

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

20種類のアミノアシル tRNA 合成酵素のうちのいくつかは、 Zn^{2+} イオンを結合する金属タンパク質であることが知られている。すなわち、大腸菌、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* および高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の MetRS、大腸菌および高度好熱菌の IleRS、高度好熱菌の ValRS、ウシの TrpRS、大腸菌の AlaRS については、原子吸光を用いた解析により、分子内に強く結合した Zn^{2+} イオンが存在することがわかっている [Posorske et al., 1979; Mayaux & Blanquet, 1981; Kisselev et al., 1981; Mayaux et al., 1982; Kohda et al., 1984; Miller et al., 1991]。さらに、 Zn^{2+} イオンに対するキレート剤を用いた研究により、これらの Zn^{2+} イオンは酵素活性に必須であることが示唆されている。一方、最近のアミノ酸配列解析により、いくつかのARSは Zn^{2+} フィンガーに似た Cys および His 残基に富む配列をもつことが見いだされてきた (図3-1) [Miller et al., 1991; Berg et al., 1986; Herbert et al., 1988; Nureki et al., 1991]。しかし、これらの Zn^{2+} 結合モチーフを持つARSの大部分について、本当に Zn^{2+} イオンが結合しているのか、どんなアミノ酸残基にどのように結合しているのか、またその機能は何であるか、といった問題に対する解答はほとんど得られていない。

高度好熱菌の MetRS はホモダイマーとして存在し、1サブユニットあたり1個の酵素活性に必須な Zn^{2+} イオンを結合している [Kohda et al., 1984]。この MetRS の遺伝子をクローニングし、一次構造を決定したところ (第2章)、分子中に存在する3つ全ての Cys 残基 (Cys-127, Cys-130, Cys-144) は N 端のドメインに集まって存在し、His-147 と共に Zn^{2+} フィンガー様のモチーフを形成していることがわかった (図3-1) [Nureki et al., 1991]。大腸菌および酵母の MetRS にも、アミノ酸相同性は低いが、対応した位置に Zn^{2+} 結合モチーフが存在している (図3-1)。この高度好熱菌 MetRS の Zn^{2+} フィンガー様モチーフ中の1つの Cys 残基 (Cys-127) を Ser に置換したところ、アミノアシル化反応の k_{cat} が著しく低下した [Nureki et al., 1991]。一方、大腸菌の AlaRS の Cys および His 残基に富む領域 (Cys/His box) と同じ配列を持つ20残基程度のペプチドを合成したところ、このペプチドは Zn^{2+} および Co^{2+} イオンと結合しうることがわかった [Miller

et al., 1991]. さらに, この Cys/His boxは, tRNA^{A11}の特異的な認識に重要な役割を果たしていることが示唆されてきている [Miller et al., 1991; Miller & Schimmel, 1992].

本研究では, 高度好熱菌 MetRS の Zn²⁺フィンガー様モチーフについて, 変異体の反応速度論的解析を進めるとともに, Cys残基の化学修飾を用いて, このモチーフが実際に Zn²⁺イオンを結合していることを明らかにした. さらに, このCys残基の化学修飾法と反応速度論的解析を組み合わせることで, 図3-1に示した他のARSについても, そのZn²⁺結合モチーフの機能・構造相関について研究を行った.

3. 2. 材料と方法

3.2.1 試薬

monosodium p-(hydroxymercuri)-phenylsulfonate (PMPS), 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) は, それぞれSigma Chemical Co., 和光純薬 (大阪) から購入した. 化学修飾で用いるTris-HCl, NaClなどのStock solutionは, Chelex 100 (200-400mesh, Bio-Rad Laboratory) を通して, Zn²⁺イオンの混入を防いだ. 高度好熱菌 MetRS の部位特異的変異導入には, Muta-Gene™キット (Bio-Rad Laboratory) を用いた. ARSの活性測定に用いた L-[(methyl)-¹⁴C]Met (57 mci/mmol), L-[(U)-¹⁴C]Ile (315.5 mci/mmol), L-[(U)-¹⁴C]Thr (234 mci/mmol), L-[(U)-¹⁴C]Phe (513 mci/mmol), L-[(U)-¹⁴C]Arg (305 mci/mmol), L-[(U)-¹⁴C]Glu (265.7 mci/mmol), L-[(U)-¹⁴C]Asp (220 mci/mmol)はすべてAmershamより購入した.

3.2.2 高度好熱菌のARSの調製

高度好熱菌の野性型 MetRS は, 第1章で述べた方法により調製した. MetRS の変異体は, 第2章で述べた方法により作成し, 野性型と同じ方法で精製した. また, *metS* 遺伝子のLys-503に対応するAAGコドンを終止コドンTAGに置換することによって, 単量体型のMetRSを大量発現させ, 野性型の二量体の酵素と同様に精製した. 高度好熱菌のGluRSは第1章で述べた方法によって調製した. 高度好熱菌のIleRSは, 第2章で述べた方法により調製した.

3.2.3 大腸菌のARSの調製

大腸菌AspRSについては、D.Moras博士 (IBMC, CNRS, Strasbourg, France) より精製された標品をいただいた。大腸菌のIleRS, ThrRS, PheRS, ArgRSは、当研究室の河野博士によって、それぞれ *ileS*, *thrS*, *pheS*・*pheT*, *argS* 遺伝子の大量発現系を用いて培養を行い、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フィーを用いて精製されたものを用いた。なお、*ileS*遺伝子の大量発現系は水島博士 (現 東京大学応用微生物研究所教授) よりいただいた。また、*thrS*, *pheS*・*pheT*遺伝子の発現系は、M.Springer博士 (Institut de BiologiePhysicochimique, CNRS, Paris) よりいただいた。また*argS*遺伝子の大量発現系は、当研究室の坂本氏により構築された。

3.2.4 高度好熱菌および大腸菌のtRNAの調製

高度好熱菌の粗RNA画分は、当研究室の春木博士によりZubayの方法 [Zubay, 1962] によって調製された。大腸菌のtRNA^{Arg}, tRNA^{Phe}は当研究室の坂本氏、高井氏により、第1章でtRNA^{Met}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Ile}の精製について述べた (1.2.2) のと同様の方法によって、大腸菌粗RNA画分から精製された。

3.2.5 ARSのCys残基の化学修飾と遊離したZn²⁺イオンの検出

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M NaCl, 5% glycerolを含む0.1mlの反応液中で、ARS (2-8 μM) に、4-256 μMのPMPS (Cysに特異的な修飾剤) を加え、25°Cで3時間反応を行う。これによりARSのCys残基がHg²⁺によって修飾され、生成したmercaptide bondは250nmに吸収を持つので、A₂₅₀を測定することにより化学修飾の度を定量することができる (図3-2)。また、あらかじめ反応液に0.12 mMのPARを入れて化学修飾を行うことにより、遊離したZn²⁺イオンがZn²⁺・PAR₂複合体を形成し、これは500nmに吸収を持つためA₅₀₀を測定することで遊離したZn²⁺イオンを定量することができる (図3-2)。吸光度の測定に関しては、PMPSの濃度が0μMの時の値を0に設定し、以後の測定値はこれに対する差の吸光度としてΔA₂₅₀, ΔA₅₀₀として表した (図3-3~12)。なお実験方法の詳細は、aspartate transcarbamylase [Hunt et al., 1984] およびTFIIIA [Shang et al., 1989] に

ついて以前に行われた研究に従った。

3.2.6 アミノアシル化反応の活性測定

野性型および変異体のMetRSの反応速度定数は、第2章で述べた方法により測定した。化学修飾したARSのアミノアシル化反応の初速度は、以下の方法により測定した。様々な濃度のPMPSにより10 μ lの体積で化学修飾を行い(3.2.4)，うち1.25 μ lを用いて50 μ lのスケールでアミノアシル化反応を行い，30秒後，1分後に24 μ lずつ取り出して 14 Cの放射活性を測定し，反応の初速度を求めた。アミノアシル化反応は，高度好熱菌のIleRSについては，100 mM Tris-HCl (pH 8.0, 65°C)，5 mM Mg(CH₃COO)₂，10 mM KCl，2 mM ATP，0.2 μ M IleRS，300 μ M 14 C-Ile，2.4 mg/ml (約100 μ M) 高度好熱菌粗分画tRNA，の組成にて65°Cで行った。高度好熱菌GluRSについては，Trisが反応を阻害するため，上記の組成のうち緩衝液を100 mM HEPESに換えて反応を行った。大腸菌のIleRS，PheRS，ArgRS，AspRSについては，100 mM Tris-HCl (pH 7.5)，5 mM MgCl₂，10 mM KCl，2 mM ATP，0.2 μ M ARS，300 μ M 14 C標識アミノ酸および10 μ M tRNA (それぞれのARSに特異的なもの)の組成で反応を行った。大腸菌のThrRSについては，大腸菌の粗分画tRNA (200 μ M)を用いて反応を行った。また，化学修飾した大腸菌のIleRS，ThrRSの反応速度定数の測定は以下の通りに行った。すなわち，0および64 μ MのPMPSで化学修飾したARSを0.8 μ M用いて反応を行い，基質濃度はアミノ酸 100 μ M，tRNA 10 μ M，ATP 2 mMを基準値とし，それぞれ10-100 μ M，0.5-5 μ M，0.5-2 mMの範囲で濃度を振った。

3.3. 結果と考察

3.3.1 高度好熱菌MetRSの化学修飾とZn²⁺イオンの遊離

高度好熱菌のMetRS (4 μM) のCys残基をPMPSで化学修飾したところ、PMPSの濃度に比例してA₂₅₀が増加し、PMPSの濃度が32 μMになったところで飽和した(図3-3, ▲)。このことは、MetRSの6つ(1サブユニットあたり3つ)のCys残基すべてが修飾されたことを意味している。さらにこの時、PMPSの濃度に比例してA₃₀₀が直線的に増加し、やはり32 μMになったところで飽和した(図3-3, ●)。このことから、MetRSの3つのCys残基(Cys-127, Cys-130, Cys-144)を化学修飾することによって、Zn²⁺イオンが遊離したことがわかる。これらA₂₅₀とA₃₀₀の増加は、いずれも直線的でお互によく相関していた(図3-3)。したがって、MetRSの3つのCys残基すべてが、協同的にZn²⁺イオンの結合に関わっていると考えられる。Zn²⁺-PAR₂複合体のモル吸光係数(ε₃₀₀=6.6×10⁴ M⁻¹cm⁻¹)を用いて計算すると、二量体のMetRS 1分子あたり2個のZn²⁺イオンが結合していたことになり、当研究室で以前行われた原子吸光を用いた測定の結果[Kohda et al., 1984]とよく一致する。

3.2.2の方法で調製した単量体型のMetRSは、野性型の二量体と同程度にアミノアシル化の活性を持っていた。このことは、二量体のMetRSをトリプシンで限定分解することにより得られた単量体のフラグメント(ドメインT1-T2)が十分なアミノアシル化活性を持っていたこと[Kohda et al., 1987]とよく対応する。この単量体型のMetRSを化学修飾したところ、3.1当量のPMPSによって1分子あたり1個のZn²⁺イオンが遊離してきた(図3-3, ○)。このことは、3つのCys残基すべてがこの単量体型のMetRS分子に含まれていることとよく対応する。さらに本研究室では、1,10-phenanthrolineを用いた解析を行ない、Zn²⁺イオンがMetRSのN末端のドメインに存在することをすでに確かめている[Kohda et al., 1987]。これらの結果から、高度好熱菌のMetRSのN末端ドメインに存在するZn²⁺フィンガー様のモチーフは、Zn²⁺イオンの結合に関わっていることが示唆される。

3.3.2 MetRS変異体の化学修飾を用いた解析

そこで、この高度好熱菌MetRSのZn²⁺フィンガー様モチーフ中に存在するCys-127, Cys-130, His-147をそれぞれSer, Ser, Cysに置換した変異体(C127S, C130S, H147C)を

作成した(図3-1)。Cys-144にも変異を導入することを試みたが、metS遺伝子上でこのアミノ酸残基に対応するDNA配列が安定な二次構造を作り得るものであったためか、変異体を得ることができなかった。これらの変異体MetRSは、野生型のMetRSと同様に熱安定であり、70°C30分の熱処理にも耐えた。このことから、これら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ていないと考えられる。これらの変異体MetRSについて、PMPSおよびPARを用いた化学修飾を行なった。するとC127S変異体では、Cys残基を化学修飾してもZn²⁺イオンは遊離して来なかった(図3-4, Δ)。このことは、C127S変異体にはZn²⁺イオンが結合していないことを示唆している。すなわち、Cys-127側鎖のスルフヒドリル基はZn²⁺イオンの結合に必須であると考えられる。

これに対し、C130S変異体(▲)、H147C変異体(■)では、Cys残基の修飾に伴ってA₅₀₀が増加し、これはA₂₅₀の増加とよく対応していた(図3-4)。したがって、C130SおよびH147C変異体は依然としてCys残基でZn²⁺イオンを結合していると考えられる。すべてのZn²⁺イオンを遊離させるのに要するPMPSの量は、C130S変異体、野生型MetRS、H147C変異体の順に3.3、6.7、9.2当量であり、それぞれ1分子あたりに含まれるCys残基の数(それぞれ4個、6個、8個)とほぼ一致している(図3-4)。しかし、これらの変異体から遊離してくるZn²⁺イオンの量は、野生型のMetRSに比べて減少していた(図3-4)。C130S変異体、H147C変異体は、それぞれ1サブユニットあたり平均0.75個、0.6個のZn²⁺イオンを結合していた(表3-1)。このことは、Cys-130、His-147に変異を導入することで、MetRSのZn²⁺イオンに対する親和性が落ちたことを示唆している(結合していたZn²⁺イオンは精製過程で取れてしまったものと考えられる)。したがって、Cys-127のみならず、Cys-130やHis-147もZn²⁺イオンの結合に関わっていると考えられる。また、Cys-144もおそらくZn²⁺イオンの結合に関わっていると考えられる。

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

C127S、C130S、H147C変異体のアミノアシル化反応の反応速度定数を測定した結果を表3-2に示す。まず、C127S変異体では、L-メチオニン、ATP、tRNA^{Met}に対するK_mが3-4倍に上がっていたが、それ以上にk_{cat}が1/300まで落ち込んでいた(表3-2)。この活性の低下は、Cys-127の変異によりZn²⁺イオンが遊離してしまったこと(3.3.2)によると考えられる。C130S変異体では、k_{cat}はC127Sほど低下していなかったが、L-メチオニン、

tRNA^{Met}に対する K_m が著しく上昇していた(約8倍)(表3-2)。C130S変異体は、依然としてZn²⁺イオンを結合していたことから(3.3.2)、この活性の低下はZn²⁺イオンが離脱したことによるものではなく、Zn²⁺フィンガー様モチーフが形成していたメチオニンおよびtRNA^{Met}の結合部位のコンフォメーションが、この変異の導入によって変わってしまったからであると考えられる。さらに、H147C、H147S変異体では、H147C変異体が依然としてある程度のZn²⁺イオンを結合していたにもかかわらず、 k_{cat} が1/5,000に低下し、ほぼ完全に失活してしまった(表3-2)。このことから、His-147はアミノアシル化の触媒活性自身に関わっている可能性も考えられる。以上より、Zn²⁺フィンガー様モチーフへの変異の導入は、アミノアシル化の k_{cat} を低下させ、メチオニンやtRNA^{Met}に対する K_m を上昇させたが、ATPに対する K_m にはほとんど影響を及ぼさなかった。このことから、高度好熱菌MetRSのZn²⁺フィンガー様モチーフは、ATPの結合には関与せずtRNAにアミノ酸を結合する過程の重要なステップに寄与していると考えられる。

3.3.4 Zn²⁺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

さらに、このMetRSのZn²⁺フィンガー様モチーフのすぐC端側には、Arg153-Arg154-Lys155なる塩基性アミノ酸のクラスターが存在する(図3-1)。TFIIIAのZn²⁺フィンガーのC端側にも塩基性アミノ酸のクラスターが存在し、DNAとの結合に寄与していた[Miller et al., 1985]ことから、このMetRSの塩基性アミノ酸のクラスターもなんらかの活性に寄与していると考えられる。そこで、このArg153-Arg154-Lys155をコードしているd(AGGCGGAAG)という塩基配列をd(GAGGCGGAA)という塩基配列に置換し、Glu-Ala-Gluという酸性アミノ酸のクラスターに変換した変異体を作成した(図3-1)。この¹⁵³RRK/EAE変異体の反応速度定数を求めたところ、 k_{cat} が1/55と大きく低下し、メチオニンに対する K_m が26倍と著しく上昇したにもかかわらず、tRNA^{Met}とATPに対する K_m は影響を受けなかった(表3-2)。したがって、この塩基性アミノ酸クラスターもZn²⁺フィンガー様モチーフと同様に、メチオニンをtRNAに結合させるステップで重要な役割を果たしていると考えられる。

3.3.5 MetRSのZn²⁺フィンガー様モチーフの機能・構造相関

以上の結果より、高度好熱菌MetRSのZn²⁺フィンガー様モチーフはメチオニンやtRNAなどの基質の認識や酵素の触媒活性に重要な役割を果たし、特にこのモチーフ中

のCys-127は Zn^{2+} イオンの配位に直接関わり、His-147は触媒活性自体に関わっていることが示唆された。一般に Zn^{2+} イオンが触媒活性自体に関わっている酵素では、 Zn^{2+} イオンは3つのCysおよびHis残基と1つの活性化された H_2O 分子によって配位されていることが知られており [Vallee & Auld, 1990]、高度好熱菌のMetRSでもこれと似た Zn^{2+} イオンの結合様式を取っている可能性がある。したがって、MetRSの Zn^{2+} フィンガー様モチーフは、 Zn^{2+} イオンが4つのCysおよびHis残基によって配位されている典型的な Zn^{2+} フィンガーとは異なるコンフォメーションをとっているのかもしれない。本研究により、高度好熱菌MetRSの Zn^{2+} フィンガー様モチーフは、ATPの結合ではなく、アミノ酸やtRNAの認識およびそれらの間の反応の触媒に関わっていることが明らかになった。この結果は大腸菌MetRSの Zn^{2+} 結合モチーフ (図3-1) 中のLys残基が $tRNA^{Met}$ のCCA末端のcytidine残基にクロスリンクした、という最近の報告 [Hountondji et al., 1990] とよく一致する。また、この Zn^{2+} 結合モチーフ中のCys-158はメチオニンの活性化に寄与していることが明らかになっており [Starzyk et al., 1989]、この報告も高度好熱菌のMetRSで得られた本研究の結果とよく対応する。

本論分の序でも述べたように、最近、ATP結合に関わる特徴的なモチーフの違いに基づいて、20種のARSが大きく2つのグループに分類された [Eriani et al., 1990]。MetRSが含まれるclass IのARSでは、特徴的なHIGH (His-Ile-Gly-His) 配列、KMSK (Lys-Met-Ser-Lys) 配列を中心に Rossmann foldが形成され、このATP結合構造の中に「connective polypeptide I」(CP-I) と呼ばれる領域が挿入されている (2.3.4)。興味深いことに、MetRSの Zn^{2+} 結合モチーフはこのCP-I領域に存在している (図2-8)。大腸菌のGlnRSと $tRNA^{Gln}$ の複合体のX線結晶解析から、この酵素のCP-I領域はtRNAのアクセプターステムと結合していることが明らかになった [Rould et al., 1989]、したがって、class IのARSのCP-I領域は、すべてのARSに共通な基質であるATPの結合に関わるのではなく、むしろARSごとに異なるアミノ酸やtRNAの認識およびそれらの触媒活性といった、アミノ酸特異的な機能に寄与していると考えられる。このことは、高度好熱菌MetRSの Zn^{2+} フィンガー様モチーフがメチオニンと $tRNA^{Met}$ の結合に関わっており、ATPの結合には関与していない、という本研究の結果とよく一致している。

3.3.6 アミノアシル tRNA 合成酵素の Zn^{2+} 結合モチーフ

図3-1に示すように、高度好熱菌の MetRS のみならずいろいろな ARS は Cys, His 残基に富むアミノ酸配列を持っており、これらは金属イオンの結合に関わっていると考えられる(各 ARS のアミノ酸配列は以下の文献による):

T. thermophilus MetRS, [Nureki et al., 1991]; *E. coli* MetRS, [Dardel et al., 1984]; *S. cerevisiae* MetRS, [Fasiolo et al., 1985]; *E. coli* CysRS, [Hou et al., 1991; Avalos et al., 1991]; *E. coli* IleRS, [Webster et al., 1984]; *S. cerevisiae* mitochondrial LeuRS, [Tzagoloff et al., 1988]; *S. douglassi* mitochondrial LeuRS, [Herbert et al., 1988]; Human ValRS, [Hsieh & Campbell, 1991]; *E. coli* GluRS, [Breton et al., 1986]; *S. cerevisiae* GlnRS, [Ludmerer & Schimmel, 1987]; Human GlnRS, [Fett & Knippers, 1991]; *E. coli* ArgRS, [Eriani et al., 1989]; *E. coli* TrpRS, [Hall et al., 1982]; *B. stearothermophilus* TrpRS, [Barstow et al., 1986]; *E. coli* ThrRS, [Mayaux et al., 1983]; *S. cerevisiae* ThrRS, [Pape & Tzagoloff, 1985]; Human ThrRS, [Curzen & Arfin, 1991]; *S. cerevisiae* mitochondrial AspRS, [Gampel & Tzagoloff, 1989]; *E. coli* PheRS, [Mechulam et al., 1985]; *E. coli* AlaRS, [Putney et al., 1981]; *Bombyx mori* AlaRS, [Chang & Dignam, 1990]) .

興味深いことに、この Zn^{2+} 結合モチーフを有するか否かに基づく ARS のグループ分けは、ATP 結合モチーフの違いに基づくグループ分け (class I, class II) (序章) と一致していない。また、図3-1に示した ARS の Zn^{2+} 結合モチーフでは、モチーフの長さや Zn^{2+} に配位していると考えられるアミノ酸残基の種類、その配位子の間のアミノ酸配列が様々に異なっている。したがって、これらの ARS の Zn^{2+} 結合モチーフが本当に Zn^{2+} イオンを結合しているのか、その機能は何なのかを調べることは非常に興味深いことと考えられる。そこで、図3-1に示した ARS のうちいくつかについて、PMPS によって Cys 残基を化学修飾し、PAR によって Zn^{2+} が遊離するかどうかを解析することにした。

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

図3-5に示す通り、大腸菌の IleRS (15個の Cys 残基を持つ) の化学修飾の実験では A_{280} の増加と相関して A_{300} の増加が見られた。これらの増加は、15個の Cys 残基すべてを修飾する PMPS の濃度 (60 μ M) において飽和した。 Zn^{2+} -PAR₂ のモル吸光係数を用いることにより、大腸菌 IleRS は、1分子あたり2個の Zn^{2+} イオンを Cys 残基によって結合し

ていることが明らかになった。図3-5で、 ΔA_{500} の曲線はシグモイド状であり、高度好熱菌MetRSのグラフとは異なっている。これは、化学修飾されるCys残基のうち一部の残基のみが Zn^{2+} イオンの結合に関与しているからであると考えられる。従って、 ΔA_{500} 曲線の最大傾斜から、 Zn^{2+} イオンの結合に関与しているCys残基は約6つであると見積ることができた。この結果は、大腸菌のIleRSがN端のドメインにHis-His-Cys-CysおよびC端のドメインにCys-Cys-Cys-Cysという2つの Zn^{2+} 結合モチーフを持つこと(図3-1)とよく対応している。さらに、IleRSをいろいろな濃度のPMPSで修飾した後に、アミノアシル化反応の活性(初速度)を測定してみた。すると、 Zn^{2+} イオンの遊離と対応してアミノアシル化の活性は急激に低下し、2つの Zn^{2+} イオンのうち1つが失われたところではほぼ失活してしまった(図3-5)。そこで、 Zn^{2+} イオンの遊離がアミノアシル化反応のどのステップに効いているのかを調べるため、 $0\mu M$ 、 $64\mu M$ のPMPSで処理したIleRSについて、3種類の基質に対する K_m と k_{cat} を測定した(表3-3)。すると、イソロイシン(3倍)とtRNA^{11*}(20倍以上)の K_m が上昇していたうえに、 k_{cat} も1/73に落ちていた。このことからIleRSの Zn^{2+} イオン(Zn^{2+} 結合モチーフ)も、MetRSと同様にアミノ酸やtRNAの結合と触媒活性に寄与していると考えられる。

高度好熱菌*T. thermophilus* HB8のIleRSの化学修飾の結果から、このIleRSもCys残基に結合した2つの Zn^{2+} イオンを持つことがわかった(図3-6)。また Zn^{2+} イオンの遊離に伴って、アミノアシル化の活性はやはり著しく低下した(図3-6)。高度好熱菌のIleRSにも2つの Zn^{2+} 結合モチーフが存在しており、このうちの1つは大腸菌IleRSのN端側のモチーフにほぼ対応している(図2-8)。したがって、大腸菌および高度好熱菌のIleRSのそれぞれ2つの Zn^{2+} 結合モチーフは、 Zn^{2+} イオンを結合しており、少なくともその1つはIleRSの活性に必須であると結論される。原子吸光を用いた以前の解析からは、大腸菌のIleRSは1つ以上[Mayaux & Blanquet, 1981]、高度好熱菌のIleRSは2個の Zn^{2+} イオン[Kohda et al., 1984]を結合していることが報告されており、本研究の結果とよく一致する。特に、大腸菌のIleRSについては、 Zn^{2+} イオンの数は1個ではなく、2個であることが本研究によりはつきりした。

IleRSはclass IのARSであり、大腸菌および高度好熱菌のIleRSで共通していたN端側の Zn^{2+} 結合モチーフは、やはりCP-I領域に存在する(図2-8)。先の反応速度定数の解析の結果からも示唆されたように、このN端側の Zn^{2+} 結合モチーフは、MetRSのモチーフと同様に、アミノ酸やtRNAの認識およびその触媒といった、アミノ酸

特異的な機能に関与していると考えられる。以前の大腸菌 IleRS の deletion mutant を用いた解析から、CP-I領域内のZn²⁺結合モチーフ周辺の100アミノ酸残基を欠失すると活性が大きく低下することが報告されており [Starzyk et al., 1987]、本研究での結果とよく対応する。大腸菌 IleRS の2番目 (C端側) のZn²⁺結合モチーフは、きわめてC端に近い部位 (C端から37残基目まで) に存在し、他の生物由来の IleRS では保存されていない。最近大腸菌の AlaRS において、そのZn²⁺結合モチーフが tRNA^{Ala} のアイデンティティー決定因子である G3-U70 の認識に関わっていることが示唆されている [Miller et al., 1991; Miller & Schimmel., 1992]。したがって、大腸菌の IleRS でも、C端側のZn²⁺結合モチーフは大腸菌 tRNA^{Ala} に特異的なアイデンティティー決定因子の認識にたずさわっている可能性が考えられる。本研究でもC端側のZn²⁺結合モチーフ中のCys-902, Cys-905をAlaに置換することを試みたが、変異体が不安定なためか、発現させることができなかった。しかし、興味深いことに、*Tetrahymena thermophila* の IleRS では、このC端側のZn²⁺結合モチーフに対応するあたりに、Leuジッパーに似た配列が存在しており [Csank et al., 1992]、これら2つのモチーフは tRNA の結合などの共通した機能をもつと考えられる。

3.3.8 大腸菌 ThrRS のZn²⁺結合モチーフの機能・構造相関

大腸菌の ThrRS はホモダイマーとして存在し、1サブユニットあたり13個のCys残基を含んでいる。大腸菌の ThrRS についてPMPSによるCys残基の化学修飾をおこなったところ、1分子あたり2個 (1サブユニットあたり1個) のZn²⁺イオンが遊離してきた (図3-7)。ΔA₅₀₀の増加曲線は IleRS の場合と同様にジグモイド状であり、13個のCys残基のうち2ないし3残基がZn²⁺イオンの結合に関与していると考えられる。このZn²⁺イオンの離脱に伴い、アミノアシル化の活性は著しく低下した (図3-7)。0μMと64μMのPMPSで処理した ThrRS の反応速度定数を測定したところ (表3-3)、(64μMのPMPSでは、全てのCys残基が修飾されていないので傾向しかわからないが) tRNA^{Thr} に対するK_mが上昇し、k_{cat}が低下する傾向が見られた。大腸菌の ThrRS には His-Xe-Cys-Xe-His-Xe-Cys という構成のZn²⁺結合モチーフが存在しており (図3-1)、したがってこのモチーフは1個のZn²⁺イオンを結合し、MetRSやIleRSのZn²⁺結合モチーフと同様に、アミノ酸特異的なアミノアシル化反応のステップに寄与していると考えられる。酵母やヒトの ThrRS にも、対応する領域にZn²⁺結合モチーフが存在しており (

図3-1), これらの領域はThrRSの活性に必須であると考えられる。

ThrRSは, class IIに属するARSである。class IIのARSに共通なATP結合のモチーフはC端側のドメインに存在し(図1), 一方本研究で同定されたZn²⁺結合モチーフはN端側のドメインに存在している。したがってThrRSのZn²⁺結合モチーフは, ATPの結合ではなく, AlaRSの場合と同様にtRNAとの相互作用に関わっていると考えられる。現に, 上の反応速度論的解析の結果はこの考えを支持している。以上の結果は, class IのMetRSやIleRSとclass IIのThrRSで, きわめて類似した基質認識および酵素触媒の機構が存在することを意味しており, このZn²⁺結合モチーフの持つメカニズムは, ATP結合様式に基づくARSの分類とは独立したものであると考えられることができる。

3.3.9 大腸菌PheRSのZn²⁺結合モチーフの機能・構造相関

大腸菌のPheRSは, $\alpha_2\beta_2$ のサブユニット構造を持ち, 1分子あたり26個のCys残基を持つ。PMPSを用いた化学修飾によって, わずかなZn²⁺イオンの遊離(1分子あたり0.3個程度)が検出された(図3-8)。このことは, PheRSがCys残基に弱く結合したZn²⁺イオンを持っていることを意味している(したがって, 大半のZn²⁺イオンは精製過程で取れてしまったと考えられる)。以前の蛍光を用いた解析[Mayaux & Blanquet, 1981]で, 大腸菌のPheRSは1分子あたり8個のZn²⁺イオンを弱く結合し得ることがわかっており, 本研究の結果とよく対応する。大腸菌のPheRSの α サブユニットのN端には長いZn²⁺結合モチーフが存在し(図3-1), Zn²⁺イオンの1つはこのモチーフに結合する可能性がある。また, このZn²⁺イオンの離脱によって, アミノアシル化の活性はほとんど影響を受けなかった(図3-8)。さらにPMPSを過剰に加えると, 活性は急激に低下した(図3-8)。これは, あるCys残基が化学修飾されたことによりこの4量体の酵素の(4次)構造が大きく変わってしまったからであると考えられる。以上より, すでに指摘されているように[Plateau et al, 1981], PheRSに結合しているZn²⁺イオンはアミノアシル化反応に関わるのではなく, Ap₄A合成など他の機能に関与していると考えられる。

