

学位論文

tRNA 修飾酵素 アーケオシン tRNA グアニン
トランスグリコシラーゼの機能・構造解析

平成 14 年 12 月博士（理学）申請
東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻
石谷 隆一郎

目次

第 1 章	序論	1
1.1	RNA 修飾の意義	1
1.2	RNA 修飾酵素と RNA の構造	2
1.3	tRNA 修飾酵素 ArcTGT による tRNA 認識	4
1.4	塩基交換反応	6
1.5	本研究の概要	8
1.5.1	第 2 章の概要	8
1.5.2	第 3 章の概要	8
1.5.3	第 4 章の概要	8
1.5.4	第 5 章の概要	8
1.5.5	第 6 章の概要	9
第 2 章	超好熱性古細菌 <i>Pyrococcus horikoshii</i> 由来 ArcTGT の X 線結晶構造解析	11
2.1	材料と方法	11
2.1.1	ArcTGT の構造解析	11
2.1.1.1	組み換え蛋白質の大量調製	11
2.1.1.2	動的光散乱の測定	12
2.1.1.3	結晶化	12
2.1.1.4	セレノメチオニン標識蛋白質の大量調製と結晶化	12
2.1.1.5	X 線回折像の測定 (B 型結晶)	13
2.1.1.6	X 線回折像の測定 (C 型結晶)	13
2.1.1.7	回折データの処理	13
2.1.1.8	重原子同型置換体の探索	13
2.1.1.9	分子置換法による位相決定の試み	13
2.1.1.10	MAD 法による位相決定	13
2.1.1.11	ArcTGT 原子モデルの構築	14
2.1.1.12	ArcTGT モデルの精密化	14
2.1.2	ArcTGT とリガンド (グアニン等) との複合体の構造解析	14
2.1.2.1	複合体結晶の調製	14
2.1.2.2	回折像の測定と回折データ処理	15
2.1.2.3	分子置換法による位相決定とモデルの精密化	15

2.2	結果と考察	16
2.2.1	ArcTGT の構造解析	16
2.2.1.1	組み換え蛋白質の大量調製	16
2.2.1.2	動的光散乱の測定	17
2.2.1.3	結晶化と回折像の測定	17
2.2.1.4	データセットの測定と処理 (C 型結晶)	20
2.2.1.5	重原子同型置換体の探索	20
2.2.1.6	分子置換法による位相決定の試み	20
2.2.1.7	セレノメチオニン標識蛋白質の大量調製	20
2.2.1.8	セレノメチオニン標識蛋白質の結晶化	21
2.2.1.9	セレノメチオニン標識結晶の回折像測定とデータ処理	21
2.2.1.10	MAD 法による位相決定	21
2.2.1.10	原子モデルの構築と精密化	26
2.2.2	ArcTGT とリガンドとの複合体の構造解析	26
2.2.2.1	複合体結晶の回折像測定とデータ処理	26
2.2.2.2	複合体のモデル構築と精密化	26
第 3 章	ArcTGT 単独, リガンドとの複合体の結晶構造	27
3.1	材料と方法	27
3.2	結果と考察	27
3.2.1	ArcTGT の結晶構造	27
3.2.1.1	全体構造	27
3.2.1.2	亜鉛結合サイト	27
3.2.1.3	ArcTGT の二量体化	27
3.2.1.4	触媒ドメインの構造	28
3.2.1.5	QueTGT の構造との比較	28
3.2.1.6	ドメイン C3 の構造	30
3.2.1.7	ドメイン C1, C2 の構造	31
3.2.1.8	他の古細菌ではドメイン C2・C3 を欠く ArcTGT が存在する	31
3.2.2	ArcTGT・リガンド複合体の結晶構造	35
3.2.2.1	リガンド・フリー型 ArcTGT と グアニン, preQ ₀ 結合型 ArcTGT の比較	35
3.2.2.2	グアニンと preQ ₀ の認識様式	35
3.2.2.3	QueTGT による preQ ₁ 認識との比較	37
3.2.2.4	グアノシン, デオキシグアノシン類似体との複合体の構造	38
第 4 章	<i>P. horikoshii</i> 由来 ArcTGT・tRNA 複合体の X 線結晶構造解析	39
4.1	材料と方法	39
4.1.1	tRNA T7 転写産物の大量調製	39
4.1.2	ArcTGT・tRNA 複合体の調製	39
4.1.3	複合体状態での動的光散乱の測定, native PAGE, ゲルろ過	40
4.1.4	ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化	40

4.1.5	ArcTGT・tRNA 共結晶の回折像測定	40
4.1.6	回折データの処理	40
4.1.7	分子置換法による位相決定	40
4.1.8	tRNA モデルの構築と精密化	40
4.2	結果と考察	41
4.2.1	tRNA T7 転写産物の調製と精製	41
4.2.2	ArcTGT・tRNA 複合体の調製	41
4.2.3	ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化スクリーニングと結晶化条件最適化	41
4.2.4	ArcTGT・tRNA ^{Val} 複合体の回折像測定	45
4.2.5	分子置換法による位相決定	45
4.2.6	tRNA モデルの構築とモデルの精密化	45
第 5 章	ArcTGT による tRNA の認識機構	49
5.1	材料と方法	49
5.1.1	ArcTGT 変異体の調製	49
5.1.2	tRNA ^{Val} 変異体の調製	49
5.1.3	グアニン交換反応の活性測定	49
5.3.1	ArcTGT・tRNA 複合体の全体構造	51
5.2	結果	51
5.3	考察	51
5.2.1	各変異体の活性測定	51
5.2.2	ミニ・マイクロヘリックスの活性測定	51
5.3.2	ArcTGT に結合した tRNA の構造変化	52
5.3.3	C 末端ドメインによるアクセプター・ステムの認識	55
5.3.3.1	ドメイン C3 (PUA ドメイン) による認識	55
5.3.3.2	ドメイン C2 による認識	58
5.3.4	高次構造の壊れた D アームの認識	59
5.3.4.1	D アーム前半 U8 から U13 の認識	59
5.3.4.2	G15 とその前後の残基の認識	60
5.3.4.3	ArcTGT はいかにして tRNA 15 位を探し当てているか	61
5.3.4.4	ArcTGT による認識に必要な RNA の最小構造	61
5.3.5	触媒サイトの構造	62
5.3.5.1	Phe99 の役割	62
5.3.5.2	Asp249 の役割	62
第 6 章	総合討論	65
6.1	塩基交換反応の触媒機構	65

■ 目次

6.1.1 Asp249 の役割	65
6.1.2 Asp95 の役割	65
6.2.1 QueTGT による tRNA 認識との比較	69
6.2 ArcTGT による tRNA 認識と他の酵素・RNA 相互作用の比較.	69
6.2.2 SnoRNP 複合体による基質 RNA 認識との対比.	69
6.2.3 構造変化による修飾導入は RNA 以外の系にありうるか?	70
6.3 オルタナティブ型 tRNA の意義	71
6.3.1 tRNA 修飾酵素の超分子複合体 “modificosome”	71
6.3.2 Ψ 55 修飾酵素 TruB との比較.	72
6.3.3 RNA シャペロンとしての ArcTGT	72
6.4 オルタナティブ型 tRNA とミトコンドリア tRNA の対比	73
Appendix. A 記号・略号及び備考	75
A.1 アミノ酸の略号	75
A.2 核酸の略号	75
A.3 その他の略号	76
A.4 備考	77
Appendix. B 参考文献	79
謝辞	83

図表目次

第 1 章 序論

図 1-1	構造安定化に寄与する修飾塩基の例	2
図 1-2	シュードウリジンによる構造安定化	2
図 1-3	rRNA と塩基修飾サイト	3
図 1-4	tRNA のコア構造	3
図 1-5	TruB・RNA 複合体の結晶構造	3
図 1-6	アーケオシンの生合成経路	4
図 1-7	ArcTGT と他の相同性を有する酵素のドメイン構成	5
図 1-8	キューオシンの生合成経路	5
図 1-9	塩基交換反応に対して提唱されている反応機構	6
表 1-1	ArcTGT に関して過去に行われた tRNA の変異体解析の結果	4

第 2 章 超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来

ArcTGT の X 線結晶構造解析

図 2-1	本研究で使用した結晶構造精密化手順	13
図 2-2	本研究で使用したデオキシグアノシン類似体の構造式	14
図 2-3	大腸菌で大量発現させた ArcTGT の精製	16
図 2-4	リガンド・フリー ArcTGT の結晶の写真	17
図 2-5	B 型結晶の回折像	18
図 2-6	C 型結晶の回折像	18
図 2-7	セレノメチオニン化した酵素と native 酵素の質量分析	20
図 2-8	X 線蛍光スペクトルの測定	21
図 2-9	異常分散差フーリエマップ	23
図 2-10	ArcTGT の実験的位相マップ	23
図 2-11	リガンド・フリー ArcTGT のラマチャンドランプロット	24
図 2-12	C 型結晶のパッキングの様子	25
図 2-13	リガンド・フリー ArcTGT の主鎖の温度因子分布	25
表 2-1	ArcTGT の精製に使用した緩衝液の一覧	12
表 2-2	リガンド・フリー ArcTGT の結晶化条件	18
表 2-3	B, C 型結晶の回折像統計値	19
表 2-4	結晶中の異常散乱原子の位置	22
表 2-5	Sharp による位相計算の統計値	22
表 2-6	リガンド・フリー ArcTGT と 各リガンドとの複合体の構造精密化統計値	24
表 2-7	各リガンドとの複合体の回折像統計値	26

