

真正細菌型グルタミンアミドトランスフェラーゼ CAB 複合体の結晶構造

中村彰良¹, 田中 勲²¹北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻, ²北海道大学大学院先端生命科学研究院Crystal structure of bacterial Glu-tRNA^{Gln}-dependent amidotransferaseAkiyoshi NAKAMURA¹, Isao TANAKA²¹Division of Life Sciences, Graduate School of Life Science, Hokkaido University,²Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

1. はじめに

遺伝暗号を正確に翻訳するためには、アミノ酸と対応する tRNA を結び付けるアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) の正確さが必須である [1]。真核生物の aaRS は、正確にアミノ酸を認識するために、20 種類のアミノ酸に対応し 20 種類存在する。しかし、近年のゲノム解読の結果から、古細菌と多くの真正細菌にはグルタミンを対応する tRNA (tRNA^{Gln}) に付加するグルタミン tRNA 合成酵素 (GlnRS) が存在しないことが明らかになった [2]。これらの生物では、誤った組み合わせの Glu-tRNA^{Gln} を一旦合成し、その後、アミドトランスフェラーゼ (Glu-AdT) が Glu-tRNA^{Gln} を正常な Gln-tRNA^{Gln} に変換する [3] (Fig. 1a)。真正細菌の Glu-AdT は GatC, GatA, GatB の 3 つのサブユニットからなり (GatCAB), 古細菌では GatD, GatE の 2 つのサブユニットからなる (GatDE) [4, 5]。アミノアシル化反応において、生物ドメイン間で異なる反応経路が使われることも、また異なる分子が関与することも、他には例がなく大変興味深い現象である。

Glu-AdT は異なる複数の反応を統括し、Glu-tRNA^{Gln} を Gln-tRNA^{Gln} に変換する (Fig. 1b)。最初に、グルタミンの加水分解によりアンモニアを合成する (Glutaminase: グルタミン加水分解酵素)。同時に、tRNA^{Gln} に付加したグル

タミン酸をリン酸化により活性化する (Kinase: リン酸化酵素)。その後、2 つの反応産物を用いて Glu-tRNA^{Gln} を Gln-tRNA^{Gln} に変換する (Amidotransferase: アミド基転移酵素)。この過程において、Glu-AdT は誤った組み合わせの Glu-tRNA^{Gln} を、正しい組み合わせの Gln-tRNA^{Gln} や Glu-tRNA^{Gln} から正確に識別している。また Glu-AdT が行う 3 種類の反応はお互いに同調しており、リン酸化およびアミド基転移反応の基質である Glu-tRNA^{Gln} が、GatCAB に結合して初めてグルタミン加水分解反応が活性化される [6, 7]。しかし、基質認識、活性部位、および異なる反応の同調機構などの詳細な分子機構は、Glu-AdT の立体構造情報が不足していたため明らかになっていなかった。

今回、*Staphylococcus aureus* 由来 GatCAB の様々な基質複合体の立体構造解析を行い、全ての活性部位を特定し、反応同調機構について新たな知見を得ることができたため [8]、ここに概略を紹介する。

2. 結晶化と X 線結晶構造解析

最初に GatCAB の各サブユニットを個別に大腸菌内で大量発現させたが、GatA を可溶性画分で回収することができなかった。そこで、gatCAB オペロン全長のクローニングを行い、大腸菌内で各サブユニットを共発現させたところ、GatCAB 複合体の状態ですべてのサブユニットを可溶化させることに成功した。大腸菌内で大量発現させた GatCAB は、アフィニティークロマトグラフィー・ゲルろ過・陰イオン交換カラムにかけ、高純度に精製した。位相決定のためのセレノメチオニン置換体も同様の方法により精製した。結晶化はシッピングドロップ蒸気拡散法で行い、50 mM HEPES pH 7.0, 5 mM MgCl₂, 25 % PEGMME550 の条件で初期結晶が得られた。同じ条件で、セレノメチオニン置換体の結晶を作成し、SAD 法により 2.8 Å 分解能で初期位相を決定した。しかし、2.8 Å 分解能では全体の約 8 割しかモデル構築をすることができなかったため、結晶改良を行い、初期結晶をシーディングすることで良質な結晶を得ることができた。その後、PF-AR NW12 で 2.4 Å 分解能のネイティブデータの測定に成功し、このデータを用いて初期位相を改良することで、ほぼすべてのモデルを構築することができた。また、複数の基質複合体結晶は、結晶を基質溶液にソーキングすることで調製した。Table.1(Appendix) に結晶学的データおよび回折強度データと