3.3.10 大腸菌ArgRSの化学修飾

大腸菌ArgRS(1分子あたり3つのCys残基を持つ)のCys残基を化学修飾したところ, Zn²⁺イオンの遊離は見られなかった(図3-9)。しかし, PMPSの濃度を上げていくと

アミノアシル化の活性がゆるやかに低下した(図3-9)。ただしこの活性の低下は、PMPSによるmercaptide bondの形成とは相関がなかった。すなわち、アミノアシル化の活性に関与する(Cys以外の)なんらかのアミノ酸残基(His残基など)が分子表面に露出していて、PMPSの攻撃を受けたものと考えられる。以上の結果は、大腸菌ArgRSには明瞭な Zn^{2+} 結合モチーフが存在しないこととよく対応する。図3-1にHis-X₂-Cys-X₁-His-Cysという配列を示してあるが、この配列中の連続したHis, Cys残基では Zn^{2+} イオンを結合できないと考えられるからである。

3.3.11 高度好熱菌GluRSおよび大腸菌AspRSの化学修飾

高度好熱菌GluRS(1分子あたり1個のCys残基を持つ)(図3-10)および大腸菌AspRS(1分子あたり6個のCys残基を持つ)(図3-11)の化学修飾では、 Zn^{2+} イオンの遊離は検出されなかった。したがって、これらのARSは、Cys残基に結合する Zn^{2+} イオンを持っていないと考えられる。このことは、これらのARSには Zn^{2+} 結合モチーフが存在しないこと(図3-1)とよく対応する。また、高度好熱菌のGluRSや大腸菌のAspRSのアミノアシル化の活性は、Cys残基の修飾によって全く影響を受けなかった(図3-10,11)。これらの結果は、これまでの解析結果に対する良いnegative controlとなっている。一方、大腸菌のGluRSでは、1分子あたり1個の Zn^{2+} イオンを結合していることが原子吸光を用いた測定により明らかになっており、実際に化学修飾を行ったところ、確かに1個の Zn^{2+} イオンが遊離してくることが確かめられた(図3-12)。

3.3.12 結論

本研究では、Cys残基の化学修飾を用いた解析により、アミノアシルtRNA合成酵素の Zn^{2+} イオン結合に関する機能・構造相関を明らかにすることができた。すなわち、図3-1に示されるような Zn^{2+} イオン結合モチーフを持つ酵素は、確かにCys残基で Zn^{2+} イオンを結合していた。また、これらの Zn^{2+} イオンの離脱により、これらのARSのアミノアシル化活性は著しく低下（特に、アミノ酸とtRNAの K_m が上昇し、 k_{cat} が低下）した。したがって、「CysやHis残基による Zn^{2+} イオンの結合がアミノアシル化活性に必須な役割を果たす」という性質は、あるサブセットのARSには一般化され得ることであると考えられる。

また、この Zn^{2+} 結合モチーフの機能・構造相関は、class IのARSにもclass IIのARSにも共通して見られた。class Iに属するMetRSやIleRSでは、 Zn^{2+} 結合モチーフはCP-I領域に存在し、それぞれに特異的なアミノ酸およびtRNAの認識やそれらの間の触媒過程に寄与していた。また、class IIに属するThrRSでは、tRNAとの相互作用に働いていることが示唆された。したがって、 Zn^{2+} イオンが介在するアミノアシル化のメカニズムは、ATP結合モチーフに基づくARSのクラス分けとは明らかに独立なものであることがわかる。このことは、この Zn^{2+} 結合構造がそれぞれのARSの特異性を発揮するように、ATP結合構造とは独立に進化してきたものであることを暗示している。ARSの分子進化とこの Zn^{2+} 結合モチーフの関連については、第5章総合討論でさらに深く議論する。

	X^a [(ΔA_{500}) _{max}]	Y^b [(ΔA_{250}) _{max} /N(Cys)]	X/Y^c (relative)
Wild-type	0.28	0.020	1
C127S mutant	0	0.020	0
C130S mutant	0.22	0.022	0.75
H147C mutant	0.18	0.020	0.60

表3-1 高度好熱菌MetRS変異体の化学修飾の効果

^a, ΔA_{500} のプラットーの値 (図3-4) ; ^b, ΔA_{250} のプラットーの値をCys残基の数で割った値 ; ^c, MetRS変異体の1サブユニットあたりから遊離するZn²⁺イオンの数に相当,

	K_m			k_{cat} S ⁻¹
	L-methionine μ M	ATP mM	rRNA ^{Met} μ M	
Wild-type	18	0.18 ^a , 1.5	1.4	17
C127S mutant	56	5.0	5.6	0.047
C130S mutant	143	3.3	10.9	2.1
H147C mutant	- ^b	- ^b	- ^b	$<8.0 \times 10^{-4}$
H147S mutant	- ^b	- ^b	- ^b	$<7.2 \times 10^{-4}$
RRK/EAE mutant	471	3.3	1.9	0.31

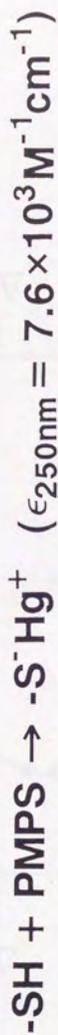
表3-2 高度好熱菌MetRS変異体の反応速度定数

^a, 野生型のMetRSでは, ATPの濃度範囲を広くとることによって, 2つの K_m の値が求まる [Kohda et al., 1987].
^b, これらの変異体は活性が低く, K_m を求めることができなかった.

	K_m			k_{cat} S ⁻¹
	amino acid μM	ATP mM	tRNA μM	
IleRS	10.3	1.1	5.4	0.51
Chemically-modified IleRS	35.7	-	100	0.007
ThrRS	23	4.2	(107)*	1.1
Chemically-modified ThrRS	21	4.0	(222)*	0.46

表3-3 化学修飾した大腸菌IleRS, ThrRSのアミノアシル化の反応速度定数
各4 μM のARSを64 μM のPPPSで化学修飾した。-, 測定していないことを示す。*, 粗分画のtRNAを用いて測定を行なった。

PMPS: p-(hydroxymercuri)benzenesulfonate



PAR: 4-(2-pyridylazo)resorcinol

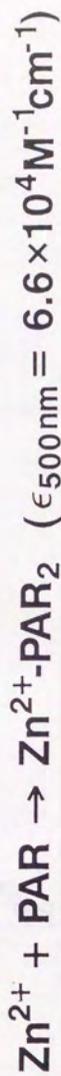


図3-2 PMPSによるCys残基の化学修飾と遊離した Zn^{2+} イオンの検出

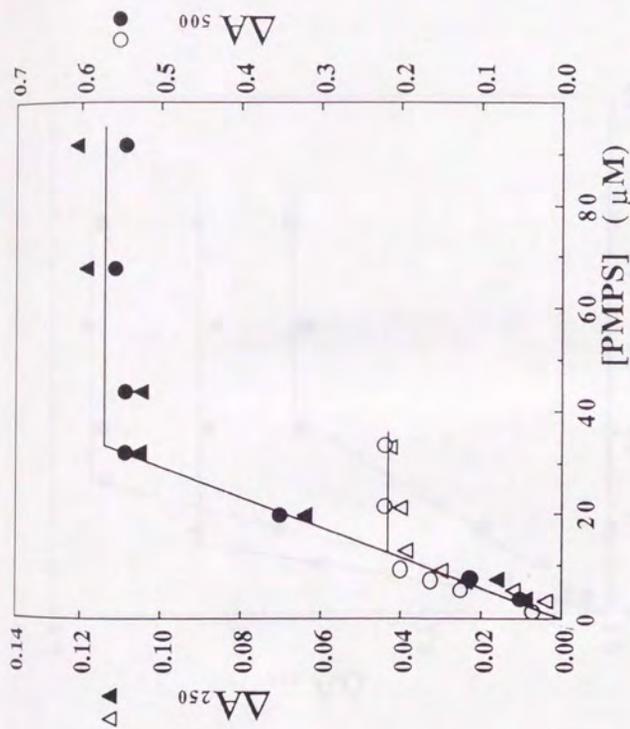


図3-3 高度好熱菌MetRSの化学修飾
 高度好熱菌MetRS (二量体) (●, ▲) および単量体型MetRS (○, △) (いずれも4.8 μM) をいろいろな濃度のPMPSで修飾し, mercaptide bondの生成量は ΔA_{500} (▲, △) を測定することにより, 遊離した Zn^{2+} イオンの量は ΔA_{250} (●, ○) を測定することにより定量を行なった。

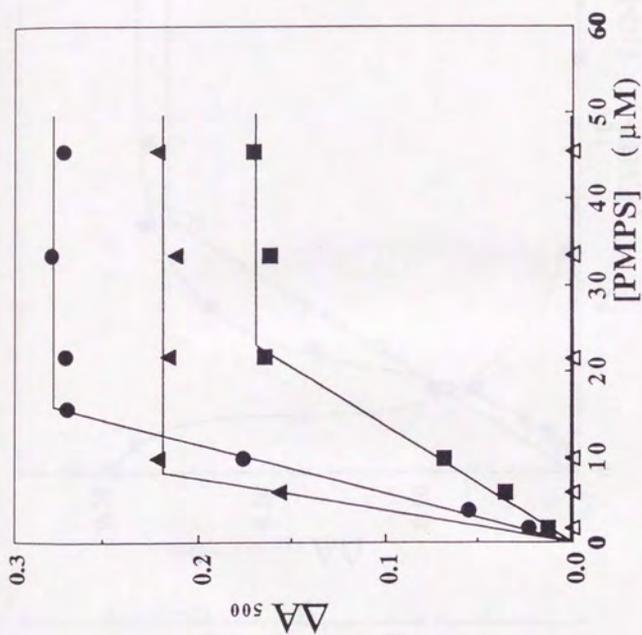


図3-4 高度好熱菌MetRS変異体の化学修飾
 各MetRS変異体の濃度は2.4 μMに台わせてある。●, 野生型; △, C127S変異体; ▲, C130S変異体; ■, H147C変異体。

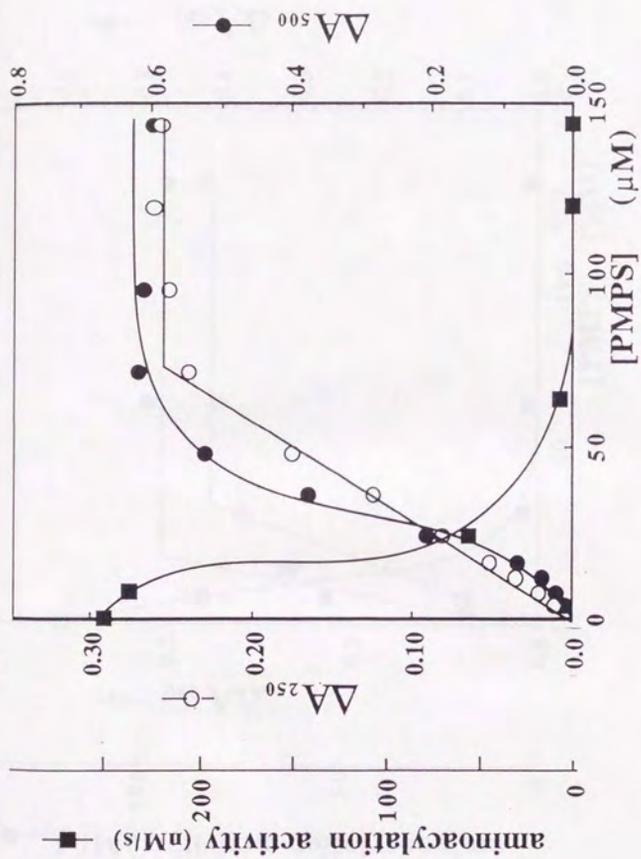


図3-5 大腸菌IleRSの化学修飾
IleRSの濃度は4 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

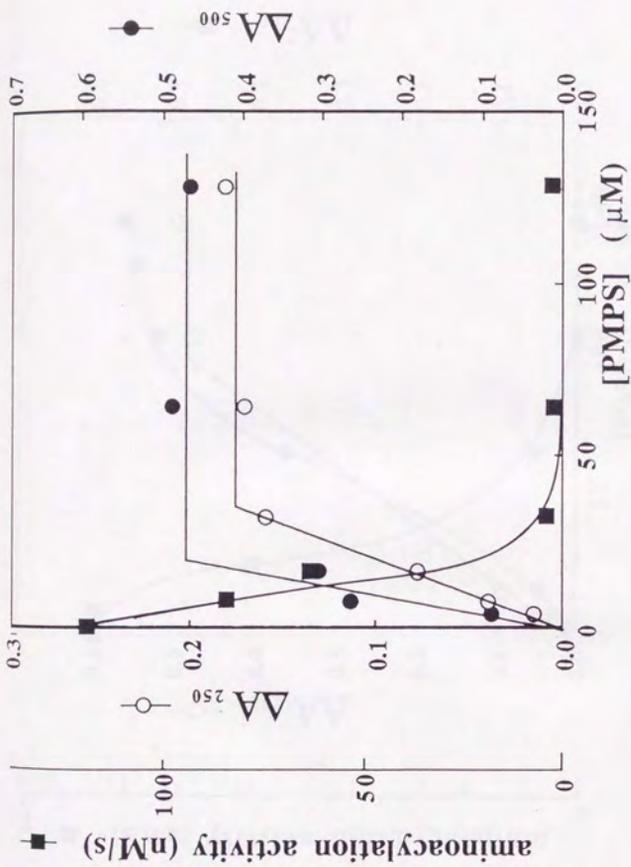


図3-6 高度好熱菌 IleRS の化学修飾
IleRS の濃度は 4 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

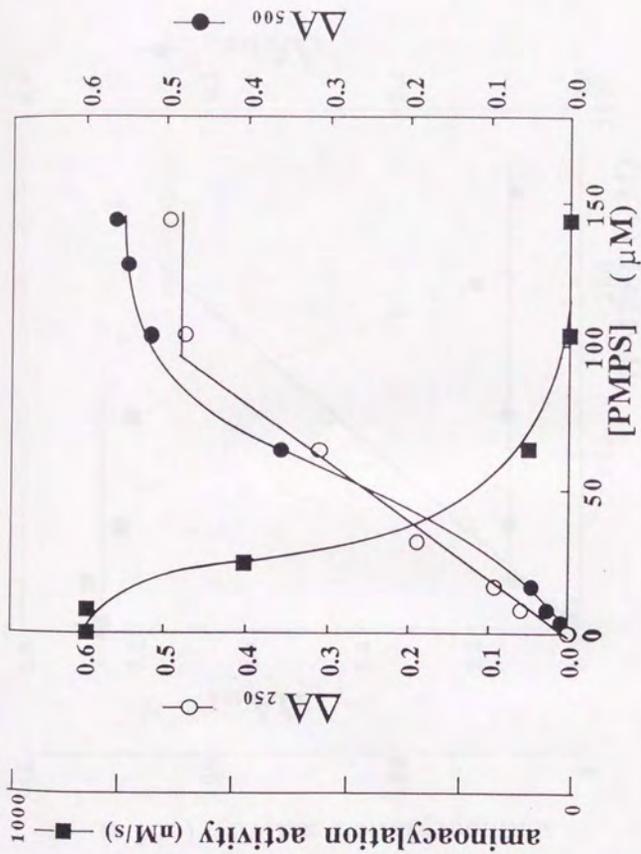


図3-7 大腸菌 ThrRS の化学修飾
 ThrRS の濃度は 4 μ M. ○, ΔA_{250} ; ●, ΔA_{500} ; ■, アミノアシル化反応の初速度.

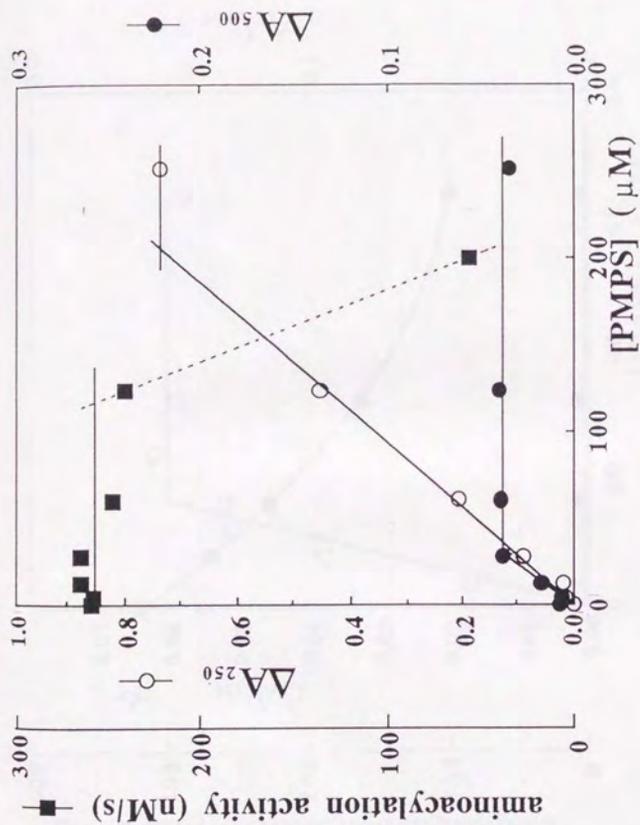


図3-8 大腸菌PheRSの化学修飾
PheRSの濃度は4 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

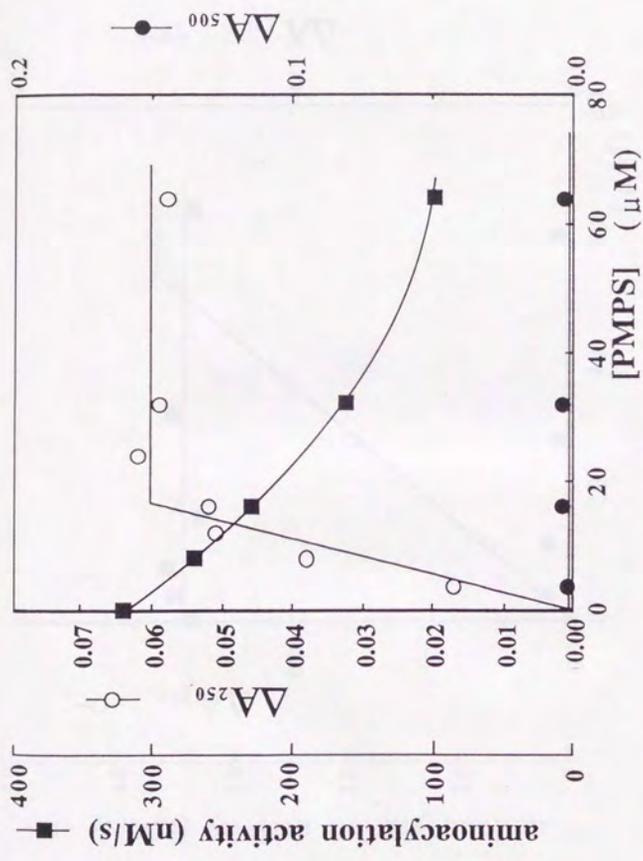


図3-9 大腸菌ArgRSの化学修飾
 ArgRSの濃度は4 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

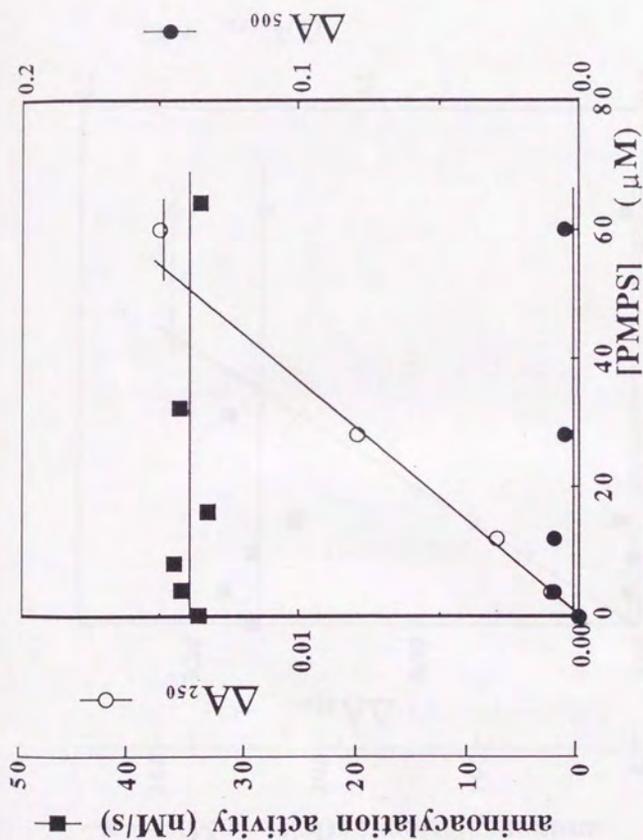


図3-10 高度好熱菌GluRSの化学修飾
GluRSの濃度は8 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

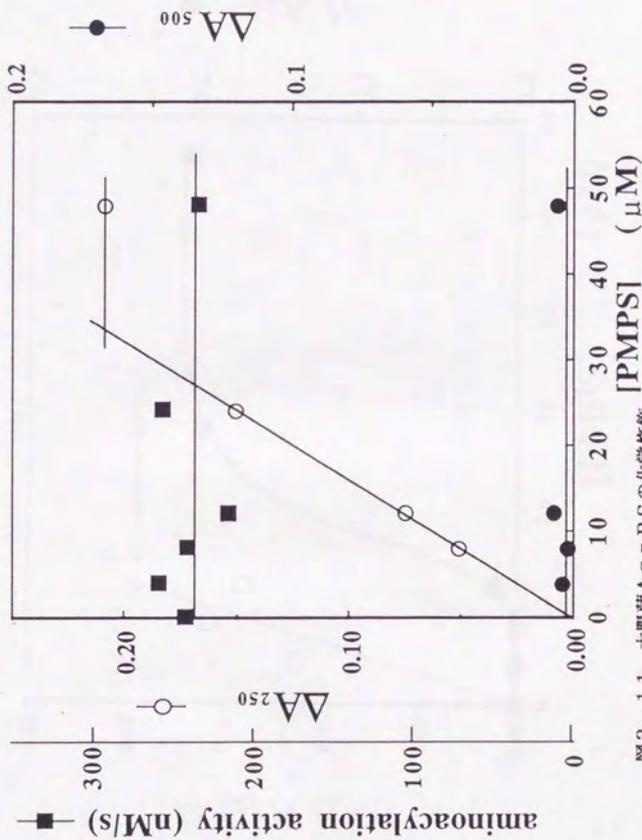


図3-11 大腸菌ASPRSの化学修飾
ASPRSの濃度は4 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

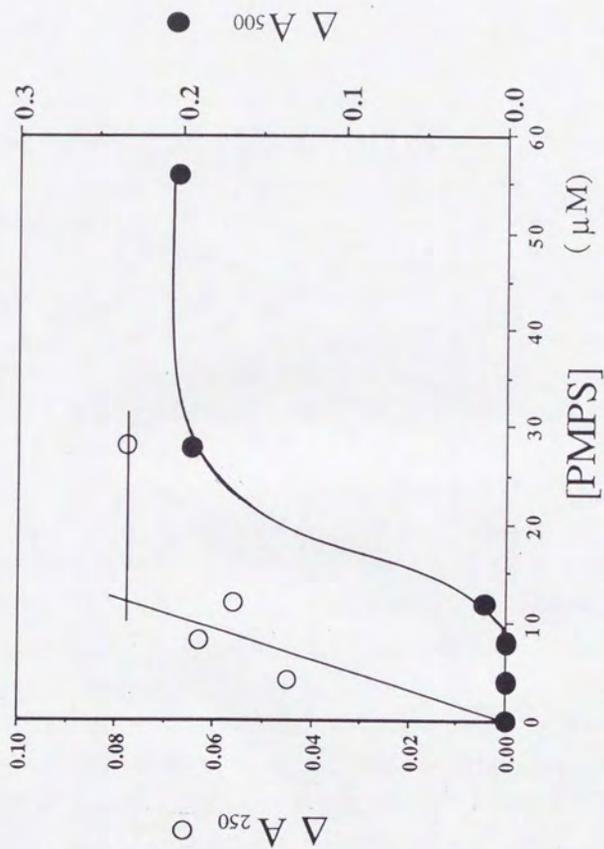


図3-12 大腸菌GluRSの化学修飾
 GluRSの濃度は4 μM. ○, ΔA₂₅₀; ●, ΔA₅₀₀; ■, アミノアシル化反応の初速度.

一、

二、

三、

四、

五、

六、

七、

八、

九、

十、

十一、

十二、

十三、

十四、

十五、

十六、

十七、

十八、

十九、

二十、

二十一、

二十二、

二十三、

二十四、

二十五、

二十六、

二十七、

二十八、

二十九、

三十、

三十一、

三十二、

三十三、

三十四、

三十五、

三十六、

三十七、

三十八、

三十九、

四十、

四十一、

四十二、

四十三、

四十四、

四十五、

四十六、

四十七、

四十八、

四十九、

五十、

五十一、

五十二、

五十三、

五十四、

五十五、

五十六、

五十七、

五十八、

五十九、

六十、

六十一、

六十二、

六十三、

六十四、

六十五、

六十六、

六十七、

六十八、

六十九、

七十、

七十一、

七十二、

七十三、

七十四、

七十五、

七十六、

七十七、

七十八、

七十九、

八十、

八十一、

八十二、

八十三、

八十四、

八十五、

八十六、

八十七、

八十八、

八十九、

九十、

九十一、

九十二、

九十三、

九十四、

九十五、

九十六、

九十七、

九十八、

九十九、

一百、

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

アミノアシルtRNA合成酵素による基質（とりわけtRNA）の厳密な認識機構を解明するには、酵素と基質（tRNA）の複合体のX線結晶構造解析を行うのが最も直接的な方法である。また、複合体と酵素単体の結晶構造を比較できれば、tRNAとARSがお互いにどのように構造を変えて認識が行われ、酵素はどのようにして活性化されていくのか、といった興味深い問題を明らかにすることができる。さらに最近では、分子進化の観点からARS自身の構造が注目を浴びてきている。すなわち、序章でも述べたように、ATP結合に関わるモチーフおよびそれをとりまく3次構造の相違から、ARSはclass Iおよびclass IIの2つのグループに分類され、この分類は「アミノ酸をtRNA 3'末端のアデノシン残基のリボースの2'OHに結合するのか、3'OHに結合するのか」といった反応機構の相違にまで関わっていることが提唱された [Eriani et al., 1991]。今後決定されるARSの3次構造がこのクラス分けと対応するかどうか、研究の一つの焦点となるであろう。したがって、20種類すべてのARSの構造を明らかにすることは、ARSの分子進化を解明する上で重要であると考えられる。

X線結晶解析を行ううえでの2大障壁とは、まず高分解能の結晶を大量に生産できる系をつくること、次に重原子同型置換法により位相を決定するために良い重原子同型置換体を作ることである。結晶化は熱力学に従い、重原子同型置換は化学に従うといわれるが、これらの知識を以ってもこれらのステップは現在なお試行錯誤によるところが大きいと考えられる。ARSの結晶化については歴史が古く、表4-1に示すようにさまざまな条件が試されており、大いに本研究の参考になる。最近では、レーザー光散乱を用いることにより、さまざまな種類・濃度の沈殿剤の中での分子の拡散係数Dを求め、その動向により沈殿剤の結晶化に対する適正を調べる試みが行われるようになってきた [Thibault et al., 1992]。本研究でも、これまでなかなか結晶化が成功しなかった大腸菌 IleRSについてこの結晶化の診断法を適用し、結晶化に成功した。

本章では高度好熱菌のGluRS、MetRS、大腸菌のIleRSの結晶化、および高度好熱菌のGluRSのX線結晶解析について論じる。高度好熱菌GluRSについて

は、結晶構造が解かれているGluRSとの対比が興味深い。この2つの酵素は非常に近縁であると考えられてきたが、tRNA認識の厳密性(序章)や、tRNAを認識するアミノ酸残基の配置(第2章)、および後述する2次構造予測の結果から、tRNA認識ドメインの構造は互いに異なるという印象が持たれる。また、GluRSの構造を解くことは、ARSによるtRNA認識機構を解明すること以外の側面にも意義のあることである。すなわち、大腸菌のGluRSはヘテロダイマーとして存在し、相手のサブユニットが存在するとATPやtRNAに対するGluRSの親和性が大きく上がる(10倍)ことが以前から知られていた[Proulx et al., 1983]が、最近になってこのヘテロサブユニットはadenylosuccinate lyaseであることが判明し、GluRSとこのadenylosuccinate lyaseとの相互作用がタンパク質合成と核酸合成のつりあいを保つ働きをしている可能性が示唆されてきている[Gendron et al., 1992]。したがって、GluRSの構造を解くことによって、このadenylosuccinate lyaseとの相互作用様式も明らかになることが予想され興味深い。また高度好熱菌MetRSについては、その構造を解くことにより、第3章で論じたような、あるサブクラスのARSに普遍的なZn²⁺結合モチーフの構造を明らかにすることができ、このモチーフによるtRNAおよびアミノ酸認識の機能・構造相関が解明されると考えられる。さらにIleRSは、Zn²⁺結合モチーフのみならずLeuジッパ様のモチーフをもっており(図2-9)、またこのように分子量の大きなARSの構造は未だかつて解かれたことはなく、構造を決定することの意義は十分にあると思われる。

4.2. 材料と方法

4.2.1 試薬など

沈殿剤として結晶化に用いたPEG6000, MPDは和光純薬から購入した。結晶化に用いたグッドバッファー(Mes, Hepes, Pipes, Tris)は、Sigmaから購入した。その他の結晶化用のMgCl₂, KCl, 2-mercaptoethanol, DTT, クエン酸ナトリウムは、一般に販売されている特級品を用いた。重原子同型置換体を作成する際の重原子化合物は、Sigmaなどから購入した。

4.2.2 高度好熱菌のGluRS, MetRSの結晶化用標品の調製

高度好熱菌の *gluR* 遺伝子・*metS* 遺伝子を、PCRを用いて T7 promoter を持つ発現ベクター (本研究室の木川氏により作成) にサブクローニングし、大腸菌 JM109 (DE3) 中で発現させる大量発現系を構築した。これにより、この大腸菌粗抽出液に含まれる可溶性タンパク質の約 80% 以上まで *GluRS*、*MetRS* を合成させることに成功した (図 4-1)。精製は第 1 章で述べた方法により行った。熱処理によりすでに 90% 近い純度になっていたため (図 4-1)、他の発現系を用いた場合より最終精製標品の純度は高く、これが高分解能の結晶の作成に成功した 1 つの要因になっていると考えられる。

