

アミノアシル tRNA 合成酵素による
tRNA の認識機構

平成5年3月 博士(理学)申請

東京大学大学院 理学系研究科
生物化学専攻

濡 木 理

①

学 位 論 文

<<Mechanism of tRNA-Recognition by
Aminoacyl-tRNA Synthetase>>

(アミノアシル tRNA 合成酵素による
tRNA の認識機構)

平成 5 年 3 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学 専攻
<濡木 理>

指導教官 横山 茂之

目次

序章	1
第1章 tRNAのアイデンティティー決定因子の研究	
1.1. 序	12
1.2. 材料と方法	
1.2.1. 試薬および酵素	15
1.2.2. 大腸菌tRNA ^{11*} , tRNA ^{Met} , tRNA ^{Glu} の調製	15
1.2.3. T7 RNA polymerase の精製	16
1.2.4. tRNAの <i>in vitro</i> 転写物の精製	16
1.2.5. tRNA変異体の作成	16
1.2.6. 大腸菌 IleRS の精製	16
1.2.7. 高度好熱菌MetRS, GluRSの精製	17
1.2.8. tRNA末端の放射能標識	18
1.2.9. RNaseプローブを用いたtRNAのフットプリンティング	18
1.2.10. N-nitroso-N-ethylureaを用いたtRNAのフットプリンティング	19
1.2.11. Eckstein 法によるtRNAのフットプリンティング	20
1.2.12. 変異体tRNA ^{11*} の反応速度定数の解析	20
1.2.13. 修飾塩基を ¹³ CラベルしたtRNSの ¹³ C-NMR解析	21
1.3. 結果と考察	
1.3.1. tRNA ^{11*} のN-nitroso-N-ethylureaを用いたフットプリンティング	22
1.3.2. tRNA ^{11*} の <i>in vitro</i> 転写物のEckstein法によるフットプリンティング	24
1.3.3. tRNA ^{11*} のイソロイシン受容活性における修飾塩基の役割	24
1.3.4. tRNA ^{11*} 変異体の <i>in vitro</i> 転写物の反応速度定数解析	25
1.3.5. 大腸菌tRNA ^{11*} のアイデンティティー決定因子	30
1.3.6. tRNA ^{11*} のミニヘリックス, マイクロヘリックスの イソロイシン受容活性	30
1.3.7. tRNA ^{Met} のイソロイシン受容tRNAへの変換	31
1.3.8. IleRSによる認識に伴うtRNA ^{11*} のlocalな構造変化と	32

globalな構造変化	
1.3.9. tertiary base pairの変異体の反応速度論的解析	32
1.3.10. TΨCアームを欠失したtRNA ¹¹⁰ のイソロイシン受容活性	33
1.3.11. tRNA ¹¹⁰ の2ドメインへの分断	33
1.3.12. IleRSによるtRNA ¹¹⁰ の動的な認識機構	34
1.3.13. フットプリンティングによるtRNA ^{Met} ・MetRS複合体の解析	35
1.3.14. ¹³ C-NMRを用いたtRNA ^{Glu} ・GluRS複合体の解析	37
1.4. 結論	38
図表	41
第2章 高度好熱菌のアミノアシルtRNA合成酵素遺伝子のクローニングと変異体解析	
2.1. 序	78
2.2. 材料と方法	
2.2.1. 菌体	79
2.2.2. 試薬・酵素	79
2.2.3. 高度好熱菌MetRS, GluRS遺伝子のクローニング	79
2.2.4. 高度好熱菌MetRS, GluRS遺伝子の <i>大腸菌</i> での大量発現系の構築	80
2.2.5. 高度好熱菌IleRS遺伝子のクローニング	80
2.2.6. 高度好熱菌MetRS, GluRSの変異体の作成	80
2.2.7. 高度好熱菌MetRS, GluRS変異体の反応速度定数の測定	81
2.3. 結果と考察	
2.3.1. 高度好熱菌metS遺伝子の塩基配列	82
2.3.2. 高度好熱菌MetRSと他の生物由来のMetRSのアミノ酸配列相同性	82
2.3.3. 高度好熱菌MetRSのTrp-227変異体の反応速度定数解析	85
2.3.4. class I MetRSサブファミリーのアミノ酸配列相同性	85
2.3.5. IleRSのLeuジッパー様モチーフ	86
2.3.6. 高度好熱菌gltX遺伝子の塩基配列	87
2.3.7. 高度好熱菌GluRSと他の生物由来のGluRSのアミノ酸配列相同性	87
2.3.8. class I GluRSサブファミリーのアミノ酸配列相同性	87
2.3.9. 高度好熱菌GluRSのLys-309, Trp-312変異体の解析	89

第3章 アミノアシルtRNA合成酵素のZn ²⁺ 結合モチーフの機能構造の解析	
3. 1. 序	112
3. 2. 材料と方法	
3.2.1. 試薬	113
3.2.2. 高度好熱菌のARSの調製	113
3.2.3. 大腸菌のARSの調製	114
3.2.4. 高度好熱菌および大腸菌のtRNAの調製	114
3.2.5. ARSのCys残基の化学修飾と遊離したZn ²⁺ イオンの検出	114
3.2.6. アミノアシル化反応の活性測定	115
3. 3. 結果と考察	
3.3.1. 高度好熱菌MetRSの化学修飾とZn ²⁺ イオンの遊離	116
3.3.2. MetRS変異体の化学修飾を用いた解析	116
3.3.3. 高度好熱菌MetRS変異体における アミノアシル化反応の反応速度論的解析	117
3.3.4. Zn ²⁺ フィンガー様モチーフ近傍に存在する塩基性アミノ酸のクラスター	118
3.3.5. MetRSのZn ²⁺ フィンガー様モチーフの機能・構造相関	118
3.3.6. アミノアシルtRNA合成酵素のZn ²⁺ 結合モチーフ	120
3.3.7. 大腸菌および高度好熱菌IleRSのZn ²⁺ 結合モチーフの機能・構造相関	120
3.3.8. 大腸菌ThrRSのZn ²⁺ 結合モチーフの機能・構造相関	122
3.3.9. 大腸菌PheRSのZn ²⁺ 結合モチーフの機能・構造相関	123
3.3.10. 大腸菌ArgRSの化学修飾	123
3.3.11. 高度好熱菌GluRSおよび大腸菌AspRSの化学修飾	124
3.3.12. 結論	125
図表	126
第4章 アミノアシルtRNA合成酵素の高分解能結晶の作成とX線結晶構造解析	
4. 1. 序	141
4. 2. 材料と方法	

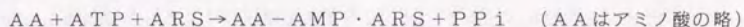
4.2.1. 試薬など	142
4.2.2. 高度好熱菌のGluRS, MetRSの結晶化用標品の調製	142
4.2.3. 大腸菌IleRSの精製	143
4.2.4. 結晶化	143
4.2.5. 種結晶法 (seeding)	143
4.2.6. 結晶のmountingとプレセッション写真による解析	144
4.2.7. 重原子同形置換体の作成	144
4.2.8. データコレクション	144
4.2.9. X線結晶構造解析	145
4.2.10. レーザー散乱を用いた結晶化の診断法	145
4.3. 結果と考察	
4.3.1. 高度好熱菌GluRSの結晶多形と高分解能結晶の作成	147
4.3.2. 高度好熱菌GluRS結晶の重原子リサーチ	150
4.3.3. 高度好熱菌GluRSのX線結晶構造解析	151
4.3.4. 高度好熱菌MetRSの高分解能結晶の作成	153
4.3.5. 高度好熱菌MetRSと大腸菌tRNA ^{Phe} の複合体の結晶化	154
4.3.6. レーザー光散乱診断法を用いた大腸菌IleRSの結晶化	155
図表	157
第5章 総合討論	189
図表	208
略号	218
Reference	219
謝辞	229

1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in approximately 20 horizontal lines across the page.

序章

最近になって生命の原始体系はRNAワールドであるとする説がでてきたが、その制限された体系を現存の生物の持つ多種多様なシステムに発展せしめたのはタンパク質であり、その接点に位置するものがタンパク質合成系である。この生物にとって最も基本的な働きの一つであるタンパク質合成の中枢をなすものは、mRNA上の遺伝暗号(コドン)に對するtRNAであり、tRNAのCCA(3')末端にアミノ酸を結合させるアミノアシルtRNA合成酵素(ARS)である。ARSは、20種類のアミノ酸1つ1つに對しておよそ1分子種ずつ存在し、特異的なtRNAに特異的なアミノ酸を、しかし以下の共通な反応によって結合させる。



したがって、ARSがそれと特異的なアミノ酸とtRNAの両方を厳密に認識することこそ、正確な遺伝暗号の翻訳にとって必須である。

アミノ酸に対する認識は、一般の酵素で見られるような基質に特異的なポケットを想定することで、一応の解釈をつけることができると考えられる。ただARSには、非特異的なアミノ酸を積極的に排除する校正機構があり、これにより認識を厳密化していることが知られている [Fersht et al., 1977]。

tRNAの認識機構は、さらに複雑であると考えられる。tRNA自身が分子量約2万5千の高分子であるうえに、どのtRNAも共通なL字型の3次構造をとっている。さらに多くのアミノ酸では、複数のコドンに對して数種のtRNAが存在し、ARSはそのどれもに正しいアミノ酸を結合させなければならない。これらのことから、ARSは、對するtRNAと(水素結合や、静電的・疎水的相互作用により)80Åにもわたって広範に結合し、tRNA上の独特な目印を認識して、他のtRNAから識別していると考えられる。さらに、「特異的なtRNAと結合することによってはじめて、ARSは對するL-アミノ酸を結合し、アミノアシルAMPの合成を開始する」という現象が、アルギニン、グルタミンおよびグルタミン酸の系で明らかになっている [Kern & Lapointe, 1979; Hara-Yokoyama et al., 1986]。多くのtRNAではアンチコドンがARSによる主な認識部位であると考えられることから(第1章)、これらの系では、tRNAのアンチコ

ドンの結合が引金となって、ARSとtRNAの高次構造変化が引き起こされ、80Åも離れたARSの触媒部位が活性化されると考えられる。したがって、ARSによるtRNAの認識には、tRNAおよびARSの高次構造変化を伴った動的な機構を想定する必要があると考えられる。

アイデンティティー決定因子

ARSが対応するtRNAを他のtRNAから識別するために認識するtRNA上の目印(ヌクレオシド)を、アイデンティティー決定因子と呼ぶ[Normanly et al., 1986; Yarus, 1988; Normanly & Abelson, 1989; Schimmel, 1989; Schulman, 1991]。アイデンティティー決定因子という概念が確立されてきた背景には「あるアミノ酸に対応するtRNAが、その一部のヌクレオシド残基を置換することにより、他のアミノ酸を受容するtRNAに変換される」という実験事実があった。すなわち本研究室の村松は、RNAの分子整形法を用いて大腸菌tRNA^{Leu}のアンチコドン1字目の修飾塩基L(ライジジン)を未修飾のCに変換したところ、このtRNA^{Leu}変異体(アンチコドンCAU)はコドンAUGに対合するtRNAになっただけでなく、メチオニルtRNA合成酵素(MetRS)によってメチオニンをチャージされるtRNAに変換された[Muramatsu et al., 1988b]。すなわち、アンチコドンのたった1残基の置換によってtRNAのアイデンティティーが変換されてしまったわけである。これと時を同じくして、McClainらのグループとSchimmelらのグループが、アンバーサプレッサーtRNAの系を使うことにより、tRNA^{Arg}のアイデンティティーがG3·U70というたった一对の塩基対によって支配されていることを明らかにした[Hou & Schimmel, 1988; McClain et al., 1988; McClain & Foss, 1988a]。このようにアンバーサプレッサーtRNAの変異体がアンバーコドンをどのアミノ酸に翻訳するようになるかを解析する手法は、またArg, Gln, SerなどのtRNAのアイデンティティー決定因子を決定するのにも用いられてきた[McClain & Foss, 1988b; Shimura et al., 1972; Normanly et al., 1986]。さらにアイデンティティー決定因子の研究を飛躍的に進展させたのは、T7 RNA polymeraseによるtRNA(変異体)のin vitroでの転写系の確立である[Sampson & Uhlenbeck, 1988]。幸いにして、大部分のアミノ酸に対応するtRNAでは、このin vitroでの転写物は修飾の入ったtRNAと同程度のアミノ酸受容活性を持つため、ほとんどのtRNAについて総括的に変異体を合成し、アミノ酸受容活性が調べられた[Shimizu, M., 1992]。こういった手

法により、アンチコドン部位の数残基を置換することで、tRNAのアイデンティティーが完全に交換されてしまう例も見いだされてきた [Schulman & Pelka, 1988; Schulman & Pelka, 1989]. 最近では、Ala, His, Glyの系で見られるように、tRNAのアクセプターステムの配列を持つマイクロヘリックスがアミノアシル化されることが見いだされ [Franklyn & Schimmel, 1990a,b; Franklyn et al., 1992], 多くのアミノ酸の系でtRNAのアクセプターステムにアイデンティティー決定因子が存在することがわかってきた. ただ前述のtRNA^{Met}の例が示す様に、塩基の転写後修飾そのものがtRNAのアイデンティティーを決定しているものもあり [Muramatsu et al., 1988b], このことは今後のアイデンティティー研究の焦点の一つになっている. したがって、これらの研究の蓄積をもとに、tRNAのアイデンティティー決定因子を総括的に把握できる段階が来つつあると考えられる.

さらに、最近、大腸菌のGlnの系と酵母のAspの系で、ARSとtRNAの複合体の結晶が高分解能で解析された [Rould et al., 1989; Rould et al., 1991; Ruff et al., 1991]. これらによれば、tRNAが酵素と結合する際、アイデンティティー決定因子の存在するアンチコドンループおよびアクセプターステムは、塩基対の開裂・形成を伴うような極端な構造変化を起こして酵素の認識を受けていることが明らかになってきた. これらの研究は、ARSによるtRNAの動的な認識機構を解明するうえでの決定的な第一歩であると考えられる. したがって、次なる研究段階は、ARSの側でtRNA認識に関わる機能・構造相関を明らかにすることであると考えられる.

アミノアシルtRNA合成酵素のtRNA認識部位

それでは、ARSの側のtRNA認識機構はどうなっているのか. ARSは同じ形式の反応を触媒するにもかかわらず、その4次構造は、 α , α_2 , α_4 , $\alpha_2\beta_2$ とさまざまであり、また分子量も40,000から260,000 (大腸菌の酵素の場合)といろいろである. 大腸菌については20種類のアミノ酸に対応するすべてのARSの遺伝子がクローニングされ、その1次構造が明らかになったが、お互いのアミノ酸配列相同性はわずかな数のモチーフを除いてほとんど無い. 最近、Serに対応する酵素 (SerRS) のX線結晶解析の結果が報告され、この酵素は、今までに解析されたMetRS, TyrRS, GlnRSが持つような "Rossmann fold" (α -helixを介して平行な β -sheetが折り畳まれた構造) を持たず、ATP結合に寄与するまったく新しい構造 (逆平行 β -sheet) をもつことが明らか

になった(図1) [Cusack et al., 1990]。さらに、この結果を裏づけるように、ATP結合に関与するモチーフおよび基本構造の相同性から、ARSは2つのグループに分けられるという仮説が出された [Eriani et al., 1989]。すなわち、"Rossmann fold"を持つクラスIのARSと逆平行 β -sheetを持つクラスIIのARSである(図1)。このクラス分けは、さらに、酵素のドメインのトポロジーの相違(N端、C端のいずれがアミノアシル化のドメインでいずれがtRNAの認識に関わるドメインか)とも一致する可能性があり分子進化と密接に関係していることが提唱されてきている。今後このARSのクラス分けとtRNAの認識機構の相関が研究の一つの焦点となると思われる。

これに対し、ARSのtRNA認識部位に関する分子構造レベルでの研究は非常に遅れている。その原因の一つは、ARSの結晶化が容易でなく、構造に関する情報が乏しいことである。さらに機能解析面での原因として、ARSの変異体を細胞内で大量発現させるとタンパク質合成に誤りが生じて細胞の致死につながることで、さらに、そもそも細胞におけるARSの発現量は高いため、変異体と野性型の酵素を分離して解析を行うのが困難であることなどが挙げられる。本研究室では、早くから高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8のARSを用いた解析を行っており、高度好熱菌のARSは大腸菌のtRNAを十分に効率よくアミノアシル化することを見いだしている [Kohda et al., 1984, 1987; Hara-Yokoyama et al., 1984, 1986]。高度好熱菌のARSは37°Cでは活性が低いため、高度好熱菌のARS遺伝子をクローニングしてこれに変異を導入し大腸菌で大量発現すれば、細胞毒性の問題も解決され変異体を効率よく調製できると考えられる。さらに、精製過程の熱処理によって、大腸菌由来の野性型の酵素を熱変性させて除去することもできる。このように、ARSの機能解析に高度好熱菌由来の酵素を用いることは様々な利点があると思われる(高度好熱菌ARSを用いる問題点については、第5章総合討論で詳述する)。

アミノアシルtRNA合成酵素の機能性モチーフ

また、ARSの機能・構造相関が別の面から明らかになる可能性もある。すなわち、最近、転写調節因子など真核生物の核酸結合タンパク質で、共通に存在するいくつかのモチーフが見つかったが、これらのモチーフの構造上の特徴を手がかりにしてコンピュータ解析を行ったところ、いくつかのARSは、これらのモチーフと相同性のある配列を持っていることが示された。例えば、大腸菌のAlaRS、MetRSは、 Zn^{2+} -フィンガーに似た機能性モチーフを持つことが推定された [Berg, 1986]。現にAlaRSに関し

ては、この Cys, His 残基に富む配列を持つ合成ペプチドは、 Zn^{2+} や Co^{2+} イオンと結合することが示された [Miller et al., 1991b]。さらに、この領域は tRNA^{Asp}のアイデンティティ決定因子 (G3-U70) の認識に関わっている可能性も示唆されている [Miller et al., 1991a; Miller & Schimmel, 1992]。また、「7残基ごとに疎水性および親水性のアミノ酸残基が繰り返される」という配列的特徴に基づいてコンピューター解析を行ったところ、大腸菌の AlaRS および SerRS は、Leuジッパー様の coiled-coil 構造を持つことが推定された [Lupas et al., 1991]。現に SerRS の X線結晶構造解析の結果、対応する領域は「Leu-ladder」と呼ばれる 60Å にもおよぶ長い coiled-coil 構造をとっていることが示されている [Cusack et al., 1990]。さらに、この coiled-coil 構造は tRNA^{Asp}の長い variable loop を結合するための構造であることも明らかになってきた [Yaremchuk et al., 1992]。また、最近遺伝子がクローニングされたテトラヒメナの IleRS では、他の生物種の IleRS で Zn^{2+} フィンガー様の配列が保存されている領域に、Leu ジッパー様の配列がとってかわって存在しており、非常に興味深い [Csank & Martindale, 1992]。このことから、これらのモチーフは共通の機能（例えば RNA の結合）を持っていることが推測される。さらに、最近、哺乳類の TrpRS, GlnRS, HisRS の遺伝子がクローニングされ、それらの 1次構造が明らかになった [Garret et al., 1991; Fett & Knippers, 1991; Raben et al., 1992]。それによるとこれらの酵素は、30アミノ酸残基程度の非常に相同性の高いモチーフ（両親媒性ヘリックスと推定される）を持っており、このモチーフは酵母の RNAポリメラーゼやラビットの eRF (beef pancreasの TrpRS と相同性が高い [Garret et al., 1991]) にも見いだされることから、新規の RNA 結合モチーフと考えられている。

このような機能性モチーフの由来はどこに求めればよいのか。ARS の中には、本来のアミノアシル化反応以外の機能を持っているものが見つかっている。数例を挙げるなら、原核、真核を問わず多くの ARS は、リボソームに対する負の調節因子である、ApA を合成する [Goerlich et al., 1982]。また、酵母の GCN2 は HisRS に相同的なドメインを C 端側に持つが、このドメインは uncharged tRNA に応答して、隣接する protein kinase ドメインを活性化し、これにより GCN4 (アミノ酸合成に関わる酵素の遺伝子の転写活性化因子) の発現が翻訳レベルで上昇することで、アミノ酸の需要と供給のバランスをとるのに働いていると考えられている [Wek et al., 1989]。哺乳類の LeuRS は、eIF-2 の α サブユニットのリン酸化（これにより、eIF-2 は GTP 型に戻れなくなる）を調節

することでペプチド合成のInitiationを制御している。また大腸菌のThrRSやMetRSは、細胞内のtRNA濃度が低い時にはそれぞれthrS, metGのmRNA上のtRNAに似た配列を持つ領域に結合して翻訳を抑制することで、tRNAとARSの量比を調節している [Lestienne, 1988; Dardel et al., 1990]。ARS遺伝子の発現制御はこのような自動制御によるだけではなく、大腸菌のヒートショック型のLysRSは leucine-responsive regulatory element (LRP) のような別系統のタンパク質により転写調節されることが最近明らかになり、LysRSがアミノアシル化以外の機能（何らかの制御機構）に関与していることの一つの傍証となっている [Ito et al., 1992]。

さらに翻訳機構の制御だけでなく、Saccharomyces cerevisiaeのLeuRS (NAM2) [Labouesse et al., 1987; Herbert et al., 1988] やNeurospora crassaのTyrRS (cyt-18 gene product) [Akins & Lambowitz, 1987] は、シトクロムbのmRNAのグループ1イントロンのスプライシングに関わっていることが明らかになっている。後者は *in vitro*での実験でも確認されている [Mohr & Lambowitz, 1991]。また前者のLeuRSでは、分子内に2つ存在するZn²⁺フィンガーモチーフが、スプライシング過程でmRNAに結合するのに働いていると考えられている。

ARSは、タンパク質合成が誕生した時点から存在する極めて古い酵素群であるから、はじめはアミノアシル化以外の機能も兼ね備えた多機能酵素であったと考えられる。そのころの名残が、現在のARSのセカンドファンクションとして残っており、あるいは、それらの機能にたざざわった機能的モチーフの一部は、tRNAの認識に転用されていった可能性も考えられる。

そこで、このようなアミノ酸配列上の特徴あるモチーフに着目し解析を行うことも、ARSによるtRNAの認識機構を解明する別のアプローチになり得ると考えられる。

アミノアシルtRNA合成酵素の結晶構造解析

しかし、ARSによるtRNA認識の動的かつ厳密な機構が実際どのようなものであるか、といった究極的な問題は、ARSおよびARS・tRNA複合体の構造解析を行ってはじめて解明することができる。現在主流となっている立体構造解析の手段は、NMRとX線結晶構造解析である。NMRは、部分から全体を組み立てていく解析方法であり、X線結晶構造解析は、全体がまずあって、さらに細かい部分へ掘り下げていくアプローチをとっている。このため、この2つの手法は、視点（部分を見るか、全体を見るか）が全く

異なり、互いに相手の欠点を相補するような性格を持っている。すなわち、分子量が大きい分子を解析する場合、NMRではシグナルが重なって解析が困難になり、一方X線結晶構造解析では分解能の低下が問題となる。したがって、ある生体高分子の機能・構造の相関を明らかにしようとするなら、まず、X線結晶構造解析で分子全体の骨組みを明らかにした後、NMRで注目する部分の機能・構造相関を明らかにしていく、という方法が妥当であると思われる。また、X線結晶構造解析にはどうしても結晶化によるpacking effectがつきまとうため、NMRにより水溶液中での構造を確かめる必要がある。

A R S の結晶化は、かなり早くから報告がある。すなわち、1970年代に酵母の L y s R S [Rymo & Lagerkvist, 1970; Rymo et al., 1970]、L e u R S [Chirikjian et al., 1970] が salting-out によって結晶化されたが、これらの結晶は分解能が低く解析に至らなかった。さらに、大腸菌の単量体型の M e t R S (二量体の本酵素をプロテアーゼで限定分解したもの) が、透析法で結晶化され [Waller et al., 1971]、重原子同形置換法によって2.5Åの分解能で解析された [Zelwer et al., 1982]。現在では、A T P との複合体の高次構造も2.5Åまで精密化されている [Brunie et al., 1990]。さらに、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* の T r p R S が、hanging drop法により結晶化された [Carter & Carter, 1979; Coleman & Carter, 1984] が、良い重原子置換体が得られず未だ解析に至っていない。また、中等度好熱菌 *B. stearothermophilus* の T y r R S が結晶化され [Reid et al., 1973]、重原子同形置換法によって2.7Åの分解能で解析された [Irwin et al., 1976]。さらにTyrosyl-AMPとの複合体の結晶のX線構造解析が2.3Åの分解能で行われ、チロシンがA T P によって活性化されるメカニズムが明らかになった [Brick & Blow, 1987; Brick et al., 1988]。これら1980年代までに構造が明らかになった M e t R S、T y r R S は、Rossmann Foldと呼ばれるA T P 結合のための構造を共通に持っていた。ところが1990年に大腸菌の S e r R S のX線結晶構造解析(2.8Å)の結果が発表され、この酵素はRossmann Foldを持たず、代わりに逆平行 β -sheet構造でA T P を結合していることが明らかになった [Cusack et al., 1990]。さらにt R N A との複合体の形で、酵母の A s p R S のX線結晶構造解析が3Åで行われ、この酵素もRossmann Foldの代わりに逆平行 β -sheet構造を持っていることが明らかになった [Ruff et al., 1991]。こうして、前述のような分子進化に基づくA R S のクラス分けが提唱されていったわけである [Eriani et al., 1990]。

t R N A とA R S の複合体のX線結晶構造解析については、A s p R S 以外にも大腸菌

のGlnRSとtRNA^{Gln}の複合体の結晶構造が2.8Åで明らかにされているが[Rould et al., 1991], さらにアンチコドンの認識部位の構造が2.5Åで精密化されたことで[Rould et al., 1991], ARSによるtRNAの原子レベルでの認識機構が、はじめて姿を現して来た。そこで現在の最大の焦点は、複合体とフリーの状態のARSの構造を比較することにより、tRNAの結合に伴う酵素側の構造変化を明らかにし、tRNAによるARSの活性化のメカニズムを分子構造レベルで解明することである。AspRSおよびGlnRSについては酵素だけの結晶化も試みられているが、未だ解析できるような結晶は得られていない。これは、こういったARSのフリーの構造がフレキシブルであるためであると考えられる。

一方、最近、高度好熱菌のARSの結晶解析が注目されてきている。これまでに、ソ連とフランスのグループによって、高度好熱菌のSerRS (さらにtRNA^{Ser}との複合体)、PheRS, AspRS, GlyRSなどが次々と結晶化され[Garber et al., 1990; Yaremchuk et al., 1992; Ankilova et al., 1988], PheRSについては260,000という巨大な分子量を持つにもかかわらず6Åでの解析が行われ、「tRNAに沿って結合すると考えられるL字型のドメインが存在する」などという興味深い報告も得られている[Reshetnikova et al., 1992]。また、これらの試みに先行して本研究室では、早くから高度好熱菌の *Thermus thermophilus* HB8のARSに着目し、MetRS, IleRS, ValRS, GluRSおよびPheRSを精製し、キャラクタリゼーションを行ってきた[Kohda et al., 1984, 1987; Hara-Yokoyama et al., 1984, 1986]。これらのうち、MetRS [Nureki et al., 1991], GluRS [Nureki et al., 1992], IleRS [小林・瀧木, 未発表]については、高度好熱菌のARSではじめて遺伝子をクローニングし、大腸菌で大量発現することに成功した。さらに、大腸菌で大量合成したこの高度好熱菌のMetRSおよびGluRSの高分解能結晶を作成することに成功した[Nureki et al., 1992]。高度好熱菌の酵素は、非常に熱安定で構造のゆらぎが少なく、結晶化に有利であると考えられる。したがって、tRNAとの複合体およびフリーの状態の構造を比較解析するには高度好熱菌のARSが適していると考えられる。

分子量の大きいARSの結晶化は決して容易ではなく、結晶構造解析は年単位の研究を要する。しかし前述のように、ARSによるtRNAの厳密かつ動的な認識機構を解明するには構造解析による分子構造レベルでの情報が必須である以上、あえてX線結晶構造解析に挑戦する必要があると思われる。

本研究の意義

以上のように、ARSによるtRNAの認識機構の研究には様々な側面があり、どの側面の研究にも今後の飛躍的な発展が期待される。さらに、ARS・tRNAの系は、タンパク質による核酸（特にRNA）の分子認識機構に関して最も研究が進んでおり、今後も他の系のよいモデルになり得ると考えられる。したがって、20種類すべてのARS・tRNAの系を比較検討しながら研究を進めることは非常に重要なことである。本研究では大腸菌および高度好熱菌のイソロイシン、メチオニン、グルタミン酸の系のtRNAおよびARSを材料に選んだ。これらのARSは、すべてクラスIに属する酵素で一次構造上の相同性も見られ、tRNA認識機構についても共通した性質を持っていると考えられる。したがって、これら3つの系の解析を並行して進め、適宜互いに比較検討を行うことによって、クラスIのARSに本質的に共通したtRNA認識機構を明らかにして行けると考えられる。また、本研究の目的には多岐に渡る手法を用いた解析が必要なため、1つの系だけに執着しては手法の適用限界から解析が行えなくなる危険性もある。3つの系の解析結果を比較考察することにより、このような障壁を乗り越えることができると考えられる。さらに高度好熱菌のIleRS、MetRS、GluRSに関しては、本研究室において独自に得られた生化学的な知見の蓄積があり、これらを基礎とすることができる。

本論文は5章からなる。第1章では、tRNA・ARS複合体のフットプリンティング解析、tRNA変異体の *in vitro* 転写物の反応速度論的解析、修飾塩基が ^{13}C 標識されたtRNAとARSの複合体の ^{13}C -NMRの解析などを行って、tRNAのアイデンティティー決定因子を明らかにし、さらにARSによる認識に伴うtRNAの構造変化についてのモデルを確立した。本章で主に解析を進めた大腸菌のtRNA¹¹⁰は、tRNA上で今までにアイデンティティー決定因子の存在が報告された領域すべてにアイデンティティー決定因子を持ちあわせた複雑な系であったため、この解析結果に基づいてtRNAのアイデンティティー決定因子を総括的に考察することができた。第2章では、熱安定で物理化学的測定に適した高度好熱菌由来のMetRS、GluRS、IleRS（小林・潘木、未発表）の遺伝子をクローニングし、大腸菌で大量発現することに成功した。さらにアミノ酸配列相同性の解析と変異体の反応速度論的解析を組み合わせることで、これらのARSでtRNAの認識に関わる、いままでに知られていなかった領域を同定することができた。この結果に基づき、これらのクラスIのARSでは、特に同じサブクラス内で、

かなり共通した tRNA 認識機構を持っていることが明らかになった。第 3 章では高度好熱菌 MetRS に存在する Zn^{2+} フィンガー様モチーフに着目し、酵素の化学修飾法と変異体の反応速度論的解析を行なって、このモチーフが実際に Zn^{2+} イオンを結合し、tRNA の認識にも寄与していることを明らかにした。さらにこれを発展させて、他の ARS にも同様の解析を適用し、高度好熱菌の IleRS および大腸菌の IleRS, GluRS, ThrRS にも Zn^{2+} フィンガー様モチーフを介した基質認識機構が存在することをつきとめた。第 4 章では、tRNA の認識機構を原子レベルで解明するのに必要な ARS の X 線結晶構造解析に挑戦し、高度好熱菌の MetRS, GluRS について 2.5 Å の高分解能を持つ結晶の作成に成功した。さらに、GluRS については、重原子同形置換により最初の電子密度分布図を得ることに成功した。また MetRS · tRNA^{Met} 複合体の結晶化、大腸菌の IleRS の結晶化にも初めて成功した。これらの構造を解くことによって第 1, 2, 3 章で得た tRNA および ARS の機能面での知見と合わせて、ARS による tRNA の認識機構の機能・構造相関を明らかにすることができると思われる。最後に第 5 章で、本研究で得た新たな知見に基づいて、ARS による tRNA の認識機構、および ARS の分子進化について総合的に考察した。

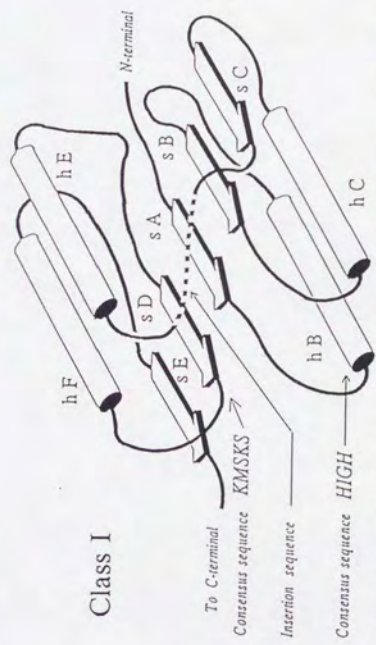
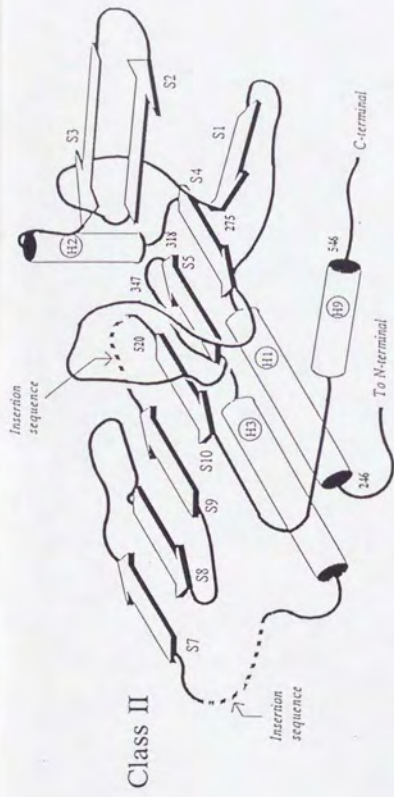


図1 class I, class II ARSのATP結合ドメインの構造 class IのARSに特徴的な Rossmann fold (下) と class IIのARSに特徴的な 逆平行βシート構造を示す。模式図は, Dino Moras博士 (IBMC, CNRS, Strasbourg, France) の御厚意による。

第1章

tRNAのアイデンティティー決定因子の研究

1. 1. 序

tRNAのアミノ酸に対する特異性 (tRNAのアイデンティティー) は, アミノアシルtRNA合成酵素 (ARS) がtRNAとアミノ酸の両方を厳密に認識することに依存している. ARSは, 特異的なtRNA上の目印となる数個のヌクレオシド (アイデンティティー決定因子) を認識することによって, このtRNAを他のtRNAから識別している [Normanly et al., 1986, 1989; Yarus, 1988; Schimmel, 1989; Schulman, 1991]. 序章でも述べたように, わずかな例外を除いてほとんどのtRNAでは, アンチコドン (34-36位) とディスクリミネーター (73位) が最も主要なアイデンティティー決定因子となっている [Yarus, 1988; Normanly & Abelson, 1989; Schimmel, 1989; Schulman, 1991; Muramatsu et al., 1988b; Shimizu, 1992] (表1-1). さらに, tRNA^{Asp}で U3-G70の塩基対がこのtRNAの支配的なアイデンティティー決定因子であることが示されて以来 [Hou & Schimmel, 1988; McClain & Foss, 1988; McClain et al., 1988], His, Glyなどの系でもアクセプターシステムに相当な強さのアイデンティティー決定因子が存在することがわかってきた. さらに最近では, tRNAのアクセプターシステムだけからなるマイクロヘリックスを用いた解析により, これらの系ではお互いにアイデンティティー決定因子の位置をずらしたり, 依存度を変えて認識することで, 他のtRNAを識別できるしくみになっていることが明らかになってきた [Franklyn & Schimmel, 1990a, b; Franklyn et al., 1992]. また, 大腸菌のGlnの系では, ARS・tRNA複合体のX線結晶解析より, GlnRSはtRNA^{Gln}のアクセプターシステムの最初の塩基対 U1-A72を開裂させて, 2番目, 3番目の塩基対を認識していることが明らかになった [Rould et al., 1989; Jahn et al., 1989]. このように, ほとんどのtRNAでは, アンチコドン, ディスクリミネーター, およびアクセプターシステム (1, 2, 3番目の塩基対) に, 強度の差はあれアイデンティティー決定因子が存在していると考えられる. このように共通な部位以外にも, tRNA^{Arg}やtRNA^{Phe}では「Variable Pocket」と呼ばれるDループとTΨCループの会合領域に, それぞれA20あるいはG20という強いアイデンティティー決定因子が存在することが明らかになった [McClain & Foss, 1988b, c; McClain et al., 1990; Sampson

& Uhlenbeck, 1988; Sampson et al., 1989, 1992]. これに対し, tRNAのDステムやアンチコドンステムなどヘリックスの真ん中にアイデンティティー決定因子が存在するという報告はいままでに得られていない.