第 3 章 ArcTGT 単独, リガンドとの複合体の結晶構造

図 3-1	リガンド・フリー ArcTGT の結晶構造	28
図 3-2	ArcTGT のドメイン構成	29

図 3-3	触媒ドメインの比較	29
図 3-4	ArcTGT と QueTGT の分子表面, 表面電荷の比較	30
図 3-5	TGT ファミリーの触媒ドメインの配列アラインメント	31
図 3-6	ArcTGT のドメイン C2, C3 と Cb5p Ψ 合成酵素の PUA ドメインの配列アラインメント	32
図 3-7	TruB Ψ 合成酵素の C 末端ドメインとの比較	33
図 3-8	ArcTGT の系統樹	33
図 3-9	リガンド・フリー, グアニン, preQ ₀ との複合体それぞれにおける触媒サイトの構造	34
図 3-10	ArcTGT の触媒ドメインと QueTGT のクリスタルコンタクトの比較	35
図 3-11	ArcTGT のリガンド認識と, QueTGT のリガンド認識の比較	36
図 3-12	ArcTGT によるリガンドの認識 (その 2)	37
表 3-1	二量体化に関わっている原子の組とその距離	28

第 4 章 *P. horikoshii* 由来 ArcTGT・tRNA 複合体の X 線結晶構造解析

図 4-1	試験管内転写反応で調製した tRNA の精製	41
図 4-2	ArcTGT と tRNA によるゲルシフト・アッセイ	41
図 4-3	ArcTGT・tRNA 複合体の結晶	42
図 4-4	ArcTGT・tRNA 複合体 B2 型結晶の回折像	43
図 4-5	複合体結晶構造の電子密度	44
図 4-6	複合体 ArcTGT のラマチャンドラプロット	45
図 4-7	複合体 ArcTGT 主鎖の温度因子分布	46
図 4-8	複合体構造中の tRNA 主鎖の温度因子分布	46
図 4-9	複合体結晶のクリスタルパッキング	47
表 4-1	tRNA の試験管内転写反応に使用した反応液組成	40
表 4-2	ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化条件	42
表 4-3	ArcTGT・tRNA 複合体結晶の回折像統計値	43
表 4-4	分子置換により得られた解	44
表 4-5	ArcTGT・tRNA 複合体モデルの精密化統計値	44

第 5 章 ArcTGT による tRNA の認識機構

図 5-1	tRNA 変異体の 2 次構造模式図	50
図 5-2	本研究で使用したマイクロヘリックス・ミニヘリックス	50
図 5-3	ArcTGT・tRNA 複合体の結晶構造	52
図 5-4	通常型とオルタナティブ型 tRNA の高次構造の比較	53
図 5-5	通常型とオルタナティブ型 tRNA の二次構造の比較	53
図 5-6	通常型とオルタナティブ型 tRNA のコア構造の比較	54
図 5-7	ArcTGT と tRNA の相互作用の模式図	55
図 5-8	tRNA のアンチコドン・アームと ArcTGT の相互作用	56
図 5-9	ArcTGT C 末端ドメインによる tRNA アクセプター・ステムの認識	56
図 5-10	ArcTGT C 末端ドメインによる tRNA 認識 (その 2)	57
図 5-11	通常型 tRNA の D アームの付け根に配位した Mg ²⁺ イオン	58
図 5-12	飛び出した D アームの認識	59
図 5-13	A14 と U16 の認識	60
図 5-14	ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造	62
表 5-1	変異体作成に用いた DNA プライマー	50
表 5-2	酵素活性測定の結果	51

第 6 章 総合討論

図 6-1	ArcTGT・tRNA 複合体と, DNA 修復酵素 AlkA・DNA 複合体構造の触媒サイトの比較	66
図 6-2	Asp95 の向きと比較	67
図 6-3	塩基交換反応・第一段階目の反応機構	68
図 6-4	ArcTGT, QueTGT の RNA 結合ポケットの比較	69
図 6-5	SnoRNA による基質 RNA 認識	70
図 6-6	TruB によるオルタナティブ型 tRNA 認識の可能性	71
図 6-7	オルタナティブ型 tRNA とミトコンドリア tRNA の構造	73

第1章

序論

1.1 RNA 修飾の意義

RNA は遺伝情報を伝達できる側面と、化学反応を触媒できる側面を持つ生体高分子である (Altman, 1990; Cech, 1990). その為、現存する生物界 (DNA・Protein world) が完成する進化の段階に、RNA 主体で成り立つ生物界 (RNA world) が存在したのではないかという仮説が立てられている。しかしながら、RNA は遺伝情報の伝達・触媒分子としての性能、両者ともに現存の DNA・Protein world に比べて劣っている点が多い。例えば、RNA は 2' 位の OH 基がホスホジエステル結合の切断を促進してしまう為、DNA に比べて化学的に不安定で分解されやすい。一方、触媒機能の面では、RNA は蛋白質に比べて構造が柔軟な為、効率的に反応を触媒するのが困難である。また、RNA は蛋白質に比べて構成要素が 4 種類と少なく、分子間の相互作用も蛋白質に比べて貧弱なものとなり、これも RNA の構造を不安定にしている。

RNA world 仮説では、RNA には以上のような問題点がある為、遺伝情報に関しては (一部のウイルスなどを除いて) DNA にその役割を譲ったものと考えられている。一方、触媒・機能分子としての役割は、その殆どを蛋白質に移行したわけであるが、転写・翻訳系には未だに RNA が触媒・機能分子としての役割を担っている部分が多く存在している。例えば遺伝情

報とアミノ酸を対応付ける役割を果たす tRNA や、蛋白質を合成する反応を触媒する rRNA, mRNA の転写後プロセッシングを行うスプライソームなどが挙げられる。これらの分子では、RNA が^{modification}修飾というストラテジーを取ることで、蛋白質にひけをとらない、十分に効率的な触媒・機能分子として働くことができるようになったと考えられる。

例えば、アダプター分子として働く tRNA には特異的な分子間相互作用が必須であるが、4 種類しか構成要素がない RNA だけでは、多くの特異的な相互作用を作り出すのは困難である。その為、tRNA のアンチコドン部位には多種の^{modified nucleoside}修飾塩基が存在し、分子間相互作用をよりバラエティに富んだものになっていると考えられる (Björk *et al.*, 1999; Giegé *et al.*, 1998; Marck & Grosjean, 2002; Yokoyama & Nishimura, 1995). さらに、リボソームやスプライソーム等に多く見られる修飾塩基シュードウリジン (Ψ ; 図 1-1, 2 ページ, パネル A) は、水分子を結合して RNA の構造を強固にし、さらに塩基間のスタッキングを強めるという役割を果たしていると考えられている (図 1-2, 2 ページ) (Auffinger & Westhof, 1998; Charette & Gray, 2000). また、 Ψ と同様に多く見られる修飾の一つである 2'-O-メチル化 (図 1-1, 2 ページ, パネル B) も、RNA の構造を

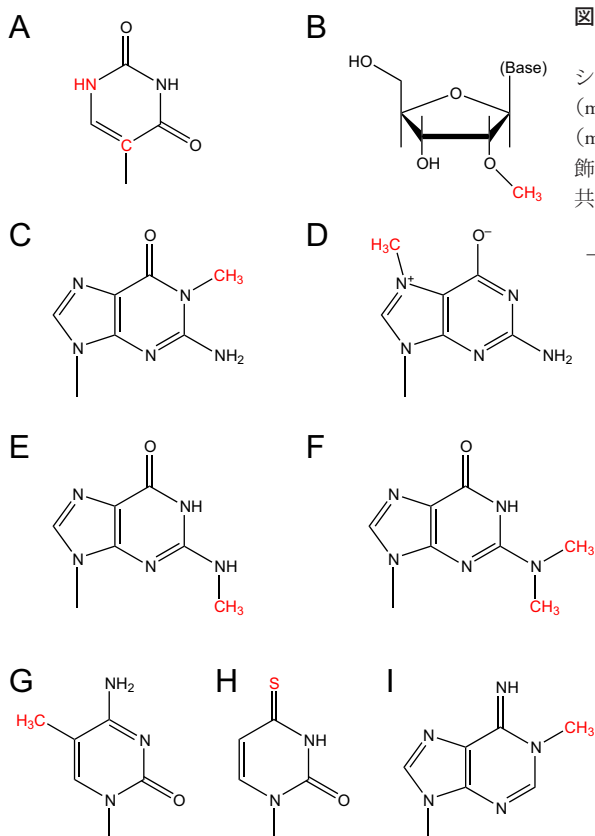


図 1-1 構造安定化に寄与する修飾塩基の例

(A) シュードウリジン (Ψ), (B) 2'-O-メチル化, (C) 1-メチルグアノシン (m^1G), (D) 7-メチルグアノシン (m^7G), (E) N^2 -メチルグアノシン (m^2G), (F) N^2,N^2 -ジメチルグアノシン (m^2_2G), (G) 5-メチルシチジン (m^5C), (H) 4-チオウリジン (s^4U), (I) 1-メチルアデノシン (m^1A). 修飾により, 元の塩基から変化した部分を赤色で示した. (B) 以外は, 共通であるリボース部分を省略した.