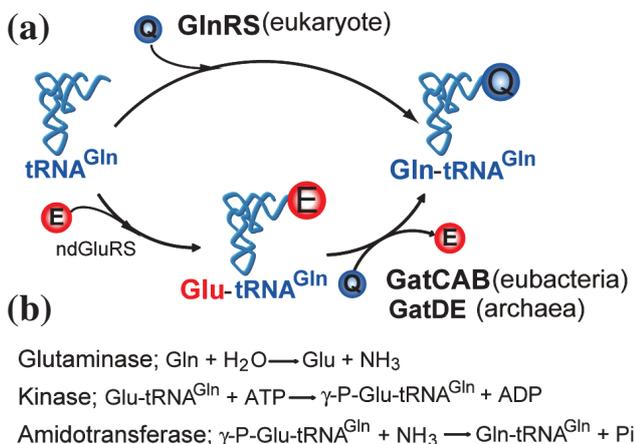


Figure 1

(a) Pathways of Gln-tRNA^{Gln} synthesis. The direct aminoacylation pathway (top) and the indirect transamidation pathway (bottom) exist both in nature. Glu-AdT participates in the indirect transamidation pathway as a tRNA-dependent amidotransferase. (b) Reactions in tRNA-dependent transamidation catalyzed by Glu-AdT.

精密化の統計値を示す。

3. GatC : 分子ベルト

非対称単位中には GatCAB 複合体が 1 分子存在し、GatB の C 末端はディスオーダーしていた (Fig. 2a)。GatCAB の全体構造で最も目を引くのは、GatC がまるでベルトのように GatA と GatB の境界面に巻きついていたことである。GatC 自身は 2 次構造をほとんどとらず、分子全体で GatAB と相互作用しており、N 末端部位は GatA とヘリックスバンドルを形成し、C 末端部位は GatB の 2 本の β -ストランドと共に β -シートを形成していた (Fig. 2b-d)。このことから、GatC は GatAB に結合して初めて安定な構造を取り、GatA と GatB の結合をより強固にしていると考えられる。

4. GatA : グルタミン加水分解反応の詳細

GatA はアミノ酸配列からアミダーゼであると予想されており、Ser, *cis*-Ser および Lys からなる活性残基でグルタミン加水分解反応を行うと考えられていた。立体構造解析を行った GatCAB/グルタミン複合体では、グルタミンは GatA の中心に結合し、グルタミン側鎖の近傍に Ser, *cis*-Ser および Lys が存在していた。興味深いことに、結合したグルタミンは活性残基である Ser178 の側鎖と共有結合しており、4 面体中間体を形成していた (Fig. 3)。通常は観察できないはずの反応中間体が確認されたことから、

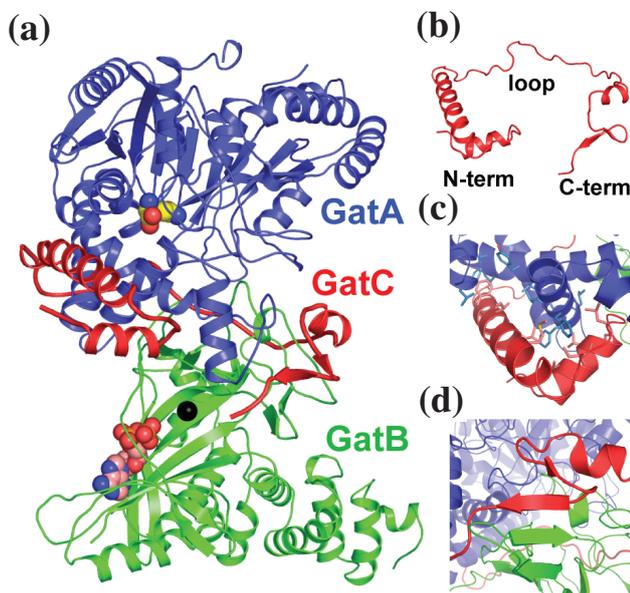


Figure 2

(a) The overall structure of *S. aureus* GatCAB/glutamine complex at 2.3 Å resolution, depicted in three different colors for each subunit; blue, green, and red for GatA, GatB, and GatC, respectively. A yellow sphere model in GatA indicates a glutamine binding site to the active site of glutaminase reaction. The magnesium ion found in the active site of GatB is drawn as the black sphere. The pink sphere model in GatB indicates the ADP in GatCAB/ADP complex. (b) The overall structure of GatC. (c) Amphipathic helices at the N-terminus of GatC form a helical bundle with the hydrophobic core of GatA. (d) The C-terminus of GatC constructs an antiparallel β -sheet with GatB.