4.2.3 大腸菌 *IleRS* の精製

第 1 章で述べた方法にしたがって精製を行った。

4.2.4 結晶化

結晶化は、hanging drop法を用い、蛋白工学研究所の森川博士の方法にしたがって行った。すなわち、glycerol 溶液として保存されている *ARS* (2-10 mg/ml) 約 1 ml を、10 mM Tris-HCl (pH 7.8)、5 mM $MgCl_2$ 、10 mM 2-mercaptoethanol を含む緩衝液 1 l に対して一晚透析し [透析チューブは SPECTRA/POR (Spectrum Medical Industries) を用いた]、Centricon (ミリポア) を用いて約 50 μ l まで濃縮する。これに 10 \times 緩衝液および沈殿剤溶液 (PEG6000 など) を様々な最終濃度になるように加えて drop 溶液とする。このうち 16-20 μ l をスライドガラス (Takahashi Giken Glass Co. LTD, No. 5) にのせ、様々な濃度の沈殿剤を含む reservoir の入った秤量びん (安田商店) に、vacuum oil ではりつける。これをプラスチックのケースに入れ、4 $^{\circ}C$ 、10 $^{\circ}C$ 、20 $^{\circ}C$ の低温 incubator (IL-92, Yamato) 中で 1-8 週間放置した。結晶化に用いたすべての溶液は 0.22 μ m のフィルターで濾過した。またガラス器具はすべてシリコン化を行った (10% ジクロロジメチルシランを含むジクロロメタンと共存させ、真空に引いたデシケーター内で一晚放置)。結晶の観察は、結晶の核を分散させないよう結晶を仕込んでより 2 日目以降に、偏向顕微鏡 (Nicon UFX-II) を用いて行った。

4.2.5 種結晶法 (seeding)

なかなか得られにくい高分解能結晶を大量に得るには、seeding を行うのが最も効果的である。さらにサイズの大きい結晶を得るには、macro seeding が適しているが、新しい

dropに結晶の破片をただ入れるだけでは、一結晶面内での成長が一樣でないためpoly-crystalになってしまう。そこで、なるべく新鮮なseedを、やや濃い緩衝液 [GluRSは100 mM Mes (pH 6.2), MetRSは150 mM Hepes (pH 7.5)] に5-10分浸して表面を少し溶かし、水で洗って、仕込んだ直後および2, 3日後のdropに入れた。GluRSの高分解能結晶は、この方法によってのみ大量に生産することができた。

4.2.6 結晶のmountingとプレセッション写真による解析

harvestの条件(結晶が単独でも溶けずに、しかも割れない条件)は、GluRSで15% PEG6000, 1.1% MPD, 55 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 5.5 mM MgCl₂, 11 mM 2-mercaptoethanol, MetRSでは10% PEG6000, 150 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.75 mM DTTであった。結晶をこれらのharvest溶液中にしばらく浸しておいて、マウスベットを用いて直径0.5-1.5 mmのガラスキャピラリー (MARK-ROHRCHEN, Germany) に詰め、soft waxで封管する。

プレセッション写真は、Huber社およびEnraf社のカメラを用いて撮影した。X線 (Cu α , $\lambda=1.5428$ nm) の発生装置は、回転対陰極型のRU-300 (RIGAKU社) およびM18X (MAC Science社) を使い、50kV 90mAで測定を行った。

4.2.7 重原子同型置換体の作成

GluRSの結晶を4.2.6で述べたharvest溶液(六穴中)に浸しておき、harvest溶液と同じ塩組成を持つ5 mMの重原子化合物溶液(常に新鮮なものを作り、0.22 μ mのフィルターで濾過する)を、1 μ lずつ10-30分の間隔をあけてゆっくりと目的の濃度まで加えていく。最終濃度に至ったら、15% PEG6000のreservoirが入った密閉ガラス容器に入れ、20°Cで1-2日間放置しておく。重原子リサーチの手順としては、まずプレセッション写真をとり、回折強度の変化が見られたものについて、次項で述べるdata collectionを行った。

4.2.8 データーコレクション

data collectionは、imaging plateを装備したDIP-100 (MAC Science) および筑波高エネルギー研究所の坂部式巨大分子量ワイゼンベルグカメラを用いて、表4-2に示される条件で行った。DIP-100システムにおいては、data collectionはプログラムELMSを用いてPC

-9801 VX上で行われ、集められたdataは一旦コンピューターSunに転送されてここに蓄積され、再びPC-9801上でevaluation処理を行い、VAXシステム (VT286) に転送して以後の解析を行った。

4.2.9 X線結晶構造解析

重原子同型置換体のPatterson関数解析、差フーリエ解析による重原子ピークのrefinement、電子密度分布図の解析など基本的なX線結晶構造解析は、VAXシステム上でプログラムPROTEIN (Steigemann) を用いて行った。位相決定は、Patterson関数で明瞭なピークを与えた重原子 (methylmercuri chloride) のdataを基準にして、他の重原子のピークを差フーリエ解析により求め、これらを用いて重原子同型置換法を適用し、場合によっては良い重原子の異常分散効果を用いて位相を決定した。

4.2.10 レーザー散乱を用いた結晶化の診断法

「タンパク質濃度を一定にして沈殿剤の濃度を上げていく、あるいは沈殿剤の濃度を一定にしてタンパク質濃度を上げていくことにより、(レーザー光の散乱から求められる)タンパク質分子の粒子半径がどのような動向を示すか」を解析することにより、その沈殿剤が結晶化に相当であるか否かを判断する方法である。装置は、図4-2に示されるようにタンパク質、沈殿剤、緩衝液を含む溶液 40 μ lを長さ3 cmくらいのガラスセルに入れ、波長 $\lambda=488$ nmのレーザー光を当てて、Photocounterで様々な角度方向での散乱光の強度 [$I(K,t)$, K は散乱ベクターで $|K|=4\pi n/\lambda \sin(\theta/2)$, n はサンプルごとに決まる反射定数, θ は散乱角度] を測定し、photomultiplierで $I(K,t)$ の実時間ごとの揺らぎを処理し、correlatorでautocorrelation function $G_2(\tau)$ を以下の式により計算する。

$$G_2(\tau) = \langle I_s(K, t+\tau) I_s(K, t) \rangle_t / \langle I_s(K, t) \rangle_t^2$$

D を拡散係数 (translational diffusion coefficient) とすると、 $G_2(\tau)$ はまた、

$$G_2(\tau) = \exp(-2DK^2\tau)$$

で表されるので、拡散係数 D が算出される。 D は

1. 粒子サイズ (球に近似した場合の半径は、

$$R_{app} = k_B T / 6\pi\eta D \quad (\eta; \text{溶液の粘度}, T; \text{温度}, k_B; \text{Boltzmann定数})$$

2. 粒子同士の相互作用
3. 粒子サイズの散らばり (variance)

で決まるので、Dを求めることにより、1~3に関する情報を得ることができる。一般に、図4-3の上の図で示されるように、タンパク質がある濃度になると急にDが下がる（粒子サイズが上がる）場合は結晶の核ができていることが示唆され、図4-3の下の図で示されるように、徐々にDが下がっていく場合はコンスタントにaggregationが生じていることが示唆される。

光散乱の実験に用いたサンプルは、同じ沈殿剤を含むreservoirに対してhanging drop法により、並行して結晶化を試みた。

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

高度好熱菌 *GluRS* について、沈殿剤の種類と濃度 [PEG6000(11-23%), 硫酸(25-53%), MPD(15-40%)] (dropとreservoirのそれぞれの濃度), タンパク質の初濃度 (3-20 mg/ml), 温度 (4, 10, 20°C), 緩衝剤の種類 [Tris-acetate(pH 7.0-7.8), Mes(pH 6.0-7.0), Pipes(pH 6.5), Bistris(pH 6.5), Bistris/propane(pH 6.5)] ・濃度 (50-100 mM) と pH (5.8-7.8), 塩などの付加物 ($MgCl_2$, KCl, 2-mercaptoethanol) などの条件を振って、結晶化を試みた。すると、PEG6000 (15-18%) およびMPD (35%) を沈殿剤に用いた時には細い柱状の結晶が、硫酸 (1.6 M, pH 6.5) を用いた時には板状 (羽状) の結晶が成長してきた [Nureki et al., 1992]。硫酸で出る結晶は成長に時間がかかる (約3ヵ月) ので、PEG6000にMPDを少量加えた系で結晶化の条件を改良した。その結果、3種類のOrthorhombic (I, II, III) および1種類のHexagonalの計4種類の結晶が、非常に近い条件で出現することがわかった [図4-4, 表4-3]。図4-4を見ると、PEG6000のinitial/reservoirの濃度、KClの有無、*GluRS*の初濃度、pHによって各結晶形の最適条件はずれているものの、pHが0.1違うと別の結晶形の結晶ができてしまい、1つのdropに4種類の結晶形が成長することもめずらしくはなかった。

GluRS の等電点をPhast System (Pharmacia) の等電点電気泳動を用いて測定したところ5.8であり、確かに5.8-7.8のpHの範囲ではpHが下がるほど*GluRS*の溶解度は小さくなった。また、実験的に、塩 (KCl) 濃度を上げてやることにより、*GluRS*の溶解度を上げることができた。これらの実験事実をふまえて、図4-5 (および表4-3) の結果を解釈すると、*GluRS*の濃度が高かったり、KClの塩溶の効果により、*GluRS*分子同士が相互作用しやすいほど、あるいはまた、PEG6000の初濃度が低い (ただしdropからの水分の蒸散による濃縮の勾配は大きい) ほど、Orthorhombic II, Hexagonal, Orthorhombic III, Orthorhombic Iの順に生成しやすいことがわかる。換言すると、Orthorhombic IIは、結晶化にいたるnucleationが低い沈殿剤濃度で起こり、その後の結晶成長は速い。確かに、顕微鏡観察によると、Orthorhombic IIやHexagonalの結晶は、結晶の出現が早く (dropを仕込んでより数時間以内)、その後の成長も速かった。これに対し、Orthorhombic IIIやOrthorhombic Iは、nucleationが比較的高い濃度の沈殿剤によって誘発され、その後の結晶成長はゆるやかであると考えられる。以下、各結晶形ごとに、プレ

プレセッション写真の結果と共に若干の考察を加える。

Orthorhombic I ($P2_12_12_1$)

図4-5にOrthorhombic I結晶の顕微鏡写真(A)とプレセッション写真(B)の結果を示す。写真の通り、この結晶は縦方向(a^* 軸方向)には成長するが幅はあまり大きくならず(最大のもので $0.15 \times 0.15 \times 1.0$ mm)、柱状結晶しかもpolycrystalになりやすい。プレセッション写真の結果、分解能は 3.5 \AA 程度で非常に良い結晶とは言えない。逆格子はmmm対称性を持っており、 $h=2n, k=2n, l=2n$ の消滅則が見られたことから(図4-5B)、結晶形はOrthorhombic $P2_12_12_1$ と決定された。結晶格子定数は $a=86.4, b=88.6, c=84.9$ (\AA)であり、 V_m は $3.01(\text{\AA}^3/\text{Da})$ 、solvent contentは59.1%となった(表4-3)。タンパク質のsolvent contentは一般に27-65%であるから、このOrthorhombic I型結晶は、比較的多量の溶媒を含んでおり、このために反射が弱く高分解能に至っていないとも考えられる。

Orthorhombic II ($P2_12_12_1$)

図4-6にOrthorhombic II結晶の顕微鏡写真(A)とプレセッション写真(B)の結果を示す。この結晶形の結晶は、写真に示すように非常に美しい形と消光を持っており、大きさも最大級のものでは $0.4 \times 0.8 \times 2.0$ mmにも達する。しかしプレセッション写真が示す通り分解能は 4 \AA 止まりであり、これも高分解能結晶とは言えない。逆格子はやはりmmm対称性を持っており、 $h=2n, k=2n, l=2n$ の消滅則が見られたことから(図4-6B)、結晶形はOrthorhombic $P2_12_12_1$ と決定された。結晶格子定数は $a=80.8, b=131.2, c=66.39$ (\AA)であり、 V_m は $3.26(\text{\AA}^3/\text{Da})$ 、solvent contentは62.3%となった(表4-3)。この高い溶媒含量のために高分解能までの反射が出ていないとも考えられる。先に、「Orthorhombic IIは高濃度のGluRSおよびKClの存在により、低濃度のPEGでnucleationが起こる」と述べた。このOrthorhombic II結晶は溶媒含量が高かったことから、この結晶内ではGluRS分子同士が水分子を介して親水的に分子間接触を形成していると考えられる。

Orthorhombic III ($P2_12_12_1$)

図4-7にOrthorhombic III結晶の顕微鏡写真(A)とプレセッション写真(B)の結果を示す。この結晶の外形は、Orthorhombic IIのそれと似ているが、消光はやや弱く、丸みを帯びている(結晶の成長に比べてタンパク質の供給が間に合わないときに起こる現象

である)。結晶の大きさは、最大のもので $0.3 \times 0.7 \times 1.5$ mmにも達する。プレセッション写真の結果から、分解能は 3\AA 以上（この写真では 2.8\AA 程度）まで達し、非常に良い高分解能結晶であることがわかった。逆格子はやはり mmm 対称性を持っており、 $h=2n, k=2n, l=2n$ の消滅則が見られたことから（図4-7B）、結晶形はOrthorhombic $P2_12_12_1$ と決定された。結晶格子定数は $a=75.75, b=110.1, c=67.57$ (\AA)であり、 V_m は $2.61(\text{\AA}^3/\text{Da})$ 、solvent contentは 52.9% とタンパク質の結晶の最も標準的な値になった（表4-3）。この溶媒含量はGluRSの他の結晶形の値のどれよりも低く、反射が最も強い原因の1つになっていると考えられる。

Hexagonal ($P6_322$)

図4-8にHexagonal結晶の顕微鏡写真(A)とプレセッション写真(B)の結果を示す。この結晶は、図4-8の写真のように、成長の方向によって六角形になることがある。消光は弱く、大きさは最大のもので、 $0.3 \times 0.3 \times 0.4$ mmに達する。プレセッション写真の結果から、分解能はわずかに 6\AA 程度しかなく、解析には不向きである。逆格子は mm 対称性を持っており、 $3n$ の消滅則が見られたことから（図4-8B）、結晶形はHexagonal $P6_322$ と決定された。結晶格子定数は $a=b=62.94, c=287.5$ (\AA)であり、 c 軸が非常に長く、一般の研究用でのdiffract-meterでは解析が困難であると考えられる。 V_m は $4.57(\text{\AA}^3/\text{Da})$ であり、solvent contentは非常に高く 73.1% であった（表4-3）。このことが、高分解能の反射が出ない原因の1つになっていると考えられる。

以上4つの結晶形の結晶化の至適条件、結晶の性質は表4-3にまとめてある。溶媒含量と分解能がよく相関していて、興味深い。

これまでの結果より、結局X線結晶解析に適しているのは、Orthorhombic IIIだけであることがわかる。前述の議論より、このOrthorhombic IIIだけを自発的に作成するのは難しい。そこで、4.2.5の方法にしたがって、seedingによりOrthorhombic III結晶を大量生産した。このOrthorhombic III結晶を筑波高エネルギー研究所の坂部式巨大分子量ワイゼンベルグカメラでdata collectionを行ったところ、図4-9に示すように非常に強い回折パターンが得られ、分子量 $54,000$ の割には分解能も $2.2-2.5\text{\AA}$ に達し、非常に良い高分解能結晶であることがわかった。

4.3.2 高度好熱菌GluRS結晶の重原子リサーチ

表4-4にGluRSのOrthorhombic III型結晶の重原子リサーチの結果を示す。現在までに、計34種類の重原子化合物を試した。ある種の水銀(Hg^{2+})化合物、オスミウム(Os)化合物、ウラン(U)化合物では、非常に低濃度にしても結晶にひびが入ったり、割れたりしてしまった(表4-4, Crash)。このことから、Orthorhombic III型結晶は溶媒含量も標準的に高く、いろいろな重原子が入りやすいと考えられる。割れなかった重原子置換体については、プレセッション写真を用いた解析を行った。逆格子のa軸、b軸の長さを測定することにより、結晶の同型性が失われていないかを調べることができる。また分解能が落ちていないか、回折強度が変化しているかを観察して、これらの結果を表4-4に示した。また、一番右のカラムで同じマークのついた重原子化合物は、同様の傾向の強度変化が観察されたものである。 Hg^{2+} や Au^{+3} 、 Pt^{2+} 、 $^{4+}$ などの共有結合性を持つ金属イオンは、電子の局在化を起こす硫黄原子や窒素原子に結合しやすく、したがってCys, Met, Hisといったアミノ酸残基の側鎖に結合していると考えられる。これに対し、アルカリ・アルカリ土類金属、ランタノイド(Sm^{3+} , Eu^{3+})、アクチノイド(U^{6+})などイオン化傾向の強い金属イオンは電気陰性度の高い酸素原子に結合しやすく、したがってGlu, Aspおよび主鎖のカルボキシル基, Ser, Thrの側鎖に結合していると考えられる。

表4-4で、 K_2HgI_4 、5-chloromercuri Uridine(5-Hg-uridine)、methylmercuri chloride (MeHgCl)などの Hg^{2+} 化合物では、同じ傾向(○)の比較的大きな強度変化が見られた(図4-10)。 Hg^{2+} はCys残基に特異的に結合しやすいので、GluRSのただ1つのCys残基(Cys-271)に結合していると考えられる。 Hg^{2+} は反応性が高いので、*で示したように、0.5mMの2-mercaptoethanolを加えてCys残基と競合させることにより反応を緩和した。 NaAuCl_4 、 IrCl_3 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ では、●で示した同様の強度変化が認められた。これらの化合物はCys, Met, His残基のどれかに結合していると考えられる。また、 $\text{K}_2[\text{Pt}(\text{Oxalate})_2]$ ($\text{K}_2[\text{Pt}(\text{OX})_2]$ と略記)と $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (PtN_2Cl_2 と略記)は、△で示した同じ傾向の強度変化を示した。 Pt^{2+} はMet残基と親和性が高いと言われており、これらの化合物もGluRSのMet残基に結合していると考えられる。一方、■で示された $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_3$ や $\text{KUO}_2(\text{IO}_3)_3$ などのウラン化合物、□で示された SmCl_3 や $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ などのランタノイド化合物では、それぞれ同じ傾向の強い強度変化が認められた。これらの化合物は、GluRSの表面に出て多くのカルボキシル基のどれかに結合していると考えられる。

表4-4で強度変化が認められた Hg^{2+} 、 Pt^{2+} 、 U^{6+} 、 Sm^{3+} などの重原子化合物について、

DIP-100を用いたdata collectionを行った結果が表4-5である。一般に、結晶のいずれかの軸の格子定数が、Nativeのそれに比べて0.5%以上変化した重原子化合物は非同型であるといわれている。K₂HgI₄、5-Hg-Uridine、MeHgClなどのHg²⁺化合物では、ちょうど0.5%くらいa軸およびb軸の格子定数が変化した。R merge ($\sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$) は比較的小さく、また回折強度の変化は20%弱であった。これらの重原子置換体についてPatterson mapを書かせたところ、5-Hg-Uridine (図4-11) とMeHgCl (図4-12) で全く同じ位置に鮮明な重原子のピークが1つ現れ、先の予想通りこれらのHg²⁺化合物はG l u R Sに唯一存在するCys-271に結合していることがわかる (K₂HgI₄も同じ位置に重原子のピークが認められた)。

Pt²⁺化合物については、Pt(NH₃)₂Cl₂でb軸の格子定数が1.2%も変化してしまったため、Patterson mapには結晶の非同型性に起因するたくさんのピークが出てしまった。MeHgClの反射dataを基準とした差フーリエ解析によって、1つの弱いピークを見いだすことができた。K₂[Pt(OX)₂]では、格子定数はあまり変わらなかったが、Patterson mapに非同型性が現れていた。(NH₄)₂Pt(NO₂)₂は測定中に結晶にひびが入ってしまったため、R mergeが大きくなってしまったものと思われる。いずれにしろ、表4-4の重原子リサーチでもPt²⁺化合物では格子定数の変化が大きかったことから、G l u R Sにはその構造上あるいは分子間相互作用にとって非常に重要なMet残基やHis残基があって、これらがPt²⁺イオンによって攻撃されることにより結晶が非同型になってしまうものと考えられる。

K₃UO₂F₆やSmCl₃では、やはりb軸の格子定数がそれぞれ0.7%、1.2%大きくなってしまいPatterson mapにも非同型性が現れてしまった。これらの化合物は分子表面のカルボキシル基に非特異的に結合しやすい傾向があり、その結果G l u R S分子が結晶の中で動いてしまった可能性も考えられる。

4.3.3 高度好熱菌G l u R SのX線結晶構造解析

Nativeの反射データはDIP-100を用いて測定した2.8Åまでのものを用いた。4.3.2の結果より、位相決定に使える重原子は5-Hg-UridineとMeHgClだけであったが、これらは同じCys-271に配位していたため、本質的には重原子のデータは1つである (Pt(NH₃)₂Cl₂はPhasing powerが小さく、位相決定にはほとんど使えなかった)。そこで、MeHgClの異常分散効果を用いて、3Åまでの分解能で位相を決定した。MeHgClのR-Cullis ($\sum |F_{PH} - F_P| / F_{N(c \& l o s)}| / \sum |F_{PH} - F_P|$) は0.69、Phasing powerは1.59、全体のFigure of meritは0.59で

あった。これらにより求められた電子密度図を図4-13に示す。一番長いb軸に垂直に切断した断面で表してある。solvent flatteningを行い、溶媒部分の電子密度分布を平滑化することによって溶媒領域とタンパク質領域をはっきり区別することができた(図4-13)。

予備的ではあるが、本研究で得られた高度好熱菌GluRSの電子密度分布図において近接する電子密度をプログラムBONESを用いて結んだ構造を図4-14に示してある。BONESの解析においては、長くつながる断片が比較的多く見いだされた。位相問題の解決が未だやや不完全であるため、妙なつなぎかたをしている部位もあるが、図4-14によりGluRSの外形についての予備的な情報を得ることができると考えられる。それによると、GlnRSが長く伸びた外形(図5-1)をしているのに対して、GluRSの外形はよりコンパクトな形をしていると考えられる。(ただ、tRNAが結合することによりGluRSが構造変化を起こして、コンパクトな外形が長く伸びた外形に変わるという可能性も否定しきれないが。)

次に、高度好熱菌のGluRSの一次構造からJOINT-METHOD (VAX system) によって二次構造予測を行った(図4-15)。この方法では、特に α ヘリックスについては、かなり信頼性の高い予測を行うことができる。さらにこの結果を参考にして、主鎖の帰属(chain trace)を行った。方法は、電子密度分布図(図4-13)をOHPシートにコピーしたものを1枚1枚(全56枚)アクリル板に貼り、これを何枚か重ね、下から光を当てることによって行った。手がかりとして、 α ヘリックスのような二次構造を探した。現在までに数個の α ヘリックスを見いだしており、そのうちの1つを図4-16に示す。この α ヘリックスは、約2巻半(アミノ酸にして9-10残基)の短いヘリックスであるが、その中間あたりと終わりのあたりに、芳香族アミノ酸残基のものと思われる大きな側鎖が出ているのが見える(図4-16)。またこの α ヘリックスは、重原子 Hg^{2+} が配位しているCys-271に空間的に非常に近い位置にあった。二次構造予測の結果(図4-15)を参考にすると、この α ヘリックスは²⁸⁰LEEFIQFTWに相当する部位の構造ではないかと考えられる。

以上の結果より、本研究で得られた高度好熱菌GluRSの最初の電子密度分布図は、図4-16に示されるような二次構造も明瞭に見いだされたことから、位相問題もある程度まで解決されていると思われる。さらにこの先、この結晶の位相を決定するために、以下のアプローチを考えている。

1. 分子表面に露出している可能性の高いHisやArgなどの残基に配位する、Auのような重原子を中心に、さらに重原子リサーチを進める。

2. 部位特異的変異導入により, Cys残基をあらたに導入し, もうひとつHg²⁺をいれた同型置換体を得る.

3. 重原子置換体のdataをシンクロトンにより測定し, multiwavelength anomalous diffraction (MAD) [Hendrickson, 1991]に基づいて, 位相を決定する. この際, Se-Metを含む最少培地でGluRSを大量合成させ, MetがSe-Metに置換された酵素を調製するのも有効であると思われる.

これらにより位相問題が完全に解決されれば, 高度好熱菌GluRSの3次構造を明らかにできると思われる.

4.3.4 高度好熱菌MetRSの高分解能結晶の作成

野性型二量体のMetRS (1.2.7の方法で精製) について, 4°C, 24°Cにおいて, pH 5.5 (50 mM cacodylate-MaOH), pH 6.5 (50 mM Mes-NaOH), pH 7.5 (50 mM Hepes-NaOH) の溶液中で, 沈殿剤 (3.5 M 硫酸, 25% PEG6000, 50% MPD) を少量づつ加えていき沈殿剤の濃度がいくらになった時に沈殿が生じるかを調べ, その試料はhanging drop法による結晶化に用いた. このシステムティックな方法により, 23-25% PEG6000 (initial 6-8%), MetRSの初濃度 4-8 mg/ml, 温度20°C, 100 mM Hepes (pH 7.0-7.5), 0.5 mM DTEの条件で, 針状や羽状, 直方体形の結晶を作成することに成功した (図4-17上). ところが, 生じた結晶を洗って水に溶かしSDS-PAGEにかけたところ, 分子量が, 55,000程度であり, 野性型MetRSの1サブユニットの分子量70,000よりも小さかった. 溶かした結晶のアミノアシル化の活性を測定したところ, 十分な活性が認められた. したがって, 結晶化の最中にわずかなコンタミネーションのプロテアーゼによってMetRS分子のヒンジ領域 (Lys-503あたり, 図2-7) が切断され, 単量体型のMetRSが生じ, これが結晶化したものと思われる.

そこで, 4.2.2で述べた方法により, 単量体型MetRS (3.2.2) を大腸菌内で大量合成させ, 1.2.7の方法で精製した. この標品を用いて, initialとreservoirのPEG6000の濃度, および単量体型MetRSの初濃度をいろいろ変えて結晶化を試みた (表4-6). dropの溶液組成は, 100 mM Hepes (pH 7.5), 0.5 mM DTT, 0.02% NaN₃に固定し, 温度は20°Cで行った. すると表4-6に示すように, 条件によってamorphousになったり, いろいろな大きさの結晶が生じたりした. 表4-6より, 単量体型MetRSの結晶は低い濃度のPEG 6000でnucleationが起こり, その後水分の蒸散によるdropの濃縮勾配が比較的大きい条件

で成長することがわかった。また、結晶の成長が速く（実際、顕微鏡下で成長する有様が目で確認された）、これにMetRSの供給が応じるために、比較的高い試料濃度が要求された。表4-7に、単量体型MetRSの結晶化の至適条件を示した。実際には、同じ形の結晶を大量に生産するため、seeding (4.2.5)を行った。図4-17にMetRSのいろいろな形の結晶の写真をのせた。上段が自然にdegradationを受けて結晶化したもの、下段が遺伝子工学的に大量調製した単量体型MetRSの結晶である。この結晶のプレセッション写真をとってみたところ（図4-18）、分解能は極めてよく、2.5Åまでは反射が出ている印象を受けた。逆格子にはmmm対称性が現れており、 $h=2n, k=2n, l=2n$ の消滅則が見られたことから（図4-18）、結晶形はOrthorhombic $P2_12_12_1$ と決定された。結晶格子定数は $a=82.4, b=117, c=67.0$ (Å)となり、 V_m は $2.78(\text{Å}^3/\text{Da})$ 、solvent contentは55.8%と、タンパク質の結晶の標準的な値になった（表4-7）。このように含水量があまり高くなかったことが、高分解能まで反射が出る原因の1つとなっていると思われる。

4.3.5 高度好熱菌MetRSと大腸菌tRNA^{fMet}の複合体の結晶化

高度好熱菌のtRNA^{fMet}と大腸菌のtRNA^{fMet}は3つの塩基（TΨCステム）と4つの塩基修飾だけが異なり [Watanabe et al., 1979]、大腸菌のtRNA^{fMet}は高度好熱菌MetRSの十分によい基質である [Kohda et al., 1984]。そこで、高度好熱菌MetRSと大腸菌のtRNA^{fMet}の複合体の結晶化を試みた。酵母のAspRSとtRNA^{fMet}の複合体は、AspRS単独の場合よりも高いpHで結晶化されることが報告されているので [Lober et al., 1983]、本研究でもMetRS単独の条件よりもpHを高目にして結晶化を試みた。すると表4-7に示された条件で、図4-20のような結晶が得られた。図4-19に示されるように、ほとんどが針状結晶が寄り集まってウニのようになった結晶であったが、ほんの2、3個、写真に現れているような四角錐型の結晶が得られた。この結晶を水に溶かしてSDS-PAGEにかけたところクマジーブルー染色によって野性型の二量体MetRSに対応する分子量70,000のバンドが、メチレンブルー染色によってtRNA^{fMet}に相当する77mer程度の核酸のバンドが検出された。したがって、この結晶は確かにMetRS（二量体）とtRNA^{fMet}の複合体の結晶であると考えられる。しかし、この結晶にX線を当ててみたところ、反射は観測されなかった。この原因として、結晶が小さかったせいもあるが、むしろこの結晶は含水量が高く結晶内でMetRSとtRNAが様々な結合の仕方をしていて可能性が高いと思われる。やはり高度好熱菌tRNA^{fMet}を用いて結晶化を行な

う必要があると考えられる。いずれにしろ、二量体MetRS単独では、ヒンジ領域が非常にフレキシブルで結晶を得ることが困難であったが、tRNAと複合体を形成すると構造が安定化されて結晶化するのではないかと考えられる。

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

沈殿剤として硫酸(1 M), PEG(3%), PEG/NaCl(3%/100mM), MPD(5%), クエン酸ナトリウム(0.8 M)を用い、IleRSの濃度を0-25 mg/mlの間で振って、レーザー光散乱の解析(4.2.10)を行った(図4-21)。緩衝剤としては、100 mM Hepes(pH 7.5)を用いた。すると、クエン酸ナトリウムではIleRSの濃度が上がっても拡散係数Dは変わらなかった(図4-20)。すなわち、この沈殿剤ではIleRSの粒子半径や分子間相互作用は一定であり、aggregationは起きていないと考えられる。これに対し、PEGを用いた場合は、IleRSの濃度を上げると明らかにDが減少し、aggregationを起こしていることがわかる(図4-20)。硫酸やPEG/NaClでもPEGに比べればDの減少の割合は小さいが、本質的にaggregationが起きていると考えられる(図4-20)。またMPDでは、IleRSの濃度に伴ってむしろ粒子半径が小さくなるような傾向が見られ(図4-20)、aggregationこそ起きていないが、IleRS分子の構造が変わるなど何か自然でないことが起きていると考えられる。また、拡散係数Dの値を求めてみると、硫酸、PEG、PEG/NaCl、MPDでは $D=4.5 \times 10^{-7}$ cm/s、粒子半径 $R_{app}=4.9$ nmになったが、クエン酸ナトリウムを用いた時は、Dがその半分、したがって粒子半径は2倍になっていた。分子量がやや大きい高度好熱菌MetRSでレーザー散乱の実験を行った場合は、 $D=4.8 \times 10^{-7}$ cm/s、 $R_{app}=4.5$ nmであった。したがって、クエン酸ナトリウムを用いた場合に、何か特別なこと(例えばnucleationなど)が起きていると考えられる。

