

アミノアシル tRNA の A サイト結合における  
ポリペプチド鎖延長因子 Tu の役割

春 木 潤

①

博士論文

アミノアシルtRNAのAサイト結合における  
ポリペプチド鎖延長因子Tuの役割

春木 満

指導教官 横山 茂之

1990

## 目次

要旨	1
序章 ポリペプチド鎖延長因子 T u の機能	6
図	9
第2章 E F - T u とアミノアシル t R N A との相互作用	
～アミノアシル t R N A の 2' , 3' 異性体の解析	
2. 1. 序	10
2. 2. 材料と方法	11
2.2.1. 材料	11
2.2.2. [ <sup>3</sup> H]Ile-tRNA の調製	12
2.2.3. [ <sup>3</sup> H]Phe-tRNA の調製	12
2.2.4. [ <sup>3</sup> H]Ile-tRNA の調製からの Ac[ <sup>3</sup> H]Ile-Ado の調製 (pH7)	12
2.2.5. [ <sup>3</sup> H]Ile-tRNA, [ <sup>3</sup> H]Phe-tRNA からの Ac[ <sup>3</sup> H]Ile-Ado, Ac[ <sup>3</sup> H]Phe-Ado の調製 (pH7.5)	13
2.2.6. EF-Tu と [ <sup>3</sup> H]Ile-tRNA との複合体の形成	13
2.2.7. EF-Tu と [ <sup>3</sup> H]Ile-tRNA との複合体からの Ac[ <sup>3</sup> H]Ile-Ado の調製	13
2.2.8. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNA からの Ac[ <sup>3</sup> H]Ile-Ado の調製	14
2.2.9. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNA からの Ac[ <sup>3</sup> H]Phe-Ado の調製	14
2.2.10. H P L C による分析	15
2. 3. 結果	15
2.3.1. p H 7.5 における Ile-tRNA の 2' , 3' 異性体の比率	15
2.3.2. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNA から調製したの Ac[ <sup>3</sup> H]Ile-Ado の分析	16
2.3.3. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNA から調製したの Ac[ <sup>3</sup> H]Ile-Ado の分析	16



2.3.4. EF-Tuと $[^3\text{H}]\text{Ile-tRNA}$ との複合体から調製した Ac $[^3\text{H}]\text{Ile-Ado}$ の分析	16
2.4. 考察	17
図表	20
第3章 EF-TuとアミノアシルtRNAとの相互作用 ～コンフォメーションの解析	
3.1. 序	26
3.2. 材料と方法	27
3.2.1. 材料	27
3.2.2. tRNAのアミノアシル化	27
3.2.3. EF-TuとtRNAの複合体のクロスリンキング とゲルシフト法による検出	28
3.2.4. EF-TuとtRNAとの複合体の $^{13}\text{C}$ NMRスペ クトルの測定	28
3.2.5. CDスペクトルの測定	28
3.2.6. EF-TuのTPCKによる化学修飾	29
3.2.7. RNaseによるアミノアシルtRNAの切断の EF-Tuによる保護	29
3.3. 結果	30
3.3.1. EF-TuとtRNAとの複合体の形成の クロスリンクによる分析	30
3.3.2. EF-Tu-GTPと大腸菌Ile- $[^{13}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Ile}}$ との 複合体の $^{13}\text{C}$ NMRスペクトル	30
3.3.3. <i>T. thermophilus</i> tRNA $^{\text{Ile}}$ のCDスペクトルの 温度変化	31
3.3.4. EF-Tuと高度好熱菌tRNA $^{\text{Ile}}$ との複合体の CDスペクトル	32
3.3.5. EF-Tuと大腸菌tRNA $^{\text{Ile}}$ との複合体のCD スペクトル	32

3.3.6. EF-Tuと大腸菌 tRNA <sup>Val</sup> との複合体のCD スペクトル	32
3.3.7. TPCK処理したEF-Tuによる脱アミノアシル化 の抑制	33
3.3.8. TPCK処理したEF-Tuと複合体を形成した Ile-tRNAのCDスペクトル	33
3.3.9. RNaseによるアミノアシルtRNAの切断の EF-Tuによる保護	33
3.3.10. TPCK処理したEF-Tuによるアミノアシル tRNAのAサイト結合活性	34
3.4. 考察	34
図	40
第4章 リボソームのAサイトにおけるEF-Tuの役割	
4.1. 序	54
4.2. 方法	55
4.2.1. 材料	55
4.2.2. アミノアシルtRNAのAサイトへの結合	56
4.2.3. アミノアシルtRNAの脱アミノアシル化の測定	57
4.2.4. AサイトにおけるアミノアシルtRNAの 脱アミノアシル化の測定	57
4.2.5. オーロドックス存在下におけるEF-Tu-GDPに結合した Ile-tRNAの2', 3'特異性の解析	57
4.2.6. CDスペクトルの測定	57
4.3. 結果	57
4.3.1. オーロドックス存在下でのEF-Tu-GDPによる アミノアシルtRNAのAサイトへの結合	57
4.3.2. オーロドックス存在下でのEF-Tu-GDPによる 脱アミノアシル化の抑制	58
4.3.3. AサイトにおけるアミノアシルtRNAの 脱アミノアシル化	58

4.3.4. オーロドックス存在下におけるEF-Tu・GDPに結合した Ile-tRNAの2', 3'特異性	59
4.3.5. オーロドックス存在下でのEF-Tuと複合体を 形成したtRNAのCDスペクトル	59
4.4. 考察	59
図	64
第5章 EF-Tuと23S rRNAの毒素ドメインとの相互作用	
5.1. 序	71
5.2. 材料と方法	72
5.2.1. 材料	72
5.2.2. 毒素ドメインRNAの化学合成	72
5.2.3. RNAオリゴマーの5'- <sup>32</sup> Pラベル	72
5.2.4. クロスリンキング	72
5.3. 結果	73
5.4. 考察	74
図	76
結語	78
略号	80
参考文献	81
謝辞	86



## 要旨

ポリペプチド鎖延長因子 (EF-Tu) は1分子のGDPまたはGTPを結合する。アミノアシルtRNAのAサイトへの正常な結合には、活性型であるEF-Tu-GTPの存在が必要であるが、EF-Tuの具体的な役割についてはよくわかっていない。本研究では、アミノアシルtRNAのAサイト結合の過程におけるEF-Tuの役割について検討した。

### (1) アミノアシルtRNAの2', 3'特異性の分析

アミノアシルtRNAには、アミノアシル基がCCA末端のアデノシン残基の2'位に結合した2'異性体と、3'位に結合した3'異性体が存在し、転移反応によって相互に変換する。2'異性体と3'異性体の転移速度は37°Cにおいて0.1~1/秒である。リボソームのペプチジルトランスフェラーゼは、3'異性体のみを基質とするので、なんらかの因子がアミノアシルtRNAの3'異性体のみをリボソームに供給しているのではないかと考えられる。

そこで、アミノアシルtRNA合成酵素 (ARS) とEF-Tuの2', 3'特異性を検討した。ARSの場合は、3'末端が2'または3'デオキシアデノシンとなったtRNAのデオキシアナログなどを用いて特異性の決定が行われARSによって2', 3'特異性が異なることが報告されている。他方、デオキシアナログなどを用いて決定された2', 3'特異性に基づき、構造モチーフによる分類がclass IのARSは特異性が2'で、class IIのARSは3'であることが示唆されている。しかし、PheRSはclass IIに属するが特異性が2'であり、例外とされていた。しかし、このようなアナログを用いた実験では最初にアミノアシル化された部位しか決定できないため、合成されたあと別の異性体に転移する可能性がある。

本研究では、PheとIleの場合について、最終的に生成するアミノアシルtRNAの2', 3'特異性を直接決定することに初めて成功した。その結果PheRSによって生成するアミノアシルtRNAは3'異性体であり、IleRSによって生成するアミノアシルtRNAは2'異性体であることが明らかとなった。したがって、ARSによって供給されるアミノアシルtRNA

には2'異性体も、3'異性体も存在することが明らかとなった。PheRSの場合、特異性が3'であることが判明したので、クラス分けと2'、3'特異性が一致することが明らかとなった。したがって、ARSが進化的に2系統あることがより明確に示された。

次に、EF-Tuに結合したアミノアシルtRNAの2'、3'異性体の分析を行った。2'位にアミノアシル化されるIle-tRNAもEF-Tuに結合しているのは3'異性体であることが明らかになった。Phe-tRNAの場合はEF-Tuに結合しているのは3'異性体であることがすでに明らかにされているので、EF-Tuがペプチルトランスフェラーゼの基質として、アミノアシルtRNAの3'異性体をリボソームに供給するという重要な機能を持つということが本研究によって明らかとなった。

## (2) EF-Tuに結合したtRNAのコンフォメーション

tRNAのTループとDループとの会合はリボソーム上では開裂して、16S rRNAと結合することが知られている。EF-TuがtRNAに結合したときに、TループとDループとの会合を開裂させるという説があり、本研究ではこの説を検証するために、EF-Tuと複合体を形成したtRNAのコンフォメーションを、CDおよび $^{13}\text{C}$  NMRを用いて解析を行った。

本研究では、高次構造の要にある修飾塩基のチオカルボニル基に由来するCDバンド（他のバンドに妨害されず観測できる）と、コア領域の高次構造を反映するCDバンド（複数のバンドの寄与による）に注目して解析を行った。

その結果、アミノアシルtRNAがEF-Tu-GTPと複合体を形成すると、TループとDループの会合およびコア領域が安定化され、tRNAが堅固なL字型構造をとるようになることが明らかとなった。さらに、アミノアシル化されていない場合には、tRNAの種類によっては、tRNAが異常な形でEF-Tuに結合する場合があったり、L字型構造の安定化が十分でない場合があることが明らかになった。したがって、tRNAがアミノアシル化されていることが十分に安定化されたL字型構造をとるために必要であることが明らかになった。

次に、Tと $m^7\text{G}$ が $^{13}\text{C}$ でラベルされたtRNA $^{\text{Ile}}$ を用いて、三重複合体の $^{13}\text{C}$  NMRを測定した。その結果、Tや $m^7\text{G}$ が形成している分子内の会合は



EF-Tu·GTPと複合体を形成しても開裂しないことが明らかとなった。

以上の結果から、いずれのtRNAでもEF-Tu·GTPと結合すると、L字型構造が安定化する方向に変化することが明らかとなった。また、tRNAのTループとDループとの会合はリボソームに結合する前には開裂しないことが明らかになった。

他方、EF-Tu·GDPはアミノアシルtRNAと結合することはできるが、結合しているアミノアシルtRNAは2'異性体も3'異性体も存在することが明らかになった。さらに、EF-Tu·GDPはtRNAのL字型構造を安定化できないことが明らかとなった。そのためにEF-Tu·GDPはアミノアシルtRNAをAサイトに結合させることができないと考えられ、このような機構によって、アミノアシルtRNAの2'異性体がリボソームに供給されないと考えられる。

以上の結果から、EF-TuはtRNAのL字型構造を崩すのではなく、種々のtRNAで異なっていたtRNAのコンフォメーションをならしてAサイトへの結合に必要な、堅固なL字型にする役割があると考えられる。

### (3) リボソーム上におけるEF-Tuの役割

EF-Tuは、コドンに対して正しく対応するアンチコドンを持つアミノアシルtRNAを、Aサイトに結合する役割を担っていると考えられている。EF-TuとアミノアシルtRNAの複合体がAサイトに結合したときに第1段階の選別が行われ、EF-Tuに結合したGTPが加水分解してEF-Tu·GDPとなったあとも、すぐにはリボソームから離れず、その間にコドンとアンチコドンの対応が正しいかどうかの第2段階の「校正」がなされていると考えられている。これらの過程において、アミノアシルtRNAがどのような状態であるかを知ることが「校正」の機構を知るうえで重要である。抗生物質オーロドックスはEF-Tuに対するリボソームの効果を模倣すると考えられ、リボソームにおけるEF-TuとtRNAとの相互作用を解析するのに有用である。そこで、本研究ではオーロドックスを用いて、Aサイト結合後のアミノアシルtRNAがどのような状態にあるかを解析した。

オーロドックスはEF-Tu·GDPがリボソームから解離するのを抑制することによりタンパク質合成を阻害すると考えられている。まず、オーロドックス存在

下において、EF-Tu·GDPがアミノアシル tRNA の A サイト結合のどの段階でリボソームに結合しているかを検討した。オーロドックス存在下で、EF-Tu·GTP との複合体において、アミノアシル tRNA の L 字型構造は安定化されていたが、EF-Tu·GDP との複合体においてはアミノアシル tRNA の L 字型構造は安定化されていないことが CD を用いることにより明らかになった。このことから、オーロドックス存在下において、EF-Tu·GTP はアミノアシル tRNA を正しく A サイトに結合できるが、EF-Tu·GDP はアミノアシル tRNA を正しく A サイトに結合できないことが予想される。実際、オーロドックス存在下で EF-Tu·GDP がアミノアシル tRNA を A サイトに結合させた場合、EF-Tu·GTP が結合させた場合とは異なり、EF-Tu·GDP は A サイトにおいてアミノアシル tRNA の脱アミノアシル化を抑制できないことが明らかとなった。したがって、オーロドックス存在下での EF-Tu·GDP によるアミノアシル tRNA の A サイトへの結合は、通常の A サイト結合の過程を経たものではないと考えられる。したがって、オーロドックス存在下で、EF-Tu·GDP は、EF-Tu·GTP を模倣するような形でリボソームにとどまっているのではないと考えられる。

次に、オーロドックス存在下で、EF-Tu·GTP がアミノアシル tRNA を A サイトに結合させた場合、A サイトにおいてアミノアシル tRNA の脱アミノアシル化を抑制することが明らかとなった。さらにリボソームがない場合も、オーロドックス存在下において EF-Tu·GDP が EF-Tu·GTP と同じようにアミノアシル tRNA の 3' 末端と結合し 3' 異性体に固定することが明らかとなった。したがって、リボソーム上で GTP が加水分解した後、EF-Tu·GDP となっても、EF-Tu·GDP はリボソームから解離しないかぎり、アミノアシル tRNA の 3' 末端と結合していると考えられる。以上のことから、GTP の加水分解後もなお EF-Tu·GDP がリボソームにとどまり、アミノアシル tRNA の 3' 末端と結合してペプチド鎖転移反応に移行するのをおさえ、その間にコドンとアンチコドンとの対応の正しさを確かめる「校正」が行われ、正しい場合にのみペプチド鎖転移反応に移行すると考えられる。

GTP の加水分解の前にアミノアシル tRNA の T ループと D ループとの会合が開裂するという確かな証拠は得られていないので、本研究の結果から、

GTPの加水分解に伴って、アミノアシルtRNAのTループとDループとの会合が開裂して16S rRNAと結合する可能性が考えられる。この場合GTPの加水分解の前後で、アミノアシルtRNAはL字型が安定化された状態から16S rRNAと結合した状態へ変化し、このような二つの異なった状態においてコドンとアンチコドンの対合を確認することにより、誤りの確率を小さくしていると考えられる。

EF-TuやEF-Gのリボソームへの結合には、23S rRNAのうち、毒素ドメインと呼ばれる部分に関与していると考えられている。本研究では、毒素ドメインの合成RNAとEF-Tu·GDPおよびEF-Tu·GTPとの結合をクロスリンクにより初めて検出した。さらに、毒素ドメインとの結合はEF-Tu·GTPよりもEF-Tu·GDPのほうが強いことが示された。したがって、毒素ドメインは「校正」を含めた全段階において、EF-Tuとリボソームとの結合を支持していると考えられる。

以上のような機構を通じてEF-Tuは、コドンとアンチコドンの正しい対応を保証し、タンパク質合成の正確さを維持する役割を果たしていると考えられる。



## 序章 ポリペプチド鎖延長因子 T u の機能

ポリペプチド鎖延長因子 (E F - T u) は 1 分子の G D P または G T P を結合している。活性型である E F - T u · G T P のみアミノアシル t R N A をリボソームの A サイトに結合することができる。A サイトにおいて、リボソームの作用により E F - T u の内在的 G T P a s e 活性が上昇し、E F - T u に結合した G T P が加水分解される。G T P の加水分解後、E F - T u · G D P がアミノアシル t R N A を A サイトに残してリボソームから解離し、次の段階のペプチド鎖転移反応に移行する。以上のような G D P から G T P へのリガンドの交換による E F - T u の活性化のスキームは、上代らによって明らかにされ、G T P 結合タンパク質の機能を理解する基礎となっている<sup>1)</sup> (図 1.1.)。アミノアシル t R N A の A サイトへの正しい結合には E F - T u が必須である。しかし、アミノアシル t R N A の A サイト結合において、E F - T u がどのような役割を果たしているかはあまり知られていない。

E F - T u · G T P はアミノアシル t R N A の C C A 末端に結合し、アミノアシル基を加水分解から保護している。このことは、E F - T u の重要な機能の一つであると考えられている。E F - T u · G T P はフェニルアラニル t R N A のアミノアシル基を C C A 末端のアデノシンの 3' 位の水酸基に結合した状態に保持することが見出されている<sup>2)</sup>。本研究では、アミノアシル化の段階や、E F - T u に結合したアミノアシル t R N A の C C A 末端のアデノシンの 2' 位と 3' 位のどちらの水酸基にアミノ酸が結合しているかについて、さらに詳細な解析を行った。そして、E F - T u がアミノアシル t R N A の C C A 末端に結合することが、ポリペプチド鎖延長サイクルにおいてどのような役割を果たしているのかを検討した (第 2 章)。

アミノアシル t R N A の A サイトへの正しい結合には E F - T u が必要である。したがって、E F - T u がアミノアシル t R N A になんらかの影響を及ぼすことにより、アミノアシル t R N A を正し

くAサイトに結合できるようにしていると考えられる。tRNAは分子種によってコンフォメーションにバラエティがあり、それがアミノアシルtRNA合成酵素によるtRNAの特異的な認識において重要であると考えられている。他方、リボソームにおいては、各tRNAは共通の認識をうけるので、コンフォメーションのバラエティは少ないほうがよいと考えられる。したがって、EF-TuはtRNAのコンフォメーションのバラエティを少なくする役割があるとも考えられる。

EF-Tuの機能の一つは、tRNAのTループとDループとの間の会合を開き、TループのGTΨC配列と16SrRNAの相補的配列と会合を形成することであるといわれている<sup>3)</sup>。この開裂がアミノアシルtRNAがAサイトに結合する前におこるか、後におこるか不明である。

以上の問題を明らかにするためには、EF-Tuと複合体を形成したtRNAのコンフォメーションを調べることが重要であるが、これまでは十分に解析されていなかった。本研究において、EF-Tuとの複合体におけるtRNAのコンフォメーションを解析するのに有用なCDや<sup>13</sup>C NMRを用いてこれらの問題の解明を行った(第3章)。

ナンセンスサプレッションやフレームシフトをおこすEF-Tuの変異も知られており<sup>4,5)</sup>、EF-Tuはタンパク質合成の正確さを保証するという重要な役割を担っている。EF-Tuはリボソームにおいて、コドンとアンチコドンとの対合が正しいかどうかを、GTPの加水分解の前後の2段階におけるブルーフリーディングによって確認していると考えられている<sup>6)</sup>。つまり、加水分解の前後において、アミノアシルtRNAの状態が異なっていて、2段階の「校正」により、コドンとアンチコドンとの対合を二つの異なった角度から確認し、誤りの確率を減らしていると考えられている。加水分解の前後で、アミノアシルtRNAの状態がどのように異なるかはよくわかっていない。そこで、加水分解の前後におけるアミノ

アシル tRNA のコンフォメーションの違いを調べることは重要であると思われる。

GTP の加水分解後の第二段階目の「校正」は、EF-Tu·GDP がリボソームからすぐには解離せず、にしばらくとどまっている間に行われると考えられている<sup>7)</sup>。しかし、EF-Tu·GDP とアミノアシル tRNA の複合体は結合が弱いためにあまり注目されておらず、この「校正」の段階の実態はよくわかっていない。この「校正」の間には、EF-Tu·GDP とアミノアシル tRNA がどのように相互作用しているかを知ることは、「校正」のメカニズムを解明する上で重要である。

抗生物質オーロドックスは、EF-Tu に結合した GTP の加水分解の段階および「校正」の段階の EF-Tu に対するリボソームの効果を模倣すると考えられているので<sup>8)</sup>、これらの段階における EF-Tu の役割を解析するのに有用である。本研究では、オーロドックスを用い、GTP の加水分解の段階や「校正」段階における EF-Tu とアミノアシル tRNA の相互作用を、tRNA のコンフォメーションや EF-Tu とアミノアシル tRNA の 3' 末端との結合に注目して解析した（第 4 章）。

最近、EF-Tu と 23S rRNA の毒素ドメインと呼ばれる部分との相互作用が示唆され<sup>9)</sup>、リボソームの EF-Tu に対する作用と、rRNA の関係が注目されている。本研究では、EF-Tu と毒素ドメイン部分の合成 RNA との直接の結合を、クロスリンクの手法を用いて解析し、毒素ドメインと EF-Tu の相互作用の意義を検討した（第 5 章）。



