</u>, A. Nakamura, S. Kobayashi, and S. Yokoyama *Cell* 125, 287-300 (2006).
- "Structural basis for sulfur relay to RNA mediated by heterohexameric TusBCD complex" T. Numata, S. Fukai, Y. Ikeuchi, T. Suzuki and <u>O. Nureki</u> *Structure*, 14, 357-366 (2006).

邦文論文

22.「RNA 修飾マシーナリーの時間分解能での反応機構」 濡木理 蛋白質核酸酵素 51巻 2596-2602 (2006) 23.「アミノ酸の"品数"をふやすには?」 濡木理 ニュートン 26巻 126 (2006) 24. 「RNA に依存した遺伝コード形成のメカニズム」 濡木理 蛋白質核酸酵素 52 巻 415-426 (2007) 25. 「RNA に依存したグルタミン酸からグルタミン生成のメカニズムの解明と産業への応 用日 濡木理 バイオインダストリー 24 巻 80-86 (2007) 26. 「RNA に依存した遺伝暗号の進化機構」 濡木理 バイオサイエンスとインダストリー 65巻 67-70 (2007) (2)口頭発表 ①学会 国内 9件 7件, 海外

②その他国内 4件, 海外 0件

(3)特許出願(SORST研究の成果に関わる特許(出願人がJST以外のものを含む))

	件数
国内出願	0
海外出願	0

計 0

(4) その他特記事項

プレス発表

平成18年7月24日(月)午前11時 文部科学省にてプレス発表 「生体内の硫化反応における新しい酵素触媒メカニズムを解明(酵素を用いた触媒工学 や合成化学の産業応用の道を開く)」

新聞報道

平成18年6月30日 日刊工業新聞 「太古のアミノ酸作成 東工大が仕組み解明」

平成18年7月3日 日本経済新聞 朝刊「アミノ酸の種類増加課程を解明」

- 平成18年7月3日 日経産業新聞 「アミノ酸の種類増加課程 原子レベルで解明」

平成 18 年 7 月 28 日 日経産業新聞 「生体内の硫化反応 触媒結合の謎解明」

平成19年8月17日 フジサンケイビジネスアイ 「マグネシウム摂取の適量調整 東 工大が機構解明」

平成 19 年 8 月 20 日 日経産業新聞 「マグネシウム取り込むたんぱく質 X線で構造 解析 東工大、心筋こうそく薬に道」

平成19年9月17日 信濃毎日新聞 「細胞膜の通路が開閉 東工大チーム マグネシ ウム取り込み解明」

平成19年9月12日 福井新聞 「マグネシウム取り込み 細胞内に濃度センサー 東 工大教授らタンパク質を分析」

<u>受賞</u>

平成 19 年 手島工業教育資金団手島記念研究賞「Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate」

平成19年 文部科学大臣表彰科学技術賞(研究部門)「高精度な化学反応を触媒す る酵素の反応機構の研究」

その他

英文論文の 6. Nature, 443, 956-960 (2006)に関しては、

・2007年3月29日号の Nature に"Animated Crystallography"として本研究が紹介される。

・CCA 付加反応の動的機構のムービーが、米国教科書「Molecular Biology of the Cell(細胞の分子生物学)」(第6版)に掲載される。

9. 結び

本研究では、さきがけ研究を引き継いだ遺伝暗号翻訳系の構造生物学に加え、ほ乳類の アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) およびそれらが構成する MARS 超分子複合体の構造解 析を当初の目標にした。遺伝暗号翻訳系の構造生物学に関しては、ダイナミックなタンパ ク質と核酸の協同作用により高精度・高特異的な化学反応が達成される機構が解明され、 構造解析を志して以来長年の夢であった分子ムービーの作成に成功し、予想以上の成果を 上げることができた。ほ乳類の aaRS に関しては、hTrpRS に関して、血管内皮細胞のアポト ーシス活性発現機構の構造基盤を解明できたものの、MARS の調製は予想以上に困難であり、 結晶化には至っていない。このような時々刻々と変化する超分子複合体こそ、生命維持の 本質であり、今後もライフワークとして継続して研究を進めていきたい。ほ乳類 aaRS が細 胞内の状態に応じて細胞外に分泌され、高次生命機能を果たす、という意外な研究展開に 端を発し、より一般的に分子が膜を通過して輸送されるメカニズムの解明に研究の方向が 向いてしまった。しかし、基礎研究はフレキシブルに研究を展開できることこそ、研究者 としての本懐であり、戦略的創造研究がそのようなフレキシブルな研究を容認してくれる 制度であり続けてほしいと切に願っている。さきがけ研究から発展研究まで、私が独立し



て研究室を持ち研究を発展させる一番大事な時期を支えてくれた本プロジェクトに心から 感謝しているとともに、極めて使い勝手のよかった研究費であったと心から思っている。 研究室旅行@鬼怒川温泉(2008 年 11 月)