そこで、これらの沈殿剤ごとに、IleRSの初濃度(5-20 mg/ml)、pH[6.0(50 mM Mes), 7.0(50 mM Pipes), 7.5(50 mM Hepes)]、温度(4-25°C)などの条件を振ってhanging drop法により結晶化を試みた。すると、1.2 M クエン酸ナトリウム、5 mg/ml IleRS、50 mM Hepes(pH 7.5)、15°Cの条件で、IleRSの小さい針状結晶ができた。さらにpHを7.5に固定して緩衝剤の種類(Pipes, Tes, Mops, Bistris, Bistris/Propane, Tris-maleate, Potassium phosphate, 各 50 mM)を変えてみたところ、Potassium phosphateおよびBistris/propaneを用いた時には細かい針状結晶が、Pipesを用いた時には、図4-21に示されるようなやや大きい針状結晶(棒状結晶)が得られた。し

かし、このIleRSの結晶はseedingによってわずかに成長するが、それでもやっとな幅が20 μm程度であり、X線結晶解析に進むにはまだまだ検討の余地がありそうである。IleRSは分子量が大きく、構造がフレキシブルなためか、これまでどこのグループも結晶化に成功していなかったのが、本研究がその最初の例となる。最近、大腸菌のValRSについて、同様のレーザー光散乱解析を行って結晶化に成功したという報告がなされた[Thibault et al., 1992]。結晶化に成功した沈殿剤はやはりクエン酸ナトリウムであった。また、大腸菌のMetRSも結晶化はクエン酸アンモニウムを用いて行っており[Brunie et al., 1990]、これらIleRS, ValRS, MetRSが同じサブグループに属する、互いに相同性の高いARSであることと考えあわせると、興味深い。

ARS (Source)	Crystallization conditions				Space group Cell parameter	Res.	Heavy-atom derivatives
	precipitant	pH	additives	temp			
LeuRS (<i>S.cerevisiae</i>) 40-65 mg/ml	50% (NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM KPi (7.5)	0.2 mM DTT 0.2 mM EDTA	4	/	/	/
LysRS (<i>S.cerevisiae</i>) 10-30 mg/ml	/	10-30 mM KPi (6.5-8.5)	/	/	/	/	/
TyrRS (<i>B. stearother- mophilus</i>) 5-6 mg/ml	53% (NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM TrisOAc (7.0)	10 mM MgCl ₂ tyrosyl adenylate	25	Hexagonal <i>P</i> 3121 a = b = 64.6Å c = 238.8Å	2.3	HgCl ₂ U, Pt
MetRS (<i>E. coli</i> , mono- meric form) 10 mg/ml	1.5 M (NH ₄) ₂ - citrate	100 mM KPi (7.2)	5 mM ATP	4	Monoclinic <i>P</i> 2 ₁ a = 78.1Å, b = 46.2Å c = 87.9Å, β = 108.8°	2.5	K ₂ UO ₂ F ₅ K ₂ Pt(CN) ₄ Sm(NO ₃) ₃
TrpRS (<i>B. stearother- mophilus</i>)	2.0 M KPi	6.5-7.6	0.2 M tryptophan 5 mM ATP 10 mM MgCl ₂	37	Tetragonal <i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2 a = b = 60.9Å c = 234.4Å	6.0	/
PheRS (<i>T. thermo- philus</i>) 3-5 mg/ml	25-30% (NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM Imidazol (7.8)	1 mM MgCl ₂ 1 mM NaN ₃	4	Trigonal <i>P</i> 3 ₂ 21 a = b = 176Å c = 142Å	6.0	K ₂ PtCl ₄ Hg(CH ₃ COO) ₂ KAu(CN) ₂
AspRS + tRNA ^{Asp} (<i>S.cerevisiae</i>) 10 mg/ml	60% (NH ₄) ₂ SO ₄	40 mM Tris- maleate (7.5)	5 mM MgCl ₂	4	Orthorhombic <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 a = 210Å, b = 146Å c = 86Å	3.0	AuCl ₃ PCMB SmCl ₃
SerRS (<i>E. coli</i>) 10 mg/ml	58% (NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM Tris-Cl (7.6)	10 mM MgCl ₂ 0.5 mM DTT 0.5-1.0% N-octyl- glucoside	r.t.	Monoclinic <i>I</i> 2 a = 128.1Å, b = 90.7Å c = 69.8Å, β = 91.1°	2.5	DyCl ₃ UO ₂ Ac EtHgCl
HisRS (<i>E. coli</i>) 2.5-10 mg/ml	PEG 6000	50 mM Tris-Cl		r.t.			
GlnRS + tRNA ^{Gln} (<i>E. coli</i>) 5 mg/ml	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM KPi (7.2)	10 mM Mg(OAc) ₂ 20 mM 2-mercapto- ethanol 10% Glycerol	4	Orthorhombic <i>C</i> 2221 a = 242.8Å, b = 93.6Å c = 115.7Å	2.5	K ₂ AuCl ₄ DiHgAc EtHgPO ₄ PCMB

表4-1 これまでに結晶化されたARSの結晶化条件

	DIP-100	P.F.
Film distance (mm)	150	430
Exposure time (s/deg.)	500	0.67
Temperature	4	12
Oscillation angle (deg.)	<i>b</i> -axis:1.5 <i>c</i> -axis:2.0	<i>a</i> -axis:7.8 <i>b</i> -axis:7.0
Number of films	54	16
Current (mA)	90	284
Resolution (Å)	2.8	2.5

表4-2 高度好熱菌GluRS結晶の data collection の条件

	Form I Orthorhombic		Form II Orthorhombic	Form III Orthorhombic	Hexagonal
Precipitant	PEG6000		PEG6000	PEG6000	PEG6000
Starting conc.	7.5%	3%	2%	5%	5%
Reservoir conc.	15%	15%	9-12%	13-15%	13%
Initial protein concentration (mg/ml)	5		8-20	5	5
Temperature	10	4	4	4	4
Mes/NaOHbuf. (mM)	50		50	50	50
pH	6.0-6.5	5.8-6.1	6.2	6.2-6.3	6.4-6.5
MgCl ₂ (mM)	2		2	2	2
KCl (mM)	0		30	0	0
2-Mercaptoethanol (mM)	10		10	10	10
MPD (%)	1		1	1	1
Space-group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 6 ₂ 2 ₂
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 86.4 <i>b</i> = 88.6 <i>c</i> = 84.9	<i>a</i> = 80.81 <i>b</i> = 131.2 <i>c</i> = 66.39	<i>a</i> = 75.75 <i>b</i> = 110.1 <i>c</i> = 67.57	<i>a</i> = 62.94 <i>b</i> = 62.94 <i>c</i> = 287.5	
V _m (Å ³ /Da)	3.01		3.26	2.61	4.57
Solvent content (% volume)	59.1		62.3	52.9	73.1
Resolution limit (Å)	3.5		4	2.5	6

表 4-3 高度好熱菌 *GluRS* の結晶化条件

Derivative	Concentration (mM)	Soaking Time(days)	Cell Constant		Intensity Change
			<i>a</i>	<i>b</i>	
Ag(NO) ₃	0.4	2	75.75	110.42	↓ + (Crack)
NaAuCl ₄	1.5	3	75.61	110.14	↓ + ●
KAu(CN) ₂	1	2	75.75	110.71	+ (Crack)
KAu(CN) ₂	5	2	75.55	110.28	↓ +
Bakers Hg	1				Crack
HgCl ₂	1				Crack
K ₂ HgI ₄	1	3	75.84	109.86	↓ +++ ○
K ₂ HgI ₄	0.3	2	76.01	110.42	↓ +++ ○
Hg(OAc) ₂	1	2			Crack
MeHgAc	1	2			Crack
Mersalyl	1				Crack
5-Hg-Uridne	1	2	75.55	110.42	++ ○
EMTS	0.5*	2	75.75	110.14	↓ +
PhHgAc	0.5				Crack
MeHgCl	0.5*	2	75.68	110.28	++ ○
IrCl ₃	2	2	75.75	110.28	↓ + ●
K ₂ IrCl ₆	1.5	2	75.75	110.57	↓ +++ (Crack)
KOsOM ₂	0.4	1/2	75.68	110.70	↓ + (Crack)
Pb(NO) ₃	0.3	2	75.61	110.34	↓ ++ (Crack) ●
AcM ₃ Pb	1	2	75.61	110.57	+ (Crack)
K ₂ PtI ₆	1.5	3	75.05	109.3	+++
K ₂ Pt(CN) ₄	1	1			↓
NPtNO	2	2	74.83	110.70	↓ +++
K ₂ Pt(SCN) ₂	2	2	75.48	110.00	+ (Crack)
K ₂ PtCl ₄	1	2	75.75	110.14	↓ +

表4-4 高度好熱菌 *GlurS* の Orthorhombic III 型結晶の重原子リサーチ ↓は分解能の低下(矢印の長さは低下の程度)を, +は回折強度の変化の割合を, その右に回折強度の変化のパターンが同じものを同じマークで示した.*はsoakingの際に, さらに0.5 mM 2-mercaptoethanolを加えたことを示す. 略称は以下のとおり: Ph, Phenyl; Me, Methyl; AcM₃Pb, 酢酸トリメチル鉛; NPtNO, (NH₄)₂Pt(NO₂)₄; ox, oxaloacetate; PtN₂Cl₂, Pt(NH₃)₂Cl₂

	Concentration (mM)	Soaking Time(days)	Cell Constant		Intensity Change
			<i>a</i>	<i>b</i>	
$K_2[Pt(OX)_2]$	1	2	75.68	110.42	++ ▲
PtN_2Cl_2	1	2	75.48	110.42	+++ ▲
K_2PtCl_6	1	2	73.81	110.99	↓ +++
Ac_2UO_2	1/2 sat.	2	75.55	110.62	+ (Crack)
$K_3UO_2F_5$	0.5	2	74.96	110.14	↓ ++ (Crack) ■
$KUO_2(IO_3)_3$	1.5	4	75.75	110.14	↓ ± ■
$SmCl_3$	1	2	75.61	110.45	+++ □
$Eu(NO_3)_3$	1.2	2	75.61	111.02	++ □
$BaCl_2$	2	2	75.68	110.42	↓ ±

表4-4 高度好熱菌G1uRSの Orthorhombic III 型結晶の重原子リサーチ (続き)

Derivative	Cell Constant			Res.	Number of Reflections	% of Rejected Reflections	R _c merge before/after rejection	Isomorphous Differences (%)	Site
	a	b	c						
Native	75.749	110.09	67.566	3	13867	3.25	4.22/3.80		
K ₂ HgI ₄	76.015	110.72	67.639	6	1501	6.33	8.25/7.28	23.1/27.6	1
5-Hg-Uridine	75.908	110.64	67.492	3	12826	0.97	5.11/4.74	12.3/18.0	1
MeHgCl	76.162	110.70	67.511	3	12779	1.90	7.29/6.53	18.0/21.0	1
(NH ₄) ₂ Pt(NO ₂) ₄	75.618	110.40	67.537	3	9940	10.69	18.05/10.3	25.8/33.0	NI
K ₂ [Pt(OX)]	75.358	110.97	67.782	3	12518	1.85	6.61/5.82	17.8/23.7	NI
Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂	75.177	111.39	68.284	3	11171	0.97	8.17/7.53	8.17/7.53	(1)
K ₃ UO ₂ F ₅	75.724	110.84	67.567	3	11302	7.43	15.78/8.24	21.5/26.3	NI
SmCl ₃	75.627	111.39	67.400	3	10061	0.94	6.01/5.71	19.1/22.7	NI

表4-5 高度好熱菌G1uRSの Orthorhombic III 型結晶重原子置換体の data collection の統計 NIは非同形であったことを表す。

PEG conc. Initial Reservoir	Initial protein concentration (mg/ml)					
	5		20		25	
16%	4%	5%	3%	4%	2%	3%
18%	precip.	precip.	precip.	large crystal	precip.	small crystal
20%	precip.	small crystal	large crystal	middle crystal		middle crystal
22%	precip.	small crystal	precip.			
24%	small crystal	middle crystal				

表4-6 高度好熱菌単量体型MetRSの結晶化条件 precip.は precipitationの略.

	MetRS monomeric form	MetRS(dimeric form) +tRNA ^{Met}
Precipitant	PEG6000	PEG6000
Starting conc.	3%	8%
Reservoir conc.	19%	24%
Initial protein concentration (mg/ml)	20	5
Temperature	20	19
Hepes/NaOH buf. (mM)	100	50
pH	7.5	8.2
MgCl ₂ (mM)	0	3
tRNA (stoichiometry)	-	2.5
DTT (mM)	0.5	0.5
NaN ₃ (%)	0.02	0.02
Space-group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	-
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 82.4 <i>b</i> = 117 <i>c</i> = 67.0	-
V_m (Å ³ /Da)	2.78	-
Solvent content (% volume)	55.8	-

表4-7 高度好熱菌単量体型MetRSおよびMetRS・tRNA^{Met}複合体の結晶化条件

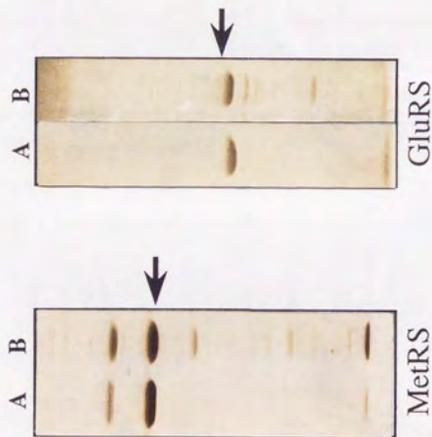
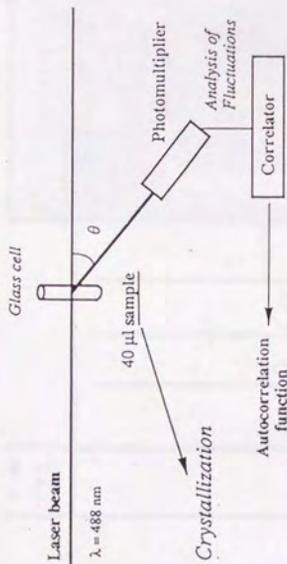


図4-1 T7 promoter制御下での高度好熱菌 *metS*, *gluX* 遺伝子の発現
 単量体型MetRS, GluRSを矢印で示す。A, 熱処理後; B, 粗抽出液。



For a single population of scatterers, the relaxation process can be fitted with a single exponential

$$G^{(2)}(\tau) = \exp(-2DK^2\tau)$$

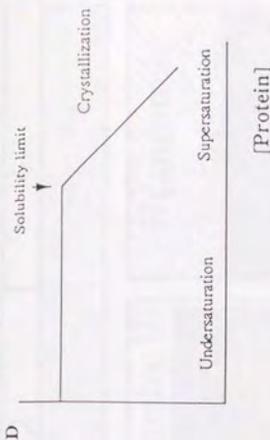
D translational diffusion coefficient
 K scattering vector
 $|K| = 4\pi n/\lambda \sin(\theta/2)$
 τ characteristic time

Translational (mutual) diffusion coefficient D

- Particle size (for spheres $R_{app} = knT/(6\pi\eta D)$)
- Interactions between particles
- Polydispersity of the sample

図 4-2 Light scatteringを用いた結晶化診断

Salt favouring crystallization



Salt favouring amorphous aggregation

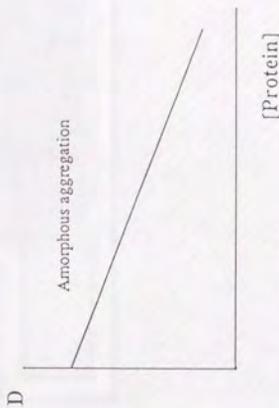


図 4-3 結晶化および変性沈殿に伴う拡散係数 D の挙動

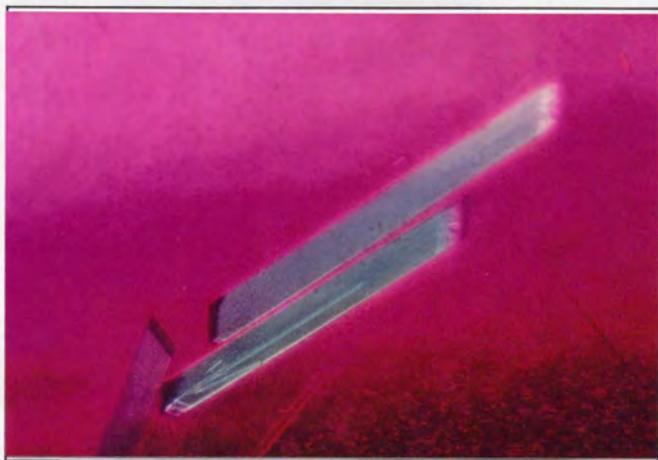


図4-5A 高度好熱菌GluRSの Orthorhombic I 型結晶の写真

C^*
 a^*

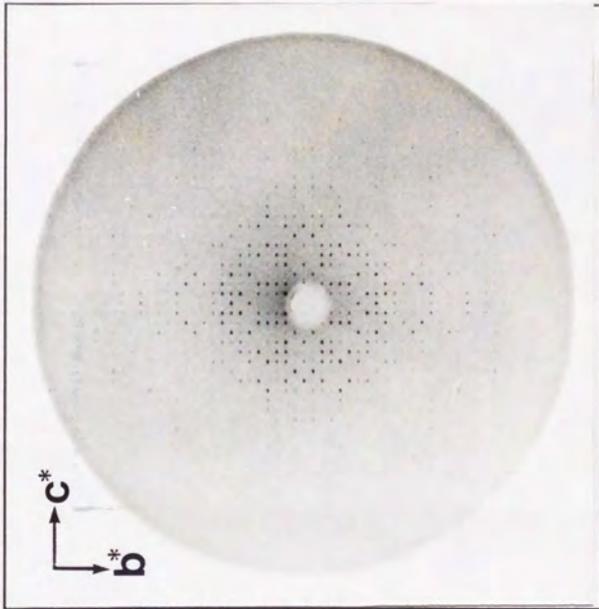
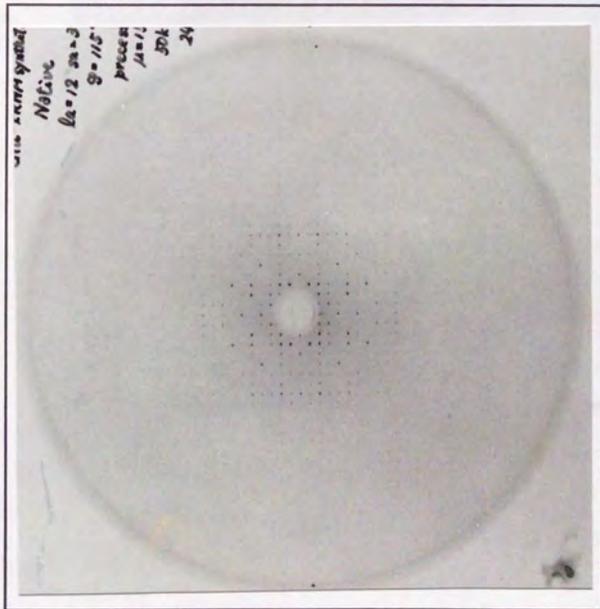


図4-5B 高度好熱菌G1uRSのOrthorhombic I型結晶のPrecession写真 (h0l)面(左)と(0kl)面(右)を示す。

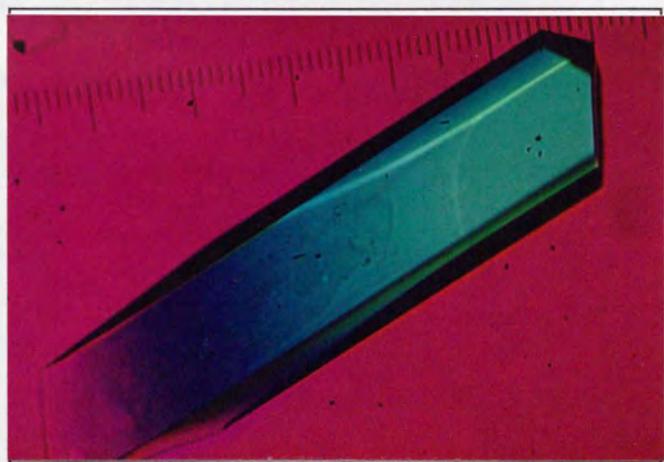
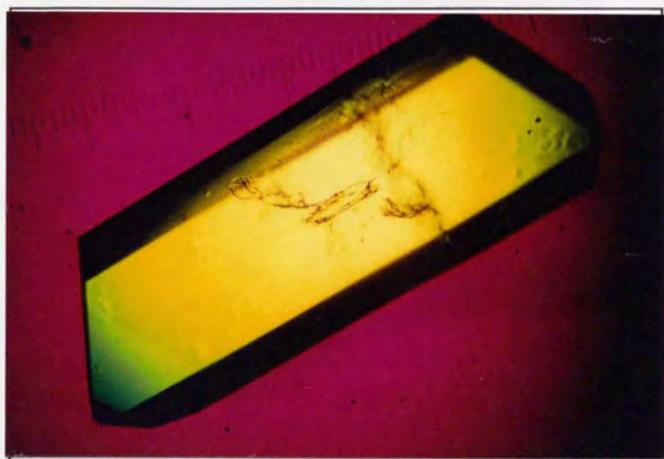


図4-6A 高度好熱菌GluRSの Orthorhombic II 型結晶の写真
写真中のスケールは、小さいメモリが $10\mu\text{m}$ に相当する。

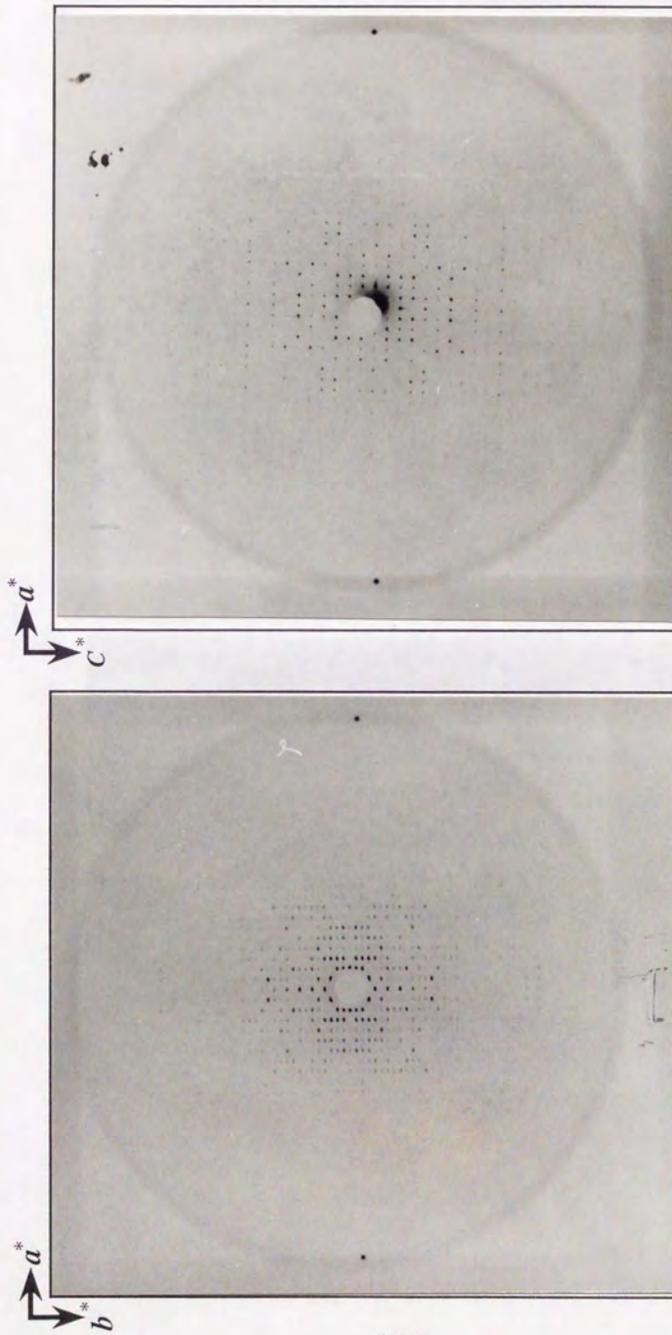


図4-6B 高度好熱菌GluRSのOrthorhombic II型結晶のPrecession写真 (hk0)面(左)と(h0l)面(右)を示す。

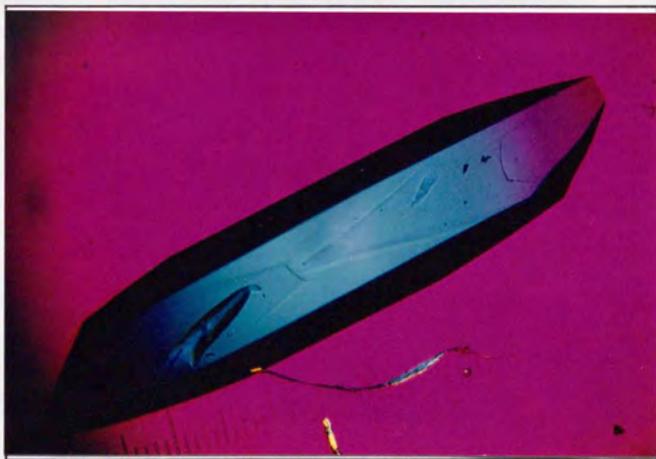
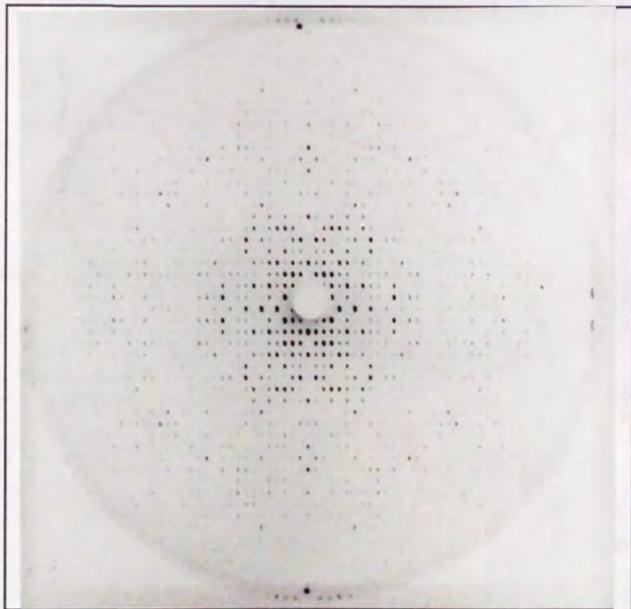


図4-7A 高度好熱菌GluRSの Orthorhombic III 型結晶の写真
写真中のスケールは、小さいメモリが $10\mu\text{m}$ に相当する。

a^*
 b^*



a^*
 c^*

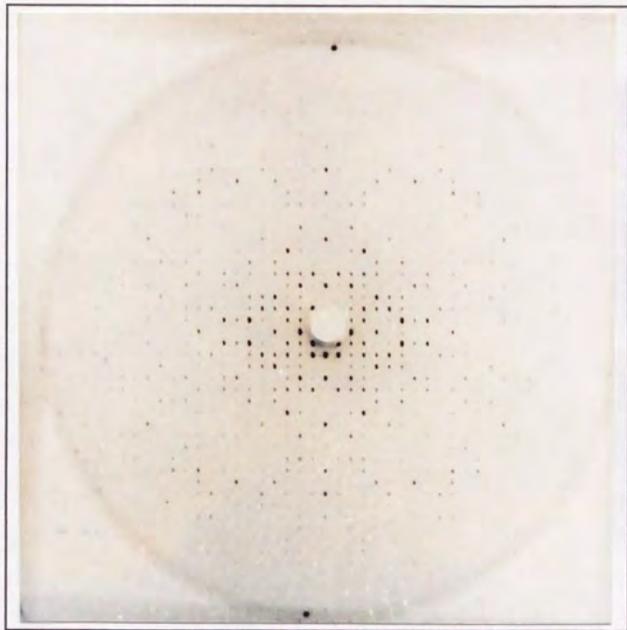


図4-7B 高度好熱菌G1uRSのOrthorhombic III型結晶のPrecession写真 (hk0)面(左)と(h0l)面(右)を示す。

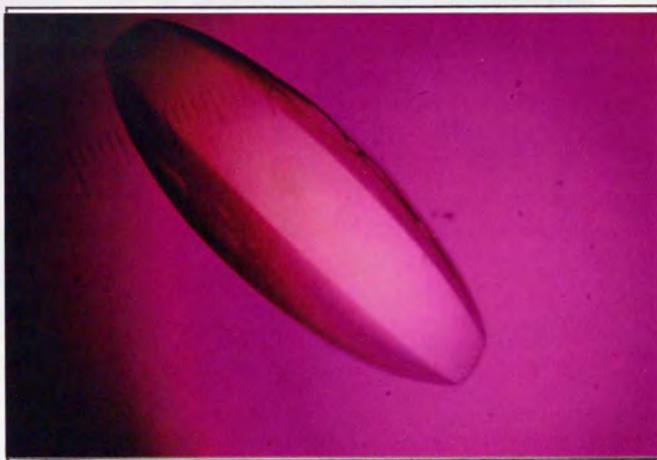
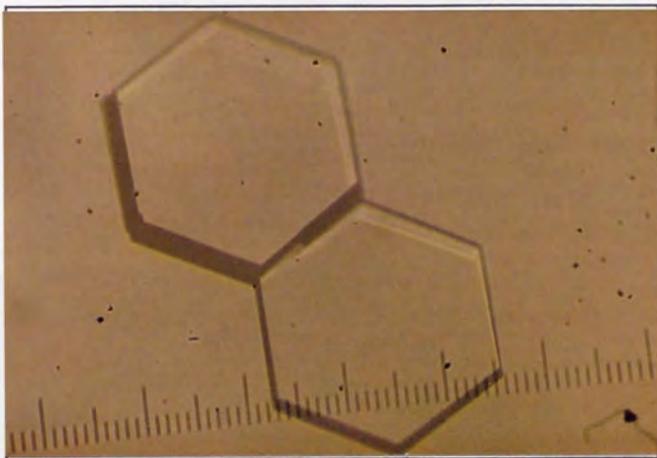


