

2012年3月5日の最終講義

「細胞の中で形成される局所的疎水的環境場であるタンパク質上で基質の周囲のケージ崩壊を伴いながら反応が進む機構の化学的視点の解明」

今野 美智子

生物が発生する前にすでにアミノ酸、核酸、脂肪酸が合成され、タンパク質も存在していた。細胞膜が形成され外界と区別され、1つの細胞から細胞分裂し2つの娘細胞が作られた時が生物の起源であり、それまで化学反応として合成された物質が、細胞内で作られ生体反応となる。従って、「生体反応は化学反応である。」生物の進化は、生物が意思を持って決めたのではなく、この環境下でこの生物はこの反応が可能だから生き延びたのである。

まず、タンパク質のスーパーファミリーを考えてみよう。タンパク質はある時期同時並行的に一斉にタンパク質のコピーが起こった。すなわち、ゲノムの中に新たな遺伝子のコピーが起こった。ところで、有性生殖では、体細胞分裂と減数分裂がある。細胞には、父方と母方からの相同染色体が1対あり、それらがそれぞれ複製されて分裂するのが体細胞分裂であるが、他方、減数分裂では複製された染色体の間で乗換え、交叉が起こる。これが遺伝的組換えで、この時、父方と母方の染色体の長さが同じでないと乗換えが起こらない。同じ対応する場所で交叉が起こり、その後2回分裂する。すなわち、染色体の長さが異なると父方と母方の配偶子の染色体の交叉ができず減数分裂が起きない。起きるためには配偶子の染色体が同じ長さでなければならない。遺伝子のコピーは遺伝子の修復機構が関与する。同じ種の配偶子が近隣に存在し、修復しなければならない状態がかなりの頻度で起こる。このような状態の可能性は、放射性損傷であり、地球上で同時にかなりの期間放射性損傷が起こっている事が考えられる。

進化とは何か。コピーされた中に点突然変異 (point mutation) がかなり起こり、他のアミノ酸に変異する。そのタンパク質は、畳み込み (folding) ができて、タンパク質自体の機能が変わる。例えば、新しい炭素源が使える。次に、原始生物を考えよう。現在の原核生物は染色体の対を作らない。対を作らない原核生物が対を作る真核生物になるだろうか。もとは対を作っていたが一方が欠けたかもしれない。例えば働き蜂は、一方の染色体しか持たない。

生命の起源について

1. 1種類の原始生物から分かれたのか？すなわち、1つの地域で発生し広がったのか。
2. 同じ環境では似た生物ができたのか？例えば、アフリカ、オーストラリア、南米、中東の菌はそれぞれで発生したか

生物の起源を考える上で、生物が発生したときに存在したであろうタンパク

質を考えてみよう。その1つとして、研究対象としたアミノアシル-tRNA 合成酵素がある。このアミノアシル-tRNA 合成酵素は、遺伝子情報である核酸 DNA のコドンとタンパク質を構成するアミノ酸をつなげる tRNA に働く酵素である。生命が誕生する前にはアミノアシル-tRNA 合成酵素、その他のタンパク質、アミノ酸、ATP、tRNA も脂肪酸もあった。しかし、脂肪酸がミセルを作れない環境であり、そのことは疎水的であることを示す。アミノアシル-tRNA 合成酵素の基質のつく局所的場所は、更に疎水的である。すなわち、この反応に関与するアミノ酸も ATP も tRNA も基質のつく局所的疎水的場所ではイオン化していない。アミノアシル-tRNA 合成酵素の研究の1つの目的は、この酵素の反応機構からイオン化していなければ反応が進むことを証明することである。

アミノアシル-tRNA 合成酵素の特徴は、自分の中だけで働き生命を維持するタンパク質である。種が変わってもその効率はあまり変わらない。この酵素活性は、種が生きているのに適した環境ではほとんど変わらない。どの種でもアミノアシル-tRNA 合成酵素の反応機構は同じであるから、同じアミノ酸に対して同じ形で反応している。どの進化の段階でもこのアミノアシル-tRNA 合成酵素の効率は、実質的に変化していない。すなわち、進化に伴って本質的に変わってきたタンパク質ではない。例えば、高度好熱菌のアミノアシル-tRNA 合成酵素は温度に対する安定性は格段に違うが、大腸菌の生存温度では反応性は変わらないことは、本質的に同じである。アミノアシル-tRNA 合成酵素の研究の1つの目的は、同じ反応機構を取っているか確認することである。

