

1R08

HIV-1 逆転写酵素の基質結合に対する配列特異性について

○岩城俊雄^{1,2}, Chang, Y³, 血井明倫⁴, 石野良純⁴, 品川日出夫¹, 土居洋文^{1,6} ¹科技団・土居プロジェクト, ²大阪府大・農, ³理研・ジーンバンク, ⁴生物分子工学研究所, ⁵大阪大・微研, ⁶富士通研究所

ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)の逆転写酵素(HIV-1 RT)はウイルスゲノム一本鎖 RNA から二本鎖の DNA を生成するが, DNA 合成時にまちがいを起こしやすくその正確さはテンプレート/プライマーの配列に依存することが知られている. HIV-1 ゲノム複製の DNA+鎖合成のプライマーとなるポリプユリントラクト(ppt: 5'-dTTTAAAAGAAAAGGGGG-3')はゲノム上の 2 カ所に存在し, その配列はレトロウイルス間でよく保存されている. さらに ppt の配列のうち, AAAGAA は HIV-1 ゲノム配列上において存在頻度が最も高いのに対して, GGGGG(G トラクト)は 4 カ所にしか存在しない. これらのことと報告されているポリメラーゼの構造解析から, RT は G トラクトに対して高い親和性を持つと考えられる. そこで種々のテンプレート/プライマー-dsDNA と HIV-1 RT の解離定数(Kd)をフィルターバインディングアッセイで測定した.

18/19 mer の ppt 配列に関して, +鎖合成方向のオリゴDNA(RT2)に対する Kd 値は 0.33 [nM]となった. 一方, -鎖合成のプライマー配列となる tRNA^{Asn} の結合配列では 2.1 [nM]となった. さらに RT2 オリゴDNA を-鎖合成方向になるようにした RT1 の Kd 値は 2.8 [nM]となった. これらのことより, RT は+鎖合成のプライマー配列として ppt をその親和性によって選択的に認識することが考えられる. DNA-RT 複合体の構造解析によると ppt 配列のうち 6 mer の G トラクトは RT 上のポリメラーゼ領域と相互作用する. そこで, G トラクト中の dG を一塩基ずつ dT に置き換えた各テンプレート/プライマー-dsDNA の Kd 値を測定したところ, 3' 端を置き換えたものでは 0.47 [nM]となったが, 他のものでは 1.3 [nM]から 1.9 [nM]の値が得られ, すべて RT2 の Kd 値より高かった. さらに, HIV-1 ゲノム配列上で ppt を中心に 5' 側および 3' 側に 1~4 bp シフトした 18/19 mer のオリゴ dsDNA との結合を測定した結果, RT が G トラクトの特異な構造を認識していることが推察された. その他種々のテンプレート/プライマー-dsDNA との測定結果をあわせると, HIV-1 RT は ppt の構造をそのポリメラーゼ部位だけでなく RNaseH 部位でも認識することが示唆された.

T.Iwaki, Y.Chang, A.Sarai, Y.Ishino, H.Shinagawa, H.Do: Template-primer binding specificities of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase

1R10

イソロイシル tRNA 合成酵素のアミノ酸校正機構の高次構造的基盤 ○瀧木理¹, Dmitriy G. Vassilyev², 館野賢³, 中迫雅由⁴, 嶋田睦¹, 中間崇¹, 深井岡也¹, 今野美智子¹, 横山茂之^{1,5}

¹東大・院理・生化, ²松下電器・国際研, ³理化学研究所計算機科学研究室, ⁴東大・分生研, ⁵お茶の水大・理・化学, ⁶理化学研究所細胞情報伝達研究室

アミノアシル tRNA 合成酵素はタンパク質合成過程において, 特異的な tRNA に対応するアミノ酸を結合させることで, 正確な遺伝暗号の翻訳を保証している. これに対しイソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) は, L-バリンを誤って活性化し, valyl-tRNA^{Asn} を合成する. IleRS は, tRNA^{Asn} の結合に依存して, これらの誤産物を加水分解することで, アミノアシル化反応の誤りを校正することが知られている. 最近, アミノアシル化を触媒する Rossmann fold ドメインへの挿入部分が, この校正反応を担っていることが生化学的に示唆された. 我々はすでに高度好熱菌 IleRS の結晶構造を, 重原子同型置換法により, 2.5 Å 分解能で解明することに成功している. その結果, この「校正ドメイン」は, Rossmann fold ドメインから突出した β パレル様の構造を取っており, その根本には, 亜鉛イオンを配位した zinc finger 構造が見られた. 結晶に L-イソロイシンおよび L-バリンを浸透させ, 分子置換法により複合体の構造を明らかにした結果, アミノアシル化部位には両アミノ酸が結合していたのに対し, 校正ドメインのクレフトには L-バリンのみが結合した. この L-バリン特異的ポケットの近くには, 全ての IleRS で保存されている Thr, His, Asn 残基が近接して存在し, いろいろな加水分解酵素に見られる, catalytic triad を形成していた. さらに最近, この IleRS の校正反応を引き起こす tRNA^{Asn} 側の決定因子が, D ループに存在する 3 スクレオシドであることが報告された. 我々は, IleRS と tRNA^{Asn} のドッキングモデルとエネルギー計算を行うことにより, β パレル様の校正ドメインがこれらのヌクレオシドと相互作用する結果, zinc finger を支点としてドメインが約 180 度回転することにより, 校正部位がアミノアシル化部位に接近し, アミノ酸の校正を行うことを示唆した. 現在, 校正部位と考えられる「catalytic triad」を形成するアミノ酸残基に関し, 変異体の解析を進めている.