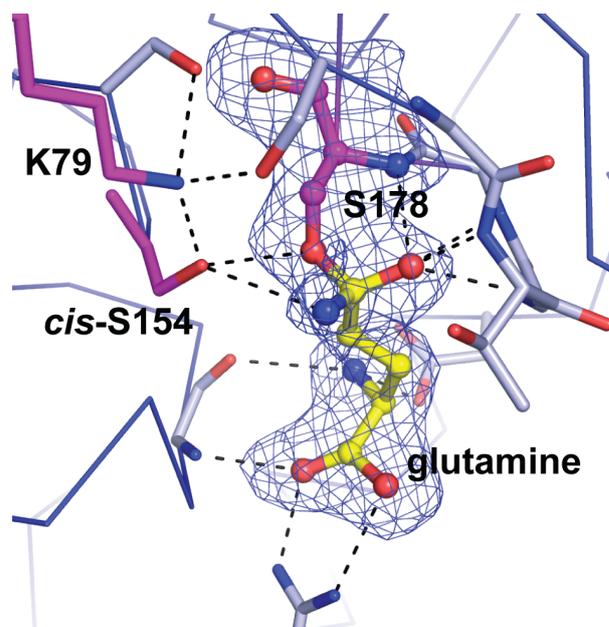


Figure 3

The active site of a glutaminase reaction in GatA is constructed by the conserved three catalytic residues (S178, *cis*-S154, and K79, magenta sticks) and residues involved in the hydrogen-bonded network. The *Fo-Fc* electron density map (contoured at 3σ , blue mesh) was calculated without the glutamine and Ser178.

グルタミン加水分解反応は未知の制御機構によって活性が抑制されていると示唆される。この未知の制御が、リン酸化およびアミド基転移反応の基質である Glu-tRNA^{Gln} の結合により解除されることで、すべての反応が同調すると考えられる。

5. GatB : リン酸化反応およびアミド基転移反応部位の同定

過去に GatB は Glu-tRNA^{Gln} のリン酸化反応を行うと報告されているが [6], その反応機構の詳細は明らかになっていなかった。GatCAB/ADP 複合体の立体構造では、ADP は GatB のクレイドル (ゆりかご) ドメインの底にあるポケットに結合しており、近傍にアポ体でも観察された Mg^{2+} が存在した (Fig. 4a)。このクレイドルドメインの底が GatB の活性部位であることが強く示唆された。更に、 Mn^{2+} をソーキングした結果、ADP 結合部位付近に 2 つの Mn^{2+} 結合サイトが観察された。*Fo-Fc* 電子密度マップでより強いピークを示す第 1 の Mn^{2+} は、アポ体で観察された Mg^{2+} の結合サイトと同じ位置に結合していた。一方、 Mn^{2+} のソーキングにより初めて明らかになった第 2 の結合サイトは、第 1 の結合サイトのすぐ横にあり、ADP 複合体では水分子が結合し、リン酸基と相互作用していた (Fig. 4b)。以上の結果から明らかになった GatB の活性部位は、グルタミン合成酵素の活性部位と高い構造相関性があった。グルタミン合成酵素は遊離のグルタミン酸をリン酸化により活性化し、アンモニアを用いたアミド基転移反応からグルタミンを合成する。この反応機構は遊離のグルタミン酸を用いること以外、GatB と全く同じ反応機構で