また, 大腸菌のGlnや酵母のAspの系で, tRNA・ARS複合体のX線結晶解析により, ARSと結合した際のtRNAの構造変化が明らかになってきた. それによるとアンチコドンやディスクリミネーターおよびアクセプターステム上のアイデンティティー決定因子がARSの認識を受けやすいように, アンチコドンループがしぼり込まれたり, ねじれたり, またはアクセプターステムが開裂したり, といった局所的ではあるが特徴的な構造変化が起きていることが明らかになった [Rould et al., 1989; Rould et al., 1991; Ruff et al., 1991]. すなわち, これらの系では, tRNAの全体的なL字型構造は保ったままで, アイデンティティー決定因子付近の局所的な構造変化により, 効率の良い認識を受けていると考えられる.

本研究は, 大腸菌のtRNA^{11*}, tRNA^{Met}, tRNA^{Glu}のアイデンティティー決定因子を明らかにし, 特異的なARSによる認識機構を解明することを目的とする. まずtRNA^{11*}については, minorなtRNA^{Met}のアンチコドン1字目(Cの修飾塩基であるLysidine)を未修飾のCに変えると, もはやIleRSでイソロイシンをチャージされず, MetRSによりメチオニンをチャージされるようにアイデンティティーが変換されることから, アンチコドン1字目がアイデンティティー決定因子であることが明らかにされた [Muramatsu et al., 1988b]. またSchulmanらは, tRNA^{Met}のアンチコドンをいろいろ変えた変異体を大腸菌で発現させ, それと対応するように開始コドンを変えたdihydrofolate reductaseのN端にどのアミノ酸がとり込まれるかを調べることにより, tRNA^{Met}の3つのアンチコドンすべて(GAU)がそのアイデンティティーに寄与していることを明らかにした [Pallanck & Schulman, 1991]. ただ, アンチコドンの置換だけではアイデンティティーが完全に変換されないため, アンチコドン以外にもアイデンティティー決定因子が存在すると思われる. 最近, 当研究室の新美らにより, 大腸菌のtRNA^{Met}とIleRSの複合体のイミノプロトンのNMRが解析された (図1-1) [Niimi et al., submitted]. これによると, アンチコドンステムの下から2つの塩基対およびtRNAのL字型を維持する3次構造上の塩基対2つが, 塩基対の開裂, もしくはbreathingを伴うような大きな構造変化を起こしていることが示された [図1-1の黒塗りの塩基対]. また, Dステム中のU12・A23およびC11・G24, アンチコドンステムの真ん中の

C29-G41, TΨCステムおよびアクセプターステムの2つのwobble塩基対, アクセプターステム中のU6-A67, G7-C66は, 規模は小さいが確かに構造変化を起こしていることが示された [図1-1の斜線の塩基対]. そこで, これらヘリックスの真ん中にも生じた構造変化が, IleRSによって直接認識された結果起こったものなのか, あるいは認識に伴う間接的な構造変化を意味するものなのかを明らかにするため, 本研究ではtRNA^{Ile}・IleRS複合体のフットプリンティングおよびtRNA^{Ile}の変異体のアミノアシル化反応の速度論的解析を行った.

大腸菌のtRNA^{Met} (アンチコドンac⁺CAU, CAU) については, tRNA^{Val}のアンチコドンUACをCAUにすると, アイデンティティーがValからMetに完全に変換されることから, アンチコドンが最も主要なアイデンティティー決定因子であることが示された [Schulman & Pelka, 1988]. さらに, 反応速度論的に, アンチコドンはk_{cat}に寄与していることが示唆された [Schulman & Pelka, 1989]. アンチコドンがtRNA^{Met}の最も主要なアイデンティティー決定因子であることは, *in vivo*の実験でも確かめられている [Pallanck & Schulman, 1991]. また, アクセプターステムの2番目, 3番目の塩基対がMetRSによって認識されていることが, マイクロヘリックスを用いた実験で明らかにされている [Martin & Schimmel, 1992]. これらに対し, ディスクリミネーターA73は, MetRSによって認識を受けてはいるが, その依存度は他の系と比較して低いことが示されている [Shimizu, 1992]. 本研究では, フットプリンティングを用いた解析により, tRNA^{Met}のどこがMetRSと特異的に相互作用しているかをtRNA分子全体にわたって明らかにした.

大腸菌のtRNA^{Gln}については, アンチコドン1字目の修飾塩基mnm^sUがBrCNによりblockされたtRNA^{Gln}の反応速度解析が行われ, このmnm^sUがGluRSによって認識されていることが示唆された [Kern & Lapointe, 1979]. 枯草菌 *Bacillus subtilis* やクロロプラストのtRNA^{Gln}は, まずGluRSによりGluがチャージされた後, tRNA-dependent amidotransferaseによってGluがGlnに変換される [Lapointe et al., 1986; Schon et al., 1988]. このため, これまでtRNA^{Gln}とtRNA^{Gln}の酵素による認識機構は似たものであろうと考えられてきた. しかし, 未修飾のtRNA^{Gln}の *in vitro* 転写物がGlnRSによって十分にチャージされるのに対し, tRNA^{Gln}の *in vitro* 転写物は修飾の入ったtRNA^{Gln}に比べGluRSによるアミノアシル化の効率が著しく落ちることが最近明らかになり (館野), tRNA^{Gln}とtRNA^{Gln}のARS

による認識機構は異なることが示唆されてきた。本研究では、修飾塩基を ^{13}C で標識した大腸菌 tRNA $^{\text{Glu}}$ と高度好熱菌 GluRS (大腸菌の系とクロスリアクションする)の複合体の ^{13}C -NMRを観測することにより、どの修飾塩基がGluRSにより認識されているのかを明らかにした。

本研究は、フランス Strasbourgの国立細胞分子生物研究所のRichard Giege博士の研究室との共同研究であり、特にフットプリンティングに関しては、筆者がストラスブールの同研究室に1990年11月より3ヶ月間の短期留学を行った際に修得させいただいたものである。

1. 2. 材料と方法

1.2.1 試薬および酵素

N-nitroso-N-ethylureaは、Sigma (U.S.A.)より購入した。Bacterial alkaline phosphataseとT4 polynucleotide kinase (いずれも大腸菌A19由来)は、東洋紡(大阪)より購入した。snake venom phosphodiesteraseは、Wahthington Biochemical Corp.から、RNase T1は三共製薬から購入した。tRNA-nucleotidyl-transferaseは、Strasbourgの国立細胞分子生物研究所のGiege博士よりいただいた。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, L-[(U)- $^{14}\text{C}]\text{Ile}$, $[\alpha\text{-}^3\text{S}]\text{NTP}$ は、Amershamより購入した。制限酵素 Nsp(7524)IおよびPCRキットは、宝酒造(京都)から購入した。

1.2.2 大腸菌 tRNA $^{\text{Ile}}$, tRNA $^{\text{Met}}$, tRNA $^{\text{Glu}}$ の調製

大腸菌の tRNA $^{\text{Ile}}$, tRNA $^{\text{Met}}$ は、それぞれ、当研究室の新美氏および村松博士(現 東大理学部助手)によって、大腸菌A19株の粗RNA画分から、DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia) (pH 7.5), benzoylated DEAE-cellulose (Boehringer-Mannheim), DEAE-Toyopearl 650S (Tohso), Butyl-Toyopearl 650S (Tohso)を用いて精製 [Muramatsu, 1988; Niimi et al., 1992] されたものを用いた。大腸菌の tRNA $^{\text{Met}}$ は粗RNA画分からDEAE-Sephadex A-50 (pH 7.5), DEAE-Sephadex A-50 (pH 4.0)のカラムクロマトグラムを用いて精製した。大腸菌の tRNA $^{\text{Glu}}$ は、当研究室の高井氏により粗RNA画分からDEAE-Sephadex A-50 (pH 7.5), DEAE-Sephadex A-50 (pH 4.0)のカラムクロマトグラ

ムを用いて精製されたものを用いた。

1.2.3 T7 RNA polymeraseの精製

Studier博士 (Stonybrook, New York) よりいただいた, T7 RNA polymeraseの大量発現系を用いて, Polymin Pによる除核酸, 硫酸沈殿, S sepharose FFによるカラムクロマトグラム, 溶解度の塩 (NaCl) 濃度依存性を用いて精製した。精製法の詳細は, Zawadzkiの方法 [Zawadzki & Gross, 1991] に従った。

1.2.4 tRNAのin vitro転写物の精製

T7 RNA polymeraseの転写効率を考慮して, tRNAはG1-C72を持つように設計した。T7 promoterの配列の直後にtRNAの塩基配列をつなげたDNAを全合成し, これをBamHI, Nsp(7524)Iで切断した断片を, M13mp19のBamHI, SphI部位にサブクローニングした (図1-2)。これを鋳型として, PCRにより断片を増幅し, 転写がCCA末端で終わるようにNsp(7524)Iで切断した。さらにこの断片をtemplateとして, 2mM spermidine, 20mM DTT 200 μ g/ml acetylated BSA, NTP (各濃度が4mM), 20mM GMP, 20unit/ml RNase inhibitor (東洋紡), 40mM KCl, 16mM MgCl₂を含む80mM Hepes緩衝液 (pH 7.5) 中で, 140 μ g/ml T7 RNA polymeraseを加えて, 2時間, 37°Cで反応した。転写物は, 8M ureaを含む 20% denaturing polyacryamide gelにて, 1000V, 24時間で電気泳動を行った後, UVを照射して蛍光吸収のあるバンドを切り出して, Bio Trap™ (Schleicher & Schuell) により電気泳動的にゲルから抽出した。

1.2.5 tRNA変異体の作成

前述のtRNA遺伝子をM13mp19にサブクローニングしたものを鋳型とし, Muta-Gene™ キット (Bio Rad) を用い, Kunkel法により部位特異的変異導入を行った。アクセプターシステム部位の変異は, 変異を導入したprimerを2本合成し, PCRによって変異体tRNA遺伝子を作成した。

1.2.6 大腸菌IleRSの精製

大腸菌IleRSは, 当研究室の河野博士 (現 三菱化成生命研究所研究員) により, IleRSの大量発現系 [Kawakami et al., 1985] を用いて, DEAE-Sephacel (Pharmacia)

およびPhenyl-Superose HR10/10, monoQ HR10/10 [後者2つはFPLC LC-500 plus system (Pharmacia)] のカラムクロマトグラムによって、精製されたものを用いた。

1.2.7 高度好熱菌MetRS, GluRSの精製

高度好熱菌*Thermus thermophilus*のMetRS, GluRS遺伝子を、高度好熱菌の染色体DNAから単離し、それぞれlac promoter, tac promoterを持つベクターに組み込んで大量発現系を構築した(第2章)。MetRS遺伝子(*metS*)を組み込んだプラスミドpUC118/TMTS-2.2(第2章)でトランスフォームした大腸菌MV1190株 [Δ (*srl-recA*)306::Tn10, Δ (*lac-proAB*), *ara*⁻, *thi*⁻, *rpsL*⁻, ϕ 80d*lacZ* Δ M15([F']:*proAB*, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15, *traD*36)] を、ampicillinを50 μ g/ml含むLB培地(10g/l bactotrypton, 5g/l yeast extract, 5g/l NaCl)中にて、37°Cで A_{550} =0.5まで培養し(4-5時間)、IPTGを0.5mMとなるように加えinductionをかける。さらに5時間培養をつづけ、遠心機で集菌後、湿菌重量1gあたり1.5mlのTMM緩衝液[50mM Tris·HCl (pH 7.9), 10mM Mg(COOH)₂, 10mM 2-mercapto-ethanol, 0.5mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)]にけんだくし、超音波破碎(120W, 90秒を4回)を行なう。さらに、12,000g, 30分間遠心し、粗抽出液を得る。この粗抽出液について70°C, 30分間の熱処理を行ない、大腸菌の大部分のタンパク質を変性させた後、12,000g, 30分間の遠心を行なうことで、上清に約80%まで精製された高度好熱菌のMetRSを得る。さらに、これを20mM NH₄Clを含むTMM緩衝液で透析し、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel (Pharmacia) にかけて、20-250mM NH₄Clの直線勾配で溶出する。ここまでの精製によりMetRSは約95%まで精製され活性測定には十分になるが、さらに微量のRNaseを除くため、50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5, 10mM 2-mercapto-ethanolを含む)で平衡化したPhenyl-Superose HR10/10カラム[FPLC LC-500 plus system (Pharmacia)] にかけて、0.8-0Mの硫酸で溶出した。MetRSを含む画分をさらに20 mM Tris·HCl緩衝液(pH 7.4, 10mM Mg(COOH)₂および10mM 2-mercaptoethanolを含む)で平衡化したmonoQ HR10/10カラム[FPLC LC-500 plus system (Pharmacia)] にかけて、0-0.5M KClの直線勾配により溶出した。

また、高度好熱菌のGluRSの精製は、GluRS遺伝子(*gltX*)を組み込んだプラスミドpEXP7/*gltX*1.8でトランスフォームした大腸菌MV1190株を、ampicillin 50 μ g/ml 0.5%グルコースを含む2×H培地(20g/l bactotrypton, 8g/l NaCl, 1 μ g/l thiamin)で37°C 4時間培養し、IPTGを0.5mM加え、さらに培養を5時間続ける。以後の熱処理、

DEAE-Sephacel, Phenyl-Superose, monoQを用いた精製法は、上記のMetRSの場合と同様であるが、ただmonoQの精製に用いる緩衝液は(等電点がMetRSより高いので)、20mM 酢酸トリス(pH 7.9, 10mM Mg(COOH)₂および10mM 2-mercaptoethanolを含む)を用いた。

1.2.8 tRNA末端の放射能標識

tRNAの5'末端の標識は、tRNAをbacterial alkaline phosphataseで脱リン酸化した後、polynucleotide kinaseにより[γ -³²P]ATPでラベルを行なった。tRNAの3'末端の標識は、tRNAのCCA末端をsnake venom phosphodiesteraseで除去した後、tRNA-nucleotidyl-transferaseにより、非放射性的のCTPと[α -³²P]ATPでCCA末端を再構成することで行なった。生成物を8M ureaを含む10% denaturing polyacryamide gel電気泳動にて精製し、バンドをgelから切り出し、Maxam & Gilbert (1977)の方法により抽出した(37°C一晩)。エタノール沈殿の後、シンチレーションカウンターで放射比活性を測定した。

1.2.9 RNaseプローブを用いたtRNAのフットプリンティング

放射活性にして100,000cpmに相当するラベルしたtRNAに、非放射性的のtRNA(carrier)を加え、tRNAの総濃度がアミノアシル化反応のtRNAに対するK_mと同程度になるようにする。これに、tRNAの2倍濃度のARSを加え、50mM Tris-HCl緩衝液(10mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂)中で、20°C10分間放置し、tRNAとARSが複合体を作るようにする(液量は10 μ l)。これに、0.25-1unitのnuclease S1あるいは0.01-0.1unitのnuclease V1を加え、さらに20°C10分間反応させる。その後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、4M urea, 10% sucroseを含むdye溶液にとかして、12%の変性ポリアクリルアミドで電気泳動を行う。泳動後、オートラジオグラフィーを行う。

電気泳動のマーカーとして、tRNAをRNaseT1(Gの3'側を切断する)で限定分解したものの(T1 ladder)と、アルカリで完全分解したものを用いる。T1 ladderについては、50,000cpm相当のtRNAに、大腸菌の未分画tRNA 2 μ gを加え、20mM クエン酸ナトリウム(pH4.5), 1mM EDTA, 7M urea, 0.1% bromphenol blueおよび0.1% xylene cyanol中(液量7.5 μ l)で、50°C10分間のpreincubationを行い、0.01unitのRNaseT1を加えて、さらに50°C15分間の反応を行ったものを用いる。アルカリ分解は、50,000cpm相当のtRNAに大腸菌の未分画tRNA 2 μ gとホルムアミド2 μ lを加えて、100°Cで10分間反応させた

ものを用いた。

1.2.10 N-nitroso-N-ethylureaを用いた tRNA のフットプリンティング

N-nitroso-N-ethylureaにより、RNA のリン酸基がアルキル化され、弱アルカリ性下の加水分解の結果、環状ヌクレオチドを経てRNA 鎖が切断される(図1-3)。 N-nitroso-N-ethylureaは RNaseなどよりずっと小さい分子であり、かなり狭いすきまへも入っていることに加えて、切断に特異性がないので、この反応をRNA のフットプリンティングに用いると、かなり精密な分析ができ高次構造に関する知見までも得ることができる [Romby et al., 1985; Theobald et al., 1988; Dietrich et al., 1990]。

フットプリンティングには、1セットにつき3種類の反応が必要である。すなわち、ARSなしでのnative condition, ARSを加えたcomplexed condition, ARSなしでtRNAを変性させたdenaturing conditionである。まずnative conditionは、100,000cpm相当のラベルtRNAに非放射性tRNAを総量2 μ gとなるように加え、300mM カコジル酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0, 2mM EDTA, 20mM MgCl₂, 100mM NaClを含む)中(20 μ l)で、5 μ lの N-nitroso-N-ethylureaのエタノール飽和溶液を加え、20°C3時間反応する。complexed conditionは、200,000cpm相当のラベルtRNAに非放射性tRNAを総量2 μ gとなるように加え、さらに10-20 μ MとなるようにARSを加え、22.5 μ lの150mM カコジル酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0, 0.3mM EDTA, 5mM MgCl₂を含む)中で、まずtRNA \cdot ARS複合体を形成させた(20°C10分間)後、2.5 μ lの N-nitroso-N-ethylureaのエタノール飽和溶液を加えさらに20°C3時間反応させる。denaturing conditionでは、100,000cpm相当のラベルしたtRNAに非放射性tRNAを総量2 μ gとなるように加え、300mM カコジル酸ナトリウム緩衝液(pH8.0, 2mM EDTAを含む)中(20 μ l)で、5 μ lの N-nitroso-N-ethylureaのエタノール飽和溶液を加え、80°C2分間反応させる。コントロールは、 N-nitroso-N-ethylureaの代わりにエタノールを加える。反応後、エタノール沈殿を行い、20 μ lの0.3M 酢酸ナトリウム(pH6.0, 20mM EDTAを含む)に溶かして再度エタノール沈殿を行うことにより、 N-nitroso-N-ethylureaを完全に除く。さらに、10 μ lの0.1Mの Tris-HCl緩衝液(pH 9.0)に溶かして、50°C 5分間加水分解を行う。これをエタノール沈殿し、放射活性が等しくなるようにサンプルの量を調節して、8M ureaを含む15あるいは20%のpolyacrylamide gelで電気泳動を行い、その後オートラジオグラフィを行う。定量的な分析を行うため、オートラジオグラフィ後のフィルムの各バンドの濃さを、デン

シトメーター（島津）にて測定した。

1.2.11 Eckstein法によるtRNAのフットプリンティング

本方法では、まず、tRNAをT7 RNA polymeraseによりin vitroで合成する際に、 α 位のリン酸基の酸素原子の1つが硫黄原子に置き換った[α -S]NTPを5%程度混ぜて転写を行い、A, C, G, Uそれぞれについて部分的にphosphorothioateが含まれている転写物を得る。phosphorothioateが図1-4の反応に示されるように I_2 と反応して、RNA鎖が切断されることを利用して、RNAのシーケンスやフットプリンティングを行うことができる [Schatz et al., 1991]。上記のように調製した転写物を（A, C, G, Uそれぞれが一部phosphorothioateに置換されたものごとに）Qiagenのカラムで精製し、5'末端を前述の方法で ^{32}P で標識し、urea PAGEで精製する。native conditionでは、30,000cpm相当の標識tRNAに非放射性的tRNAを1 μ Mとなるように加え、10 μ lの10mM Hepes緩衝液（pH 7.4, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂を含む）中で37°C 3分間放置し、5mM I_2 エタノール溶液1 μ lを加えてさらに1分間反応させる。complexed conditionでは、30,000cpm相当の標識tRNAに非放射性的tRNAを1 μ Mとなるように加え、30 μ MのARSと共に、10 μ lの10mM Hepes緩衝液（pH 7.4, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂を含む）中で複合体を形成させ（37°C 3分間）、1-10mMの I_2 エタノール溶液を1 μ l加えて、さらに1分間反応させる。denaturing conditionでは、やはり30,000cpm相当の標識tRNAに非放射性的tRNAを1 μ Mとなるように加え、10mM Hepes緩衝液（pH 7.4）中で70°C 3分間 preincubationを行い、5 mM I_2 エタノール溶液を1 μ l加えて、さらに70°C 1分間反応を続ける。これら3種類の反応物は、3M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）1 μ lを加えることで反応を停止しエタノール沈殿後、8M urea PAGEで分析を行う。

他のグループの報告では、tRNAのアイデンティティー決定因子の解析において、この I_2 を用いたフットプリンティングは、前述のN-nitroso-N-ethylureaを用いた方法よりも感度がよいことが知られている。 [Schatz et al., 1991; Rudinger et al., 1992]。

1.2.12 変異体tRNA^{11*}の反応速度定数の解析

0.5-50 μ MのtRNA^{11*}と0.1-20 μ M（tRNAのアミノ酸受容活性に応じて変える）のIleRSを、100 mM Tris-HCl（pH 7.5）、10 mM KCl, 2 mM ATP, 0.1 mM [(U)-¹⁴C] Ile（315 mCi/mmol）中で反応させ（50 μ l）、30秒と1分後に24 μ lをとって17 μ l

の水冷した5%トリクロロ酢酸 (TCA) に入れて反応を止める。このうち40 μ lをろ紙にぬって、5%TCAで15分間、3回洗う。さらに、エタノールで10分間、2回洗った後乾燥し、トルエンシンチレーターに入れてカウントを測定した。反応速度定数は、30秒と1分後のカウントから反応の初速度を求め、Lineweaver-Burk Plotで決定した。

1.2.13 修飾塩基を ^{13}C ラベルしたtRNAの ^{13}C -NMR測定

修飾塩基のメチル基が ^{13}C でラベルされたtRNA $^{\text{Glu}}$ は、横山博士、横山(原)博士(現 日大松戸歯学部助手)らによって以下の方法で精製された。すなわち、まずメチオニン要求株の大腸菌(*rel⁻,met⁻*)を [^{13}C -methyl] methionineを含む最小培地で培養し、これからZubayの方法 [Zubay, 1962] により粗RNA画分を抽出し、さらにDEAE-Sephadex A-50 (pH 7.5)およびDEAE-Sephadex A-50 (pH 4.0)を用いたカラムクロマトグラムによって、修飾塩基のメチル基が ^{13}C ラベルされたtRNA $^{\text{Glu}}$ を精製した。

NMR測定のためのサンプリングは、以下のように行なった。tRNAは、エタノール沈殿後、20 mM deuteriated Tris緩衝液 (pH 7.5)、10mM MgCl_2 に溶かし、セントリコン(アミコン)を用いて、同緩衝液で5回 (10^{-5} 倍) 溶媒交換をする。その後、真空ラインで凍結乾燥を行ない、重水素に溶かして A_{260} を測定し、サンプルとする。GluRSは前述の方法で精製を行ない、セントリコンで濃縮後、溶媒交換を5回 (10^{-5} 倍) 行ない A_{260} を測定した。

NMRの測定は、以下のようにして行なった。まず、0.56mMの ^{13}C ラベルtRNA $^{\text{Glu}}$ の ^{13}C -NMRを測定する。この時、 ^{13}C の化学シフトの標準として、5%の1,4-dioxane ($\delta_c=67.4$)を用いる。測定後、サンプルチューブのtRNAを回収し、1.1倍当量のGluRSを加えて、セントリコンで100 μ lまで濃縮して ^{13}C -NMRを測定する。tRNAに対しGluRSをやや余計に加えるのは、複合体の形成を確実にするためである。最終的に複合体でのtRNAの濃度は、0.37 mMになった。NMRの測定は、Bruker社のAM-400の装置を用い、37 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

1. 3. 結果と考察

1.3.1 tRNA^{11*}の N-nitroso-N-ethylurea を用いたフットプリンティング

tRNA^{11*}が IleRS と複合体を形成すると、ステムの各所で構造変化が観測された(本章序, 図1-1)。これらの構造変化が, IleRS との直接の相互作用によるものかどうかを明らかにする目的で, IleRS によるリン酸基のプロテクションに基づいて tRNA^{11*} の IleRS との接触部位を解析した。図1-5に, このフットプリンティングの結果を示す。各写真で, 5のレーン (denaturing condition) に比べ 3のレーン (native condition) でリン酸基がアルキル化を受けにくくなっている部位は, tRNA が L字型構造をとることによって溶媒から隠れる部位である。酵母の tRNA^{Phe} ではコアの部分に存在する19番, 59番のリン酸基が強く隠れることがわかっている [Romby et al., 1985]。図1-5を定量的に解析した図1-6を見るとよくわかるように, tRNA^{11*} でも19番や59番といった, tRNA のコアに相当する部位でリン酸基が隠れていることから水溶液中では, tRNA^{11*} は tRNA^{Phe} と同じように典型的な L字型構造をとっていることがわかる。さらに, 図1-5で 3のレーン (native condition) に比べて 4のレーン (complexed condition) でプロテクションが観測される部位は, IleRS が結合していた部位であると考えられる。この酵素によるプロテクションを tRNA の L字型の上に矢印 (大きさがプロテクションの強さに対応) で模式的に表したものが, 図1-7である。

図1-7で, まず, IleRS は, アンチコドンループのほぼ全域としっかり結合し, さらに, アンチコドンステムの3'側の鎖に強くはりついている。先のNMRの解析において観測されたようなアンチコドンステムの塩基対の緩み(図1-1)は, IleRS がこのように tRNA^{11*} のアンチコドンステムの片側の鎖のみに結合することにより, ステムのヘリックスが巻き戻された結果であるとも解釈できる。Dステムにおいては, IleRS は U12・A23を中心にステムの両側に結合しているが, これは立体構造上ではちょうど片面 (DステムがU8, A9や variable loopと3次構造上の水素結合をつくるのと反対側の面) に結合することを意味する(図1-8)。先のNMRの解析においても, U12・A23の塩基対は複合体形成に伴って構造変化を起こしていることが示唆された部位であり, 今回の結果とはよくつつまが合っている。したがって IleRS は, Dステムに関してはヘリックス構造を保ったままで U12・A23と相互作用していると考えられる。また, アクセプターステムにおいては70番と72番のリン酸基がプロテクションを受けており, アクセプターステム

にも IleRS の認識部位が存在する可能性がある。これら図1-7に示したプロテクションを受けた部位を、tRNAのL字型3次構造の上にプロットしてみると(図1-9)、ほぼすべてがL字型の片面(variable loopと反対側の面)にのっていることがわかる。すなわち IleRS は、tRNA^{11*}にDループの面から接触し、これを認識していることが推察される。これに対し、G41、U42、G43のリン酸基のみがこの面からややはずれている(図1-8,9)。しかし、もし前述のように、tRNA^{11*}が IleRS と結合した際にアンチコドンステムが巻き戻るような構造変化が起きれば、これらのリン酸基も他と同じ面にのることができる。また、DループとTΨCアームには酵素によるプロテクションが見られなかったことから、NMRで観測されたG15·C48やG19·C56などの3次構造上の水素結合、G49·Ψ65塩基対の変化は、IleRSによって直接認識を受けたことによるのではなく、複合体形成に伴うtRNAの構造変化に起因するものであると考えられる。

一方、tRNA^{11*}が IleRS と結合すると、むしろアルキル化を受けやすくなる部位がある。例えば、10番、19番、59番などのリン酸基で、ちょうどnativeのtRNAではコアを形成して溶媒から隠れていたものが、コアが歪んでtRNAが部分的に変性し表に出てきた印象を受ける(図1-6)。実際これらの残基はDステムとvariable loopの間、DループとTΨCループの間の3次構造上の水素結合を形成している残基であり、tRNAが酵素と結合すると、これらの水素結合が開裂、あるいは少なくとも緩んでしまうことが推察される。NMRによる解析でも、複合体形成に伴ってこれらの3次構造上の水素結合が開裂することが示唆されており(図1-1)、本研究の結果とよく一致する。すなわち、複合体形成に伴って、tRNAのDループとTΨCループの間が開裂するような構造変化が起きていると判断される。さらに、アンチコドンループ内の37番の修飾塩基であるt⁶A (N-[9-β-D-ribofuranosylpurine-6-yl]carbamoyl]threonine)のリン酸基は、tRNA^{11*}が IleRS と複合体を形成することによって、顕著にアルキル化を受けやすくなった(図1-6,7)。このt⁶A37は、フリーなtRNAではアンチコドンループの中にスタックしているが、IleRSと複合体を形成すると、塩基の部分が認識されて表へ引っ張り出されていると考えられる。

このように、NMR、フットプリンティングといった2つの独立な物理化学的手法により、tRNA^{11*}は IleRS と結合した際に、局所的な構造変化とtRNA全体の構造変化の両方を起こしていることが示唆された。

1.3.2 tRNA^{i1*}のin vitro転写物のEckstein法によるフットプリンティング

さらに、tRNA^{i1*}のin vitroの転写物について、より感度の良いI₂を用いたフットプリンティングを行った(図1-10)。この方法では、同時にRNAのシーケンスが行われるので、どの残基が酵素によって保護されたのかが明白である。すると、図1-10で▼をつけたDステムの両側、アンチコドンループ、アンチコドンステムの5'側に酵素によるプロテクションが見られた。これは、N-nitroso-N-ethylureaを用いたフットプリンティングの結果(図1-5,7)と一致する。ただ、tRNA^{i1*}のin vitro転写物のプロテクションのパターンと、修飾が入ったmatureなtRNA^{i1*}のパターンは、以下の点で相違が見られた(図1-7)。

1. in vitroの転写物では、Dステムのプロテクションは明瞭だが、アンチコドンループおよびアンチコドンステム 3'側鎖のプロテクションはやや弱くなっている。

2. matureなtRNA^{i1*}で複合体形成に伴いアルキル化を受けやすくなった、10, 19および59番のリン酸基は、in vitroの転写物では切れやすくならなかった。

3. in vitroの転写物では、matureなtRNA^{i1*}では観測されなかったような、弱いプロテクションが variable loopに見られた。

すなわち、tRNA^{i1*}の修飾塩基のうちあるもの(t^oA37)は、IleRSによって特異的に認識されており、この修飾がなくなると、IleRSによる認識が弱まって、周辺のアイデンティティー決定因子のIleRSとの相互作用も弱まってくると考えられる(1に対する理由)。また、DループやTΨCループにあってこれらの間の相互作用を支持していた塩基の修飾が無くなると、もともとの構造が開いたものになり、複合体形成に伴ってDループ・TΨCループが開裂しても見かけ上切れやすくないと考えられる(2に対する理由)。3に関しては、variable loop上の修飾塩基も構造の維持に寄与しており、これらの修飾が無くなることで variable loopの構造が弱くなり、IleRSが周辺に結合すると、variable loopもアルキル化剤から保護されるような間接的な構造変化を受けると考えられる。

1.3.3 tRNA^{i1*}のイソロイシン受容活性における修飾塩基の役割

tRNA^{i1*}の修飾の入っていない in vitro転写物について、アミノアシル化の反応速度定数を測定したところ、matureなtRNAに比べて活性が低下しており、それは主に、k_{cat}が落ちている(1/400倍)ことに起因していることがわかった(表1-1)。そこで、

37番の $t^{\text{A}}A37$ に着目し、これが別の修飾塩基で置き換わった $tRNA^{11\text{e}}$ のイソロイシン受容活性を測定してみた。まず、37番に $t^{\text{A}}A$ を持つ大腸菌の $tRNA^{11\text{e}}$ 、および37番が $t^{\text{A}}A$ ではなく $m^{\text{A}}A$ になっている枯草菌*Bacillus subtilis*の $tRNA^{11\text{e}}$ について、大腸菌のIleRSによるアミノアシル化の反応速度定数を測定した(表1-1, 図1-11)。すると大腸菌の $tRNA^{11\text{e}}$ に比べ枯草菌の $tRNA^{11\text{e}}$ は、 K_m は2.7倍しか上がっていないのに対し、 k_{cat} は1/15.6に落ちていた(表1-1, 図1-11)。さらに、大腸菌 $tRNA^{11\text{e}}$ の $t^{\text{A}}A37$ のみが他の修飾塩基($t^{\text{A}}A$ がさらに過修飾されたもの)になっている $tRNA^{11\text{e}}$ の反応速度定数を測定したところ、matureな $tRNA^{11\text{e}}$ に比べ、 K_m は1.6倍しか上がっていないのに対し、 k_{cat} は1/30に落ちていた(図1-11)。これらのことから、大腸菌 $tRNA^{11\text{e}}$ の $t^{\text{A}}A37$ の修飾側鎖は、アミノアシル化反応のcatalysis(k_{cat})に寄与していると考えられる。先のフットプリンティングの結果に対する考察(1.3.1, 1.3.2)と考え合わせるとmatureな $tRNA^{11\text{e}}$ に対してin vitro転写物の活性が1/400に落ちた内訳は、 $t^{\text{A}}A37$ の修飾側鎖に対するIleRSの認識が欠落したことによって少なくとも1/30に落ち、残りはtRNAの構造の維持に効いているDループやT Ψ Cループの修飾塩基に起因するものであろうと見積ることができる。