O.Nureki, V.G.Dmitry, M.Tateno, M.Nakasako, A.Shimada, T.Nakama, S.Fukai, M.Konno, S.Yokoyama: Structural basis for amino-acid editing of isoleucyl-tRNA synthetase

1R09

塩基とアミノ酸の相互作用自由エネルギー曲面の計算

○Fabio Pichierni, 相田美砂子¹, 沈君偉, 血井明倫
理研ライフ, 国立がん七研

Understanding the processes involved in DNA-protein recognition is one of the most ambitious goals in bioscience. In spite of the increasing structural information on DNA-protein complexes available to date, the mechanism is not understood at the molecular level yet. Clearly, the analysis of the "recognition problem" becomes difficult due to the complexity of biomolecules involved and, consequently, its simplification through the developments of simple models would represent a helpful starting point. Here we present a model which allows us to explore the DNA-protein interaction potential energy surface by combining the free energy calculations with an *ab-initio* derived force field [1]. The interaction potential energy surfaces are calculated by the following algorithm: (1) coordination of amino acids around DNA base pair; (2) generation of rotamers of the side-chain; (3) calculations of the Boltzmann average structure and free energy; (4) construction of the potential energy map from the interaction energy for each point of the grid. We have first considered the interaction between Asn and A-T base pair, which is often observed in protein-DNA complexes, and calculated the free energy surface of the interaction. Then, this calculation has been extended to other combinations of amino acids and base pairs. The resulting potential energy map will be compared with the corresponding maps obtained by carrying out a statistical analysis of the available DNA-protein complexes. The goal of our approach is the search for possible rules for interpreting the DNA-protein recognition process. The derived information will be used to predict target sites of DNA-binding proteins.

[1] M. Aida, G. Corongiu and E. Clementi, Int. J. Quantum Chem., 42, 1353-1381 (1992).

F.Pichierni, M.Aida, J.Shen, A.Sarai: Evaluation of Interaction Potentials between Bases and Amino Acids in Protein-DNA Recognition

1R11

GCC ボックスを認識する植物転写因子の DNA 結合特異性の解析

○Dongyun HAO, 高木優¹, 血井明倫
理研ライフ, 工技院生命研

Amino acid alignment of a group of sequence-divergent polypeptides in *Arabidopsis*, tobacco and other plants has revealed a highly conserved DNA binding motif of about 60aa, referred as AP2 domain, which interacts specifically with GCC-box sequence, functioning as nuclear transcriptional factors related to many aspects of plant development and response to environmental stresses. One of the ethylene responsive element binding proteins (EREBPs) in tobacco, EREBP2, has a 59aa AP2 domain that interacts with a synthesized 16bp sequence (CATAAGGCGGCACT), from 5-prime upstream region of ethylene-inducible PR protein gene in tobacco, with K_d value less than 10pM. Deletion of 2bp from 5-prime end or mutation outside the GCC-box did not affect the binding affinity, whilst the deletion of 3bp at 3-prime end aborted the binding with EREBP2, suggesting that the GCC-box requires some franking region to maintain the binding affinity. The sequence preference of EREBP2 within the GCC-box was confirmed by binding affinity measurements with systematic single-base mutagenesis. The results showed that the G1, G4 and C6 in GCC-box appeared to make major contributions to the specificity of EREBP2 binding. A similar sequence preference has also been observed for other two AP2-containing proteins from *Arabidopsis*: AtERF-1 and CBF1. Binding assay of the GCC-box sequence with different truncated EREBP2 around the AP2 domain showed that the upstream franking region of the AP2 domain appears to be more important than the downstream. The current findings would lead to a hypothesis that GCC-box is responsible for sequence specific binding by AP2 or AP2-like proteins, of which their AP2 motif sequences may be divergent. These AP2 proteins appear to interact with GCC-box sequence as a monomer and are likely to introduce DNA bending upon binding to engage 7bp of GCC-box.

D.Hao, M.Ohme-Takagi, A.Sarai: Specific Interaction of GCC-box with AP2-Containing DNA Binding Proteins in Plant