

Peptidyl-tRNA hydrolase の基質認識および触媒反応の構造基盤 Structural basis for substrate recognition and catalysis by peptidyl-tRNA hydrolase

伊東孝祐^{1,*}, 村上僚¹, 望月正弘¹, 斉浩², 清水義宏², 三浦謹一郎², 上田卓也², 内海利男¹

¹新潟大理学部生物学科, 〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

²東京大学大学院新領域創成科学研究科, 〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5
Kosuke Ito^{1,*}, Ryo Murakami¹, Masahiro Mochizuki¹, Hao Qi², Yoshihiro Shimizu²,
Kin-ichiro Miura², Takuya Ueda², Toshio Uchiumi¹

¹Department of Biology, Faculty of Science, Niigata University, 8050 Ikarashi 2-no-cho, Nishi-ku, Niigata, 950-2181, Japan ²Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

1 はじめに

Peptidyl-tRNA hydrolase (Pth) は、タンパク質合成が正常に終了しなかった際に生じるペプチジル tRNA を、ペプチドと tRNA 間のエステル結合を加水分解することで、tRNA を正常にリサイクルさせる役割を担っている。細胞内におけるペプチジル tRNA の蓄積は tRNA の枯渇を引き起こし、最終的にタンパク質合成系を停止へと追いやってしまう。それ故、Pth 活性は生命維持に必要不可欠である。

現在までに、Pth の機能発現のメカニズムを明らかにするため、7 種の生物種由来の Pth の立体構造が決定されてきた。しかし、それらはいずれも Pth 単独の構造であり、Pth がどのように基質であるペプチジル tRNA を認識し、そして基質をペプチドと tRNA に分離するのか、その活性発現の分子機構は明確にされていなかった。そこで我々は、まず Pth と基質の tRNA 部位との相互作用を明らかにするため、大腸菌由来の Pth と tRNA の CCA-acceptor-TΨC ドメイン (Pth が認識する基質の tRNA 部位の領域) との複合体の結晶構造を明らかにすることを目的として研究を進めた。

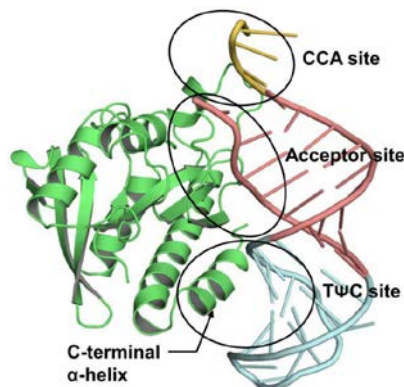
2 実験

Pth は大腸菌を用いて作製した。CCA-acceptor-TΨC ドメインは *in vitro* 転写系を用いて作製した。それらを混合し、100 mM acetate buffer pH 5.2、20%(w/v) 1,4-butanediol、30 mM glycyl-glycyl-glycine を使用することで結晶を得ることができた。測定は BL-5A、17A、NW12A、NE3A にて行った。結晶は空間群 $P6_1$ に属し、格子定数は、 $a = b = 55.1$, $c = 413.1$ Å、分解能は 2.4 Å であった。

3 結果および考察

本研究において我々は、大腸菌由来の Pth と tRNA の CCA-acceptor-TΨC ドメインとの複合体の結晶構造を 2.4 Å の分解能で決定することに成功した。

そして、部位特異的変異体を利用した機能解析と併せて、基質の tRNA 部位を認識している Pth のアミノ酸残基を特定した。また Pth は、高度に保存されている G53 以外については、tRNA のリン酸バックボーンとリボースのみを認識し、塩基とは相互作用していないことを明らかにした。この認識様式が、塩基配列が様々である tRNA の認識を 1 種類の Pth で行える理由であると考えられる。さらに我々は、得られた立体構造と酵素学的な機能解析結果、およびドッキングシミュレーションにより、Pth-ペプチジル tRNA 複合体モデルを構築した。また、同時に詳細な加水分解反応のメカニズムも考案することができた。



図：Pth と tRNA CCA-acceptor-TΨC ドメイン複合体の構造

謝辞

X 線データ測定においては PF スタッフの方々に大変お世話になりました。感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Ito, K. *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **67**, 1566–1569 (2011).
[2] Ito, K. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10521–10531 (2012).

* k-ito@bio.sc.niigata-u.ac.jp