

非天然アミノ酸を認識するアミノアシル tRNA 合成酵素の構造生物学的研究 Structural study of unnatural amino acid specific aminoacyl-tRNA synthetases

中村彰良*

産業技術総合研究所, 生物プロセス研究部門 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東 2-17-2-1

Akiyoshi Nakamura*

Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1, Tsukisamu-higashi, Toyohira-ku, Sapporo, 062-8517, Japan

1 はじめに

タンパク質の機能拡張において、20種類の天然アミノ酸以外の非天然アミノ酸をタンパク質の任意の部位に導入する研究が注目されている。非天然アミノ酸をタンパク質へ導入する方法としては、終止コドンに非天然アミノ酸をコードする方法が最も進んでおり、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)を改変し、非天然アミノ酸を認識する改変 aaRS を開発することで、生物の翻訳システムを利用し非天然アミノ酸をタンパク質へ導入することが可能となる[1]。

大腸菌の発現系を用いる場合、古細菌 *M. jannaschii*由来 TyrRS(MjTyrRS)が非天然アミノ酸の導入によく用いられている。しかし、これまでの研究は非天然アミノ酸の種類の拡張が中心であり、非天然アミノ酸のタンパク質への導入効率が低いことが問題となっていた。

近年、非天然アミノ酸の導入効率を改善するために新規スクリーニング法が開発され、Azidophenylalanine (AzF)を認識するAzFRSの活性を大幅に向上することに成功した[2]。活性が向上したAzFRS変異体はアミノ酸結合部位ではなく、その周辺残基への変異が確認された。

本研究では、アミノ酸結合部位周辺の変異がどのようにAzFRSの活性向上に寄与するのか明らかにするために、AzFRS変異体とAzF複合体の構造解明を目指した。

2 実験

AzFRS変異体を大腸菌内で発現後、高純度に精製し、AzFとの共結晶化を行った。得られた結晶を用いてBL-1A, BL-17A, NE3Aでデータ測定を行った。XDSを用いてデータ処理後、Phenixを用いて分子置換および精密化を行った。

3 結果および考察

AzFRS変異体の結晶化を行い、16-26% PEG300, 2-8% PEG8000, 100 mM Tris-HCl pH8.5, 10% Glycerolの条件で得た結晶を用いて3.5Åのデータ測定に成功した。空間群はP4₃2₁2, 格子定数はa=b=103.4 Å, c=73.0 Åで、非対称単位中一分子のAzFRS変異体が含まれていた(図1A)。

AzFRS (PDB ID: 1zh6) をサーチモデルに分子置換で構造決定したが、基質であるAzFの電子密度はアミノ酸結合部位には確認出来なかった。

AzFRS変異体の全体構造を変異前の構造と比較したところ、tRNA結合ドメインには構造変化は見られなかったが、活性ドメインにアミノ酸変異由来と思われる構造変化が確認された(図1B)。この変異によるドメイン全体の構造変化がアミノ酸やtRNAの結合位置に影響し、酵素活性の向上に寄与することが示唆された。

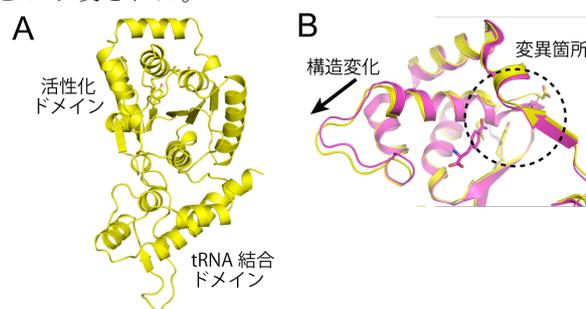


図1: MjAzFRS変異体の立体構造解析

(A) 全体構造 (B) 活性部位の比較 (黄: AzFRS変異体, マゼンタ: AzFRS)

4 まとめ

AzFRS変異体の3.5Å分解能のデータ測定に成功した。分子置換により構造決定したが、共結晶化したAzFの電子密度は確認出来なかった。これまで報告されている変異導入前のAzFRSと構造比較を行った結果、変異部位を起点とする活性化ドメイン全体の構造変化が確認された。

今後はより詳細に議論するためにも、AzFRS変異体のAzFを含むより高分解能での構造解析が必要である。

謝辞

データ測定においてサポートいただいたビームラインスタッフの皆さまに深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] CC. Liu and PG. Schultz. *Annu Rev Biochem.* **79**, 413 (2010).
[2] M. Amiram., et. al., *Nat. Biotechnol.* **33**, 1272 (2015).

* akiyoshi.nakamura@aist.go.jp