

1R04

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* バリル tRNA 合成酵素の遺伝子クローニング、大量発現と結晶化

○深井周也¹, 瀧木理¹, 嶋田睦¹, 斎藤京子², 今野美智子², 瀧尾擴士³, 横山茂之^{1,4} ¹東大・院理・生化,²お茶の水大・理・化,³理研・生体分子解析室,⁴理研・細胞情報伝達研究室

アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)は特異的なアミノ酸に対応する tRNA に結合させることによって、正確な遺伝暗号の翻訳を保証している。aaRS は各アミノ酸に対応して計 20 種類存在し、ATP との結合様式の相違に基づき class I, class II の 2 つのクラスに大別される。バリル tRNA 合成酵素(ValRS)は、class I に属する分子量約 10 万の巨大な aaRS である。ValRS はアミノアシル化の最初の反応においてトレオニンを誤って活性化することが報告されている。これに対して校正機構が存在し、ValRS には tRNA^{Val} の結合に依存して Thr-AMP 及び Thr-tRNA^{Val} を加水分解する活性があることが示されているが、そのメカニズムは明らかではない。ValRS によるこの校正機構を原分子分解能レベルで解明するため、熱安定で結晶化に適した高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の ValRS 遺伝子をクローニングした。T. *thermophilus* ValRS は 862 アミノ酸残基から成り、その分子量は 98,774 であった。また、T. *thermophilus* ValRS に存在する 9 つのシステイン残基のうち 8 残基は 2 つの Zn²⁺フィンガーモチーフを構成していることが推測された。Zn²⁺フィンガーモチーフは近縁のイソイシル tRNA 合成酵素(IleRS)にも存在する。そこで Zn²⁺フィンガーモチーフの位置に基づいて ValRS, IleRS のアミノ酸配列のアラインメントを行った。さらに、最近発表された T. *thermophilus* IleRS の高次構造から得られた知見と合わせて、校正機構に関わるアミノ酸残基を推定した。現在、これらのアミノ酸残基について変異体解析を行っている。一方で、大腸菌を用いた T. *thermophilus* ValRS の大量発現系を構築し、熱処理と 2 段のカラムクロマトグラフィーによって純粋な ValRS15mg を得た。予備的ではあるがポリエチレングリコールを用いた条件で結晶化に成功した。現在、結晶化条件の最適化を行っている。

S.Fukai,O.Nureki,A.Shimada,K.saito,M.Konno,K.Takio,S.Yokoyama:

Molecular cloning, overproduction and crystallization of *Thermus thermophilus* valyl-tRNA synthetase

1R06

超好熱性 TATA 結合蛋白質による DNA 認識の分光学的解析

○山崎和彦、李潔美、Mark D. Allen、山崎智子、平津圭一郎、鈴木理

工技院生命研

TATA 結合蛋白質 (TBP) は、DNA のプロモータ上の TATA-box 配列を認識し、転写開始位置および転写の方向を決定する 200 残基程度の転写因子蛋白質である。この蛋白質は、真核生物および古細菌に存在するが、原核生物には存在しない。真核生物の TBP に関して、DNA との複合体を含めて、結晶構造解析が行われており、蛋白質のみでは二量体を形成しているが、DNA とは 1:1 の複合体を形成することが知られている。この複合体の特徴として、DNA が TBP と結合した部分で、水溶液中の B 状態と異なる「super A 状態」に変化し、その結果、全体として約 90 度曲がることが挙げられる。また、この複合体形成過程が、ゲルシフトアッセイや蛍光分光法によって、調べられており、反応中間体の存在が示唆されている。しかし、これがどのような性質のものかは解っていない。本研究では、超好熱性古細菌である *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の TBP およびいくつか配列の異なった TATA-DNA をもちい、TBP による DNA 認識について、UV 吸収、円偏光二色性 (CD) や NMR など分光学的解析を行った。これらすべての解析から、DNA と蛋白質の stoichiometry は、1:1 であることが確認された。UV 吸収をもちいて、TBP 結合によって DNA の変性温度が最大約 11 度上昇することを観察した。また、TBP が結合することによる TATA-box 配列を含む DNA の構造変化を 280 nm 付近の CD を用いて調べたところ、CD 値の大幅な上昇(約 50%) が観察され、super A 状態は B 状態よりも高い CD 値をもつことが示唆された。さらに、スペクトルは、DNA 配列によっては、2 つの極大をもつ形状を示した。これは、purine-pyrimidine ステップが多いほど明確に観察され、DNA 自身の持っているやわらかさと関係するものと考えられた。なお、この研究は、科学技術振興事業団「戦略的基礎研究推進事業」の助成を受けて行われた。

K.Yamasaki,J.Li,M.D.Allen,T.Yamasaki,K.Hiratsu,M.Suzuki: Spectroscopic analyses on the DNA recognition by TATA binding protein from a hyperthermophilic archeon