先のフットプリンティング解析では、in vitro転写物のプロテクションのパターンは、matureな $tRNA^{11\text{e}}$ のパターンと大局的には同じものであった。従って、 $tRNA^{11\text{e}}$ の37番以外の残基に対する認識機構は、 $tRNA^{11\text{e}}$ 変異体のin vitro転写物の反応速度論的解析によって明らかにすることができると判断される。そこで、NMRおよびフットプリンティングの結果に基づき、60種以上の $tRNA^{11\text{e}}$ 変異体をin vitroで調製した。

1.3.4 $tRNA^{11\text{e}}$ 変異体のin vitro転写物の反応速度定数解析

$tRNA^{11\text{e}}$ 変異体の反応速度定数解析の結果を表1-1に示す。以下、tRNAの各ドメインごとに議論する。

アンチコドンループ

イソロイシン受容活性の低下が最も著しかったのは、アンチコドンの3残基に変異を導入した場合であった(表1-2)。したがって、アンチコドンGAUはすべて $tRNA^{11\text{e}}$ の主要なアイデンティティ決定因子であると考えられる。このことは、いままでの報告とよく一致する[Muramatsu et al., 1988b, 1992; Pallanck & Schulman, 1991]。また、フツ

トプリンティングによる解析で、I l e R S が t R N A^{11*}のアンチコドンとしっかり結合していたこととつじつまが合う。アンチコドンの変異は、 K_m よりも k_{cat} に影響をおよぼした(表1-2)。従って、アンチコドンは酵素の活性化(catalytic activation)に働いていると考えられる。34番と35番に関しては、どの塩基に置換した場合も著しい活性の低下が見られたことから、これらの塩基内のいろいろな原子が I l e R S によって多重的に認識されていると考えられる。これに対し、36番のUは、Cに変えても k_{cat}/K_m が1/6しか落ちなかったことから(表1-2)、I l e R S は U36の2-carbonyl基[Cでも保存されている(図1-12)]を主に認識していると考えられる。

1.3.3で述べたように、t^oA37の修飾側鎖は酵素に直接認識されていると考えられる。未修飾の t R N A^{11*} in vitro転写物のA37を他の塩基に置換した場合、もはや k_{cat} は変化しなかったが、 K_m は、UやCへの置換体で上昇したのに対し、Gに変えた場合はむしろ K_m が低下(affinityが上昇)した(表1-2)。このことから、図1-13に示されるようなモデルを考えることができる。すなわち I l e R S は、t^oA37の修飾側鎖のトレオニン部位のcarboxyl基、carbonyl部位のcarbonyl基、および塩基 AのN7を認識していると考えられる。A37では、この3つの因子のうち1つしか持っていないのに対し、G37では2つを持っているため、むしろaffinityが上昇したと考えられる。また、A38をUに変えたものでは、 k_{cat} はまったく変わらずに、 K_m のみが17倍も上昇した(表1-2)。このA38にしるt^oA37にしる、フットプリンティングにより I l e R S と相互作用をしていることが明らかであり(図1-7)、またこれらの塩基はほとんどすべての生物の t R N A^{11*}で保存されている[Sprinzl et al., 1989]ことから、t R N A^{11*}のアイデンティティー決定因子であると考えることができる。

またU33をAに変えた場合、やはり k_{cat} はほとんど変わらずに、 K_m のみが12倍も上昇した(表1-2)。この塩基はほぼすべての t R N A で保存されていることから、t R N A^{11*}のアイデンティティー決定因子とは言えないが、I l e R S と相互作用していると考えられる。したがって、U33とA38がアンチコドンループを I l e R S につなぎとめる錨のような働きをし、その結果アイデンティティー決定因子G34、A35、U36、t^oA37が I l e R S の適当な結合部位におさまってこれを活性化(catalytic activation)すると考えられる。

アンチコドンシステム

NMRおよびフットプリンティングの解析の結果、t R N A^{11*}のアンチコドンシステム

先端の3つの塩基対がIleRSと相互作用していることが示唆された(序, 1.3.1)。そこでこれらの塩基対を、それぞれ他の3種類の塩基対に置換して、反応速度定数におよぼす効果を調べた。すると、C29・G41に変異を導入した場合にイソロイシン受容活性が大きく低下した。C29・G41をU29・G41に変えた場合に k_{cat}/K_m の低下は最も小さかったが、さらにU29・A41に変えるとほぼ完全に失活してしまった(表1-2, 図1-14)。このことからIleRSはC29・G41のうち3'側のG41を主に認識していると考えられる。この結果は、フットプリンティングによる解析において、IleRSがアンチコドンステムの3'側の鎖のみと結合していたこととよく対応する(図1-7)。さらに、 k_{cat} および K_m について詳細な解析を行うことにより、次のような原子レベルでのモデルを組むことができる(図1-14)。すなわち、C29・G41をG29・C41に変えると K_m はほとんど変わらないが、 k_{cat} が大きく低下する(表1-2, 図1-14)。これに対し、C29・G41をA29・U41に変えると、 k_{cat} よりも K_m に効いてくる(表1-2, 図1-14)。したがって、major groove側に向いているcarbonyl基[G41の6-carbonyl基あるいはU41の4-carbonyl基(図1-12)]がproton acceptorとして働くことが、 k_{cat} (catalytic activation)に効いていると考えられる(図1-14)。これに対して、minor groove側に向けたamino基[G41の2-amino基あるいはG29の2-amino基(図1-12)]がproton donorとして働くことが、 K_m (IleRS-binding)に効いていると考えられる(図1-14)。ただ、G41の6-carbonyl基はRNAのmajor grooveに深く埋もれてしまっていて、このままではIleRSが認識することは難しい(図1-15, 写真左のモデルで真ん中よりやや下部にかるうじて見えている赤い酸素原子がG41の6-carbonyl基)。したがって、前述(1.3.1.)のようなアンチコドンステムの巻き戻りが起こってはじめて、IleRSはこのcarbonyl基を認識できると考えられる。またこのC29・G41は、大腸菌のtRNAではtRNA^{Ile}に特徴的なものであり[McClain & Nichoras, 1987]、アイデンティティ決定因子として用いられている可能性は高い。さらにこのC29・G41は原核生物およびクロロプラストのtRNA^{Ile}では強く保存されている[Sprinzl et al., 1989]。したがって、tRNA^{Ile}のC29・G41(G41)は、このtRNAのアイデンティティ決定因子であると考えられる。

C31・G39の変異体においてもイソロイシン受容活性の低下が見られた(表1-2)。しかしこのtRNA^{Ile}のC31・G39は、tRNA^{Ile}ではA31・Ψ39になっている。A・Ψ塩基対はA・U塩基対より安定であることが報告されており[Pochon et al., 1964; Sampson et al., 1992]、またC31・G39の変異においても、これをA・U塩基対やU・A塩基対、さらにA・G塩基対

といった弱い塩基対に置換した場合に活性が大きく低下したことから、このC31・G39はIleRSによって特異的に認識されているのではなく、アンチコドンステムの先端の安定化(ステムの巻き戻りが元にもどる過程など)に働いていると考えられる。A28・U42やG30・C40は、塩基対を置換しても活性の低下は見られなかった(表1-2)。

Dステム

Dステムの4つの塩基対をそれぞれ他の塩基対に置換した結果、U12・A23に変異を導入するとイソロイシン受容活性が大きく低下することが明らかになった(表1-2)。この塩基対は、まさに、NMRおよびフットプリンティングによる解析で、IleRSと相互作用することが示唆された塩基対である。U12・A23をmiss matchであるU12・U23に置換すると完全に失活したことから、U12・A23塩基対のまわりが正常なヘリックスのコンフォメーションをとっていることが、酵素による認識にとって必須であると考えられる。またU12・A23をA12・U23に変えた場合には、 k_{cat}/K_m は1/2しか落ちなかったことから、IleRSはU12・A23のU12のminor groove側のフリーな2-carbonyl基を認識していると考えられる(図1-16)。このU12・A23塩基対は、一部の真核生物のtRNA^{Ile}(Dステムが3塩基対からなるもの)を除いて、すべてのtRNA^{Ile}で保存されている。したがって、U12・A23(U12)はtRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子の1つであると考えられる。

アクセプターステム

アクセプターステムの先端のA1・U72塩基対をG1・C72に変えて塩基対を強めても、イソロイシン受容活性は変化を受けなかったことから(表1-2)、Ileの系は、Glnの系のようなアクセプターステム先端の開裂を伴う認識機構[Rould et al., 1989]をとっていないことがわかる。アクセプターステム7塩基対すべてに、それぞれ変異を導入した結果、C4・G69をG4・C69に変えた場合のみイソロイシン受容活性の低下が認められた(表1-1)。この結果は、フットプリンティングによる解析において、70番のリン酸基にプロテクションが観測されたこととつじつまが合う。また、NMRによる解析でも、C4・G69の隣のU5・G68や、さらにU6・A67、G7・C66に構造変化が示唆されたこと(序)とも関連があると考えられる。したがって、C4・G69は弱いながらもtRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子の1つであると考えられる。興味深いことに、U5・G68をU5・A68に変えても k_{cat} および K_m はいずれも変化しなかったが、U5・G68をC5・G68に変えて塩基対を強めてやると、 k_{cat} お

よび K_m の両方が上がり、見かけ上 k_{cat}/K_m に影響がない結果となった (表1-2)、このことは、この U5·G68 や C4·G69 の周辺に構造変化が起こっており、この変化がアミノアシル化反応の過程で重要な働きをしていることを意味している。C4·G69 は、大腸菌の tRNA においては tRNA^{11*} に特徴的であり [McClain & Nichoras, 1987]、また原核生物やオルガネラの tRNA^{11*} でこの C4·G69 は強く保存されている [Sprinzl et al., 1989]。このことは、C4·G69 が tRNA^{11*} のアイデンティティー決定因子であるという今回の実験結果とよく符合する。

ディスクリミネーター

ディスクリミネーター A73 を他の3種類の塩基に置換すると、イソロイシン受容活性が大きく低下した (表1-2)。したがって、ディスクリミネーター A73 は tRNA^{11*} の主要なアイデンティティー決定因子であると考えられる。このことは、フットプリンティングによる解析において、72番のリン酸基にプロテクションが検出されたのとよく符合する (1.3.1)。A73 を C73 に変えた場合が最も活性の低下の度合いが小さかったことから、IleRS は A73 の 6-amino 基 [C では 4-amino 基で代用される (図1-12)] を認識していると考えられる。

CCA 末端

大腸菌の tRNA^{91a} は G1nRS と複合体を形成すると、CCA 末端がヘアピンのように反りかえって、先端の A が活性中心のポケットに入り込むことが X 線結晶構造解析の結果から明らかになった [Rould et al., 1991]。大腸菌の Ile の系でも同様なメカニズムがあるかどうかを調べるため、tRNA^{11*} の C74、C75、A76 をそれぞれ G に変えた変異体を調製して、反応速度定数を測定した (表1-2)。C74 を G に変えた変異体では、 K_m はほとんど変わらなかったが、 k_{cat} が著しく低下した。したがって、C74 はディスクリミネーター A73 と同じように、IleRS によって認識されていると考えられる。これに対し、隣の C75 を G に変えた場合には、 K_m と k_{cat} が著しく上がったが、見かけ上では k_{cat}/K_m は変わらなかった (表1-2)。このように K_m と k_{cat} が共に上がるという現象は、U5·G68 を C5·G68 に変えた場合にも見られたもので、複合体形成に伴い C75 の近傍で構造変化が起きていることが示唆される。最後に A76 を G に変えた場合は、 k_{cat} は変わらなかったが、 K_m が著しく低下した (表1-2)。このことは、A76 は酵素の触媒活性に影響することではなく、

アミノアシルグループのacceptorとしてのみ働いていることを意味している。ところで大腸菌のtRNA^{Ala}では、C74は酵素と多くの相互作用をして認識され、C75、A76はディスクリミネーターG73とスタッキングしてヘアピン構造を安定化していることが、X線結晶解析の結果から明らかになった [Rould et al., 1989]。したがって、以上の変異体の反応速度解析の結果は、大腸菌のIleの系でもGlnの系と同じようにCCA末端はヘアピン構造を形成している可能性を暗示していると思われる。

1.3.5 大腸菌tRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子

以上のNMR解析、フットプリンティング解析、変異体の反応速度論的解析の結果は非常によく符合し、大腸菌のtRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子セットを明らかにすることができた。すなわち、アンチコドンループ中のアンチコドンG34、A35、U36、修飾塩基t^AA37、A38、ディスクリミネーターA73、それぞれ3本のステムの真ん中に位置するU12-A23、C29-G41、C4-G69（下線を引いた残基が相手方よりもいっそう重要であると考えられる）がtRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子であると考えられる（図1-17）。大腸菌tRNA^{Ile}のもう一つのisoacceptorであるtRNA^{Ile}₂は、tRNA^{Ile}₁とは76残基中25残基も異なる配列を持ちながら、これら9個のアイデンティティー決定因子をすべて含んでいる（図1-18）。

1.3.6 tRNA^{Ile}のミニヘリックス、マイクロヘリックスのイソロイシン受容活性

アイデンティティー決定因子として1.3.5で列記したもののうち、C4-G69は他のものに比べてイソロイシン受容活性における寄与が小さかった（表1-2）。そこで、これが真にtRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子であることを確かめるため、tRNA^{Ile}のアクセプターステムに（それとスタッキングしている）TΨCアームが連結した構造を持つミニヘリックス、さらにアクセプターステムだけの構造を持つマイクロヘリックスをT7 RNA polymeraseを用いてin vitroで合成した（図1-19）。これらのtRNAの部分分子の反応速度論的解析を行えば、アクセプターステムのイソロイシン受容活性への寄与を直接見ることができる。しかし活性測定条件のARS濃度が高いと、ARS自身にアミノ酸が結合して、これが誤って検出されてしまう。そこで、酸性PAGEやHPLCを用いることによって、確かにRNAにアミノ酸が結合していることを確認する必要がある [Martins & Schimmel, 1992; Frugier et al., 1992]。ただしこのARSへのアミノ酸結合反応は非

常に反応速度が遅いので、本研究のような短時間での測定には誤差範囲の影響しかないと考えられる。

反応速度論的解析の結果、ミニヘリックス、マイクロヘリックスのいずれも K_m はほとんど変わらなかったが、 k_{cat} が野性型のtRNA^{11*}に比べて著しく(1/100)低下していた。すなわち、アンチコドンなどのアイデンティティー決定因子を欠落している分だけ catalytic activation としての働きを欠いてはいるが、アクセプターステムだけでも十分 IleRS に認識されていると考えられる。そこで、このマイクロヘリックスの上で、C4·G69をG4·C69に置換した変異体、およびA73をGに変えた変異体をそれぞれ調製し、イソロイシン受容活性を測定した(図1-19)。すると、これらの変異体マイクロヘリックスはイソロイシンを全く受容しなかった(表1-2)。したがってC4·G69もA73と同様、確かにtRNA^{11*}のアイデンティティー決定因子の一つであると考えられる。

1.3.7 tRNA^{50*}のイソロイシン受容tRNAへの変換

そこで、1.3.5で述べた9個の残基が本当にtRNA^{11*}のアイデンティティー決定因子であるかどうかを確かめるため、これらを大腸菌のtRNA^{50*}(アンチコドンUGA)に移植して、イソロイシン受容活性をもつようになるかどうかを調べた。tRNA^{50*}は、クラスIIに属する長いvariable loopを持つtRNAで、tRNA^{11*}とは最も相同性の低いtRNAの1つであると考えられる。これら9つの残基以外に、tRNA^{50*}はDステムの先端がG13·A22というmiss matchになっているので、これをC13·G22に変え、また、アンチコドンステムの先端のU31·A39はより安定なC31·G39に変えた(図1-20A)。図1-20Bからわかるように、tRNA^{50*}は大腸菌IleRSによって全くアミノアシル化を受けなかったが、これらの残基を移植してやることによって、このtRNA^{50*}変異体(図1-20A)はIleRSに対するよい基質となった。さらに、反応速度論的解析の結果、 K_m は6倍に上昇していたが、 k_{cat} はほとんど変わらなことがわかった(図1-20A)。この K_m の上昇はtRNA^{50*}とtRNA^{11*}の構造的な相違によるものであろうと考えられる。いずれにせよ、1.3.5で述べた9つの残基は確かにtRNA^{11*}のアイデンティティー決定因子であると結論することができる。

また、補足的ではあるが、高度好熱菌IleRS(第2章)を用いて、tRNA^{50*}およびtRNA^{50*·11*}のアミノアシル化反応を行なってみた。その結果、高度好熱菌のIleRSはtRNA^{50*}を全くアミノアシル化しなかったが、上記の9残基を移植した

tRNA^{ser→11}はtRNA¹¹と同程度にイソロイシンをチャージされることがわかった(図1-20B)。したがって、図1-17に示した9残基は、高度好熱菌IleRSに対しても完全なアイデンティティーセットであると考えられる。

1.3.8 IleRSによる認識に伴うtRNA¹¹のlocalな構造変化とglobalな構造変化

1.3.4の議論に基づいて、図1-15に、各アイデンティティー決定因子(黄色)で認識に特に重要であると思われる官能基を赤(酸素原子)および青(窒素原子)で示した。先に述べたように、これらのうち、major grooveに埋もれているなどの理由によりIleRSが認識しにくくなっているものは、ステムの巻き戻りなどのlocalな構造変化によって表に出てきてIleRSに認識されるしくみになっていると思われる。すなわち先のNMRによる解析で、アイデンティティー決定因子の近傍に認められた変化(図1-1)は、IleRSによる認識に伴うtRNA¹¹のlocalな構造変化を意味しているものと思われる。では、NMRによる解析(図1-1)やフットプリンティングによる解析(図1-7)で、DループやTΨCループなどのtRNAのコアを形成する部位に認められた変化はどのような意味を持つのだろうか。

1.3.9 tertiary base pairの変異体の反応速度論的解析

そこで、tRNA¹¹の9つのtertiary base pairに変異を導入し、これらの水素結合がもともと弱めなくなったようなtRNA¹¹変異体を調製し、反応速度定数を測定した。すると、A9-A23、G10-G45、G15-C48、G18-U55、G19-C56、G26-A44、U54-A58の変異体では k_{cat} も K_m も変わらず、これらが開裂してもアミノアシル化反応の過程は影響されることがわかる(表1-2、図1-21)。これに対し、U8-A14やG22-G46などのtertiary base pairを変異の導入により弱めなくしてやると、 k_{cat} が著しく低下することがわかった(表1-2、図1-21)。変異を導入しても活性に影響のない(壊してもよい)tertiary base pairは、NMR解析(図1-1)やフットプリンティング解析(図1-7)において、複合体形成に伴い積極的に開裂していると推察された部位であり、壊してはいけないU8-A14やG22-G46などのtertiary base pairは、これらの物理化学的解析においても、確かに残っている。すなわち、tRNA¹¹はIleRSと複合体を形成すると、tRNA¹¹のコアのコンフォメーションが変わるようなglobalな構造変化が起きて、数多くのtertiary base pairが積極的に開裂すると考えられる。これは、酵母のtRNA^{Phe}とは著しい相違を示してい

る。すなわち tRNA^{Phe}では、9つ全ての tertiary base pair が残ったままで tRNA が適切な L 字型構造をとっていることが、そのフェニルアラニン受容活性に必須であると考えられる [Sampson et al., 1990].

1.3.10 TΨCアームを欠失した tRNA^{Ile}のイソロイシン受容活性

以上の解析により、IleRS が Dループを含む面で tRNA^{Ile} と接触し、これと複合体を形成すると、tRNA^{Ile} の Dループと TΨCループが開裂するような構造変化が起こることが示唆された。また TΨCアームにはアイデンティティー決定因子が存在していないことから、tRNA^{Ile} の TΨCアームを取り去ってしまっても、IleRS によってイソロイシンをチャージされるのではないかと考えられる。天然では、線虫 (*Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum*) のミトコンドリアの tRNA が、TΨCアームを欠失していることが知られている [Wolstenholm et al., 1987]。そこで、TΨCアームを欠失し、代わりに UUUUUG なる配列 (*Ascaris suum* の tRNA^{Ile} の配列を用いた) で variable loop とアクセプターステムをつなげた大腸菌 tRNA^{Ile} 変異体を *in vitro* で調製し、反応速度論的解析を行った (表1-1, 図1-22)。すると、興味深いことに K_m はほとんど変わらず (むしろ小さくなり)、 k_{cat} だけが 1/12 程度に低下した (表1-1)。このことは、TΨCアームを欠失したような柔らかい構造を持つ tRNA^{Ile} 変異体でも、IleRS によって十分に認識され、それなりにアミノアシル化されてしまうことを意味している。さらに、variable loop とアクセプターステムの間の挿入配列 UUUUUG ((U)₅G) を (U)₄G, (U)₃G, (U)₂G, UG と縮めていくと、急激に K_m が上がって、アミノアシル化されなくなる (表1-2, 図1-22b)。この失活の原因を図1-23のモデルから考察すると、TΨCアームをこのような短いループでつなぐことにより、tRNA^{Ile} の認識部位 (アイデンティティー決定因子) 付近の構造までひろく壊れてしまったためであるか、あるいは、本来 TΨCアームが持っていた柔軟性が失われてしまって、tRNA^{Ile} の構造変化がスムーズに起こらなくなり、アイデンティティー決定因子が効率よく IleRS に認識されなくなったためであると考えられる。

1.3.11 tRNA^{Ile} の 2 ドメインへの分断

tRNA は 2 本のヘリックス (acceptor-TΨC helix と anti-codon-D helix) に分かれ、それぞれが 1 種のドメインになっている。そこで、tRNA^{Ile} において、さらにこの 2 つ

のドメインに切り離した形でも I l e R S によって十分アミノアシル化されるかどうかを解析した。具体的には、図1-24に示したように、acceptor-T Ψ C helixからなるミニヘリックスとanticodon-D helixからなるアンチコドンミニヘリックスをT7 RNA polymeraseを用いて調製し、ミニヘリックスのイソロイシン受容活性がアンチコドンミニヘリックス（マイクロヘリックスの6倍濃度）を加えることで上がるかどうかを調べた。するとアンチコドンミニヘリックスを加えた場合、ミニヘリックス単独の場合に比べて、プラトーレベルにして約20%のイソロイシン受容活性の上昇が再現性良く認められた（図1-24）。したがって、アンチコドンアームやDシステムは、アクセプターシステムとは独立に I l e R S に認識されてこれを活性化していると考えられる。しかしアンチコドンミニヘリックスを加えても、1/60に低下したミニヘリックスのイソロイシン受容活性はわずか1.2倍しか上昇しなかった。もちろんミニヘリックス分子だけでなく、アンチコドンミニヘリックス分子も同時に I l e R S 分子と結合しなければならないので、これにより k_{cat} はかなり低下すると考えられるが、それを考慮してもなお効果が小さいと考えられる。この原因として、1-3-9で k_{cat} に効いていることが明らかになった高次構造上の塩基対U8-A14やG22-G46が欠落していることが考えられる。さらに考察を進めるなら、アンチコドンアームやDシステム、アクセプターシステムが共有結合でつながったまま、tRNA^{11*}分子全体がglobalな構造変化を起こすことではじめて、全てのアイデンティティ決定因子が余すところなく I l e R S に認識され、I l e R S を十分に活性化するものと予想される。すなわち、アミノアシル化反応の活性化のシグナルは酵素側の構造変化のみを介して行われるのではなく、tRNA側のglobalな構造変化をも介していることが本研究により示唆された。

1.3.12 I l e R S による tRNA^{11*}の動的な認識機構

以上の大腸菌 tRNA^{11*}の3種の独立した解析（NMR、フットプリンティング、反応速度論的解析）の結果を合わせると、I l e R S による tRNA^{11*}の認識機構が浮かび上がってくる（図1-25）。すなわち、I l e R S は tRNA^{11*}のアンチコドンループにしっかり結合し、アンチコドン3残基およびt^{11*}A37とA38を認識する。さらに、アンチコドンシステムの3'側のRNA単鎖にはりついてG41を認識する。これにより、アンチコドンシステムの巻き戻りが生じ、先端の2残基が開裂する。また、Dシステムにおいては、ヘリックス構造のままシステムに結合しU12を認識する。これにより、近傍のtertiary base pair は開裂する。一方アクセプターシステムでは、ディスクリミネーターA73およびG69を認識す

る。これら tRNA 分子全体に散在するアイデンティティー決定因子が一度に認識されるため、tRNA は L 字型構造をとれなくなり、D ループと TΨC ループは開裂し、L 字型立体構造は歪んでしまうと考えられる。このモデルをグラフィクスを用いて表したのが図 1-26 である。D ループと TΨC ループの開裂には、アンチコドシステムの巻き戻りに引きずられて起こる TΨC アームの配向の変化が起因していると考えられる (図 1-26)。

1.3.13 フットプリンティングによる tRNA^{Met}・MetRS 複合体の解析

これまで tRNA^{Met} のアイデンティティー決定因子はアンチコドンであるということが定説になってきたため、tRNA 全体にわたっての詳細な研究は報告がない。そこで本研究では、大腸菌の tRNA^{Met} と高度好熱菌 MetRS の複合体のフットプリンティング解析を行って、その相互作用様式を tRNA 全体にわたって明らかにすることを試みた。高度好熱菌の tRNA^{Met} は大腸菌の tRNA^{Met} とほぼ同じ配列を持ち (TΨC ステムの 3 ヌクレオチドと 4 つの塩基修飾だけが異なる [Watanabe et al., 1979])、高度好熱菌 MetRS は 2 つの tRNA^{Met} を同じ反応速度定数でアミノアシル化する。

まず、ヌクレアーゼ S1 やヌクレアーゼ V1 といった酵素プローブを用いたフットプリンティングを行った (図 1-27)。ヌクレアーゼ S1 は、RNA の露出したループ構造を特異的に切断する。これに対し、ヌクレアーゼ V1 は二本鎖のステム領域を特異的に切断する。まずヌクレアーゼ S1 によって、フリーの tRNA^{Met} の C34, A35, U36 の 3' 側が切断された (図 1-27, レーン 4)。これに MetRS を加えると、これらアンチコドンの 3 残基はプロテクトされ、確かに tRNA^{Met} のアンチコドンは MetRS と結合していることがわかる (図 1-27, レーン 5)。MetRS の代わりに大腸菌の IleRS を加えると、アンチコドン 3 残基はいずれもプロテクションを受けず、むしろより強く切断されている印象を受ける (図 1-27, レーン 7)。したがって、MetRS による tRNA^{Met} のアンチコドン部位のプロテクションは特異的な認識によるものであり、他の ARS によってはむしろ排除されるような現象が起きていると予想される。興味深いことに、単量体型の MetRS (C 端の二量化ドメインを欠失させたもの、第 2 章) を用いた場合には、アンチコドンのプロテクションが弱い (図 1-27, レーン 6)。したがって、MetRS による tRNA^{Met} の認識は、酵素の二量化によってより確実なものにされているのかもしれない。ヌクレアーゼ V1 では、明らかなプロテクションは検出されなかった (図 1-27, レーン 8-11)。したがって Met の系では、Ile の系のように tRNA のステムに強い認識部位が存在する可

能性は低いと考えられる。

そこで、酵素プローブよりさらに感度のよいN-nitroso-N-ethylureaを用いたフットプリンティングを行った。大腸菌のtRNA^{Met}は大腸菌のtRNA^{Ile}に比べて構造が弱い
ためか、反応の過程で切れやすく、これが解析の妨げになってしまった。図1-28にフットプリンティングの結果を示す。各バンドの強度をデンストメーターで測定して、定量的なヒストグラムで表したものを図1-29に示す。さらに、この結果をtRNAのL字型2次構造の上に矢印で表したものが図1-30である。すると、やはりアンチコドンが最も強いプロテクションを受けた。また、Dアームやvariable loopにもプロテクションが見られた(図1-28-30)。これらのプロテクションは、MetRSの代わりにIleRSを用いた場合は検出されなかった(図1-28, レーン4)。さらに、プロテクションを受けたリン酸基をtRNAの3次構造の上にプロットしたものが図1-31である。これを見ると、プロテクションを受けたリン酸基はほぼ1面にのっており、MetRSはtRNA^{Met}のvariable loopの側からこれと相互作用していると考えられる。これはtRNA^{Ile}の場合とは逆の方向に相当する(図1-9と図1-31を比較)。すなわち、MetとIleの2つの系は、tRNAについてもARSについても非常に相同性が高く、同じサブグループに属すると考えられているが、tRNAとARSの相互作用様式は著しく異なることが今回の研究により示唆された。

さらに興味深いことに、16番、19番のリン酸基は、MetRSと複合体を形成すると、フリーな状態よりもアルキル化剤の攻撃を受けやすくなった(図1-28, 29, 30)。特に19番のリン酸基は、フリーな状態の4.5倍の強度を示し(図1-29)、ゲルの写真上でも強度の増加がはっきり認められる(図1-28, レーン2)。この結果は、以前報告された大腸菌のtRNA^{Met}・MetRS複合体のRNaseプローブによるフットプリンティングの結果[Yamashiro-Matsumura & Kawata, 1981]と非常によく一致する。すなわちその結果とは、リボヌクレアーゼT₂を用いた場合には、tRNA^{Met}がMetRSと複合体を形成すると、A14, G15, A22, G23およびC34の切断が促進され、ヌクレアーゼS1をプローブとした場合には、G15, G19, G20, G23およびG2がより切れやすくなった、というものである。すなわち、tRNA^{Ile}で見られたように、tRNA^{Met}の場合も酵素と複合体を形成すると、DループとTΨCループのtertiary interactionが開裂すると考えられる。

コンピューター解析の結果からは、tRNA^{Met}にはアンチコドンとC3・G70以外に、他のtRNAと比べて特徴的な残基が見つからない[McClain & Nichoras, 1987]。したがっ

て、本研究の結果から、tRNA^{Met}の支配的なアイデンティティー決定因子はやはりアンチコドンであり、他にもDアームかvariable loopにそれより弱いアイデンティティー決定因子が存在することが示唆される。

1.3.14 ¹³C-NMRを用いたtRNA^{Glu}・GluRS複合体の解析

tRNA^{Glu}のグルタミン酸受容活性にtRNAの修飾が必須であることは序でも述べたが、そもそもtRNA^{Glu}には修飾塩基が少なく、Ψ13, mnm^s2U34, m²A37, T54, Ψ55のわずか5つしかない。このうち、T54とΨ55は全てのtRNAで共通して存在し、DループとTΨCループのtertiary interactionに寄与する修飾塩基であると考えられるので、他の3つの修飾塩基のどれかをGluRSは特異的に認識していると思われる。図1-32にメチル基が¹³Cでラベルされた修飾塩基とそのtRNA^{Glu}での位置を示す。従って本研究では、Ψ以外の修飾塩基についてそのGluRSとの相互作用を検討することができる。

図1-33に¹³CラベルされたtRNA^{Glu}の¹³C-NMRの結果を示す。各修飾塩基のメチル基のδ_cの値は、単離されたヌクレオシドの¹³C-NMRの測定結果より明らかになっている[Yokoyama et al., 1980]ので、これを用いて帰属を行った。図1-33で見られるように、3つの修飾塩基のメチル基のシグナルはよく分離している。低磁場側のブロードなシグナルは、天然存在比に相当してtRNA^{Glu}に含まれる¹³C由来のシグナルである。

このフリーの大腸菌tRNA^{Glu}に高度好熱菌GluRSを加えて複合体を形成させた場合の¹³C-NMRの結果を図1-34の上に示す。GluRSと複合体を形成して分子量が約3倍になったため、3本のシグナルは線幅が広がっている。複合体を形成することにより、フリーの状態に比べて2つの大きな変化が起こっている。1つは、mnm^s2U34のシグナルが1.2ppmも低磁場シフトしたことである。このことから、アンチコドン1字目のmnm^s2UはGluRSと特異的に相互作用していると考えられる。また、シグナルが低磁場シフトしたことから、なんらかのGluRS側の芳香族アミノ酸残基がこの認識に関与している可能性がある[Nureki et al., 1992] (第2章)。図1-34を詳しく見ると、複合体を形成した際のmnm^s2Uのシグナルが2つに割れており、1方は化学シフトが変わらず、もう1方のみが低磁場シフトしている。そもそもtRNA^{Glu}には、nativeなコンフォメーションとdenature型のコンフォメーションの2形が存在しているといわれており、化学シフトが変わらない方のシグナルはdenature型のコンフォメーションをとっているtRNA^{Glu}由来のシグナルである可能性がある。

もう1つの変化は、 m^2A37 のシグナルが、分子量の増加による効果以上にブロードニングしたことである(Tのシグナルのブロードニングの度合と比べるとよくわかる)。このことは、アンチコドンの隣に位置する37番の m^2A もやはり $Gl uRS$ と特異的に相互作用していることを示唆する。酵母の $tRNA^{Asp} \cdot AspRS$ 複合体のX線結晶解析では、 $tRNA^{Asp}$ の37番の m^2A は酵素の疎水性ポケットに深く入りこんで認識を受けていることが示唆されている。本研究により、大腸菌 $tRNA^{Glu}$ の場合にも同じような認識機構が存在することが示唆された。

本研究より $Gl uRS$ は $tRNA^{Glu}$ のアンチコドンループに存在する2つの修飾塩基を特異的に認識していることが示唆された。N-nitroso-N-ethylureaを用いたフットプリンティングにより、アンチコドン以外にも、Dアームやvariable loop、アクセプターステムで酵素との接触が検出されている(館野・瀧木、未発表)。コンピュータ解析の結果 [McClain & Nichoras, 1987] と考えあわせると、Dステムの U11-A24, C12-G23, Ψ 13、および variable loop の U44, A45, A46, A49、アクセプターステムの G69, G70, A71 は $tRNA^{Glu}$ に特徴的であり、しかもこれらは酵素との接触がフットプリンティング解析により示唆された部位である(館野・瀧木、未発表)。またDループの C20, C20a、アンチコドンループの C38 は他の大腸菌 $tRNA$ ではほとんど見られない残基である。したがって、これらの中にも $tRNA^{Glu}$ のアイデンティティー決定因子が含まれているものと考えられる。

1. 4. 結論

本研究では、大腸菌の $tRNA^{Ile}$ 、 $tRNA^{Met}$ 、 $tRNA^{Glu}$ の、それぞれ特異的なARSによる認識様式を解明・考察し、特に、 $tRNA^{Ile}$ については、NMR、フットプリンティング、 $tRNA$ 変異体の反応速度論的解析といった独立した3つの解析の結果が相乗的に統合されて、全てのアイデンティティー決定因子とその動的な認識機構を明らかにすることができた。 $tRNA^{Ile}$ では、アイデンティティー決定因子が分子全体にわたって散在し、いままでどの $tRNA$ でも見いだされなかったアンチコドンステムやDステムの真ん中にもアイデンティティー決定因子が存在することがわかった。さらに、こういったアイデンティティー決定因子の分布そのものが、ARSによる $tRNA$ の動的な認識と結びつくことを示唆することができた。以下、この2点について、他の $tRNA$ の系