活性部のアミノ酸が変わっているにも関わらず同じ反応効率をそれぞれのアミノアシル-tRNA 合成酵素は持っている。それは、反応機構が同じであることによることを分子化学的に証明する。現在生存している生物は、点突然変異によって反応効率が大きく変わる構造を持っていない。すなわち疎水的フォームが維持されていればよい構造である。生物の起源についてアミノアシル-tRNA 合成酵素は科学的貢献ができる可能性がある。

例えば、タンパク質の中には、20 個のアミノ酸を必要としないタンパク質もいくつもあるが、しかし、20 個より少ないたとえが 18 個のアミノ酸からなるタンパク質で構成された生物が現在存在しているだろうか？そのような生物は現在存在しない。18 個しか使わない生物が進化の過程で絶滅する理由があるだろうか？ない。すなわち、生物の起源から 20 個のアミノ酸を使っていたと考えられる。

ところで、20 種類のアミノアシル-tRNA 合成酵素について進化の系統樹が報告されている。生物進化の過程でアミノアシル-tRNA 合成酵素の種類がいくつかが段階的に増えてきたとすると、最初の生物は何種類のアミノ酸でよいのか。そのアミノアシル-tRNA 合成酵素ができる前にそれに対応するアミノ酸の合成

系ができていなければならないが、その前は使われていない。使われないアミノ酸を作るだろうか。

これらのことから、最初から 20 種類のアミノ酸でタンパク質は作られていた。アミノアシル-tRNA 合成酵素について考えてみると、1つの祖先から分化したスーパーファミリーではなく、構造的に同じでなければならないし、反応機構も同じでなければならないのでスーパーファミリーを作ったと結論付けられる。また、原始生物を考えてみると

1. 1つの原始生物から分かれたのか？
2. 同じ環境下においては似たものができ、いくつかの原始生物があったのか？
このように捉えると、**生物の起源と進化を考える上で Bioscience は重要で、反応機構を科学的に解明しなければならない。**すなわち、
 1. それぞれの種が同じ機能を持ったアミノアシル-tRNA 合成酵素を持っている—その反応機構がすべて同じか
 2. アミノアシル-tRNA 合成酵素は大きくクラス I とクラス II に分かれるが、クラス I とクラス II に属するリシン-tRNA 合成酵素 I と II が現在存在する。このことは原始生物では、他のアミノアシル-tRNA 合成酵素でもクラス I と II があり淘汰されたのか？
 3. クラス I のヴァリン-tRNA 合成酵素とイソロイシン-tRNA 合成酵素上でクラス II のスレオニン (Thr) 存在下において ATP-PPi 交換反応が観測される。20種類のアミノアシル-tRNA 合成酵素について化学反応としての類似性を決める。
 4. 北米、アフリカの自然酵母で同じタンパク質でどれだけアミノ酸配列の違いがあるか。

最終的に 20 種類のアミノアシル-tRNA 合成酵素について化学反応としての類似性を決める。まず、クラス Ia には 6 種類のアミノアシル-tRNA 合成酵素のうち Met、Val、Ile、Leu、Arg のアミノアシル-tRNA 合成酵素が進化によって効率がほとんど変わらない構造と反応機構を持っていることを最終的に証明することを目的としてこれまで研究を行ってきた。

まず、クラス Ia の基本的な構造をもつメチオニル-tRNA 合成酵素の構造解析を手掛けた (図 1、*Structure* 8, 197-208, 2000)。