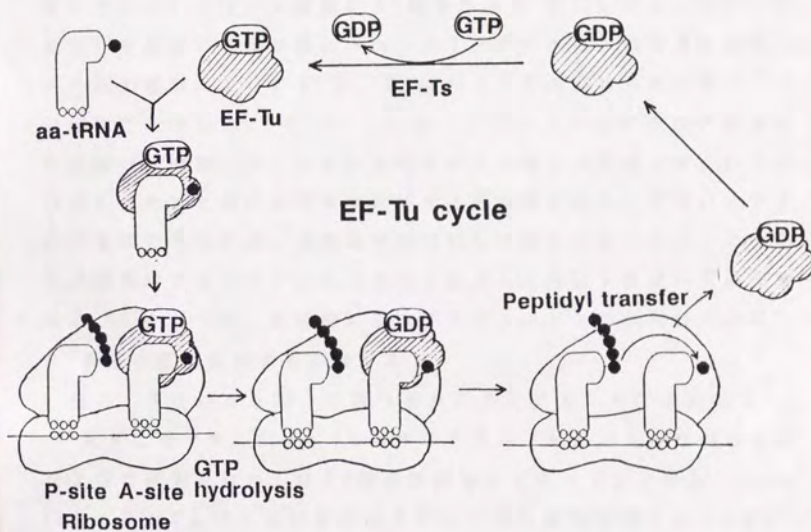


図1.1. アミノアシルtRNA結合サイクル

## 第2章 E F-TuとアミノアシルtRNAとの相互作用

### ～アミノアシルtRNAの2', 3'異性体の解析

#### 2. 1. 序

アミノアシルtRNAには、アミノアシル基がCCA末端のアデノシン残基の2'位に結合した2'異性体と、3'位に結合した3'異性体が存在し、転移反応によって相互に変換する(図2.1.)、アミノアシル化はアミノアシルtRNA合成酵素(ARS)によって行われる。ARSが2'位と3'位のどちらの水酸基をアミノアシル化するかについては、水酸基が2'位または3'位にしかないアナログを用いて基質レベルで検討され、アミノアシル化される水酸基は、ARSの種類によって2'位、3'位のどちらの場合も存在することが報告されている<sup>10, 11, 12</sup>。しかし、このようなアナログを用いた実験では最初にアミノアシル化された部位しか決定できないため合成されたあと別の異性体に転移する可能性がある。さらに、アナログを用いた場合は、水酸基が片方にしかないことにより、どちらの水酸基がアミノアシル化されるかを正しく決定できない可能性がある。したがって、最終的に生成するアミノアシルtRNAの2', 3'異性を直接決定する必要がある。

他方、アナログを用いて調べられたアミノアシル化部位の2', 3'異性にに基づき、class Iに属するARS(KMSKS配列およびHIGH配列を持つ)は2'位の水酸基をアミノアシル化し、class IIのARS(KMSKS配列およびHIGH配列を持たない)は3'位の水酸基をアミノアシル化することが示唆されている<sup>13</sup>(表2.1.)。しかし、PheRSはclass IIに属するが2'位の水酸基をアミノアシル化し、例外とされていた。この場合、アナログを用いたために、アミノアシル化部位の異性が正しく決定されていない可能性があり、最終的に生成するアミノアシルtRNAの2', 3'異性を直接決定することが配列と特異性の関係を決定的につけるうえで重要である。本研究では、PheとIleについて、最終的に生成し

たアミノアシル tRNA の 2', 3' 異性を決定することに初めて成功した。

2' 異性体と 3' 異性体の転移速度は 37°C において 0.1 ~ 1 / 秒であり、同じ条件下でのタンパク質合成速度 (22 アミノ酸 / 秒) と比べて遅いことが見いだされている<sup>14, 15)</sup>。一方、リボソームのペプチジルトランスフェラーゼは、3' 異性体を基質とする<sup>10, 18, 17)</sup>。したがって、リボソームの A サイトに 2' 異性体が結合するとポリペプチド鎖延長サイクルに不都合を生じると考えられ、なんらかの因子が 3' 異性体をペプチジルトランスフェラーゼの基質として供給すると思われる。EF-Tu がアミノアシル tRNA の 3' 異性体と結合して A サイトへ結合させるという可能性が考えられ、実際に EF-Tu に結合した Phe-tRNA の 2', 3' 異性の分析により、EF-Tu に結合しているのは 3' 異性体であることが見出されている<sup>2)</sup>。本研究では、EF-Tu に結合した Ile-tRNA の 2', 3' 異性を決定し、アミノアシル tRNA の種類にかかわらず、EF-Tu がアミノアシル tRNA の 3' 異性体をペプチジルトランスフェラーゼの基質として供給する機能をもつことを明らかにした。

## 2. 2. 材料と方法

### 2.2.1. 材料

EF-Tu·GDP は、*Thermus thermophilus* HB8 の粗抽出液より、DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Tyoppearl, Butyl-Toyoppearl のカラムクロマトグラフィーにより精製した。さらに、EF-Tu·EF-Ts 複合体はゲルろ過 HPLC カラム G-3000SW を用いて、EF-Tu·GDP と分離精製した。

tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> は、*E. coli* A19 より Zubay の方法<sup>19)</sup>を用いて得た未分画 tRNA から、DEAE-Sephadex A-50 (pH 7.5), DEAE-Sephadex A-50 (pH 4.0), BD-Sellulose カラムクロマトグラフィーを用いて文献<sup>19, 20)</sup>に従って精製した。



I l e R S , P h e R S は , i l e S 遺伝子または p h e S 遺伝子をクローニングしたランナウェイプラスミドを持つ大腸菌より , DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーおよび Mono-Q , Phenyl-Superlose による F P L C カラムクロマトグラフィーを用いて文献<sup>21, 22</sup>) に従って精製した .

#### 2.2.2. [<sup>3</sup>H]Ile-tRNA の調製

アミノアシル化反応は , 100 m M Tris-HCl ( p H 7.5 ) , 17 μ M t R N A <sup>I<sup>16</sup></sup> , 100 μ M [<sup>3</sup>H]Ile ( 3.86 Ci / μ mol ) , 2 m M A T P , 10 m M K C l , 10 m M Mg ( O A c ) <sub>2</sub> , 1.5 μ M E. coli I l e R S を含む溶液 200 μ l を 37 ° C , 10 分間インキュベートすることにより行った . 続いてフェノール抽出をおこない , 水層を 20 m M Mg ( O A c ) <sub>2</sub> 溶液 ( p H 5 ) 1 l に対して透析し , エタノール沈殿により回収した .

#### 2.2.3. [<sup>3</sup>H]Phe-tRNA の調製

アミノアシル化反応は , 100 m M Tris-HCl ( p H 7.5 ) , 17 μ M t R N A <sup>P<sup>16</sup></sup> , 100 μ M [<sup>3</sup>H]Phe ( 4 Ci / μ mol ) , 2 m M A T P , 10 m M K C l , 10 m M Mg ( O A c ) <sub>2</sub> , 0.7 μ M E. coli P h e R S を含む溶液 200 μ l について , 2.2.2. 項と同様に行った .

#### 2.2.4. [<sup>3</sup>H]Ile-tRNA からの Ac [<sup>3</sup>H]Ile-Ado の調製 ( p H 7 )

50 m M Mops-KOH ( p H 7.0 , 0 ° C ) , 12 p m o l の [<sup>3</sup>H]Ile-tRNA を含む溶液 30 μ l を 0 ° C に保持したのち , 2 M 酢酸カリウム緩衝液 ( p H 7.0 ) 15 μ l , 無水酢酸 30 μ l を加えて混合した . 混合液に 2 m g / m l R N a s e A 溶液 50 μ l を加え , 10 分間 0 ° C に放置したのち , 8.5 M 酢酸溶液 30 μ l を加えて R N a s e 反応を停止した . 切断産物である Ac [<sup>3</sup>H]Ile-Ado は , 酢酸エチル 150 μ l を加えて抽出した . 酢酸エチル層を遠心によって回収し , アスピレーターによって乾燥した . Ac [<sup>3</sup>H]Ile-Ado の収率は約 70 % であった .

#### 2.2.5. [ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNA, [ $^3\text{H}$ ]Phe-tRNAからのAc[ $^3\text{H}$ ]Ile-Ado, Ac[ $^3\text{H}$ ]Phe-Adoの調製 (pH 7.5)

100 mM Tris-HCl (pH 7.5, 0 °C), 10 mM Mg(OAc) $_2$ , 1.2 pmolの[ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNAまたは, [ $^3\text{H}$ ]Phe-tRNAを含む溶液30  $\mu\text{l}$ について, 2.2.4.項と同様な操作を行った.

#### 2.2.6. EF-Tuと[ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNAとの複合体の形成

EF-Tu-GTP-[ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNAの形成は, 50 mM Mops-KOH (pH 7.0, 0 °C), 150 mM NH $_4$ Cl, 10 mM Mg(OAc) $_2$ , 75  $\mu\text{M}$  GTP, 0.9 mM ホスホエノールビルビン酸, 0.6  $\mu\text{M}$  ビルビン酸キナーゼ, 4  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNA, 40  $\mu\text{M}$  EF-Tu-GDP, 1.7  $\mu\text{M}$  EF-Tu-EF-Tsを含む反応液 20  $\mu\text{l}$ 中で行った. 反応液を37 °Cで6分間インキュベートしたのち0 °Cに保持した. EF-Tu-GDP-[ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNAの形成は, 50 mM Mops-KOH (pH 7.0, 0 °C), 150 mM NH $_4$ Cl, 10 mM Mg(OAc) $_2$ , 4  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNA, 40  $\mu\text{M}$  EF-Tu-GDP, を含む反応液中 20  $\mu\text{l}$ 中で同様に行った.

#### 2.2.7. EF-Tuと[ $^3\text{H}$ ]Ile-tRNAとの複合体からのAc[ $^3\text{H}$ ]Ile-Adoの調製

上記の反応液に, 2 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 7  $\mu\text{l}$ , 無水酢酸 21  $\mu\text{l}$ , 88%フェノール 28  $\mu\text{l}$ を加えて1分間激しく混合した. 遠心により水層を回収し, 水層のうち1/3に 2 mg/ml RNase A 溶液 100  $\mu\text{l}$ を加え, 10分間 0 °Cに放置したのち, 8.5 M 酢酸溶液 100  $\mu\text{l}$ を加えてRNase反応を停止した. 切断産物であるAc[ $^3\text{H}$ ]Ile-Adoは, 酢酸エチル 300  $\mu\text{l}$ を加えて抽出した. 酢酸エチル層を遠心によって回収し, アスピレーターによって乾燥した. Ac[ $^3\text{H}$ ]Ile-Adoの収率は約50~70%であった.

#### 2.2.8. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNAからのAc[ $^3\text{H}$ ]Ile-Adoの調製

アミノアシル化反応は、100 mM Tris-HCl (pH 7.5, 0 °C), 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 10 μM tRNA<sup>Ile</sup>, 100 μM [<sup>3</sup>H]Ile (4.36 Ci/mmol), 2 mM ATP, 10 mM KCl, 1 μM *E. coli* Ile-RSを含む溶液 20 μlを、ATPを加えることによって反応を開始し、0 °C, 5秒間および10秒間インキュベートすることにより行った。2 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 7 μl, 無水酢酸 21 μlを加えて混合したのち、エタノール沈殿を行った。沈殿を乾燥し、0.5 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、2 mg/ml RNase A 溶液 100 μlを加え、10分間 0 °Cに放置したのち、8.5 M 酢酸溶液 100 μlを加えてRNase反応を停止した。切断産物であるAc[<sup>3</sup>H]Ile-Adoは、酢酸エチル 300 μlを加えて抽出した。酢酸エチル層を遠心によって回収し、アスピレーターによって乾燥した。Ac[<sup>3</sup>H]Ile-Adoの収率はほぼ 50%であった。さらに、100 mM Tris-HCl (pH 7.5, 0 °C), 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 μM tRNA<sup>Ile</sup>, 10 μM [<sup>3</sup>H]Ile (32 Ci/mmol), 2 mM ATP, 10 mM KCl, 0.1 μM *E. coli* Ile-RSを含む溶液 20 μlについて同様に反応をおこない、エタノール沈殿のかわりに、0.5 M 酢酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析したのち、RNase反応を行う方法についても試みた。

#### 2.2.9. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNA からのAc[<sup>3</sup>H]Phe-Adoの調製

アミノアシル化反応は、100 mM Tris-HCl (pH 7.5, 0 °C), 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 μM tRNA<sup>Phe</sup>, 10 μM [<sup>3</sup>H]Phe (35 Ci/mmol), 2 mM ATP, 10 mM KCl, 0.1 μM *E. coli* Phe-RSを含む溶液 20 μlについて2.2.7.項と同様に行った。Ac[<sup>3</sup>H]Phe-Adoの収率はほぼ50%であった。

#### 2.2.10. HPLCによる分析

酢酸エチル抽出し、乾燥したAc[<sup>3</sup>H]Ile-Ado, Ac[<sup>3</sup>H]Phe-Adoを、



40%メタノールを含む 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.5) 10  $\mu$ l に溶解し, 島津 SHIM-PACK PC18カラム (ODS, 0.46  $\times$  5 cm) を用いた島津 LC-6A HPLCシステムにより分析した. 溶出は40%メタノールを含む 5 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.5)により, 流速 0.2 ml/minで, アイソクラティックに行った. 溶出液を0.1mlずつ分取し, Beckman Ready Cap<sup>TM</sup>にのせて乾燥し液体シンチレーションカウンタにより放射活性を測定した.

## 2. 3. 結果

### 2.3.1. pH 7.5におけるIle-tRNAの2', 3'異性体の比率

アミノアシルtRNAのアミノアシル基をアセチル化すると, アミノアシル基の2'位, 3'位間の転移速度が非常におそくなる. また, アミノアシルアデノシン残基のアミノアシル基がアセチル化されている場合も, アミノアシル基の2'位, 3'位間の転移速度が非常におそくなる. したがって, アミノアシルtRNAをアセチル化したのち, 0°CにおけるRNaseによる切断によって得られたアミノアシルアデノシンの2', 3'異性体の比率を分析することによって, もとのアミノアシルtRNAの2', 3'異性体の比率を決定することができる<sup>2)</sup>. アミノアシルアデノシンの2', 3'異性体の比率の決定にはHPLCを用いた分析法が開発されている<sup>3)</sup>. 図2. 2.Cに0°C, pH 7において, 2', 3'異性体の比率が平衡値に達した<sup>3</sup>H]Ile-tRNAから調製したAc[<sup>3</sup>H]Ile-AdoのHPLCによる分析を示した. 溶出時間12分に2'異性体のピーク, 19分に3'異性体のピークがみられ, 化学合成されたAcIle-Adoの溶出パターンと一致した. この結果から, 2', 3'異性体の比率は, 0°C, pH 7.5において, 0.19:0.81であることが決定された. なお, 7分にみられるピークはAc[<sup>3</sup>H]Ileのものである.

### 2.3.2. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシルtRNAから調製したAc[<sup>3</sup>H]Ile-Adoの分析

アミノアシル基の2'位, 3'位間の転移速度はかなり速いので, アミノアシル化反応における2', 3'異性を決定するためには, 転移速度をおさえるためにアミノアシル化反応を低温で行い, アミノアシル化反応の開始後, 転移速度に比べてすみやかにアセチル化を行うことが必要である. そこで, 0°C, pH 7.5において, 5秒間および10秒間アミノアシル化反応を行った後, アセチル化した. 未反応のアセチル化された $[^3\text{H}]\text{Ile}$ を除くために, エタノール沈殿をおこなった場合の結果を図2.2.A,Bに示す. 5秒間および10秒間で反応を停止した場合の2', 3'異性体の比率はそれぞれ, 0.32:0.68および0.27:0.73であった. また, 5秒間アミノアシル化反応を行い未反応のアセチル化された $[^3\text{H}]\text{Ile}$ を除くために, 透析をおこなった場合の結果を図2.3.に示した. その結果, 2', 3'異性体の比率は0.69:0.31であった. この場合, 透析が完全ではなく, かなりの量の $\text{Ac}[^3\text{H}]\text{Ile}$ が混入しており, 現在方法の改良を試みている.

#### 2.3.3. アミノアシル化反応によって生じたアミノアシル tRNA から調製したの $\text{Ac}[^3\text{H}]\text{Phe-Ado}$ の分析

まず, 0°C, pH 7.5における $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ の2', 3'異性体の比率の平衡値を解析した(図2.4.C). その結果, 2', 3'異性体の比率は, 0.20:0.80であった. 次に, 0°C, pH 7.5において, 5秒間および10秒間アミノアシル化反応を行なった場合の結果を, 図2.4.A,Bに示す. 5秒間および10秒間で反応を停止した場合の2', 3'異性体の比率はそれぞれ, 0.14:0.86および0.16:0.84であった.

#### 2.3.4. $\text{EF-Tu}$ と $[^3\text{H}]\text{Ile-tRNA}$ との複合体から調製した $\text{Ac}[^3\text{H}]\text{Ile-Ado}$ の分析

$\text{EF-Tu}$ に結合した $[^3\text{H}]\text{Ile-tRNA}$ の2', 3'異性体の比率を2.3.1.項と同様に決定した. まず, 0°C, pH 7.5における2', 3'異性体の比率が平衡値に達した $[^3\text{H}]\text{Ile-tRNA}$ から調製した $\text{Ac}[^3\text{H}]\text{Ile-Ado}$ のHPLCによる分析を行った(図2.5.A). その結果,



2', 3'異性体の比率は, 0.19:0.81であった. 次に, EF-TuはアミノアシルtRNAのCCA末端と強く結合するため, 複合体を形成したままではRNaseによって切断することができない. そこでフェノール抽出によってEF-Tuを取り除いてからRNase反応をおこなった. EF-Tu·GTP·[<sup>3</sup>H]Ile-tRNAから得られたAc[<sup>3</sup>H]Ile-AdoのHPLCによる分析を図2.5.Bに, EF-Tu·GDP·[<sup>3</sup>H]Ile-tRNAから得られたAc[<sup>3</sup>H]Ile-AdoのHPLCによる分析を図2.5.Cに示した. 2', 3'異性体の比率は, EF-Tu·GTP·[<sup>3</sup>H]Ile-tRNAの場合は0.04:0.96であり, EF-Tu·GDP·[<sup>3</sup>H]Ile-tRNAの場合は0.18:0.72であると決定された.

#### 2. 4. 考察

IleRSによるアミノアシル化の場合, 5秒間の反応では2', 3'異性体の比率は0.32:0.68であり, 10秒間の反応では0.27:0.73であることが明らかとなった. 平衡値は0.19:0.81であるから, 2'位の側から平衡値に近づいている. IleRSについて, 未反応のアセチル化された[<sup>3</sup>H]Ileを除くために透析をおこなった場合は, エタノール沈殿を行った場合よりもさらに2'の比率が高くなっている. したがって, 最初に2'位にアミノアシル化されると結論された. エタノール沈殿を行った場合には, 2'位, 3'位間の転移がかなり生じてしまった可能性があり, 解析方法の改良が必要であると思われる. 反対に, PheRSによるアミノアシル化の場合, 5秒間の反応では2', 3'異性体の比率は0.14:0.86であり, 10秒間の反応では0.16:0.84であることが明らかとなった. 平衡値は0.20:0.80であるから, 3'側から平衡値に近づいている. したがって, 最初に3'位にアミノアシル化されると結論された. 以上の結果から, PheRSによって生成するアミノアシルtRNAは3'異性体であり, IleRSによって生成するアミノアシルtRNAは2'異性体であることが明らかとなった. したがって, ARSによって供給されるアミノアシルtRNAには2'異性体も, 3'異性体も存



在することが明らかとなった。アナログを用いた解析では、PheRSは2'位の水酸基をアミノアシル化するとされていたが<sup>10)</sup>、本研究により、3'位の水酸基をアミノアシル化することが判明した。PheRSの場合、アナログを用いた2', 3'異性の解析と最終的に生成したアミノアシルtRNAの分析による2', 3'異性の解析の結果が異なるのは、本来存在すべき水酸基が他のものと置換しているため、アデノシンの基質ポケットへの結合が変化しているからなどの理由が考えられる。天然のtRNAとは構造が異なるために、このようなアナログを用いた方法では、2', 3'異性を正しく決定できない場合があることが明らかとなった。アナログを用いた実験では最初にアミノアシル化された部位しか決定できないため合成されたあとARSがアミノアシルtRNAから離れる前に2'位、3'位間の転移が生じて、生成したアミノアシルtRNAではすでに平衡値になっている可能性があった。本研究において、最終的に生成したアミノアシルtRNAの2', 3'異性を決定することに初めて成功し、実際に生成したアミノアシルtRNAにおいても2', 3'異性が保持されていることが示された。

本研究により、PheRSの場合もクラス分けとアミノアシル化部位の異性が一致することが明らかとなった。したがって、ARSが進化的に2系統あることがより明確に示された。GlnRS, TrpRSの場合も配列に基づく分類とアミノアシル化部位の異性がくいちがい<sup>13)</sup>、TyrRS, AspRSでは2'位、3'位の両方においてアミノアシル化される報告されており<sup>10, 11, 12)</sup>、これらの場合もアナログを用いたために誤った結果となった可能性がある。これらについても最終的に生成したアミノアシル化部位の2', 3'異性を決定することが、これらのARSの構造と進化的起源との関係を明らかにするうえで重要であると考えられる。

次に、本研究によって、2'異性体として生成するIle-tRNAが、EF-Tu-GTPに結合しているのは3'異性体であることが明らかとなった。3'異性体として生成するPhe-tRNAの場合は、3'異性体がEF-

Tu·GTPに結合していることが明らかにされている<sup>2)</sup>。したがって、2', 3'のどちらの異性体として生成するアミノアシルtRNAもEF-Tu·GTPに結合しているのは3'異性体であることが明らかとなった。EF-Tu·GDPはアミノアシルtRNAと結合できるが(3.3.1.項参照)、脱アミノアシル化を抑制できない(4.3.2.項参照)。本研究において、EF-Tu·GDPに結合しているIle-tRNAの2', 3'異性体の比率はほとんど平衡値に近くなり、EF-Tu·GTPがアミノアシルtRNAの脱アミノアシル化を押さえるとともに、アミノアシル基を3'位に固定していることが明らかとなった。以上の結果から、EF-TuがアミノアシルtRNAの3'異性体をペプチジルトランスフェラーゼの基質として供給することによって、タンパク質合成を効率よく行うという重要な機能を持つということが、本研究によって明らかとなった。