と比較しながら議論を進める。

tRNA^{11*}の最も主要なアイデンティティー決定因子はアンチコドンの3残基であった。これは他の多くのtRNAでも共通した特徴である [Normanly et al., 1986; Yarus, 1988; Normanly & Abelson, 1989; Schimmel, 1989]。ただしtRNA^{11*}の場合は、さらにアンチコドンループ上のt^oA37, A38も比重の高いアイデンティティー決定因子として働いており、特徴的である。37番の修飾塩基が認識部位となっていることを示唆したのは、おそらくこのtRNA^{11*}の系が最初であると思われる。最近のX線結晶構造解析の結果より、大腸菌のtRNA^{o12}でも37番のm²Aが酵素によって認識されていることが明らかになった [Rould et al., 1991]。おそらく本研究のtRNA^{o12}でも、m²A37はGluRSによって特異的に認識されていると考えられる (1.3.14)。一方で、酵母のtRNA^{A8P}では、37番のm²Gは、ArgRSに対する負の決定因子 (negative determinant) として働いていることが示唆されている [Perret et al., 1990]。

tRNA^{11*}の次に比重の高いアイデンティティー決定因子は、ディスクリミネーターであった。ディスクリミネーターは、他の多くのtRNAでもアイデンティティー決定因子として用いられている [Yarus, 1988; Normanly & Abelson, 1989; Schimmel, 1989; Schulman, 1991]。

アンチコドンシステムに関しては、これまでに大腸菌およびヒトのtRNA^{Phe}で、ステムの先端の2つの塩基対や27・43の塩基対がPheRSの認識部位であることを示唆する実験結果が報告されている [McClain & Foss, 1988c; Nazarenko et al., 1992]。本研究では、tRNA^{11*}のアンチコドンシステム3番目のC29・G41がかなり強いアイデンティティー決定因子であることを示し、アンチコドンシステムにもアイデンティティー決定因子が普遍的に存在する可能性を強く示唆することができた。

アクセプターシステムについてはtRNA^{Ser}、tRNA^{Asp}、tRNA^{His}、tRNA^{Ala}、tRNA^{o12}、tRNA^{o13}などの系で、先端の3塩基対のうち1つか2つがアイデンティティー決定因子として用いられていることが知られている (図1-35) [Normanly et al., 1986; Hou & Schimmel, 1988; McClain & Foss, 1988a; McClain et al., 1988; Franklyn & Schimmel, 1990a, b; McClain et al., 1991a, b; Franklyn et al., 1992; Jahn et al., 1991]。本研究のtRNA^{11*}では、C4・G69が、minorではあれ、確かにアイデンティティー決定因子として働いており、4番目以下の塩基対もアイデンティティー決定因子として用いられる可能性を示唆することができた。またアクセプターシステムには、正の決定因子だけでなく負

の決定因子も存在すると考えられており [Schulman, 1992], この領域に多くの tRNA がアイデンティティー決定因子を持つことの1つの傍証となっている。

さらに, tRNAのL字型構造の中心に近いDステムについては, 酵母の tRNA^{Asp} や大腸菌の tRNA^{Gln} で, アイデンティティー決定因子 (G10) が存在することが断片的に示唆されてきたが [Rould et al., 1991; Putz et al., 1991], tRNA¹¹⁰ では, ステムの真ん中の U12·A23 がアイデンティティー決定因子となっており, tRNAのDステムにもアイデンティティー決定因子が普遍的に存在することを示唆することができた。ちなみに, tRNA^{Arg} (U20) [McClain & Foss, 1988c], tRNA^{Phe} (G20) [Sampson & Uhlenbeck, 1988; Sampson et al., 1989, 1992], tRNA^{Gln} (C16) [Rould et al., 1991], そしておそらく tRNA^{Glu} (1.3.16) では, Dループの特徴的な "variable pocket" にアイデンティティー決定因子が存在すると考えられる。

これに対し, tRNA¹¹⁰ の TΨCアームには, 本研究の TΨCアーム欠失変異体の解析から明らかなように, アイデンティティー決定因子は存在しないと思われる。線虫ミトコンドリアのほとんどの tRNA は TΨCアームを欠失していることから, TΨCアームにアイデンティティー決定因子が無いことも, かなり普遍化できる可能性がある。

以上のように考察してみると, tRNA¹¹⁰ は決して例外的に複雑なのではなく, すべての tRNA には, 酵素による認識において共通の方式が存在することが示唆される。そして各 tRNA は, 認識部位の場所を少しずらせたり, 比重を変えたり, 塩基修飾を導入することで, それぞれのアイデンティティーを発揮していると考えられる。

また tRNA¹¹⁰ では, 酵素による認識に伴い local な構造変化に加えて global な構造変化が引き起こされた。このような global な構造変化は, 散らばって存在するアイデンティティー決定因子が IleRS によって十分に認識を受けるのを助けるように緻密にデザインされたものである。このような Dループと TΨCループの開裂を伴う global な構造変化は, tRNA^{Met} や tRNA^{Val} の系でも, フットプリンティングや F¹⁹-NMR を用いた解析により示唆されている [Yamashiro & Kawata, 1981; Chu & Holowitz, 1991]。また, tRNA^{Gln} でも, GlnRS と相互作用することによって構造上のストレスが生じ, 特異的な RNA 主鎖の切断が起こることが報告されている [Beresten et al., 1992]。したがって, tRNA¹¹⁰ で見られたように, アイデンティティー決定因子の認識が tRNA の local な構造変化と global な構造変化を伴うという現象は, 他の tRNA の系にも普遍的に存在するものと思われる。

Role of the anticodon (AC) and discriminator (DIS) bases
in the *E. coli* tRNA identity *in vitro*.

Amino acid	AC	DIS	Amino acid	AC	DIS
Alanine	UGC ●	A O	Leucine	CAG ●	A O
Arginine	ACG O	A, G Δ	Lysine	UUU O	A O
Asparagine	GUU O*	G O*	Methionine	CAU O	A Δ
Aspartate	GUC O	G O	Phenylalanine	GAA O	A Δ
Cysteine	GCA O*	U O*	Proline	CGG O*	A O*
Glutamine	UUC O	G O*	Serine	UGA ●	G ●
Glutamate	UCC O	G O*	Threonine	UGG O	A ●
Glycine	GCC O*	U Δ*	Tryptophan	CCA O*	G Δ*
Histidine	GUG O*	C O	Tyrosine	GUA O	A O
Isoleucine	GAU O	A O*	Valine	UAC O	A O

Simizu, M. (1992) *J. Mol. Evol.* in press.

* preliminary data

表1-1 いろいろな大腸菌tRNAのアイデンティティにおけるアンチコドン(AC)とディスクリミネーター(DIS)の役割
○はアイデンティティの決定に重要であることを, Δは弱いアイデンティティ決定因子であることを, ●はアイデンティティ
の決定に寄与していないことを表している. Shimizu による [Shimizu, 1992].

Mutant type	tRNA ^{Ile} variant	K_m (μM)	k_{cat} $\times 10^3 (s^{-1})$	k_{cat}/K_m (relative)	Loss of specificity (x-fold)
tRNA ^{Ile} transcript	A1U72(wild type)	8.4	3.3	0.81	1
Acceptor stem	G1C72	8.2	4.0	1.0	1
	G2C71→A2U71	7.9	1.8	0.48	2
	C2G71	n.d.	n.d.	3.3	0.3
	G3C70→A3U70	12	10	1.8	0.6
	C4G69→U4A69	7.0	2.7	0.79	1
	G4C69	4.8	0.30	0.13	8
	U5G68→C5G68	33	29	1.8	0.6
	U5A68	6.7	2.8	0.86	1
	U6A67→C6G67	15	6.1	0.85	1
	G7C66→A7U66	11	3.8	0.71	1
	U8→A8	21	0.27	0.027	37
	A9→C9	10	2.9	0.59	2
D-stem and loop	G10C25→A10U25	12	4.3	0.73	1
	C11G24→U11A24	15	5.2	0.74	1
	U12A23→C12G23	29	0.82	0.058	17
	G12C23	24	2.4	0.21	5
	A12U23	26	5.8	0.45	2
	U12U23	n.d.	n.d.	<0.001	>1000
	C13G22→U13A22	7.7	0.85	0.23	4
	G13C22	4.2	3.0	1.5	0.7
	G15→A15	8.3	7.9	2.0	0.5
	G18→A18	3.7	1.4	0.81	1
	G19→A19	1.2	0.86	1.5	0.7
	Anticodon stem	A28U42→C28G42	10	2.4	0.50
C29G41→U29A41		n.d.	n.d.	<0.001	>1000
A29U41		96	2.6	0.055	18
G29C41		15	0.30	0.041	24
U29G41		16	0.78	0.10	10
C30G40→U30A40		10	5.0	1.0	1
A30U40		8.6	7.6	2.0	0.5
G30C40		19	3.9	0.43	2
C31G39→U31A39		12	0.67	0.12	8
A31U39		5.7	0.17	0.063	16
G31C39		10	1.2	0.24	4
A31G39		14	0.19	0.028	36
Anticodon loop	C32→A32	7.1	1.1	0.32	3
	U33→A33	100	1.6	0.033	30
	G34→A34	33	0.057	0.0036	280
	C34	36	0.053	0.0031	320
	U34	12	0.039	0.0070	140
	A35→C35	57	0.071	0.0026	380
	G35	n.d.	n.d.	<0.001	>1000
	U35	39	0.082	0.0044	230
	U36→A36	77	0.166	0.0045	220
	C36	63	5.3	0.18	6
	G36	46	0.57	0.026	38
	A37→C37	63	6.9	0.23	4
G37	3.7	3.3	1.9	0.5	
U37	19	3.2	0.35	3	
Variable loop	A38→U38	140	4.9	0.073	14
	G45→U45	57	23	0.85	1
	G46→C46	9.1	0.053	0.012	83
T-stem and loop	A57→G57	26	7.6	0.90	1
	G49U65→G49C65	130	42	0.67	1
3' terminus	A73→C73	160	10	0.13	8
	G73	25	0.25	0.020	50
	U73	56	0.62	0.023	43
	C74→G74	23	0.14	0.013	77
	C75→G75	420	150	0.73	1
	A76→G76	230	3.1	0.028	36
$\Delta(T\psi C\text{-Arm})$	-(U)5G.*	7.3	0.34	0.097	10
	-(U)4G.*	10.9	0.21	0.040	25
	-(U)3G.*	68	0.47	0.014	71
	-(U)2G.*	n.d.	n.d.	<0.001	>1000
	-UG.*	n.d.	n.d.	<0.001	>1000
	Minihelix		6.9	0.058	0.017
Microhelix		4.6	0.028	0.012	83
Microhelix	C4G69→G4C69	n.d.	n.d.	<0.001	>1000
Microhelix	A73→G73	n.d.	n.d.	<0.001	>1000
tRNA ^{Ser/Ile}		50	2.5	0.11	9
tRNA ^{Ile} (mature)		5.4	1600	620	0.002
tRNA ^{Ile} (mature)		9.6	1400	310	0.003

表 1-2 大腸菌 tRNA^{Ile}¹⁰
変異体の反応速度定数

*; Tアームを欠失させた

tRNA^{Ile}¹⁰ (図1-22),

*; アイデンティティ-がイソロ

イシンに変換した tRNA^{Ser}

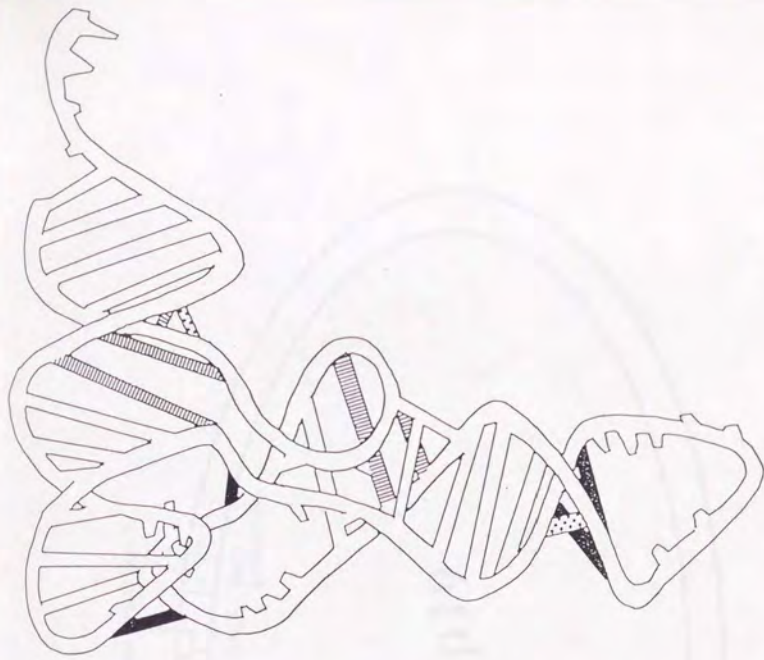
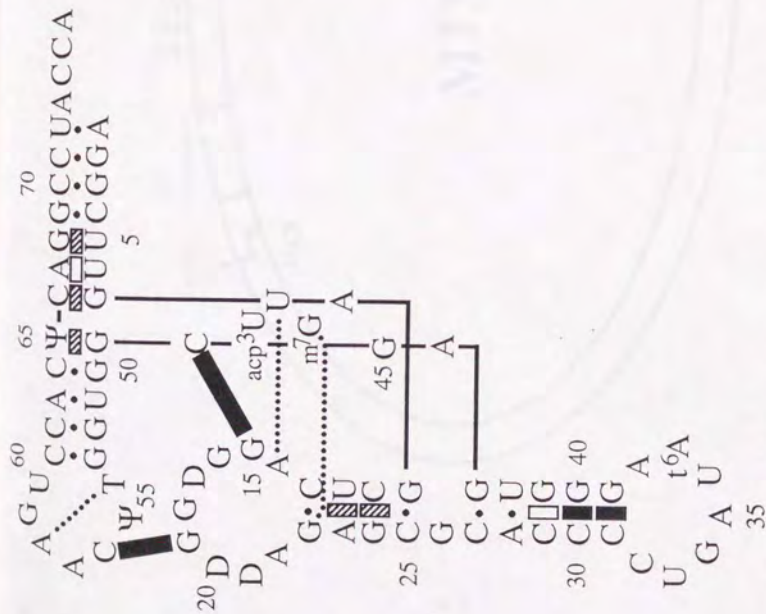


図1-1 大腸菌 tRNA^{Ile} の IleRS 複合体の¹H-NMR解析の結果 [Niimi et al., submitted] 黒く塗った塩基対は、複合体の形成に伴って塩基対が開裂 (あるいは breathing) を起こしたものの、斜線および白抜きで示した塩基対は、複合体形成に伴って、それぞれ大ききおよび小さな構造変化が示唆された部位である。

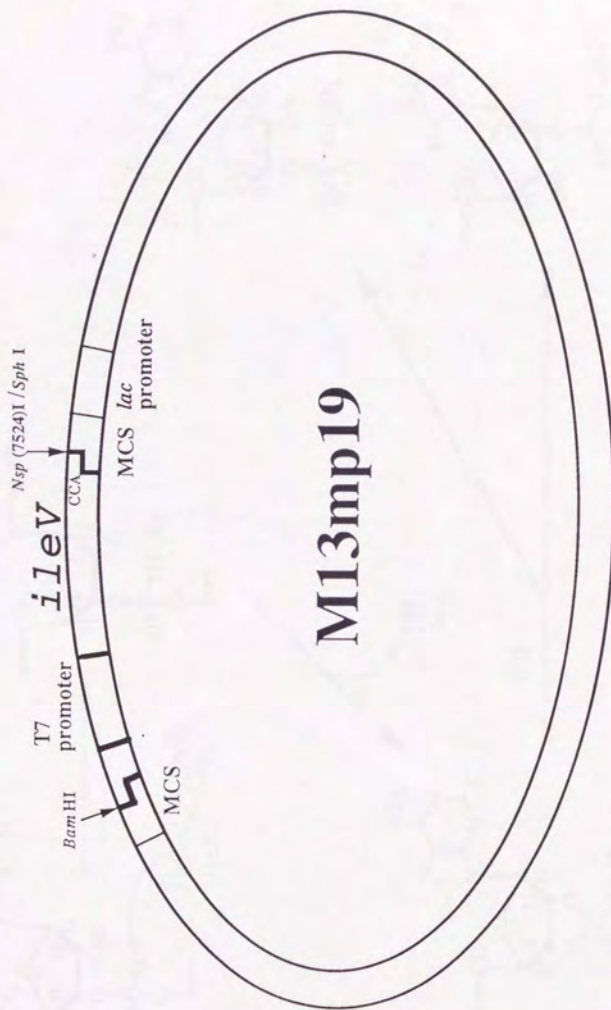


図 1-2 大腸菌 tRNA^{tyr} の in vitro 転写系の構築 MCS, multiple cloning site.

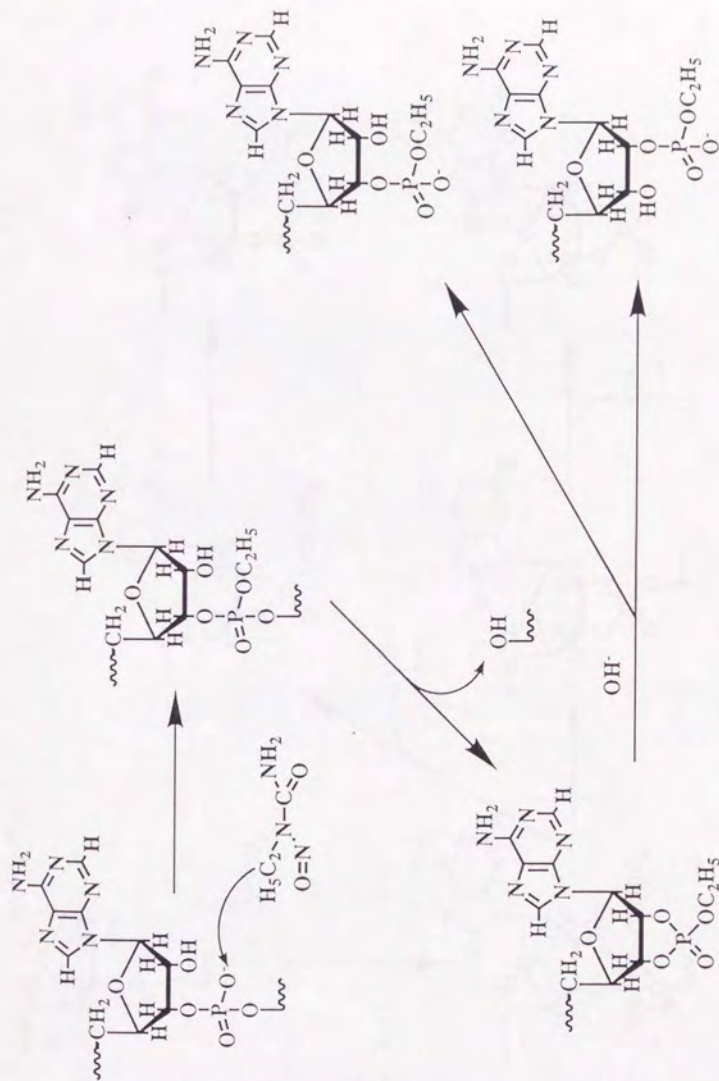


図1-3 N-nitroso-N-ethyl ureaによるRNAのアルキル化と切断

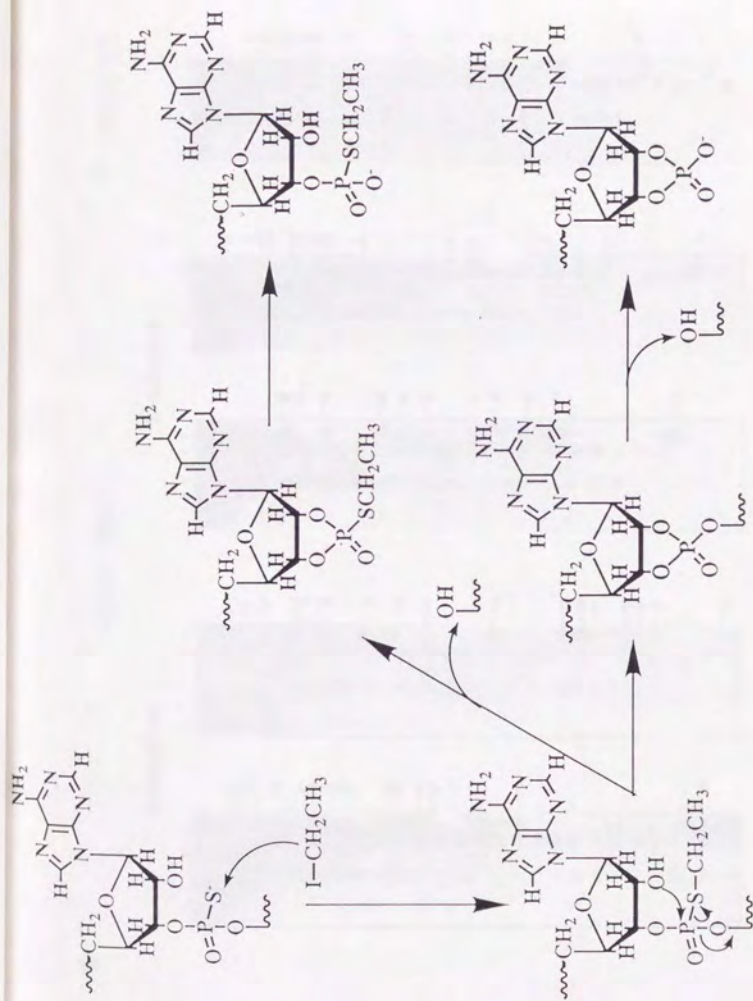


図1-4 Phosphorothioate diesterのヨウ化エチルによるアルキル化と切断

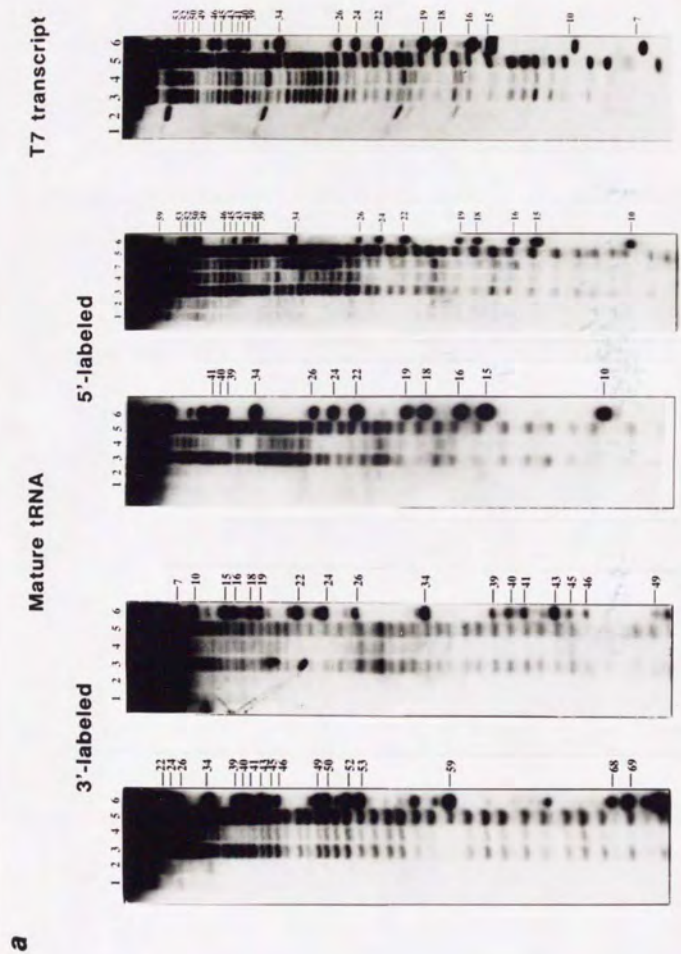


図1-5 大腸菌 tRNA^{Leu} の N-nitroso-N-ethylurea を用いたフットプリントング解析 転写後修飾の入った tRNA^{Leu} については、3' 端を標識したものと5' 端を標識したものについて、それぞれ20% (左) および15% (右) の Urea PAGE で解析を行った。in vitro 転写物については5' 端を標識したものの結果のみを示した。1, I e R S を入れないコントロール; 2, I e R S を入れたコントロール; 3, native な状態のアルキル化; 4, I e R S との複合体の状態でのアルキル化; 5, denature の状態でのアルキル化; 6, RNaseT1 による限定分解産物

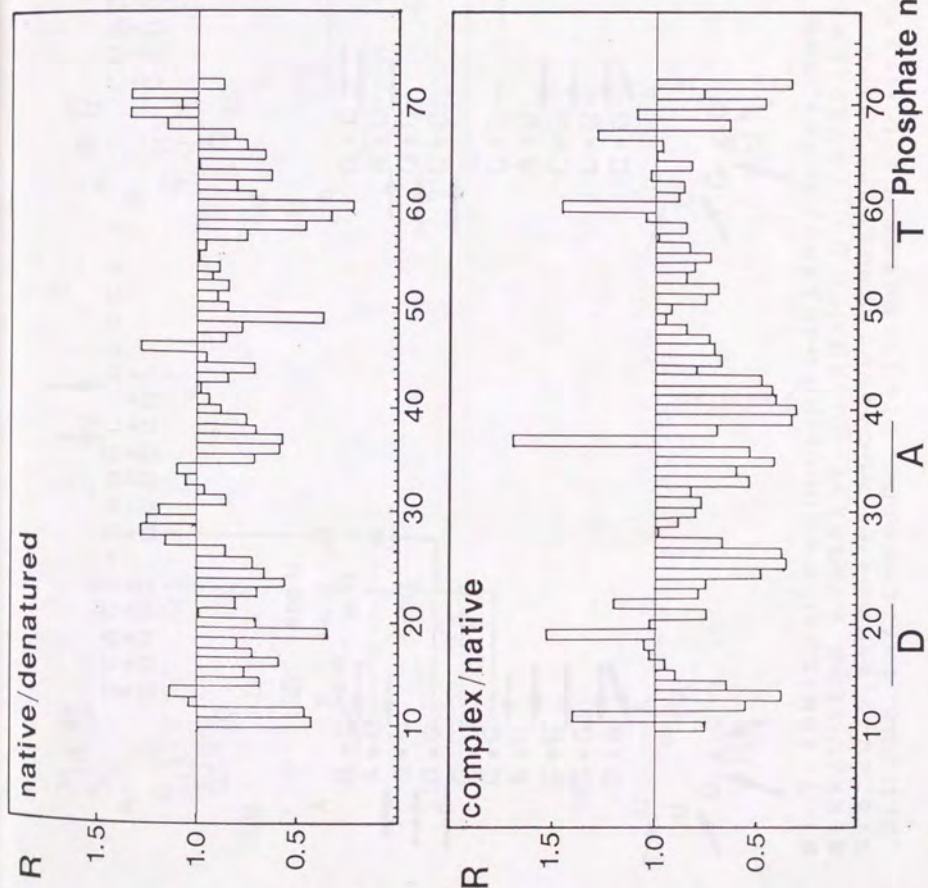


図1-6 大腸菌tRNA^{11*}のN-nitroso-N-ethylureaを用いたフットプリンティングの定量的解析 図1-5に示されたゲルの各バンドの強度をdensitometerで測定し, native conditionでの強度をdenatured conditionの強度で割った比(上)およびcomplexed conditionでの強度をnative conditionの強度で割った比(下)で表した. D:Dループ, A:Aンチコドナルループ, T:TVCループ, を表す.

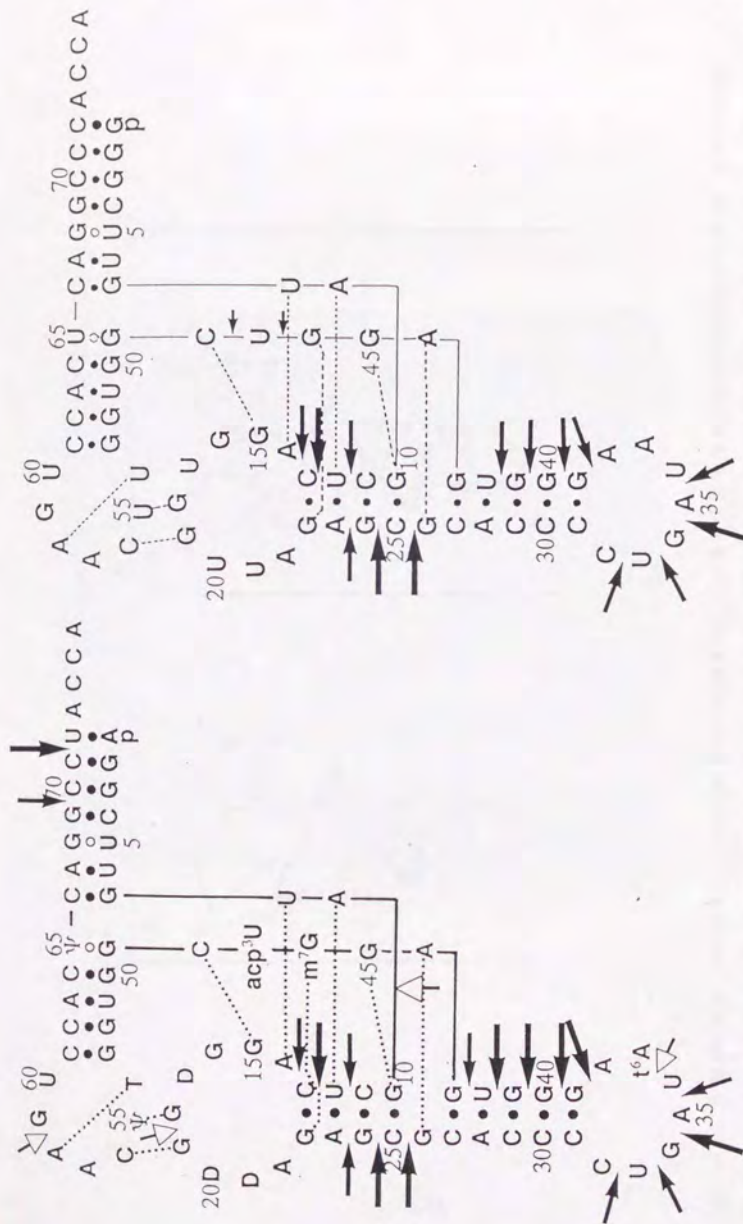


図1-7 大腸菌 tRNA^{Ile} の N-nitroso-N-ethyl urea によるフットプリンティング解析 左が転写後修飾が入った mature な大腸菌 tRNA^{Ile} の結果、右が修飾の入っていない tRNA^{Ile} の *in vitro* 転写物での結果である。矢印は、IleRS と複合体を形成することにより、N-nitroso-N-ethyl urea によるアルキル化が抑えられたリン酸基であり、矢印の大きさはプロテクションの程度 (図1-6) に対応している。白ぬきの矢印は、IleRS と結合することによりむしろアルキル化を受けやすくなった部位を示す。

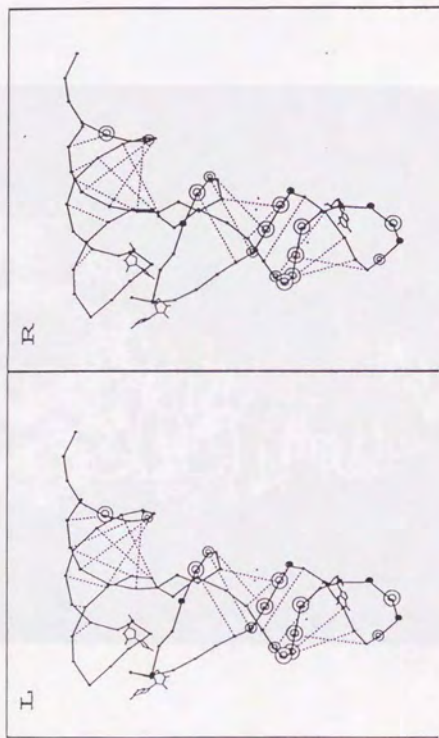


図1-8 大腸菌tRNA^{Ile}がIleRSと複合体を形成することによりアルキル化から保護されたリリン酸基(ステレオ図) プロ
 テクシオンを受けたリリン酸基を◎で、逆にアルキル化が促進された部位はヌクレオンド残基を描いて示してある。

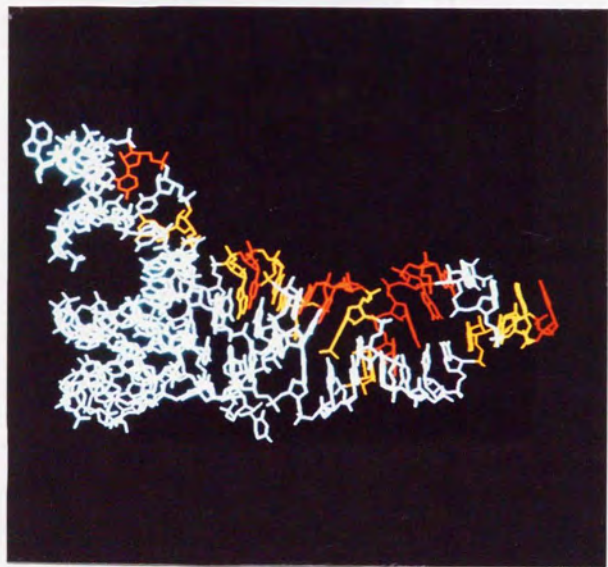


図1-9 tRNA^{Ile}のIleRSとの接触部位。フトプリンテリング解析においてIleRSによるプロテクシオンが見られた部位を、程度の強い順に赤、橙、黄色で示してある。tRNAをアクセプターシステムの方から見たところ。