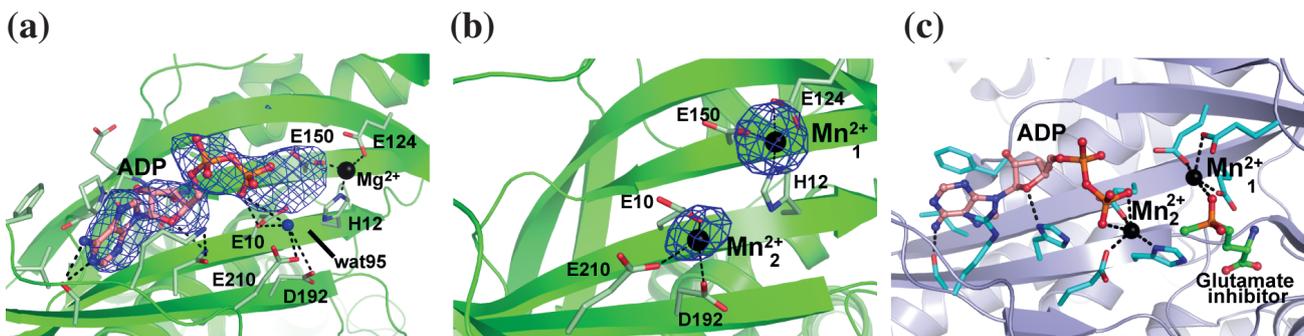


Figure 4

(a) The ADP in the cradle domain of GatB is shown as the stick model together with the omit *Fo-Fc* electron density map (2σ , blue mesh). Residues contributing to Mg^{2+} and water 95 recognitions are drawn as stick models with labels. (b) Two manganese ion binding sites in the cradle domain of GatB. Blue mesh indicates the strong peaks of the manganese ions (black spheres) seen in the *Fo-Fc* electron density map contoured at 4σ level. Coordinate sites are drawn as stick models and labeled. Mn^{2+}_1 is in the same position as Mg^{2+} site in the apo form or ADP-bound complex structures. Mn^{2+}_2 implies the secondary transient metal binding site in the kinase center of GatB. (c) The active site of a glutamine synthetase with ADP and a glutamate inhibitor (PDBID: 1FPY).

ある。グルタミン合成酵素と ADP およびグルタミン酸アナログとの複合体の立体構造解析から、第 1 の Mn^{2+} は基質であるグルタミン酸と相互作用し、第 2 の Mn^{2+} は ATP と相互作用することが確認されている [9] (Fig. 4c)。このことから、GatB が行うリン酸化反応もグルタミン合成酵素と同様に 2 つの Mg^{2+} が必要であり、第 1 の Mg^{2+} は tRNA^{Gln} に結合したグルタミン酸に結合し、第 2 の Mg^{2+} は

ATP のリン酸基に結合し、リン酸基転移を促進していると考えられる。

6. アンモニアチャネル

様々な基質複合体の構造解析により、グルタミン加水分解反応、リン酸化反応およびアミド基転移反応の 2 つの活性部位を同定したが、これらの反応はお互いに同調しているにもかかわらず活性部位は 30 Å も離れていた。しかし、分子内部を詳細に解析したところ、離れた 2 つの活性部位は分子内部のチャネルにより連結されていることが明らかになった (Fig. 5a)。2 つの活性部位を結ぶこのチャネルは、GatA で生成されたアンモニアを GatB のアミド基転移反応部位に運搬するアンモニアチャネルであると考えられる。しかし、現在までに構造解析されているアンモニアチャネルの多くは、疎水性残基で構成されており、アンモニウムイオンではなくアンモニアの状態で輸送するとされているのに対し [10, 11], GatCAB が持つアンモニアチャネルは親水性残基で構成されていた。我々は、チャネルが親水性であることから、これまで解析された疎水性のアンモニアチャネルとは異なり、GatA で生成されたアンモニアは、アンモニウムイオンの状態で輸送され、反応前に脱プロトン化されると考えている。

さらに、このアンモニアチャネルには途中で極端に狭くなっている部分が存在する (Fig. 5b)。このことから、グルタミン複合体でのアンモニアチャネルは途中で閉じており、GatA からのアンモニアの輸送が制限されているために、グルタミン加水分解反応が抑制されると考えられる。そして、Glu-tRNA^{Gln} の結合によりアンモニアチャネルの構造変化が引き起こされることで、初めてアンモニアチャネルが開通し、アンモニアが輸送されることでグルタミン加水分解反応が活性化され、リン酸化反応およびアミド基転移反応と同調すると予想される。