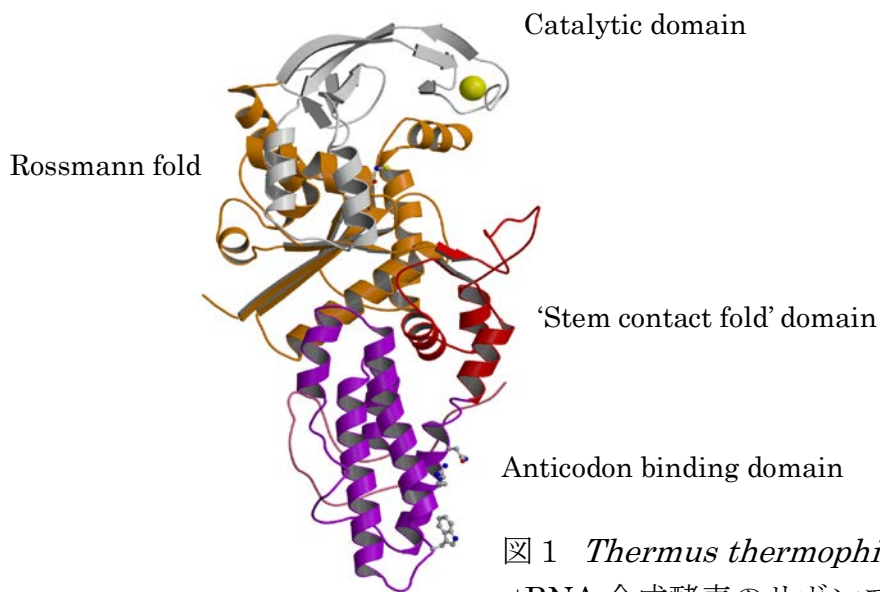


図1 *Thermus thermophilus* 由来メチオニル-tRNA 合成酵素のリボンモデル

アミノアシル-tRNA 合成酵素上では、ATP-PPi 交換反応 (アミノ酸 + ATP \leftrightarrow アミノアシル-AMP + PPi) が観測される。すなわち、アミノ酸と ATP からアミノアシル-AMP と PPi が形成され、PPi を加えると逆反応 (pyrophosphorolysis) が起こり、全体として可逆的に反応が進む。この反応は Mg²⁺ イオンを必須とする。更に、tRNA を加えるとアミノアシル-tRNA が形成される。

ところで 20 種類のアミノアシル-tRNA 合成酵素のうちアルギニル-tRNA 合成酵素 (ArgRS) とグルタミンイル-tRNA 合成酵素 (GlnRS)、*E. coli* K12 由来グルタニル-tRNA 合成酵素 (GluRS) 上では、ATP-PPi 交換反応が観測されず、対応する tRNA を加えて初めて観測される。更に、生成物 Arg-AMP と Gln-AMP は単離されない。この現象に対しこれまで合理的説明がなされてこなかった。この未解決の問題を解くために、*Pyrococcus horikoshii* 由来 ArgRS と tRNA^{Arg} と ATP アナログの複合体の立体構造を 2.0 Å で決め (図 2)、この構造に基づいてモデリングを行いその解を示した。すなわち、Dino のグループにより報告された酵母菌由来 ArgRS、tRNA^{Arg} と Arg の複合体の構造 (PDB ID: 1F7U) では、tRNA の 3'末端の A76 の 2'-OH の O と Arg のカルボキシル基 CO1O2H の C,O1 と O2 との原子間距離がそれぞれ 3.18 Å, 3.71 Å, 3.57 Å である。この Arg の COOH の C α -C の周囲での 45° の回転の動きは、O2 と 2'-OH 間の原子間距離を 2.77 Å に減少することを見出した (図 3)。このことから、tRNA の 3'末端の A76 のリボースの 2'-OH と Arg の COOH の O との水素結合の形成が ATP-PPi 交換反応を促進する分子科学的な機構で合理的に説明をした。この結果は、*FEBS J.* **276**, 4763-79, 2009 に報告し、更に、以下の現象を説明した。