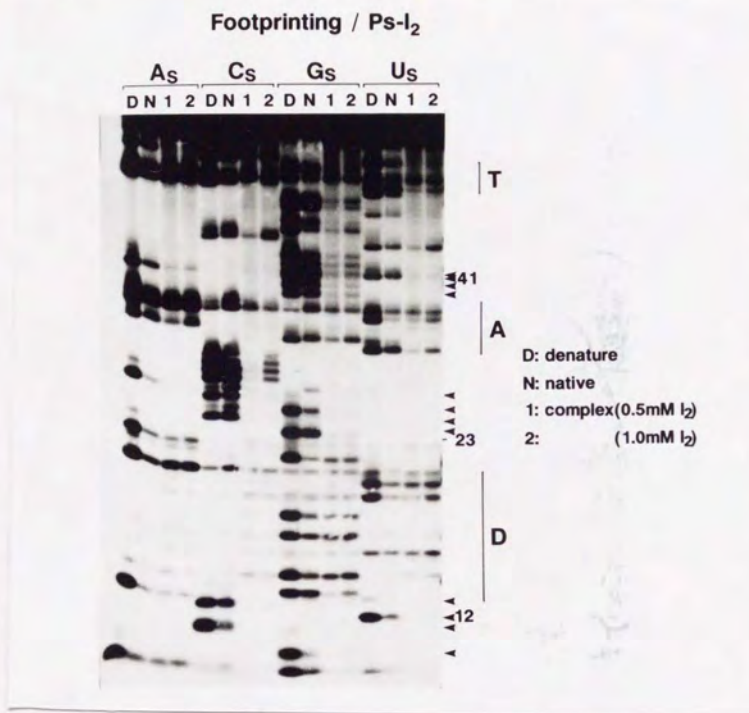


図1-10 大腸菌 tRNA^{Phe}の *in vitro* 転写物の Eckstein 法によるフットプリンティング
 A, C, G, Uのうち1種類のヌクレオシドの phosphodiester bond が phosphorothioate diester に
 一部置換された転写物にヨウ化エチルを作用させたもの。写真右の三角は, I leRS によりプロテ
 クションを受けた部位。D, D-arm; A, anticodon loop; T, T ψ C-loop



tRNA₁^{Ile}

tRNA₀^{Ile}

B. subtilis tRNA₂^{Ile}

K_m (μM) 5.4

8.5

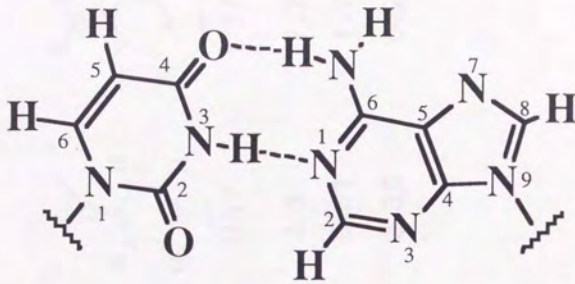
26

k_{cat} (s^{-1}) 1.6

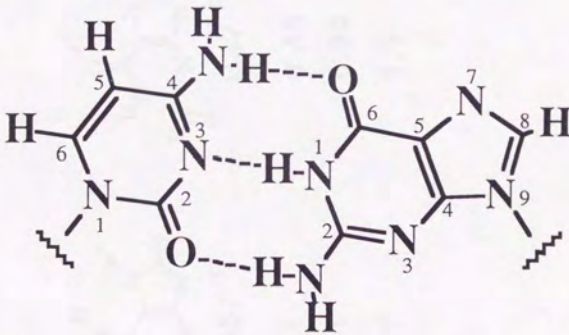
0.051

0.098

図1-11 大腸菌tRNA₁^{Ile}および枯草菌tRNA₁^{Ile}の反応速度定数 tRNA₁^{Ile}は37位がt⁶Aの未同定の置換体t⁶A*に変わったtRNA₁^{Ile}であり，枯草菌tRNA₁^{Ile}は37位がt⁶Aではなくm⁶Aになっている．枯草菌tRNA₁^{Ile}では，それ以外のアイデンティティ決定因子(1.3.5)は保存されている(白ぬきの四角)．



U-A



C-G

図1-12 ワトソン・クリック塩基対
1.3.4での議論に備え、4種類の塩基の番号の付け方を示す。

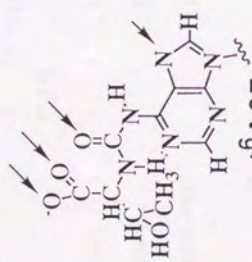
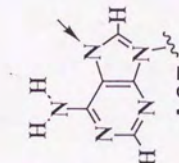
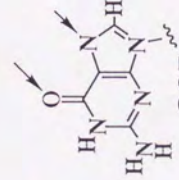
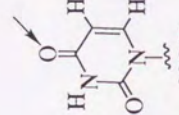
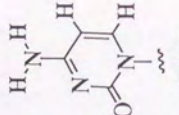
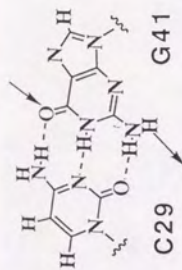
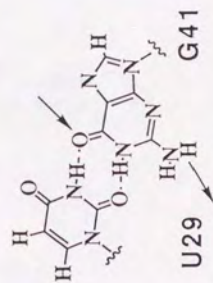
	t⁶A37			
	A37	1	1	1
	G37	0.45	0.84	1.9
	U37	2.3	0.81	0.35
	C37	7.7	1.7	0.23
K_m(relative)		0.66		
k_{cat}(relative)		400		
k_{cat}/K_m(relative)		620		

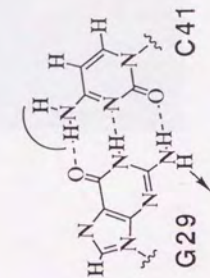
図1-13 大腸菌tRNA¹¹⁰のt⁶A37のIleRSによる認識機構のモデル 予想される酵素・tRNA間の水素結合を、proton donor→acceptorの方向の矢印で示す。



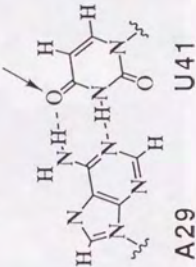
K_m (relative) 1
 K_{cat} (relative) 1
 K_{cat}/K_m (relative) 1



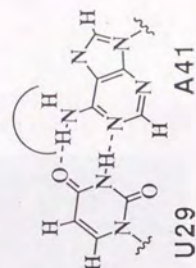
K_m (relative) 2.0
 K_{cat} (relative) 0.2
 K_{cat}/K_m (relative) 0.10



1.8
 0.075
 0.041



5.9
 0.38
 0.067

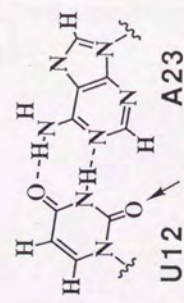


n.d.
 n.d.
 <0.001

図1-14 大腸菌tRNA^{Phe}のC29-G41のI1eRSによる認識機構のモデル。予想される酵素・tRNA間の水素結合を，proton donor→acceptorの方向の矢印で示す。アミノ基のまわりに描いた弧は，立体障害により酵素側のproton donorが近づけないことを意味している。



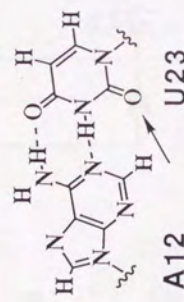
図1-15 大腸菌tRNA^{fMet}のアイデンティティ決定因子(充填モデル) アイデンティティ決定因子を黄色で示してある。さらに、各アイデンティティ決定因子で特に重要と思われる官能基の酸素原子を赤で窒素原子を青で示してある。



∞

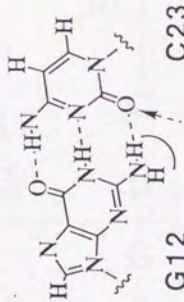
U12

A23



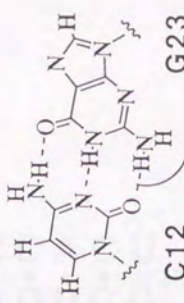
A12

U23



G12

C23



C12

G23

$K_m(\text{relative})$	1	3.2	2.9	3.5
$k_{\text{cat}}(\text{relative})$	1	1.5	0.6	0.2
$k_{\text{cat}}/K_m(\text{relative})$	1	0.45	0.21	0.058

図1-16 大腸菌 tRNA^{Phe}の U12-A23 の I I e R S による認識機構のモデル 予想される酵素-tRNA間の水素結合を, proton donor→acceptorの方向の矢印で示す. アミノ基のまわりに描いた弧は, 立体障害により酵素側の proton donorが近づけないことを意味している.

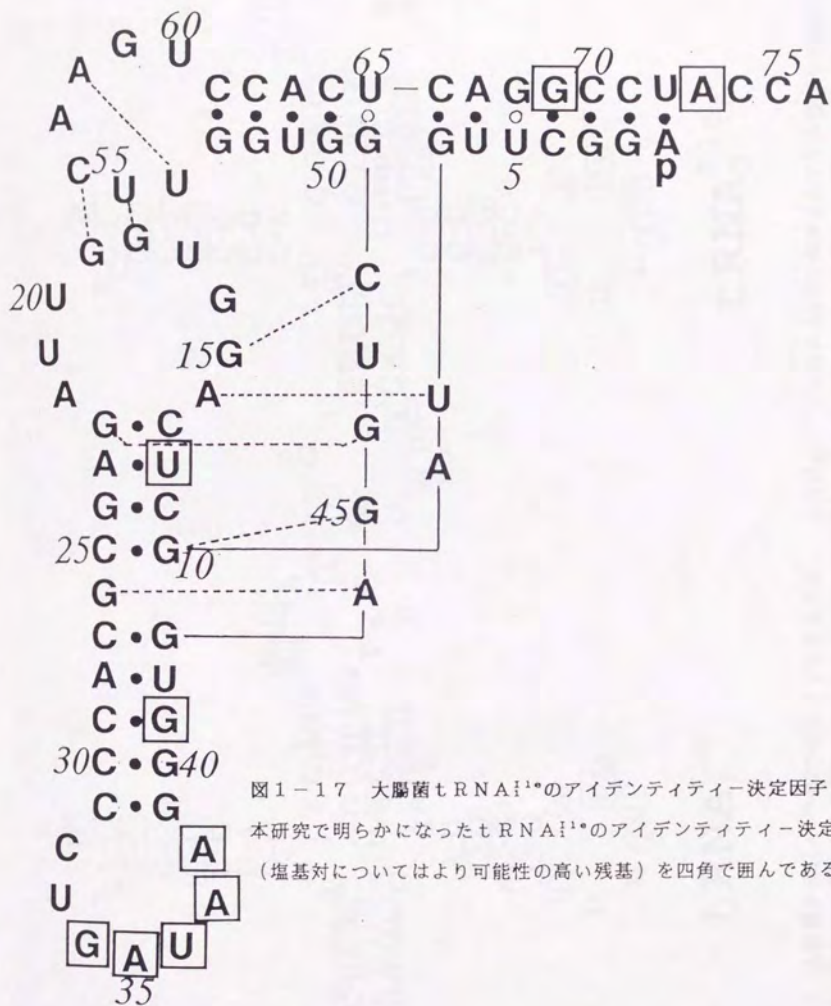


図1-17 大腸菌tRNA¹のアイデンティティー決定因子

本研究で明らかになったtRNA¹のアイデンティティー決定因子
 (塩基対についてはより可能性の高い残基)を四角で囲んである。

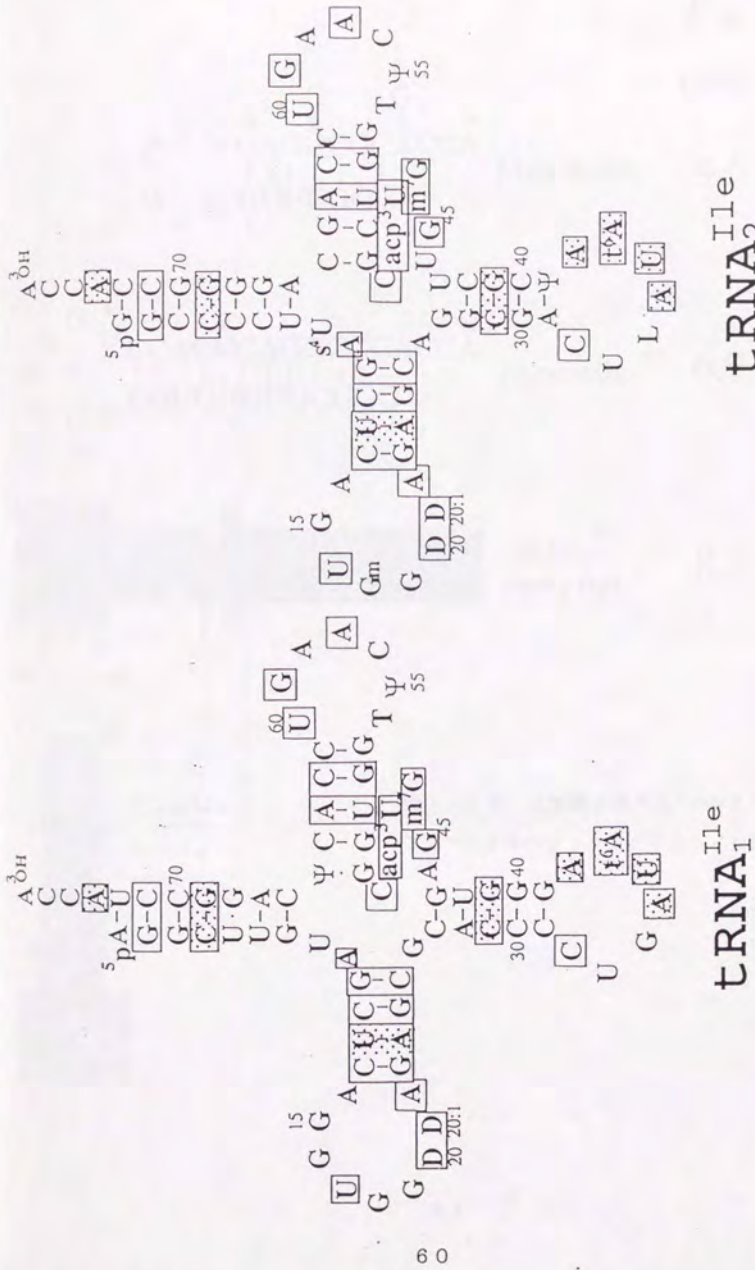


図1-18 大腸菌 tRNA^{Ile} の2つのアイソアクセプター tRNA^{Ile} と tRNA^{Ile} で保存されている残基を四角で囲んである
 (すべての大腸菌の tRNA に共通のヌクレオシドは除いてある) . アイデンティティ決定因子 (綱掛け) は2つの tRNA^{Ile} で保
 存されている.

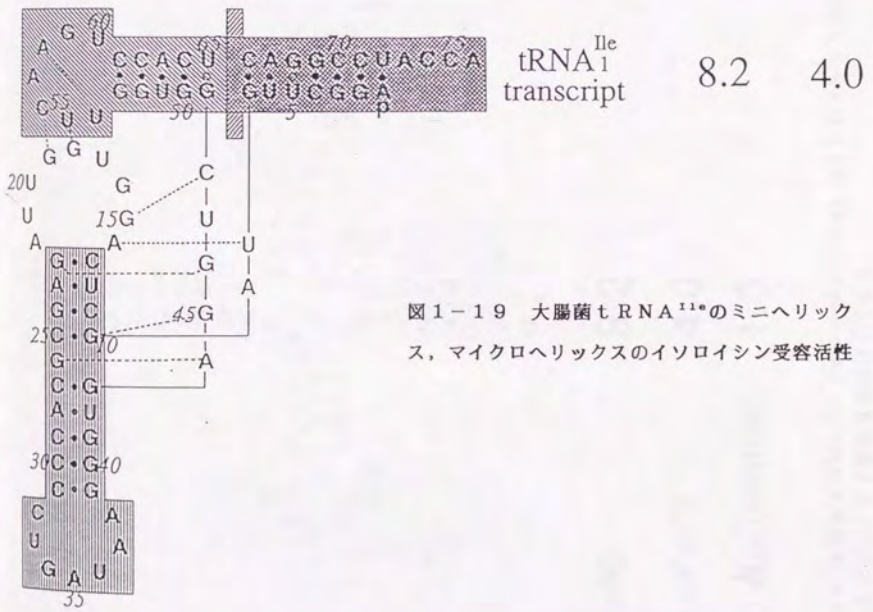
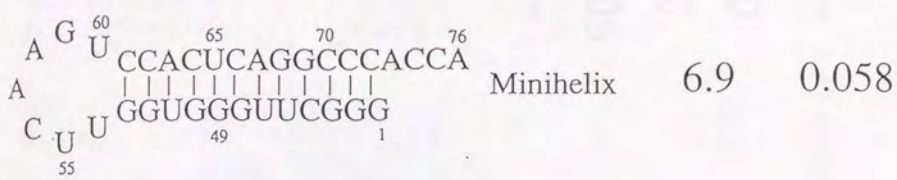
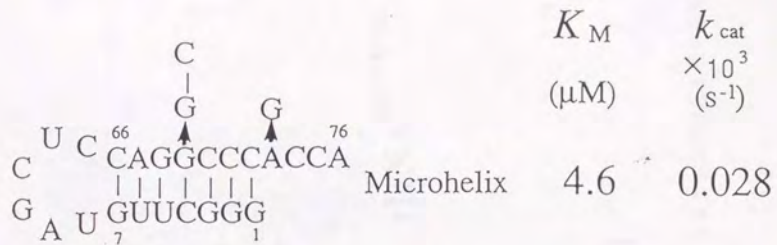
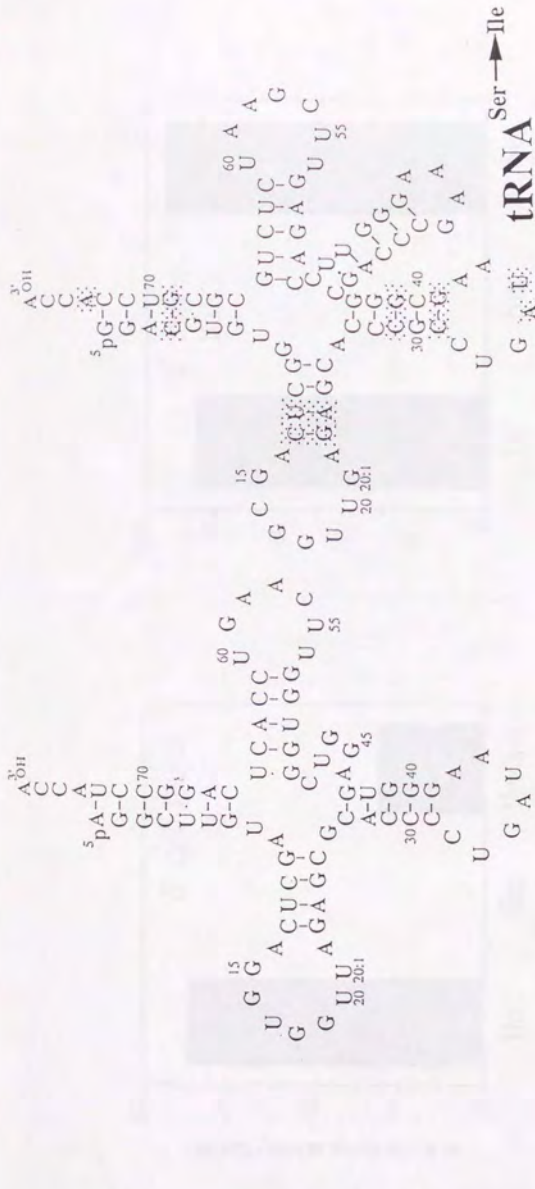


図1-19 大腸菌 tRNA^{Ile} のミニヘリックス、マイクロヘリックスのイソロイシン受容活性



K_m (μM)	8.2	50
$k_{\text{cat}} \times 10^3$ (s^{-1})	4.0	2.5
k_{cat} / K_m (relative)	1.0	0.11

図1-20A 大腸菌 tRNA^{ser} (アンチコドン UGA) のイソロイシシンへのアイデントイタイーの変換 tRNA^{ile}から tRNA^{ser}へ移植したヌクレオチド残基を網掛けしてある。

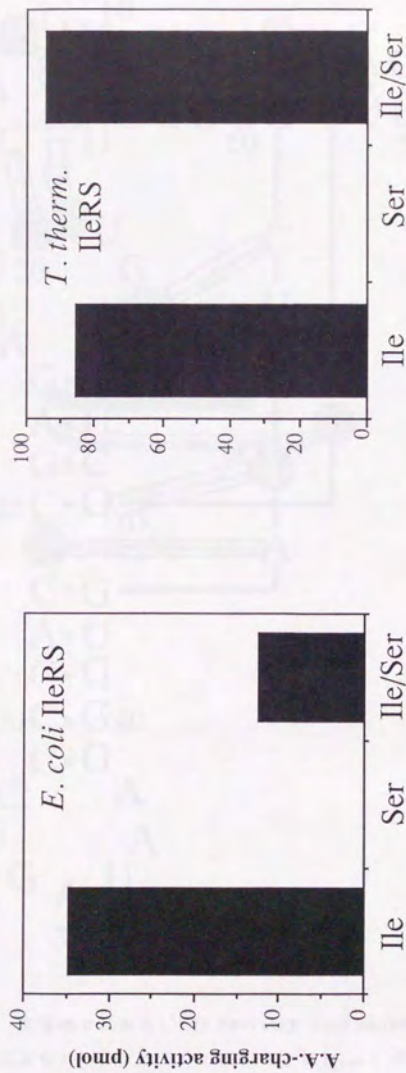


図1-20B tRNA^{Ile}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Ser:Ile} (Ile/Serで表示) の, 大腸菌IleRS, 高度好熱菌IleRSによるイソロイシン受容活性

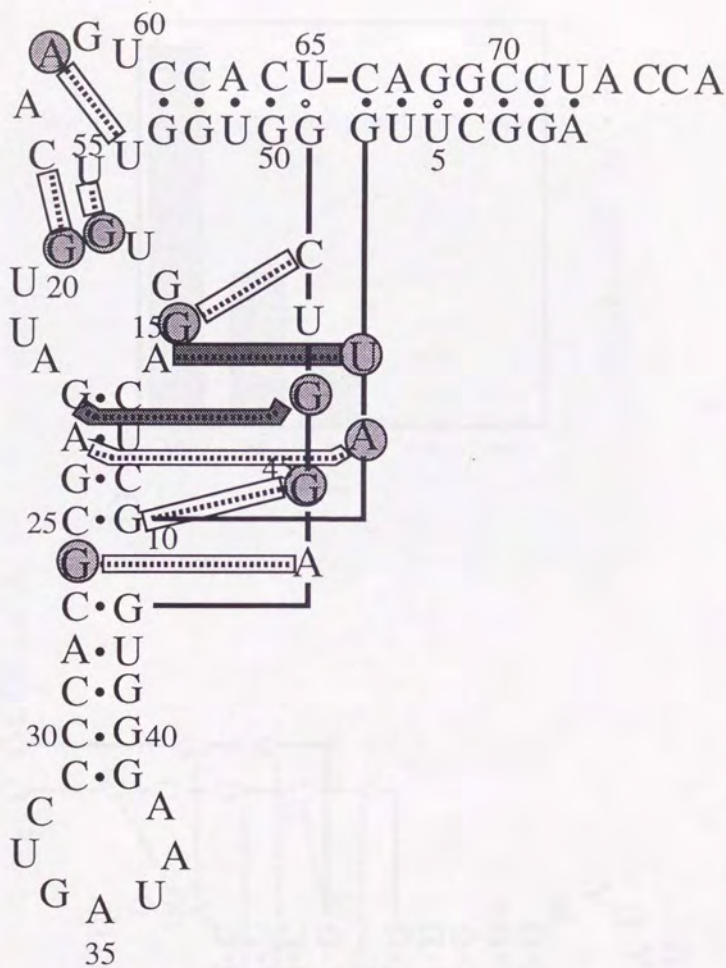


図1-21 大腸菌 tRNA^{Phe} の tertiary base pair の変異体の反応速度論的解析
 変異の導入によりアミノアシル化の活性 (主に k_{cat}) が落ちた tertiary base pair
 を黒く塗ってある. 変異を導入したヌクレオシド残基を黒ぬりの円で囲った.

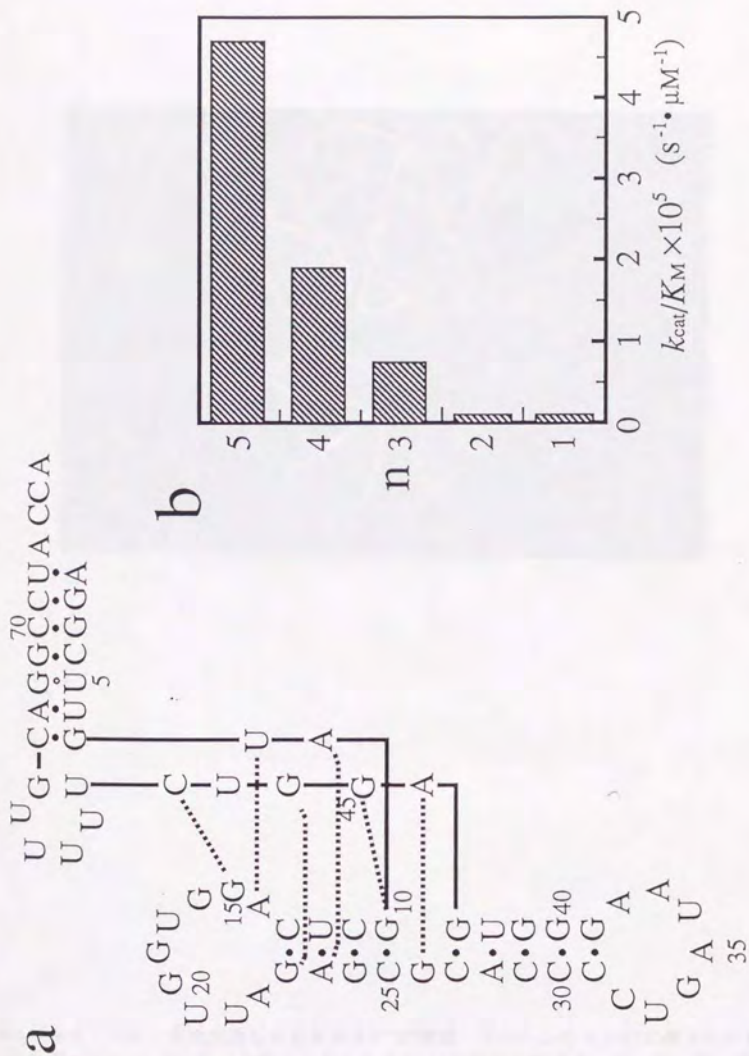
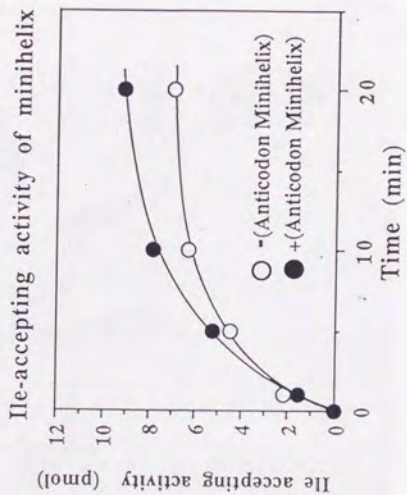
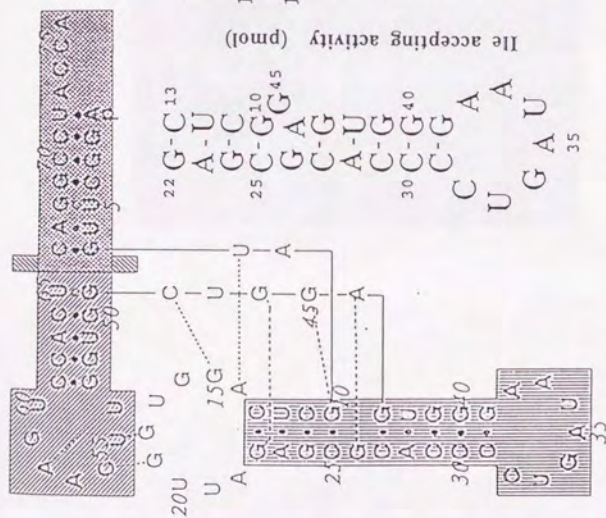


図1-22 Tアームを欠失した大腸菌 tRNA^{Ala}変異体(a)とTアームをさらに短くした変異体のイソロイシン受容活性(b) (b) tRNA^{Ala}のTアームを欠失させ、代わりに (U)₆ (n=5-1) なるヌクレオチド鎖で置換した。



図1-23 Tアームを欠失したtRNA^{i2*}の構造 Tアームの代わりに挿入した配列(U)_nGのnを5, 4, 3, 2, 1と短くしたtRNA^{i2*}変異体の構造を, 赤, 黄, 緑, 青, 紫で示す. 各tRNAの構造は, エネルギー最小化を行なって決定した.



Anticodon
Mini-helix

図1-24 アンチコドンミニヘリックスがミニヘリックスのイソロイシン受容活性に及ぼす効果

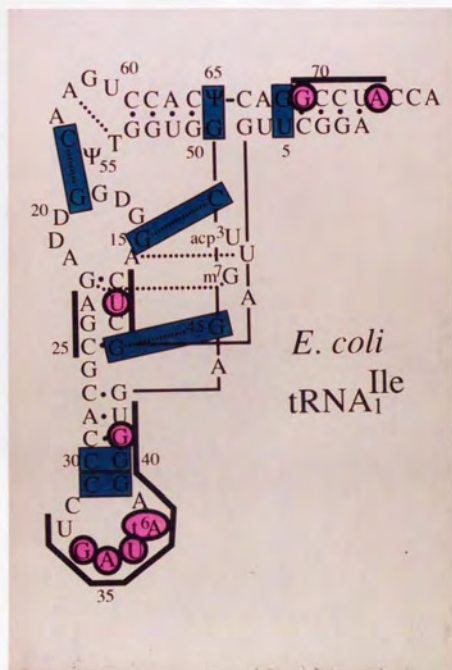


図1-25 大腸菌IleRSによるtRNA^{Ile}の認識機構 ¹H-NMR解析により、開裂あるいは breathing を起こすことが示唆された塩基対を青で示した。また、フットプリンティング解析の結果、IleRSと接触していることが明らかになった領域を傍線で示した。さらに変異体の反応速度論的解析の結果、アイデンティティ決定因子と結論された部位を赤で示してある。

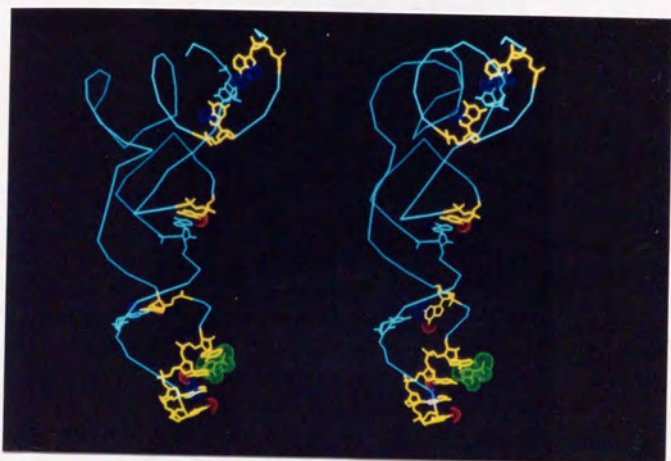


図1-26 IleRSと結合した際のtRNA^{Ile}の構造変化のモデル
 フリーのtRNA^{Ile}の構造を左に、IleRSと複合体を形成した時のtRNA^{Ile}の構造を右に示す。アイデンティティー決定因子を黄色で示し、それらの残基で特に重要と思われる官能基の酸素原子を赤で窒素原子を青で示してある。また、複合体形成に伴い構造変化が示唆されたt^oA37を緑で示す。

12 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

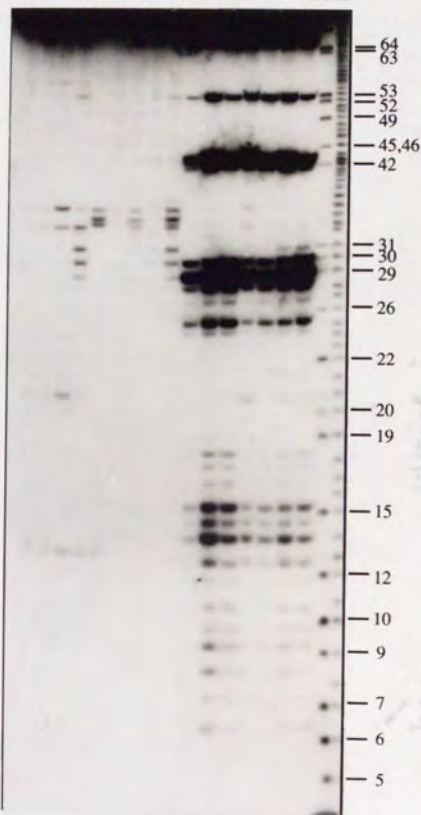


図1-27 大腸菌 tRNA^{Met} のヌクレアーゼS1, ヌクレアーゼV1を用いたフットプリンティング解析 1, 高度好熱菌 MetRS (二量体) を入れたコントロール; 2, 単量体型の高度好熱菌 MetRS 変異体を入れたコントロール; 3, 大腸菌の IleRS を入れたコントロール; 4, 酵素を入れずにヌクレアーゼS1で切断; 5, MetRS (二量体) を入れてヌクレアーゼS1で切断; 6, 単量体型の MetRS を入れてヌクレアーゼS1で切断; 7, IleRS を入れてヌクレアーゼS1で切断; 8, 酵素を入れずにヌクレアーゼV1で切断; 9, MetRS (二量体) を入れてヌクレアーゼV1で切断; 10, 単量体型の MetRS を入れてヌクレアーゼV1で切断; 11, IleRS を入れてヌクレアーゼV1で切断; 12, RNaseT1で tRNA^{Met} を限定分解したもの; 13, denatureの状態でのアルキル化

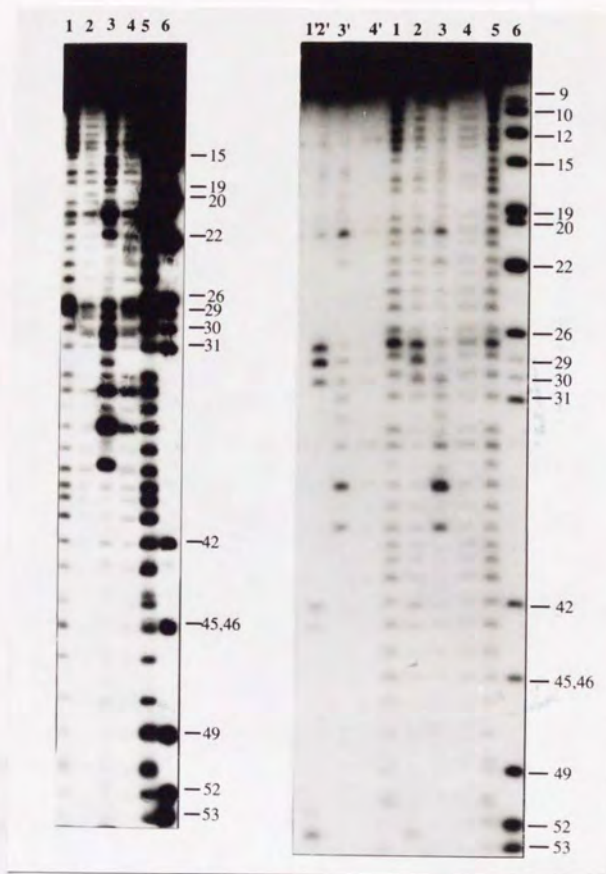


図1-28 大腸菌tRNA^{Phe}のN-nitroso-N-ethyl ureaを用いたフットプリンティング解析
 1, nativeな状態でのアルキル化； 2, 高度好熱菌MetRS (二量体)を加えた状態でのアルキル化；
 3, 単量体型のMetRS変異体を加えた状態でのアルキル化； 4, 大腸菌のIleRSを加えた状態でのアルキル化； 5, denatureの状態でのアルキル化； 6, RNaseT1でtRNA^{Phe}を限定分解したもの。
 右図の1', 2', 3', 4'は, 1, 2, 3, 4のコントロール

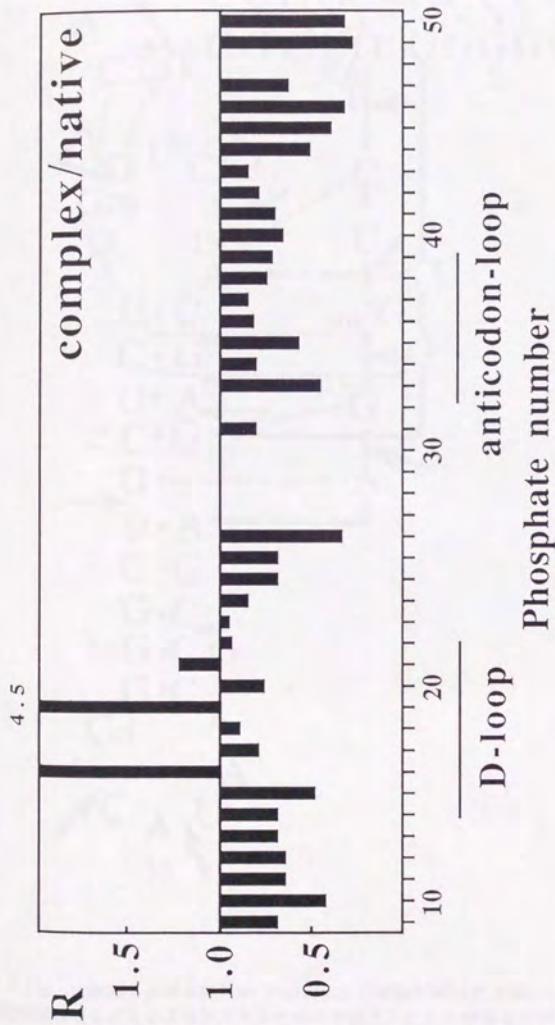


図1-29 大腸菌 tRNA^{Arg} の N-nitroso-N-ethylurea を用いた フットプリンティング の定量的解析 図1-28 に示されたゲルのバンドの強度を densitometer で測定し, complexed condition での強度を native condition の強度で割った比で表した. 19 番のリン酸基は複合体を形成すると native な状態に比べ 4.5 倍もアルキル化されやすくなったので, この数値をグラフの上に表示した.