図4-8A 高度好熱菌GluRSのHexagonal型結晶の写真
写真中のスケールは、小さいメモリが $10\mu\text{m}$ に相当する。

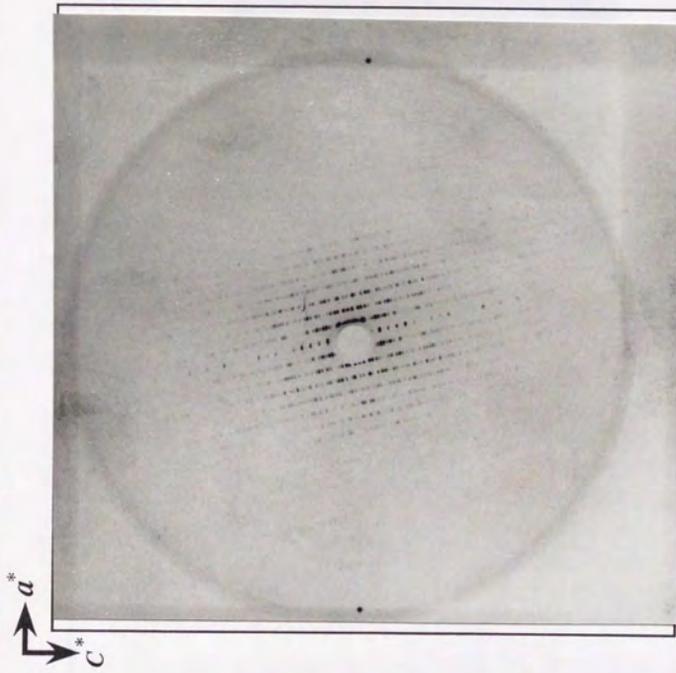


図4-8B 高度好熱菌G1uRSのHexagonal型結晶のPrecession写真(h0l)面を示す。

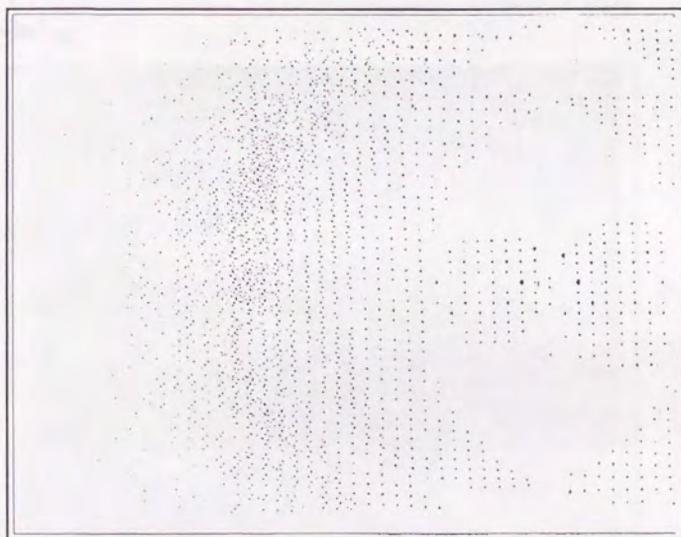


図4-9 高度好熱菌GluRSの Orthorhombic III 型結晶のワイゼンベルグ写真
筑波の高エネルギー研究所の坂部式巨大分子量ワイゼンベルグカメラを用いて撮影したもの。下は、
Imaging plateに感光された像をPATTERNで描いたもの。十分に高分解能までのdiffractionが観測される。

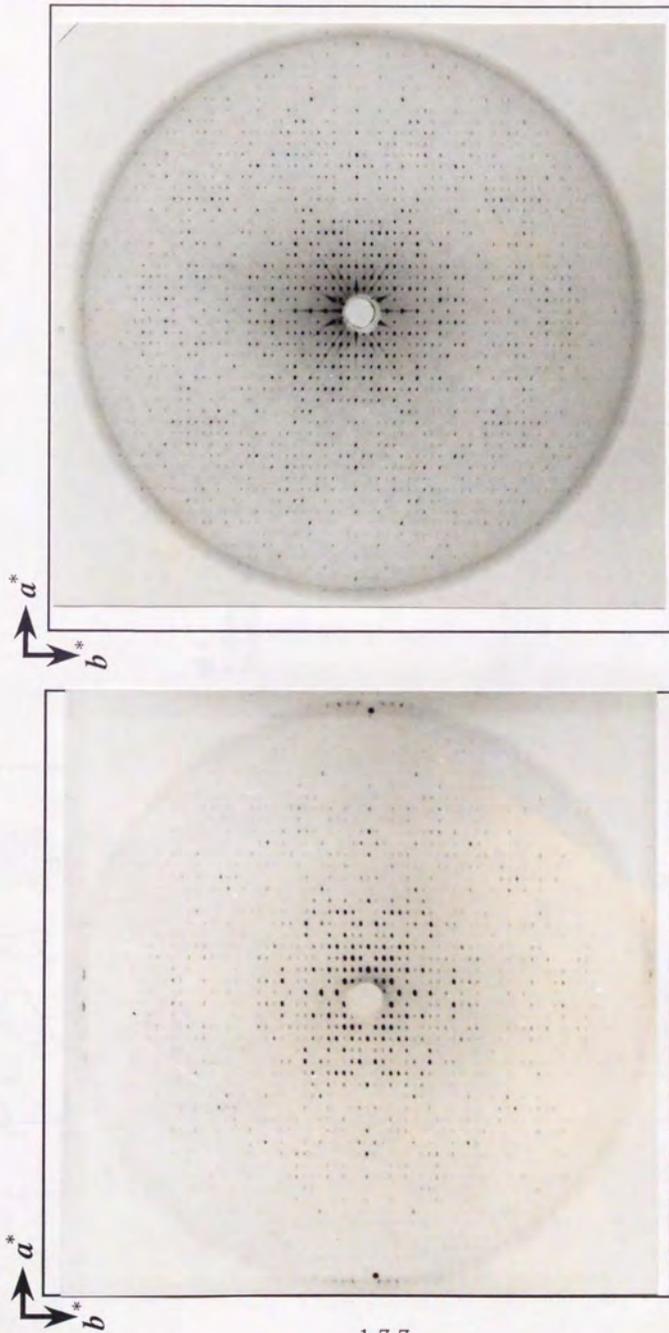


図4-10 G I u R Sの Orthorhombic III 型結晶の Precession 写真による重原子リサーチ 左からNative, methylmercuri chloride
 置換体の Precession 写真. 回折強度が変化しているのが観測される. 重原子の置換による分解能の低下は見られない.

図4-11 G1uRS Orthorhombic III 型結晶の 5-chloromercuri
uridine 置換体の Patterson map 6Åまでの分解能のmapを示す。空間
群がP2₁2₁2₁であるため、各切断面は 0-1/2の範囲のみを示してある。

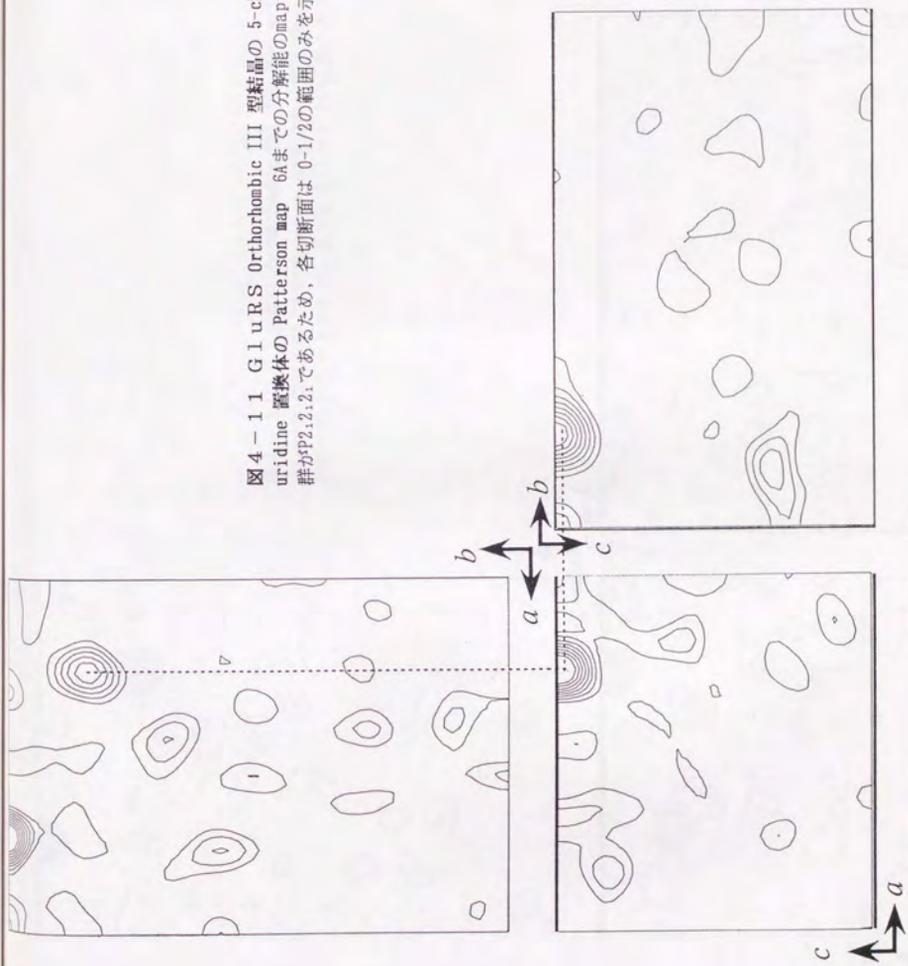
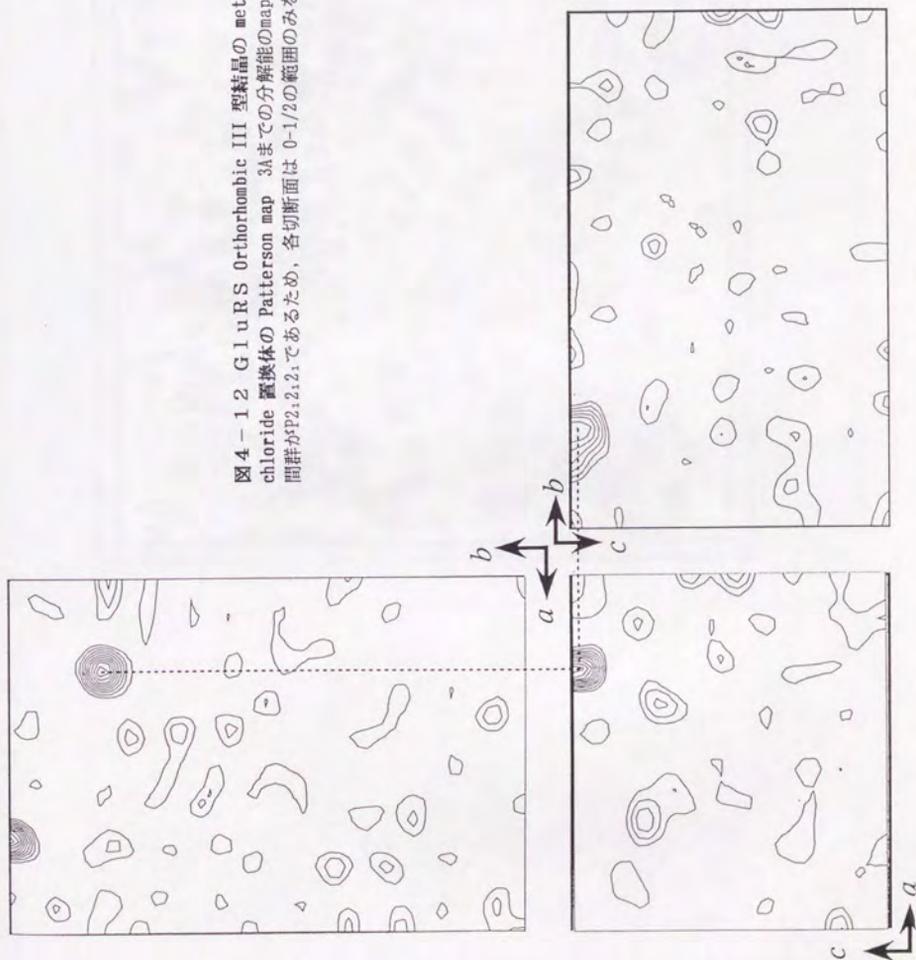
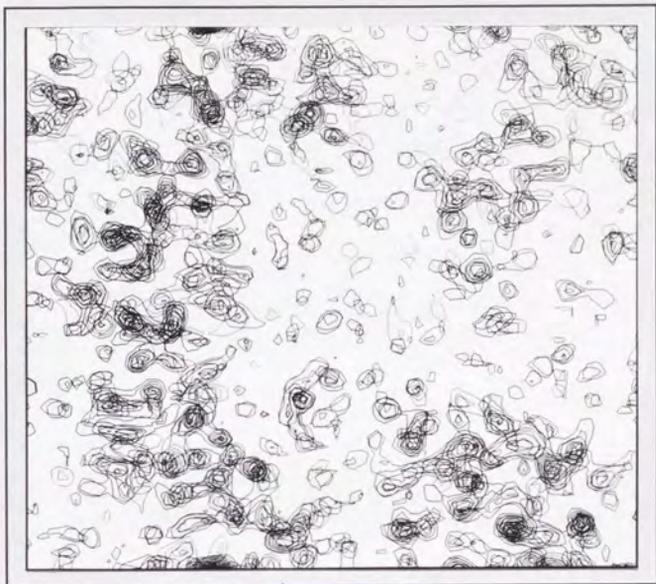


図4-12 G1uRS Orthorhombic III 型結晶の methylmercuri
 chloride 置換体の Patterson map 3Aまでの分解能のmapを示す。空
 間群が $P2_12_12_1$ であるため、各切断面は $0-1/2$ の範囲のみを示した。



Z



X

図4-13 高度好熱菌GluRSの電子密度分布図の一部 7Åの厚みに相当する分布図を重ね合わせたもの。タンパク質領域と溶媒領域の境界がはっきりしている。



図4-14 BONESによるGluRS電子密度分布図の解析
 真ん中の1つのかたまりがGluRS 1分子に対応していると思われる。



図4-16 高度好熱菌GluRSの電子密度分布図中に見られる α -helix 構造の一例
青く塗った部位が α -helixと思われる。

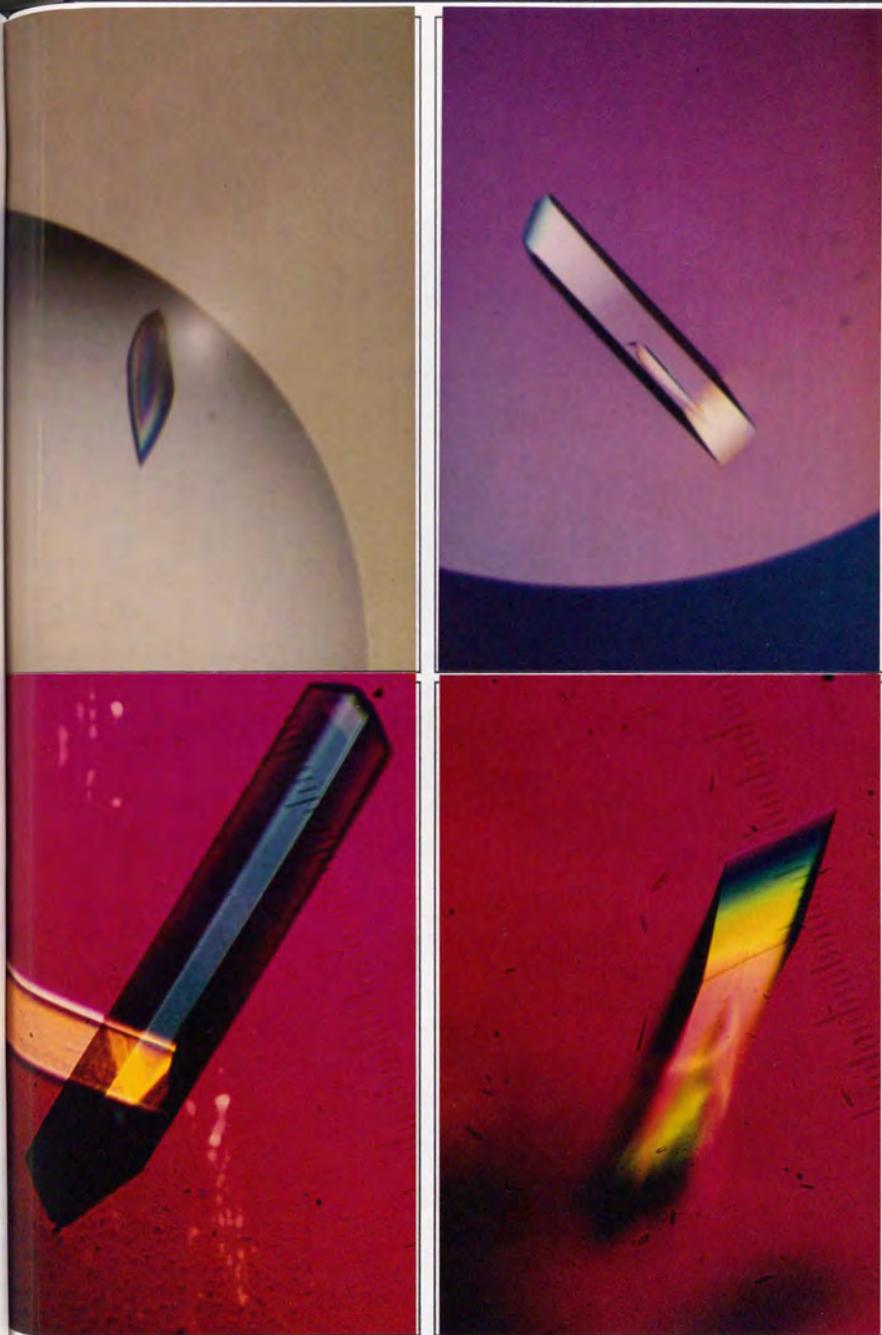


図4-17 高度好熱菌単量体型MetRSのいろいろな結晶
上の2つがdegradationによって単量体化して生成したMetRSの結晶, 下の2つが遺
伝子工学的的手法により調製した単量体型MetRSの結晶. 写真中のスケールは, 小さい
メモリが $10\mu\text{m}$ に相当する.

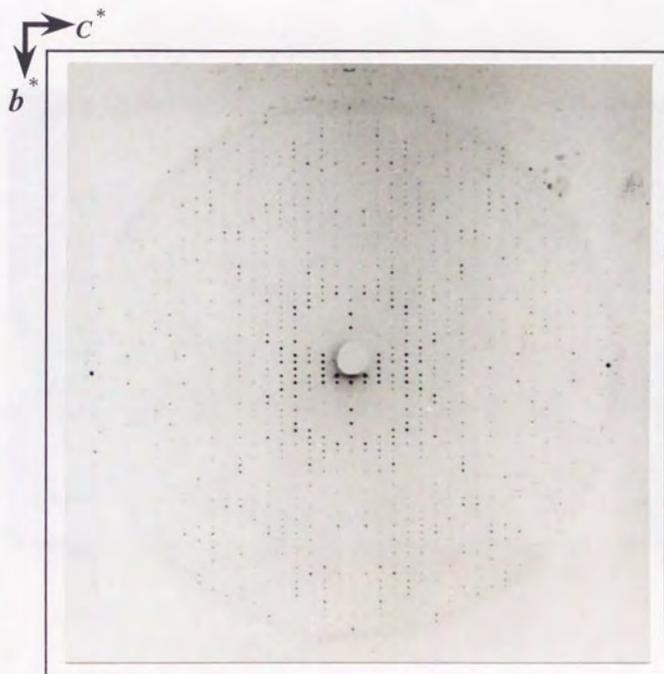


図4-18 高度好熱菌単量体型MetRSのP2₁2₁2₁型結晶の Precession写真 (h0l)面を示す.

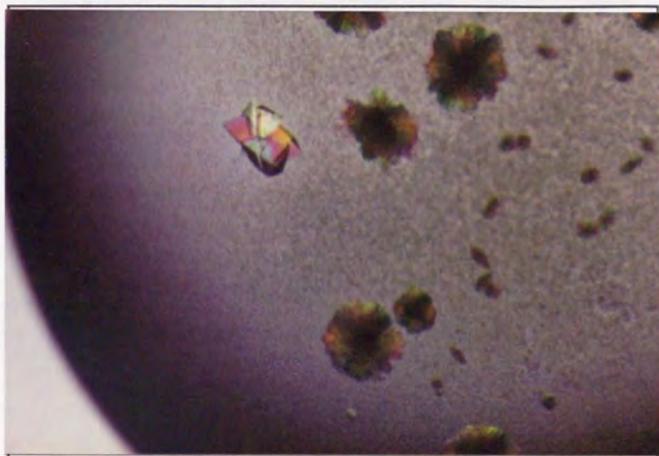


図4-19 高度好熱菌MetRSと大腸菌tRNA^{Met}の複合体の結晶

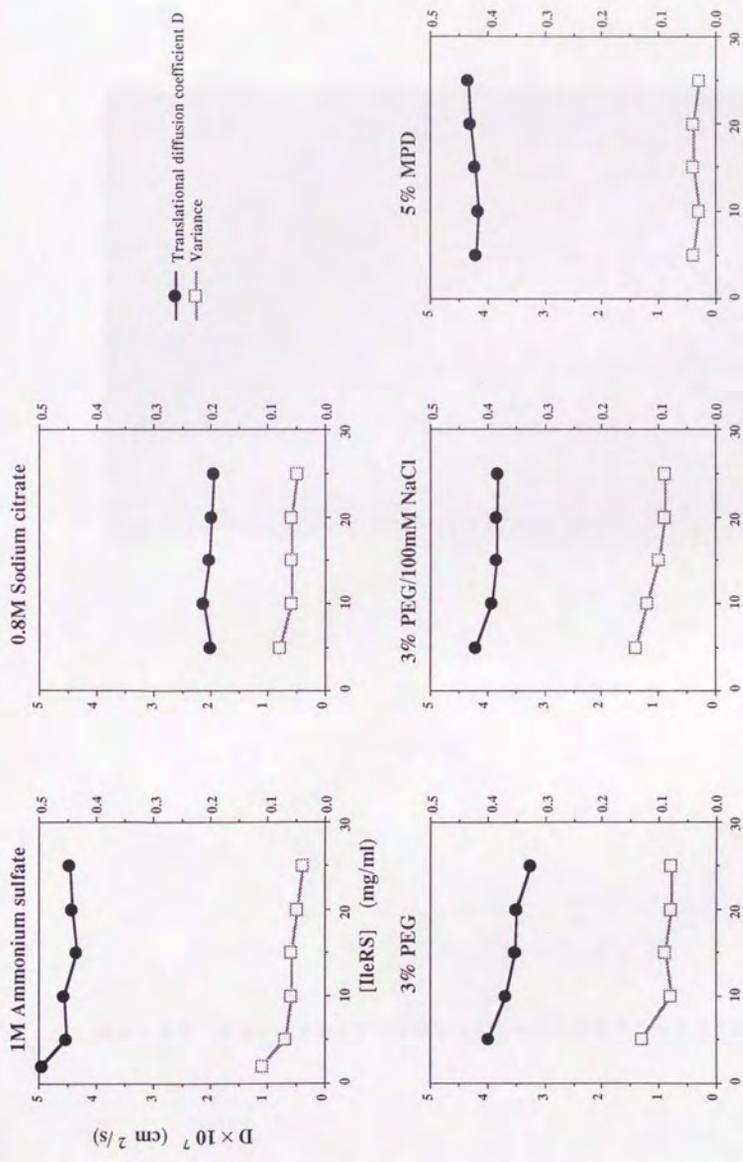


図4-20 大腸菌I1eRSのレーザー光散乱を用いた結晶化診断

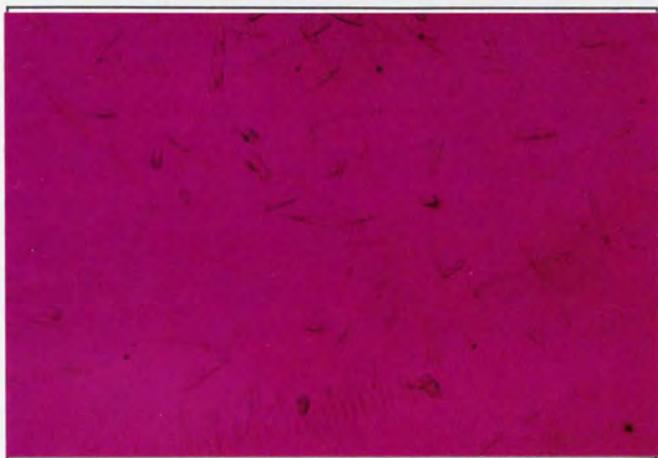


図4-21 ケエン酸ナトリウムを用いて得られた大腸菌IleRSの結晶

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

第5章

総合討論

本論文第1章の研究では、主に大腸菌 tRNA^{11a} について深く解析を行い、アイデンティティー決定因子とその IleRS による認識のメカニズムを明らかにした。この研究により、立体構造のレベルで tRNA がどのようにしてダイナミックな認識を受けるのかを明らかにすることができた。第2章の研究では、高度好熱菌 MetRS, GluRS, IleRS 遺伝子のクローニングに始まり、これらARSのアミノ酸配列解析およびそれに基づく変異体の速度論的解析を行うことによって、クラスIのARSについて新規の tRNA 認識部位を同定することができた。この結果クラスIの中でも特に同じサブクラスに属するARS (MetRS/IleRS/ValRS/LeuRS, およびGluRS/GlnRS) では、tRNA 認識部位の配置からそのアミノ酸配列にいたるまで、かなりの共通性が見いだされることが示唆された。第3章の研究では、第2章でのアミノ酸配列相同性に基づく解析とは別の視点から、ARSの持つZn²⁺結合モチーフに着目し、化学修飾と反応速度論的解析により、MetRS, IleRS, ThrRSのZn²⁺結合モチーフはtRNAの認識にも関わる極めて重要な部位であることを明らかにした。第4章の研究では、高度好熱菌MetRSおよびGluRSについて、2.5Åの高分解能を持つ結晶を作成することに成功し、さらにGluRSにおいては、重原子同形置換法により最初の電子密度分布図を得て、この結晶が十分に解析可能であることを示した。従って、この研究をさらに進めてこれらのARSの高次構造を決定し、第2章および第3章で得られた機能面での知見とつき合わせることで、ARSによるtRNA認識の機能・構造相関をいっそう明確にしていくことができると期待される。また、これらARSの結晶化を通じて得られた結晶化自体に関する様々な技術は、今後他のARSやさらに別の高分子量タンパク質の結晶化にも活かされるであろうと考えられる。

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、グルタミン酸の系を並行して用い、体系的な解析を行なうことをめざした。このことは結果的に有利であったと思われる。すなわち数例を挙げるなら、tRNA^{11a}では、その塩基修飾がアミノ酸受容活性に必須であり、グルタミン酸の系だけを用いていたのでは、*in vitro*転写物の反応速度論的解析は不可能であった。またIleRSの結晶化は非常に困難であり、これだ

けに執着しては解析が進展しなかったであろう。また、メチオニンの系に関しては、他のグループによる研究結果の膨大な蓄積を基礎とすることができた。さらにすべての系を通じて、高度好熱菌の系を用いることで、変異体の反応速度論的解析や結晶化を有利に進めることができたものと思われる。IleRS, MetRSおよびGluRSは近縁のARSであったため、お互いに他の系で得られた知見に基づいて検討を行うことで、本研究の目的を遂行することができたと思われる。

本章では、まず、本研究で新たに得た知見をこれまでに他のグループによって明らかにされている研究成果と対比させて、ARSによるtRNAの認識・識別機構を総括的に議論する。さらに、本研究を通じて提起された一つの問題点を発展させて、ARSの分子進化について自分なりの仮説を立ててみたい。

tRNAのアイデンティティー決定因子

本研究の意義を明確にする意味で、tRNAのARSによる認識機構に関する研究が、国際的にどのように進められてきたかをここで再度振り返ってみたい。

1980年前半までは、UVによるクロスリンク解析やRNaseプローブを用いたフットプリンティング解析が行なわれ、tRNAのどの領域がcognate/noncognateなARSと相互作用するのかが調べられた [Schoemaker et al., 1975; Ebel et al., 1979]。同じtRNAについてもARSが異なると相互作用する領域が異なるため、ARSごとにtRNAに対する相互作用の仕方が異なっており、このARS側の性質によってtRNAの厳密な識別が行なわれていると考えられていた [Ebel et al., 1979]。さらに中性子散乱を用いた解析によって、tRNAと結合するとARSの構造が変化することが明らかになると [Zaccai et al., 1979]、ARSが構造変化することによってcognateなtRNAを厳密に認識していると考えられるようになった。tRNAの一部の変異によってアミノ酸受容活性が失われても、それは、この変異体tRNAに対するARSの結合の仕方が変わって、3'末端のAがARSの活性部位に適切にはまらなくなったからであると結論されていたのである。

1980年代後半に、少数のヌクレオシドの置換によってtRNAのアミノ酸特異性が変換されてしまうこと [Normanly et al., 1986; Muramatsu et al., 1988b; Hou & Schimmel, 1988; McClain et al., 1988; McClain & Foss, 1988a; McClain & Foss, 1988b] が見いだされたのは、tRNA・ARS研究の転換点であった。すなわち、ARSはtRNA全体

の構造的特徴を認識しているのではなく、tRNAの少数かつ特定のヌクレオシド（アイデンティティー決定因子）を見ていたのである。これを機に国際研究の関心事はtRNAにうつり、図5-1に示されるように、様々なtRNAについてその特徴的な因子が同定されてきたのである。その結果、アイデンティティー決定因子は主に2つの領域に集中していると考えられた。その1つは、tRNA^{Met}、tRNA^{Val}、tRNA^{Ile}で最初に見いだされた [Schulman & Pelka, 1988; Muramatsu et al., 1988b] アンチコドンであり、他の1つは、tRNA^{Asp} [Hou & Schimmel, 1988; Franklyn & Schimmel, 1990a; McClain & Foss, 1988; McClain et al., 1988] やtRNA^{His} [Himeno et al., 1989; Franklyn & Schimmel, 1990] で最初に見いだされたアクセプターステムの先端であった。tRNA^{Gly} [McClain et al., 1991] やtRNA^{Gln} [Jahn et al., 1991] はこれら両方の領域にアイデンティティー決定因子を持つことが明らかになった。さらに、tRNA^{Arg} [McClain & Foss, 1988b; McClain et al., 1990] やtRNA^{Phe} [Sampson et al., 1989] でDループ(20番)に特徴的なアイデンティティー決定因子が見つかること、ARSはtRNA上の一本鎖の領域にある特徴的なヌクレオシドを認識している、というのが当時の共通した見解になった。図5-1に示したアイデンティティー決定因子のほとんどは、この作業仮説に基づいてそれぞれのtRNAに特徴的な残基に着目し、これに変異を導入して、*in vitro*および*in vivo*でのアミノ酸受容活性を調べることで明らかにされたものである。

さらに大腸菌のtRNA^{Gln} [Rould et al., 1989, 1991] と酵母のtRNA^{Asp} [Ruff et al., 1991] でARSとの複合体のX線結晶構造解析が成功し、これらの系について原子レベルでのtRNAの認識機構が明らかになった。その結果、これらのARSはアンチコドンやアクセプターステムといったmajorな部位だけでなく、Dステムのようなminorな部位をも認識していることが示唆された。これらの構造的な知見に基づいて体系的な変異体解析が行なわれ、tRNA^{Gln} [Jahn et al., 1991]、tRNA^{Asp} [Putz et al., 1991] について、アイデンティティー決定因子セットが明らかになり、これらの系のARSによる認識の機能・構造相関が解明された。また、アンチコドンループやアクセプターステムの認識に伴って、これらのtRNAにはlocalであるが特徴的な構造変化が起こっていることが明らかになったのである。

本研究は、大腸菌tRNA^{Ile}のIleRSによる認識機構を構造と機能の両面から解明することを目的としたものである。イミノプロトンのNMRによる解析(本研究室新美らによる)では、ステム領域などの水素結合がIleRSとの結合によってどのように構

造変化を起こすかが明らかになった。さらに、感度のよい chemical probe を用いたフットプリンティング解析によって、tRNA^{11*}のどの領域が IleRS と相互作用し、またどこが構造変化を起こすかが明らかになった（特に本研究の N-nitroso-N-ethylurea を用いたフットプリンティング解析の結果は、他の系で従来報告されている結果と比べても、かなり clear なものである）。また、体系的に tRNA^{11*}の変異体（35個所の部位について61種類の変異体）を作成し反応速度論的解析を行なうことで、tRNAのどの残基が functional に重要であるかが明らかになった。以上のように、これら独立な3つの解析からは質的に異なる情報が得られるが、これらを組み合わせることで、tRNA^{11*}のアイデンティティー決定因子セットを矛盾なく決定し、また IleRS による動的な認識機構のモデルを構築することができたことを、本研究は示している。すなわち、tRNA^{11*}は、他の多くの tRNA で認識部位になっているアンチコドンおよびディスクリミネーターの他に、U12, G41, G69 といった、それぞれ D ステム、アンチコドンステム、アクセプターステムの、しかも中央に、IleRS による認識部位を持っていた（図1-17, 図5-1）（アイデンティティー決定因子がステムの中央に存在することを明確に示したのは、本研究がおそらく最初である）。さらに詳細な変異体解析の結果、IleRS は、U12 については D ステムの minor groove 側からフリーの 2-カルボニル基を認識しており、一方 G41 や G69 についてはステムの major groove 側から 6-カルボニル基および N-7 位を認識していることが示唆された（図1-15）。そして IleRS が major groove の深い溝に埋もれたこれらの官能基を認識することが、アンチコドンステムおよびアクセプターステムの unfolding という local な構造変化と実に良く対応しているのである（図1-25）。これに対し、tRNA^{11*}分子中に散在するアイデンティティー決定因子が余すことなく IleRS と接触して認識を受けるために、tRNA の L 字型構造が歪むような global な構造変化が起こることが必要だったわけである（図1-26）。

tRNA^{01*} [Rould et al., 1989, 1991] や tRNA^{4*} [Ruff et al., 1991] でも、ARS は major groove 側からアイデンティティー決定因子を認識しており、このためこれらの tRNA 上の認識部位は大きな構造変化を起こした。しかし、これらの系ではアイデンティティー決定因子が主に tRNA の両端に局在していたため、その構造変化は local なものにとどまったと考えられる。

本研究では tRNA^{11*}変異体の反応速度論的解析を体系的に行なったが、この結果を同様な解析が報告されている大腸菌 tRNA^{01*} [Jahn et al., 1991]、酵母 tRNA^{4*}

[Putz et al., 1991], 酵母およびヒトの tRNA^{Phe} [Sampson et al., 1992; Nazarenko et al., 1992] の結果と比較検討することにより, 次の様な傾向が明らかになってきた. すなわち tRNA の L 字型の両端に位置するアンチコドンとディスクリミネーターは K_m よりも主に k_{cat} に効いており, さらに L 字の内部に近づいたアンチコドンステムやアクセプターステムのアイデンティティ決定因子では k_{cat} より K_m に効く様になり, L 字の支点に位置する D アームのアイデンティティ決定因子では K_m にかなり比重が移っているということである.