	Class I synthetases HIGH + KMSKS	Class II synthetases
2'-OH	Glu Arg Val Ile Leu Met (Gln)	Phe
3'-OH		Gly Ala Pro Ser Thr Asn His Lys
2'-OH and 3'-OH	Tyr Trp	Asp

(Eriani *et al.*, 1990)

表2.1. A R S のモチーフによる分類とアミノアシル化の 2', 3' 異性との対応<sup>13)</sup>



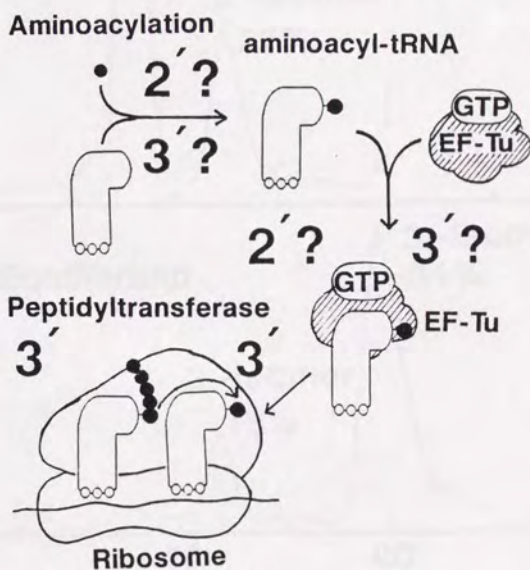
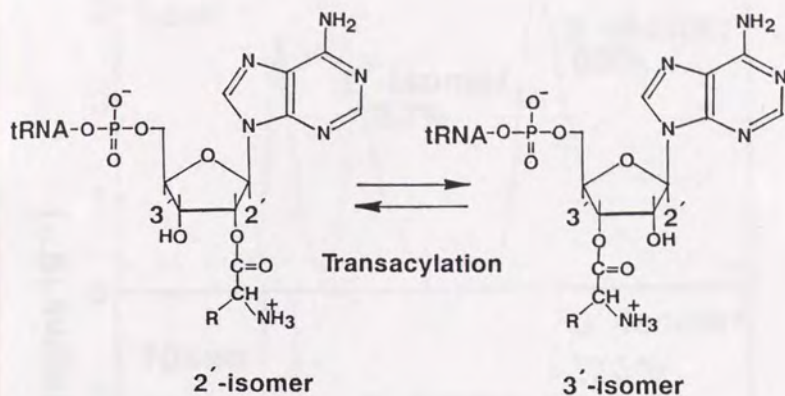


図2.1. アミノアシルtRNAの2'異性体と3'異性体

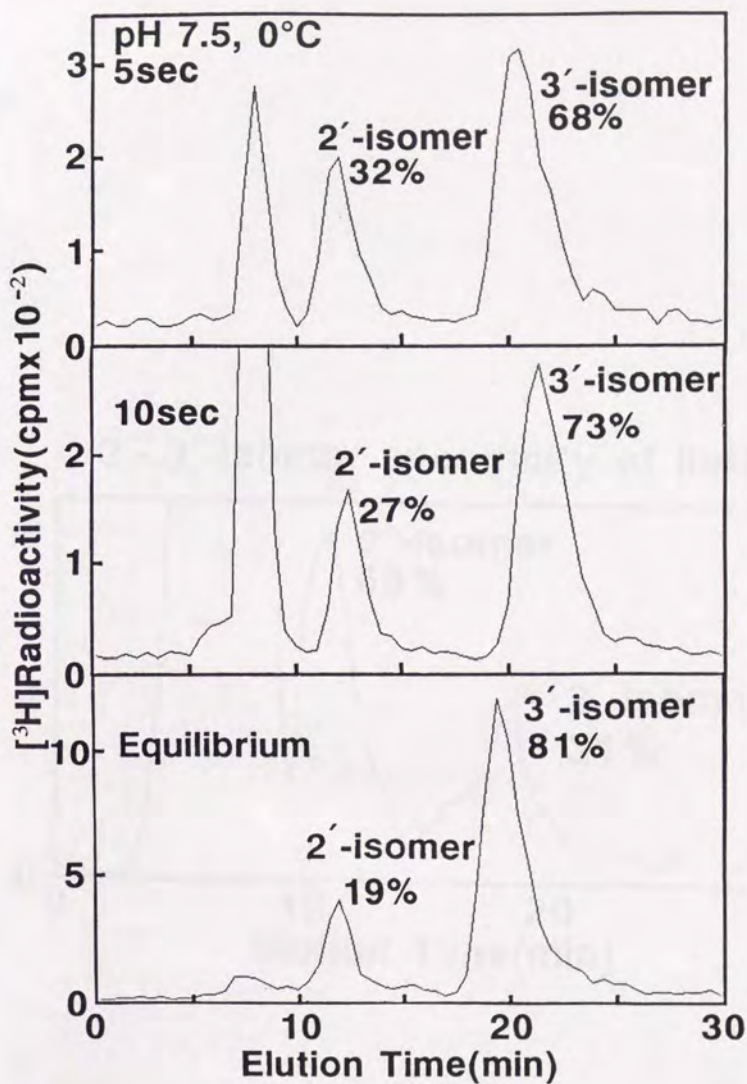


図2.2. IleRSのアミノアシル化の2', 3'異性の解析

- A. 反応を5分間行ったもの
- B. 反応を10分間行ったもの
- C. pH 7.5, 0°Cにおける平衡値

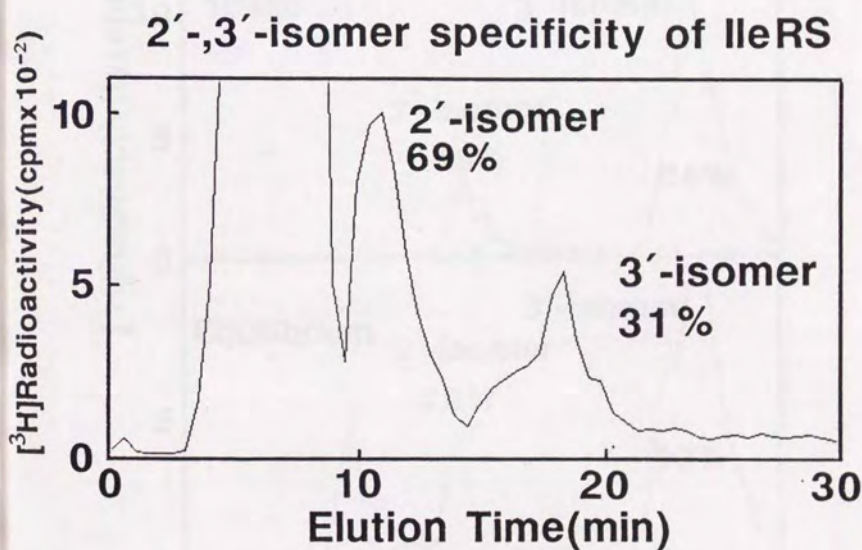


図2.3. IleRSのアミノアシル化の2', 3'異性の解析  
(未反応のAc[ $^3$ H]Ileを除くために透析をおこなった場合)



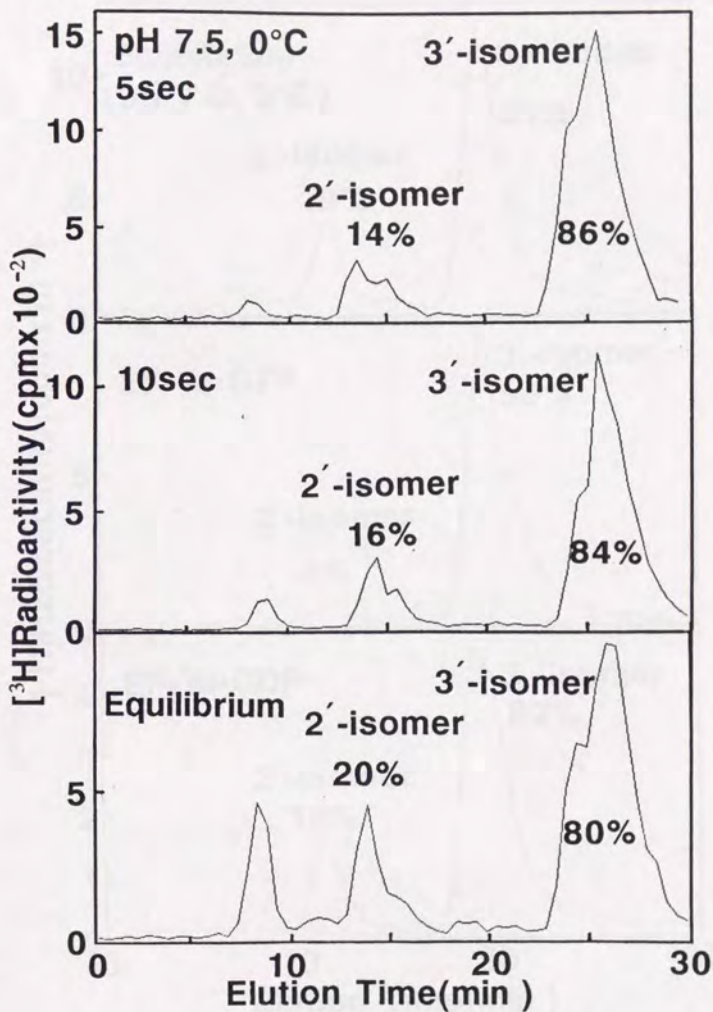


図2.4. PheRSのアミノアシル化の2', 3'異性の解析  
 A. 反応を5分間行ったもの  
 B. 反応を10分間行ったもの  
 C. pH 7.5, 0°Cにおける平衡値

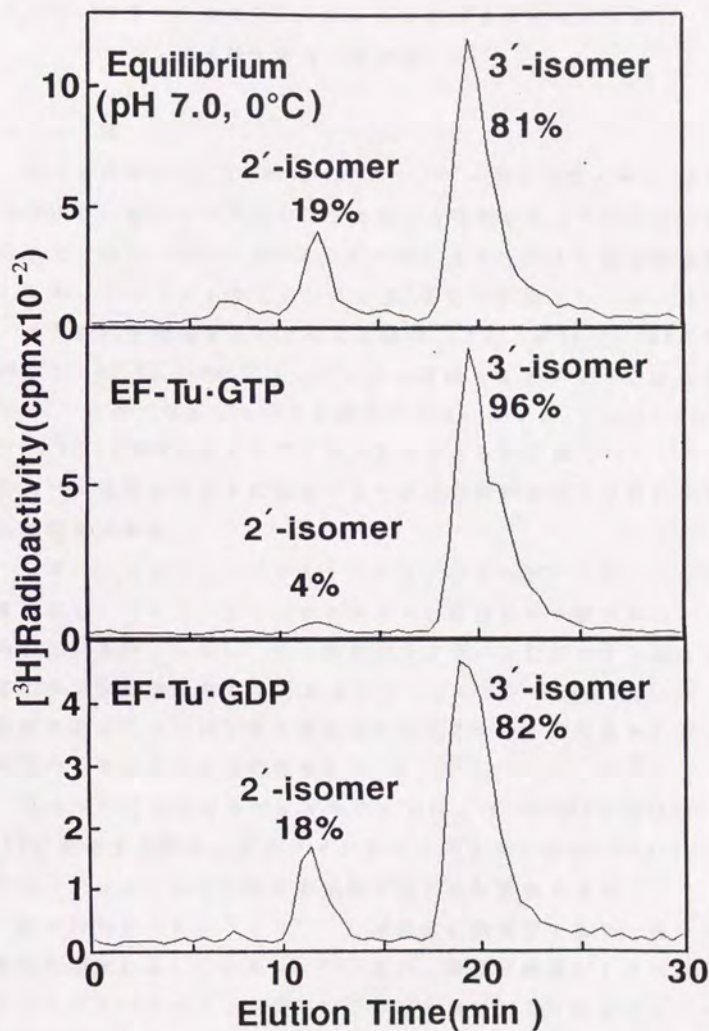


図2.5. EF-Tuに結合したIle-tRNAの2', 3'異性の解析  
 A. pH 7.0, 0°Cにおける平衡値  
 B. EF-Tu·GTPの場合  
 C. EF-Tu·GDPの場合

### 第3章 EF-TuとアミノアシルtRNAとの相互作用 ～コンフォメーションの解析

#### 3. 1. 序

第2章において、EF-Tu·GTPはアミノアシルtRNAを3'異性体に固定し、脱アミノアシル化を抑制する役割を担っていることが示された。他方、EF-Tu·GDPはアミノアシルtRNAと複合体を形成しても、アミノアシルtRNAを3'異性体に固定できず、脱アミノアシル化を抑制することもできない。これらのEF-Tu·GDPの持つ特徴と、EF-Tu·GDPがアミノアシルtRNAをAサイトに結合できない<sup>23)</sup>ことが対応している可能性がある。そこで、この他にEF-Tu·GTPとEF-Tu·GDPとのあいだに差があるかどうかを調べ、アミノアシルtRNAをAサイトに結合するためには何が必要かを解析することは重要である。

EF-TuはアミノアシルtRNAのTループとDループの会合を開裂し、リボソームの16S rRNAに結合させる働きがあるといわれている<sup>24)</sup>。しかし、この開裂がリボソームに結合する前におこるのか、結合後におこるのかはわかっていない。EF-Tu·GTPはこの開裂をおこすことができるためにアミノアシルtRNAをAサイトに結合できるという可能性もある。

これらのことを明らかにするためには、EF-Tu·GTPまたはEF-Tu·GDPに結合する際の、アミノアシルtRNAまたはuncharged tRNAのコンフォメーション変化を比較することが重要である。

高度好熱菌のEF-Tu<sup>24-26)</sup>は非常に熱安定であり、種々の物理学的測定に適している<sup>27-29)</sup>。また、高度好熱菌のtRNAが持つ2-チオオリボチミジン残基のCDバンドは、tRNAとタンパク質との相互作用を解析するのに有用である<sup>30-34)</sup>。また、大腸菌のtRNAにも5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン(mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U)残基や、4-チオウリジン(s<sup>4</sup>U)残基など有用な修飾ヌクレオシドが存在する。本研究では、EF-Tu·GTPとEF-Tu·GDPで、EF-



Tuに結合したtRNAのコンフォメーションがどう異なるかを高度好熱菌および大腸菌のtRNAと高度好熱菌のEF-Tuとの複合体のCDスペクトルを観測することにより解析した。さらに、EF-Tuに結合したtRNAのコンフォメーションを、修飾ヌクレオシドを $^{13}\text{C}$ でラベルしたtRNAを用いて、 $^{13}\text{C}$  NMRを用いて解析を行った。

さらに、TPCKによる化学修飾をうけたEF-TuとアミノアシルtRNAとの相互作用をCDなどを用いて調べ、tRNAのコンフォメーションと複合体の親和性との関係を解析した。

### 3. 2. 材料と方法

#### 3.2.1. 材料

高度好熱菌のEF-Tu, および大腸菌のtRNA $^{\text{I}^{\text{10}}}$ の精製は2.2.1.項に従って行った。大腸菌のtRNA $^{\text{Y}^{\text{a1}}}$ はDEAE-Sephadex A-50(pH 7.5), BD-Sellulose カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。大腸菌のtRNA $^{\text{Z}^{\text{1u}}}$ はDEAE-Sephadex A-50(pH 7.5), DEAE-Sephadex A-50(pH 4.0)カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。 $^{13}\text{C}$ tRNA $^{\text{I}^{\text{10}}}$ は、メチオニン要求性の大腸菌を、 $2 \times 10^{-3}\%$ の[メチル- $^{13}\text{C}$ ]メチオニンと0.2%のグルコースを含むM9培地で培養した菌体より、2.2.1.項に従って精製した。trans-diaminedichloroplatinum(II)はシグマ社より購入した。

#### 3.2.2. tRNAのアミノアシル化

高度好熱菌および大腸菌のtRNA $^{\text{I}^{\text{10}}}$ ,  $^{13}\text{C}$ tRNA $^{\text{I}^{\text{10}}}$ のアミノアシル化は、100 mM Tris-HCl (pH 7.5),  $17 \mu\text{M}$  tRNA $^{\text{I}^{\text{10}}}$ ,  $100 \mu\text{M}$  Ile, 2 mM ATP, 10 mM KCl, 10 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ,  $1.5 \mu\text{M}$  E.coli IleRSを含む溶液1 mlについて2.2.2.項と同様に行った。tRNA $^{\text{Y}^{\text{a1}}}$ , tRNA $^{\text{Z}^{\text{1u}}}$ のアミノアシル化は、大腸菌S100分画 $^{200}$ を用いて同様に行った。

### 3.2.3. EF-Tu と tRNA の複合体のクロスリンキングとゲルシフト法による検出

EF-Tu と tRNA が, CD および NMR 測定における濃度で十分複合体を形成していることを, クロスリンキングとゲルシフト法により確認した. *E. coli* tRNA<sup>Ile</sup> の [5'-<sup>32</sup>P] 標識は, すでに報告されている方法により行った<sup>35)</sup>. クロスリンキングは, CD 測定と同じ濃度の Ile-[5'-<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Ile</sup> または uncharged [5'-<sup>32</sup>P]tRNA<sup>Ile</sup> と EF-Tu·GTP または EF-Tu·GDP を, 0.7 mM *trans*-diamine-dichloroplatinum(II) (*trans*-DDP) とともにインキュベートして行い<sup>36)</sup>, 7.5% ポリアクリルアミド電気泳動とオートラジオグラフィによってクロスリンクされた複合体を検出した.

### 3.2.4. EF-Tu と tRNA との複合体の <sup>13</sup>C NMR スペクトルの測定

EF-Tu と tRNA の NMR スペクトルの測定は, ブルカー AM400 型核磁気共鳴装置を使用して行った. 測定は, 20 mM Tris<sub>411</sub>-DCl (pH 7.2, 25°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl を含む重水溶液に, 500 μM Ile-[<sup>13</sup>C]tRNA<sup>Ile</sup> と 500 μM EF-Tu もしくは tRNA または EF-Tu の一方のみを加えて行った. EF-Tu·GTP についての測定の場合は, EF-Tu·GDP を EF-Tu·GTP に変換するために, 120 μM GTP, 1.2 mM ホスホエノールビルビン酸, 0.6 μM ビルビン酸キナーゼ, 0.75 μM EF-Tu·EF-Ts の共存下で測定を行った.

### 3.2.5. CD スペクトルの測定

EF-Tu と tRNA の CD スペクトルの測定は, 日本分光 J-500 型円偏光二色計を使用し, 290~340 nm の範囲で行った. 測定は, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5, 30°C), 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 5 mM β-メルカプトエタノールを含む溶液に, 33 μM tRNA と 50 μM EF-Tu, もしくは tRNA または EF-Tu の

一方のみを加えて行った。EF-Tu·GTPについての測定の場合は、EF-Tu·GDPをEF-Tu·GTPに変換するために、 $60\mu\text{M}$  GTP,  $0.8\text{mM}$  ホスホエノールビルビン酸,  $0.6\mu\text{M}$  ビルビン酸キナーゼ,  $0.75\mu\text{M}$  EF-Tu·EF-Tsの共存下で測定を行った。

### 3.2.6. EF-TuのTPCKによる化学修飾

$20\text{mM}$  Tris-HCl (pH 8.1),  $100\text{mM}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $50\mu\text{M}$  EF-Tu,  $500\mu\text{M}$  TPCK を含む溶液で,  $4^\circ\text{C}$ , 12時間反応を行った<sup>37)</sup>,  $\beta$ -メルカプトエタノールを最終濃度  $10\text{mM}$  になるように加えて, 反応を停止し, 逆浸透膜によるろ過を用いてTPCKを除去した。TPCKによる化学修飾の割合は, 残存するシステイン残基を定量することにより解析した<sup>38)</sup>。その結果, 全体の約60%が修飾を受けていた。

TPCK処理したEF-Tuの脱アミノアシル化の抑制の測定は4.2.3.項に従って行った。TPCK処理したEF-Tu·GTPとIle-tRNAとの複合体とのCDスペクトルを測定は, EF-TuとIle-tRNAとは等モル量とし, 3.2.5.項と同様に行った。

TPCK処理したEF-TuによるアミノアシルtRNAのAサイト結合活性の測定は, 4.2.2.項に従って行った。

### 3.2.7. RNaseによるアミノアシルtRNAの切断のEF-Tuによる保護

$28\mu\text{M}$  *E. coli* Ile-tRNA,  $28\mu\text{M}$  EF-Tu·GDP,  $50\mu\text{M}$  GTP,  $0.8\text{mM}$  ホスホエノールビルビン酸,  $1.2\mu\text{M}$  ビルビン酸キナーゼ,  $0.8\mu\text{M}$  EF-Tu·EF-Tsを含むTMMN緩衝液  $10\mu\text{l}$  を $37^\circ\text{C}$ , 5分間インキュベートしたのち氷冷する。  $0.1\text{mg/ml}$  RNase A  $1\mu\text{l}$  を加え, 0, 15, 60秒後に  $4\mu\text{l}$  を採取し,  $120\mu\text{l}$  の氷冷した5% TCAを加えて反応を停止する。Whatman 3MM ろ紙につけ, 氷冷した5% TCAで3回, エタノールで2回洗浄して乾燥し, トルエンシンチレーター中で液体シンチレーションカウンタを用いて放射



活性を測定した<sup>39)</sup>。

### 3. 3. 結果

#### 3.3.1. EF-Tu と tRNA との複合体の形成のクロスリンクによる分析

EF-Tu-GTP と Ile-tRNA との組合せでは、tRNA のバンドより泳動度の小さいバンドが観測された (図3.1., レーン2)。このバンドは、EF-Tu の濃度の上昇に比例して濃くなるため (data not shown), クロスリンクされた複合体のバンドであると同定された。同様に、EF-Tu-GDP と Ile-tRNA (レーン3), EF-Tu-GTP と uncharged tRNA (レーン4), EF-Tu-GDP と uncharged tRNA (レーン5) の場合も、クロスリンクされた複合体に由来する泳動度の小さいバンドが観測された。一方、tRNA と牛血清アルブミンとの組合せや (レーン6), tRNA 単独では (レーン1), クロスリンクは観測されなかった。

#### 3.3.2. EF-Tu-GTP と大腸菌 Ile- $^{13}\text{C}$ tRNA $^{\text{Ile}}$ との複合体の $^{13}\text{C}$ NMR スペクトル

大腸菌 tRNA $^{\text{Ile}}$  の修飾ヌクレオシドのうち、メチオニンから合成される S-アデノシルメチオニンをメチル基の供与体としてメチル化されるリボチミジン (T) と 7-メチルグアノシン ( $m^7\text{G}$ ) のメチル基が $^{13}\text{C}$  ラベルされていると思われる。

$^{13}\text{C}$  tRNA $^{\text{Ile}}$  の $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (図3.2.A) において、11.2ppm と 36.7ppm に大きなシグナルが観測された。これらのシグナルは、本研究と同様な方法で $^{13}\text{C}$  でエンリッチし、部分精製された tRNA 分子種の $^{13}\text{C}$  NMR を用いた研究<sup>40)</sup> において同定されたシグナルと化学シフトを比較することにより同定を行った。その結果、11.2ppm のシグナルは T のもので、36.7ppm のシグナルは  $m^7\text{G}$  のものと同定された。

EF-Tu-GTP と Ile- $^{13}\text{C}$  tRNA $^{\text{Ile}}$  との複合体の $^{13}\text{C}$  NMR ス

ベクトル (図3.2.B) において, 11.2ppmの大きなシグナルはTのもので, 36.7ppmの大きなシグナルはm<sup>7</sup>Gのものである. さらに詳しく解析するために, EF-Tu・GTPのみの<sup>13</sup>C NMRスペクトルを測定し, 三重複合体の<sup>13</sup>C NMRスペクトルとの差スペクトルをとった結果, Ile-[<sup>13</sup>C]tRNA<sup>f1\*</sup>のTとm<sup>7</sup>Gのメチル基の化学シフトは, EF-Tu・GTPと複合体を形成しても変化しないことが明らかとなった.