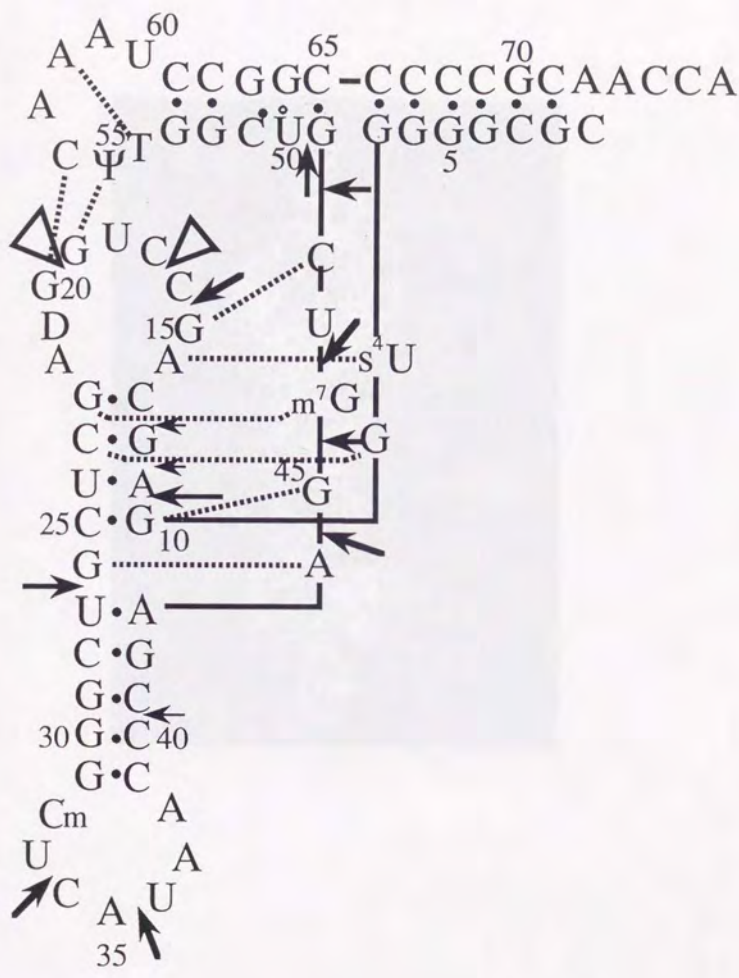


図1-30 大腸菌tRNA^{Met}のN-nitroso-N-ethyl ureaによるフットプリンティング解析の結果
 高度好熱菌MetRSによりアルキル化から保護されたリン酸基を矢印で示した。矢印の大きさはプロ
 テクションの程度に対応している。白ぬきの三角は、複合体形成に伴ってむしろアルキル化を受けやす
 くなったリン酸基を表す。



図1-31 大腸菌tRNA^{Met}のMetRSとの接触部位 MetRSによりプロテクションを受けた部位(図1-30)をその程度の大・中・小に応じて、赤・橙・黄色で表してある。また、複合体形成に伴って、むしろアルキル化を受けやすくなった部位を緑色で示してある。tRNAをアクセプターステムの方から見たところ。

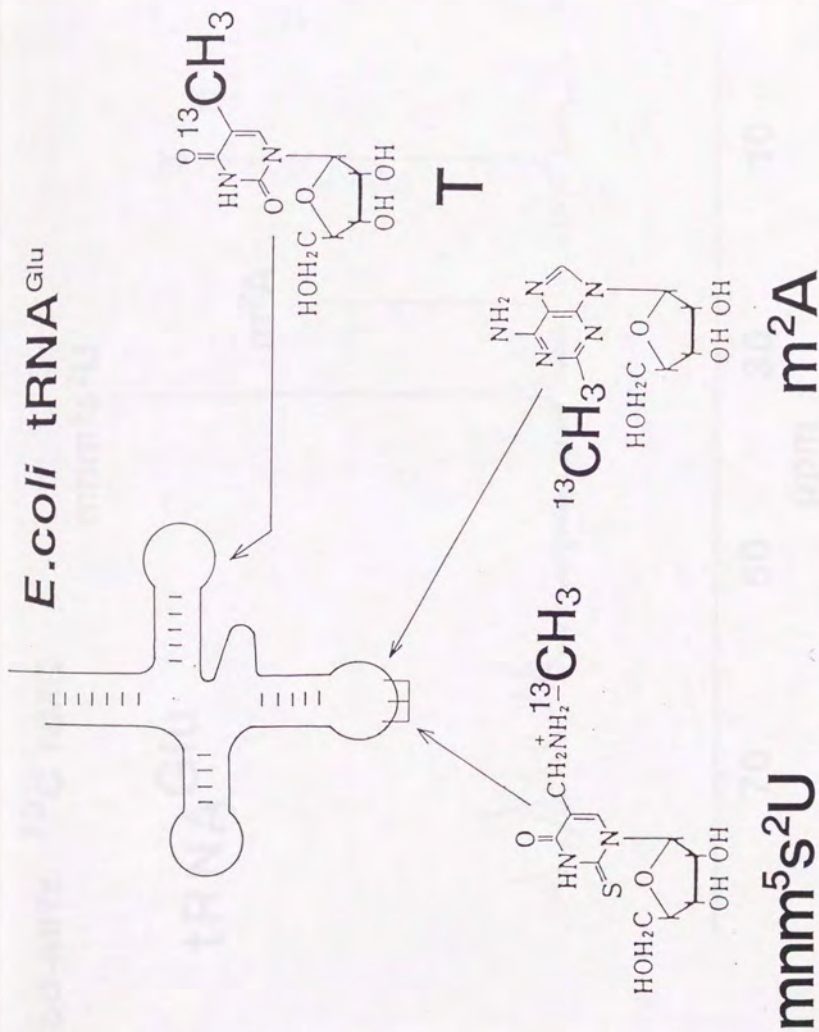


図1-32 大腸菌 tRNA^{Glu}の¹³C標識された修飾塩基 各修飾塩基の¹³Cで標識されたメチル基を太字で示してある。

150-MHz ^{13}C NMR

tRNA Glu

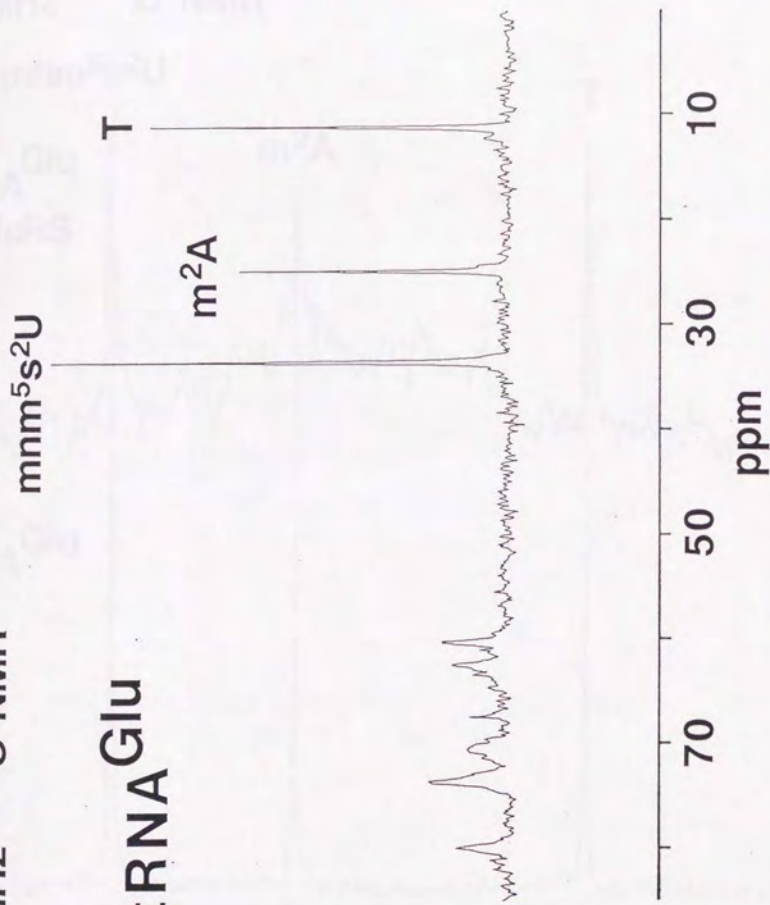


図1-33 修飾塩基のメチル基が ^{13}C で標識された大腸菌tRNA^{Glu}の ^{13}C -NMRスペクトル

150-MHz ^{13}C NMR

$\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$

tRNA^{Glu}
+ GluRS

m^2A

T

tRNA^{Glu}

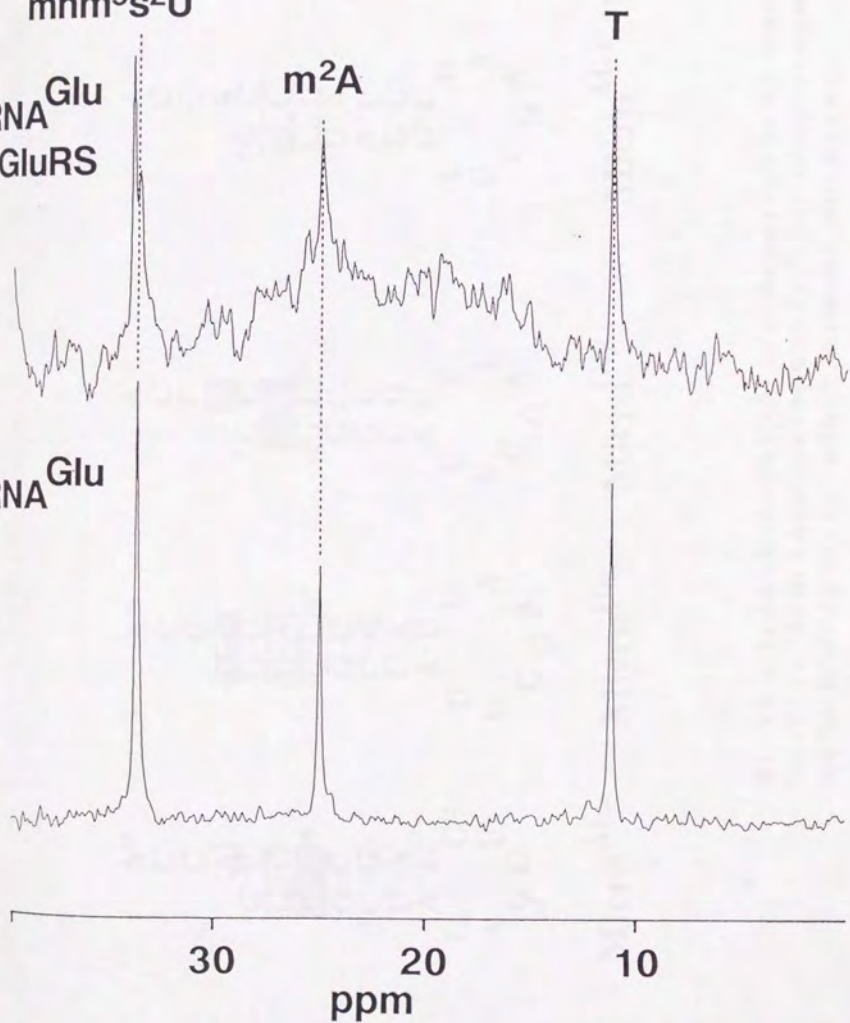


図1-34 フリーな状態 (下) およびGluRSと複合体を形成した状態 (上) のtRNA^{Glu}の ^{13}C -NMRスペクトル。メチル基のCのシグナルが観測される高磁場領域のみを表してある。

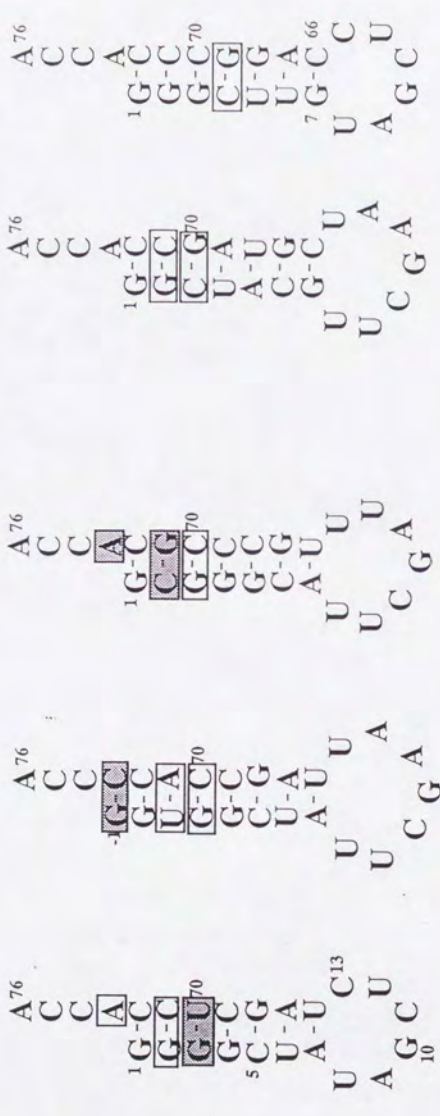


図1-35 いろいろなtRNAのアクセプターステムに存在するアイデンティティ決定因子
 マイクロヘリックスを用いた解析により明らかになったアイデンティティ決定因子の例を挙げる。
 四角で囲んだのがアイデンティティ決定因子で、特に強い因子に網掛けをしてある。

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

The history of the United States is a story of growth and change. From the first European settlers to the present day, the nation has evolved through various stages of development. The early years were marked by exploration and the establishment of colonies. The American Revolution led to the birth of a new nation, and the subsequent years saw the expansion of territory and the growth of industry. The Civil War was a pivotal moment in the nation's history, leading to the abolition of slavery and the strengthening of the federal government. The late 19th and early 20th centuries were characterized by rapid industrialization and the rise of a new middle class. The World Wars of the 20th century tested the nation's resolve and led to its emergence as a global superpower. Today, the United States continues to face new challenges and opportunities, and its history remains a source of inspiration and guidance for the future.

第2章

高度好熱菌のアミノアシルtRNA合成酵素遺伝子のクローニングと変異体解析

2.1. 序

第1章ではtRNA^{Phe}, tRNA^{Met}, tRNA^{Glu}の各ARSによる認識部位の解析を行った。第2章ではIleRS, MetRS, GluRSのtRNA認識部位について論じる。ただしtRNAなら高々77残基であるから、片端から変異体を作成して反応速度論的解析を行うこともできるが(1.3.4), ARSは最小のものでも461残基(CysRS [Hou et al., 1991; Avalos et al., 1991]) からなり、むやみにin vitroで変異体を作成するわけにはいかない。geneticsを用いたin vivoでの変異解析は1つの解決策であると考えられる。本研究では以下の2つのアプローチをとることにした。1つは、地道にARSとtRNAの複合体のX線結晶構造解析を行い、ARSによるtRNAの認識機構を直接見る方法である。序章でも述べたように、高度好熱菌のタンパク質は非常に熱安定であり(85°Cでも活性を有する)、結晶化にも適していると考えられる。そこで第1のアプローチを進めるために、本研究ではまず、高度好熱菌のMetRS, GluRSの遺伝子を高度好熱菌の染色体DNAからクローニングし、これらの酵素の一次構造を決定した[Nureki et al., 1991; Nureki et al., 1992]。高度好熱菌IleRSの遺伝子は、小林・潘木によってクローニングが行なわれた。さらに、lac promoterやtac promoterを持つベクターを用いて、これらの遺伝子を大腸菌内で大量発現することに成功し、培養液1あたり3-5mgの高度好熱菌酵素を精製できる系を確立した。

第2のアプローチは、他の生物由来のARSとのアミノ酸配列の相同性、および他のARSとのアミノ酸配列の相同性を検討し、これに基づいて部位特異的変異導入を行い、変異体の反応速度論的解析を行うものである。序章で、20種のARSはATPの結合様式の違いによってclass I, class IIの2つのグループに分けられると述べたが、さらにclass Iの中でも、GluRS/GlnRS/ArgRS, IleRS/ValRS/LeuRS/MetRS/CysRS, TyrRS/TrpRSは、さらに詳細なアミノ酸配列相同性によって、それぞれ同じサブグループに属することが示唆されている(表2-1)。またclass IIのARSでは、ProRS/SerRS/ThrRS, AspRS/AsnRS/LysRSが同じサブグループに属していると考えられている(表2-1)。

したがって本研究では、class IのGluRS/GlnRS, IleRS/ValRS/LeuRS/MetRSのアミノ酸配列相同性をそれぞれ検討し、他の生物由来のARSでもよく保存されている部位や、他のARSでtRNAの認識に関与していることが示唆されているアミノ酸残基に対応する部位について、GluRS, MetRSの変異体を作成し反応速度論解析を行った。序でも述べたように、高度好熱菌のARSは、常温では極めて活性が低く変異体の細胞毒性が少ない、大腸菌由来のARSと分離して反応速度論的解析が行なえるなどの利点があるため、本研究で大量調製系が確立された高度好熱菌のGluRS, MetRSの変異体を作成し、これを解析した。

2.2. 材料と方法

2.2.1 菌体

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8(ATCC 27634)は、大島泰郎博士(現 東工大教授)よりいただいた。クローニングの際のプラークハイブリダイゼーションでは、宿主菌としてJM109(*recA1, endA1, gyrA96, thi⁻, hsdR17, supE44, relA1, λ⁻, Δ(lac-proAB)[F': proAB, lacI^q, lacZΔM15, traD36]*)を用いた。

2.2.2 試薬・酵素

遺伝子工学的手法に用いた制限酵素は東洋紡(大阪)および宝酒造(京都)より購入した。クローニングで用いたT4 polynucleotide kinase, bacterial alkaline phosphatase およびDNA ligation kit, nick-translation kitは宝酒造から、塩基配列決定に用いた7-deaza-Sequenase kitはU.S. Biochemical Corp.から購入した。DNAラベル用の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ や $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は、Amershamから購入した。部位特異的変異導入は、Muta-Gene *in vitro* mutagenesis kit (Bio-Rad)を用いて行った。ARSのアミノアシル化活性の測定に用いるL-[(U)- ^{14}C]Ile(315.5 mci/mmol), L-[(methyl)- ^{14}C]Met(57 mci/mmol), L-[(U)- ^{14}C]Glu(265.7 mci/mmol)は、Amershamから購入した。

2.2.3 高度好熱菌MetRS, GluRS遺伝子のクローニング

高度好熱菌のARSを精製し、そのN端およびプロテアーゼ限定分解産物(ドメイン)のN端のアミノ酸配列(10-20残基程度)をエドマン分解法により決定した(神田大輔博

士および横山三紀博士による)。これらのアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプローブを合成し、数種の制限酵素で切断した高度好熱菌の染色体DNA (Marmur法 [Marmur, 1961] により調製) に対してSouthern blotting解析を行い (MetRSでの1例を図2-1に示す)。ハイブリダイズするDNA断片をブランクハイブリダイゼーションによって単離した。このDNA断片が遺伝子の一部を含む場合は、この断片をプローブ(nick-translationにより標識)としてSouthern blotting解析を繰り返す。塩基配列決定はダイデオキシ法に基づく7-deaza-Sequenase kitを用いて行い、ストラテジーとしては kilo-sequence kit (宝酒造) を用いてdeletion seriesを作成するか、あるいは適当なDNA断片をM13ベクターにサブクローニングすることにより行った。高度好熱菌のDNAはGC含量が非常に高く、コドン使用頻度が大腸菌などとはかなり異なるため、本研究のように高度好熱菌のコドン使用頻度に適合したオリゴヌクレオチドプローブを用いてクローニングを行うのが、最も速く確実であると考えられる。

2.2.4 高度好熱菌MetRS, GluRS遺伝子の大腸菌での大量発現系の構築

高度好熱菌MetRS遺伝子 (metS)、GluRS遺伝子 (gltX) をそれぞれ図2-2, 2-3に示すベクターに組み込んで大腸菌での発現系を構築した。これらの発現系のうち、MetRSに関しては、lac promoterを用いたpUC118/TMTS-2.2(図2-2)が、GluRS遺伝子に関しては、tac promoterを用いたpEXP7/gltX1.8(図2-3)が最も効率よく目的タンパク質を発現していたので、以後の解析にはこれらの系を用いた。大腸菌で大量合成された各酵素は、1.2.7の方法にしたがい、図2-4 (MetRS)、図2-5 (GluRS) の純度まで精製を行った。

2.2.5 高度好熱菌IleRS遺伝子のクローニング

高度好熱菌のIleRS遺伝子のクローニングは、小林・瀧木により2.2.3で述べたMetRS, GluRSと同様の方法で行われた。高度好熱菌IleRS遺伝子 (ileS) は、pUC118のlac promoterの下流に組み込むことによって、大腸菌での大量発現に成功したので、1.2.7に準じた方法によって精製を行った。

2.2.6 高度好熱菌MetRS, GluRSの変異体の作成

MetRSについては、metS遺伝子 (1851bp) (図2-6) を制限酵素KpnIで切断し、得

られた1543bpのDNA断片(142-1685)をM13mp18にサブクローニングし、これを鋳型としてKunkel法により部位特異的に変異の導入を行い、変異体を作成した。GluRSについてはgltX遺伝子(1407bp)(図2-11)を制限酵素Nsp(7524)IとEcoRIあるいはNsp(7524)IとHindIIIで切断し、得られたgltX遺伝子前半の701bpDNA断片(-6-695)、あるいは後半の約990bpのDNA断片をそれぞれM13mp18にサブクローニングして、これらを鋳型として部位特異的変異導入を行った。変異の確認のための塩基配列決定は、適当なDNAプライマーを合成して行った。

2.2.7 高度好熱菌MetRS, GluRS変異体の反応速度定数の測定

アミノアシル化反応溶液の組成は、100 mM Tris-HCl(pH 8.0, 65°C), 5 mM Mg(CH₃COO)₂および10 mM KClとした。GluRSについては、Trisがアミノアシル化反応を阻害するため、緩衝剤は100 mM Hepes(pH 8.0)を用いた。基質濃度は¹⁴C標識アミノ酸 300 μM, tRNA 10 μM, ATP 2 mMとし、それぞれ10-200 μM, 1-50 μM, 50 μM-2 mMの範囲で濃度を振って各基質に対する反応速度定数の測定を行った。酵素濃度は、変異体の活性に応じて、0.1-10 μMの範囲で変えた。測定は2回行い、Lineweaver-Burk plotを用いて反応速度定数を決定した。

2.3. 結果と考察

2.3.1 高度好熱菌metS遺伝子の塩基配列

高度好熱菌metS遺伝子の塩基配列を図2-6に示す。metS遺伝子の読み枠は1848塩基対からなり、616アミノ酸残基からなるMetRSをコードしていた。MetRSの分子量は70,637と計算され、SDS-PAGEの値(M_r 74,000) [Kohda et al., 1984] とほぼ一致した。図2-6で下線を引いたアミノ酸配列は、MetRSをトリプシンで限定分解することによって得られた3つのフラグメント(ドメインT1, T2, T3) [Kohda et al., 1987] のN末端のアミノ酸配列である。遺伝子のクローニングに用いたオリゴヌクレオチドプローブはこの配列に基づいて設計した。遺伝子のコドン3字目のG, C含量は94%と非常に高く、これまでにクローニングされた高度好熱菌の遺伝子に共通した特徴 [Kagawa et al., 1984; Nishiyama et al., 1986; Kunai et al., 1986; Kushiro et al., 1987; Ono et al., 1990] を示した。この異常なコドン使用頻度のため、高度好熱菌metS遺伝子の大腸菌内での発現はかなり抑えられると考えられる。また、図2-6で、metS遺伝子上流の矢印で示した塩基配列は、inverted-repeatの二次構造を作り得る配列で、metS遺伝子の発現を調節するattenuatorとして機能している部位であろうと考えられる [Nureki et al., 1991]。

2.3.2 高度好熱菌MetRSと他の生物由来のMetRSのアミノ酸配列相同性

高度好熱菌metS遺伝子から推定されるMetRSのアミノ酸配列を、すでに一次構造が決定されている大腸菌、酵母細胞質、酵母ミトコンドリアのMetRSの配列と比較したのが図2-7である。大腸菌、酵母細胞質、酵母ミトコンドリアのMetRSとの相同性はそれぞれ27, 24, 33%であり、ホモロジーは比較的低かった。したがって、これら4種のMetRSで保存された数少ないアミノ酸残基は、MetRSの機能に必須な役割を果たしている可能性がある。以下、その数例について論じる。

分子の二量化に寄与する領域

まず、高度好熱菌と大腸菌のMetRSのC端のドメインでは、比較的高いホモロジー(57%)が見いだされた(図2-7)。このC端のドメインは分子の二量化に関わっているドメインであると考えられており [Cassio & Waller, 1971]、単量体として存在する酵母細胞質および酵母ミトコンドリアのMetRSには存在しない(図2-7)。高度好熱菌のMetRSでは、このC端ドメイン(T3)は単離された状態で二量体を形成するが、この

ドメインがさらにトリプシンによる限定分解を受けて生じたドメインN端部分のフラグメント (Mr 7,500, アミノ酸残基にしておよそ68残基分に相当) は, 単量体として単離されてくる [Kohda et al., 1987]. したがって, このドメインT3はおそらくLys-571かLys-572で二段階目の限定分解を受けてN端側の単量体のフラグメントを生成したと考えられる. すなわちMetRS分子の二量化には, これらのLys残基よりC端側のVal⁵⁷³-Trp⁵¹⁶が関与していると考えられる (図2-7) [Nureki et al., 1991]. このC末の領域にはLeu残基が多く存在し, 二次構造予測によると α ヘリックスに富む構造をとることが推定されている. そこで, この領域内のLeu-568, Leu-575, Leu-578, Leu-583をすべてAlaに置換した変異体をPCRを用いて作成し, SDS-PAGEによって大腸菌での発現を調べたところ, 段階的に分子量が小さくなるバンドが検出された. このことから, このMetRS変異体は二量体が形成できなくなりC端の構造が不安定になったため, degradationを受けているのではないと思われる. したがって, この結果は, この α ヘリカルなLeu残基に富む領域がMetRSの二量化に寄与していることを暗示している.

tRNA^{Met}認識部位 (図2-7, ●)

class IのARSに特徴的なKMSK配列は, 高度好熱菌MetRSの297-300番目の残基に見いだされ (図2-7, ●), ATPおよびtRNAの3'末端を結合しアミノアシル化の遷移状態を安定化するのに寄与していると考えられる [Mechulam et al., 1991]. また, 大腸菌MetRSでは, tRNAとのクロスリンクおよび変異体の速度論的解析により, Trp-461がtRNA^{Met}のアンチコドン1字目のC34の認識に関わっていることが明らかになっている [Gohsh et al., 1990]. さらに変異体の解析によって, Arg-395もtRNA^{Met}のアンチコドン部位の認識および酵素触媒活性に寄与していることがわかった [Gohsh et al., 1991]. このTrp-461とArg-395はMetRSの結晶構造上で分子の逆の側面に位置しており, 20Åも離れているが, Trp-461を含むループがそのコンフォメーションを変えることによって, 同時にtRNA^{Met}と結合すると考えられている [Gohsh et al., 1991]. 高度好熱菌MetRSでも, これらのTrp, Arg残基に相当するTrp-424, Arg-359が存在しており (図2-7, ●), tRNA^{Met}のアンチコドンの認識に寄与していると思われる.