7. GatCAB と GatDE の分子進化

古細菌型アミド基転移酵素である GatDE の立体構造も

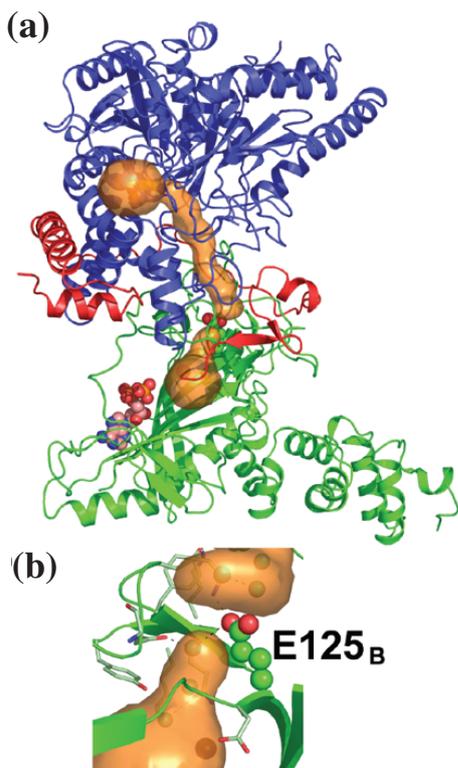


Figure 5

(a) The putative ammonia channel was calculated using the program CAVER [15] with the water-omitted GatCAB/glutamine complex. The glutaminase and transamidase active sites are markedly distant but connected by a hydrophilic ammonia channel 30 Å in length. (b) Glu125_B blocking the ammonia transport route is shown in a space-filling representation for clarity. The channel was filled with a row of solvent molecules (spheres), which interact with the conserved polar residues (sticks) along the pathway.

すでに明らかになっている [12]。GatDE では GatD がグルタミン加水分解，GatE がリン酸化およびアミド基転移反応を担っている。GatB と GatE はほぼ同じ構造をとっており，活性部位周辺は全く共通であることから反応機構も共通であると考えられる。また，GatB および GatE は単体で Glu-tRNA^{Gln} をリン酸化することができ，さらに遊離のアンモニウムイオンを活性は低いながらもアミド基転移反応に利用することができることと報告されている [4, 6]。一方，グルタミンの加水分解を担うサブユニット間の構造比較では，GatA はアミダーゼホモログであるのに対し，GatD はアスパラギナーゼホモログであり，全体構造に全く共通点はない。また，各複合体の安定化機構にも違いがあり，GatCAB では GatC が GatAB 複合体を安定化しているのに対し，GatDE では GatD が N 末端側にアスパラギナーゼにはない挿入ドメインを持っており，この挿入ドメインが GatDE 複合体を安定化している。以上のことから Glu-AdT の分子進化を以下のように推測する。リン酸化およびアミド基転移反応を行う GatB および GatE の祖先タンパク質は元々単体で機能しており，遊離のアンモニアを利用して。その後，より効率よくアンモニアを利用するために，アミダーゼを取り込んだものとアスパラギナーゼを取り込んだものとに別れ，複合体を安定化するために GatC および GatD の N 末端に挿入ドメインを獲得し，現在の GatCAB および GatDE になったと考えられる。

8. おわりに

Glu-AdT はグルタミン加水分解，リン酸化およびアミド基転移反応の他に，tRNA^{Gln} を厳密に認識しなければならない。Glu-AdT の tRNA^{Gln} 認識機構は，GatCAB と tRNA^{Gln} の結合実験 [8]，および，その後行われたより詳細な結合実験 [13]，また，GatDE と tRNA^{Gln} との複合体の立体構造解析から [14]，明らかになった。しかし，親水性残基で構成されたアンモニアチャネルのアンモニア輸送機構，複数の反応の同調機構は完全には解明されていない。これらの残された謎を解明するためには，残る基質 Glu-tRNA^{Gln} との複合体の立体構造解析が必要である。この複合体の立体構造解析により，アンモニアチャネルの構造変化を観察するとともに，反応の最終段階であるアミド基転移反応の詳細も明らかにできるものと考えている。

引用文献

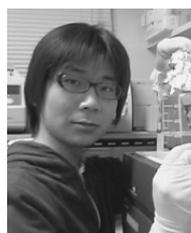
- [1] Ibba, M., Söll, D. *Science* **286**, 1893 (1999).
- [2] Wilcox, M., Nirenberg, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**, 229 (1968).
- [3] Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C. D., Tumbula, D. L., Söll, D. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 311 (2000).
- [4] Curnow, A. W., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 229 (1997).
- [5] Tumbula, D. L., Becker, H. D., Chang, W. Z., Söll, D. *Nature* **407**, 106 (2000).
- [6] Feng, L., Sheppard, K., Tumbula, H. D., Söll, D. *J. Biol. Chem.* **280**, 8150 (2005).