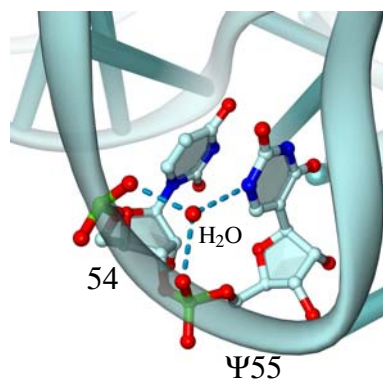


図 1-2 シュードウリジンによる構造安定化

シュードウリジンは, 図のように特異的に水分子と水素結合を形成し, RNA の構造安定化に寄与していると考えられている (Auffinger & Westhof, 1998). 図では, 酵母 tRNA^{Phe} における $\Psi 55$ と水分子の水素結合を例として挙げた.

安定化する役割があると推測されている (Davis, 1998; Kawai *et al.*, 1992). 実際, 現在明らかにされているリボソームの構造と rRNA の修飾サイトを対応付けると, リボソーム中央の触媒サイト付近に修飾が集中している (図 1-3, 3 ページ; Decatur & Fournier, 2002). すなわち, これらの rRNA の修飾は RNA の構造を補強し,

効率的にペプチド転移反応を触媒できるようにしていると考えられている. 一方, tRNA の L 字型構造の中央部分 (コア; 図 1-4, 3 ページ) を形成する D アーム, バリアブル・ループ, T Ψ C ループには多種多様の修飾塩基が見出されており (Sprinzl *et al.*, 1998), tRNA の L 字型構造を補強していると考えられる.

1.2 RNA 修飾酵素と RNA の構造

構造を補強していると考えられるタイプの RNA 修飾は RNA の折畳みの内部に存在し, 互いに複雑な高次構造的相互作用を形成している.

例えば, リボソームの高次構造から (Ban *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000), rRNA の修飾サイトの殆どが構造の内部に存在していることが明らかになった (図 1-3, 3 ページ; Decatur & Fournier, 2002). また, tRNA のコア構造に見られる多種の修飾塩基も, その多くが tRNA の折畳みに埋もれて存在している (図 1-4, 3 ページ). これらの修飾は, いずれも RNA 修飾酵素が触媒する化学反応により導入されるが, このように大半の修飾サイトは RNA の構造に埋もれている為, 修飾酵素が完成した状態の rRNA や tRNA に

結合し, 修飾を行っているとは考えにくい. RNA 修飾酵素は, 修飾サイトが露出するように構造変化を起こした RNA に結合し, 修飾を導入している可能性が高い. rRNA のような巨大な構造を持つ RNA の場合は, 多種の RNA ヘリカーゼがその生合成に重要であることが知られており (Luking *et al.*, 1998), RNA 修飾酵素はヘリカーゼにより巻き戻された状態の RNA に結合して修飾を導入していると推定される. 一方, tRNA のような小さな構造においてはそのようなヘリカーゼは知られておらず, 多くの tRNA 修飾酵素は ATP のようなエネルギー源を使用せずに修飾を行うことが出来る (Garcia & Goodenough-Lashua, 1998). その為, tRNA 修飾酵素は正規の L 字型構造から何らかの構造

変化を起こし修飾サイトが露出した tRNA を結合して、修飾していると推測される。さらに、このようにしてコアの部分に修飾が導入された tRNA は、正規の L 字型構造のみを安定に取り、再び構造変化することのないよう補強されると考えられる。

最近、tRNA の 55 位に Ψ を導入する、シュードウリジン合成酵素 TruB と T Ψ C ステム・ループからなる RNA との複合体の結晶構造が報告されている (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001)。それによると、TruB は通常ループの内側を向いている U55 の塩基をフリップさせて、TruB の触媒サイトに結合させることが明らかになった (図 1-5, 3 ページ)。ステム・ループという

tRNA の部分構造のみからなる基質では、このような単純な残基のフリップでアクセスできたわけであるが、一方で、通常の tRNA では Ψ 55 は D ループ上の Gm18 と塩基対を作り高次的な相互作用を形成している (図 1-4, 3 ページ)。その為、tRNA の D ループは、TruB と tRNA が結合した状態では何らかの構造変化を起こしている筈である。しかしながら、上記の結晶構造では基質が T Ψ C アーム部分のみである為、他の部分がどのような構造変化を起こすかは解明できなかった。さらには、D アームやバリアブル・ループ上にある修飾サイトの中には、コアの内部に埋もれて、上記のような単純な塩基のフリップだけではアクセスできないサイトが多数存在する (s^4 U8, m^1 G9, m^2 G10, Ψ 13, m^1 A22, m^2 G26, m^7 G46, m^5 C48 など; 図 1-1, 2 ページに各々の構造式を、図 1-4, 3 ページに導入されるサイトを示す)。すなわち、これらの修飾塩基は、tRNA が何らかの構造変化を起こして修飾酵素により認識され修飾が導入されている、という可能性が強く示唆されるのである。

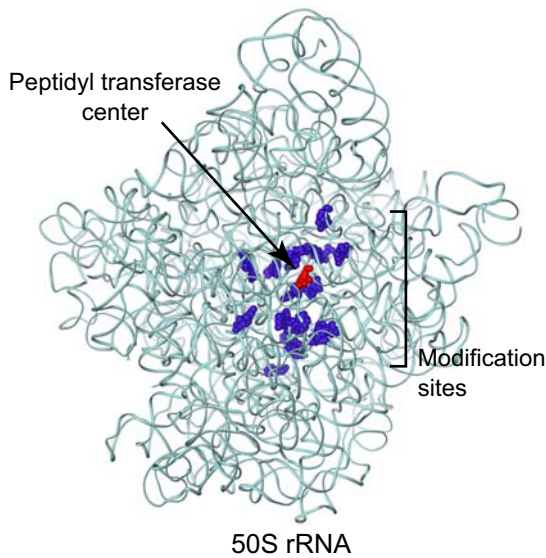


図 1-3 rRNA と塩基修飾サイト

50S rRNA の結晶構造 (Ban *et al.*, 2000) に、大腸菌 50S rRNA の修飾サイトをマッピングしたものを示している。青色が修飾サイト、赤色が触媒サイトを示している。

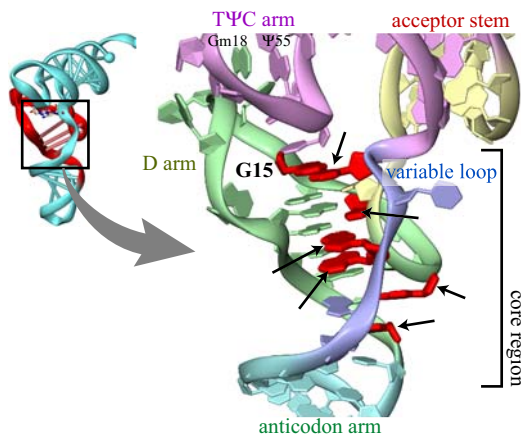


図 1-4 tRNA のコア構造

様々な生物種にわたって広く修飾されている残基を矢印で示した。また、アーケオシンが導入される 15 位も示した。

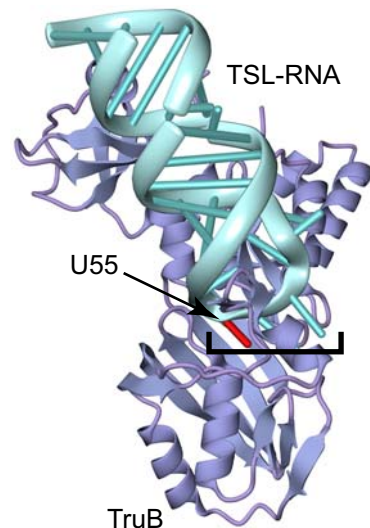


図 1-5 TruB・RNA 複合体の結晶構造

tRNA の 55 位 U をシュードウリジン化する TruB と T Ψ C stem-loop RNA (TSL-RNA) との複合体の結晶構造 (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001)。U55 を赤色で示した。U55 を含む、かぎ括弧で示した 3 ヌクレオチドが通常の T Ψ C ループの構造と異なり、ループの外側へフリップしている。

1.3 tRNA 修飾酵素 ArcTGT による tRNA 認識

修飾塩基 ^{archaeosine} アーケオシン (図 1-6, 4 ページ) は古細菌 ^{archaea} tRNA の 15 位に見出される修飾塩基であり (Edmonds *et al.*, 1991; Gregson *et al.*, 1993; McCloskey *et al.*, 2001), 細胞内のほぼ全ての tRNA に存在する (Gupta, 1984; Sprinzl *et al.*, 1998). tRNA D ループ上の 15 位はバリアブル・ループ上の 48 位と塩基対をつくり, さらに TΨC ループ上の 59 位にスタックしている (図 1-4). その為, アーケオシンはこの相互作用を強化して, tRNA の D ループ, バリアブル・ループ, TΨC ループをつなぎとめる楔のような役割をしていると推測される.