1970年代においても, tRNA によるARSへの結合とARSの活性化は分けて考えられていた. それは, 酵母の tRNA^{Phe} や tRNA^{Val} のいろいろな領域を除去すると, アミノ酸受容活性は失われるが, cognate なARSに対する結合親和性は変わらなかった [Bonnet et al., 1975a, b; Beltchev & Grunberg-Manago, 1970; Horz & Zachau, 1973] という実験事実に基づいている. さらに, この tRNA^{Phe} の3/4分子は, m⁷G46の修飾を除いても tRNA の構造をflexibleにすると, アミノ酸受容活性が復活したのである. このことから, cognate なARSに対して tRNA のいろいろな領域が独立に結合することで, ARS に対する特異的な結合が実現され, その結果CCA末端がARSの活性部位に適切におさまると, ARSが活性化されてアミノアシル化反応が起こると解釈された.

先に述べた傾向にもあったように, tRNA のアンチコドンがARSに対する結合よりもその活性化に働いていることは, 国際的にコンセンサスとなってきた [Jahn et al., 1991; Schulman, 1991]. 本研究のミニヘリックス, マイクロヘリックスを用いた研究結果は, このことを如実に示している. すなわち, tRNA^{Val} のミニヘリックスは, intactな tRNA 分子と同程度の affinity で I 1 eRS と結合するが, アミノアシル化反応の k_{cat} は著しく小さい (図1-19) (このことは, 1970年代の tRNA 部分分子を用いた実験結果とよく一致する). しかし, これにアンチコドンアームを別に合成して加えてやると, ミニヘリックスの受容活性が上昇するのである (図1-24). 同様の結果は, 酵母 tRNA^{Val} についても報告されている [Frugier et al., 1992].

以上のことより, tRNA は L 字の支点でしっかりとARSに結合し, 両端のアンチコドンとディスクリミネーターが特異的にARSと結合することにより, そのシグナルがARS側の構造変化を介してARSの触媒中心に伝わり, これを活性化するという普遍的なメカニズムがあると考えられる. さらに, 前述のとおり, 各 tRNA はアイデンティティ決定因子の位置をずらしたり, 比重を変えたり, 塩基修飾を導入することで, 他の

tRNAから識別される機構を作っていると考えられる。そして本研究のtRNA^{11*}の系で示された様に、そのアイデンティティー決定因子の分布の仕方によって、これに対応した巧妙な構造変化がtRNA側に生じ、ARSによる動的な認識を受けることになるのであろう。表5-1に、これまでフットプリンティング解析やX線結晶構造解析により明らかになった、様々なtRNAのARSによる結合様式をまとめてある。tRNAがアイデンティティー決定因子の位置をずらしたり比重を変えるのにもなって、ARSは最も効率よく認識が行えるようにtRNAに対するorientationを変えていると考えられる。

本研究では、NMR、フットプリンティング、反応速度論的な変異体解析を組み合わせることで、tRNA^{11*}の認識部位を明らかにした。しかし厳密な意味では、IleRSによるこれらのアイデンティティー決定因子の直接の認識を見たことにはならない。大腸菌のtRNA^{Gln}や酵母のtRNA^{Asp}では、反応速度論的な解析から、G10がアイデンティティー決定因子であると考えられた [Jahn et al., 1991; Putz et al., 1991]。しかし複合体のX線結晶構造解析の結果、確かにtRNA^{Gln}についてはG10はGlnRS側のグルタミン酸残基と水素結合を作ることによって認識を受けていた [Rould et al., 1991; Hayase et al., 1992] が、tRNA^{Asp}のG10は base-specificな認識は受けていなかったのである (Dr. Moras私信)。tRNA・ARS複合体の分子量は非常に大きいので、NMRによってこれら分子間のNOEを観測してtRNAの塩基とARSのアミノ酸残基の直接の相互作用を明らかにすることは困難である。したがって、大腸菌のIleの系についても、複合体のX線結晶構造解析を実現し、片やARS側の(変異体)解析を行なうことが重要である。本論文第2章以後の研究はこのアプローチを進めたものである。

さらに、本研究では、転写後修飾のないin vitro転写物を用いて機能面での解析を進めた。しかし、現にtRNA^{11*}では、その塩基修飾がアミノ酸受容活性に重要である(1.3.3)。したがって、今後は、tRNA^{11*}遺伝子を大腸菌で大量発現させて、修飾の入ったtRNA^{11*}を調製する系を構築し、変異体の解析を行なうことも重要であると考えられる。次項では、転写後修飾の持つもう一つの重要な役割を付け加えておきたい。

tRNAの識別機構

in vitroでの解析と異なり、細胞中(in vivo)には、cognateなARSのみならずnon-cognateなARSも存在するため、tRNAのチャージをめぐる一種の競争が起こると考えられる。従って、in vivoでは、そのtRNAの持つ最も強い決定因子がそのアイデ

ンティティーを決めると言われている [Jahn et al., 1991] . Pallanckらは $tRNA^{Met}$ のアンチコドンを変えた変異体を大腸菌で発現させ、そのアンチコドンに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入るかを解析した [Pallanck & Schulman, 1991] . この結果、アンチコドンを GAU にした場合、84% は Ile で残りの 16% は Met が取り込まれ、GAC にした場合、100% Val が取り込まれ、GAA にした場合、76% は Phe、21% は Met、後の 3% は Ile が取り込まれた。この解析の結果、 $tRNA^{Ile}$ と $tRNA^{Phe}$ ではアンチコドン 3 残基が positive なアイデンティティ決定因子であり、 $tRNA^{Val}$ ではアンチコドン 2 字目 3 字目が positive determinant であると結論された。アンチコドンを GAU にしても Met が 21% も取り込まれたのは、本研究の $tRNA^{Ile}$ のアイデンティティ決定因子に関する解析結果を考慮に入れば、 $tRNA^{Met}$ には U12、G41、G69 といった IleRS に対する determinant が欠けていることにより IleRS の認識が弱まっており、またこの変異体 $tRNA^{Met}$ が MetRS に対する他の positive determinant (G2-C71, C3-G70) [Martins & Schimmel, 1992] をまだ持っていたことにより MetRS に認識されたために、競争が起きた結果であろう。このことから、前項で示したような minor なアイデンティティ決定因子も *in vivo* で確かに機能していることが推測される。

しかし、さらに *in vivo* では、 $tRNA$ が noncognate な ARS に認識されないための negative determinant [Perret et al., 1990] が重要な意味を持つてくると考えられる。本研究の結果を考慮するなら、上記の Pallanck らの実験結果に関しても、 $tRNA^{Met}$ (GAU) の G4-C69 が IleRS に対する negative determinant になっていたのではないかと考えられる。なぜなら、 $tRNA^{Ile}$ で C4-G69 を U4-A69 にしてもアミノ酸受容活性は落ちなかったが、G4-C69 にしたときのみ活性が低下したからである (表1-2)。 $tRNA^{Met}$ と $tRNA^{Ile}$ の間で、これらアクセプターシステムにおける各々の positive determinant が互いに他の系に対する negative determinant になっていることは、本研究室の館野によるニューラルネットワークを用いた計算によっても推測されている (館野, 未発表)。さらに、この negative determinant について、ここに一つの実験結果を追加し、これを題材に議論を進めてみたい。

図5-2に、 $tRNA^{Ile}$ 、 $tRNA^{Met}$ および $tRNA^{Ser^{TCT}}$ (図1-20) の *in vitro* 転写物について、いろいろな ARS でミスチャージを行なった実験結果が示してある。この $tRNA^{Ser^{TCT}}$ は大腸菌および高度好熱菌の IleRS でチャージされたが、同時に

SeRSによっても効率よくアミノアシル化を受ける, dualidentityを持つtRNAであった. すると, tRNA^{11*}のin vitro転写物はPheRSによってかなりの効率でPheをミスチャージされることがわかったのである(図5-2). 修飾の入ったmatureなtRNA^{11*}ではこれほどのミスチャージは観察されなかった. さらにtRNA^{5**}のin vitro転写物はPheRSによってミスチャージを受けなかったが, tRNA^{5**+11*}ではわずかではあるが再びPheRSのミスチャージを受けるようになったのである(図5-2). 従って, tRNA^{5**}に移植した11残基(図1-20)にはPheRSに対するアイデンティティー決定因子が含まれていたこと, さらにmatureなtRNA^{11*}の修飾塩基のいずれかがPheRSに対するnegative determinantとして働いていることが示唆される.

まず前者については, アンチコドンの3残基(GAA)がtRNA^{P^h*}のアイデンティティー決定因子であることから[Pallanck et al., 1991](図5-1), tRNA^{5**+11*}がG34, A35を持つことでPheRSによって認識されたものと思われる. 一方後者については, matureなtRNA^{11*}の転写後修飾のうち, t^oA37以外はtRNA^{P^h*}に含まれるため, t^oA37がPheRSに対するnegative determinantであることが示唆される. すなわち, tRNA^{11*}のt^oA37はIleRSに対するpositive determinantである(1.3.3)と同時に, PheRSに対するnegative determinantとしても働いていると考えられる.

このtRNAの37位の塩基修飾は36番の残基に依存して決まっていると考えられる[Nishimura, 1987]ため, Pallanckらの行なったin vivoでの実験では, tRNA^{4**}(GAU)の37位はt^oAになっており, tRNA^{4**}(GAA)の37位はms²i^oAになっていると思われる. このため, tRNA^{4**}(GAU)はIleRSではチャージされてもPheRSではチャージされなかったものと考えられる.

tRNA^{11*}のU36はAに置換されると活性が著しく低下するが, GやCに置換されてもさほど活性は低下しない(表1-2). このことから, tRNA^{P^h*}側の36位のAはIleRSに対するnegative determinantである可能性があると考えられる. しかし, それ以上にこの実験結果からは, むしろtRNA^{11*}のU36は37位をt^oAにするのに働いており, これによってIleRSによってpositiveに認識されるのを促し, 一方PheRSによる認識を防いでtRNA^{11*}のアイデンティティーを保証していると考えられる.

さらに考察を広げるために, tRNA^{11*}のアンチコドンGAUと2残基を共有するアンチコドンを持ったtRNAを抜き出してみた(表5-2). すなわち, コドンXUXに対合するtRNA^{P^h*}(GAA), tRNA^{1/2**}(GAG), tRNA^{M**}(CAU),

tRNA^{Val} (GAC), およびコドンAXXに対合するtRNA^{Thr} (GGU)とtRNA^{Ser} (GCU)である。これらのtRNAに対応するARSのうち、PheRSは上記の理由でtRNA^{Leu}により排除される。LeuRSとSerRSはアンチコドンをも全く認識していない(他の部位にpositive determinantがある)(図5-1)。MetRSはC34を、ValRSはC36を、ThrRSはG35を非常に積極的に認識する(図5-1)ことで、tRNA^{Leu}に対するミスチャージが防がれていると考えられる。

転写後修飾がnegative determinantである例は酵母のArgRSに対するtRNA^{Arg}の例でも見られる現象である[Perret et al.,1990]。以上の様なin vitro転写物のミスチャージの実験を体系的に行ない、Pallanckらの行なったようなin vivoの解析と組み合わせることによって、修飾塩基が加味されたtRNA識別機構のネットワークが解明されると考えられる。そして、おそらく細胞内では、tRNAのmajor determinantが積極的にARSに認識されるだけでなく、minor determinantの認識や、negative determinantによる排除機構に裏づけられた非常に巧みな機構によって、tRNAのアイデンティティが保証されているのであると考えられる。

ARS側のtRNA認識機構

前述のように、tRNAのアンチコドンが結合することによってARSは活性化されることが明らかとなってきた。このようなメカニズムを解明し、ARSによるtRNAの動的な認識機構をさらに明らかにするためには、ARS側のtRNA(特にアンチコドン部位)の認識部位に関する研究が重要な意味を持つてくる。

tRNAは溶液中で共通のL字型3次構造をとっていると考えられるので、この構造に基づいて変異体を作成し、反応速度論的解析を進めることができた。これに対し、ARSは、分子量やサブユニット構造もまちまちであり、ARS間でのアミノ酸配列の相同性も低い。さらに、X線結晶構造解析により3次構造が明らかになっているARSは、大腸菌由来のMetRS, GlnRS, SerRS, 中等度好熱菌のTyrRS, 酵母のAspRSのわずか5例であり(図5-3)、ARSの構造に関する情報は絶対的に乏しい。従って、ARSのtRNA認識部位も数例を除いてはまだほとんど明らかにされていない。本論文第2章の研究と対比させる意味で、その数例の研究をここに紹介しておく必要があると思われる。

まず、大腸菌MetRSについて、SchulmanらがtRNA^{Met}とのクロスリンク解析を

行ない [Hountondji & Blanquet, 1985; Valenzuela & Schulman, 1986; Leon & Schulman, 1987a, b, c; Schulman et al., 1987; Hountondji et al., 1990], この結果に基づいて変異体の反応速度論的解析を行ない, Trp-461がアンチコドン1字目のC34を認識していることを示している [Gohsh et al., 1990]. さらに大腸菌MetRSおよび中等度好熱菌のTyrRSに関しては, ARS単独の結晶構造が得られているので, これに基づき表面に出ているLysおよびArg残基に変異を導入し, 反応速度論的解析を行うことによって, tRNAの認識部位を明らかにした研究がある [Gohsh et al., 1991; Bedouelle & Winter, 1986]. これに対し, 結晶構造の知見が得られていない大腸菌AlaRSやGlyRSでは, 酵素のdeletion mutantを作成し反応速度論的解析を行うことによって, tRNAの認識に関わる領域(ドメイン)を同定することから研究を始めている [Regan et al., 1987; Matthew & Schimmel, 1990]. 最近になって, 大腸菌GlnRSと酵母AspRSの系でtRNAとの複合体の結晶構造が高分解能で明らかになってはじめて, アイデンティティ決定因子とそれを認識するアミノ酸残基の1対1の対応がつく例が現れてきた [Rould et al., 1991; Dr. Moras私信]. GlnRSの系での一例を図5-4に示す. tRNA^{Gln}のアンチコドン2字目のU35の認識には, GlnRSのC端側ドメインの β -barrelをつなぐ複数のループから様々なアミノ酸残基が集まってきて認識部位を形成している [Rould et al., 1991]. しかしこれまでのところARSのtRNA認識構造に関しては以上のような各論的・断片的な解析結果の蓄積はあるものの, これを統一的に把握できる段階には至っていない. 1990年に大腸菌のすべてのARSの1次構造が明らかにされ, ErianiらがARSのクラス分けを提唱した [Eriani et al., 1990] のは, ARS研究の一つの革命であったと言える. これにより, ATP結合様式を分子進化の一つの指標としてクラスごとにARSの1次構造を統一的に比較検討できる道が開かれたと思われる.

以上が, 本論文第2章の研究にいたるまでの, ARSのtRNA認識機構に関する国際的な研究の系譜である. 本論文第2章の研究の特徴は, クラスIのARSに着目しMetRS/IleRS/ValRS/LeuRS/CysRSの作るサブファミリー, GluRS/GlnRSの作るサブファミリーについて, 統一したsequence alignmentを行い (図2-8, 13) (MetRSサブファミリーに関しては [Shiba & Schimmel, 1992] を参照), これに基づいて作成した変異体の反応速度論的解析を行って, 新規のtRNA認識部位を明らかにした (図2-8, 13, 14) ことである. その結果, クラスIのARSは, KMSK配列を境界にして, 機能的に大きく2つのドメインに分かれていることがわかった. N端側

のドメインには、ATPを結合するRossmann fold構造が存在するが、この構造は3つに分断されており、その間にConnective Polypeptide I, II (CP I, II)と呼ばれる2つのループ領域が挿入されている [Shiba & Schimmel, 1992]。GlnRS・tRNA^{Gln}複合体の結晶構造解析の結果から、GlnRSではこれらのCP I, II領域がtRNAのアクセプターステムおよびディスクリミネーターの認識に関与していることが示唆されている [Rould et al., 1989]。本論文第2章の研究結果から、GlnRSのみならず、GluRS、さらにMetRS、IleRS、ValRS、LeuRSでも共通して、このCPI, II領域でもtRNAおよびアミノ酸を認識していることが示唆された (図2-8, 13)。さらにC端側のドメインについては、本研究の sequence alignmentおよび変異体解析の結果から、KMSK配列よりC端側約120アミノ酸残基程度以内にtRNAのDアームおよびアンチコドン領域に対する認識領域が (恐らくはこの順に) 存在していることが示唆された (図2-8, 13)。今後はこれらの系について、tRNAとARSの対応を、以上のような領域対領域のレベルでなく、アイデンティティー決定因子対アミノ酸残基のレベルまで高めて研究を行なっていくことが必要であろう。その際、本論文第1章の研究成果が生きてくるであろうし、またその解析結果は本研究の sequence alignmentを介して、他の系にも普遍化できるであろう。

本研究の成果から示唆できる、tRNAとARSにおけるアイデンティティー決定因子対アミノ酸残基の対応の一例を挙げてみる。すなわち、蛍光を用いた解析 [Willick & Kay, 1976]、¹³C-NMRの解析 (図1-34) およびtRNA^{Gln}の変異体解析 (Dr. Soll私信、本研究室関根ら未発表) の結果、大腸菌tRNA^{Gln}のアンチコドン1字目のmnm^sU34は、GluRSによって認識を受けていることが明らかになった。一方、sequence alignmentに基づいて変異体解析を行なった結果、GluRSのTrp-312は、tRNA^{Gln}のアンチコドン部位の認識に関わっていることが示唆された (表2-3, 図2-13)。従って、tRNA^{Gln}とGluRSの複合体の¹³C-NMR解析において、アンチコドン1字目のmnm^sU34のシグナルが低磁場シフトした (図1-34) のは、おそらくこのTrp-312が接近したことに起因するのかもしれない。また、大腸菌MetRSにおいても、C34の認識に関わっていたのはTrp-461であった (図2-8) [Gohsh et al., 1990]。従って、これらの系の間にはTrp残基によるピリミジン残基の共通した認識機構 (例えばスタッキング) が存在する可能性も考えられ、非常に興味深い。このような解析を進めていくことによって、アミノ酸残基による核酸塩基の認識様式を普遍的に議論できるようになるかもしれない。

今後、アイデンティティー決定因子とこれを認識するアミノ酸残基の対応をつけるためには、ARSの変異体とtRNAの変異体を組み合わせた反応速度論的解析やtRNAのフットプリンティング解析を行う必要があると考えられる。

しかし一方で、20種すべてのARSについて、酵素単独およびtRNAとの複合体のX線結晶構造解析を行い、ARSによるtRNAの認識機構、さらにtRNAの結合によるARSの活性化の機構を分子構造レベルで解明していく必要があることは否定できない。本論文第4章の研究では、高度好熱菌ARSを用いることによって、大腸菌由来のARS（例えばGluRS）では実現できなかった結晶化をなし遂げることができた。常温菌のARSの代わりに高度好熱菌のARSを解析に用いることは、酵素が熱安定で結晶化しやすいというメリットと裏腹に、いくつかの問題をはらんでいる。すなわち、1つは酵素の反応の至適温度が65℃以上と高いのに、4~20℃で結晶化を行なって活性のある構造を反映するのか、低温変性の心配はないかということ、もう1つは高度好熱菌のARSで得られた成果を、大腸菌のtRNAで得られた結果と対応させてよいのかという問題であろう。

1番目の低温変性の問題に関しては、今後実験的に検討する必要があると思われる。しかし、一説によれば、高度好熱菌タンパク質の耐熱化は、構造のフリーエネルギーのポテンシャル幅が温度に対して広がっていることによって成り立っており、現に大腸菌が低温変性を起こすような低温においても高度好熱菌のタンパク質はnativeな構造を保っている例がみられる[大島泰郎,「異常環境と微生物酵素」講談社サイエンティフィック]といわれている。また最近、高度好熱菌SerRSの結晶が大腸菌SerRSの結晶構造の位相を用いて分子置換法により解かれたが、実際に活性部位の構造はよく保存されており、そのまわりの柔軟なループ領域が大きく欠失されていた程度であったことが報告されている(Dr.Cusack私信)。

次に、2番目の疑問についてであるが、大腸菌と高度好熱菌はかなり近縁な生物種であって、基質認識に関する基本的な部分は共通であると考えられる。例えばIleの系を例にとると、高度好熱菌のtRNA^{Ile}では、大腸菌tRNA^{Ile}のアイデンティティー決定因子(図1-17)全てが保存されており[Horie et al.,1985]、現にtRNA^{Ser}にこれらの決定因子を移植することによって、高度好熱菌IleRSはこのtRNA^{Ser→Ile}をtRNA^{Ile}と全く同じレベルでアミノアシル化できるようになる(図1-20)。また、大腸菌細胞内で、大腸菌のIleRS遺伝子の変異を、高度好熱菌IleRSが相補するのである(芝博士私信)。大腸菌のtRNA^{Glu}ではアイデンティティー決定因子であるアン

チコドン1字目は $\text{mm}^{\circ}\text{s}^2\text{U}$ であり、高度好熱菌の tRNA^{Glu} ではこれがCになっている [Hara-Yokoyama et al., 1986]。このことを反映してか、大腸菌 tRNA^{Glu} に対する結合のイオン強度依存性は大腸菌 GluRS と高度好熱菌 GluRS とは異なることが示唆されている [Hara-Yokoyama et al., 1986]。しかし、本論文2.3.8で示したように、このような tRNA の塩基認識の違いを利用して、むしろこのアンチコドンの残基の酵素側の認識部位を予測することもできるであろう。このような、進化に伴う認識機構のfine tuningはあるにしても、大腸菌と高度好熱菌のARSは、それぞれ互いの tRNA を十分に効率よく認識する。現に、高度好熱菌の IleRS 、 MetRS 、 GluRS は大腸菌の tRNA を高度好熱菌の tRNA と同じ反応速度定数でアミノアシル化するのである [Kohda et al., 1984, 1987; Hara-Yokoyama et al., 1984, 1986]。

したがって、高度好熱菌のARSを解析して得られる構造的知見の基礎的な部分は、大腸菌の系にも適用できると考えられる。ただし、高度好熱菌の系で得られた知見は、今後なんらかのアプローチで大腸菌の系についても検証を行なう必要があると考えられる。また、高度好熱菌の tRNA とARSのホモな系についても、フットプリンティングや変異体の解析を行なっていく必要があると思われる。

ARSのクラス分けに関する問題

本論文の第1章から第4章までを通して提起されつづけてきた問題がある。それは、「Erianiらが提唱したATPの結合様式に基づくARSの分類が、 tRNA の認識機構の相違までを説明できるか」といった問題である。さらに言うなら、「ATPの結合様式に基づく分類でARSの分子進化を説明しきれるか」という問題である。

当分類法を提唱したフランスのグループは、「クラスIのARSとクラスIIのARSは異なる祖先から出発して進化したものであり、 tRNA の認識様式もこの分類に従う」と考えている (Dr. Moras私信)。さらに彼らの主張によれば、「クラスIのARSは、 tRNA のアンチコドンと認識するドメインから発祥し、これにRossmann FoldからなるATP結合ドメインが結合して進化したものである。これに対し、クラスIIのARSは、 tRNA のアクセプターアームと認識するドメインから発祥し、アンチコドンと認識するドメインが後から付け加わったものである」であり、その証拠として「クラスIのARSには、 tRNA のアンチコドンに比重をおいて認識するものが多く、これに対しクラスIIのARSでは、microhelixを効率よくチャージすることからもわかるように、アクセプタ

一システムに比重をおいてtRNAを認識するものが多い」というのである。

しかし、図5-1からもわかるように、クラスIのARSでもLeuRSのようにアンチコドン認識しないものもあれば、クラスIIのARSでも多くのARSはアンチコドン認識している。現にtRNA^{Ala}のmicrohelixのGlyRSによるチャージは、Alaの系に比べて1/1000も低いものであり[Franklyn et al., 1992]、アンチコドンに高い比重が置かれていることがわかる。

また、tRNAに対するARSの結合のtopologyも、このクラス分けとは一致しない。すなわち、「ARSがtRNAのどちらの面から結合するか」が、X線結晶構造解析やフットプリンティング解析によって明らかにされているものについて、その結果を表5-1にまとめてある。クラスIに属し、非常に近縁なARS同士でも、tRNAに対する結合様式は異なっている。

さらに、ARSの側について、本論文の研究成果に基づいて反駁を進めてみたい。すなわちGluRSとGlnRSのアミノ酸配列は高い相同性を示し(図2-13)、変異体解析の結果を考えあわせると、共通したアミノ酸残基でtRNAの認識を行なっていることが示唆された。しかし、このsequence alignmentによれば、GlnRSでtRNAのアンチコドン認識部位を支えている β -barrel領域は、GluRSでは完全に欠失されていることになる(図2-13、2-3-9の議論)。さらに高度好熱菌GluRSの二次構造予測の結果(図4-15)からも、C端のドメインにはGlnRSが持つ様な β -barrel構造は存在せず、むしろ α -helixに富む構造であることが予測された。また、予備的なX線結晶構造解析の結果(図4-14)からも、GluRSの外形は、GlnRSの長く伸びた外形(図5-3)とは異なり、よりコンパクトな形をしていると考えられる。ARSのtRNA認識部位は主にループ領域に存在していると考えられる(2-3-4参照)ことからGluRSとGlnRSでtRNAの認識に関わるループ上のアミノ酸領域はかなり相同性が高いが、それらを支えている高次構造はこの同じサブクラスに属するARS同士でさえ異なると考えられる。したがって、tRNAの認識構造は、ATP結合様式に基づくARSの分類とは必ずしも対応していないと考えられる。現に、図5-3のARSの結晶構造においてtRNAの認識に関わる領域(ドメイン)を矢印で示したが、TyrRS(クラスI)、MetRS(クラスI)、SerRS(クラスII)ではこの領域が α -helixで構成されているのに対して、GlnRS(クラスI)とAspRS(クラスII)では、 β -barrelで構成されている。

図5-5にクラスIおよびクラスIIのARSのドメイン構造図を示した。クラスIARSでは、おそらくN端側にATP結合ドメイン(合間にtRNAのアクセプターステムの認識部位が埋め込まれている)が、C端側にtRNAのアンチコドン認識に関わるドメインが配置されていると考えられる。これに対し、クラスIIのARSではATP結合ドメインの位置は一樣でない(図5-1)。AspRSやSerRSでは、結晶構造から明らかなように[Ruff et al.,1991; Cusack et al.,1990]、N端側にtRNAの認識に関わるドメインが、C端側にATP結合ドメインが配置されている。これに対しProRSやHisRSでは、ATP結合ドメインがN端寄りに位置しているため、tRNAのアンチコドンの認識(図5-1よりアンチコドンはアイデンティティ決定因子である)に関わるドメインはC端側にならざるをえないと考えられる。従って、ATP結合ドメインとtRNA認識ドメインは、それぞれ独立した機能ユニットであり、独自に進化してきたのではないかと思われる。

ARSの分子進化に関する仮説

ARSの分子進化を考える上で、本論文第3章で着目した Zn^{2+} 結合モチーフは重要な指標となると考えられる。ARSの Zn^{2+} 結合モチーフのいくつか(図3-1から抜粋)を、DNA結合性タンパク質やRNA結合性タンパク質でみられるZn fingerと対比させたものが図5-6である。DNA結合性タンパク質のZn fingerは、大きく3つのタイプに分けられる[Coleman, 1992]。1つは、transcription factor IIIA (TFIIIA)に代表されるZn fingerで、Cys₂His₂のリガンド構成をしている。最近このタイプのZn fingerを持つZif 268とDNAの複合体のX線結晶構造解析が行なわれ、このZn fingerはantiparallel β -sheetに α -helixが繋がった構造をしており、DNAのmajor grooveに沿ってはまり込む形で結合していることが明らかになった[Pavletich & Pabo,1991]。次に第2のタイプのZn fingerは、glucocorticoid receptorに代表されるホルモンレセプターに見られるもので、Cys₂Cys₂なるリガンド構成をしている。glucocorticoid receptorについてもDNAとの複合体のX線結晶構造解析が行なわれ、十文字に交差する両親媒性 α -helixの両端に Zn^{2+} イオンが結合する構造をとっており、これが二量体化して、パンドローム配列を持つDNAの片面に結合することが明らかになった[Luisi et al.,1991]。第3のタイプのZn fingerは、GAL4に代表されるもので、6つのCys残基が、稜を合わせた2つの正四面体の頂点に配置して、2つの Zn^{2+} イオンを結合するものである。いずれにせよ、