### 3.3.3. *T. thermophilus* tRNA<sup>f1\*</sup>のCDスペクトルの温度変化

様々な温度における高度好熱菌のtRNA<sup>f1\*</sup>のCDスペクトルを測定した. 30°Cから65°Cにおいて, 315 nmに正のCDバンド, 330 nmに負のCDバンドが観測され, 温度を95°Cにあげると315 nmの正のCDバンドは消失し, 330 nmの負のCDバンドの強度は顕著に増大した (図3.3.). これらのCDバンドは, すでに報告されている高度好熱菌のtRNA<sup>21a</sup>とtRNA<sup>22c</sup>のCDスペクトルでは, tRNAのTループとDループとの会合部分に存在する54番目の2-チオリボチミジン残基(s<sup>2</sup>T)に帰属されている (図3.4.)<sup>20, 33</sup>. 315nmの正のCDバンドは, tRNAが本来の高次構造をとっているときに観測されることが示されている. 高度好熱菌のtRNAの多くは, Tループのリボチミジン残基(T)がさらにs<sup>2</sup>Tに修飾されており, 高度好熱菌のtRNAの耐熱性に重要な役割を果たしている.

s<sup>2</sup>T由来のCDバンドに加えて, 295nmに負のCDバンドが観測され, このCDバンドも温度が上昇してtRNAが変性すると消失した (図3.3.). このバンドは, tRNAのDアームとバリアブルループからなるコア領域の三次構造を反映していると考えられている. また, 295nmから330nmの領域において, EF-Tu由来のCDバンドは観測されないで, tRNA<sup>f1\*</sup>のs<sup>2</sup>Tやコア領域由来のCDバンドは, EF-Tuと複合体を形成したときのtRNAのコンプォメーション変化を解析するのに有用である.

#### 3.3.4. EF-Tu と高度好熱菌 tRNA<sup>Ile</sup> との複合体の CD スペクトル

Ile-tRNA の 315nm の正の CD バンドの強度は, EF-Tu·GTP と複合体を形成すると約 3 倍に増大した (図 3.5.a), uncharged tRNA の場合にも, 315nm の正の CD バンドの強度は, EF-Tu·GTP と複合体を形成すると約 2 倍に増大した (図 3.5.b), このことは, tRNA の L 字型構造が安定化されていることを示している, 一方, EF-Tu·GDP が Ile-tRNA または uncharged tRNA と複合体を形成したときは s<sup>2</sup>T 由来の CD バンドの強度は変化しなかった (図 3.5.c,d), Ile-tRNA の 295nm の負の CD バンドの強度は EF-Tu·GTP と複合体を形成すると顕著に増大し (図 3.5.a), tRNA の L 字型構造がさらに安定化されていることを示しているが, uncharged tRNA の場合は変化しなかった (図 3.5.b), 他方, tRNA がアミノアシル化されていてもされていなくても, EF-Tu·GDP との複合体を形成したとき, 295nm の負の CD バンドの強度は変化しなかった (図 3.5.c,d),

#### 3.3.5. EF-Tu と大腸菌 tRNA<sup>Met</sup> との複合体の CD スペクトル

大腸菌 tRNA<sup>Met</sup> の CD スペクトルにおいて, 340nm 付近の負の CD バンドは, のアンチコドン一字目に存在する mnm<sup>E</sup>s<sup>2</sup>U 由来であり, 300nm 付近の負の CD バンドは tRNA のコア領域由来である (図 3.6), tRNA がアミノアシル化されていてもされていなくても, EF-Tu·GTP と複合体を形成すると, 300nm 付近の負の CD バンドの強度が少し増大した (図 3.7.a,b), 一方, 340 nm 付近の負の CD バンドの強度は変化しなかった (図 3.7.a,b), EF-Tu·GDP と複合体を形成した場合, tRNA がアミノアシル化されていてもされていなくても, 300nm および 340nm の CD バンドの強度は変化しなかった (図 3.7.c,d),



### 3.3.6. EF-Tuと大腸菌tRNA<sup>Phe</sup>との複合体のCDスペクトル

大腸菌tRNA<sup>Phe</sup>のCDスペクトルにおいて、335nm付近の正のCDバンドは、tRNA<sup>Phe</sup>のDループの根元に存在するs<sup>4</sup>U由来であり、300nm付近の負のCDバンドはtRNAのコア領域由来である(図3.8.)。tRNAがアミノアシル化されていてもされていなくても、EF-Tu・GTPと複合体を形成すると、300nm付近の負のCDバンドの強度が少し増大した(図3.9.a,b)。一方、tRNAがアミノアシル化されていない場合のみ335nm付近の負のCDバンドの強度は少し減少した(図3.9.a,b)。EF-Tu・GDPと複合体を形成した場合、tRNAがアミノアシル化されていてもされていなくても、300nmおよび340nmのCDバンドの強度は変化しなかった(図3.9.c,d)。

### 3.3.7. T P C K処理したEF-Tuによる脱アミノアシル化の抑制

図3.10.に、T P C K処理したEF-Tu・GTP、未処理のEF-Tu・GTPによる脱アミノアシル化の抑制を示す、14  $\mu$ MのPhe-tRNAに対して、14  $\mu$ MのT P C K処理したEF-Tu・GTPを加えた場合は、未処理のEF-Tu・GTPと同程度、脱アミノアシル化を抑制した(図3.10.A)。他方、T P C K処理したEF-Tu・GTPが低濃度の場合の場合は、まったく脱アミノアシル化を抑制しなかった(図3.10.B)。

### 3.3.8. T P C K処理したEF-Tuと複合体を形成したIle-tRNAのCDスペクトル

Ile-tRNAはT P C K処理したEF-Tu・GTPと複合体を形成しても、遊離のtRNAと比較して、315nmの正のCDバンドおよび295nmの負のCDバンドとも強度は変化しなかった(図3.11.)。

### 3.3.9. RNaseによるアミノアシルtRNAの切断のEF-Tuによる保護

Ile-tRNAのみの場合は、完全にRNaseによってCCA末端が切断されているが、TPCK処理したEF-Tu・GTPは、未処理のEF-Tu・GTPと同程度、Ile-tRNAをRNaseによる切断から保護した(図3.12.)。

### 3.3.10. TPCK処理したEF-TuによるアミノアシルtRNAのAサイト結合活性

TPCK処理したEF-Tu・GMPPNPによるアミノアシルtRNAのAサイト結合活性は、未処理のEF-Tu・GMPPNPと比較して、40%程度であった。TPCKにより修飾されずに残ったEF-Tuの比率は約40%であるから、TPCK処理したEF-Tuは、アミノアシルtRNAをAサイトに結合できないと結論された(図3.13.)。

## 3.4. 考察

EF-Tu・GTPとクロスリンクしたIle-tRNAの量はバンドの濃さから全tRNAの約35%と見積られた。E. coli EF-Tu・GTPとPhe-tRNAについて、複合体を分離して本研究と同じ条件でクロスリンク反応を行った場合のクロスリンクの効率は、約35~40%であると報告されている<sup>20)</sup>。したがって、T. thermophilus EF-Tu・GTPとE. coli Ile-tRNAはCDやNMR測定条件において、ほとんどすべて複合体を形成した状態にあると考えられる。EF-Tu・GTPとuncharged tRNAの場合クロスリンクされた複合体のバンドの濃さは他の組合せよりも薄く約10%である。しかし、クロスリンクの効率は複合体の形成の程度に加えて、複合体のコンフォメーションに依存していると考えられる。実際、EF-Tu・GTPとIle-tRNAまたはuncharged tRNAとの解離定数(それぞれ、 $0.2 \mu\text{M}$ および $1 \mu\text{M}$ )<sup>22)</sup>から、クロスリンクの条件下で、Ile-tRNAの場合は99%、uncharged tRNAの場合は95%がEF-Tu・GTPと複合体を形成していると推定される。したがって、CDおよびNMRの測定条件において、EF-TuとtRNAのどの組合せでも、tRNAのほとんどがEF-Tuと複合体を形成してい



ることが確認された。

Tは $tRNA^{I^1}$ のTループに存在し、 $m^7G$ はバリアブルループに存在している(図3.2.)。TはTループとDループが分子内会合を形成している領域あり、 $m^7G$ はDループ、Dステムのヌクレオチドと三次構造塩基対を形成している。これらの分子内会合が開裂した場合、Tと $m^7G$ の化学シフトは低磁場側にシフトすることが知られている。

したがって、Ile- $tRNA^{I^1}$ がEF-Tu-GTPと複合体を形成してもTと $m^7G$ の化学シフトが変化しなかったことから、複合体の形成に伴い、Tや $m^7G$ の形成している分子内会合の開裂が生じていないと結論される。

$tRNA^{I^1}$ のCDスペクトルにおいて、95°Cにおける330nmの負のCDバンドの強度、波長は遊離の $s^2T$ のCDバンドと同じである。したがって、 $tRNA^{I^1}$ の融点(86.2°C)<sup>41)</sup>より高い温度では、 $s^2T$ (54)周辺はもはや堅固な三次構造をとっていないと考えられる。この330nmの負のCDバンドは、高度好熱菌の $tRNA^{Q^{10}}$ と $tRNA^{M^{90}}$ では、変性状態における $s^2T$ (54)に帰属されている。また、これらの $tRNA$ では、315nmの正のCDバンドは $tRNA$ が本来の三次構造をとっているときの $s^2T$ (54)に帰属されている。T(54)と同様に、 $s^2T$ (54)は、58番目の1-メチルアデノシン残基と塩基対を形成し、TループとDループの間の会合を形成している三次構造塩基対を補強している<sup>33)</sup>。したがって、 $tRNA^{I^1}$ の場合も、315 nmの正のCDバンドはTループとDループが会合している領域の三次構造の形成に由来すると結論される。

ところが、30°Cにおける $tRNA^{I^1}$ 315 nmの正のCDバンドの強度は、 $tRNA^{Q^{10}}$ や $tRNA^{M^{90}}$ の場合に比べて約半分であった<sup>30,34)</sup>。一方、25°Cから65°Cにおいて $tRNA^{Q^{10}}$ と $tRNA^{M^{90}}$ ではまったく観測されない330 nmの負のCDバンドが $tRNA^{I^1}$ の場合にはわずかながら観測された<sup>30,37)</sup>。このことは、変性していない本来の三次構造をとっている $tRNA^{I^1}$ のTループとDループ



プとの会合が,  $tRNA^{Glu}$  や  $tRNA^{Met}$  ほど堅固ではなく, L 字型構造がゆるんだ状態であることを示している.  $tRNA^{Glu}$  や  $tRNA^{Met}$  では T ループの, D ループとの会合部分の配列が  $s^2T-\Psi CGm^1A$  であるのにたいして,  $tRNA^{Ile}$  は  $s^2T\Psi CA m^1A$  であることがその理由であると思われる.  $T\Psi CGm^1A$  の配列を持つ酵母の  $tRNA^{Phe}$  の X 線結晶解析によって<sup>42)</sup>, G(57)の2位のアミノ基は G(19)のリボース環および G(18)の2'の水酸基と水素結合していることが知られている. したがって, G(57)が A(57)に変わっている  $tRNA$  では, これらの2個の水素結合を欠くため, A(57)を持つ  $tRNA$  では T ループと D ループの会合が弱くなっていると考えられる.

Ile-tRNA およびの uncharged tRNA の 315nm の正の CD バンドの強度は, EF-Tu·GTP と複合体を形成すると増大するとともに, どちらの場合も, 330 nm の弱い負の CD バンドは完全に消失していた. これらの結果から,  $tRNA^{Ile}$  の T ループと D ループとの会合は, EF-Tu·GTP と複合体を形成すると,  $tRNA^{Glu}$  や  $tRNA^{Met}$  の場合と同じくらい安定化され, 堅固な L 字型構造をとると結論される. T と  $s^2T$  は  $tRNA$  上で相同な位置にあり,  $^{13}C$  NMR から得られた結果は CD から得られた結果とよく一致する. Ile-tRNA の 295nm の負の CD バンドの強度が EF-Tu·GTP と複合体を形成すると増大したという結果から, Ile-tRNA のアミノアシル基は  $tRNA$  が EF-Tu·GTP を形成すると,  $tRNA$  の L 字型構造をさらに安定化すると結論される.

$tRNA^{Glu}$  と  $tRNA^{Met}$  はアミノアシル化されていてもされていなくても, EF-Tu·GTP と複合体を形成するとコア領域由来の CD バンドの強度が増大した. これらのコア領域由来のバンドは  $tRNA$  が熱変性すると消滅することから,  $tRNA^{Glu}$  や  $tRNA^{Met}$  でみられる変化は, やはり  $tRNA$  の L 字型構造の安定化を示していると結論される.  $tRNA^{Met}$  がアミノアシル化されていない場合のみ, EF-Tu·GTP と複合体を形成すると  $s^4U$  由来の CD バンドが変化

した。このことから、 $tRNA$ がアミノアシル化されていない場合は、 $EF-Tu \cdot GTP$ と複合体を形成してもL字型構造の安定化が十分でないために、 $EF-Tu$ に異常な形で結合していると考えられる。 $EF-Tu \cdot GTP$ とuncharged  $tRNA$ とのクロスリンクされた複合体の量が他の組合せと比較して少なかったのも、uncharged  $tRNA$ が $EF-Tu \cdot GTP$ に異常な形で結合しているためと考えられる。

$tRNA^{21u}$ の $mnm^b s^2U$ 由来の負のCDバンドは、 $tRNA^{21u}$ が $EF-Tu$ と複合体を形成してもまったく変化しなかったことから $EF-Tu$ は $tRNA$ のアンチコドン以外の場所に結合していて、アンチコドンにまではその影響は及んでいないことが明らかとなった。

$tRNA$ がアミノアシル化されていてもされていなくても、 $EF-Tu \cdot GDP$ との複合体を形成したとき、295nmおよび315nmのCDバンドの強度は変化しなかったことから、 $EF-Tu \cdot GDP$ との複合体の形成はTループとDループとの会合に影響を与えないと考えられる。また $tRNA^{21u}$ や $tRNA^{Y^a1}$ の場合も同様に $EF-Tu \cdot GDP$ と複合体を形成しても、CDのパターンに変化はみられなかったので、 $EF-Tu \cdot GDP$ は $tRNA$ と複合体を形成しても $tRNA$ のL字型構造の安定化は引き起こさないと結論される。

以上のことから、 $EF-Tu$ に結合したGTPの $\gamma$ -リン酸基は $EF-Tu$ と $tRNA$ の間にも $tRNA$ のTループとDループの会合を安定化するような相互作用をひきおこし、アミノアシル基が存在している場合には、さらに $tRNA$ のL字型構造が安定化されると考えられる。 $s^4U(8)$ を蛍光ラベルした $tRNA$ の $EF-Tu \cdot GTP$ への結合による蛍光強度の変化が、 $tRNA$ の種類により異なることが報告されており<sup>40)</sup>、 $EF-Tu \cdot GTP$ のアミノアシル $tRNA$ の種類の違いによるコンフォメーションの多様性を少なくする役割が示唆されている。アミノアシル化の際には $tRNA$ のコンフォメーションが異なっていることが、ARSによるそれぞれの $tRNA$ の認識に必要であると考えられている。実際、イソロイシンの $tRNA$ の



場合， $tRNA$ がやわらかく変形できることがARSによる認識に必要であることが知られている（私信），したがって， $EF-Tu \cdot GTP$ と複合体を形成することにより， $tRNA$ の種類によって程度が異なる $tRNA$ のコンフォメーションを，共通の堅固なL字型構造にすることが，リボソームのAサイトへの結合に必要であると考えられる．おそらく， $EF-Tu \cdot GTP$ は $s^2T(54)$ の近くに結合し，この残基周辺の三次構造を安定化していると考えられる．

TPCKは $EF-Tu$ の $Cys^{61}$ に作用して，タンパク質合成を阻害する<sup>44)</sup>．*E.coli*および，*B.stearothermophilus*の $EF-Tu$ はTPCK処理により，アミノアシル $tRNA$ のアミノアシル基を保護できなくなることが知られている<sup>44)</sup>．また，*B.subtilis*の場合にはアミノアシル基を保護できるが，CCA末端との結合がゆるくなっていることが知られている<sup>45)</sup>．*T.thermophilus*の $EF-Tu$ は高濃度の場合にはアミノアシル基を保護でき，CCA末端との結合も未処理の $EF-Tu$ と変わらないが，濃度が低くなるとアミノアシル基を保護できなくなることから，アミノアシル $tRNA$ に対する親和性が低下していることが本研究により明らかとなった．そのためTPCK処理した $EF-Tu$ はアミノアシル $tRNA$ をAサイトに結合できないと結論される．他方，TPCK処理した $EF-Tu \cdot GTP$ と複合体を形成しても， $Ile-tRNA$ のL字型構造は安定化されていないことが，CDを用いた解析から明らかとなった．CDの測定濃度ではTPCK処理した $EF-Tu \cdot GTP$ はアミノアシル基を保護しているので，TPCK処理した $EF-Tu \cdot GTP$ は $EF-Tu \cdot GDP$ とは異なってアミノアシル基の保護はできるが，TPCK処理によって $EF-Tu$ とアミノアシル $tRNA$ の他の部分との相互作用がそなわれてL字型構造を安定化できなくなり，親和性も低下していると結論される．以上のことから $EF-Tu$ とアミノアシル $tRNA$ との親和性は， $EF-Tu$ とアミノアシル基との相互作用だけでなく， $tRNA$ のTループとDループとの会合部分との相互作用が大きな寄与をしていると考えられる．この結論は，アミノアシルミニヘリックス（ $t$



RNAのうち、アクセプターステム、TループとTステム、およびDループとDステムから構成される分子)はEF-Tu・GTPによってアミノアシル基が保護されるが(Sprinzi, 私信), アミノアシルマイクロヘリックス(tRNAのうち、アクセプターステムのみから構成される分子)のアミノアシル基は保護されないという研究結果<sup>46)</sup>とよく一致する。また、EF-Tuに結合したGTPの影響はアミノアシルtRNAのアミノアシル基とTループとDループとの会合部分の2個所に伝わるが、TPCK処理されたEF-Tu・GTPの場合は、後者への影響をTPCKによる修飾が遮断してしまうためにアミノアシル基の保護のみ行われると考えられる。

アミノアシルtRNAのTループとDループは、EF-TuによってリボソームのAサイトに結合する際に解離し、Tループに共通に存在するGTPC配列が、16S rRNAの相補的な配列と塩基対を形成することが知られている<sup>3)</sup>。本研究の結果から、TループとDループの解離はAサイトへの結合の前には起こらないことが明らかとなった。さらに、リボソームのAサイトに結合の前に、EF-TuがアミノアシルtRNAのTループとDループの会合領域と相互作用しているということは、次の段階としてリボソーム上で、EF-TuがTループとDループの会合を解離するということを示唆している。

以上のCDおよび<sup>13</sup>C NMRを用いた解析から、EF-TuはtRNAのTループとDループの会合を開裂させてL字型構造を崩すのではなく、種々のtRNAによってバラエティのあるコンフォメーションをそろえて、Aサイトへの結合に必要な堅固なL字型構造にする役割を果たしていることが明らかとなった(図3.14.)。