アーケオシン tRNA グアニントランスグリコシラーゼ (ArcTGT) は, アーケオシンの生合成にかかわる tRNA 修飾酵素である (Watanabe *et al.*, 1997). 図 1-6 (4 ページ) に示すように, ArcTGT はアーケオシン前駆体の preQ₀ 塩基を tRNA 上 15 位に導入する (Watanabe *et al.*, 1997). さらに, tRNA に導入された preQ₀ にアンモニアが付加することでアーケオシンが完成する (Watanabe *et al.*, 1997; 最後の preQ₀ をアーケオシンに変換するステップに関しては, どのような酵素がかかわっているかは不明である). tRNA 15 位は L 字型のコアの中心部分に深く埋もれており (図 1-4), 単純な塩基のフリップだけで酵素がアクセスできるとは考えにくい. ArcTGT は何らかの構造変化を起こした tRNA を認識し, 修飾していると考えられる. ArcTGT による tRNA 認識に関しては, 表 1-1 (4 ページ) に示すように, tRNA の変異体解析による生化学的な研究が詳細に行われている (Watanabe *et al.*, 2000). その結果によると, 正規の L 字型の構造は必要ではなく, 高次構造の一部が形成できないような tRNA 変異体で

も効率よく認識される. また, 15 位の G が厳密に認識されているという以外は, tRNA 上の他の塩基配列に殆ど特異性がないことがわかっている. このように塩基配列に殆ど特異性がないにもかかわらず, 15 位の G のみ非常に厳密に認識されており, 例えば 14 位や 16 位が G であっても, 誤ってその部分に修飾が導入されるということはない. 以上のことから, ArcTGT は, 構造変化した tRNA の 15 位を ^{position specific} 位置特異的にかつ, 配列非特異的に認識していると考えられる. しかしながら, 配列情報を用いずに ArcTGT がどのようにして tRNA の 15 位を探し当てているのかは不明である. 本研究の ArcTGT・tRNA 複合体の構造解析から, 以上の tRNA 認識のメカニズムを含め, tRNA 修飾酵素が構造変化した tRNA をどのように認識し修飾しているかを解明することができると思われる.

表 1-1 ArcTGT に関して過去に行われた tRNA の変異体解析の結果

Watanabe *et al.* (2000) による結果を簡単にまとめたもの.

tRNA 変異体のタイプ	活性 (○:あり, ×:なし)
TΨC ステムを壊す	○
アンチコドン・ステムを壊す	○
D ステムを壊す	○
アクセプター・ステムを壊す	×
G15 を A, C, U に変異	×
G15 以外の 1 塩基置換	○
15 位を G 以外に, 14 位を G に変異 (G15 を 14 位にシフト)	×
15 位を G 以外に, 16 位を G に変異 (G15 を 16 位にシフト)	×

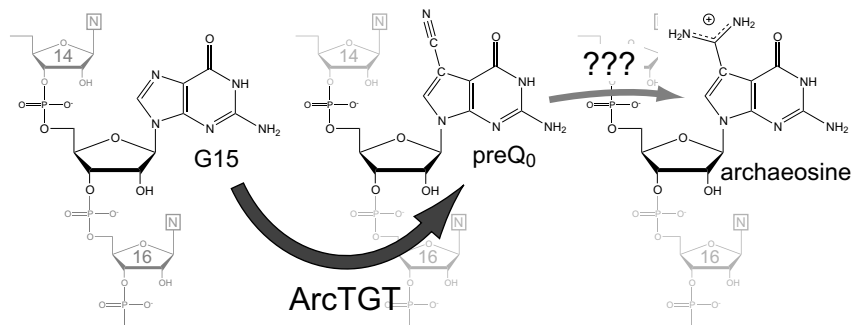


図 1-6 アーケオシンの生合成経路

tRNA 上の 15 位グアニンが ArcTGT により preQ₀ に交換され, さらに未解明の反応ステップを経てアーケオシンになる. PreQ₀ がどのようにして合成されているかも解明されていない.

図 1-7 ArcTGT と他の相同性を有する酵素のドメイン構成

ArcTGT と、さらに同じ TGT ファミリーに属する QueTGT, rRNA/snRNA のψ化にかかわる snoRNP 複合体の触媒コンポーネントである Cbf5p/dyskerin のドメイン構成を、それぞれ示した。また、バクテリア QueTGT の結晶構造 (Romier *et al.*, 1996a) を右上に示した。

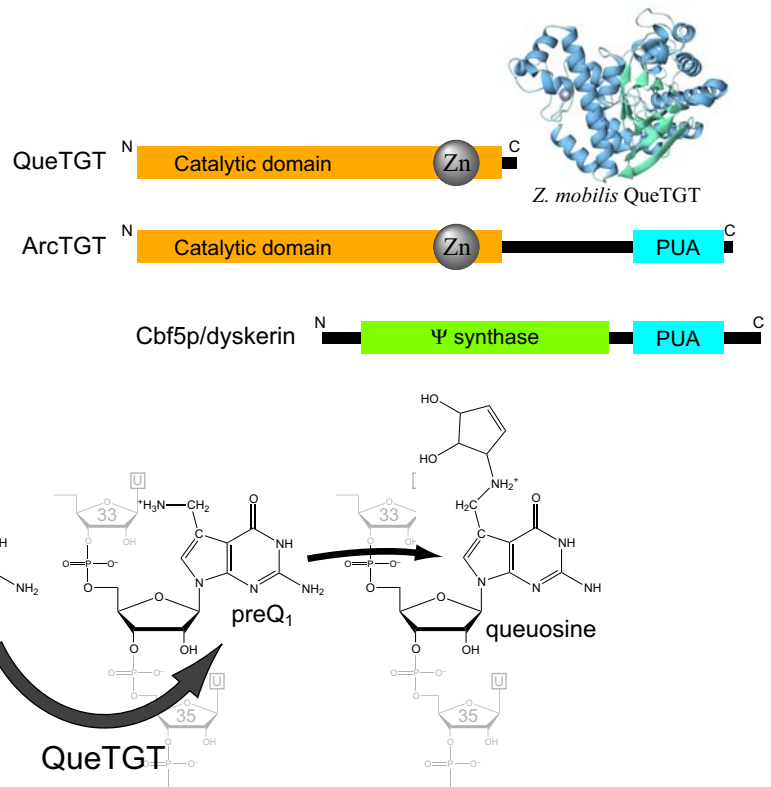


図 1-8 キューオシンの生合成経路

真正細菌におけるキューオシンの生合成経路を簡単に示した。tRNA アンチコドンループ上の 34 位グアニンが QueTGT により preQ₁ に交換され、さらに数ステップの反応によりシクロペンテンジオール環が付加されて Q となる。PreQ₁ がどのように合成されているかは解明されていない。一方、高等真核生物は Q の合成経路を持たず、栄養素として外部から取り入れた Q を QueTGT が直接 34 位の G と交換すると考えられている (Katze *et al.*, 1984)。

ArcTGT の一次構造は、図 1-7 (5 ページ) に示すように、N 末端側の領域と、C 末端側の機能未知の領域からなっている。N 末端側の領域は、近縁の酵素であるキューオシン TGT (QueTGT) 全長と相同性が高い (Romier *et al.*, 1997)。QueTGT は、図 1-8 (5 ページ) に示すように、tRNA アンチコドン・ループ 34 位に、修飾塩基キューオシンを導入する反応に関わっている (Nishimura, 1979)。すなわち、真核生物の QueTGT は Q 塩基を直接 tRNA に導入するが、真正細菌の QueTGT は前駆体である preQ₁ 塩基を tRNA に導入する (Nishimura, 1979)。真正細菌の QueTGT はその生化学的解析が進んでおり (Björk, 1995)、酵素単独あるいは preQ₁ との複合体の結晶構造も解明されている (Romier *et al.*, 1996a)。このように、QueTGT と ArcTGT の触媒する反応が類似している点や、上記のような配列の類似性から、ArcTGT の N 末端領域は触媒ドメインであると考えられている (Romier *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997)。

一方、ArcTGT の C 末端側領域は、真核生物、古細菌の RNA 修飾酵素に広く見られる、PUA (Pseudo-

uridine synthase/Archaeosine TGT) ドメインという配列モチーフを含んでいる (図 1-7, 5 ページ; Aravind & Koonin, 1999)。PUA ドメインの構造・機能はともに未知であるが、他の RNA 修飾酵素にも見出される為、RNA 認識に関わっているのではないかと推測されている。特に ArcTGT の PUA ドメインは、真核生物において rRNA, snRNA のシュドウリジン化に関わっている snoRNP 複合体の構成要素、Cbf5p/dyskerin (Kiss, 2001) の PUA ドメインに類似している (図 1-7)。これらのことから、ArcTGT の (PUA ドメインを含む) C 末端領域は、RNA 認識に関わっていると推測される。

さらに、Cbf5p のヒトの相同分子種である dyskerin^{ortholog}は、遺伝病、先天性角化異常症 (DC) の原因遺伝子であるといわれている (Heiss *et al.*, 1998; Lafontaine *et al.*, 1998)。この、DC は dyskerin をコードする遺伝子 *DKC1* のミスセンス変異により引き起こされる。DC の家系において最も頻繁に見つかっている変異は A353V のアミノ酸置換であることが報告されており (Knight *et al.*, 1999)、興味深いことに、Ala353 は dyskerin の PUA ドメイン上の残基である。