ATP結合部位 (図2-7, ■)

class IのARSに特徴的なHIGH配列 [Webster et al., 1987] は, 19-22番目の残基に

見いだされ (図2-7, ■), ATPを結合するポケットの一部として働いていると考えられる。それ以外にも, 大腸菌MetRS・ATP複合体のX線結晶構造解析から, Asn-17, Lys-142, Ile-231, Glu-241, Lys-335がATPの結合に寄与していることが明らかになっており, これらのいくつかは高度好熱菌MetRSでも保存されている (図2-7, ■)。

メチオニン結合部位 (図2-7, ▲)

大腸菌MetRSの変異体解析により, Asp-52 (メチオニンのアミノ基), Arg-233 (メチオニンのカルボニル基), His-301, Trp-305 (いずれもメチオニンの側鎖) がメチオニンの結合に寄与していることが示唆されている [Fourmy et al., 1991]。これらのアミノ酸残基はすべて高度好熱菌MetRSでも保存されており (図2-7, ▲), 大腸菌と同様のポケットでメチオニンを認識していると考えられる。特にArg-233のそばにはATPの結合に関与するIle-231も存在し, メチオニルAMPの合成部位を形成していると思われる。現に高度好熱菌でも, この領域 (203-205) 近傍に存在するLeu-201をTrpに置換した変異体を作成したところ, 熱安定性は変わらなかったが, アミノアシル化の活性がほとんどなくなってしまった。

Zn²⁺フィンガー様モチーフ (図2-7, ○)

高度好熱菌MetRSには, Cys残基が3つしかないが, これらは図2-7の○で示した部位に集中して存在し, Cys-X₂-Cys-X_{1a}-Cys-X₂-HisというZn²⁺フィンガー様の配列を形成していた [Nureki et al., 1991]。この領域の機能と構造に関しては, 第3章で他のARSとも比較対照しつつ議論する。

今まで議論されたアミノ酸残基以外にも, 特にN端のドメインには, 「YVWFDA (高度好熱菌のMetRSで225-230)」、「IGKDI (高度好熱菌のMetRSで257-261)」など, 4種のMetRSで強く保存された配列が存在する。「IGKDI」については上記の議論から近隣のHis-265, Trp-269がメチオニンの側鎖の認識に関わっていると考えられ, アミノ酸認識のポケットの一部を構成している可能性もある。本研究では, 高度好熱菌MetRSのYVWFDA (225-230) 配列中のTrp-227 (図2-7, △) をPheに置換した変異体を作成しこれを精製して反応速度論的解析を行った。

2.3.3 高度好熱菌MetRSのTrp-227変異体の反応速度定数解析

Trp-227をPheに置換したMetRS変異体(W227F)は、野性型MetRSと同じ方法で精製され、70°C 30分の熱処理でも変性しなかった。このことから、この変異の導入によってMetRSの3次構造上のフォールディングは影響を受けなかったことが示唆される。W227F変異体の反応速度定数を測定したところ、表2-2に示すようにメチオニンに対する K_m が18倍に、 $tRNA^{Met}$ に対する K_m が14倍に上昇したが、ATPに対する K_m は変わらなかった。また、 k_{cat} の値は1/7に落ちていた。したがって、Trp-227を含む「YVWFDA」領域は、主にアミノ酸とtRNAの認識に寄与する部位を構築している重要な領域であることが示唆される。

2.3.4 class I MetRSサブファミリーのアミノ酸配列相同性

序でも述べたように、MetRS、IleRS、ValRS、LeuRS、CysRSはclass Iのなかでもサブグループ(MetRSサブファミリー)を形成している。これまでに一次構造が決定されているいろいろな生物種のMetRSサブファミリーのアミノ酸配列を、最も相同性が高くなるように並べたものが図2-8 [Shiba & Schimmel, 1992]である(特に相同性の高い領域だけを抜き出してある)。大腸菌MetRSの結晶構造から推定された二次構造を配列の上を示した。するとMetRSサブファミリーは、相同性に基つて非常にきれいにアミノ酸配列を並べることができることがわかる。そして、どのARSもN端のドメインはRossmann Foldからなっているが、その構造中に2つの挿入領域(Connective Polypeptide I, II, 以下CP-I, CP-IIと呼ぶ)が埋め込まれていることがわかる。

MetRSサブファミリーで保存された領域は、どれもループ部分に存在している(図2-8)。Rossmann Fold中では、HIGH配列(1)とKMSK配列(9)の部位がよく保存されているが、それ以外にも2の領域がよく保存されている。この領域中のAsp残基(3番目)は、MetRSではメチオニンのアミノ基の結合部位(2.3.2)であり、したがってこの領域はアミノ酸と、そしておそらくはtRNAの3'末端のA76の結合部位を形成しているものと思われる。

CP-I領域では、そのN端側部分(3)に多くのARSでZn²⁺フィンガー様のモチーフが存在している(図2-8, 白抜き)(第3章で詳述する)。4や5の保存領域はIleRSやValRSおよびLeuRSだけに存在し、これらのARSはさらに進化的に近いと考

えられる。機能的にはアミノアシル化以外の機能に関わっている可能性も考えられる。

CP-II領域では、3つの領域がMetRSサブファミリー同士でよく保存されていた(図2-8)。6は、2.3.2の議論より、アミノアシルAMPを合成する部位を構築していると考えられる。7の領域は、2.3.3で述べた「YVWFDA」配列に相当する部位で、アミノ酸およびtRNAの認識機構に関わっていると考えられる。8の領域は、2.3.2の議論から、MetRSサブファミリーの基質となる疎水性アミノ酸の側鎖のポケットを構成していると考えられる。

C端側のドメインで、10や11はtRNAの認識に関わっていると考えられる。特に10は大腸菌MetRSでtRNA^{Met}のアンチコドン1字目の認識に関わっていたTrp-461を含んでおり[Gohsh et al., 1990]、この領域内にtRNAのアンチコドン認識部位が存在すると考えられる。最近Schimmelらのグループが、大腸菌IleRSにおいて、MetRSのTrp-461に相当する位置に存在するArg-734をGlnに置換した変異体を作成したが、活性はあまり落ちなかった。しかし、2つ隣のLys-732の変異体は大きく活性が低下したことから、このLys残基がtRNA^{Ile}のアンチコドンの認識に関わっている可能性を示唆している[Schimmel, 私信]。

以上のように、class IのMetRSサブファミリーには、少なくともN端のドメインにおいてはかなり共通したアミノアシル化反応の機構が存在することが示唆された。

2.3.5 IleRSのLeuジッパー様モチーフ

IleRSでは、図2-8の10の領域(tRNAのアンチコドン認識部位)のすぐN端側に、Leu残基(あるいはMet, Ile, Val, Pheなど疎水性残基)が規則的に繰り返される配列が存在する(図2-9)。大腸菌のMetRSで対応する領域は、 α ヘリックス構造をとっている。そこで、高度好熱菌IleRSのこの領域が α ヘリックス構造をとると仮定して見ると、図2-10のように疎水性アミノ酸残基はヘリックスの片面に並び、電荷を持ったアミノ酸残基は反対側に分布し、いわゆる両親媒性ヘリックスを形成することが予想された。さらに、このヘリックスのN端に隣接するAsp677, Trp679(図2-9)をそれぞれAsn, Leuに置換した変異体IleRSを作成したところ、確かにアミノアシル化活性の低下がみられた(図2-10)。DNA結合タンパク質の両親媒性ヘリックスは、DNAの結合に関わっていることが示唆されており[Schwabe & Rhodes, 1991]、IleRSの両親媒性ヘリックス構造もtRNA^{Ile}の結合に関わっている可能性があると考えられる。

2.3.6 高度好熱菌 *gluX* 遺伝子の塩基配列

高度好熱菌 *gluX* 遺伝子の塩基配列を図2-11に示す。*gluX* 遺伝子の読み枠は1407塩基対からなり、468アミノ酸残基からなる *GluRS* をコードしていた。*GluRS* の分子量は53,901と計算され、SDS-PAGEの値 (M_r : 50,000) [Hara-Yokoyama et al., 1984] とほぼ一致した。クローニングに先立って、下線を引いたアミノ酸配列 (図2-11) を決定し、これに基づいてオリゴヌクレオチドプローブを合成した。遺伝子のコドン3字目のG,C含量は94%とやはり非常に高かった。

2.3.7 高度好熱菌 *GluRS* と他の生物由来の *GluRS* のアミノ酸配列同一性

高度好熱菌 *gluX* 遺伝子から推定される *GluRS* のアミノ酸配列を、すでに一次構造が決定されている大腸菌 [Breton et al., 1986], *Rhizobium meliloti* (根粒バクテリアの一種) [Laberge et al., 1989], 枯草菌 *Bacillus subtilis* [Breton et al., 1990], 中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* [Breton et al., 1990] の *GluRS* の配列と比較したのが図2-12である。大腸菌, *Rhizobium meliloti*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* の *GluRS* との同一性は、それぞれ37, 45, 35, 41%であり、MetRSの場合と比べて生物種間のホモロジーは高かった。また、15-17残基に位置するHVGが、class IのARSに特異的なHIGH配列、243-246残基に位置するKISKが、KMSK配列であると考えられる。

2.3.8 class I *GluRS* サブファミリーのアミノ酸配列同一性

序でも述べたように、*GluRS* と *GlnRS* はアミノ酸配列同一性が高く、枯草菌 *Bacillus subtilis* や高等植物のクロロプラストの *GluRS* は $tRNA^{Gln}$ にグルタミン酸を結合する (1.1)。また *GlnRS*, *GluRS*, *ArgRS* は、特異的な $tRNA$ と結合することによって初めてATPやアミノ酸を結合するようになる性質があり (序章)、同じサブグループを形成すると考えられている。図2-13に、これまで一次構造が明らかになった *GluRS* と *GlnRS* のアミノ酸配列を、そのホモロジーに基づいて並べてみた (特に同一性の高い部位を抜き出して示してある)。するとN端のドメイン (KMSK配列よりN端側) については、*GluRS* と *GlnRS* でかなり高い同一性が見られた。また、本研究のアミノ酸配列解析により、 $tRNA$ の認識に関わっているC端側のドメインに関しても、はじめて有意の同一性を見いだすことができた (図2-13)。大腸菌の

GlnRSについては、tRNA^{Gln}との複合体の結晶構造が解かれている [Rould et al., 1989; Rould et al., 1991] ので、tRNAの認識に関わっているアミノ酸残基が明らかになっている。そこで、GlnRSのこれらのアミノ酸残基に相当する高度好熱菌 GluRSのアミノ酸残基に、変異を導入して見た (図2-14)。

アクセプターアームの認識部位

まず、GluRSのN端側のドメインで、tRNAのアクセプターアームの認識に関わっていると思われる、Asp-44, Pro-109, Arg-116をそれぞれAla, Ala, Glnに変えた変異体 (D44A, P109A, R116Q) を作成し (図2-14)、アミノアシル化の活性を測定してみた。すると、R116Qでは活性が60%程度まで落ち、D44AとP109Aでは活性は10%以下に落ちてしまった (図2-15)。このGluRSの Asp-44に対応するGlnRSの残基は Asn-69で (図2-13, 14)、このAsn残基はtRNA^{Gln}のCCA末端の C75の認識に関わっている [Rould et al., 1989]。また、GluRSのPro-109に対応するGlnRSの残基はPro-126で (図2-13, 14)、この Pro残基は、やはりtRNAのCCA末端のC74の認識に関わっていることがわかっている [Rould et al., 1989]。以上のことより、GluRSとGlnRSではtRNAのCCA末端を認識するポケットの構造は似ていることが示唆される。tRNA^{Gln}はGlnRSに結合すると、そのCCA末端が折れ戻ってポケットに入ることが知られており [Rould et al., 1989]、GluRSでも同じような機構が存在するのかもしれない。GluRSの Arg-116に対応するGlnRSの残基は、Arg-133である (図2-13, 14)。tRNA^{Gln}がGlnRSと複合体を形成すると、アクセプターシステムの1番目の塩基対 U1·A72が開裂して、アイデンティティー決定因子であるG2·C71とG3·C70が酵素に認識されやすくなるが [Rould et al., 1989]、この時 Arg-133はA72のリボースと水素結合をつくって、この開裂した構造を安定化する働きをしている。GluRSでは、これに相当する残基に変異を導入しても活性がそれほど下がらなかったことから、tRNA^{Gln}ではアクセプターシステムが開裂するような機構は存在しないのかも知れない (tRNA^{Gln}が安定な G1·C72塩基対を持つことから推測される)。また、tRNA^{Gln}の G2·C71やG3·C70の認識に関わっているGlnRSのアミノ酸残基はGluRSでは全く保存されていなかった。このことから、tRNAのアクセプターシステムの認識機構はGluRSとGlnRSで異なると考えられる。

Dステムおよびアンチコドン認識部位

C端側のドメインにおいては、まずGlnRSでDステムのG10と水素結合することが明らかになったGlu-323 [Hayase et al., 1992]が、GluRSでも保存されており (Glu-296) (図2-13), このGlu-296はtRNA^{Glu}のG10を認識している可能性がある。

また、X線結晶構造解析により、大腸菌GlnRSのArg-412がtRNA^{Gln}のアンチコドン1字目のC34と塩基特異的に水素結合をつくることが明らかになっている [Rould et al., 1991] (大腸菌のマイナーなtRNA^{Gln}は34位にmnm^ss²Uを持つが、GlnRSはこのマイナーtRNA^{Gln}よりも、C34を持つメジャーtRNA^{Gln}をより効率よくチャージすることで、コドン使用に応じたタンパク質合成を実現していると考えられる)。このGlnRSのArg-412に対応するArg残基が高度好熱菌GluRSでも保存されている (Arg-330) (図2-13)。高度好熱菌のtRNA^{Glu}は34位がCであり、Arg-330はこの塩基の認識に関わっている可能性がある。大腸菌のtRNA^{Glu}では、アンチコドン1字目はCではなくmnm^ss²U34であり、これに対応して、大腸菌のGluRSでは高度好熱菌のArg-330に相当する残基がHisにスイッチしているのは非常に興味深い。大腸菌tRNA^{Glu}のアミノ酸受容活性に塩基修飾が重要であるという現象はこのあたりにカギがあるのかもしれない。

また、大腸菌tRNA^{Gln}のアンチコドン3字目のG36のO6-カルボニル基と水素結合をつくるGlnRSのArg-402も高度好熱菌GluRSでは保存されている (Arg-319) (図2-13)。ただし、高度好熱菌のtRNA^{Gln}ではアンチコドン3字目はGではなくC36である。したがって、Arg-319はGのO6-カルボニル基の代わりにCのO2-カルボニル基を官能基特異的に認識しているのかもしれない。

これらに対し、tRNA^{Gln}のアンチコドン2字目のU35を認識しているGlnRSの領域 (図2-13で(65)と表わされた部位に含まれる)は、GluRSでは完全に欠失されていた。U35はtRNA^{Gln}の最も主要なアイデンティティ決定因子であり、GlnRSがこれを積極的に認識するために、U35の認識領域が進化的に後から挿入されたのかも知れない。

2.3.9 高度好熱菌GluRSのLys-309, Trp-312変異体の解析

ところで、大腸菌tRNA^{Glu}と高度好熱菌GluRSの¹³C-NMR解析 (1.3.15)から、tRNA^{Glu}のアンチコドン1字目のmnm^ss²Uの周辺には、GluRSのなんらかの

芳香族アミノ酸残基が近づいていることが示唆された。そこで、上記(2.3.8)でアンチコドン認識部位と推定された領域のすぐN端側にあるTrp-312(すべてのGluRSで保存されている)とその3つ隣でGluRS内でよく保存されているLys-309を、それぞれCysまたはTyr、およびGlnに置換したGluRS変異体(W312C, W312Y, K309Q)を作成し(図2-13, 14)アミノアシル化の活性を測定した。すると、W312Y, W312Cでは活性が大幅に失われ、K309Qはほぼ完全に失活してしまった(図2-16)。このことから、この領域もtRNA^{Glu}のアンチコドンの認識に関わっていると考えられる。そこで、W312Y, W312Cの2つの変異体GluRSを精製し、各基質に対する反応速度定数を測定してみた。するとW312YおよびW312Cのいずれでも、ATPやグルタミン酸に対する K_m はほとんど変化しなかったが、tRNA^{Glu}に対する K_m がW312Yで6倍、W312Cで7倍に上昇した(表2-3)。このことから、Trp-312もtRNA^{Glu}のアンチコドン部位と特異的に結合していることが示唆される。さらに、 k_{cat} は、W312Yでは1/2程度しか落ちなかったが、W312Cでは1/20に落ちていた。tRNAのアンチコドンの結合が酵素のcatalytic activationを引き起こす(k_{cat} に影響する)ことは、第1章のtRNA^{Leu}に関する研究でも考察されたことであるが、本研究のGluRSのTrp-312変異体の結果は酵素の側からこのことを示唆するものである。すなわち、GluRSのTrp-312はtRNA^{Glu}のC34を結合して、さらにそのシグナルを触媒中心に伝える過程にたずさわっており、後者の働きには312番が芳香族アミノ酸であることが必要なのではないかと考えられる。

2.3.8で、高度好熱菌GluRSのGlu-296がtRNA^{Glu}のDステムのG10を認識していることが推定された。上記の実験事実により、Lys-309やTrp-312がtRNA^{Glu}のアンチコドンと結合することを考えると、Dステムの認識部位とアンチコドンの認識部位の間はアミノ酸にして約13残基しか離れていないことになる(図2-13)。大腸菌のGlnRSでは、対応するDステムの認識部位とアンチコドンの認識部位の間が約70アミノ酸残基もあって、ここに β -barrel構造の一部が挿入されており[Rould et al., 1991]、この構造と比べると、本研究のGluRSはかなり異なる構造をとっていると考えられる。このように、GluRSとGlnRSではtRNAを認識するアミノ酸配列はかなり似ていながら、それらが埋め込まれている高次構造はかなり違うことが推測される(第4章)。

Class I	Class II	
	motif 1,2,3	motif 3
HIGH+KMSK		
MetRS (α_2) 2'OH RF	SerRS (α_2) 3'OH AP	AlaRS (α_4) 3'OH
IleRS (α) 2'OH	ThrRS (α_2) 3'OH	GlyRS ($\alpha_2\beta_2$) 3'OH
ValRS (α) 2'OH	ProRS (α_2) 3'OH	
LeuRS (α) 2'OH		
CysRS (α)	AspRS (α_2) AP	
	AsnRS (α_2) 3'OH	
GlnRS (α) RF	LysRS (α_2) 3'OH	
GluRS (α) 2'OH		
ArgRS (α) 2'OH	PheRS ($\alpha_2\beta_2$) 3'OH	
TyrRS (α_2) RF		
TrpRS (α_2)		

表2-1 ATP結合様式に基づくARSのクラス分け

[Eriani et al., 1990] より改変. 2'OH, 3'OHとは, 各ARSが対応するtRNAの3'端のアデニン残基の2'あるいは3'のOHにアミノ酸を結合させることを意味している. 結晶構造が得られているものについては, ATP結合ドメインの構造が, Rossmann Fold (RF) であるか逆平行 β シート (AP) であるかを示してある.

	K_m			k_{cat}
	L-methionine	ATP	tRNA _f ^{Met}	
	μM	mM	μM	s^{-1}
Wild-type MetRS	18	0.18, 1.5	1.4	17
W227F mutant MetRS	323	1.7	20	2.5

表2-2 高度好熱菌MetRS W227F変異体のアミノアシル化反応速度定数

	K_m			k_{cat} s ⁻¹
	L-glutamate μM	ATP μM	tRNA ^{Glu} μM	
Wild-type	35	94	2.7	1.0
W312Y mutant	31	76	16	0.60
W312C mutant	76	58	19	0.046

表 2-3 高度好熱菌 *GluRS* の W312Y および W312C 変異体のアミノシル化反応速度定数

Southern blotting

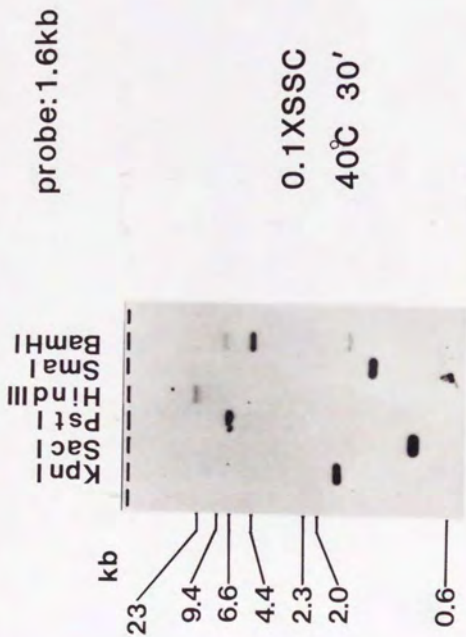


図2-1 高度好熱菌 *metS* 遺伝子のクローニングの際の Southern blotting
 アローブは *metS* 遺伝子の一部を含む *Kpn* I 切断による1.6 kb断片を nick-translation によりラベルしたものの。

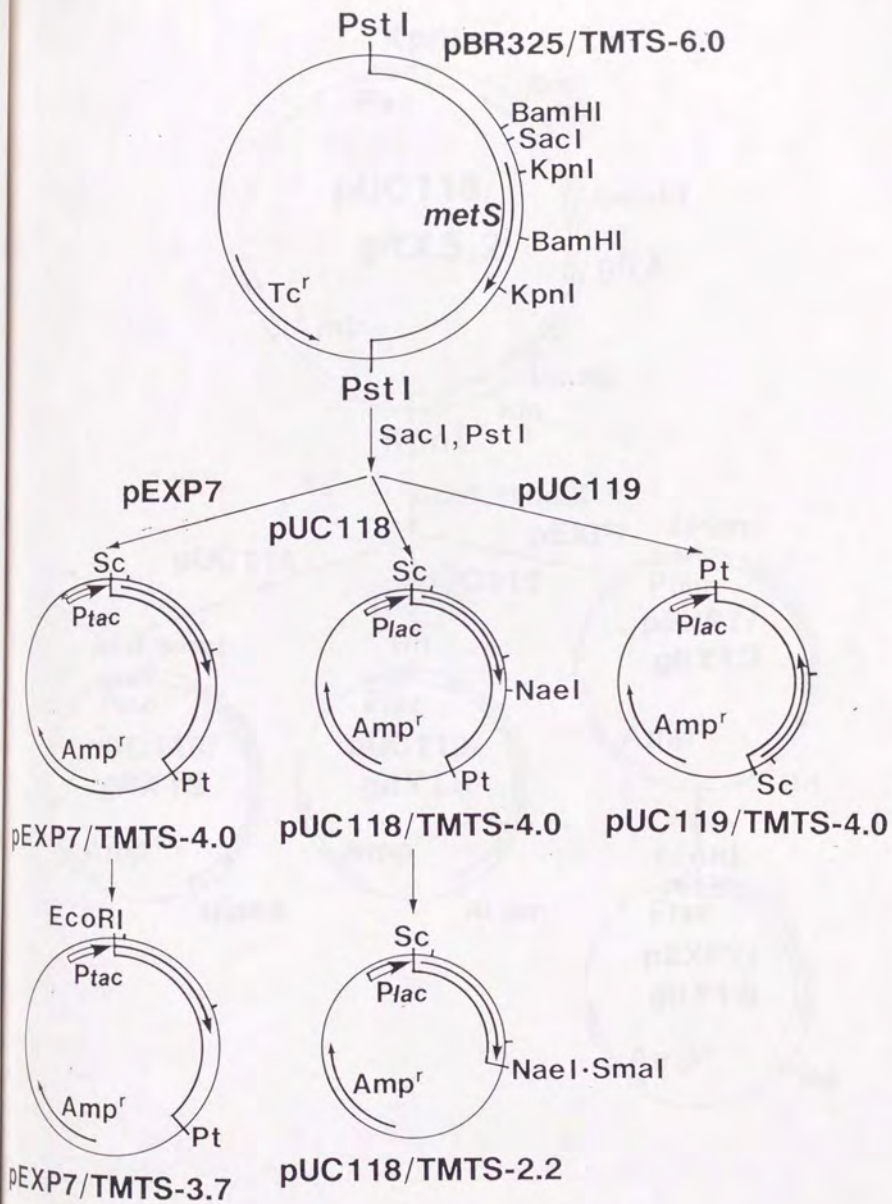


図2-2 高度好熱菌 *metS* 遺伝子の*E. coli*での大量発現系の構築

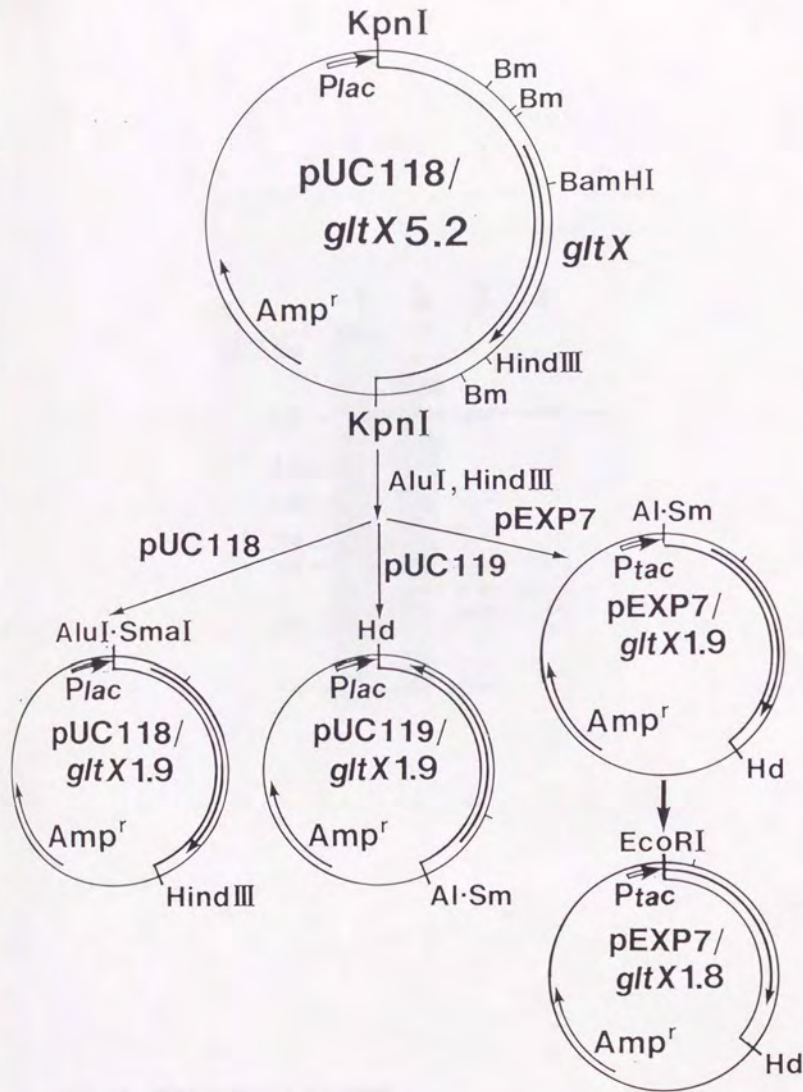


図2-3 高度好熱菌 *gltX* 遺伝子の*Bacillus subtilis*での大量発現系の構築

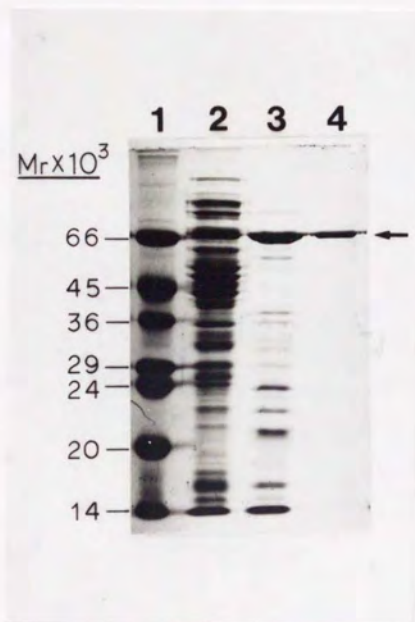


図2-4 高度好熱菌MetRSの精製

1, 分子量マーカー; 2, 組み換えプラスミドpUC118/TMTS4.0 (図2-2) で形質転換した大腸菌の粗抽出液; 3, 熱処理 (70°C, 20分) 後の上清; 4, DEAE-Sephacelカラム溶出後

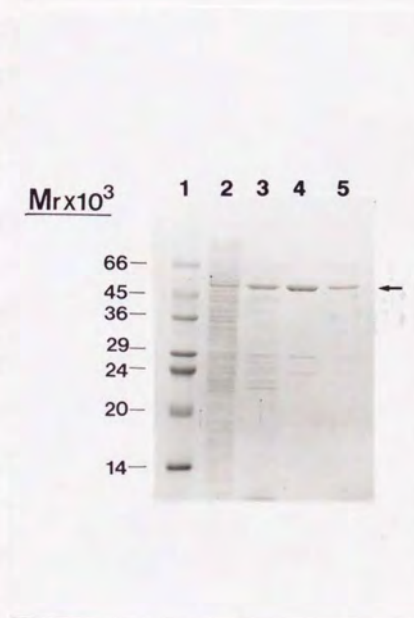


図2-5 高度好熱菌GluRSの精製
 1, 分子量マーカー； 2, 組み換えプラスミド pEXP7/gltX1.8 (図2-3) で形質転換した大腸菌の粗抽出液； 3, 熱処理 (70°C, 20分) 後の上清； 4, DEAE-Sephacel, Phenyl-Superose, monoQ カラムを用いて精製後； 5, GluRSの1つの結晶を溶かしたもの (第4章)

GAATGTCCTCCCTTCGGCTACGGGGCACCTCAAGGGCATCGCCGACCTCGGGGGGAGCCCGAGCTCCGGCATGGACGGGACAGTTCCTACTCCACGACGGGGCCACCTCATCGCC	-241
GATTCGCTCCCTCGCCCATCGGGGACCCCTTGGCCGTGCACGGGGCCCTTGGAGATCCCGGGTGGTGGAGACGGGGCTCTTCGTGGGATGCCACCGGGCCCTGTGGCGGGG	-121
CGTTTGGGGTGGAGGCTCTGGCTAGAAAGGACATGAAGGCGATGCCCGGCTTACGGCGGGGAGGCTTCCCGCCCGGGCCGCTGCCCGGTTTATAGGAGGGCGC	-1
(M E A M K G M P S *)	
ATGGAAAGGCTTCTACGTGACCCACCTACTACTGACCGGACCGGACCGCTGGGCCACCGCTACACCCAGGTGTGGCGGACTTCTGCCCGCTGGCACCGCTGCACGGC	120
W R K V F Y V T T P I Y Y V R A E P H L G H A Y T T V V A D F L A R W H R L D G	40
TAAGCCACCTTCTCTCACCGGTACCAGGACGACGGGAGCGGTCTACCGGGCGGCCAGCGGGGGAGGACCCCAAGGCTTCTGGACCGGGTCTCCGGCGCTCAAAAG	240
V R T F L T G T D E H G E T V Y R A A Q A A G E D P K A F Y D R V S G R F K R	80
CGCTGGACCTCTCGGCATCCDCTACGACGACTTCTACCGCACCGGAGCAAGAAGTGGTGCAGCTCCTCTAAAGAAGTCTACGAGCGGGGACACTACTACGGG	360
A V D L L G I A Y D D F I R T T E E R H K K V V Q L V L K K V Y E A G D I Y Y G	120
CACTACGAGGGCTCTACTCGTCTCTCGCGAGCTTTTACCGGAGAAGGACTCGTGGAGGGCTTTGCCCATCGACGGAAGGCCGTGGAAAGCGGGAAGGAGGAACTCTC	480
E Y E G L Y C V S C E R F Y T E K E L V E G L C P I H G R P V E R R K E K Y Y F	160
TTCCGATGGAGAATACCGCCCTGGCTCCAGGACTACCGAGAAATCCCGACCTATCCCGCCCGAGGGCTACCGGAAGAGGCTCTGGCCATGCTCCCGACCCCATCGGGAC	600
F R M E K Y R P W L Q E Y I Q E N P D L I R P E G Y R N E V L A M L A E P I G D	200
GTCTCATCTCCAGGCAAAATCCCGTCCCTGGGCTACCCCTCCCTGGGACGAAACCAGTACCTACGCTGTGGTGGACGCCCTCTGAACCTACTCTCCCGCTGGACTAC	720
L S I S R P K S R V P G E T P L P D E N H V T Y W F D A L L N Y V W F A L L E K Y G R D A L	240
CGCGAGGGGAGCCCTACCGACCTTCTGGCCACCGCTGGCACCTATCGGCAAGGACCTCTTAAGCCCAAGCCGCTCTTGGCCACCATGCTGAAGCGGGGGGATCCCATG	840
P E G E A Y R T F M P H A W H L I G K D I L K P H A V F W P T M L K A A G I P M	280
TACGGCCACTGACCTGGAGGGTTTTCTGGGGCGGAGGGGGCAAGATCTCAAGACCCCTGGGAACTGGTGGACCCCTTCCGCTTCTGGAAAGTACGGCGGGGACCGCCG	960
Y E H L N V G G F L L G P D G R K M S K T L G N V Y D P F A L L E K Y G R D A L	320
CGCTATTACCTCCTTAGGGAGATCCCTACGGCCAGGACACCCGCTGAGCGAGGAGCCCTAAGGACCCGTCAGAGCCGACCTCGCCGACCTGGGCACTGGTCAAAGGACC	1080
R Y T L L R E I P Y G Q D T P V S E E A L R T R Y E A D L A D D L G N L V Q R T	360
CGGGCCATGCTTCCCTTCCCGAAGGGCCGATCCCGAACCCCTGGCGGGGAGGAGCTCGCCGAGGGGACGGGCTTCCGGGAGGCTCAGGCCTTGGTGGGGAGCTCAAGTTC	1200
K A N L F R F A E G R I P E P V A G E L A E G T G L A G R L R P L V R E L K F	400
CAGCTGGCCCTCGAGGAGCCATGCCCTACGTCAAGCCCTGAACCGGTACATCAACGAGAAGAAGCCCTGGGAGCTTCTCAAGAAGGACCGGAGGAGCCCGGGCGTCTCTACCGG	1320
H V A L E E A M A Y V K A L S R Y I N E K K P W E L F K K E P E E A R A V L Y R	440
GTGTGGAGGCTGAGTCCCTCTCTCACCCGGCTATGCCCGACAAGATGGGGAGCTCAGGGGGCCCTGGGGCTTAAAGGAGGAGTGGCCCTCGAGGAGCCGAGGAG	1440
V Y E G L R I A S I L T P A M P D K M A E L R R A L G L K E E V R L E A E R	480
TGGCCCTGGCGACCCCGCCCATCCCGGAGGAAGCCCGTCTTTCGCCAAAGGAGGCCAAGTGGAGGCCAAGCCCAAGGAGAGCCCTGGATCGGATAGAGGACTCGCC	1560
W G L A E P R P I P E E A P V L F P P K K E A K V E A K P K E E A W T G I E D F A	520
AGGTGGACTCAGGGTGGAGGTTTTGGCGGGGAGAAGCCCGAACCGCCAGCGGCTTTGGTCTCAGGCTCTCCCTGGGGAACGAGGAGCCACCGTGTCTCGGGATCGCC	1680
A V E L R V A E V L A A E K H P N A D R L L V L R L S L G N E E R T V V S G I A	560
TAAGTACCGCCCGAGGACTCTGGGCAAGAAGTGGTCTGGTGGCAACCTCAAGCCCGCAAGCTCGGGGATGAGAGCCAGGGGATGATCTCCCGCCACAGGAGGGGAG	1800
K X Y R P E E L V G G K K V V L V A N L K P A K L R G I E S Q G N I L A A Q E G E	600
CGCTTCCCTGGTACGGTGGAGGGGAGTCCCGCCCGGGCTGGTGAATACCTCCCAACCGGGGGAAGCGGGATGGGGCCCGGGCAAGGGTCTCAAGGGGCTCCCT	1920
A L A L V T V E G E V P P G R W *	616
CGGCTAAGAGGCTTGGCGCTCGCGAAGCCCATATGGTGCATGGGGAAACCTTGGGAGGTAAGCGGACATAGCCCTCTCGCCCTCGGCTCGGGGTCGCGA	2040
ACTGTCCAGGCTGGGAGAAAACCCCGTCCGCTGAAGAGCGGAGTTTCTCGCTTGAAGTGGACAAGCGGAGGGGCTTACAGAGCGGGAGCGGGTAAAGGTTCTTGG	2160
CGGCTTGGAGAGCTCTGGCGG	2184

図2-6 高度好熱菌 *metS* 遺伝子の塩基配列

下線のアミノ酸配列は、Edman分解によって決定されたものと一致した。*metS*遺伝子の発現を制御するアテニューエーターのリーダー配列と思われるものを括弧で示してある。点線の塩基配列は、*tRNA^{Met}*の塩基配列と相同性があり、*metS*遺伝子の発現を制御していると考えられる [Nureki et al., 1991] .