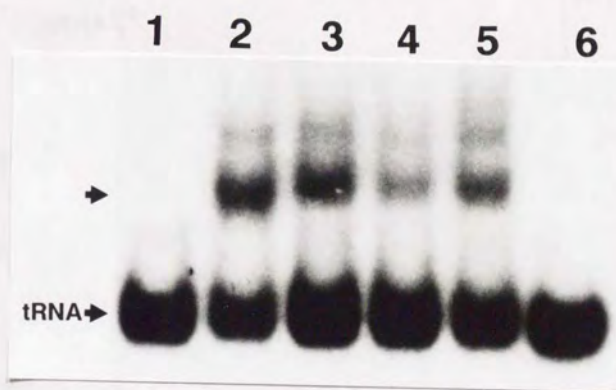


図3.1. クロスリンクによるEF-TuとtRNAの複合体の検出  
 1. tRNAのみ 2. EF-Tu-GTPとIle-tRNA  
 3. EF-Tu-GDPとIle-tRNA 4. EF-Tu-GTPとuncharged tRNA  
 5. EF-Tu-GDPとuncharged tRNA  
 6. tRNAと牛血清アルブミン

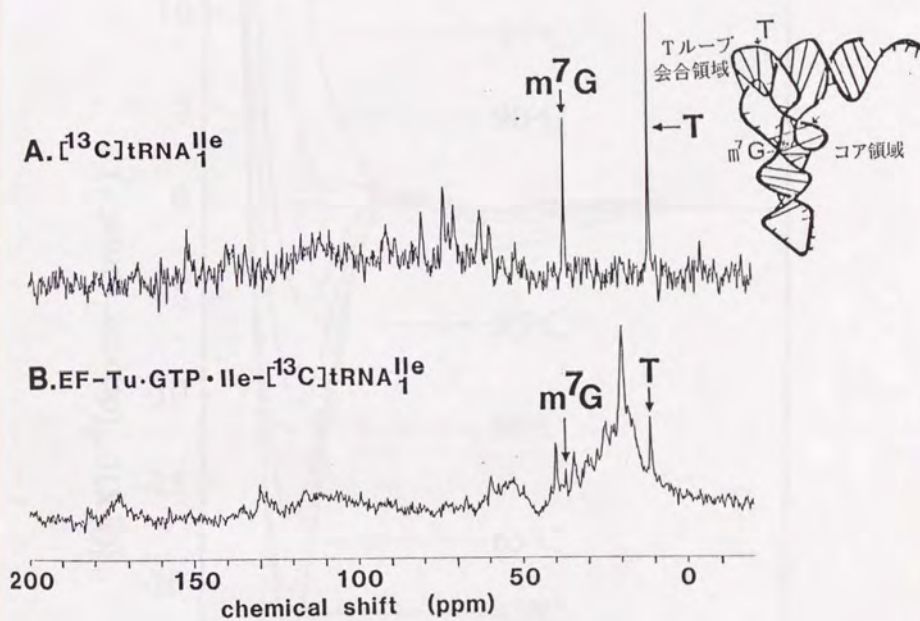


図3.2, EF-Tu·GTPと大腸菌Ile- $[^{13}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Ile}}$ との複合体の

$^{13}\text{C}$  NMRスペクトル

A.  $[^{13}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Ile}}$

B. Ile- $[^{13}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Ile}}$ ·EF-Tu·GTP



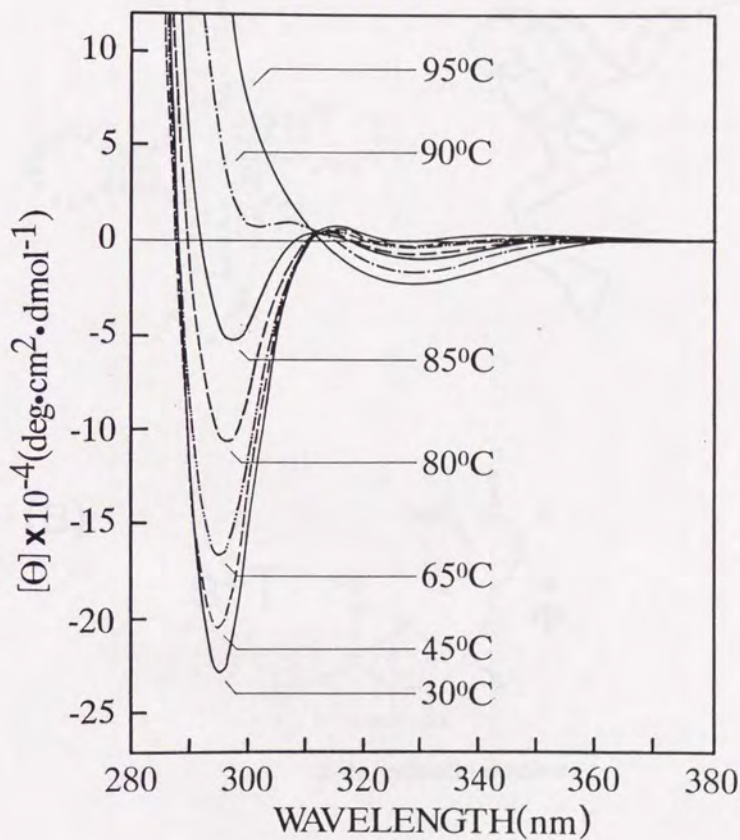
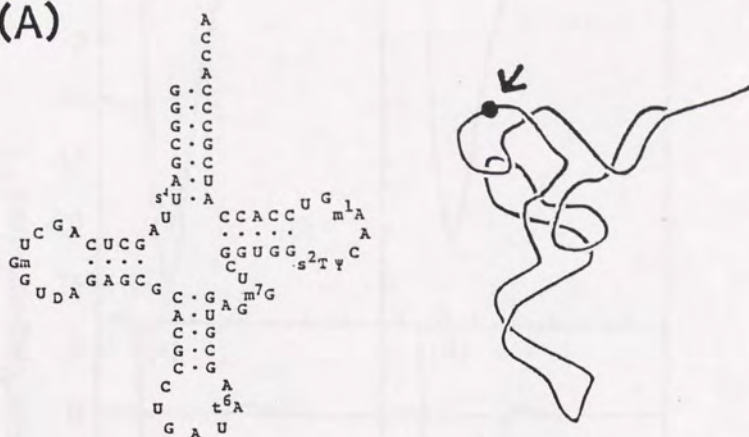
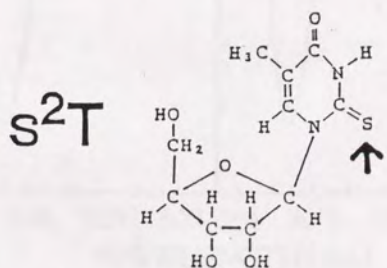


図3.3. *T. thermophilus* tRNA<sup>Phe</sup>のCDスペクトルの温度変化

(A)



(B)



2-thioribothymidine

図3.4. *T. thermophilus* tRNA<sup>16</sup>の塩基配列とs<sup>2</sup>Tの構造

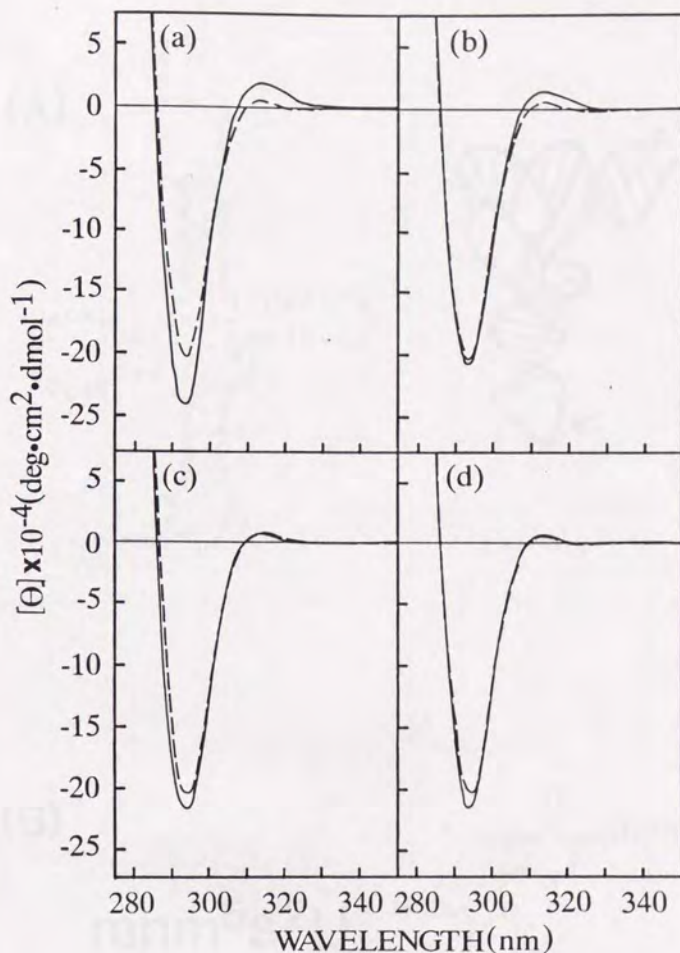
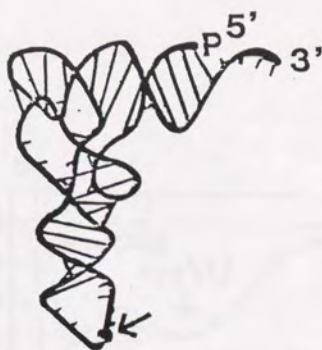
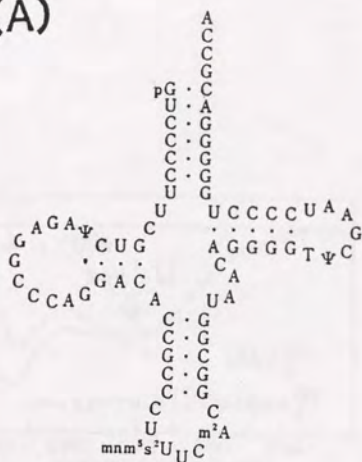


図3.5. EF-Tu と高度好熱菌 tRNA<sub>i</sub><sup>10</sup> との複合体の CD スペクトル  
 a. Ile-tRNA と EF-Tu·GTP b. uncharged tRNA と EF-Tu·GTP  
 c. Ile-tRNA と EF-Tu·GDP d. uncharged tRNA と EF-Tu·GDP  
 (破線は tRNA 単独の場合のスペクトルを示し、実線は tRNA と EF-Tu との複合体のスペクトルから EF-Tu のみの場合のスペクトルを差し引いたスペクトルを示す。)

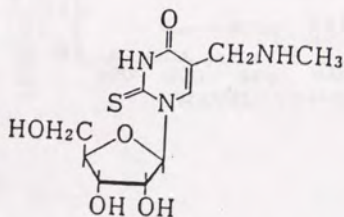


(A)



(B)

**mn<sup>m</sup>s<sup>2</sup>U**



**5-methylaminomethyl-  
2-thiouridine**

図3.6. *E. coli* tRNA<sup>21u</sup>の塩基配列とmn<sup>m</sup>s<sup>2</sup>Uの構造

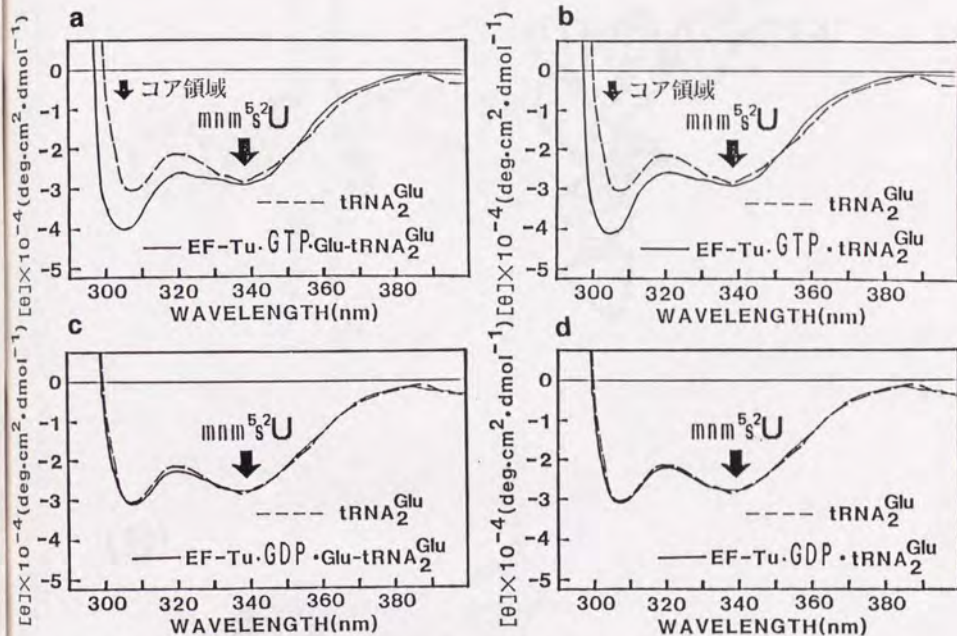
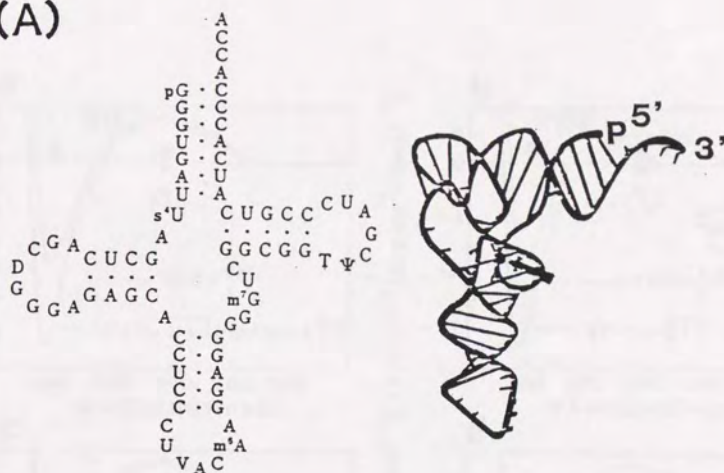


図3.7. EF-Tuと大腸菌tRNA<sup>Glu</sup>との複合体のCDスペクトル

a. Glu-tRNAとEF-Tu·GTP b. uncharged tRNAとEF-Tu·GTP  
c. Glu-tRNAとEF-Tu·GDP d. uncharged tRNAとEF-Tu·GDP  
(破線はtRNA単独の場合のスペクトルを示し、実線は  
RNAとEF-Tuとの複合体のスペクトルからEF-  
Tuのみの場合のスペクトルを差し引いたスペクトルを示す.)

(A)



(B)

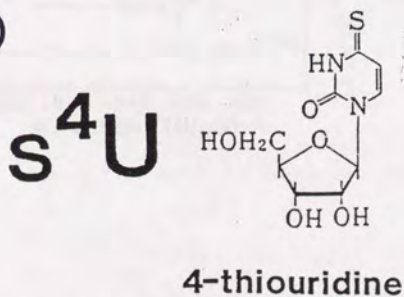


図3.8. *E. coli* tRNA<sup>Phe</sup>の塩基配列とs<sup>4</sup>Uの構造



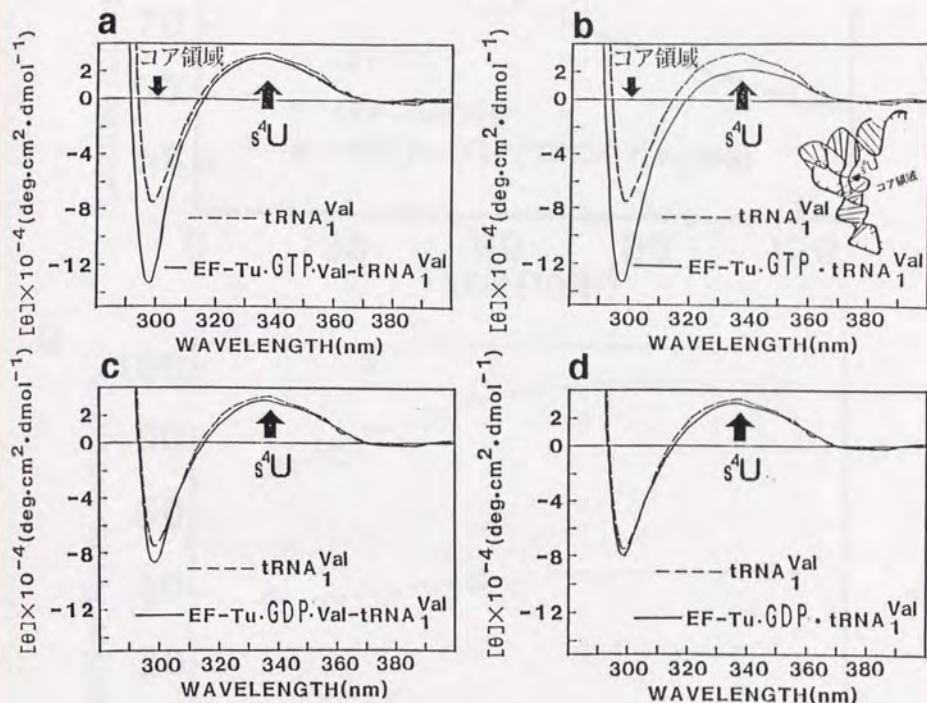


図3.9. EF-Tuと大腸菌tRNA<sup>Val</sup>との複合体のCDスペクトル

a. Val-tRNAとEF-Tu·GTP b. uncharged tRNAとEF-Tu·GTP  
c. Val-tRNAとEF-Tu·GDP d. uncharged tRNAとEF-Tu·GDP  
(破線はtRNA単独の場合のスペクトルを示し、実線はtRNAとEF-Tuとの複合体のスペクトルからEF-Tuのみの場合のスペクトルを差し引いたスペクトルを示す。)

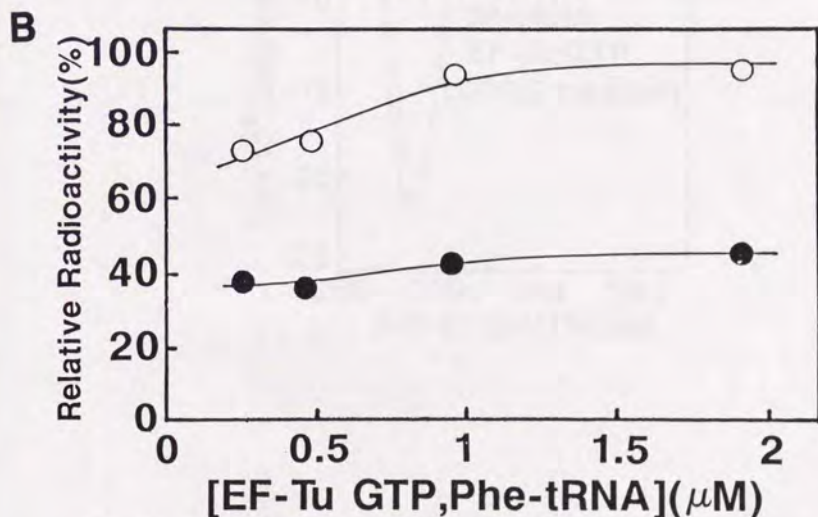
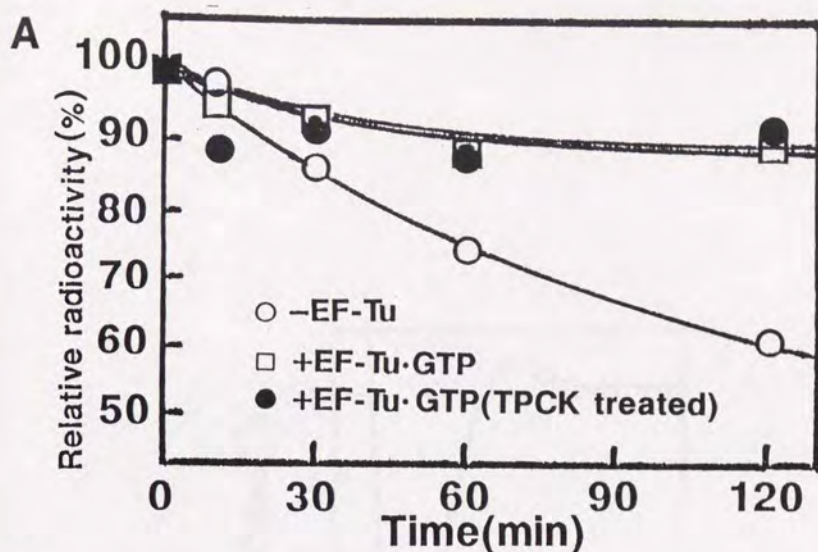


図3.10. TPCK処理したEF-Tuによる脱アミノアシル化の抑制

A. [ $^{14}\text{C}$ ]Ile-tRNAのみの場合 (○-○), 未処理のEF-Tu·GTPを加えた場合 (□-□), TPCK処理したEF-Tu·GTPを加えた場合 (●-●) の脱アミノアシル化を測定した。いずれの場合も, Ile-tRNAおよびEF-Tu·GTPの濃度は $14\mu\text{M}$ である。

B. [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-tRNAに, 等モル量の未処理のEF-Tu·GTPを加えた場合 (○-○) および, 等モル量のTPCK処理したEF-Tu·GTPを加えた場合 (●-●) について, 2時間後の脱アミノアシル化を測定した。

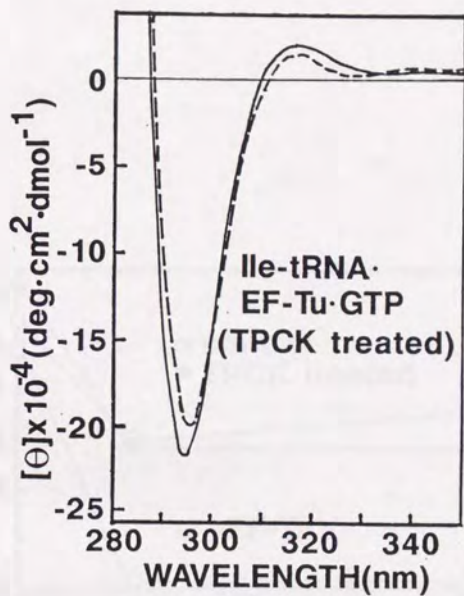


図3.11. TPCK処理したEF-Tuと複合体を形成したIle-tRNAのCDスペクトル  
 (破線はtRNA単独の場合のスペクトルを示し、実線はRNAとEF-Tuとの複合体のスペクトルからEF-Tuのみの場合のスペクトルを差し引いたスペクトルを示す。)