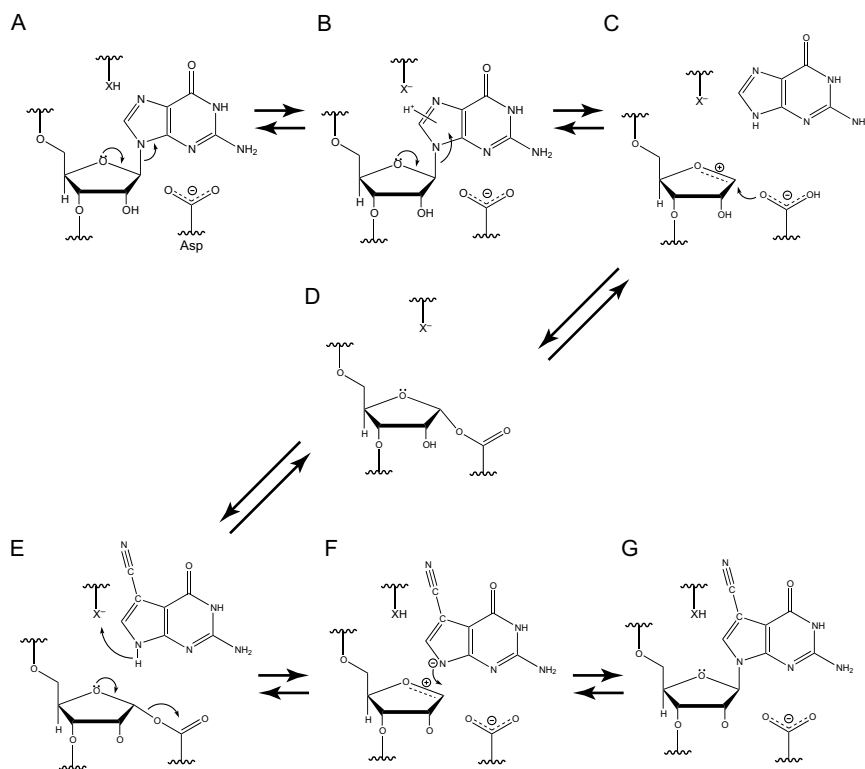


図 1-9 塩基交換反応に対して提唱されている反応機構

(A) 酵素に tRNA が結合し、触媒サイトに G15 が結合する。(B) 酵素側の残基により G15 の塩基がプロトン化される。(C) その結果、*N*-グリコシド結合が開裂し、オキソカルベニウム・カチオン（遷移状態）が生じる。さらに、カチオンを酵素の Asp 残基が求核攻撃する。(D) 新たな *O*-グリコシド結合が生じ、グアニンが脱離する。(E) PreQ₀ が触媒サイトに取り込まれ、酵素側の残基により N9 が脱プロトン化する。一方で、不安定な酵素との *O*-グリコシド結合が開裂し、再びオキソカルベニウム・カチオン（遷移状態）が生じる。(F) PreQ₀ の N9 がカチオンを求核攻撃する。(G) PreQ₀ との間に *N*-グリコシド結合が再生し、反応が完了する。

1.4 塩基交換反応

ArcTGT と QueTGT は、tRNA のポリヌクレオチド鎖上で *N*-グリコシド結合を開裂・再生させ、核酸の塩基の部分のみを交換するという、特徴的な反応機構で tRNA を修飾する。ArcTGT は G15 のグアニンと preQ₀ を入れ替え (図 1-6; Watanabe *et al.*, 1997)、一方、QueTGT は G34 のグアニンと preQ₁ を入れ替えることで修飾を導入している (図 1-8; Nishimura, 1979)。*N*-グリコシド結合を切断する酵素には、DNA の除去修復に関わる DNA グリコシラーゼなど (Cunningham, 1997; Krokan *et al.*, 1997) があり、また、同一の塩基に対して *N*-グリコシド結合を開裂・再生させる酵素にはシュードウリジン合成酵素 (Gu *et al.*, 1999) があるが、塩基を全く別のものに入れ替えてしまうという反応は他の酵素には見られないものである。

塩基交換の反応機構に関しては、ArcTGT と QueTGT 両者の酵素の類似性や、反応と基質の類似性から、ほぼ同じ機構であると推測される (Watanabe *et*

al., 1997)。さらに、真正細菌 *Zymomonas mobilis* 由来 QueTGT の結晶構造 (Romier *et al.*, 1996a) や生化学的な解析 (Romier *et al.*, 1996b) から、ArcTGT、QueTGT 両者に共通の塩基交換反応は以下のように進行すると推測されている (図 1-9, 6 ページ)。

1. *N*-グリコシド結合が開裂し、グアニンが遊離する。リボースはオキソカルベニウム・カチオン遷移状態となる。
2. 求核触媒として働く、保存された Asp 残基が tRNA のリボースの C1' を求核攻撃する。
3. 酵素と tRNA の間に新しい *O*-グリコシド結合が生成する。
4. 基質ポケットからグアニンが遊離し、preQ₀ (QueTGT の場合は preQ₁) が取り込まれる。
5. *O*-グリコシド結合が開裂し、リボースは再びオキソカルベニウム・カチオン遷移状態となる。
6. PreQ₀ の N9 がリボースの C1' を求核攻撃する。

7. *N*-グリコシド結合が再生して反応が完了する。

ただし、上記の過程で確認されているのは、酵素と tRNA の共有結合した、(3) ができる反応中間体^{intermediate}が存在する (Romier *et al.*, 1996b) という点と、活性サイト付近に Asp 残基がある (Romier *et al.*, 1996a) という点のみである。さらに、上記の反応機構には以下に挙げるような疑問点が残る。

- 結晶構造から上述の反応機構で出てくる求核触媒残基は *Z. mobilis* QueTGT の Asp102 (*P. horikoshii* ArcTGT では Asp95) であると推測されている (Romier *et al.*, 1996b)。 *Z. mobilis* QueTGT の結晶構造では Asp のカルボキシル基が塩基 (あるいはリボースがくるであろうと推測される向き) と逆方向に向いているが (図 3-11, 36 ページ, パネル C) (Romier *et al.*, 1996a), 本当に求核残基なのか。
- (1), (2) のうち、どちらが先に起こるのか。 (1) だと S_N1 的であり, (2) だと S_N2 的に求核置換^{nucleophilic substitution}反応が進むことになる。 (1) であると考え、*N*-グリコシドを開裂させるように塩基をプロトン化する酸性

残基が必要であるが, QueTGT の結晶構造からは不明である。

- (5), (6) のうち、どちらが先に起こるのか。 (5) だと S_N1 的であり, (6) だと S_N2 的に求核置換反応が進むことになる。 また、どちらの様式で進むにしても、新たに取り込まれた塩基の 9 位が脱プロトン化していなければ求核置換反応は進み得ない。 塩基性残基が塩基からプロトンを引き抜く必要がある。 1 段階目の求核置換反応で酸触媒として働いた残基がここで塩基触媒として働いている可能性が高いが, QueTGT の結晶構造からは不明である。

上記の疑問点は, ArcTGT の結晶構造, あるいは ArcTGT と基質 (グアニン, preQ₀, tRNA を含む) との複合体の結晶構造を解明することで明らかにできる可能性がある。

1.5 本研究の概要

本研究では、まず、ArcTGTによる基質認識と塩基交換反応の解明を目的とし、X線結晶構造解析法により超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 ArcTGT の構造決定を行い、さらにグアニン、preQ₀、グアノシン、デオキシグアノシン類似体それぞれとの複合体の構造を決定した。次に、上述のRNA修飾酵素によるRNA認識とRNAの構造変化を解明することを目的とし、ArcTGTとtRNA^{Val}複合体の結晶構造を決定した。さらに、得られた結晶構造に基づいてArcTGT及びtRNA^{Val}変異体を作成し、活性測定を行った。

1.5.1 第2章の概要

第2章では、超好熱性古細菌 *P. horikoshii* 由来 ArcTGTの大量調製から構造決定に至るまでを詳述した。以下に概略を述べる。まず、東京工業大学・生命理工学研究所・岡田研究室からいただいた *P. horikoshii* ArcTGTの発現系を用いて、ArcTGTの大量調製・精製の系を確立した。さらに酵素単体の結晶化スクリーニングを行った結果、最終的に分解能2.0 Å程度まで回折する結晶が得られた。また、酵素のセレノメチオン置換体を用いたMAD法による構造決定を行った。酵素単体の結晶構造は最終的に分解能2.2 Åで決定した。一方、酵素単体の結晶に様々なリガンドを浸潤させることで、リガンドとの複合体の結晶構造を決定した。構造決定は酵素単体の構造をモデルとして用いた分子置換法によって行った。最終的には、グアニンとの複合体を2.3 Å、preQ₀との複合体を2.5 Å、グアノシンとの複合体を2.8 Å、デオキシグアノシン類似体との複合体を2.8 Åの分解能でそれぞれ決定した。

1.5.2 第3章の概要

第3章では、第2章で決定した酵素単体あるいはリガンドとの複合体の構造から、「C末端ドメインの構造」、「リガンドの認識機構」、「塩基交換の反応機構」について議論した。構造未知であったPUAドメインを含むC末端領域は3つのドメインから構成されており、βシートに富む構造をとっていることが明らかになった。βシート上には多くの塩基性残基が存在して分子表面に正電荷のパッチを形成しており、C末端ドメインによるtRNA認識が示唆された。一方、ArcTGTは結晶構造中で緊密な二量体を形成しており、

溶液中での動的光散乱の結果からも二量体化が示された。N末端領域の触媒サイトと、C末端ドメインの仮説的なtRNA認識サイトの配向から、二量体化によるtRNA認識が示唆された。次に、リガンド・フリーの構造では、触媒サイト付近の残基97-106がdisorderしていたが、リガンドが結合することで構造変化してαヘリックスを形成することが判明した。また、グアニン複合体とpreQ₀複合体の構造を比較することで、ArcTGTが異なるリガンドを同様に認識する機構を解明した。さらにQueTGT・preQ₀複合体の構造と比較することで、ArcTGTとQueTGTのリガンド認識の違いが何に起因するかを明らかにした。次に、上記のリガンドとの複合体に加え、さらにグアノシン、デオキシグアノシン類似体との複合体の構造とも比較することで、従来求核触媒残基であると考えられてきたAsp95の塩基交換反応における役割について議論した。