DNA結合性タンパク質のZn fingerは、規則正しいrigidな二重らせんを形成するDNAに、定型化された様式で結合するため、その1次構造も定型化されていると考えられる。

これに対し、RNA結合性タンパク質に見られるZn fingerの1次構造は定型化されていない(図5-6)。Zn fingerを持つRNA結合タンパク質は、レトロウイルス(RNA virus)のnucleocapsidを構成するgag [Covey, 1986]などのタンパク質から、RNA polymeraseの β' subunit (EMBL gene data bank, M38293), RNA splicingに関わるyeastのPRP9, RPR6, RPR11, HUMU1C, RPR2などの遺伝子産物 [Abovich et al., 1990; Chang et al., 1988; Chen & Lin, 1990; King & Beggs, 1990; Legrain & Choulika, 1990] さらにPre-tRNAのprocessingに関わると考えられるyeastのSTP1遺伝子産物 [Wang et al., 1992], 翻訳関連のeIF-2 [Donahue et al., 1988] など、その機能も多岐にわたっている。RNAはDNAのように規則正しい構造をとらないため、これに対応してRNA結合タンパク質のZn fingerも様々な1次構造を持つと考えられる。

ARSのZn²⁺結合モチーフは不定型な1次構造を持っており、明らかにRNA結合タンパク質タイプのモチーフである。さらに配列をよくながめると、これらのRNA結合性タンパク質のZn fingerと僅かながらの相同性が見られる(例えば2番目のCys/His残基の次から<E,D,K,Rなどのチャージを持つアミノ酸><親水性アミノ酸><芳香族やIなどの疎水性アミノ酸><芳香族やLなどの疎水性アミノ酸>…の順にならんでいる)。したがって、ARSはこれらのRNA結合性タンパク質と進化的な関連があるのではないかと考えられる。

本論文第3章で議論されたように、Zn²⁺結合モチーフは、クラスI、クラスIIにかかわらずあるサブグループのARSに存在し、共通してもRNAの認識に関わっている可能性が示唆された。したがって、この機能性モチーフを介した基質認識および触媒活性のメカニズムは、ATP結合様式に基づくARSの分類とは別の進化の局面を暗示していると思われる。むしろ、上記の議論から、なんらかのRNA結合性タンパク質から由来した可能性が考えられる。

近年、大腸菌のCysRSの遺伝子がクローニングされ、この最も小さなARSの1次構造が明らかになった [Avalos et al., 1991]。すると、CysRSはクラスIのARSでありながら、クラスIIに属するSerRSと一部アミノ酸配列の相同性を持つことが明らかになった(図5-7)。さらに、EF-Tuとも一部相同性を持っていたのである(図5-7)。このため、CysRSは進化的に最も古いARSであり、クラスIのARSもクラスIIの

ARSもこのCysRSから派生したのだと考えられた。さらに意義深いことに、このCysRSもZn²⁺結合モチーフを持っているのである(図3-1, 5-6)。そしてこのCysRSのZn²⁺結合モチーフは、Rossman Foldの合間に、短いConnective Polypeptide IIを形成していた(データ未提示)。従って、3.3.5の議論より、このCysRSのZn²⁺結合モチーフは、tRNA^{Cys}のアクセプターアームの認識に関わっている部位ではないかと考えられる。このことは、その近くにもtRNAのアクセプターシステムを認識するEF-Tuとの相同配列が存在することとよく対応している(図5-7)。そしてさらに最近、ヒトのGlnRS(クラスI)やマウスのSerRS(クラスII)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、これらもEF-1 α やEF-1 γ と相同性の高い共通した配列を持つことがわかった[Fett & Knippers, 1991; Miseta et al., 1991]。これらのことから、進化上ATPの結合様式に基づくARSのクラス分けが起こるまえに、ARSはelongation factorから分かれたものであり、それ以前はtRNAのアクセプターシステムに結合する共通のタンパク質であったと考えられる。

それでは、以上のことを総合すると、ARSの分子進化について、どのような仮説が立てられるであろうか。

最近、ARSの祖先について、驚くべき仮説が立てられた。それは、ARSの祖先はRNAではないか、という仮説である[Piccirilli et al., 1992]。この仮説は、*Tetrahymena thermophila*のGroup I intronが、tRNA^{Met}のアクセプターアームの先端に結合したMetを積極的に加水分解するという実験事実を踏まえたものである(図5-8)。

この仮説を支持しこれまでの議論を総括した上で、ARSの分子進化について、次のような仮説を立ててみた(図5-8)。

- (1) 最初のアミノアシル化反応はGroup I Intron様のRNAが担っていた。
- (2) さらにこのRNAによるアミノアシル化反応の効率をあげるため、Spliceosome中のsnRNPにも似たタンパク質因子がこのRNAともRNAを引き合わせる働きをしていた。このタンパク質因子は、Zn fingerでこれらのRNA分子(tRNAについては、アクセプターアーム)を結合していたと考えられる。このタンパク質因子こそARS(そしておそらくelongation factorとの共通)の祖先であると考えられる。
- (3) さらに反応の効率をあげるため、このタンパク質因子がアミノアシル化を代行するようになった。この段階で、ATPの加水分解に伴うエネルギーが必要になっ

たため、ATP結合ドメインが連結することとなった。このATP結合ドメインにはRossmann Fold型とantiparallel β -sheet型の二種類があり、このどちらが結合するかで、今日のクラスI、クラスIIの原型ができた。さらに、このATP結合ドメインが、タンパク質因子のN端側に結合するか、C端側に結合するかで、図5-5に示す様なARSのドメイン構造の原型が決まった。特にRossmann Fold型のATP結合ドメインは、タンパク質因子のC端側に結合し、これと融合した（その結果、タンパク質因子由来のtRNAのアクセプターアーム結合ドメインは、後のConnective Polypeptide I, IIになったのであろう）。

- (4) さらに、cognateなtRNAを厳密に認識する必要性から、さまざまな構造(α -helixや β -barrel)を持つtRNA(主にアンチコドン)認識ドメインが、N端側あるいはC端側から結合した。こうして、図5-5に示したさまざまなドメイン構造を持つ今日のARSができていったのであろう。

現存するARSで、たとえばミトコンドリアのTyrRSやLeuRSがSplicingの働きを持つ [Labouesse et al., 1987; Mohr & Lambowitz, 1987; Herbert et al., 1988] のは、RNA結合性タンパク質が祖先であるという上記の仮説を支持するのではないかと考えられる。また、大腸菌のMetRSやThrRS、ヒトのGlnRSがZn²⁺結合モチーフを持つこと(図3-1)と、これらのARSがtRNA以外のRNA(自分の遺伝子のmRNA)に結合する [Lestienne, 1988; Dardel et al., 1990; Schray & Knippers, 1991] ことが対応しているのは、上記の進化が背景にあるからではないだろうか。特にヒトのGlnRSには、自分の遺伝子のmRNA上のtRNA^{gln}に似た配列に結合する領域以外に、非特異的にRNAに結合するLysに富んだ領域が存在しており [Schray & Knippers, 1991]、複数のRNAと結合しうる可能性を秘めていることは、上記の仮説との関連上興味深い。また、本研究第1章で、IleRSはT Ψ Cアームを欠失したflexibleな構造のtRNA^{ile}を効率よくチャージした(図1-22)。最近の実験結果から、ThrRSでもT Ψ Cアームを欠失したtRNAをチャージすることが明らかになった(神田・瀧木、データ未発表)。これらのZn²⁺結合モチーフを持つARSがflexibleな構造のRNAを認識するのは、上記の分子進化の仮説を支持するのではないと思われる。

Weinerらも、RNA酵素であるRNAレプリカーゼがARSの祖先であり、今日のタンパク質酵素がこれによってかわったとする進化説を発表している [Maizels & Weiner,

1987]。上記の仮説は、さらに、タンパク質がRNAにとって代わる過程を説明するものではないかと考えている。

本研究では、20種類の系に一般化することを念頭において、ARSによるtRNAの厳密な認識機構をtRNAとARSの両面から解析した。DNA結合タンパク質はDNAのrigidな二重らせん構造に対応して、比較的保存されたDNA結合構造をもつ。RNAはよりフレキシブルであるため、これに対応してRNA結合タンパク質はより自由度のある構造をとると考えられる。しかし、5SRNAや植物ウイルスのRNAがそうであるように [Brunel et al., 1991; Giege et al., 1990]、tRNAのようなL字型構造がRNAのとりうる安定な3次構造であることを考えると、tRNAとARSの系で得られた知見は他のRNAおよびRNA結合タンパク質の研究にもきつと有益な情報を与えることであろう。さらに、本研究の構造面での解析をも発展させ、20種類すべてのARSの構造を解明することによって、ARSによるtRNAの厳密な認識機構が明らかになるのにとどまらず、ARSの分子進化や生物のfundamentalな機能・構造相関が明らかになることが期待される。

ARS	tRNA	接触面
class I	tRNA ^{Met} (<i>E. coli</i>)	variable-loop side
	tRNA ^{Ile} (<i>E. coli</i>)	D-loop side
	tRNA ^{Val} (<i>S. cerevisiae</i>)	mainly variable-loop side
	tRNA ^{Leu} (bean, <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>)	mainly D-loop side
	tRNA ^{Gln} (<i>E. coli</i>)	D-loop side
	tRNA ^{Glu} (<i>E. coli</i>)	variable-loop side
	tRNA ^{Trp} (beaf liver)	variable-loop side
class II	tRNA ^{Asp} (<i>S. cerevisiae</i>)	variable-loop side
	tRNA ^{Thr} (<i>E. coli</i>)	mainly variable-loop side
	tRNA ^{Phe} (<i>S. cerevisiae</i>)	mainly variable-loop side

表5-1 tRNAのARSとの結合様式

フットプリンティングなどを用いた以下の研究により明らかになった: tRNA^{Val}, [Vlassov et al., 1983]; tRNA^{Leu}, [Dietrich et al., 1990]; tRNA^{Gln}, [Rould et al., 1989]; tRNA^{Trp}, [Garret et al., 1984]; tRNA^{Asp}, [Romby et al., 1985]; tRNA^{Thr}, [Theobald et al., 1988]; tRNA^{Phe}, [Vlassov et al., 1983].

	U	C	A	G
U	GAA Phe			
	gag Leu			
A	GAU Ile	GGU Thr		gcu Ser
	CAU Met			
G	GAC Val			

表5-2 tRNA^{1*}のアンチコドンGAUと2文字を共有するtRNA
 各tRNAのアンチコドンを、遺伝暗号表の中に書き入れてある。各アンチコドンで、
 cognateなARSが特に強く認識する残基を強調してある。アンチコドンがARSによ
 って認識されない場合は小文字で書いてある。

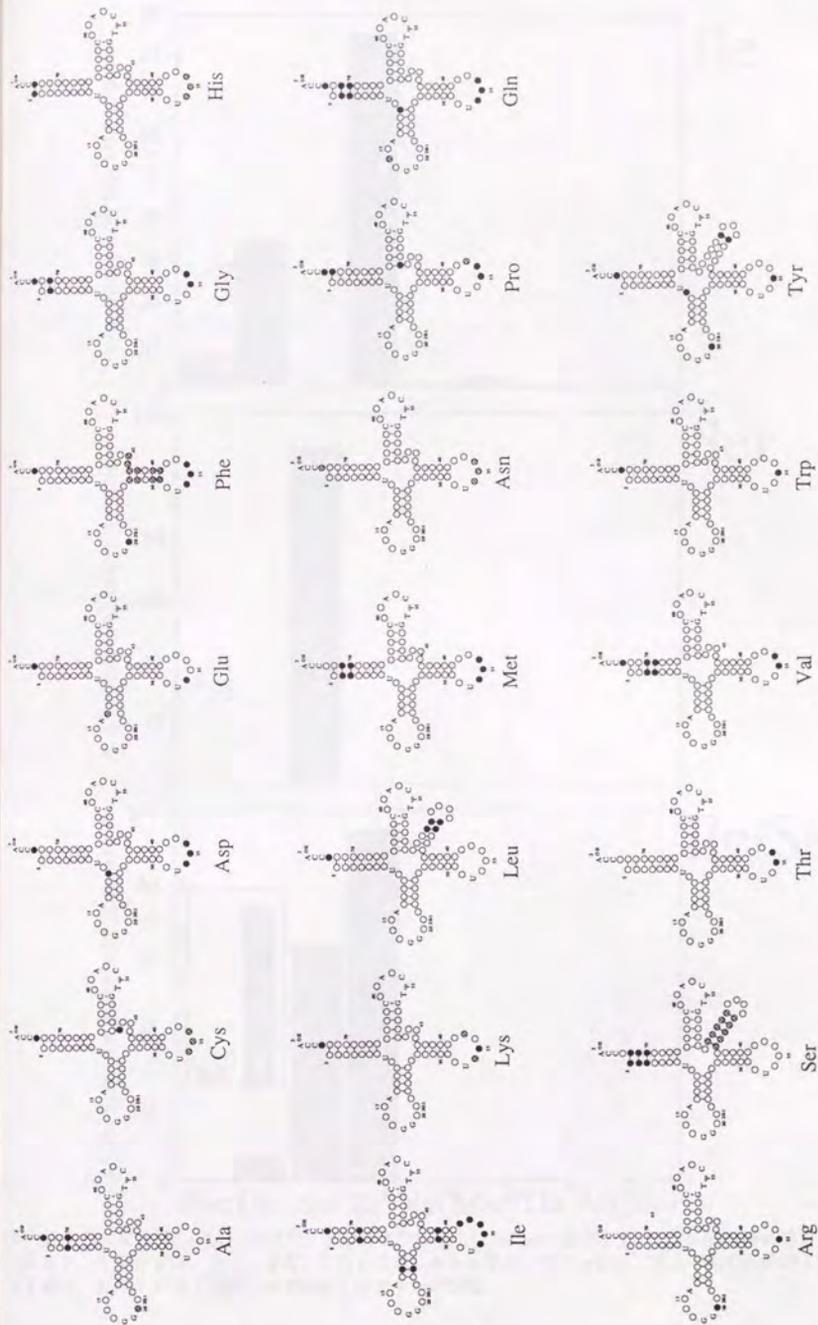


図5-1 いまままでに明らかになっているtRNAのアイデンティティ決定因子
アイデンティティ決定因子を黒くぬってある。網掛けしてあるのは、予備的な結果。

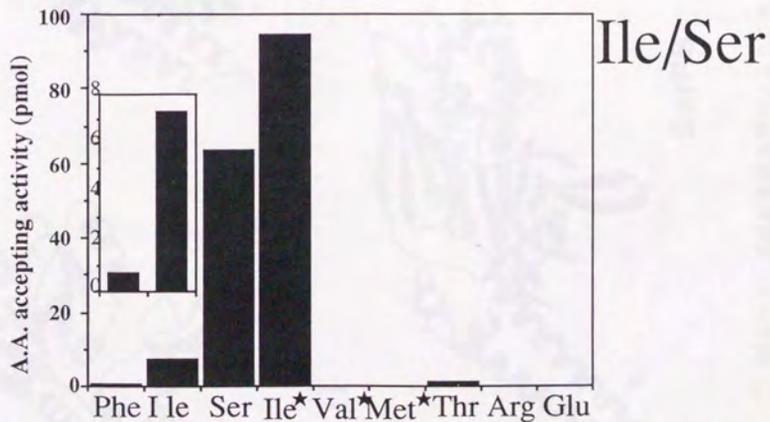
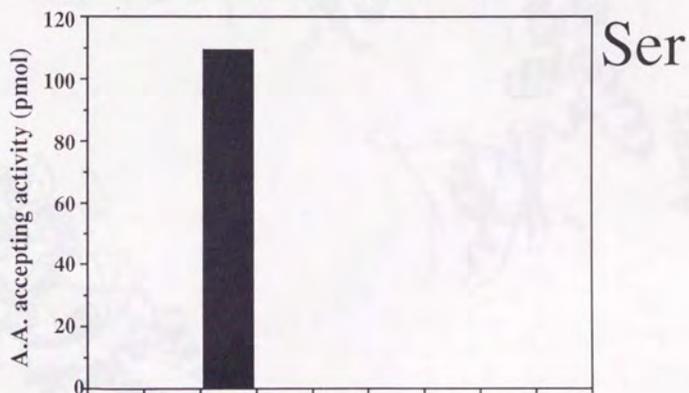
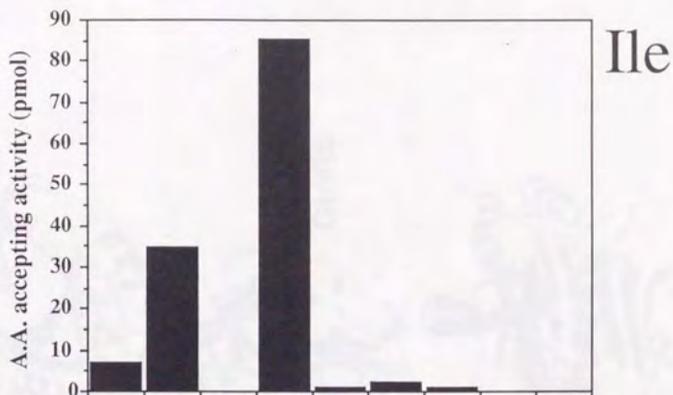
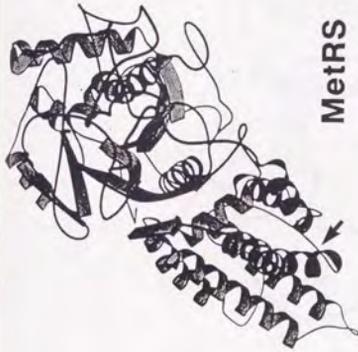
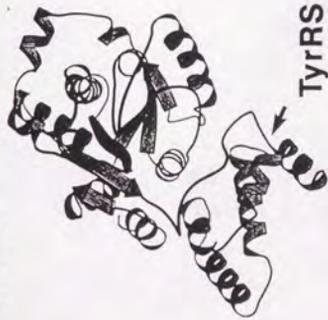


図5-2 tRNA^{Ile}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Ser→Ile} (Ile/Serで表示) *in vitro* 転写物に対する, 大腸菌 PheRS, IleRS, SerRS, ThrRS, ArgRS, GluRS, および高度好熱菌 IleRS, ValRS, MetRS (右肩に*で表示) のチャージ活性

Class I



Class II

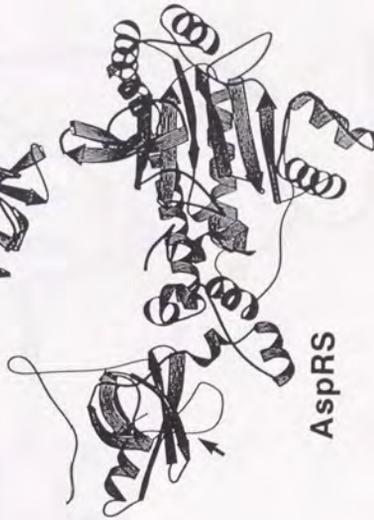
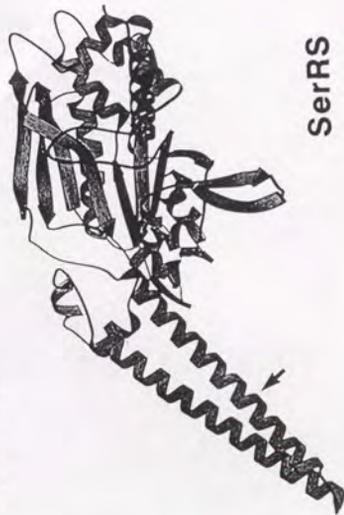


図5-3 X線結晶構造解析によりこれまでに明らかにになったARSの3次構造
各ARSのリボンモデルはDino Moras博士 (IBM, CNRS, Strasbourg, France) の御厚意による。

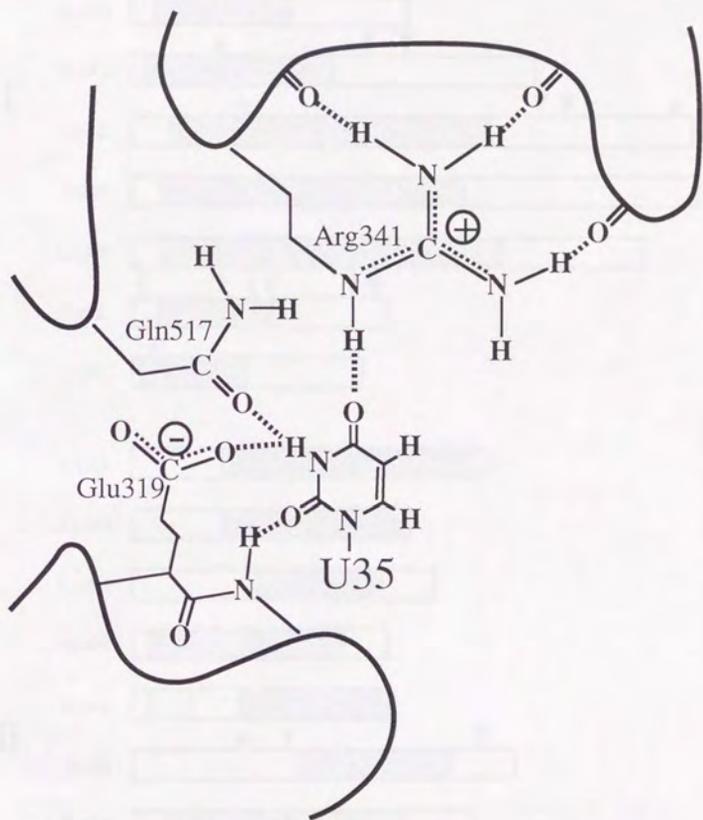


図5-4 大腸菌GlnRSによるtRNA^{Gln}のU35の認識機構
 [Rould et al., 1991] より.

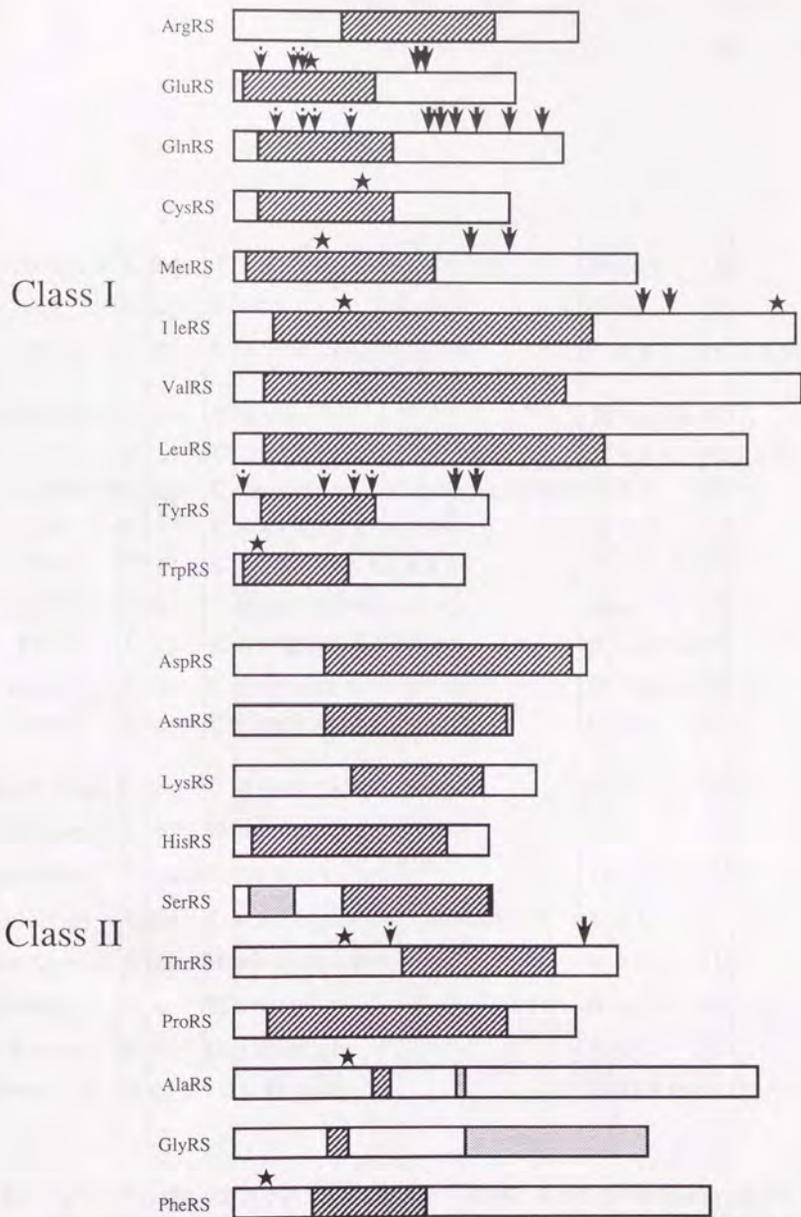


図5-5 クラスIおよびクラスIIのARSのドメイン構成図 斜線はATP結合ドメイン (Rossmann Fold あるいは Antiparallel β -sheet, tRNAのアクセプターアーム結合部位をも含んだ範囲を示してある)。tRNAのアクセプターシステムの認識に関わる部位を破線矢印で、アンチコドン認識部位は矢印で示す。星印は Zn^{2+} 結合モチーフ (図3-1)を示す。

TFIIIA finger7	C DV	C N E K F R H K D Y L R D	H QKT	H
GR	C LV	C S D E A S G C H Y G V L T	C GS	C
GAL4	C DI	C E L K K L K C S K E K P K	C AK	C L K N N W E C C
gag(MoMLV)	C AY	C K E K G	H WAKD	C
rpoC	C L	C G K Y K R L K	H R G V I	C E K C
eIF-2(yeast)	C KT	C K S I N T E L K R E Q S N R L F F M V	C KS	C
STP1	C HY	C D A T F R I E G Y L T R	H I K K	H
PRP9	C PF	C S R W F K T S S V F E S	H L V G K I	H
PRP6	C QE	C P R S S D I W L E N I R L	H E S D V	H
PRP11	C KL	C N T M H M S W S S V E R	H L G G K K	H
HUMU1C	C DY	C D T Y L T H D S P S V R K T	H C S G R K	H
PRP2	C EFP	C E P E F A K V L Y T A A T	H E Q	C
MetRS(T.therm.)	C VS	C E R F Y T E K E L V E G L	C P I	H
MetRS(yeast)	C PV	H N S Y L A D R Y V E G E	C P K	C
CysRS(E.c.)	C SAMN	C K Q L G N	H F D I	H
IleRS(E.c.)	C PR	C W H Y T Q D V G K V A E H A E I	C G R	C
LeuRS(yeast)	C PG	H D N R D F E F W Q T N	C P G E	H
GluRS(E.c.)	C R	H S E H	H A D D E P	C
AlaRS(E.c.)	C DP	C T E I F Y D	H G D	H
ThrRS(E.c.)	H E E Y V D M	C R G P	H V P N M R F	C

図5-6 DNA結合タンパク質, RNA結合タンパク質, ARSの Zn finger (様) モチーフ
 +のチャージを持ったアミノ酸は白抜きで, -のチャージを持ったアミノ酸は影付きで, 疎水性アミノ酸/Ser, Thrは強調文字で示した。

CysRS

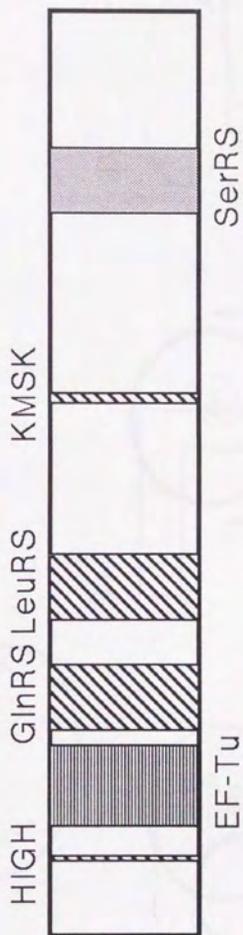
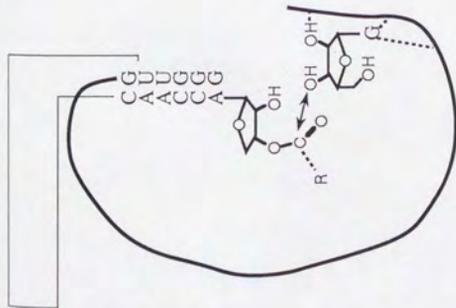
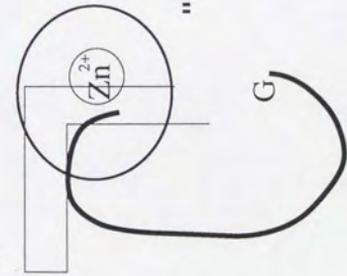


図5-7 大腸菌CysRSの他のタンパク質とのアミノ酸配列相同性

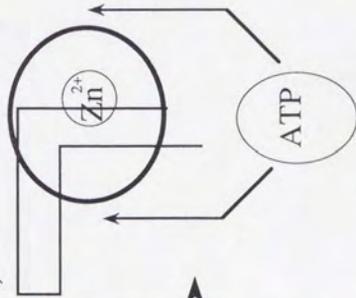


(1)

(2)



(3)



(4)

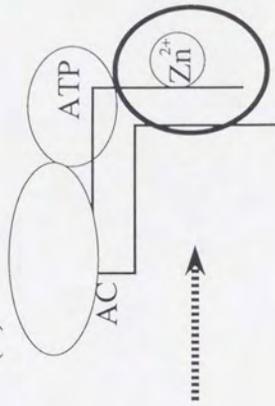


図5-8 A.R.Sの分子進化に関する仮説 R.F.は Rossmann Fold,
A.B.は Antiparalell β -sheet, ACは Anticodonの略

R.F. or A.B.