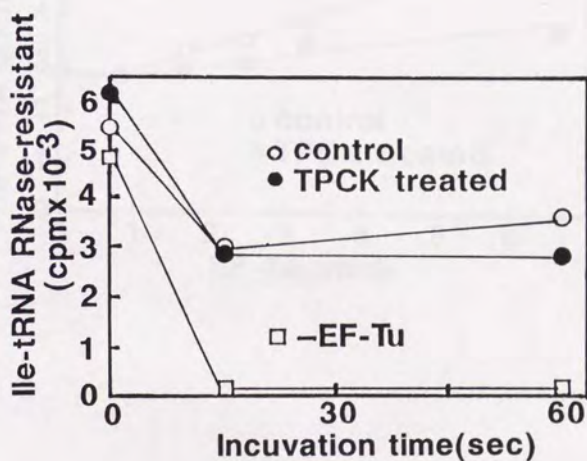


図3.12. RNaseによるアミノアシルtRNAの切断のEF-Tuによる保護

Ile-tRNAのみの場合(—□—), 未処理のEF-Tu・GTPを加えた場合(—○—), TPCK処理したEF-Tu・GTPを加えた場合(—●—)について, RNaseによって切断を受けずにろ紙に残存した<sup>14</sup>C-Ile-tRNAの量を測定した。

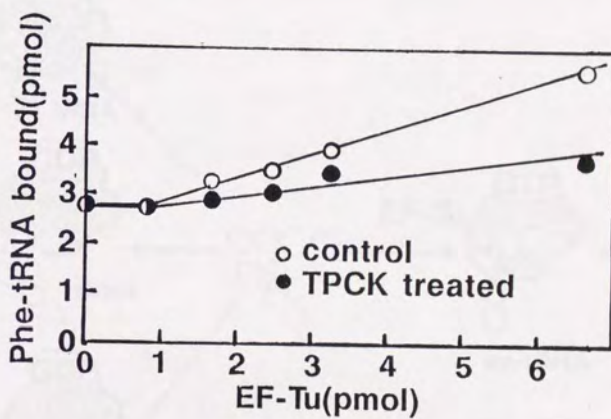


図3.13. アミノアシルtRNAのAサイト結合に対するEF-TuのTPCKによる修飾の影響  
未処理のEF-Tu・GMPPNP (—○—), TPCK処理したEF-Tu・GMPPNP (—●—) によるPhe-tRNAのAサイト結合活性を測定した。

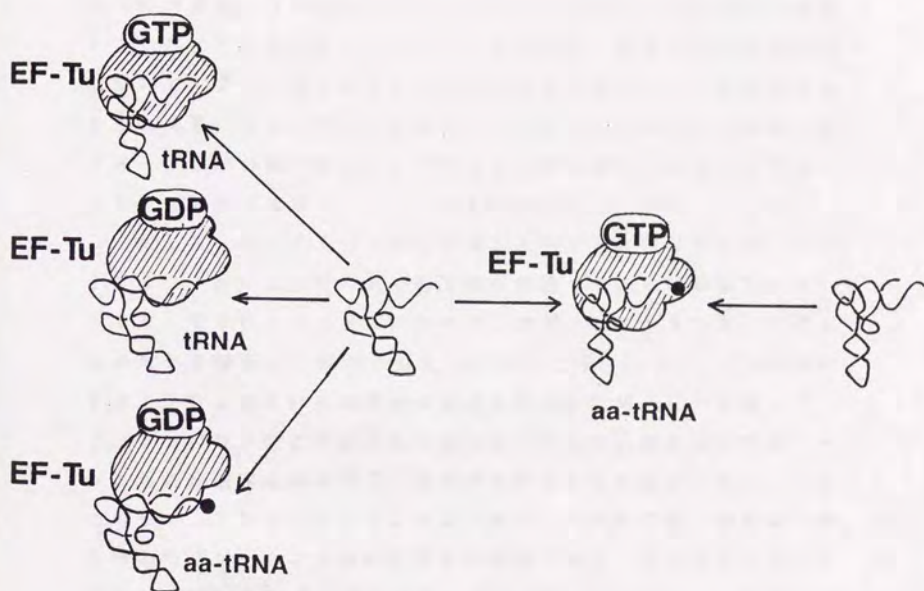


図3.14. アミノアシル tRNA の EF-Tu によるコンフォメーションの安定化のモデル

EF-Tu·GDP は tRNA と結合しても tRNA の L 字型構造を安定化できない。EF-Tu·GTP になると、tRNA の L 字型構造を安定化できるようになるが、まだ不十分である。tRNA がアミノアシル化されている場合は、さらに L 字型構造が安定化され、A サイトに結合できるようになる。



## 第4章 リボソームのAサイトにおけるEF-Tuの役割

### 4. 1. 序

EF-Tu·GTPはアミノアシルtRNAと複合体を形成し、アミノアシルtRNAのL字型構造を安定化することが、第3章において明らかになった<sup>47)</sup>。アミノアシルtRNAがAサイトに結合し、EF-Tu·GDPが解離した後においては、TループとDループの会合は開裂していることが知られている<sup>48)</sup>。したがって、Aサイト結合の段階において、アミノアシルtRNAのコンフォメーションが変化すると思われる。アミノアシルtRNAのAサイトへの正しい結合にはEF-Tuが必須であるが、EF-TuがAサイトにおいてアミノアシルtRNAにどのような作用を及ぼすかわかっていない。したがって、Aサイトへの結合以後、AサイトにおけるEF-TuとアミノアシルtRNAとの相互作用を調べることは重要である。

EF-Tuはリボソームにおいて、コドンとアンチコドンとの正しい対応を保証する役割を果たしていると考えられる。EF-Tu·GTPとアミノアシルtRNAの複合体がAサイトに結合したとき、アンチコドンがコドンと対応したものである場合は、複合体のリボソームからの解離速度はおそく、次のGTP加水分解反応に移る。これに対して、アンチコドンがコドンと対応したものでない場合は、複合体のリボソームからの解離速度は非常に速く、その結果、誤ったアミノ酸が取り込まれるのを防いでいる<sup>49)</sup>。しかし、1段階だけでは、いくら確認の時間を長くしても、誤りを完全に取り除くことはできないと考えられる。ゆえに、もう一段階方式の異なる「校正」が行われると考えられている。すなわち、GTPの加水分解後に、コドンとアンチコドンとの対合が正しくない場合は、アミノアシルtRNAがAサイトに結合することなくリボソームから解離するとされている<sup>49)</sup>。そのメカニズムとしては、EF-Tu·GDPがGTPの加水分解後もしばらくAサイトにとどまり、その間にコドンとアンチコドンの対合が正しいかどうか再確認され则认为られている。

7). つまり, GTPの加水分解によってアミノアシルtRNAの状態が変化し, コドンとアンチコドンのとの対合を見方を変えて確認することにより, 誤りの頻度を少なくしていると考えられる. したがって, GTPの加水分解の前後で, アミノアシルtRNAの状態がどのように変化するかを調べることは重要である.

EF-Tuに作用してタンパク質合成を阻害する抗生物質オーロドックス(図4.1.)は, EF-Tu-GTPに作用してその内在性GTPase活性を上昇させるため, EF-Tuに対して, GTPの加水分解の段階におけるリボソームの作用を模倣するアナログであると考えられている<sup>50)</sup>. また, オーロドックスは, EF-Tuに結合したGTPの加水分解のあと, EF-Tu-GDPがリボソームから解離するのを抑制することによってタンパク質合成を阻害すると考えられている<sup>51)</sup>. したがって, オーロドックス存在下で, EF-Tu-GDPはGTPの加水分解のあと, リボソームから解離する前の状態を保持していると考えられる. このことから, オーロドックス存在下では, EF-Tu-GDPは「校正」の段階でリボソームにとどまっている可能性が考えられる. このようにオーロドックスは, リボソーム上でのGTPの加水分解の段階と「校正」の段階におけるEF-TuとアミノアシルtRNAとの相互作用の解析に有用である. 本研究では, オーロドックス存在下におけるEF-TuとアミノアシルtRNAの相互作用を, CDや生化学的手法を用いて解析した.

## 4. 2. 方法

### 4.2.1. 材料

高度好熱菌のEF-Tu, 大腸菌のtRNA<sup>i</sup><sub>12</sub>, tRNA<sup>Phe</sup>の精製は2.2.1.項に従って行った. オーロドックスは Hoffman La Roche社(NJ, USA)より分譲して頂いた. TPCKはアルドリッチ社より購入した. *E. coli* 70S リボソームは, *E. coli* PR13 より文献<sup>51, 52)</sup>に従って精製されたものを用いた.



#### 4.2.2. アミノアシル tRNA の A サイトへの結合

*E. coli* 70S リボソーム 0.5 OD units,  $10 \mu\text{g}$  poly U, 20 pmol tRNA<sup>Phe</sup>, 2 mM スペルミジンを含む TMMN 緩衝液  $20 \mu\text{l}$  を  $37^\circ\text{C}$ , 10 分間ブレインキュベートする. EF-Tu·GDP 依存的に行う場合はこの溶液に, 指定された量の EF-Tu·GDP, 24 pmol [ $^3\text{H}$ ]Phe-tRNA を含む TMMN 緩衝液  $30 \mu\text{l}$  を加える. EF-Tu·GTP 依存的に行う場合は, 指定された量の EF-Tu·GDP, 24 pmol [ $^3\text{H}$ ]Phe-tRNA,  $100 \mu\text{M}$  GTP, 1 mM ホスホエノールビルビン酸,  $0.6 \mu\text{M}$  ビルビン酸キナーゼ, EF-Tu·GDP のモル比で 3% の EF-Tu·EF-Ts を含む TMMN 緩衝液  $30 \mu\text{l}$  を加える. EF-Tu·GMPPNP 依存的に行う場合は, 指定された量の EF-Tu·GDP, 24 pmol [ $^3\text{H}$ ]Phe-tRNA, 1 nmol GMPPNP, EF-Tu·GDP のモル比で 3% の EF-Tu·EF-Ts を含む TMMN 緩衝液  $30 \mu\text{l}$  を加える.  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした後, 氷冷し, ニトロセルロースメンブレンに吸着させ, TMMN 緩衝液で洗浄して乾燥後, 液体シンチレーションカウンタにより放射活性を測定した<sup>53)</sup>.

#### 4.2.3. アミノアシル tRNA の脱アミノアシル化の測定

50 mM Tris-HCl (pH 7.5,  $37^\circ\text{C}$ ), 150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む溶液 (TMMN 緩衝液) に, 指定量のアミノアシル tRNA と EF-Tu, もしくはアミノアシル tRNA のみを加えて行った. EF-Tu·GTP についての測定の場合は, EF-Tu·GDP を EF-Tu·GTP に変換するために,  $25 \mu\text{M}$  GTP,  $0.4 \text{ mM}$  ホスホエノールビルビン酸,  $0.6 \mu\text{M}$  ビルビン酸キナーゼ,  $0.4 \mu\text{M}$  EF-Tu·EF-Ts の共存下で測定を行った. 試料溶液  $20 \mu\text{l}$  を  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし, 一定時間において  $2 \mu\text{l}$  ずつ採取し, Whatman 3MM ろ紙につけ, 氷冷した 5% TCA で 3 回, エタノールで 2 回洗浄して乾燥し, トルエンシンチレーター中で液体シンチレーションカウンタを用いて放射活性を測定した.



#### 4.2.4. Aサイトにおけるアミノアシル tRNA の脱アミノアシル化の測定

6 pmol の EF-Tu·GMPPNP を用いた場合および、200  $\mu$  M の オーロドックス存在下で 6 pmol の EF-Tu·GDP および EF-Tu·GTP を用いた場合について、4.2.2. 項に従ってアミノアシル tRNA の A サイト結合反応を行なったのち、TMMN 緩衝液 1 ml を加えて希釈して反応を停止する。引続き 37°C でインキュベートし、一定時間ごとに 150  $\mu$  l を採取し、ニトロセルロースメンブレンに吸着させ、TMMN 緩衝液で洗浄して乾燥後、液体シンチレーションカウンタにより放射活性を測定した。

#### 4.2.5. オーロドックス存在下における EF-Tu·GDP に結合した Ile-tRNA の 2', 3' 特異性の解析

200  $\mu$  M の オーロドックス存在下で、2.2.7. 項の EF-Tu·GDP の場合と同様に行った。

#### 4.2.6. CD スペクトルの測定

3.2.5. 項と同様に行い、オーロドックス存在下で測定を行う場合は、最終濃度が 100  $\mu$  M となるようにオーロドックスを加えた。また、TPCK 処理した EF-Tu·GTP と Ile-tRNA との複合体との CD スペクトルを測定する場合は、EF-Tu は Ile-tRNA と等モル量加えた。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. オーロドックス存在下での EF-Tu·GDP によるアミノアシル tRNA の A サイトへの結合

オーロドックス非存在下では、EF-Tu·GDP はまったく Phe-tRNA を A サイトに結合できなかった。これに対し、200  $\mu$  M の オーロドックス存在下では、EF-Tu·GDP は Phe-tRNA を A サイトに結合した。さ

らに，T P C K 処理したEF-Tu·GDPもEF-Tu·GDPはPhe-tRNAをAサイトに結合した（図4.2.）。

#### 4.3.2. オーロドックス存在下でのEF-Tu·GDPによる脱アミノアシル化の抑制

図4.3.に，EF-Tu·GTP，EF-Tu·GDP，オーロドックス存在下でのEF-Tu·GDPによる脱アミノアシル化の抑制を示す。20  $\mu$ MのIle-tRNAに対し100  $\mu$ MのEF-Tu·GDPを加えた場合は，脱アミノアシル化の程度はアミノアシルtRNAのみの場合と比較して変化しなかった。これに対し，オーロドックス存在下において，14  $\mu$ MのIle-tRNAに対し14  $\mu$ MのEF-Tu·GDPを加えた場合は，EF-Tu·GTPと同程度，脱アミノアシル化を抑制した。

#### 4.3.3. AサイトにおけるアミノアシルtRNAの脱アミノアシル化の抑制

オーロドックス存在下で，Phe-tRNAがEF-Tu·GTPによってAサイトに結合した後の脱アミノアシル化の程度は，遊離のPhe-tRNAの脱アミノアシル化の程度と比較して約半分であった。この結果は，Phe-tRNAがEF-Tu·GMPPNPによってAサイトに結合した後，T M M N緩衝液で希釈した場合と同程度であった。他方，オーロドックス存在下で，Phe-tRNAがEF-Tu·GDPによってAサイトに結合した後の脱アミノアシル化の程度は，遊離のPhe-tRNAの脱アミノアシル化の程度と同程度であった（図4.4.）。EF-Tu·GMPPNPは脱アミノアシル化を完全に抑制するはずであるが，本研究の結果ではかなり脱アミノアシル化が生じている。アミノアシルtRNAとEF-Tu·GMPPNPの複合体は時間がたつとAサイトから脱離することが知られている<sup>54)</sup>。本研究での脱アミノアシル化の速度は，複合体の脱離の速度と同程度である。したがって，本研究において測定した脱アミノアシル化には，かなり三重複合体の解離の寄与があると考えられ，別の方法で検討する余地がある。

#### 4.3.4. オーロドックス存在下におけるEF-Tu·GDPに結合した

##### Ile-tRNAの2', 3'特異性

図4.5.に, オーロドックス存在下におけるEF-Tu·GDPに結合したIle-tRNAから調製したAcIle-Adoの分析を示した. 2', 3'異性体の比率は0.06:0.94であり, オーロドックス存在下において, EF-Tu·GDPに3'異性体が結合していることが明らかとなった.

#### 4.3.5. オーロドックス存在下でのEF-Tuと複合体を形成した tRNAのCDスペクトル

EF-Tu·GTPとIle-tRNAとの複合体では, 遊離のtRNAと比較して, 315nmの正のCDバンドおよび295nmの負のCDバンドの強度が増加した(図4.6.A). EF-Tu·GTPとuncharged tRNAとの複合体では, 315nmの正のCDバンドの強度は増加したが, 295nmの負のCDバンドの強度は変化しなかった(図4.6.B). EF-Tu·GDPとIle-tRNAまたはuncharged tRNAとの複合体では, 315nmの正のCDバンドおよび295nmの負のCDバンドとも強度は変化しなかった.(図4.6.C,D). これらの結果は, 3.3.4.項におけるオーロドックス非存在下における結果とまったく同じであった.

#### 4. 4. 考察

オーロドックスはEF-Tu·GDPのリボソームからの解離を抑制することによりタンパク質合成を阻害すると考えられている<sup>8)</sup>. また本研究から, 高度好熱菌のEF-Tu·GDPの場合もオーロドックス存在下で, アミノアシルtRNAをAサイトに結合させることが確認された. このように, オーロドックス存在下においてEF-Tu·GDPとリボソームの結合が強くなる理由については二つ考えられる. まず第一に, オーロドックスがEF-Tu·GDPに作用してEF-Tu·GTPに近い性質にしてAサイト結合の第1段階目でとどめておくという考え方と, 第二に, EF-Tu·GDPを「校正」の段階でとどめておくという考え方が



ある。

本研究から、オーロドックス存在下で、EF-Tu·GDPはアミノアシルtRNAと複合体を形成したときに、EF-Tu·GTPと同じくらいアミノアシルtRNAの脱アミノアシル化を抑制することが明らかとなった。EF-Tu·GDPとアミノアシルtRNAの解離定数は、オーロドックス存在下では約1/20になることが知られている<sup>25)</sup>、しかしEF-Tu·GDPとアミノアシルtRNAの複合体の形成がクロスリンクを用いて確認されている濃度においても、EF-Tu·GDPは脱アミノアシル化を抑制できなかった。したがって、オーロドックスがEF-Tu·GDPに作用することにより、EF-Tu·GDPがアミノアシル基を保護できるようになると結論される。オーロドックス存在下において、EF-Tu·GTPによってアミノアシルtRNAがAサイトに結合した場合、Aサイトにおける脱アミノアシル化の速度は、遊離のアミノアシルtRNAの脱アミノアシル化速度と比較してかなりおそくなっていることが明らかになった。このことから、実際にAサイトにおいても、オーロドックス存在下でEF-Tu·GDPがアミノアシルtRNAの脱アミノアシル化を抑制していると結論された。さらにオーロドックス存在下で、EF-Tu·GDPと複合体を形成しているのはアミノアシルtRNAの3'異性体であることが明らかとなった。したがってオーロドックス存在下で、EF-Tu·GDPはEF-Tu·GTPとまったく同様にアミノアシル基と相互作用していると思われる。以上のことから、3'末端に結合するという機能に関しては、オーロドックス存在下でのEF-Tu·GDPはEF-Tu·GTPを模倣していると考えられる。

これに対し、オーロドックス存在下における、EF-Tu·GDPとアミノアシルtRNAの複合体のCDを用いた解析の結果から、オーロドックスの存在下においても、EF-Tu·GDPはIle-tRNAのL字型構造を安定化できないことが明らかになった。したがって、tRNAのL字型構造の安定化という視点からはオーロドックス存在下でのEF-Tu·GDPは、EF-Tu·GTPを模倣した状態にはなっていないと考えられる。

オーロドックス存在下でEF-Tu·GDPはアミノアシル tRNA を A サイトに結合させることができるが，EF-Tu·GDP とアミノアシル tRNA の親和性は，オーロドックス存在下では強くはなるものの EF-Tu·GTP と比較するとはるかに弱い<sup>55)</sup>，したがって，A サイト結合の測定の条件下においてほとんど三重複合体は形成されていないと思われる。また，EF-Tu·GMPPNP によってアミノアシル tRNA を A サイトに結合させた場合には，A サイトにおいて EF-Tu·GMPPNP はアミノアシル tRNA の脱アミノアシル化を抑制するのに対し，オーロドックス存在下で EF-Tu·GDP によってアミノアシル tRNA を A サイトに結合させた場合には，EF-Tu·GDP は A サイトにおいてアミノアシル tRNA の脱アミノアシル化を抑制できないことが明らかとなった。さらに，TPCK 処理をおこなった EF-Tu·GTP はアミノアシル tRNA を A サイトに結合できないが(第3章参照)，オーロドックス存在下では TPCK 処理した EF-Tu·GDP はアミノアシル tRNA を A サイトに結合した。以上のことから，オーロドックス存在下で EF-Tu·GDP がアミノアシル tRNA を A サイトに結合するのは，三重複合体を形成して A サイトに結合するという通常の過程を経るのではないと考えられる。

以上の結果をまとめると，オーロドックス存在下で EF-Tu·GDP は EF-Tu·GTP を模倣することにより，EF-Tu·GTP と同様な形でアミノアシル tRNA を A サイトに結合させて，第1段階目でとどめているのではないと思われる。したがって，オーロドックスの作用により EF-Tu·GDP が「校正」の段階でリボソームにとどまっていると考えられる。他方，オーロドックスの作用により EF-Tu·GDP が，GTP の加水分解が途中で止まった状態を模倣して A サイトにとどまっている可能性は否定できない。この可能性は検証されなければならないが，オーロドックスの作用により EF-Tu·GDP が「校正」の段階でリボソームにとどまっている状態を維持していると考えた場合，「校正」の段階をうまく説明できるモデルが考えられるので，以下に述べる。