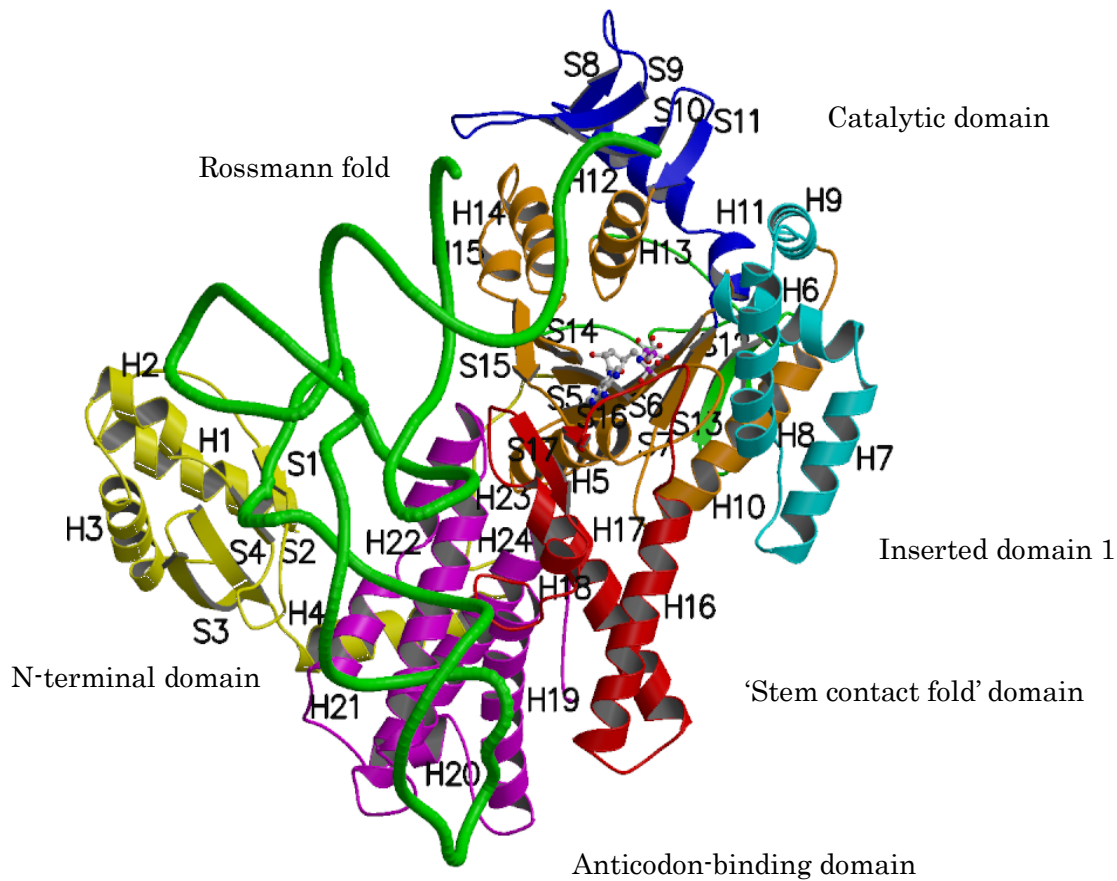


図 2. *Pyrococcus horikoshii* 由来 ArgRS, tRNA^{Arg}_{CCA} と ATP アナログの複合体

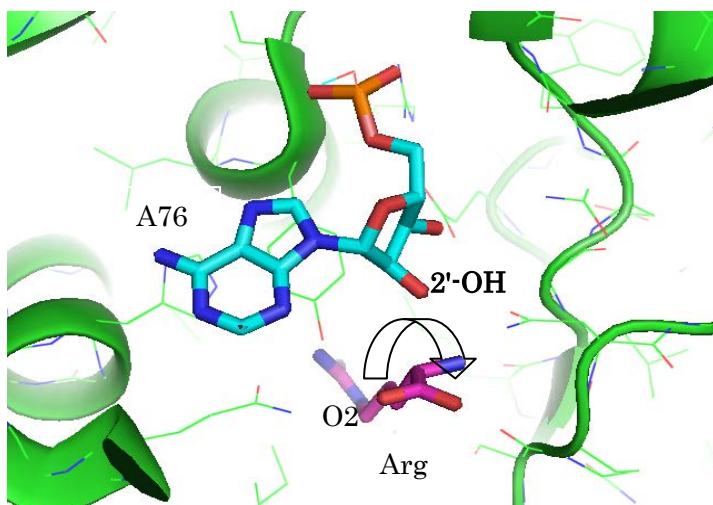
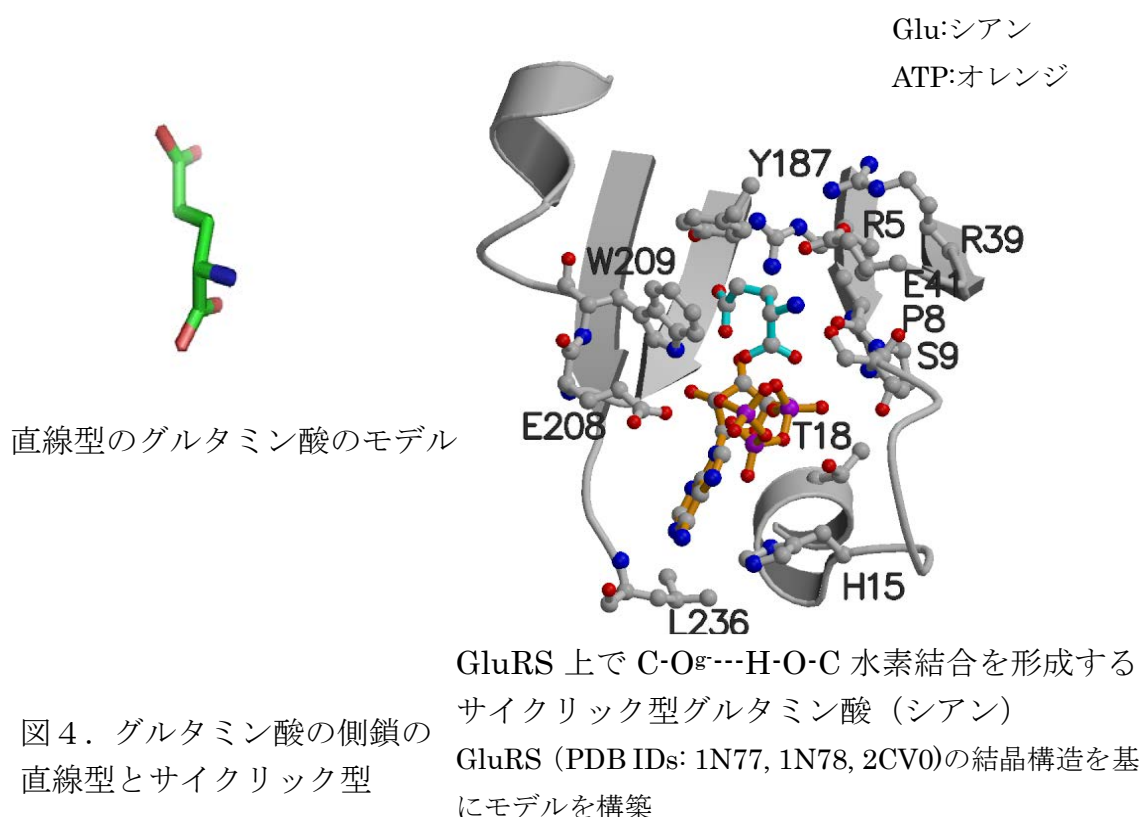
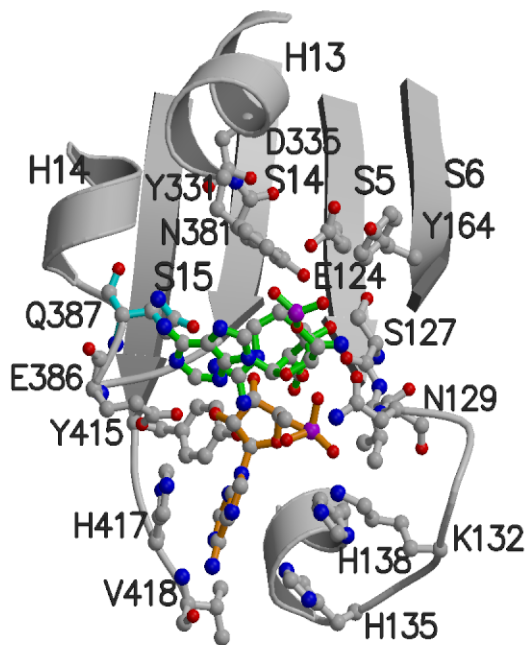
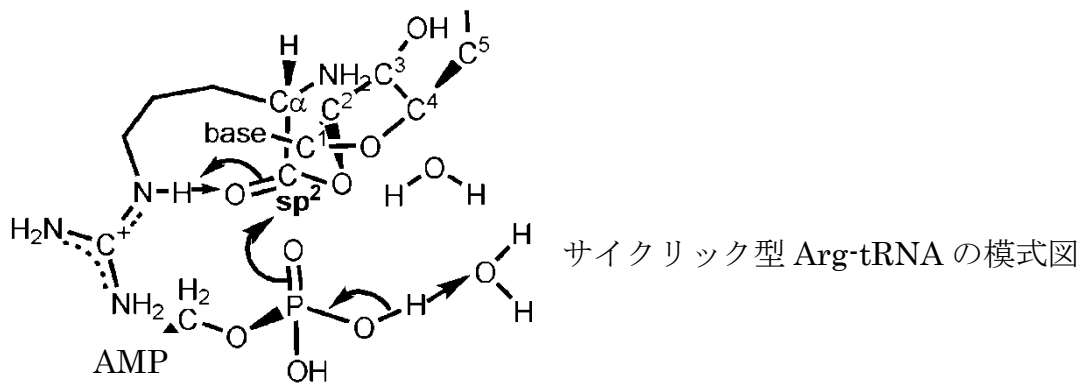


図 3. 酵母菌由来 ArgRS 上の tRNA^{Arg} の A76 と Arg (PDB ID: 1F7U)
 Arg のカルボキシル基の 45° の回転は、O2 と A76 の 2'-OH の O の距離
 を 2.77 Å に減少

GluRS では、pH 7.7 で tRNA^{Glu} の非存在下での ATP-PPi 交換反応のグルタミン酸に対する K_m 値が、tRNA^{Glu} の存在下のその $10^2 \sim 10^3$ 倍増加すること、tRNA^{Glu} の非存在下では pH 6.0 で最も交換反応が進むことが報告された。この結果は、側鎖がサイクリックな形をもつグルタミン酸が、pH が 6.0 で最も多く存在し、COH と側鎖のカルボキシル基の間で $C-O^{\ominus} \cdots H-O-C$ の水素結合が形成され反応が進む機構で説明できることを示した (図 4)。