Y R A A A A A N G C	E D P K K A F V D I R V S Q	R E F E Y V Q L C D E V Y H	K R A M D K L G L G	A N Y L E I R T T D E D	R I I K K N V V K L K K V Y A G	A N A E I I C D D H U B I K K I	115	{ T. therm. }
Q C A A G S S	F E Y D A N G Y D X K Y	R E Y V Q L C D E V Y H	K R A M D K L G L G	A N Y L E I R T T D E D	R I I K K N V V K L K K V Y A G	A N A E I I C D D H U B I K K I	126	{ S. colli. }
E T K A L E E G	V C V T L E R Q L C D E V Y H	R E Y V Q L C D E V Y H	K R A M D K L G L G	A N Y L E I R T T D E D	R I I K K N V V K L K K V Y A G	A N A E I I C D D H U B I K K I	309	{ S. cr. cyt. }
D I Y Y G E E I S	G Y V S C E R E F Y L A D R E	K E K U Y V K E G E C E	L Y V E D A L L N Y M	G R E P V E R R K -	- - - - -	- - - - -	155	{ T. therm. }
L E B E Q S M K Q	L Y C E D E F Y H N S Y	K E K U Y V K E G E C E	L Y V E D A L L N Y M	G R E P V E R R K -	- - - - -	- - - - -	172	{ P. fl. }
F S G I T P E P K	S E G N Y E F E R M E	- - - - -	X R P M T G E Y I	Q E N P D I I R P R	G E N R E V I J A M T	- - - - -	337	{ T. therm. }
L D D A S I P E K	S E S S E H I E L E	- - - - -	S E S S E M V E K A S	E G E C G N S K N S K	- - - - -	- - - - -	337	{ P. fl. }
D L S I S R E A P	R E V Y G E I P M A D R	E N H Q U Y V V M K D	- - - - -	A L L N Y M G S I	G I P S I L S N A I E	V E V E W S J A	377	{ T. therm. }
P R C I I S R R D	- - - - -	E K Y K D K	- - - - -	A L L N Y M G S I	G I P S I L S N A I E	V E V E W S J A	377	{ S. cr. cyt. }
D Y P E C E A Y L	R I E V P H M A V T A E	- - - - -	H L I G X D I L R P	E H V E M P -	- - - - -	- - - - -	290	{ T. therm. }
L R R E D S V S F	D E P D K N N P E H V S	- - - - -	I G E D I L V E H	E W M P -	- - - - -	- - - - -	334	{ T. therm. }
I T R S I Y K	G M W N N P E H V S	- - - - -	I G E D I L V E H	E W M P -	- - - - -	- - - - -	387	{ T. therm. }
L G C R C R K M S	K S R C G V G E V	- - - - -	L G E M K C K D N V P	E H V E M P -	- - - - -	- - - - -	434	{ P. fl. }
Q - Y E N G	L G N V Y V D P A L	E K X Y -	G R D A L R Y Y	- - - - -	- - - - -	- - - - -	518	{ S. cr. cyt. }
Y E A D I L A V S	R D L G N R C C S K F N I E	- - - - -	A D A S T W N H S G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	387	{ T. therm. }
V N N S - E L V	- - - - -	- - - - -	A N L G N -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	434	{ P. fl. }
A G R E L R P V V	- - - - -	- - - - -	P E T K	- - - - -	- - - - -	- - - - -	518	{ S. cr. cyt. }
A A E V Y G F A	- - - - -	- - - - -	E E E M M E L R	- - - - -	- - - - -	- - - - -	387	{ T. therm. }
V K A D I N E I L S N Y V K E M E L R	- - - - -	- - - - -	H V A L E E A X A Y Y X	- - - - -	- - - - -	- - - - -	434	{ P. fl. }
R V V E G L R I A S I L L T R A A W P D	- - - - -	- - - - -	A V R E I L A M S L S A R	G N Q F L G E E N K L	D N T L P E S Q S D E K S	D A V V A	498	{ T. therm. }
I C S M L L V A V S S T	- - - - -	- - - - -	A V R E I L A M S L S A R	G N Q F L G E E N K L	D N T L P E S Q S D E K S	D A V V A	533	{ S. colli. }
V L F P I K X X	- - - - -	- - - - -	A V R E I L A M S L S A R	G N Q F L G E E N K L	D N T L P E S Q S D E K S	D A V V A	556	{ S. colli. }
K R I D M R O V	- - - - -	- - - - -	A V R E I L A M S L S A R	G N Q F L G E E N K L	D N T L P E S Q S D E K S	D A V V A	730	{ S. cr. cyt. }
Q R I D E K K D	- - - - -	- - - - -	A V R E I L A M S L S A R	G N Q F L G E E N K L	D N T L P E S Q S D E K S	D A V V A	591	{ T. therm. }
K H P N A D R L E V R R S L S G N E E R T V	V S G L A K K V V I	V A A N K P A K L R -	G E S I Q G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	648	{ E. coli }
F V E G S D R K L R T L D L G G E K K N V	F S G R S A V P D	Q Q A L I G E R H T I M	V A N N A P R K M R F G G -	S E G G	- - - - -	- - - - -	616	{ T. therm. }
X I L A A Q E -	G E A L A V T V E G E V P P G R W *	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	616	{ E. coli }
X V M A A G P G G	K D I F L L S P D A G A K P E H Q V K *	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	616	{ E. coli }

図2-7 MetRSのアミノ酸配列相同性 高度好熱菌MetRS [Nureki et al.,1991], 酵母ミトコンドリアMetRS [Tzagoloff et al.,1989], 大腸菌MetRS [Dardel et al.,1984], 酵母細胞質MetRS [Fasiolo et al.,1986] のアミノ酸配列を比較してある。高度好熱菌MetRSの3つのドメインの境界を↓で示す。●, tRNA^{Met}結合部位; ▲, ATP結合部位; ■, A-TTP結合部位; ○, Znフィンガー様モチーフ; △, Trp-227。

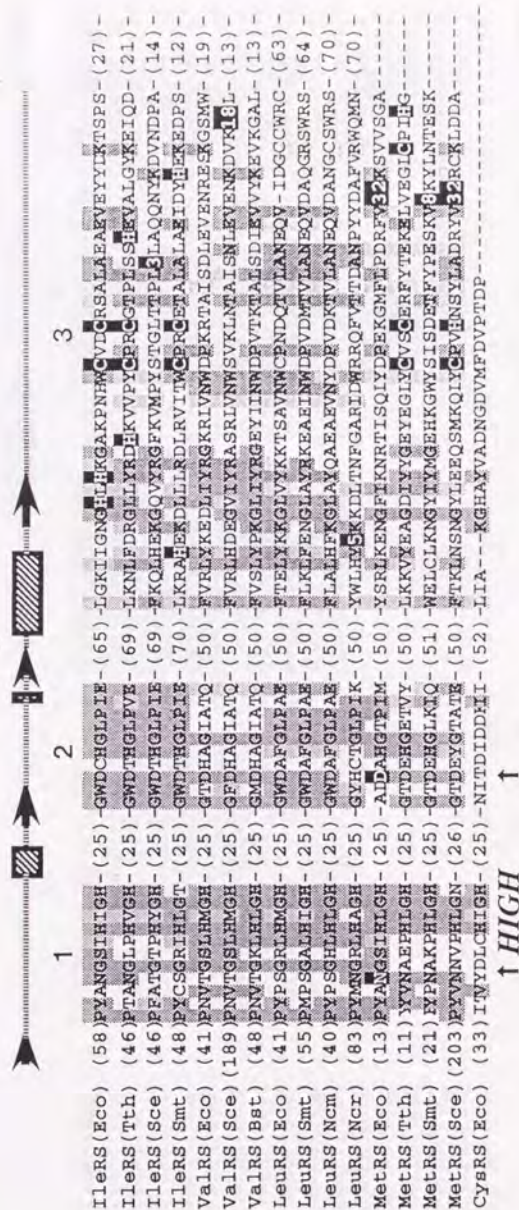


図2-8 class I MetRSサブファミリーのアミノ酸配列のホモロジー 半数以上のARSで保存されたアミノ酸残基を濃い網掛けで、それに類似のアミノ酸残基をうすい網掛けで示してある。配列の上に大腸菌MetRSの結晶構造から推定される二次構造(斜線のカラムは α -helix, 矢印は β -sheet)を示した。Shibaらによるalignment'に従った[Shiba & Schimmel, 1992]。大腸菌MetRSで、これまでに変異体解析などの結果、基質認識に関わっていることが明らかになっているアミノ酸残基を白抜きで示してある。また、白抜きの数字はアミノ酸配列の挿入を表している。さらに、3の領域に見られるZn²⁺フィンガー様モチーフは白抜きで示してある。

Connective Polypeptide I R.F. Connective Polypeptide II

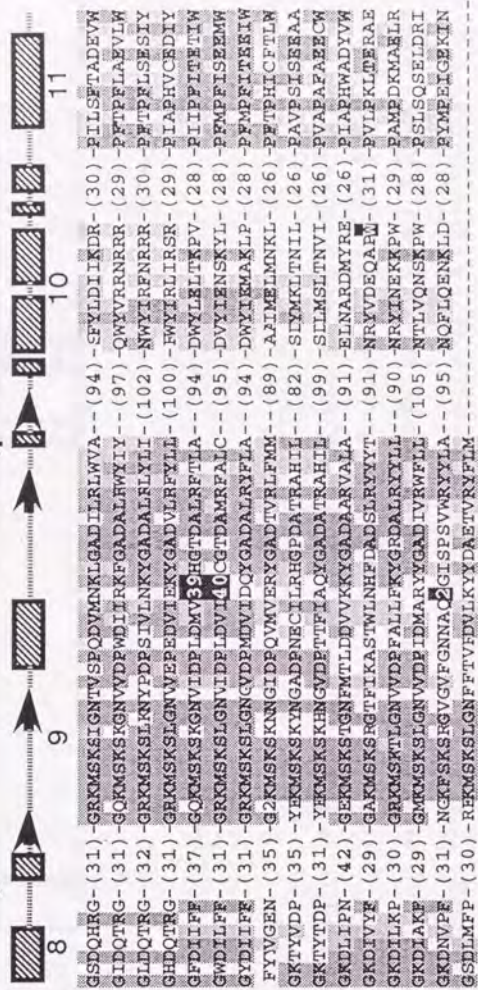
	4	5	6	7
IleRS (Eco)	LVIWTRERGLCLPTAQSLLHQI-	GTGAVHTAPGHECPDDY-	DWCISRQRWGVV-	LDVWFEDS-
IleRS (Tch)	LLIWTTFWTLFQNVAAAVHEE-	GTGIVHQAFAPGAEDL-	DWALSRRRYWSTF-	IDVWFYS-
IleRS (Sce)	LVAWTTTPWTLFNNLSLQVAD-	GTGIVHNAPAFGEEDN-	DRNVSRRYWSTF-	FCWFES-
IleRS (Smt)	LIIVWTTTPWTLFANMAVAVHPD-	GTGCVHTAPGHEPFD-	DWTSRQRWYGP-	LDVWFIDS-
ValRS (Eco)	LVAATRPETLLGDTGAVAVPE-	GTGCVKLTPAHDNDY-	DWCISRQLWVGR-	LDVWFSS-
ValRS (Sce)	LIIAATRPETIFGDZAVAVHPD-	GTGAVKLTPAHDNDY-	DWCISRQLWVGR-	LDVWFSS-
ValRS (Bbt)	LEVATRPETMLGDTAVAVHPD-	GTGAVKLTPAHDNDY-	DWCISRQLWVGR-	LDVWFSS-
LeuRS (Eco)	LTVTWTRPDTFMGCTVLAVRAG-	GTGAVMAVPGHDQRDY-	DWGVSRQRWYGA-	FDVWFES-
LeuRS (Smt)	LIVFTRPETIFAVQVVALALD-	GTGAVMCPGHDNRD-	DWLSRQRWYGP-	MDVWFDS-
LeuRS (Ncm)	LEVFTSRPDTVFGVYIAAAT-	GTGAVMGPVGHDLRHD-	DWLSRQRWYGP-	MDVWFDS-
LeuRS (Ncr)	ICPATLRPETMYGQVCCVCEA-	GTGVTSTVPSDFDDC-	NKVVSRDESCVA-	SPSTVYM-
MetRS (Eco)	-----	-----	NDLSECPYFGP-	FVWFDA-
MetRS (Tch)	-----	-----	DLISIRVFPWGP-	IYVWFDA-
MetRS (Smt)	-----	-----	DLISIRSLKWP-	VYVWFDA-
MetRS (Sce)	-----	-----	CITRDLVWGT-	YVWFDA-
CyBR5 (Eco)	-----	-----	EGSWSPWAGAG-	-----

ATP a.a. ATP a.a./tRNA

図2-8 class I MetRSサブファミリーのアミノ酸配列のホモロジー 半数以上のARSで保存されたアミノ酸残基を濃い網掛けで、それに類似のアミノ酸残基をうすい網掛けで示してある。配列の上に大腸菌MetRSの結晶構造から推定される二次構造(斜線のカラムは α -helix, 矢印は β -sheet)を示した。Shibaらによるalignmentに従った [Shiba & Schimmel, 1992]。

CP-II Rossmann Fold

2nd Domain

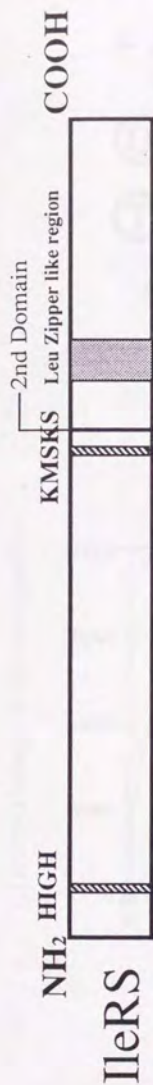


↑ KMSK

a. a.

↑ trNA anticodon

図2-8 class I MetRSサブファミリーのアミノ酸配列のホモロジー 半数以上のARSで保存されたアミノ酸残基を濃い網掛けで、それに類似のアミノ酸残基をうすい網掛けで示してある。配列の上に大腸菌MetRSの結晶構造から推定される二次構造(斜線のカラムは α -helix, 矢印は β -sheet)を示した。Shibaらによるalignmentに倣った[Shiba & Schimmel, 1992]。



⁶⁷⁷ *T.thermophilus* ...**DRW**L_{armqd}L_{iqrvtea} L<sub>eydp t t saraL_{rdfvved}L_{sq} **WYVRRNR**RRR...
E. coli ...**DRW**a v g ca kaa qedilka y eayd**F**hevvtq**L**mrfsesve**M**vs**F** YL DII KDR...
M.thermoauto. ...**DRW**II s rvns V_{alkvtea} L_{dnl hFira t re}I hdfi vedL_{sr} **WYI**RL I R S R...
T.thermophila ...**DRW**II is cqnL_{inyvrie}**M**ekyhL_{ynvvpz}L_{ih f i en} L_{in} **WYI**RLN RNR...
S.cerevisiae ...**AE** M_{il}asmsqL_{vqvihee}**M**gqykL_{ytvvpk}L_{infi d e} L_{in} **W** Y I R F N R R R...</sub>

図2-9 ILeRSに属されるLeuジッパー様モチーフ 各ILeRSのアミノ酸配列は以下の文献による: T.thermophilus, (小林); E.coli, [Webster et al.,1984]; Methanobacterium thermoautotrophicum, [Jenal et al.,1991]; Tetrahymena thermophila, [Cusank & Martindale,1992]; S.cerevisiae, [Englischet al.,1987]. *は、推定されるアンチコドン認識部位。

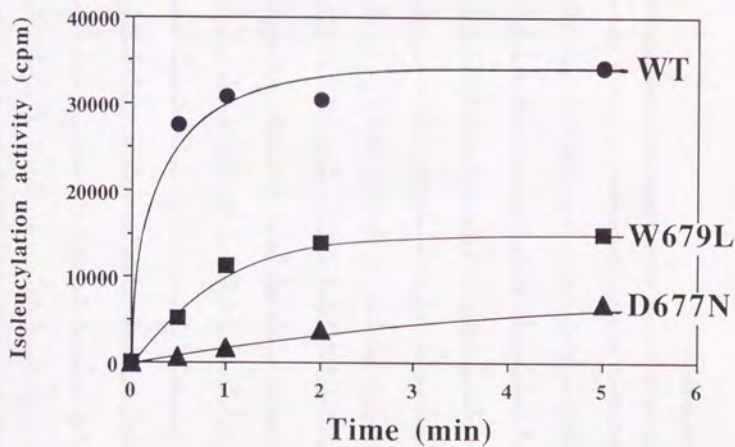
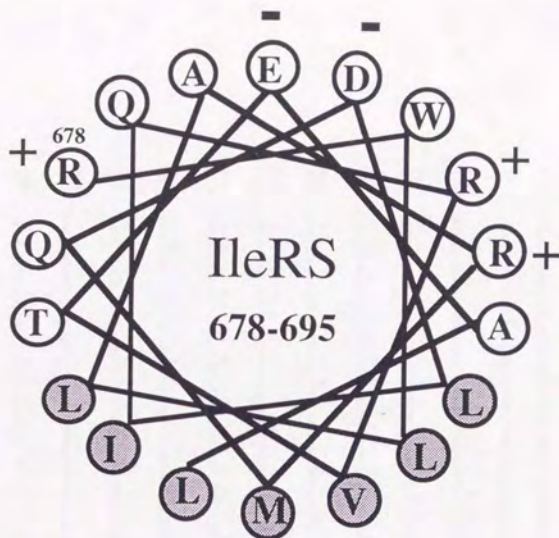


図2-10 高度好熱菌IleRSの678-695のアミノ酸残基がとると思われる両親媒性ヘリックス構造下は、IleRSのD677N, W679L変異体のアミノアシル化活性

M-VVTR IAPSPFTG	DPHYGTAYIALFNVAWARRM	GCRFIVRIEDTD	RAHYVPGAEEER	56 (T. th.)
KADS A VYRK IAPSPFTG	EPHYGTAYIALFNVLFAKKN	GGKFLRIEDTD	DATRGTPPEFEKVV	60 (R. ae.)
MK IKTAF IAPSPFTGYL	HVGARTALYSVLFAR	NHGGEFLRIEDTD	LERSTPEAIEAT	57 (E. co.)
HGNVYRY IAPSPFTGH	LHIGNARTALFNVLFAHQ	GKFLRIEDTD	KKRNIPEGGEQSQ	59 (B. su.)
KAKD VRYVY IAPSPFTGH	LHIGARTALFNVLFARH	HGGKMLVRIEDTD	JIRNVEGGEQSQ	59 (B. st.)
I A L K V L G L S T D E G P D V A A P T G P P Y R Q S E R L P L Y Q K Y A E E L L K R G W A Y R A F E T P E E L E Q I R				116 (T. th.)
I A L K V C L G L E W S E G P D I C G P Y G P P Y Q S D R K D I Y K P Y V E K I V A N G H G E F R C F C T P E R L E Q M R				120 (R. ae.)
A B G M N V L L L E W D E - - - - - G P P Y Q T K R F D R Y M A V I D Q M L E E G T A Y K C Y C S K G E L E A L R				109 (E. co.)
I A Y L K V L G L D W D E S V D V G C G E Y G P P A Q S E R D I Y K Y V Y E E L E K G L A Y K C Y C T E E L E K E R				119 (B. su.)
I E M L G H L G I D Y D E S V Q V G D G E Y G P P A Q T E R L D I Y R K Y V D E L L E Q G H A Y K C F C T P E E L E R E R				119 (B. st.)
I A E - - K G C - - - Y D G R A R N I P P E E A E E R A R R G E P H Y I R L K V P R P G T T E Y K D E L R G V V Y Y D				169 (T. th.)
I A Q R A A G K - P P K Y D G L C L S L S A E E V T S R Y D A G E P H Y V R M K I P T E G S C K F R D Q V Y G D V E I P				179 (R. ae.)
E E Q M A K G E - K P R Y D G R C R - H S H E H - - - A D D E P C V V R F A N P Q E G S V Y F D D Q I R G P I E F S				163 (E. co.)
E E Q I A R G E - M P R Y S G K H R D L T Q E E Q E K F I A E G R K P S I R F R V P E C K Y I R F M D I V K G E I S F E				178 (B. su.)
E E Q A A G C I A A P Q S G K C R R L T P E G V A E L A Q G K P Y T I R L K V P E G K Y E V D D I V R G K V T F E				179 (B. st.)
H Q E I P D V V L L K S D G Y P T Y H L A N V V D D H L M G Y T D V I R A E E W L V S T P I H Y L L Y R A F G W E A P R				229 (T. th.)
W E A V D M V L L K A D G M P T Y H M A M V V D D H L M X I T H V A R G E E W L A S V P K H I L I Y Q Y L G L E P P V				239 (B. su.)
H Q E L D D L I J R R T D G S P T Y N F C V Y D D W D H E I T H V I R G E D H I N N T P R Q I N I L A L K A P P V Y				223 (E. co.)
S D G I G D F V I Y K K D G T P T Y N F A V A T D D Y L M M T H V L R G E D H I S N T P K Q I M I Y Q R F G W D I P Q				238 (B. su.)
S K D I G D V I Y K A N G I P T Y N F A V Y D D H L M E I S H V F R G E E H L S N T P K Q L M V Y Y F G W E P P Q				239 (B. st.)
F Y N M P L L R N P D X T K I S K R K S H T S - - L D W Y X A E G E L P E A L R N Y L C L M G F S - - - M P D G R - E I				283 (T. th.)
F M H S L L M R N A D S X L S K R K H P T S - - I S Y Y T R L C Y L P E A L M N E - - - L G L F F I Q I A E - E E L				292 (R. ae.)
F A H U S M I N G D D Q K K L S K R G A V S - - V M Q Y R D D C Y L P E A L N Y L Y R L G W S H - - - - G D Q E I				276 (E. co.)
F G M T L I V N E S R K L S K R D E S I I Q F I E Y K E L G Y L P E A L F N F I G L L G W S P V - - - - G E E E L				294 (B. su.)
F A H L T L I V N E R R K K L S K R D E S I I Q F Y S Q Y K E L G Y L P E A M F N F F A L L G W S P E - - - - G E E E I				295 (B. st.)
F T L E E F I Q A F T W E R V S L G G P V F D L E K L R M X M G K Y I R E V L S L E E V A E R V K P P L R E A G L S W E				343 (T. th.)
F T L E E L A E X F D P E N L S L A G A I F D I Q K L D L N A R W I R E K L S E E E F A A R V L A W A M D N E - - -				349 (R. ae.)
F T R E E M I K Y F T L N A V S K S A F N T D K L W L N H H Y I N - A L P P E Y V A T H L - Q V H I E Q E N I D T				334 (E. co.)
F T L E E Q F I E I F D Y N A L S K S P A L F M D H K L M K Y N N Q Y Y K K L D L D Q Y V E L T L P H L Q K A G R Y G T E				354 (B. su.)
F S K D E L L R I F D Y S R L S K S P M F M D K K L T M M N N Q Y I K K L D L D R L V L E L A L P H L Y K A G R L P R D				355 (B. st.)
- - - S E A Y L R R A V E L M R P R F D T L K E F P E K A R Y L F T E D Y P V S E K - A - Q R K L - - - - E E G L P L				393 (T. th.)
R L E G - - - - - L K L S Q T R I S K L G E L P D L A A F F K S D L G - L Q P A A F A G V Y - A S P E E M L K I				400 (R. ae.)
- - R N G - P P Q A D L V K L L G E R C K T L K E M A G S C R Y - F Y E D F A E F D A A A K K H L R P Y A R Q P L E V				390 (E. co.)
L S R E E Q E W V R K L T S L Y H E Q L S Y G A E I V E L T D L - F F T D E I E Y M Q E A K A V L E E - - - E Q V P E V				410 (B. su.)
M S D E Q R Q V A R D L I A L Y Q E Q M S Y G A E I V P L S E L - F F K E E V E Y E D E A R Q V L A E - - - E Q V P D V				411 (B. st.)
L K E L Y P R L R A Q E E W T F A A L E A L L R G C F A A E - - - K G V K L G Q V A Q P L R A A L T G - S L E T P G - L				447 (T. th.)
L N T V Q P D L E X I L E W N R A D S I E T F L R A S E R - - - M G K K L F A V V A P L F V A C S G - S Q R S L P - L				453 (R. ae.)
Y R D K L A A I - - - T D W T A E N V H H A I Q A T A D E L E Y G M G K - - - V G M P L R V A V T G A G Q S - - P A L				441 (E. co.)
L S T F A A K L E E L E E F T P D N I K A S I K A V Q K E T G H - K G K K L - - - F M P I R Y A V T G - Q T H G P E L				464 (B. su.)
L S A F L A H V R D L D P F T A D E I K A A I K A V G K A T G Q - K G K K L - - - F M P I R A A V T G - Q T H G P E L				465 (B. st.)
F E - - - - - I L A L L G G E R A L R R L E R A L A *				468 (T. th.)
F D - - - - - S M E L L G R S V Y R Q E L K V A L A Q * V V A S M A G S G K *				484 (R. ae.)
D Y T V H A I C K T R S I E R I N K A L D F I A E R E N Q Q *				471 (E. co.)
F Q - - - - - S I E L I G K E T A I Q R L K K I *				483 (B. su.)
F F - - - - - A I Q L L G K Q K V I E R L E R A L Q E K F *				489 (B. st.)

図2-12 GluRSのアミノ酸配列相同性 各GluRSのアミノ酸配列は以下の文献による: *T. thermophilus*, [Nureki et al., 1992]; *Rhizobium meliloti*, [Labege et al., 1989]; *E. coli*, [Breton et al., 1990]; *Bacillus subtilis*・*B. stearothermophilus*, [Breton et al., 1990]. class I ARS に特徴的な HIGH配列と RMSK配列に下線を引いてある。

GlURS (Tth)
 GlURS (Rme)
 GlURS (Eco)
 GlURS (Bsu)
 GlURS (Bst)
 GlURS (Eco)
 GlURS (Hum)
 GlURS (Sce)

(0) M H V R I A S P S G D E F V T Y X I - (16) - V A I S D T R A K V V G A R R I A A N K K I G - (27) - K I A S I K I W S R A P F P E A R
 (3) S A M V I I A S P A G E H F V C T A Y I - (16) - K A L E D D I A T S T E F F K K V D A L K R C G - (27) - V V K I V A S C H G P R P F P E A R
 (0) M I K A F A P S P A G L V G C A T - (16) - L I L E D D I L S T E R A L A M D M G W I S - (19) - V I D O M E E S T K K Y C S R R I
 (2) N P V P A P S P S H L K G N A T - (16) - I V M D Y T K K N I E G G C Q K Y K K I G - (27) - F Y E S I E R K L A K Y C A E S I
 (2) K I V V G P S P T C H E R C G A T - (16) - V A E D T I E R N V E G C Q A E M Q I G - (27) - F V D E I E Q C H Y K S F C P P E L
 (25) T V H R P E R E N S Y I G H S K S - (16) - E A F D D N P V K E D I V Y E S I K N D V E I L A - (19) - K A L I N K L A Y V D E L P P O I
 (29) G R T V R P P E A S G Y R E X C H A K A - (16) - M E F D Y N P E K E K E D F K V I E D V A M E - (19) - F A R K I Q E K K A Y V D D T P P A Q M
 (249) G V C H R P E R E N G M L A H C H S K A - (16) - E A F D E N P E K E A E V F E S S K A M V S L S - (18) - L A E V I I K N G R A Y V H C R A E H I

HIGH

C75

Q I R - (111) - R F V E M P L E R N P D K R I S K R - (25) - S F S - -- M P D S K - E I E F I L K S E - A A A W W R V S A - (8) - K I F E M N G
 Q M R - (117) - F V E M L S E M R S A D K S R I S R H - (22) - G L F F I Q I A E S - E E L I T M E Z L - A E K E D P E N L S K - (8) - K I D R I L A
 E A L R - (102) - F V A I V M I N G D D G K K L S N H - (25) - S W S H - -- - - - D O E F T R E M - F K Y E L N A V S K - (8) - K A L R L H
 F K E F - (117) - P Q G E M T I V E S R K K L S K R D - (27) - G W S P V - -- - - E E E L L T K S Q - E I T D V N A L S K - (8) - K I K V V N
 F R E F - (118) - F O F A L T E I V N E Q R K K L S K R D - (27) - G W S P E - -- - - E E E S S K D L U - R I T D V S R L S K - (8) - E K T W S R N
 R E F - (119) - F R Q E F S R F - N L E V T V M G X N S - (27) - G Y T - -- - - A A S I K - E F C K R I G V T K D N I E M A S I - (65) - F E E A N K
 K A R - (114) - -- Y I W E X R I - N L N M V L S A P T - (27) - G M T - -- - - V E G L K - Q F T A A Q S S R S V V N M A A D K I - (65) - E T F S E G
 K R G - (123) - -- A Q R E Y G H - N I T C E V L S A K S - (27) - G V P - -- - - P G R I L - S F I N T I G V T I S T I N I Q V V R F - (65) - S D F S E N

C74

Q I R - (111) - R F V E M P L E R N P D K R I S K R - (25) - S F S - -- M P D S K - E I E F I L K S E - A A A W W R V S A - (8) - K I F E M N G
 Q M R - (117) - F V E M L S E M R S A D K S R I S R H - (22) - G L F F I Q I A E S - E E L I T M E Z L - A E K E D P E N L S K - (8) - K I D R I L A
 E A L R - (102) - F V A I V M I N G D D G K K L S N H - (25) - S W S H - -- - - - D O E F T R E M - F K Y E L N A V S K - (8) - K A L R L H
 F K E F - (117) - P Q G E M T I V E S R K K L S K R D - (27) - G W S P V - -- - - E E E L L T K S Q - E I T D V N A L S K - (8) - K I K V V N
 F R E F - (118) - F O F A L T E I V N E Q R K K L S K R D - (27) - G W S P E - -- - - E E E S S K D L U - R I T D V S R L S K - (8) - E K T W S R N
 R E F - (119) - F R Q E F S R F - N L E V T V M G X N S - (27) - G Y T - -- - - A A S I K - E F C K R I G V T K D N I E M A S I - (65) - F E E A N K
 K A R - (114) - -- Y I W E X R I - N L N M V L S A P T - (27) - G M T - -- - - V E G L K - Q F T A A Q S S R S V V N M A A D K I - (65) - E T F S E G
 K R G - (123) - -- A Q R E Y G H - N I T C E V L S A K S - (27) - G V P - -- - - P G R I L - S F I N T I G V T I S T I N I Q V V R F - (65) - S D F S E N

KMSK

A72

K R E V I S E E R V A E R V K P F L R E A C S W E S E A Y L
 W H I E K E S E E F P A R V L A W A M D N E R I K E G L K L S
 H A N - A P P E Y A T H L - Q W H I E Q E N I D T R N G P Q
 Q V K K L D L D Q V E L T P L H L Q K G V G T L S R E
 Q Y I K K L D L D R I P E F A L P H L V P A G R P R D M S D E Q
 Q V K R I L G - K E A R E N A Y V I K E R V E D A G N I
 E M V T F I I G A T S T L C K - Y - -- - - T K M Q M P P Y - I A
 V D I K E F F R P T P N Q P V G I K V S H T V S I S L S H D E

C34

G36

GlURS (Tth)
 GlURS (Rme)
 GlURS (Eco)
 GlURS (Bsu)
 GlURS (Bst)
 GlURS (Eco)
 GlURS (Hum)
 GlURS (Sce)

G10

図2-13 class I GlURSサブファミリーのアミノ酸配列のホモロジー
 半数以上のARSで保存されたアミノ酸残基を濃い網掛けで、それに類似の
 アミノ酸残基をうすい網掛けで示してある。高度好熱菌GlURSで変異を導
 入した部位を▼で示した。各GlURSのアミノ酸配列は以下の文献による：
 E. coli, [Yamao et al., 1982]; human, [Thoennes et al., 1988]; S. cere-
 visiae, [Ludmerer & Schimmel, 1987].

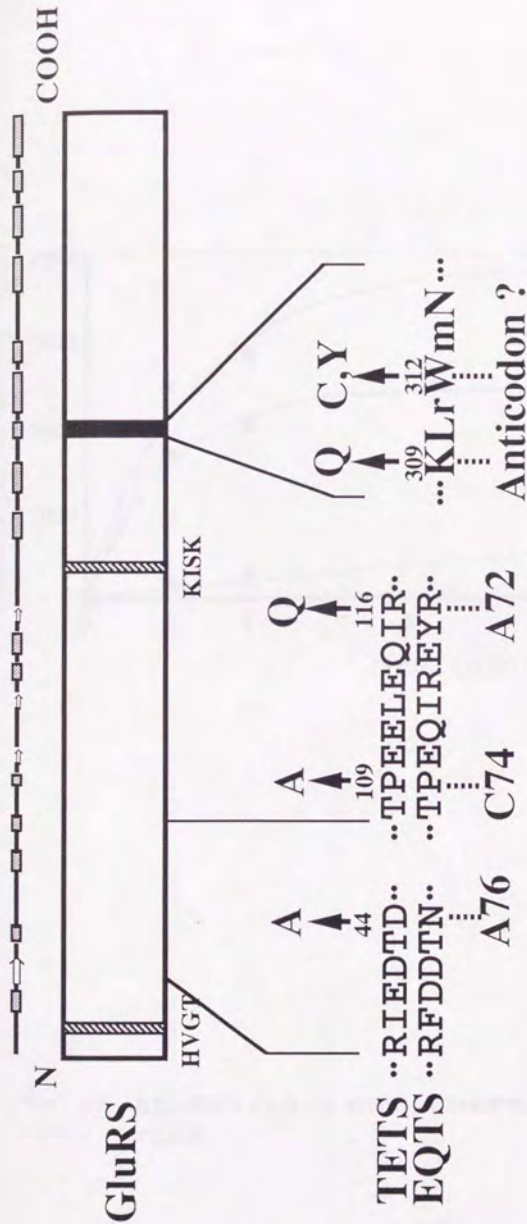


図2-14 高度好熱菌GluRSの部位特異的変異導入
 TETS, *T. thermophilus* GluRS; EQTS, *E. coli* GluRS. 図の上部に高度好熱菌GluRSの2次構造予測の結果(4.3.3)を模式的に示した. 高度好熱菌GluRSでtRNA^{Glu}のアンチコドンの認識に関わっていると考えられるアミノ酸配列(一番右)内でよく保存されているアミノ酸残基を大文字で表してある.

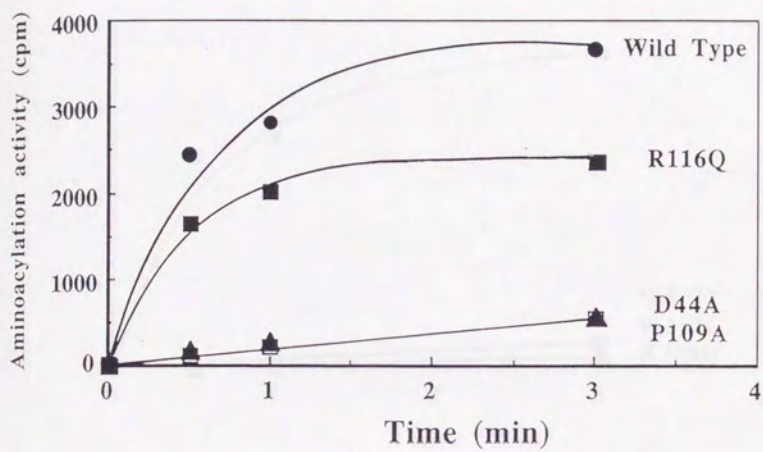


図2-15 高度好熱菌GluRSの Wild Type, D44A変異体, P109A変異体, R116Q変異体のアミノアシル化活性

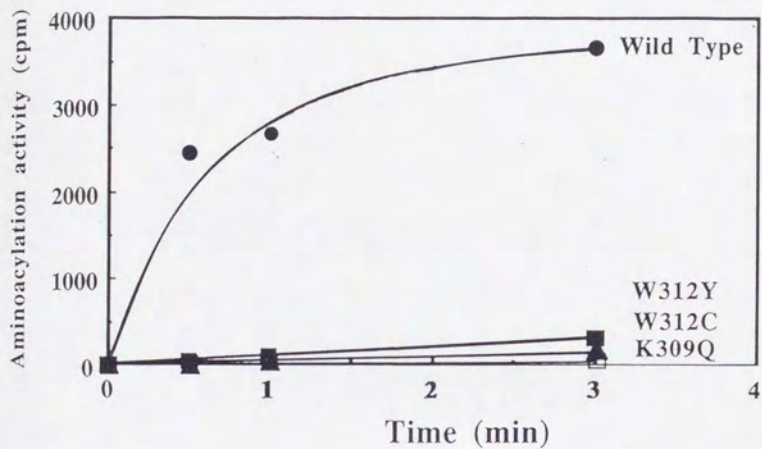


図2-16 高度好熱菌GluRSの Wild Type, K309Q変異体, W312Y変異体, W312C変異体のアミノアシル化活性