1R05

蛋白質-DNA 認識における塩基置換効果の予測 (II)

○大島玄久、河野秀俊、王翼飛、皿井明倫
理研ライフセンター

蛋白質が塩基を特異的に認識する機構を解明するために、蛋白質と塩基間の相互作用エネルギーを計算した。我々は 蛋白質と核酸の複合体の X 線構造解析 (1) とこの複合体のエネルギー(2) が知られている λ repressor を蛋白質と塩基間の特異的相互作用を調べるターゲットとして選んだ。

λ repressor の dimer は λ DNA の 6 個の operator の塩基配列の各々の部位に違った強さで結合する (2) 。各々の部位は 17 個の塩基対から成り立っており、ほぼ中央の塩基のまわりで対称である。 λ repressor の subunit は helix-turn-helix の構造をもっており、この部分が DNA の major groove に結合している。また、各々の subunit の N 端部分が対称中心の塩基対をつつみこむように相互作用している。

一方、 λ DNA の operator の塩基配列を他の 3 種類の塩基で置換した一塩基置換 DNA と λ repressor の相互作用エネルギーが明らかになっている (2)。興味深い事に、塩基配列はほぼ中央の塩基のまわりで対称であるが、相互作用エネルギーは非対称であることがわかった。

我々は昨年の生物物理学会で複合体のエネルギー計算を行った(3)。水との接触表面積を使うと鎖のエントロピーと水和エネルギーを計算することができ(4)。蛋白質と塩基間の相互作用エネルギーを両者の接触表面積だけから計算する方法と通常の分子力場のエネルギーと接触表面積から計算される鎖のエントロピーと水和エネルギーをたしあわせた方法から得られる計算値を比較した。

(1) L.J.Beamer and C.O.Pabo J.Mol.Biol. 227, 177 (1992).

(2) A.Sarai and Y.Takeda Proc. Natl.Acad.Sci.USA 86, 6513 (1989).

(3) Y.Wang, H.Kono, J.Shen and A.Sarai 生物物理 1240 S67 (1996).

(4) M.Oobatake and T.Ooi Prog.Biophys.Molec.Biol. 59, 237 (1993).

M.Oobatake, H.Kono, Y.Wang, A.Satai: Prediction of base mutation effects on protein-DNA recognition (II)

1R07

高度好熱菌 グルタミル tRNA 合成酵素と tRNA^{Glu} の複合体の X 線結晶構造解析 ○関根俊一¹, 瀧木理¹, 館野賢², 中迫雅由³, 横山茂之^{1,4} ¹東大・院理・生物化学,²理研・計算科学,³東大・分生研,⁴理研・細胞情報

正確な遺伝暗号の翻訳は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) が、対応する tRNA を厳密に認識してその CCA 末端に適切なアミノ酸を付加することによって維持されている。われわれはこれまでにグルタミル tRNA 合成酵素 (GluRS) による tRNA^{Glu} の認識機構について、様々な手法を用いて研究してきた。GluRS は特異的なモチーフを用いて tRNA^{Glu} の中心部分 (augmented D helix) と強く相互作用 (認識) する。また、C 末端側のアンチコドン認識ドメインの構造は、近縁の GlnRS とは全く異なることが明らかになった。しかしながら、tRNA の結合によって酵素が活性化される機構については、これまでのところほとんど明らかにされていない。この機構を解明するためには、GluRS と tRNA^{Glu} の複合体の高次構造解析を行い tRNA の結合によってひきおこされる GluRS の構造変化を明らかにする必要がある。

GluRS・tRNA^{Glu} 複合体の X 線結晶構造解析を行うために、高度好熱菌 tRNA^{Glu} の塩基配列を明らかにし、これをもとに tRNA^{Glu} の *in vitro* 転写物を大量に調製する系を構築した。そしてこの転写物と GluRS をもちいて複合体の結晶化条件のスクリーニングを行い、結晶化に成功した (1996 年大会で報告)。この結晶は溶媒含量が大きく X 線による損傷を被りやすいので、測定は低温で行う必要がある。クライオ法による 100 K でのデータ収集を行ったところ、3.2 Å までの分解能のデータセットを得ることができた (completeness 89%)。この結果、結晶は C 底心斜方晶系に属することが明らかになり (a=110.4 Å, b=219.6 Å, c=134.8 Å), 空間群は C22₂ と判断された。現在このデータをもちいて GluRS 単体の構造をサーチモデルとした分子置換を行い、モデルの精密化を行っている。最終的に、明らかになった複合体の構造と GluRS 単体の構造を比較して tRNA 結合による酵素の構造変化の詳細を明らかにできるものと考えている。

S.Sekine, O.Nureki, M.Tateno, M.Nakasako, S.Yokoyama: X-ray crystallography of glutamyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with the cognate tRNA^{Glu}