同様にして、サイクリックな側鎖の pH 依存度が Arg-tRNA で見られる。Arg-tRNA は、pH 6.0、ArgRS 上で AMP のみでピロホスファターゼの存在下、PPi が存在しない条件では Arg-tRNA の分解が 43%で止まる。他方、AMP と PPi と Mg^{2+} イオンの存在下、Arg-tRNA が直線的に完全に分解される。この機構については説明がなされなかった。上記の水素結合形成と対応して、Arg-tRNA は、アルギニル基のサークル型と直線型が 57 : 43 存在し、サイクリック型は、グアニジノ基 ($-N^{\delta}HC(=NH)NH_2$) の $N^{\delta}H$ が Arg-tRNA の $C=O$ と水素結合を形成し分解が進むが、直線型は、 $C=O$ へのプロトン供与がなく分解が進まない機構で説明が可能である (図 5)。



クラス II のアミノアシル-tRNA 合成酵素の触媒ドメイン構造と同じ構造をもつ酵素として BirA がある。この酵素は、biotin (ビオチン) と CoA (補酵素 A) から ATP と Mg²⁺イオンの存在下、biotinyl-CoA を形成する反応 (biotin + CoA + ATP → biotinyl-CoA + AMP + PPi) を促進する。この反応において biotinyl-AMP が形成される。 *Thermus thermophilus* BirA と biotin の複合体の結晶構造を決定した (図6)。この酵素は、biotin と CoA と ATP の代わりに ADP の存在下においても、Biotinyl-CoA が形成される。アミノアシル-tRNA 合成酵素の反応と比較し、これらの反応を統一的に今後、説明する予定である。

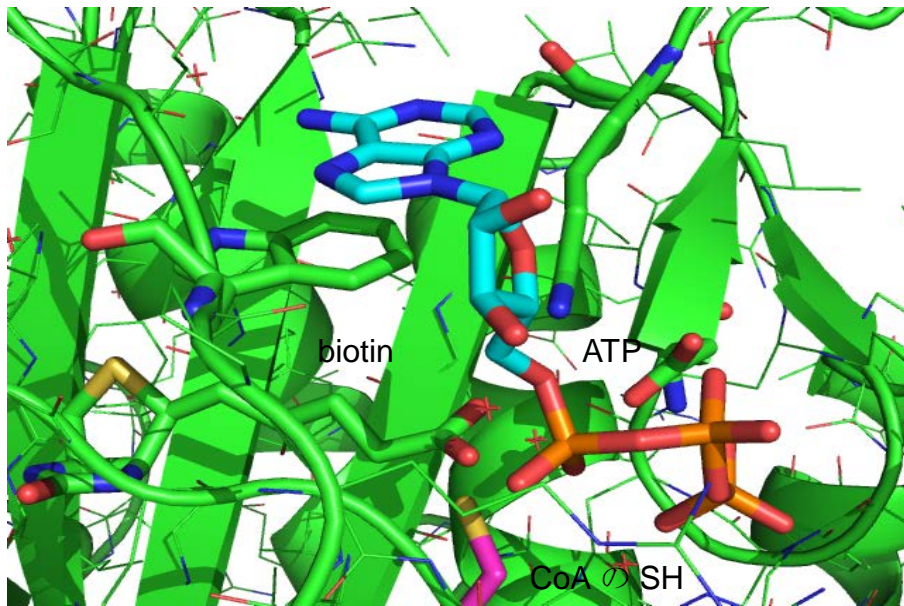


図 6. *Thermus thermophilus* BirA, Biotin, ATP と CoA

これまで研究してきたもう一つの課題は、細胞質に大量にあるサイクロフィリンの生体での機能である。

サイクロフィリンは多種類ある。

1. 大腸菌は 2 種類—細胞質とペリプラズマにサイクロフィリン A と B が存在するが、機能は未知である。もともと 2 種類あったのか進化の途中で複製により別の機能を持つようになったのか。