1.5.3 第4章の概要

第4章では、ArcTGTとtRNA複合体の結晶から、構造解析に至るまでを詳述した。以下に概略を述べる。まず、*P. horikoshii* tRNA^{Val}_(UAC)のT7 RNAポリメラーゼによる大量転写系を構築し、結晶化に適した純度に精製した。次にArcTGTとtRNA^{Val}複合体の結晶化スクリーニングを行い、いくつかの条件下で結晶化に成功した。さらに結晶化条件を改善することで、分解能3.3 Åまでの回折データを収集することができた。ArcTGT単体の結晶構造をモデルとした分子置換法により位相決定を行い、最終的には分解能3.3 Åで複合体の結晶構造を決定した。

1.5.4 第5章の概要

第5章では、第4章の結果に基づき、「tRNA修飾酵素による構造変化を起こしたtRNA認識の機構」、「配列非特異的かつ位置特異的なtRNA認識機構」について議論した。さらに、得られた結晶構造に基づいて酵素とtRNAの変異体をデザインし、それらの活性測定を行った。第5章では、その方法について述べ、さらに結果についての考察を行った。

ArcTGTは二量体化することによりtRNAを認識しており、ArcTGTに結合したtRNAは大きく構造変化を起こしていた。その構造変化は、単に変性してしま

うのではなく、修飾の標的部分が露出するよう tRNA の二次構造が組み変わっていることが明らかになった。すなわち、この ArcTGT に結合した tRNA は、正規の L 字型 tRNA とは異なった新たなコア構造を持つ、「オルタナティブ」な L 字型構造をとっていた。このオルタナティブ型 tRNA では、D アームの構造が完全に破壊され U8 位から U22 位が tRNA 本体から飛び出し、そのうち U8 位から U17 位は ArcTGT に認識されている。一方、正規の tRNA では D アームを中心にコア構造が構成されているが、オルタナティブ型 tRNA では、元 D ステムの一部とバリアブル・ループにより新たなステム構造「DV ステム」が形成され、新たなコア構造の中心を形成していた。

さらに、ArcTGT による、配列非特異的かつ位置特異的な tRNA の 15 位の認識は、tRNA のバックボーンの糖とリン酸を 1 残基ずつ厳密に認識することで達成されていることを突き止めた。ArcTGT の PUA ドメインを含む C 末端ドメインは tRNA のアクセプター・ステムのリン酸バックボーンを正確に認識し、飛び出した D アームの付け根の部分 U8 位を酵素に対して正確に位置づけていた。さらに ArcTGT は、U8 位から A14

位の（一本鎖になった RNA の）バックボーンを一つ一つ認識し、ポリヌクレオチド鎖の長さを測ることで、正確に G15 位を触媒サイトに位置づけていた。

次に、tRNA との複合体における ArcTGT の触媒サイトの構造から、保存された Asp249 残基が求核触媒残基である可能性を示した。変異体の活性測定の結果や、他の類似の反応を触媒する酵素の触媒サイトの構造などからも、Asp249 残基が求核触媒残基である可能性が強く示唆された。

1.5.5 第 6 章の概要

第 6 章では、ArcTGT・tRNA 複合体の構造だけでなく、ArcTGT と小分子リガンドとの複合体の構造解析の結果も併せた上で、「塩基交換反応の触媒機構」、「tRNA 修飾酵素による tRNA の認識機構」について総合的に議論した。またさらに、本研究で解明された tRNA 認識機構が、他の系における酵素による RNA 認識の構造生物学的な基盤となる可能性等についても議論した。

□

第2章

超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 ArcTGT の X線結晶構造解析

本章では、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 ArcTGT の精製と結晶化、X線結晶構造解析について述べる。さらに、ArcTGT とリガンドであるグアニン、preQ₀、グアノシン、デオキシグアノシン類似体、それぞれとの複合体の構造解析についても述べた。

Pyrococcus horikoshii は、最高生育温度が 104℃、至適生育温度が 98℃と高く、生育には酸素の代わりに硫黄を必要とする嫌気性の古細菌である。その為本細菌由来の酵素は非常に耐熱性が高く、機能・構造解析に有利であると考えられる。1998年に、独立行政法人・製品評価技術基盤機構により全ゲノム解析が完了している。

2.1 材料と方法

2.1.1 ArcTGT の構造解析

2.1.1.1 組み換え蛋白質の大量調製

P. horikoshii 由来 ArcTGT の native 組み換え体は、当初、東五大・生命理互・岡田研究室から精製サンプルを頂いて結晶化していたが、最終的には発現系を頂き、独自に培養・精製を行った。以下にその方法を述べる。

P. horikoshii 由来 ArcTGT の発現系は、ArcTGT 遺伝子 (1749 bp, 582 aa) を pET3a ベクター (Novagen) に *Nde*I, *Bam*HI サイトでつないだものである (Watanabe *et al.*, 2000)。この発現プラスミドを大腸菌株 BL21(DE3)TIR (大腸菌株 BL21(DE3) に Arg と Ile のマイナーコドン AGR と AUA に対応した tRNA 遺伝子を導入したもの) に導入し、終濃度 50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地で 37℃ にて培養し、波長 600 nm における濁度が 0.1 になった時点で培養温度を 20℃ に下げ、さらに 24 時間培養した。遠心 (4,000 g, 15 分) により集菌した後、培養に使用した培地の 3% 体積の緩衝液 A (表 2-1, 12 ページ) に懸濁し、超音波で菌体を破碎した。遠心 (12,000 g, 50 分) により不溶性画分を除いた後、上清を 40 分間 80℃ に加熱して大腸菌由来の蛋白質を熱変性させ、さらに遠心 (12,000 g, 50 分) により変性蛋白質を除去した。次に、得られた

ArcTGT を含む粗抽出液を疎水性クロマトグラフィーにより精製した。緩衝液 B (表 2-1, 12 ページ) で平衡化した Butyl TOYOPEARL (東洋曹達工業) を加え、更に溶液の硫酸アンモニウム濃度が 1.0 M になるように 3.0 M 硫酸アンモニウム溶液を加えた。この ArcTGT が吸着した Butyl TOYOPEARL 樹脂をカラムに充填し、緩衝液 B から緩衝液 C (表 2-1) への直線濃度勾配で目的蛋白質を溶出した。以上の疎水性クロマトグラフィーで分離したサンプルを透析法により緩衝液 D (表 2-1) に緩衝液交換した上で、陽イオン交換カラム Uno S (BIO-RAD) により精製した。溶出は緩衝液 D* から E (表 2-1) への直線濃度勾配により行った。この時点で得られた ArcTGT 準精製サンプルを 50% グリセロールを含む緩衝液 A* (表 2-1) に溶解し、-20℃ にて保存した。

結晶化の際には、上記の ArcTGT 準精製サンプルを疎水性カラム PhenylSuperose (Amersham Biosciences) により精製した。サンプルに 800 mM になるように硫酸アンモニウムを添加してカラムにチャージし、緩衝液 F から G (表 2-1) への直線濃度勾配により溶出した。ArcTGT を含む画分を限外濾過装置 Centriprep YM-30 (Millipore) で濃縮し、緩衝液 A** (表 2-1) への緩衝液交換を行った。緩衝液交換は、ゲル濾過カラム

表 2-1 ArcTGT の精製に使用した緩衝液の一覧

	緩衝剤	塩類	還元剤	その他
A	50 mM Tris・HCl pH 7.5	500 mM NaCl 200 mM MgCl ₂	10 mM DTT	1 mM PMSF
A*	20 mM Tris・HCl pH 7.5	400 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	10 mM 2-ME	
A**	10 mM Tris・HCl pH 7.5	400 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	10 mM 2-ME	
B	50 mM Tris・HCl pH 7.5	300 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1 mM DTT	0.1 mM PMSF
C	50 mM Tris・HCl pH 7.5	5 mM MgCl ₂	1 mM DTT	0.1 mM PMSF
D	100 mM 磷酸ナトリウム pH 6.5	200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	1 mM DTT	0.1 mM PMSF
D*	100 mM 磷酸ナトリウム pH 6.5	50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	10 mM 2-ME	
E	100 mM 磷酸ナトリウム pH 6.5	2 M NaCl 5 mM MgCl ₂	10 mM 2-ME	
F	20 mM Tris・HCl pH 7.5	300 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0.8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM 2-ME	
G	20 mM Tris・HCl pH 7.5	300 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	10 mM 2-ME	

Superdex200 (Amersham Biosciences) により行った。最終精製サンプルの蛋白質濃度は波長 280 nm における吸光度により決定した。

2.1.1.2 動的光散乱の測定

最終精製サンプルが結晶化に適するかどうか調べる為に動的光散乱の測定を行った。測定には DynaPro MS (Protein Solutions) を用いた。サンプル濃度は 2 g/l になるよう調製し、測定前に 0.1 μm Anodisc13 グラスフィルター (Whatman) により濾過した。得られたデータはプログラム DYNAMICS (Protein Solutions) を用いて解析した。