ペプチド鎖転移反応は遊離のアミノアシル基が存在するとすみやかにすすむ<sup>56)</sup>。23S rRNAのうち、ペプチジルトランスフェラーゼ活性中心を構成していると考えられている部分は、アミノアシルtRNAにより化学修飾から保護されるが、キロマイシン（オーロドックスの類似物質）存在下でEF-Tu·GDPがAサイトに結合している場合は保護されないことが報告されている<sup>57)</sup>。したがって、EF-Tu·GDPによりアミノアシル基のペプチド鎖転移反応への移行がおさえられていることが示唆されている。本研究の結果から、実際にAサイトにおいてEF-Tu·GDPがアミノアシルtRNAの3'末端と結合していることが明らかになった。以上のことから、EF-Tuに結合したGTPの加水分解の後、EF-Tu·GDPはAサイトにとどまり、アミノアシル基と相互作用することにより、すぐにはペプチド鎖転移反応に移行しないよう働きをしていると考えられる。そして、その間に、コドンとアンチコドンとの対合の「校正」が行われると考えられる。コドンとアンチコドンとの対合が正しくない場合は、コドンとアンチコドンとの対合が正しい場合に比べてアミノアシルtRNAのリボソームからの解離が100倍速いことが知られている<sup>54)</sup>。したがって、コドンとアンチコドンとの対合が正しくない場合は、アミノアシルtRNAがEF-Tu·GDPが遊離するまでもちこたえられずにリボソームから離れ、正しい場合はEF-Tu·GDPの遊離後にペプチド鎖転移反応に移行すると思われる。

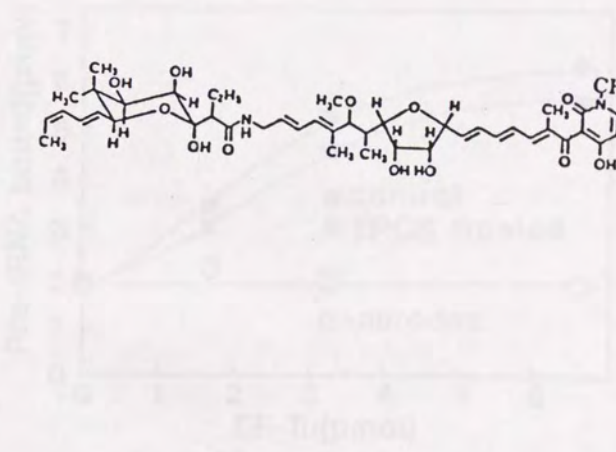
アミノアシルtRNAがAサイトに結合し、EF-Tuがリボソームから解離した状態では、アミノアシルtRNAのTループとDループとの会合は開裂していることが知られている<sup>48)</sup>。Aサイトに結合する以前には、TループとDループとの会合は開裂していないことが、当論文第3章における研究より明らかになっている<sup>47)</sup>。したがって、三重複合体のAサイトへの結合後、EF-Tu·GDPの解離以前にこの開裂が起こると考えられる。TループとDループとの会合の開裂後、TループのGTΨC配列は、16S rRNAの相補的な配列と会合すると考えられている<sup>3)</sup>。アミノアシルtRNAがAサ



イトに結合し、EF-Tuに結合したGTPが加水分解される前とEF-Tuがすでにリボソームから解離した後で、16S rRNAのアミノアシルtRNAによる化学修飾からの保護に変化がないことが報告されている<sup>50)</sup>。他方、16S rRNAのアミノアシルtRNAによる化学修飾からの保護は、アンチコドンステムおよびループの部分だけでも生じることが報告されている<sup>51)</sup>。したがって、必ずしもGTPが加水分解される前に、TループとDループとの会合が開裂して、16S rRNAと会合する確かな証拠は存在しない。ここでは、TループとDループとの会合がGTPの加水分解の前におこる場合と、後でおこる場合の両方について検討する必要がある。

まず、GTPが加水分解される前に、TループとDループとの会合が開裂して、16S rRNAと会合すると考える場合、本研究からオーロドックスが、EF-TuによるアミノアシルtRNAのL字型構造の安定化に影響をあたえないことが明らかとなっているのでEF-Tu·GTPによるTループとDループとの会合の開裂は、オーロドックスが作用を模倣するのとは異なるリボソームの部分の寄与によると考えられる。これに対し、GTPが加水分解された後に、TループとDループとの会合が開裂して、16S rRNAと会合すると考えた場合は、次のようなモデルが考えられる。本研究において、オーロドックス存在下でEF-Tu·GTPに結合したIle-tRNAのL字型構造は安定化されるのに対し、EF-Tu·GDPに結合したIle-tRNAのL字型構造は安定化されないことが明らかとなっている。したがって、アミノアシルtRNAはGTPの加水分解の前後で、L字型構造が安定化されている状態および、16S rRNAと結合した状態という異なった状態で存在しており、アミノアシルtRNAのコドンとアンチコドンの対応を異なった視点から確認することにより2段階の「校正」が行なわれていると考えられる(図4.7.)。

以上のような機構を通じて、EF-Tuはコドンとアンチコドンの正しい対応を保証し、タンパク質合成の正確さを保持するという重要な役割を担っていると考えられる。



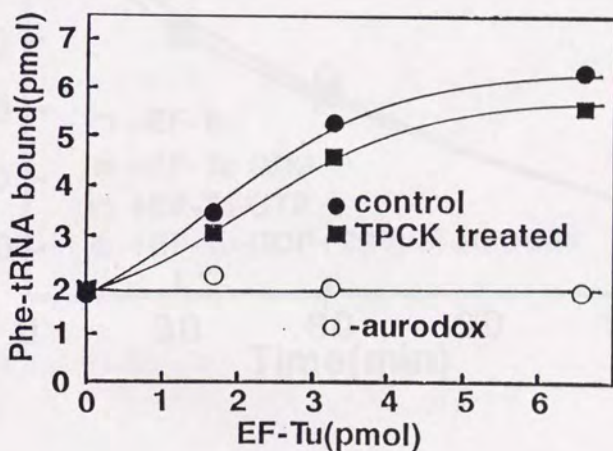


図4.2. オーロドックス存在下でのEF-Tu・GDPによるアミノアシル  
 もRNAのAサイトへの結合  
 オーロドックス非存在下での未処理のEF-Tu・GDP(—○—),  
 200  $\mu$ M オーロドックス存在下での未処理のEF-Tu・GDP  
 (—●—), 200  $\mu$ M オーロドックス存在下でのTPCK処  
 理したEF-Tu・GDP(—■—)によるPhe-tRNAのAサイト結  
 合活性を測定した。



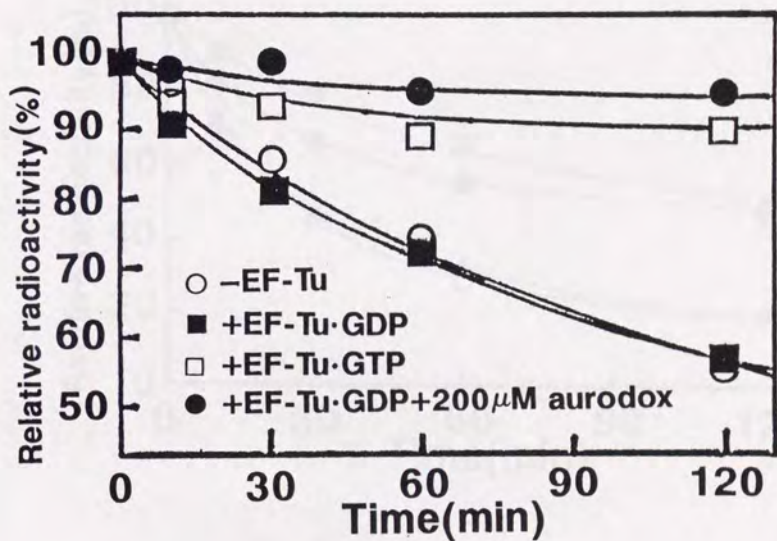


図4.3. オーロドックス存在下でのEF-Tu·GDPによる脱アミノアシル化の抑制

[ $^{14}\text{C}$ ]Ile-tRNA のみの場合 (—○—),  $20\mu\text{M}$  の [ $^{14}\text{C}$ ]Ile-  
 に対し,  $100\mu\text{M}$  の EF-Tu·GDP を加えた場合 (—■—),  $14\mu\text{M}$  の [ $^{14}\text{C}$ ]Ile-tRNA に対し  $14\mu\text{M}$  の EF-Tu·GTP を加えた場  
 合 (—□—),  $200\mu\text{M}$  オーロドックス存在下で  $14\mu\text{M}$  の  
 [ $^{14}\text{C}$ ]Ile-tRNA に対し  $14\mu\text{M}$  の EF-Tu·GDP を加えた場合  
 (—●—) について脱アミノアシル化を測定した。  
 の脱アミノアシル化を測定した。

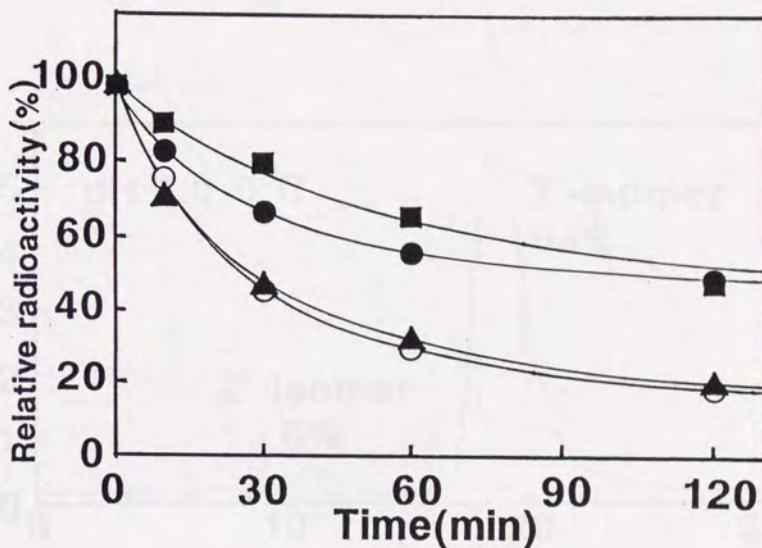


図4.4. AサイトにおけるEF-Tuによる脱アミノアシル化の測定  
遊離の $[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNAの脱アミノアシル化(—○—), オー  
ロドックス存在下で, Phe-tRNAがEF-Tu·GTPによってAサイ  
トに結合した後の脱アミノアシル化(—●—), Phe-tRNA  
がEF-Tu·GMPPNPによってAサイトに結合した後の脱アミノ  
アシル化(—■—), オーロドックス存在下で, Phe-tRNA  
がEF-Tu·GDPによってAサイトに結合した後の脱アミノア  
シル化(—▲—)を示した.

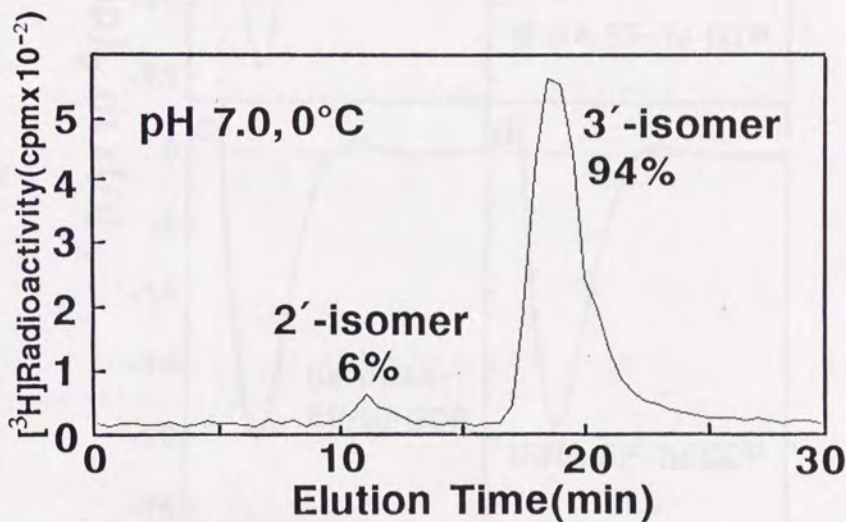


図4.5. オーロドックス存在下におけるEF-Tu・GDPに結合したIle-tRNAの2', 3'異性  
200  $\mu$ M オーロドックス存在下でEF-Tu・GDPに結合したIle-tRNAから調製したAc[<sup>3</sup>H]Ile-AdoのHPLCによる分析を示す。2'異性体と3'異性体の比率は0.06:0.94であった。



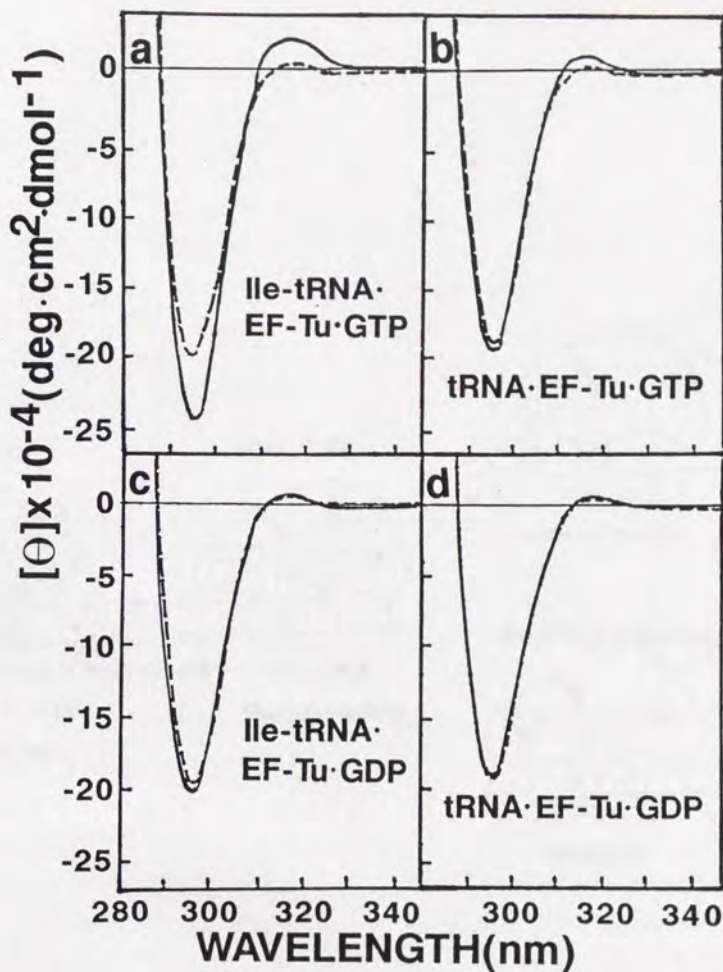


図4.6. オーロドックス存在下でのEF-Tuと複合体を形成したtRNAのCDスペクトル

a. Ile-tRNAとEF-Tu·GTP b. uncharged tRNAとEF-Tu·GTP  
c. Ile-tRNAとEF-Tu·GDP d. uncharged tRNAとEF-Tu·GDP  
の組合せについて、100  $\mu$ Mのオーロドックス存在下でCDスペクトルの測定を行った。破線はtRNA単独の場合のスペクトルを示し、実線はtRNAとEF-Tuとの複合体のスペクトルからEF-Tuのみの場合のスペクトルを差し引いたスペクトルを示す。

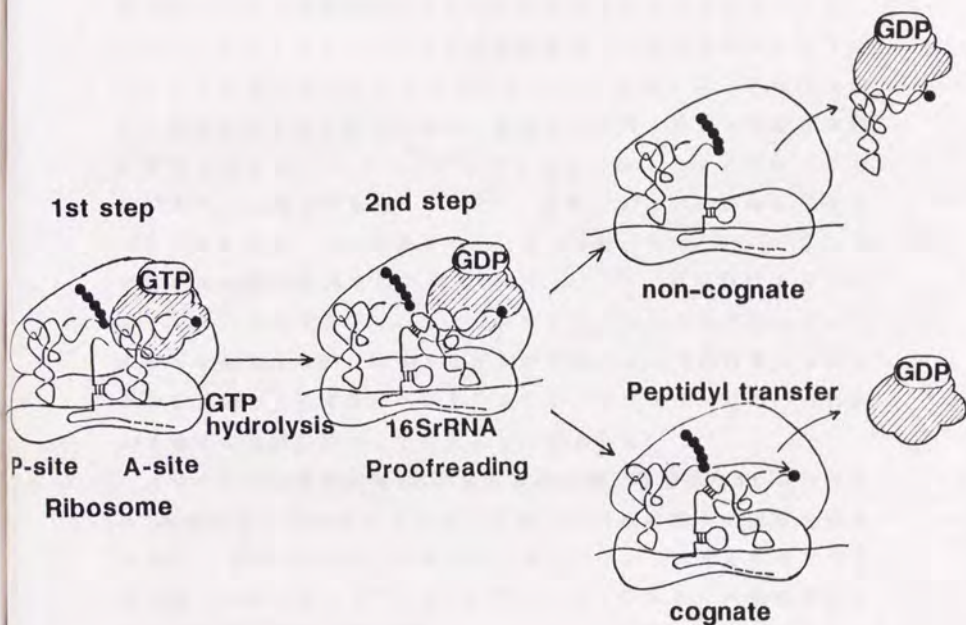


図4.7. アミノアシルtRNAのAサイト結合の過程のモデル  
 三重複合体がAサイトに結合したときには、アミノアシルtRNAのTループとDループとの会合は開裂しておらずこの状態で第1段階の「校正」が行われる。アミノアシルtRNAのTループとDループとの会合はGTPの加水分解に伴って開裂し、16SrRNAと結合する。EF-Tu・GDPはアミノアシル基と相互作用して、ペプチド鎖転移反応に移行するのを抑制し、その間に第2段階の「校正」が行われる。そして、コドンとアンチコドンとの対応が正しい場合のみ次のペプチド鎖転移反応に移行する。

### 5. 1. 序

かつては、リボソームの機能はリボソームタンパク質が担っており、リボソームRNAは単にリボソームタンパク質のアセンブリーやリボソームの構造維持をしているにすぎないと考えられていた。しかし、最近リボソームRNAが翻訳機能そのものにも関わっていることがあきらかになってきている。16SrRNAは、mRNAのSD配列と相補的な配列を持ち、翻訳開始位置の決定に重要な役割を果たしている<sup>(60)</sup>。アミノアシルtRNAはAサイトにおいて16SrRNAと相互作用している<sup>(67)</sup>。また、アミノアシルtRNAのCCA末端が、ペプチジルトランスフェラーゼ中心において23SrRNAと相互作用すると考えられている<sup>(67)</sup>。抗生物質エリスロマイシンやクロラムフェニコールはペプチジルトランスフェラーゼの作用を阻害するが、23SrRNAの変異によって抵抗性となることから、23SrRNAはペプチジルトランスフェラーゼの作用において重要な役割を果たしているものと思われる<sup>(61, 62)</sup>。

$\alpha$ サルシンは真核生物の28SrRNAおよび大腸菌の23SrRNAの3'末端に近い部分のステムアンドループ構造の特定の部分を切断する<sup>(63)</sup> (図5.1.a, b)。 $\alpha$ サルシンによってrRNAが切断をうけたリボソームには、EF-Tu-GTPとアミノアシルtRNAの複合体が結合することができない<sup>(64)</sup>。また、リシンA鎖は $\alpha$ サルシンによる切断をうけるのと同じrRNAの部分の特定の残基の塩基とリボースとの結合を切断する<sup>(65)</sup>。リシンの作用うけたリボソームにはEF-Tu-GTPとアミノアシルtRNAの複合体は結合することできるが、GTPの加水分解をひきおこすことができない<sup>(66)</sup>。 $\alpha$ サルシンとリシンA鎖は以上のような機構を通じて毒素として働くため23SrRNAのこの部分は毒素ドメインと呼ばれる。EF-TuとEF-Gはリボヌクレアーゼによる切断から毒素ドメインを保護することが最近明らかになり<sup>(6)</sup>、毒素ドメインはEF-Tuに直接作



用して，その機能に関わっていることが示唆されている．しかし，実際に E F - T u と毒素ドメインが結合するかどうかは知られていない．

本研究では，高度好熱菌の毒素ドメインに相当する合成 R N A オリゴマー（図5.1.c）と E F - T u とが実際に結合することを，クロスリンクによって明らかにした．

## 5. 2. 材料と方法

### 5.2.1. 材料

高度好熱菌の E F - T u と大腸菌の t R N A <sup>i</sup> の精製は 2.2.1. 項に従って行った．

### 5.2.2. 毒素ドメイン R N A の化学合成

Milligen Bio Search 社の Cyclone Plus 3000 型 D N A 合成機を用い，ホスホアミダイト法により，32mer の毒素ドメイン R N A の合成を行った．Sephadex G25 を用いて脱塩を行い，TOSOH Oligo-pack-ODS カラムを用いた H P L C により精製した．

### 5.2.3. R N A オリゴマーの 5'-<sup>32</sup>P ラベル

R N A オリゴマー 0.2 OD ユニットと 12m M Tris-HCl (pH 7.5)，15m M MgCl<sub>2</sub>，15m M β-メルカプトエタノール，5 μmol [γ-<sup>32</sup>P] A T P (5000 Ci/mmol)，2 ユニット ポリヌクレオチドキナーゼを含む溶液 10 μl を 30 分間インキュベートすることにより行い，未反応の A T P をポリアクリルアミド電気泳動により除去した．

### 5.2.4. クロスリンキング

クロスリンキングは，10m M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2)，5m M MgSO<sub>4</sub>，0.005% 1-0-オクチル-β-D-グルコピラノシド，20 μM β-メルカプトエタノール，0.7m M trans-diaminedichloro-platinum(II) (trans-DDP)，8.3 μM Ile-tRNA<sup>i</sup> または uncharged

tRNA<sup>i10</sup>, 16  $\mu$ M EF-Tu·GTPまたはEF-Tu·GDP, 10  $\mu$ M [5'-<sup>32</sup>P]毒素ドメイン (3.7 kBq/mmol) を含む溶液 10  $\mu$ l を, 暗所において室温で2.5時間反応を行った. 毒素ドメインのみ, 毒素ドメインとtRNA, 毒素ドメインとEF-Tu, および毒素ドメインと16  $\mu$ Mの牛血清アルブミンの組合せについても同様にクロスリンク反応を行った. 7.5%ポリアクリルアミド電気泳動とオートラジオグラフィによってクロスリンクされた複合体を検出した.