2. ヒト、酵母菌は少なくとも 8 種類あり機能は未知であるがそれぞれ異なる。

サイクロフィリンは、試験管で *Cis-Pro* (シスプロリン) を含むペプチドを *Trans-Pro* (トランスプロリン) へ異性化する反応を促進する働きと、逆に *Cis-Pro* を含むリボヌクレアーゼ T1 等のタンパク質を変性剤で解き (unfold) し、それを元に戻す過程で *Trans-Pro* から *Cis-Pro* への異性化反応を助け、再畳み込み (refolding) を促進する働きがある。当研究室で歪んだ *Trans-Pro* を含むトリペプチドの結合した大腸菌由来サイクロフィリン B (*Eur. J. Biochem.* **271**, 3794-3803, 2004) の結晶構造(図 7)と *Cis-Pro* を含むトリペプチドとテトラペプチドの結合したサイクロフィリン A (*J. Mol. Biol.*, **256**, 897-908, 1996) の結晶構造 (図 8) を決めた。

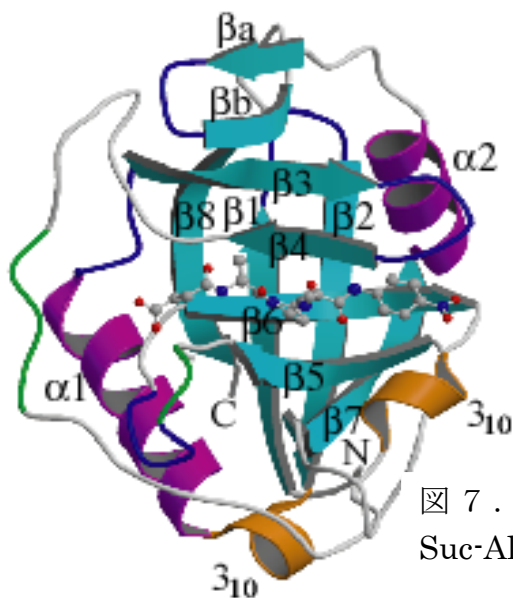


図 7. 大腸菌由来サイクロフィリン B と Suc-Ala-*trans*-Pro-Ala-pNA の複合体

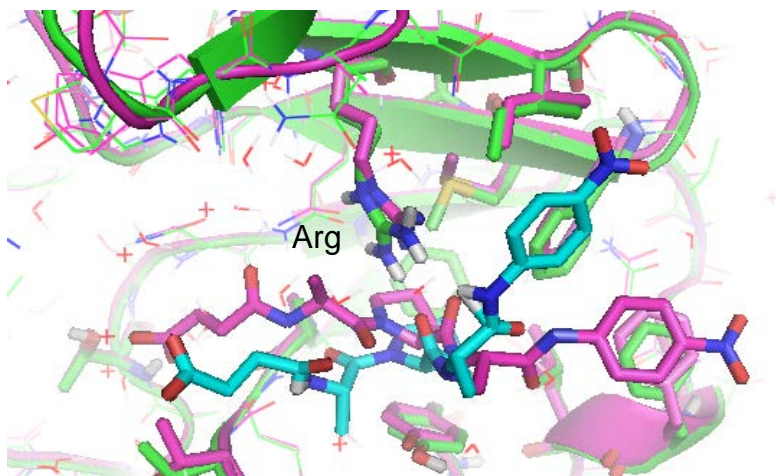


図 8. サイクロフィリン A (グリーン) と Suc-Ala-*cis*-Pro-Ala-pNA (シアン)
サイクロフィリン B (赤) と Suc-Ala-*trans*-Pro-Ala-pNA (赤)

サイクロフィリンの活性部位に存在する Arg の側鎖がペプチドの Pro の N の孤立電子対にプロトンを供与しケト型となり、異性化が進むと考えられる。これらの構造においてペプチドの Pro の C=O の O と Arg のグアニジノ基の N との間に水素結合を形成することからこれらはインヒビターとして働いていることを指摘した。更に、これらの 2 つの過程 *Cis*-Pro から *Trans*-Pro への異性化反応過程と逆に再畳み込み過程における *Trans*-Pro から *Cis*-Pro への異性化反応過程は、同じ過程を辿っていない機構を示した (図 9) (*Eur. J. Biochem.* **271**, 3794-3803, 2004)。