2.1.1.3 結晶化

上記の緩衝液 A** (表 2-1) に溶解した最終精製サンプルを限外濾過装置 Centriprep YM-10 (Millipore) で濃縮した後、0.1 μm Ultrafree-MC filter (Millipore) により不溶物を除き、紫外吸光度から濃度を 11 g/l にあわせ、結晶化用サンプルとした。結晶化条件のスクリーニングは 20°C でハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。具体的には、結晶化用サンプル 1 μl とスクリーニング用沈殿剤 1 μl をシリコン化したスライドガラス上で混合し、500 μl のスクリーニング用沈殿剤

を満たした細胞培養用 24 穴プレート (Corning) 上に、真空グリースを用いてはり付け封止した。スクリーニングには CrystalScreen, CrystalScreen II, Natrix (Hampton Research) を用いた。

さらに、沈殿剤の濃度勾配、緩衝液の pH、結晶化温度などを変化させて結晶化条件の改良を試みた。また、添加剤のスクリーニングによる結晶化条件の改良も試みた。添加剤としては、AdditiveScreen I, II, III, CrystalScreen, CrystalScreen II (Hampton Research) を用いた。

2.1.1.4 セレノメチオニン標識蛋白質の大量調製と結晶化

ArcTGT 発現用ベクターを B834(DE3)CodonPlus 株 (メチオニン要求性株 B834(DE3) に Ile, Arg, Leu のマイナーコドンに対応する tRNA 遺伝子を導入したものに導入し、50 μg/ml アンピシリン、25 μg/ml セレノメチオニンを含む LeMaster 培地を用い 37°C にて培養し、波長 600 nm における濁度が 0.6 になった時点で 1 mM IPTG により発現を誘導しさらに 8 時間培養した。精製方法等は 2.1.1.1 節 (11 ページ) に準じたが、セレノメチオニン置換体の酵素が酸化され易いことを考慮し、常に還元剤として 10 mM DTT を添加した。

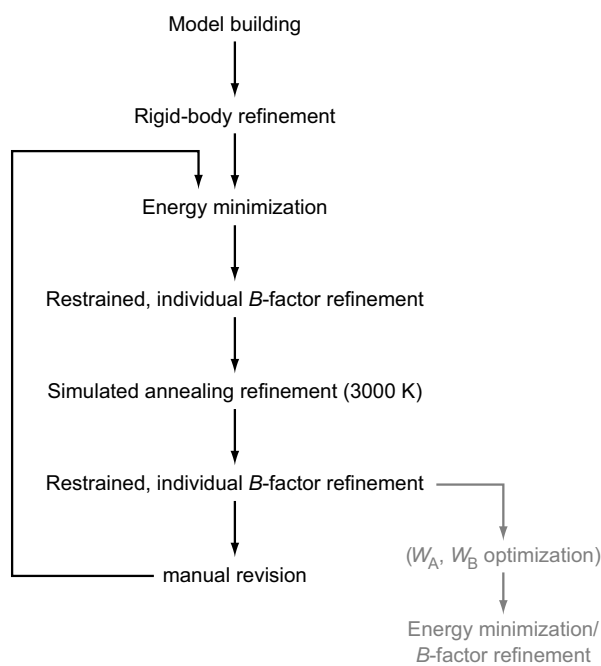


図 2-1 本研究で使用した結晶構造精密化手順

灰色で示した部分は、構造計算の最終段階に行った手順を示している。

精製したサンプルの質量分析を理化学研究所・生体分子解析室に依頼した。結晶化条件の最適化は主に沈殿剤の濃度勾配変化により行った。

2.1.1.5 X線回折像の測定 (B型結晶)

B型結晶(図 2-4, 17 ページ, パネル E)の回折像測定は全て低温(100 K)で行った。結晶をハーベスト溶液でハーベストした後、マウスピペットにより徐々に高濃度の抗凍結剤(グリセロール)を含む溶液に移した。最終的に結晶をクライオループで掬い、100 Kの窒素クライオストリームで瞬時に冷却した。実験室系におけるX線回折像の測定は、回転対陽極型X線発生装置 UltraX18 (理学電機)とイメージングプレート X線検出装置 RaxisIV (理学電機)を用いて行った。また、シンクロトロン放射光を用いた回折実験は、SPring-8 BL45PXにて波長 1.070 Å のX線を用いて行った。回折X線の検出には同様に RaxisIV を使用した。

2.1.1.6 X線回折像の測定 (C型結晶)

C型結晶(図 2-4, パネル G)の測定は、B型結晶の測定と同様の方法で行った。ただし、こちらの結晶はハーベストや抗凍結剤に対して安定であったので、モザイク性の低下を期待して溶媒の抗凍結剤への置換は透析法により行った。透析には Spectra/Por Membrane M.W.C.O. 50 kDa (Spectrum Laboratories) のものを用い

た。実験室系における回折実験は B型結晶と同様の方法で行った。放射光施設でのX線回折像の測定は、SPring-8 BL44XUにて波長 0.9 Å のX線を用いて行った。回折X線の検出には PX210 CCD (Oxford) を使用した。一方、セレノメチオニン置換体結晶の XAFS 測定と回折実験は SPring-8 BL41XUにて行った。回折X線の検出には marCCD165 (Mar Research) を使用した。回折データは、波長 0.97392 Å (High-energy remote), 0.98203 Å (Low-energy remote), 0.97916 Å (Peak), 0.97931 Å (Edge) それぞれ 4 波長のX線に対して収集した。

2.1.1.7 回折データの処理

HKL2000 package (Otwinowski & Minor, 1997) に含まれる Denzo により指数付けとデンストメトリーを行い、同 Scalepack によりスケールリング、データリダクションを行って各指数に対する回折強度を求めた。さらに CCP4 program suite (CCP4, 1994) に含まれる scalepack2mtz により ASCII 形式の回折強度データを mtz 形式に変換し、同 truncate により構造因子への変換を行った。その他 mtz 形式の構造因子データの操作には cad や mtzutils 等 (CCP4, 1994) を用いた。

2.1.1.8 重原子同型置換体の探索

C型結晶に対し、重原子同型置換 (MIR) 法による位相決定の為に重原子誘導体結晶の調製を試みた。スクリーニングには Hg, Pt, Au, Pd, Ir, Tl の化合物を用いた。重原子誘導体結晶は、重原子化合物を含むハーベスト溶液中で、結晶に重原子化合物を浸潤させることで行った。ある時間浸潤後、2.1.1.6 節 (13 ページ) の方法と同様の方法で、透析により抗凍結剤を含む溶液に置換してから回折像を測定した。

2.1.1.9 分子置換法による位相決定の試み

C型結晶で測定した回折データに対し、分子置換法による位相決定を試みた。ArcTGT の N 末端は QueTGT の全長と配列類似性が高い。モデルとしては、*Z. mobilis* QueTGT の結晶構造を用いた。分子置換には CCP4 の AMoRe (Navaza, 1994) を使用した。

2.1.1.10 MAD 法による位相決定

まず、2.1.1.6 節 (13 ページ) の方法により測定した、セレノメチオニン置換体 C型結晶(図 2-4, パネル H)のピーク波長 (0.97916 Å) のデータに対して、異常

分散パターン解析による異常散乱原子の位置決定を試みた。プログラムとしては CCP4 の *rsps* (Knight, 2000) を用いた。一方で、直接法のプログラムである SnB (Weeks & Miller, 1999) を用いた異常散乱原子の位置決定も試みた。この場合、規格化構造因子の計算には *drear* (Blessing & Smith, 1999) を用いた。さらに SnB の計算では、使用する反射の数, triplet invariant の数, 試行毎の SnB サイクル数はそれぞれ, 求める重原子サイト数の 30 倍, 300 倍, 2 倍とした。各 SnB サイクルにおける位相の精密化は *parameter-shift method* で行った。また、初期位相としては、重原子サイトをランダムに配置したモデルを使用した。全体で 1000 回試行を行った上で、最も R_{\min} 値の小さい結果を解とした。

次に、MAD 法による位相計算・精密化は、CCP4 の *mlphare* あるいは *sharp* (de La Fortelle & Bricogne, 1997) を使用し、3.2 Å 分解能の反射までに対して行った。位相の改良には、CCP4 の *dm* と *solomon* (Abrahams & Leslie, 1996) を使用した。具体的には、まず晶系と格子長、ArcTGT の分子量から推定される結晶の溶媒含量を用いて、*dm* あるいは *solomon* による溶媒平滑化とヒストグラムマッチング (*dm* のみ) を行った。次に、得られた電子密度に *Z. mobilis* QueTGT のモデルを重ね合わせたところ、ArcTGT が非対称単位中に 2 分子存在することが確認された為、重ね合わせたモデルから NCS 行列を計算し、*dm* による電子密度平均化、溶媒平滑化、ヒストグラムマッチングによる位相改良を行った。NCS 行列の計算には CCP4 の *lsqkab* を、平均化マスクの生成には *ncsmask* を使用した。Dm の計算は 6 Å からサイクルごとに分解能を上げる方法を取り、サイクルは 200 回行った。次に QueTGT には存在しない C 末端ドメインの大体の主鎖トレースを行い、C 末端ドメインに対する NCS 行列を計算した。トレースには *O* (Jones *et al.*, 1991) を使用した。さらに、同様にして *dm* による電子密度平均化を含めた位相改良と、3.2 Å から 2.8 Å への位相拡張を行った。

2.1.1.11 ArcTGT 原子モデルの構築

原子モデルの構築には *O* (Jones *et al.*, 1991) を使用した。N 末端側のドメインは、主鎖のトポロジーが *Z. mobilis* QueTGT とほぼ同じであった為これを参考にしつつ行った。C 末端ドメインは類似の構造が知られていない為ゼロからモデルの構築を行った。