- [7] Horiuchi, K. Y., et al. *Biochemistry* **40**, 6450 (2001).
- [8] Nakamura, A., Yao, M., Chimnaronk, S., Sakai, N., Tanaka, I. *Science* **312**, 1954 (2006).
- [9] Gill, H. S., Eisenberg, D. *Biochemistry* **40**, 1903 (2001).
- [10] Bera, A. K., Smith, J. L., Zalkin, H. *J. Biol. Chem.* **275**, 7975 (2000).
- [11] Khademi, S., et al. *Science* **305**, 1587 (2004).
- [12] Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S., Mechulam, Y. *Structure (Camb)* **13**, 1421 (2005).
- [13] Bailly, M., et al. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6083 (2006).
- [14] Oshikane, H., et al. *Science* **312**, 1950 (2006).
- [15] Petrek, O. M., Banas, P., Koca, J., Damborsky, J. CAVER program, <http://loschmidt.chemi.muni.cz/caver/index.php>.
- [16] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283 (1993).

(原稿受付日：2007年4月11日)

著者紹介

中村彰良 Akiyoshi NAKAMURA



北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻 博士後期課程2年 学振特別
研究員

〒060-0810 北海道札幌市北区北10
条西8丁目

TEL: 011-706-4479

FAX: 011-706-4481

e-mail: nakamura@castor.sci.hokudai.ac.jp

略歴：2004年北海道大学理学部卒業。06年北海道大学大学院理学研究科修士課程修了。

最近の研究：GatCAB に存在するアンモニアチャネルの制御機構の解明。

趣味：スキー，アーチェリー。

田中 勲 Isao TANAKA

北海道大学大学院先端生命科学院 教授。理学博士。

〒060-0810 北海道札幌市北区北10条西8丁目

TEL: 011-706-3221

FAX: 011-706-4481

e-mail: tanaka@castor.sci.hokudai.ac.jp

略歴：1974年10月大阪大学大学院理学研究科博士課程中退，名古屋大学工学部助手，旧西ドイツマックスプランク分子遺伝学研究所研究員，北海道大学理学部助教授，教授を経て平成18年4月より現職。理学博士。

最近の研究：構造生物学，X線結晶構造解析。

(Appendix)

Table. 1 : Crystallographic statistics^a

Data collection	SAD (Peak)	Native	Gln	ADP	Mn ²⁺
PDB code		2G5H	2F2A	2G5I	2DF4
Space group			$P2_12_12_1$		
Cell dimensions					
a (Å)	71.4	70.9	77.2	76.9	71.0
b (Å)	91.9	92.1	88.2	85.3	91.7
c (Å)	183.5	181.4	183.4	183.6	181.3
Wavelength (Å)	0.9793	0.9000	0.9000	1.0000	1.0000
Resolution (Å)	50.00-2.80 (2.90-2.80)	50.00-2.40 (2.49-2.40)	50.00-2.30 (2.38-2.30)	50.00-3.35 (3.47-3.35)	50.00-3.20 (3.31-3.2)
R_{merge}^b	0.103 (0.535)	0.069 (0.449)	0.067 (0.436)	0.127 (0.276)	0.090 (0.432)
$I / \sigma(I)$	15.4 (3.5)	24.1 (4.7)	21.3 (4.6)	22.3 (3.6)	12.0 (2.9)
Completeness (%)	99.6 (95.9)	99.5 (97.8)	99.9 (99.7)	98.7 (99.7)	97.5 (97.0)
Redundancy	9.2	6.9	7.3	4.3	3.6
Refinement					
Resolution (Å)		20.0-2.50	20.0-2.30	20.0-3.35	20.0-3.20
No. reflections		41591	56332	17609	19537
$R_{\text{work}}^c / R_{\text{free}}^d$		0.238 / 0.275	0.211 / 0.252	0.233 / 0.297	0.231 / 0.273
No. atoms					
Protein		7664	7689	7754	7674
Others		1	11	33	2
Water		139	393	87	88
R.m.s deviations					
Bond lengths (Å)		0.007	0.007	0.005	0.004
Bond angles (°)		1.5	1.4	1.3	1.2
Ramachandran plot ^e (%)					
Favored		86.6	85.2	78.8	85.4
Allowed		12.7	14.2	20.3	14.1
Generous		0.7	0.6	0.9	0.5
Disallowed		0.0	0.0	0.0	0.0

^aValues in parentheses are for the outermost resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_j | \langle I \rangle_h - I_{h,j} | / \sum_h \sum_j I_{h,j}$, where $\langle I \rangle_h$ is the mean intensity of symmetry-equivalent reflections.

^c $R_{\text{work}} = \sum | F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}} | / \sum F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{cal} are observed and calculated structure factor amplitudes.

^d R_{free} value was calculated for R factor, using only an unrefined subset of reflections data.

^eRamachandran plot was calculated by *PROCHECK*[16].