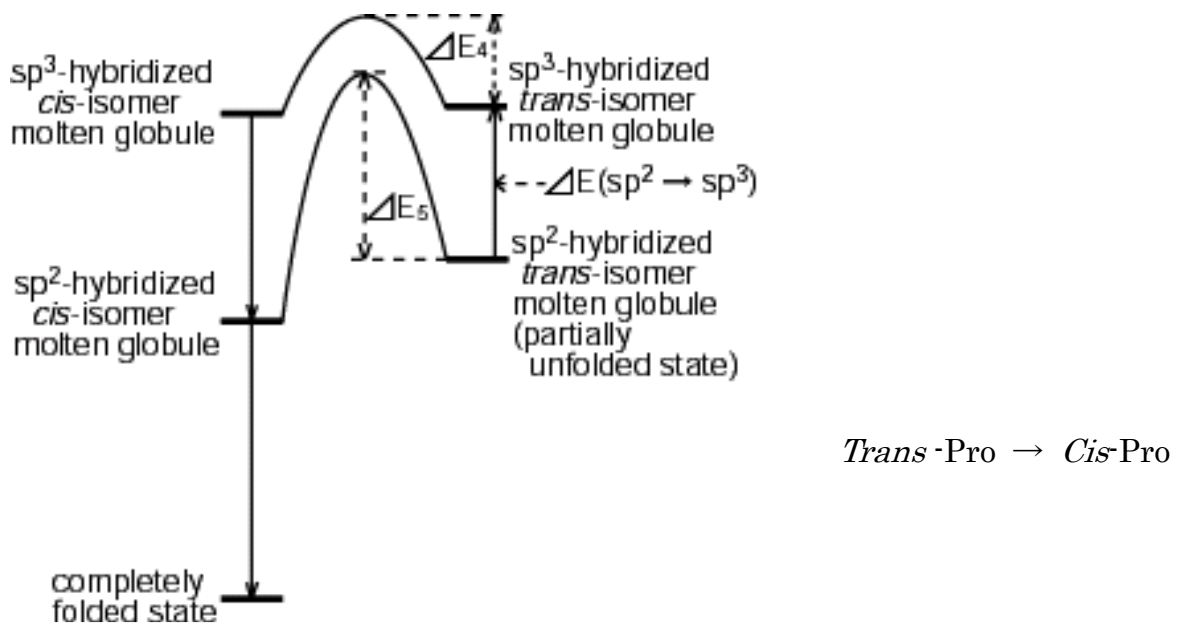
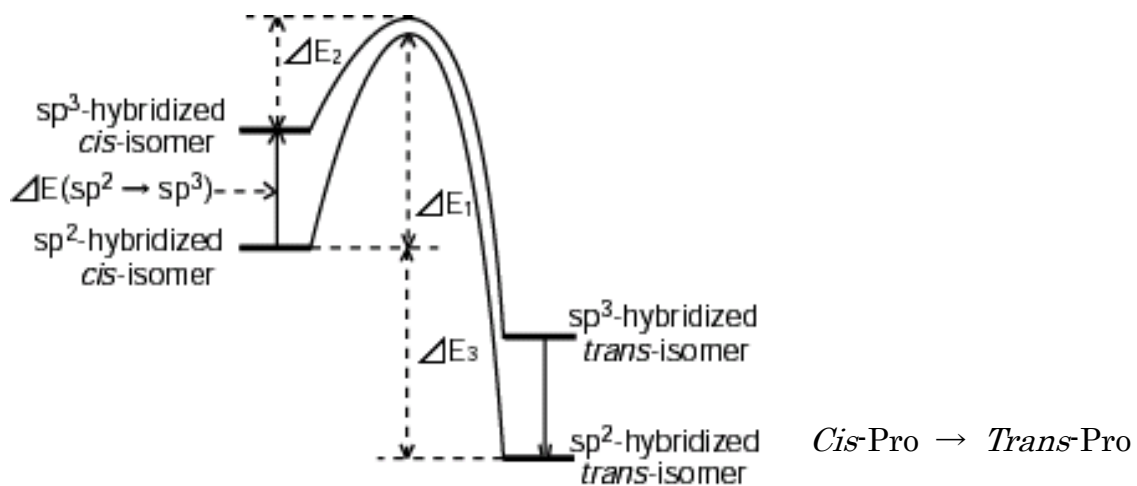


図9. *Cis-Pro* と *Trans-Pro* 間の異性化反応過程

ミトコンドリアに存在するサイクロフィリンの機能は、将来の課題、細胞分裂の課題と以下の観点で興味がある。

1. ミトコンドリアの複製がないと核の DNA の複製ができない—ミトコンドリアが細胞分裂を支配している。
2. 真核生物の起源と言われている原核生物が支配するようになった—その前の真核生物はどのような機構で分裂をコントロールしたか。
3. ミトコンドリアの複製はどのような機構で支配されているか—ミトコンドリアに存在するサイクロフィリンが重要である。

これらを指摘して最終講義を終わりとします。

最後に、これらの研究を遂行して下さった私の研究室を卒業した多くの方々、そして共同研究者である理化学研究所、(東京大学理学系研究科) 横山茂之教授と研究室の方々に感謝します。