### 5. 3. 結果

図2にクロスリンク反応の結果を示す. レーン2はクロスリンク反応を行った毒素ドメインを示し, ゲルのウエルの部分にバンドが見られた. レーン1はクロスリンク反応を行わなかった場合の毒素ドメインを示し, 毒素ドメインの本来の泳動位置にバンドがみられた. 毒素ドメインとtRNAの組合せ (レーン3) では, 本来の毒素ドメインの泳動位置にバンドが見られた. 毒素ドメインとEF-Tu·GDP, EF-Tu·GTPの組合せ (それぞれレーン4, 5) では, ゲルのウエルの部分と, クロスリンクされた複合体に由来すると考えられるバンド (矢印Aの位置) が見られた. 後者のバンドの濃度は, EF-Tu·GDPの場合のほうがEF-Tu·GTPの場合と比較して濃かった. 毒素ドメインとEF-Tu·GDPおよびuncharged tRNA<sup>i10</sup> (レーン6), 毒素ドメインとEF-Tu·GDPおよびIle-tRNA<sup>i10</sup> (レーン7), 毒素ドメインとEF-Tu·GTPおよびuncharged tRNA<sup>i10</sup> (レーン8), 毒素ドメインとEF-Tu·GTPおよびIle-tRNA<sup>i10</sup> (レーン9) の場合は, クロスリンクされた複合体に由来すると考えられるバンド (矢印Aの位置) が見られた. このバンドの濃度は, EF-Tu·GDPの場合のほうが, EF-Tu·GTPの場合と比較して濃かった. また, このバンドの位置は, [5'-<sup>32</sup>P]tRNA<sup>i10</sup>とEF-Tu·GDPとのクロスリンクされた複合体 (レーン12) のバンドの位置とほとんど同じであった (レーン11). 毒素ドメインと牛血清アルブミンの組合せでは, クロスリンクされた複合体に由来すると考えられるバンドはみられなかった (レーン

## 5. 4. 考察

毒素ドメイン単独でクロスリンク反応を行った場合、ゲルのウェルの部分にバンドが見られるのは、毒素ドメイン同士が結合しやすく、またクロスリンカーの量が過剰にあるために、多量体を形成してしまったものと解釈される。tRNAや牛血清アルブミンを共存させると、クロスリンカーの量が減るために、多量体の形成が起こらないと考えられる。EF-Tuの存在下で多量体の形成が起こっているのは、IleRSの場合も同様な現象が見られたので (data not shown), EF-Tuにはクロスリンカーがあまり結合しないためと思われる。

EF-Tu·GDP, EF-Tu·GTP存在下では、毒素ドメインが多量体を形成したバンドの他に、EF-Tuと毒素ドメインとがクロスリンクした複合体に由来すると思われるバンドが見られた (図5.2.の矢印Aの位置)。牛血清アルブミンを共存させることにより、多量体の形成が解消された場合にも、このバンドは観測された (data not shown)。したがって、このバンドは毒素ドメイン同志の結合によるものではないと結論された。EF-TuとtRNAが存在している場合にもEF-Tuと毒素ドメインがクロスリンクした複合体と思われるバンドが見られた (図5.2.の矢印Aの位置)。このバンドの位置は、EF-Tuと[5'-<sup>32</sup>P]tRNAがクロスリンクした複合体のバンドの位置とほぼ同じであった。EF-Tu単独で泳動した場合のバンドの泳動位置はこれらのバンドより小さく (data not shown)、EF-TuがtRNAや毒素ドメインと複合体を形成した場合は、電荷の寄与により泳動位置が大きくなると考えられる。以上の結果から、EF-Tuと毒素ドメインとの複合体が検出されていると結論した。さらに、tRNAが存在している場合は存在していない場合に比べて、EF-Tuと毒素ドメインとがクロスリンクした複合体に由来するバンドの泳動度がわずかに大きくなり、ま



たバンドの濃度が濃くなっている，これは，EF-TuともRNAとの複合体に毒素ドメインがクロスリンクした場合には，単独のEF-Tuにクロスリンクした場合に比べ，毒素ドメインのクロスリンクのされかたや，クロスリンクされた後の複合体のコンフォメーションが異なるためと思われる．また，牛血清アルブミンとはクロスリンクによる複合体の形成が見られないので，これらのクロスリンクは非特異的なものではないと結論された．

さらに，毒素ドメインとEF-Tuとのクロスリンクされた複合体に由来するバンドの濃度はEF-Tu·GDPの場合のほうがEF-Tu·GTPの場合と比較して濃いので，毒素ドメインはEF-Tu·GTPよりもEF-Tu·GDPに強く結合すると思われる．EF-Tuによる23S rRNAの化学修飾からの保護の実験において，キロマイシン（オーロドックスの類似物質）存在下でEF-Tu·GDPが毒素ドメインを保護するが，EF-Tu·GTPγS（GTPγSはGTPの非水解アナログ）は保護しないことが報告されている<sup>23</sup>．毒素ドメインが切断されると，三重複合体はリボソームに結合できなくなることが知られているので<sup>24</sup>，EF-Tu·GTPγSは毒素ドメインと結合すると考えられる．したがってEF-Tu·GTPγSが毒素ドメインを化学修飾から保護できないのは，EF-Tu·GTPγSは毒素ドメインと結合するが，EF-Tu·GDPよりは結合が弱いいため，十分に化学修飾から保護できないためと考えられる．

以上の結果から，毒素ドメインが実際にEF-TuおよびEF-TuともRNAの複合体に結合することが初めて示された．さらに毒素ドメインがEF-Tu·GDPともRNAの複合体にも結合することから，EF-TuがGTP加水分解の前後を通じて毒素ドメインと結合することが示唆された．GTPの加水分解後がブルーフリーディングが行われている間，EF-Tu·GDPはリボソームRNAと結合することによりリボソームにとどまっていられると考えられる．



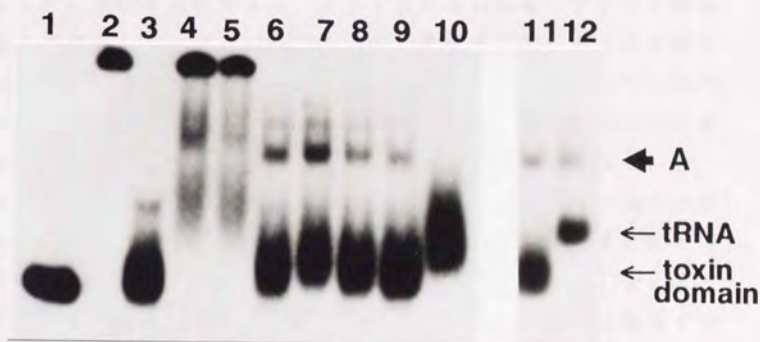


図5.2. 毒素ドメインとEF-Tuのクロスリンクによる結合の検出  
 1. クロスリンク反応を行わなかった毒素ドメイン 2. 毒素ドメインのみクロスリンク反応を行った場合 3. 毒素ドメインとtRNA 4. 毒素ドメインとEF-Tu·GDP 5. 毒素ドメインとEF-Tu·GTP 6. 毒素ドメインとEF-Tu·GDPおよびuncharged tRNA<sup>10</sup> 7. 毒素ドメインとEF-Tu·GDPおよびIle-tRNA<sup>10</sup> 8. 毒素ドメインとEF-Tu·GTPおよびuncharged tRNA<sup>10</sup> 9. 毒素ドメインとEF-Tu·GTPおよびIle-tRNA<sup>10</sup> 10. 毒素ドメインと牛血清アルブミン 11. 毒素ドメインとEF-Tu·GDPおよびuncharged tRNA<sup>10</sup> 12. [5'-<sup>32</sup>P]tRNA<sup>10</sup>とEF-Tu·GDP



## 結語

本研究によって、EF-TuのアミノアシルtRNAのリボソームへの結合段階における役割および、EF-Tuのリボソームにおける役割の解明に寄与できたと思われる。

アミノアシル化の段階においては、アミノアシル基がtRNAの2'位および3'位の水酸基のどちらに結合した場合も存在するが、EF-Tuはアミノアシル基と相互作用することにより、3'位がアミノアシル化されたアミノアシルtRNAのみをペプチド鎖転移反応の基質としてリボソームに供給する働きをしていることが明らかとなった。さらに、EF-TuはtRNAの種類によってバラエティのあるコンフォメーションをそろえ、Aサイトへの結合に必要な堅固なL字型構造にする役割を持つことが明らかとなった。

リボソームにおいては、EF-Tuに結合したGTPの加水分解後もEF-Tu·GDPはリボソームにとどまり、アミノアシル基と相互作用することにより、すぐにはペプチド鎖転移反応に移行しないようにして、そのあいだにコドンとアンチコドン対の正確さを確認する時間を確保する役割を持つことが明らかになった。さらに、EF-Tu·GDPは23S rRNAとの相互作用を通じてがリボソームにとどまっていられることが示唆された。

しかし、EF-Tuの機能についてはまだ完全には理解されたいはいえず、さらに研究を進める必要がある。アミノアシルtRNAのTループとDループとの会合がAサイト結合のどの段階で開裂するか不明であり、フットプリンティングなどの手法で明らかにする必要がある。また、「校正」の段階でコドンとアンチコドンの対合がどのように確認されているのかよくわかっていない。この問題は本研究におけるオーロドックスを用いた手法を、 $^{32}\text{P}$ でラベルしたtRNAを用いることなどによって改良し、コドンとアンチコドンの対合が正しい場合と正しくない場合について応用することにより解明が進むと期待される。また、アミノアシルtRNAとリボソーム

ムおよびEF-Tuがどのように相互作用することにより、アミノアシルtRNAのAサイト結合やコドンとアンチコドン対の形成が行われるかについては、まだ解明されていないことが多い。その解明のためには、EF-TuやtRNAの改変などの分子生物学的手法や、抗生物質やフットプリンティングを用いた生化学的手法を総動員して研究を進める必要があると考えられる。リボソーム上でどのような現象が起こっているかは、最近少しずつ明らかになりつつあり、今後飛躍的な発展が予想される。さらに、サブレーションやフレームシフト、翻訳レベルにおける発現調節など、リボソームがからんだ重要な現象の解明が期待される。

## 略号

- E F - T u : polypeptide chain elongation factor Tu  
E F - T s : polypeptide chain elongation factor Ts  
A R S : aminoacyl-tRNA synthetase  
I l e R S : isoleucyl-tRNA synthetase  
P h e R S : phenylalanyl-tRNA synthetase  
I l e - t R N A : isoleucyl-tRNA  
P h e - t R N A : phenylalanyl-tRNA  
G l u - t R N A : glutamyl-tRNA  
V a l - t R N A : valyl-tRNA  
H P L C : High Performance Liquid Chromatography  
A c I l e - A d o : N-acetyl isoleucyl adenosine  
A c P h e - A d o : N-acetyl phenylalanyl adenosine  
G T P  $\gamma$  S : guanosine-5'-thiotriphosphate  
S<sup>2</sup>T : 2-thioribothymidine  
m m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U : 5-methylaminomethyl-2-thiouridine  
S<sup>4</sup>U : 4-thiouridine  
C D : circular dichroism  
N M R : nuclear magnetic resonance  
m<sup>7</sup>G : 7-methylguanosine  
T : ribothymidine  
trans-DDP : trans-diaminedichloroplatinum(II)  
m<sup>1</sup>A : 1-methyladenosine  
 $\Psi$  : pseudouridine  
G M P P N P : guanylimide diphosphate  
B S A : bovine serum albumin  
T P C K : N-tosyl-phenylalanyl chloromethyl ketone  
E F - G : polypeptide chain elongation factor G  
T C A : trichloroacetic acid



# REFERENCES

- [1] Kaziro, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 505, 95-127.
- [2] Taiji, M., Yokoyama, S. and Miyazawa, T. (1985) *J. Biochem.* 98, 1447-1453.
- [3] Helk, B., Sprinzl, M. (1985) *Nucleic Acid Res.* 13, 6283-6298.
- [4] Hughes, D. (1987) *J. Mol. Biol.* 197, 611-615.
- [5] Vijgenboom, E. and Bosch, L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13012-13017.
- [6] Hopfield, J.J. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4135-4139.
- [7] Thompson, R.C., Dix, D.B. and Karim, A.M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4868-4874.
- [8] Wolf, H., Chinali, G. and Parmeggiani, A. (1977) *Eur. J. Biochem.* 75, 67-75.
- [9] Moazed, D., Robertson, J.M. and Noller, H.F. (1988) *Nature* 334, 362-364.
- [10] Sprinzl, M. and Wagner, T. (1979) in: *TRANSFER RNA: Structure, Properties, and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J. N. eds) pp. 473-485, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [11] Hecht, S.M. (1979) in: *TRANSFER RNA: Structure, Properties, and Recognition* (Schimmel, P.R., Soll, D. and Abelson, J. N. eds) pp. 345-360, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- [12] Cramer, F. and Freist, W. (1983) in: Nucleic Acids: The Vector of Life (Pullman, B. and Jortner, J. eds), pp 353-364, D. Reidal Publishing Company, Israel.
- [13] Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) Nature 347, 203-206.
- [14] Taiji, M., Yokoyama, S., Higuchi, S. and Miyazawa, T. (1981) J. Biochem. 90, 885-888.
- [15] Taiji, M., Yokoyama, S. and Miyazawa, T. (1983) Biochemistry 22, 3220-3225.
- [16] Hecht, S.M., Kozarich, J.W. and Schmidt, F.J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4317-4321.
- [17] Chladek, S., Ringer, D. and Quiggle, K. (1974) Biochemistry 13, 2727-2735.
- [18] Zubay, H. (1962) J. Mol. Biol. 4, 347-356.
- [19] Yarus, M. and Barrell, B.G. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 729-734.
- [20] Nishimura, S. (1971) in: Procedures in Nucleic Acid Research (Cantoni, G.L. and Davies, D.R. eds) Vol 2, pp542-564, Harper & Row, New York.
- [21] Kawakami, M., Miyazaki, M., Yamada, H. and Mizushima, S. (1985) FEBS Lett. 185, 162-164.
- [22] Kohno, T., Kohda, D., Haruki, M., Yokoyama, S. and Miyazawa, T. (1990) J. Biol. Chem. 265, 6931-6935.
- [23] Lucas-Lenard, J. and Haenni, A.-L. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59, 554-560.
- [24] Arai, K., Ota, Y., Arai, N., Nakamura, S., Henneke, C., Oshima, T. and Kaziro, Y. (1978) Eur. J. Biochem. 92, 509-519.

- [25] Nakamura, S., Ohta, S., Arai, K., Arai, N., Oshima, T. and Kaziyo, Y. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 533-543.
- [26] Gulewicz, K., Faulhammer, H.G. and Sprinzl, M. (1981) *Eur. J. Biochem.* 121, 155-162.
- [27] Nakano, A., Miyazawa, T., Nakamura, S. and Kaziyo, Y. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 233-238.
- [28] Nakano, A., Miyazawa, T., Nakamura, S. and Kaziyo, Y. (1980) *Biochemistry* 19, 2209-2215.
- [29] Fischer, W., Derwenskus, K.-H. and Sprinzl, M. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125, 143-149.
- [30] Watanabe, K., Oshima, T. and Nishimura, S. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 1703-1713.
- [31] Watanabe, K., Kuchino, T., Yamaizumi, Z., Kato, M., Oshima, T. and Nishimura, S. (1979) *J. Biochem.* 86, 893-905.
- [32] Watanabe, K., Oshima, T., Iijima, K., Yamaizumi, Z. and Nishimura, S. (1980) *J. Biochem.* 87, 1-13.
- [33] Yokoyama, S., Watanabe, K. and Miyazawa, T. (1987) *Adv. Biophys.* 23, 115-147.
- [34] Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S. and Miyazawa, T. (1986) *Biochemistry* 25, 7031-7036.
- [35] Donis-Keller, H., Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 2527-2538.
- [36] Wikman, F.P., Romby, P., Metz, M.H., Reinbolt, J., Clark, B.F.C., Ebel, J.P., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5787-5801.
- [37] Peter, M.E., Brochmoller, J., Jonak, J. and Sprinzl, M. (1989) *FEBS Lett.* 257, 219-222.



- [38] Shang, Z., Liao, Y.-D., Wu, F.Y.-H. and Wu, C.-W. (1989)  
Biochemistry 28, 9790-9795.
- [39] Jonak, J. and Karas, K. (1989) FEBS Lett. 251, 121-124.
- [40] Yokoyama, S., Usuki, K.M.J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and  
Miyazawa, T. (1980) FEBS Lett. 119, 77-80.
- [41] Horie, N., Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S., Watanabe, K.,  
Kuchino, Y., Nishimura, S. and Miyazawa, T. (1985)  
Biochemistry 24, 5711-5715.
- [42] Quigley, G.J. and Rich, A. (1976) Science 194, 796-806.
- [43] Janiak, F., Dell, V.A., Abrahamson, J.K., Watson, B.S.,  
Miller, D.L. and Johnson, A.E. (1990) Biochemistry 29, 4268-  
4277.
- [44] Jonak, J., Pokorna, K., Meloun, B., Karas, K. (1986) Eur. J.  
Biochem. 154, 355-362.
- [45] Jonak, J. and Rychlik, I. (1973) Biochim. Biophys. Acta 324,  
554-562.
- [46] Ott, G., Schiesswohl, M., Kieseewetter, S., Forster, C.,  
Arnold, L., Erdmann, V.A. and Sprinzl, M. (1990) Biochim.  
Biophys. Acta 1050, 222-225.
- [47] Haruki, M., Matsumoto, R., Hara-Yokoyama, M., Miyazawa, T.  
and Yokoyama, S. (1990) FEBS Lett. 263, 361-364.
- [48] Jorgensen, T., Siboska, G.E., Wikman, F.P. and Clark, B.F.C.  
(1985) Eur. J. Biochem. 153, 203-209.
- [49] Thompson, R.C. and Dix, D.B. (1982) J. Biol. Chem. 257,  
6677-6682.
- [50] Chinali, G., Wolf, H. and Parmeggiani, A. (1977) Eur. J.  
Biochem., 55-65.
- [51] Gestelnd, R.F. (1966) J. Mol. Biol. 16, 67-84.

- [52] Reiner, A.M. (1969) *J. Bacteriol.* 97, 1437-1443.
- [53] Rheinberger, H.J., Schilling, S. and Nierhaus, K.H. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 421-428.
- [54] Thompson, R.C. and Karim, A.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4922-4926.
- [55] Dell, V.A., Miller, D.L., Johnson, A.E. (1990) *Biochemistry* 29, 1757-1763.
- [56] Haenni, A.L. and Lucas-Lenard, J. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 1363-1369.
- [57] Moazed, D. and Noller, H.F. (1989) *Cell* 57, 585-597.
- [58] Moazed, D. and Noller, H.F. (1990) *J. Mol. Biol.* 211, 135-145.
- [59] Moazed, D. and Noller, H.F. (1986) *Cell* 47, 985-994.
- [60] Schneider, T.D., Stormo, G.D., Gold, L. and Ehrenfeucht, A. (1986) *J. Mol. Biol.* 188, 415-431.
- [61] Sigmund, C., Ettayebi, E. and Morgan, E.A. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 4653-4663.
- [62] Vester, B. and Garrett, R.A. (1988) *EMBO J.* 7, 3577-3587.
- [63] Endo, Y. and Wool, I.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9054-9060.
- [64] Vazquez, D. (1979) in: *Inhibitor of Protein Biosynthesis* pp. 80-81, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [65] Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. and Tsurugi, K. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 5908-5912.
- [66] Olsnes, S., Refsnes, K. and Phil, A. (1974) *Nature* 249, 627-631.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始温かい御指導と励ましを頂いた指導教官の東京大学助教授 横山茂之先生に感謝致します。

修士課程での指導教官であり、博士課程においても数々の貴重な助言を頂いた東京大学名誉教授（現横浜国立大学教授） 宮澤辰雄先生に感謝致します。

また、実験や研究の方法について親身になって御指導頂いた東京大学助手 武藤 裕先生に感謝致します。

高度好熱菌の E F - T u の精製や E F - T u の実験について、実際に御指導頂いた、当研究室 O B の松本理恵子氏に大変感謝致します。

2', 3' 特異性決定のための AcIle-Ado, AcPhe-Ado, リボソームを使わせて頂いた当研究室 O B の泰地睦夫博士に感謝致します。

N M R の測定その他公私にわたって親身になって御指導頂いた横浜国立大学助手 河合剛太先生に感謝致します。

C D の測定や研究の方法について実際に親身になって御指導頂いた日本大学助手 横山三紀先生に感謝致します。

高度好熱菌の E F - T u の精製法について御指導頂き、貴重な助言を頂いた東京大学名誉教授（現 D N A X 研究所）の上代淑人先生に感謝致します。

オーロドックスの入手にご尽力頂いたふくべ薬品の大湯慎二氏、日本ロシュ株式会社の館林美智子氏、オーロドックスを分譲して頂いた Hoffman La Roche 社に感謝致します。

最後に、研究生活全般にわたり、大変お世話になった横山研究室と宮澤研究室の皆様は厚く感謝致します。