略号

A R S	aminoacyl-tRNA synthetase
A l a R S	alanyl-tRNA synthetase
A r g R S	arginyl-tRNA synthetase
A s n R S	asparaginyl-tRNA synthetase
A s p R S	aspartyl-tRNA synthetase
C y s R S	cysteinyl-tRNA synthetase
G l n R S	glutaminyl-tRNA synthetase
G l u R S	glutamyl-tRNA synthetase
G l y R S	glycyl-tRNA synthetase
H i s R S	histidyl-tRNA synthetase
I l e R S	isoleucyl-tRNA synthetase
L e u R S	leucyl-tRNA synthetase
L y s R S	lysyl-tRNA synthetase
M e t R S	methionyl-tRNA synthetase
P h e R S	phenylalanyl-tRNA synthetase
P r o R S	prolyl-tRNA synthetase
S e r R S	seryl-tRNA synthetase
T h r R S	threonyl-tRNA synthetase
T r p R S	tryptophanyl-tRNA synthetase
T y r R S	tyrosyl-tRNA synthetase
V a l R S	valyl-tRNA synthetase
mm ⁵ s ² U	5-methylaminomethyl-2-thiouridine
m ² A	2-methyladenosine
Ψ	pseudouridine
N M R	nuclear magnetic resonance
T C A	trichloroacetic acid

References

- Akins, R. A. & Lambowitz, A. M. (1987) Cell, **50**, 331-345
- Ankilova, V. N., Reshetnikova, L. S., Chernaya, M. M. & Lavrick, O. I. (1988) FEBS Lett. **227**, 9-13
- Avalos, J., Corrochano, L. M. & Brenner, S. (1991) FEBS Lett. **286**, 176-180
- Abovich, N., Legrain, P. & Rosbash, M. (1990) Mol. Cell. Biol. **10**, 6417-6425
- Barstow, D. A., Scharman, A. F., Atkinson, T. & Minton, N. P. (1986) Gene **46**, 37
- Bedouelle, H. & Winter, G. (1986) Nature **320**, 371
- Beresten, S., Jahn, M. & Soll, D. (1992) Nucleic Acids Res. **20**, 1523-1530
- Berg, J. M. (1986) Science **232**, 485-487
- Beltchev, B. & Manago, G. M. (1970) FEBS Lett. **12**, 24
- Bonnet, J., Renaud, M., Raffin, J. P. & remy, P. (1975a) FEBS Lett. **53**, 154
- Bonnet, J., Befort, N., Bollack, C., Fasiolo, F. & Ebel, J. -P. Nucleic Acids Res. **2**, 211
- Breton, R., Sanfacon, H., Papayannopoulos, I., Biemann, K. & Lapointe, J. (1986) J. Biol. Chem. **261**, 10610-10617
- Breton, R., Watson, D., Yaguchi, M. & Lapointe, J. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 18248-18255
- Brick, P. & Blow, D. M. (1987) J. Mol. Biol. **194**, 287-297
- Brick, P., Bhat, T. N. & Blow, D. M. (1988) J. Mol. Biol. **208**, 83-98
- Brunie, S., Zelwer, C. & Risler, J. -L. (1990) J. Mol. Biol. **216**, 411-424
- Carter, C. W. & Carter, C. W. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 12219-12223
- Cassio, D. & Waller, J.-P. (1971) Eur. J. Biochem. **20**, 283-300
- Chang, P. K. & Dignam, J. D. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 20898-20906
- Chang, T.-H., Clark, M. W., Lustig, A. J., Cusick, M. E. & Abelson, J. (1988) Mol. Cell. Biol. **8**, 2379-2393
- Chen, J. -H. & Lin, R. -J. (1990) Nucleic Acids Res. **18**, 6447
- Chirikjian, J. G., Wright, H. T. & Fresco, J. R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **69**, 1638-1641

- Brunel, C., Romby, P., Westhof, E., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1991) J. Mol. Biol. **221**, 293-308
- Chu, W. C. & Hollowitz, J. (1991) Biochemistry **30**, 1655-1663
- Clemens, M. J., Galpine, A., Austin, S. A., Panniers, R., Henschaw, E. C.,
Duncan, R., Hershey, J. W. B. & Pollard, J. W. (1987) J. Biol. Chem. **262**
767-771
- Coleman, D. E. & Carter, C. W. (1984) Biochemistry **23**, 381-385
- Coleman, J. E. (1992) Annu. Rev. Biochem. **61**, 897-946
- Covey, S. N. (1986) Nucleic Acids Res. **14**, 623-633
- Cruzen, M. E. & Arfin, S. M. (1991) J. Biol. Chem. **266**, 9919-9923
- Csank, C. & Martindale, D. W. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 4592-4599
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Hartlein, M., Nassar, N. & Leberman, R.
(1990) Nature, **347**, 249-255
- Dardel, F., Fayat, G. & Blanquet, S. (1984) J. Bacteriol. **160**, 1115-1122
- Dardel, F., Panvert, M. & Fayat, G. (1990) Mol. Gen. Genet. **223**, 121-133
- Dietrich, A., Romby, P., Marechal-Drouard, L., Guillemaut, P. & Giege, R. (1990)
Nucleic Acids Res. **18**, 2589-2597
- Donahue, T. F., Cigan, A. M., Pabich, B. C. & Valavicius, B. C. (1988) Cell **54**,
621-632
- Ebel, J. -P., Renaud, M., Dietrich, A., Fasiolo, F., Keith, G., Favorova, O. O.,
Vassilenko, S., Baltzinger, M., Ehrlich, R., Remy, P., Bonnet, J. &
Giege, R. (1979) TRANSFER RNA: Structure, Properties, and Recognition
Cold Spring Harbor Laboratory, p.325-343
- Eriani, G., Dirheimer, G. & Gangloff, J. (1989) Nucleic Acids Res. **17**, 5725-5736
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990) Nature **347**,
203-206
- Fasiolo, F., Gibson, B. W., Walter, P., Chatton, B., Biemann, K. & Boulanger, Y.
J. Biol. Chem. **260**, 15571-15576
- Fayat, G., Mayaux, J. F., Sacerdot, C., Fromant, M., Springer, M., Manago, M. G.
& Blanquet, S. (1983) J. Mol. Biol. **171**, 239-261

- Fersht, A. (1977) Enzyme Structure and Mechanism p280 Universities Press, Belfast, U.K.
- Fersht, A. R., Knill-Jones, J. W., Bedouelle, H. & Winter, G. (1988) Biochemistry 27, 1581-1587
- Fett, R. & Knippers, R. (1991) J. Biol. Chem. 266, 1448-1455
- Fourmy, D., Mechulam, Y., Brunie, S., Blanquet, S. & Fayat, G. (1991) FEBS Lett. 292, 259-263
- Franklyn, C. & Schimmel, P. (1990a) Nature 337, 478-481
- Franklyn, C. & Schimmel, P. (1990b) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8655-8659
- Franklyn, C., Shi, J. P. & Schimmel, P. (1992) Science 255, 1121-1125
- Frugier, M., Florentz, C. & Giege, R. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 3990-3994
- Gampel, A. & Tzagoloff, A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6023-6027
- Garber, M. B., Yaremchuk, A. D., Tukalo, M. A., Egorova, S. P., Fomenkova, N. P. & Nikonov, S. V. (1990) J. Mol. Biol. 214, 819-820
- Gardner, K. H., Pan, T., Narula, S., Rivera, E. & Coleman, J. E. (1991) Biochemistry 30, 11292-11302
- Garret, M., Pajot, B., Trezeguet, V., Labouesse, J., Merle, M., Gandar, J. -C., Benedetto, J. -P., Sallafranque, M. -L., Alterio, J., Gueguen, M., Sarger, C., Labouesse, B. & Bonnet, J. (1991) Biochemistry 30, 7809-7818
- Gendron, N., Breton, R., Champagne, N. & Lapointe, J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 5389-5392
- Gige, R., Rudinger, J., Dreher, T., Perret, V., Westhof, E., Florentz, C. & Ebel J. P. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1050, 179-185
- Goerlich, O., Foekler, R. & Holler, E. (1982) Eur. J. Biochem. 126, 135-142
- Gohsh, G., Pelka, H. & Schulman, L. H. (1990) Biochemistry 29, 2220-2225
- Gohsh, G., Kim, H. Y., Demaret, J. -P., Brunie, S. & Schulman, L. H. (1991) Biochemistry 30, 11767-11774
- Hall, C. V., VanCleemput, M., Muench, K. H. & Yanofski, C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 6132-6136

- Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S. & Miyazawa, T. (1984) J. Biochem. (Tokyo) **96**, 1599-1607
- Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S., Watanabe, T., Watanabe, K., Kitazume, K., Mitamura, Y., Morii, T., Takahashi, S., Kuchino, Y., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1986) FEBS Lett. **202**, 149
- Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S. & Miyazawa, T. (1986) Biochemistry **25**, 7031-7036
- Hayase, Y., Jahn, M., Rogers, M. J., Sylvers, L. A., Koizumi, M., Inoue, H., Otsuka, E. & Soll, D. (1992) EMBO J. **11**, 4159-4165
- Hendrickson, W. A. (1991) Science **254**, 51-58
- Herbert, C. J., Labouesse, M., Dujardin, G. & Slonimski, P. P. (1988) EMBO J. **7**, 473-483
- Himeno, H., Hasegawa, T., Ueda, T., Watanabe, K., Miura, K. & Shimizu, M. (1989) Nucleic Acids Res. **17**, 7855
- Horie, N., Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S., Watanabe, K., Kuchino, Y., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1985) Biochemistry **24**, 5711-5715
- Horz, W. & Zachau, H. G. (1973) Eur. J. Biochem. **32**, 1
- Hountondji, C. & Blanquet, S. (1985) Biochemistry **24**, 1175-1180
- Hountondji, C., Schmitter, J. M., Beauvallet, C. & Blanquet, S. (1990) Biochemistry **29**, 8190-8198
- Hou, Y. -H. & Schimmel, P. (1988) Nature **333**, 140-145
- Hou, Y. -H., Shiba, K. & Schimmel, P. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 976-980
- Hsieh, S. -L. & Campbell, R. D. (1991) Biochem. J. **278**, 809-816
- Hunt, J. B., Neece, S. H., Schachman, H. K. & Ginsberg, A. (1984) J. Biol. Chem. **146**, 150-157
- Irwin, M. J., Nyborg, J., Reid, B. R. & Blow, D. M. (1976) J. Mol. Biol. **105**, 577-586
- Ito, K., Kawakami, K. & Nakamura, Y. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. in press
- Jahn, M., Rogers, M. J. & Soll, D. (1991) Nature **352**, 258-260

- Kagawa, Y., Nojima, H., Nukiwa, N., Ishizuka, M., Nakajima, T., Yasuhara, T.,
Tanaka, T. & Oshima, T. (1984) J. Biol. Chem. **259**, 2956-2960
- Kern, D. & Lapointe, J. (1979) Biochemistry **18**, 5819-5826
- Kisselev, L. L., Favorova, O. O., Nurbecov, M. K., Dmitriyenko, S. G. &
Engelhardt, W. A. (1981) Eur. J. Biochem. **120**, 511-517
- King, D. S. & Beggs, J. D. (1990) Nucleic Acids Res. **18**, 6559-6564
- Koener, T. J., Myers, A. M., Lee, S. & Tzagoloff, A. (1987) J. Biol. Chem. **262**,
3690-3696
- Kohda, D., Yokoyama, S. & Miyazawa, T. (1984) FEBS Lett. **174**, 20-23
- Kohda, D., Yokoyama, S. & Miyazawa, T. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 558-563
- Kunai, K., Machida, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1986) Eur. J. Biochem. **160**,
433-440
- Kushiro, A., Shimizu, M. & Tomita, K. (1987) Eur. J. Biochem. **170**, 93-98
- Laberge, S., Gagnon, Y., Bordeleau, L. M. & Lapointe, J. (1989) J. Bacteriol.
171, 3926-3932
- Labouesse, M., Herbert, C. J., Dujardin, G. & Slonimski, P. P. (1987) EMBO J. **6**,
713-721
- Legrain, P. & Choulika, A. (1990) EMBO J. **9**, 2775-2781
- Lestienne, P. P. (1988) Nature **335**, 503-504
- Lober, B., Giege, R., Ebel, J. -P., Berthet, C., Thierry, J. -C. & Moras, D.
(1983) J. Biol. Chem. **258**, 8429-8435
- Ludmerer, S. W. & Schimmel, P. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 10801-10806
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. &
Sigler, P. B. (1991) Nature **352**, 497-505
- Lupas, A., Dyke, M. V. & Stock, J. (1991) Science, **252**, 1162-1164
- Maizels, N. & Weiner, A. M. (1987) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative
Biology Cold Spring Harbor Laboratory, p.743-749
- Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. **3**, 208-218
- Martins, S. A. & Schimmel, P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 65-69
- Matthew, J. T. & Schimmel, P. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 1000-1004

- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 560-564
- Mayaux, J. F. & Blanquet, S. (1981) Biochemistry **20**, 4647-4654
- Mayaux, J. F., Kologerakos, T. Brito, K. K. & Blanquet, S. (1982) Eur. J. Biochem. **128**, 41-46
- Mayaux, J. F., Fayat, G., Fromant, M., Springer, M., Grunberg-Manago, M. & Blanquet, S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 6171-6183
- Mechulam, Y., Fayat, G. & Blanquet, S. (1985) J. Bacteriol. **163**, 787-791
- McClain, W. H. & Nichoras, H. B. (1987) J. Mol. Biol. **194**, 635-642
- McClain, W. H. & Foss, K. (1988a) Science **240**, 793-796
- McClain, W. H. & Foss, K. (1988b) Science **241**, 1804-1807
- McClain, W. H. & Foss, K. (1988c) J. Mol. Biol. **202**, 697-709
- McClain, W. H., Chen, Y. -M., Foss, K. & Schneider, J. (1988) Science **242**, 1681-1684
- McClain, W. H., Foss, K., Jenkins, R. A. & Schneider, J. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 9260-9264
- McClain, W. H., Foss, K., Jenkins, R. A. & Schneider, J. (1991a) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 6147-6151
- McClain, W. H., Foss, K., Jenkins, R. A. & Schneider, J. (1991b) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 9272-9276
- Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. (1985) EMBO J. **4**, 1609-1614
- Miller, W. T., Hou, Y. -M. & Schimmel, P. (1991a) Biochemistry **30**, 2635-2641
- Miller, W. T., Hill, K. A. W. & Schimmel, P. (1991b) Biochemistry **30**, 6970-6976
- Miller, W. T. & Schimmel, P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 2032-2035
- Miseta, A., Woodley, C. L., Greenberg, J. R. & Slonbin, L. (1991) J. Biol. Chem. **266**, 19158-19161
- Mohr, G. & Lambowitz, A. M. (1991) Nature **354**, 164-167
- Muramatsu, T., Yokoyama, S., Horie, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1988a) J. Biol. Chem. **263**, 9261-9267
- Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa,

- T. & Yokoyama, S. (1988b) Nature 336, 179-181
- Muramatsu, T., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1992) Nucleosides & Nucleotides 11, 719-730
- Nazarenko, I. A., Peterson, E. T., Zakharova, O. D., Lavrik, O. & Uhlenbeck, O. C. (1992) Nucleic Acids Res. 20, 475-478
- Niimi, T., Muto, Y., Haruki, M., Kohno, T., Muramatsu, T., Kawai, G., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. in preparation
- Nishimura, S. (1979) TRANSFER RNA: Structure, Properties, and Recognition Cold Spring Harbor Laboratory, p.325-343
- Nishiyama, M., Matsubara, N., Yamamoto, K., Iijima, S., Uozumi, T. & Beppu, T. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14178-14183
- Normanly, J., Ogden, R. C., Horvath, S., J. & Abelson, J. (1986) Nature 321, 213-219
- Normanly, J. & Abelson, J. (1989) Annu. Rev. Biochem. 58, 1029-1049
- Nureki, O., Muramatsu, T., Suzuki, K., Kohda, D., Matsuzawa, H., Ohta, T., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1991) J. Biol. Chem. 266, 3268-3277
- Nureki, O., Suzuki, K., Hara-Yokoyama, M., Kohno, T., Matsuzawa, H., Ohta, T., Shimizu, T., Morikawa, K., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1992) Eur. J. Biochem. 204, 465-472
- Ono, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1990) J. Biochem. (Tokyo) 107, 21-26
- Pallanck, L. & Schulman, L. H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 3872-3876
- Pape, L. K. & Tzagoloff, A. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 6171-6183
- Pavletich, N. P. & Pabo, C. O. (1991) Science 252, 809-817
- Perret, V., Gracia, A., Grosjean, H., Ebel, J. -P., Florentz, C. & Giege, R. (1990) Nature, 344, 787-789
- Piccirilli, J. A., McConnell, T. S., Zaug, A. J., Noller, H. F. & Cech, T. R. (1992) Science 256, 1420-1424
- Plateau, P., Mayaux, J. -F. & Blanquet, S. (1981) Biochemistry 20, 4654-4662
- Pochon, F., Michelson, A. M., Grunberg-Manago, M., Cohn, W. E. & London, L. (1964) Biochim. Biophys. Acta. 80, 441-447

- Posorske, L. H., Cohn, M., Yanagisawa, N. & Auld, D. S. (1979) Biochim. Biophys. Acta. 576, 128-133
- Proulx, M., Duplain, L., Lacoste, L., Yaguchi, M. & Lapointe, J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 753-759
- Putney, S. D., Royal, N. J., deVegvar, H. N., Herlihy, W. C., Biemann, K. & Schimmel, P. (1981) Science 213, 1497-1501
- Putz, J., Puglisi, J. D., Florentz, C. & Giege, R. (1991) Science 252, 1696-1699
- Raben, N., Borriello, F., Amin, J., Horwitz, R., Fraser, D. & Plotz, P. (1992) Nucleic Acids Res. 20, 1075-1081
- Regan, L., Bowie, J. & Schimmel, P. (1987) Science 235, 1651-1653
- Reid, B. R., Koch, G. L. E., Boulanger, Y., Hartley, B. S. & Blow, D. M. (1973) J. Mol. Biol. 80, 199-201
- Reshetnikova, L., Chernaya, M., Ankilova, V., Lavrik, O., Delarue, M., Thierry, J. -C., Moras, D. & Saffro, M. (1992) Eur. J. Biochem. 208, 411-417
- Romby, P., Moras, D., Bergdoll, M., Domas, P., Vlassov, V. V., Westhof, E., Ebel, J. P. & Giege, R. (1985) J. Mol. Biol. 184, 455-471
- Rould, M. A., Perona, J. J., Soll, D. & Steitz, T. A. (1989) Science 246, 1135-1142
- Rould, M. A., Perona, J. J. & Steitz, T. A. (1991) Nature 352, 213-218
- Rudinger, J., Puglisi, J. D., Putz, J., Schatz, D., Eckstein, F., Florentz, C. & Giege, R. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 5882-5886
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschuler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J. C. & Moras, D. (1991) Science 252, 1682-1689
- Rymo, L. & Lagerkvist, U. (1970) Nature 226, 77
- Rymo, L., Lagerkvist, U. & Wonacott, A. J. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4308-4316
- Sampson, J. R. & Uhlenbeck, O. C. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 1033-1037
- Sampson, J. R., DiRenzo, A. B., Behlen, L. S. & Uhlenbeck, O. C. (1989) Science 243, 1363-1366

- Sampson, J. R., DiRenzo, A. B., Behlen L. S. & Uhlenbeck, O. (1990) Biochemistry 29, 2523-2532
- Sampson, J. R., Behlen, L. S., DiRenzo, A. B. & Uhlenbeck, O. C. (1992) Biochemistry 31, 4161-4167
- Schatz, D., Leberman, R. & Eckstein, F. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 6132-6136
- Schimmel, P. (1989) Biochemistry 28, 2747-2759
- Schoemaker, H. J. P., Budzik, G. P., Giege, R. & Schimmel, P. (1974) J. Biol. Chem. 250, 4440-4444
- Schon, A., Kannangara, C. G., Gough, S. & Soll, D. (1988) Nature 331, 187-190
- Schray, B. & Knippers, R. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 5307-5312
- Schulman, L. H. (1991) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 41, 23-87
- Schulman, L. H. & Pelka, H. (1988) Science 242, 765-768
- Schulman, L. H. & Pelka, H. (1989) Science 246, 1595-1596
- Schwabe, J. W. R. & Rhodes, D. (1991) Trends Biochem. Sci. 16, 291-296
- Shang, Z., Liao, Y. D., Wu, F. Y. -H. & Wu, C. -W. (1989) Biochemistry 28, 9790-9795
- Shiba, K. & Schimmel, P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1880-1884
- Shimizu, M. (1992) J. Mol. Evol. in press
- Shimura, Y., Aono, A., Ozeki, H., Sarabhai, A., Lamfrom, H. and Abelson, J. (1972) FEBS Lett. 22, 144
- Sprinzel, M., Hartmann, T., Weber, J., Blank, J. & Zeidler, R. (1989) Nucleic Acids Res. 17, suppl. R1-R172
- Starzyk, R. M., Webster, T. A. & Schimmel, P. (1987) Science 237, 1614-1618
- Starzyk, R. M., Burbaum, J. J. & Schimmel, P. (1989) Biochemistry 28, 8479-8484
- Theobald, A., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. P. & Giege, R. (1988) Eur. J. Biochem. 175, 511-524
- Thibault, P., Langowski, J. & Leberman, R. (1992) J. Mol. Biol. 225, 185-191
- Thoemmes, P., Fett, R., Schray, B., Kunze, N. & Knippers, R. (1988) Nucleic Acids Res. 16, 5391-5406

- Tzagoloff, A., Akai, A., Kurkulos, M. & Repetto, B. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 850-856
- Vallee, B. L. & Auld, D. S. (1990) Biochemistry **29**, 5647-5659
- Waller, J. P., Risler, J. L., Monteilhet, C. & Zelwer, C. (1971) FEBS Lett. **16**, 186-188
- Wang, S. S., Stanford, D. R., Silvers, C. D. & Hopper, A. K. (1992) Mol. Cell. Biol. **12**, 2633-2643
- Watanabe, K., Kuchino, Y., Yamaizumi, Z., Kato, M., Oshima, T. & Nishimura, S. (1979) J. Biochem. **86**, 893-905
- Webster, T. A., Lathrop, R. H. & Smith, T. F. (1987) Biochemistry **26**, 6950-6957
- Webster, T., Tsai, H., Kula, M. & Mackie, G. A. (1984) Science **226**, 1315-1317
- Wek, R. C., Jackson, B. M. & Hinnebusch, A. G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**, 4579-4583
- Willick, G. E. & Kay, C. M. (1976) Biochemistry **15**, 4347-4352
- Wolstenholme, D. R., Macfarlane, J. L., Okimoto, R., Clary, D. O. & Wahleithner, J. A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 1324-1328
- Yamao, F., Inokuchi, H., Cheung, A., Ozeki, H. & Soll, D. (1982) J. Biol. Chem. **257**, 11639-11643
- Yamashiro-Matsumura, S. & Kawata, M. (1981) J. Biol. Chem. **256**, 9308-9312
- Yaremchuk, A. D., Tukalo, M. A. & Egorova, S. P. (1990) J. Mol. Biol. **213**, 631-632
- Yaremchuk, A. D., Tukalo, M. A., Krikliviy, I. A., Malchenko, N., Biou, V., Berthet-Colominas, C. & Cusack, S. (1992) J. Mol. Biol. **310**, 157-161
- Yarus, M. (1988) Cell **55**, 739-741
- Yokoyama, S., Usuki, K. M. J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1980) FEBS Lett. **119**, 77-80
- Zaccari, G., Jacrot, M. B., Moras, D., Thierry, J. C. & Giege, R. (1979) J. Mol. Biol. **129**, 483
- Zawadzki, V. & Gross, H. J. (1991) Nucleic Acids Res. **19**, 1948
- Zelwer, C., Risler, J. L. & Brunie, S. (1982) J. Mol. Biol. **155**, 63-81

謝辞

本研究を行うにあたり、終始あたたかい御指導と励ましを頂きました指導教官の東京大学教授 横山茂之先生に感謝致します。博士過程1年の冬には、フランスのストラスブールにて3ヵ月間の共同研究を行う機会を設けてくださり、新しい研究技術の修得とともに外国の研究体制など広く見聞を深めることもできました。この面でも、横山先生に深く感謝致します。また宮澤研究室出身の横山三紀(旧姓 原)博士には、グルタミルもRNA合成酵素に関する研究の指導を頂き、深く感謝いたします。

また、学部4年生のあいだ御指導頂き、その後修士過程、博士過程にわたって数々の貴重な助言と熱心な御指導を頂きました。東京大学名誉教授(横浜国大教授を経て現在(株)蛋白質工学研究所所長)宮澤辰雄先生に感謝致します。また、博士過程2年から3年にかけては蛋白質工学研究所にてX線結晶構造解析(本論文第4章)でたいへんな御世話を頂き、この面でも宮澤先生に深く感謝致します。

NMRの解析および実験全般にわたって御指導頂いた東京大学理学部助手 武藤裕博士に深く感謝致します。

当時横山研究室大学院生で、遺伝子工学および実験全般にわたってたいへん親身な御指導をくださった、村松知成博士(現在 東京大学理学部助手)、鈴木謙二氏に深く感謝致します。また、同研究室の河合剛太博士(現在 東京大学工学部助手)には、研究方針について有意義な御指導を頂きました。深く感謝致します。

高度好熱菌のアミノアシルもRNA合成酵素遺伝子のクローニングおよび大腸菌での大量発現、変異体の調製について、数々の助言と熱心な御指導を頂きました。東京大学農学部酵素学研究室教授 太田隆久先生、同助教授 松沢洋先生に深く感謝致します。また、当時酵素学研究室の大学院生でいらしゃった(現在東京大学教養学部助手)足立博之博士には、遺伝子のクローニング、発現系の構築、変異体の作成について、熱心な御指導を頂きました。深く感謝致します。同じく酵素学研究室の大学院生でいらしゃった小出昌平博士(現在米国スクリプス研究所)には、酵素の結晶化を初歩から御指導頂き、深く感謝致します。

蛋白質工学研究所第一研究部部長の森川耿介先生には、酵素の結晶化およびX線結晶解析について親身な御指導と熱心な助言を頂きました。深く感謝致します。また、同研究所の清水敏之氏(キリン基盤技術研究所)には、御本人も博士取得でお忙しい中、酵素の結晶

化およびX線結晶解析について親身の御指導を頂き、深く感謝致します。また、片柳克夫博士（三菱化成総合研究所）、松島正明博士（蛋白工学研究所研究員）、Dmitry 博士（蛋白工学研究所 Post Doctor）、および蛋白工学研究所第一研究部の皆様には、X線結晶解析についての様々な御指導と御世話を頂きました。深く感謝致します。

博士過程1年の3ヵ月間、フランスのストラスブールで共同研究の労をとって頂き、その間もRNAのフットプリンティングおよび酵素の結晶化について親身な指導と助言、さらにフランスでの私生活面で御世話を頂いたフランス国立細胞分子生物研究所の Richard Giege博士に深く感謝致します。また、同研究室の Lober Bernard博士には酵素の結晶化について、Catherine Florentz博士にはフットプリンティングについて親身な指導を頂きました。深く感謝致します。同じく、Joseph D. Puglisi博士、Joern Putz氏には、フランスでの研究生生活面で様々な御世話を頂きました。深く感謝致します。さらに、フランスで生成した結晶の解析について御世話を下さった同研究所の Dino Moras博士に感謝致します。

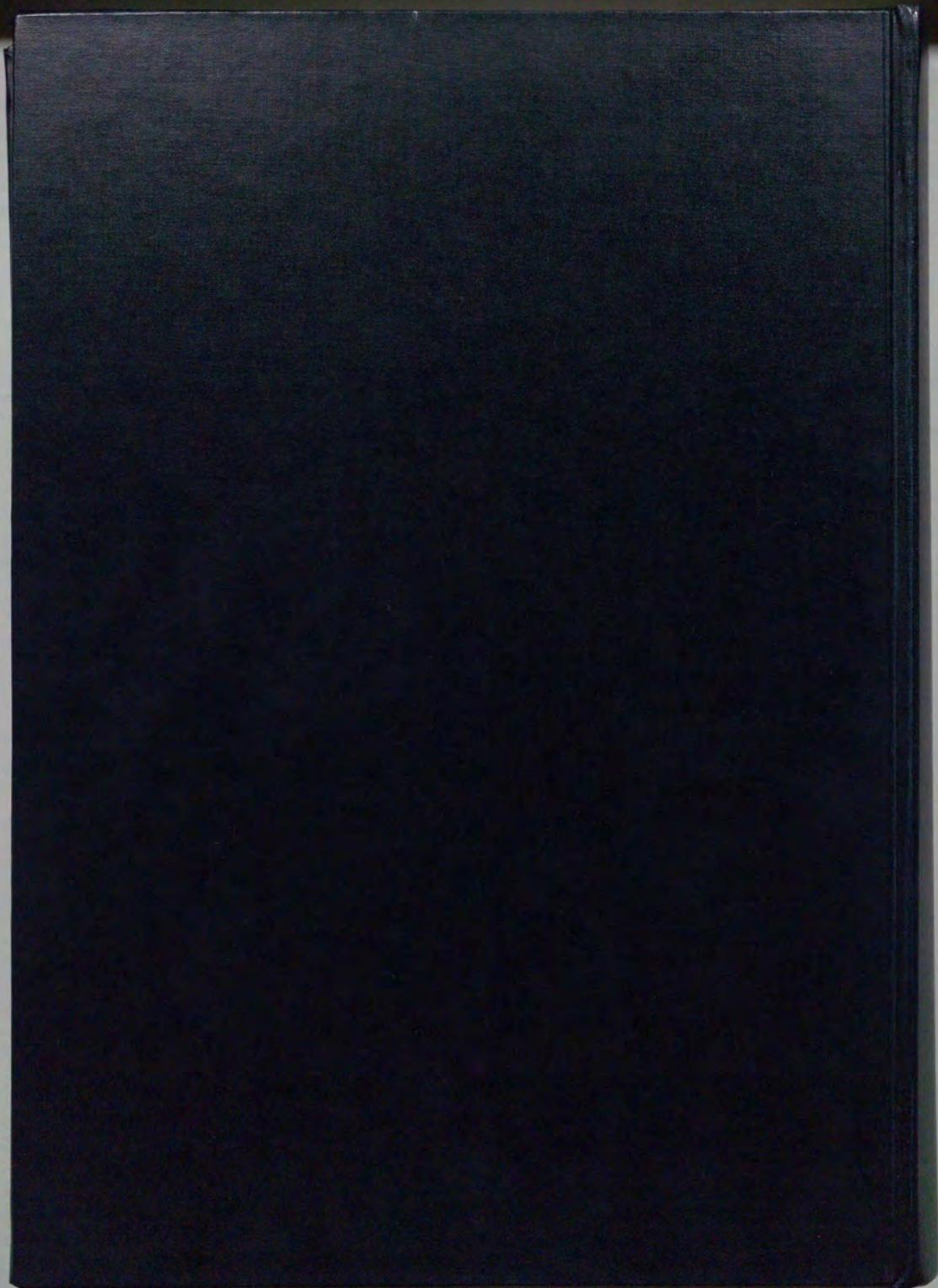
お茶の水女子大学理学部助教授 今野美智子先生には、筑波高エネルギー研究所での測定に関し御世話になりました。深く感謝いたします。

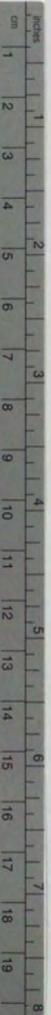
東京大学工学部教授 渡辺公綱先生には、高度好熱菌の酵素のクローニングともRNAの研究を行ううえで、様々な助言を頂きました。深く感謝いたします。

東京工業大学教授 大島泰郎先生には、高度好熱菌の分与に際して御世話になりました。深く感謝いたします。

宮澤研究室ならびに横山研究室の皆様、特に春木満博士（現在 蛋白工学研究所研究員）、河野俊之博士（現在 三菱化成生命研究所研究員）、小出寛博士（現在 米国DNAX研究所）、坂本健作氏、高井和幸氏、木川隆則氏、新美達也氏には、研究面での御指導もさることながら、研究生生活面全般にわたって御世話になりました。深く感謝いたします。

最後に、私の研究を内側から支えてくれた妻 ちづるにも感謝の意を表させていただきますと思います。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