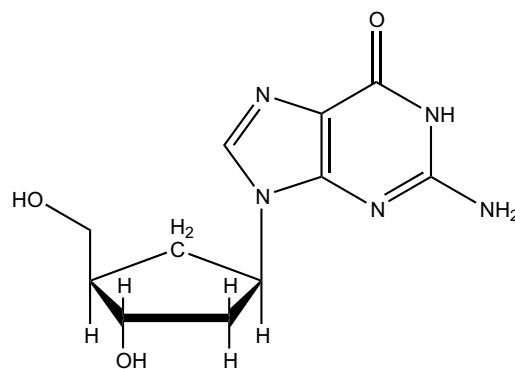


図 2-2 本研究で使用したデオキシグアノシン類似体の構造式

2.1.1.12 ArcTGT モデルの精密化

原子モデルの精密化には *Crystallography & NMR System* (CNS; Brunger *et al.*, 1998) を使用した。精密化における *cross validation* には、全反射の 10% を使用した。具体的には、図 2-1 (13 ページ) のように、剛体精密化、エネルギー極小化、焼き鈍し法、*procheck* (Laskowski *et al.*, 1993) を用いたモデルの検証、*O* を用いたモデルの修正を交互に行った。エネルギー極小化、捻れ角 MD で使用する力場としては、Engh&Huber のパラメータ (Engh & Huber, 1991) から引力を無視したものを使用した。初期の精密化サイクルにおいては、非対称単位中の蛋白質主鎖に対して $300 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ の NCS restraint をかけた。R 因子がある程度下がったところで、*native* 結晶のデータに対して CCP4 の *AMoRe* を用いて分子置換を行った。これはセレノメチオニン置換体結晶と *native* 結晶が非同型であった為である。さらに、*native* 結晶の反射に対して同様に CNS と *O* を用いてモデルの精密化を行った。この時点で、水分子のモデルも構築した。水分子のモデル構築は CNS により自動的に行った (*water_pick.inp* を使用)。水分子の自動判別には、 $|F_o| - |F_c|$ 電子密度マップ中のピークの高さ (3σ 以上)、蛋白質原子との距離 (2.2–3.5 Å) だけでなく、水素結合の可・不可も判別の基準にした。

2.1.2 ArcTGT とリガンド (グアニン等) との複合体の構造解析

2.1.2.1 複合体結晶の調製

リガンドのうち、*preQ₀* (図 1-6, 4 ページ) は東工大・生命理互・岡田研究室から頂いた。デオキシグアノシン類似体 (図 2-2, 14 ページ) は、東京医科歯科大・生体材料互学研究所の杉山 弘 先生から頂いた。これ

はデオキシグアノシンの O4' 原子がメチレン基 (CH₂) に置き換わったものである。リガンドとの複合体の結晶の調製は、すべて結晶に基質を浸潤させることで行った。結晶をハーベストし、透析により抗凍結剤入り沈殿剤溶液に置換したのち、基質溶液を加えて 24 時間以上静置して浸潤させた。各基質の浸潤条件における終濃度は、それぞれグアニン 3.0 mM, preQ₀ 2.5 mM, グアノシン 15 mM, デオキシグアノシン類似体 1.7 mM である。

2.1.2.2 回折像の測定と回折データ処理

回折像の測定は全て低温条件 (100 K), 2.1.1.5 節 (13 ページ) に準ずる方法で行った。グアニンとの複合体, preQ₀ との複合体は, SPring-8 BL45PX にて、波長 1.020 Å の X 線を用い、RaxisV (理学電機) を使用して測定した。グアノシンとの複合体, デオキシグアノシン類似体との複合体は, SPring-8 BL41XU にて波長

1.0 Å の X 線を用い、marCCD165 を使用して測定した。収集したデータの処理は、2.1.1.7 節 (13 ページ) に準ずる方法で行った。

2.1.2.3 分子置換法による位相決定とモデルの精密化

各複合体の位相決定は、CCP4 の AMoRe を用いて、分子置換法により行った。分子置換のモデルとしては、2.1.1.12 節 (14 ページ) で決定した ArcTGT 単独の結晶構造を使用した。さらに、各モデルの精密化は CNS で行った。方法は 2.1.1.12 節に準ずる。CNS で使用するグアニン、グアノシンのパラメータはグアニル酸のものから借用した。PreQ₀ のパラメータは xplo2d により分子座標から生成したものを使用した。デオキシグアノシン類似体の電子密度にはデオキシグアノシンをモデルとして置いて精密化を行った。

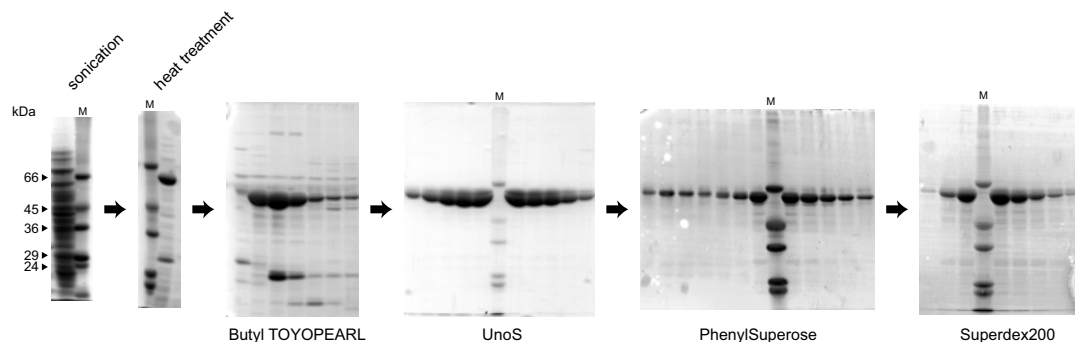


図 2-3 大腸菌で大量発現させた ArcTGT の精製

2.2 結果と考察

2.2.1 ArcTGT の構造解析

2.2.1.1 組み換え蛋白質の大量調製

当初, *P. horikoshii* ArcTGT の大腸菌における発現量はかなり少なかった. 古細菌と真正細菌のコドン使用頻度の違いが原因であると考え, Arg, Ile に対応するマイナーコドンに対応する tRNA を共発現する BL21(DE3)TIR での発現を試した. その結果, ArcTGT の発現量が飛躍的に増加したが, 菌破碎後に ArcTGT が殆ど不溶化して沈殿し, 最終的な収量はそれほど増加しなかった. 不溶化の原因としては, 好熱性古細菌由来の ArcTGT 自体が大腸菌内で正しく折り畳みにくいことが考えられた為, 発現誘導をかけるタイミングや IPTG の濃度, 培養温度の調整, 発現誘導後エタノールを加える (シャペロンの発現の誘導), などを試みたがいずれの場合も改善が見られなかった. ArcTGT は, 誘導をかけない場合でも発現がかなり漏洩することがわかっていた. その為, グルコースを加えて漏洩を抑えることを試みたが, 殆ど効果があらわれなかった. ところが一方, 発現誘導をかけずに発現させたほうが, 可溶化量が増加することが判明した. また, 培養温度をある程度菌が増えたところ ($OD_{600}=0.1$) で 20°C 程度にすると, さらに可溶化量が増加した. また, 菌破碎時の緩衝液にマグネシウムイオンを多く加えると可溶化量が少々増加した.

精製方法に関しては, 東五大・岡田研である程度確立していたが (Watanabe *et al.*, 2000), 途中での ArcTGT の沈殿が多く収量が悪かった為, さらなる改善を試みた. 初めの精製法は, 熱処理, 陰イオン交換カラム, 疎水性カラム, 陽イオン交換カラム, ハイドロキシアパタイトカラムの順であった.

熱処理上清を低イオン濃度の緩衝液に対して透析すると ArcTGT がかなり沈殿する為, イオン強度を下げる必要のない疎水性カラムを先に行うことにした. また, はじめの陰イオン交換カラムでは, 大腸菌由来の夾雑物が ArcTGT と殆ど同時に溶出する為, 精製効果が低いと考えて行わなかった.

次に, 疎水性カラムではかなり夾雑物が除かれた. ただ, 元の手順では硫酸の初期濃度を 1.6 M にしていた為 ArcTGT が一部沈殿していたようだった. その為, ArcTGT が十分に結合する限界の 1.0 M に変更した. しかし, それでも熱処理上清に硫酸を加えてカラムにチャージすると, 途中で徐々に凝集しカラムが詰まってしまった. 熱処理上清に硫酸を加えると同時に平衡化した樹脂も加え, よく混ぜた上でカラムに充填することで凝集を起こさせずに樹脂に吸着させることができた.

次に, 陽イオン交換カラムでは殆どの夾雑物が除かれた. ただし, 前段階の溶出画分をイオン交換樹脂に吸着させる為に低イオン濃度にする, ArcTGT が沈殿してしまうことが分かった. これを防ぐ為に樹脂に吸着できる最高の塩濃度を緩衝液の pH を振って検討したところ, pH 6.5 の条件 (緩衝液 D*, 表 2-1, 12 ページ) で沈殿せずにカラムにチャージできることが分かった.

この段階で十分に純度の高いサンプルが得られたので, ハイドロキシアパタイトカラムは使用せずに結晶化に用いた (図 2-3, 16 ページ). ただし, グリセロールストックにした後時間がたつと結晶が出にくくなったので, さらに疎水性カラムとゲル濾過カラムを使用して精製した.

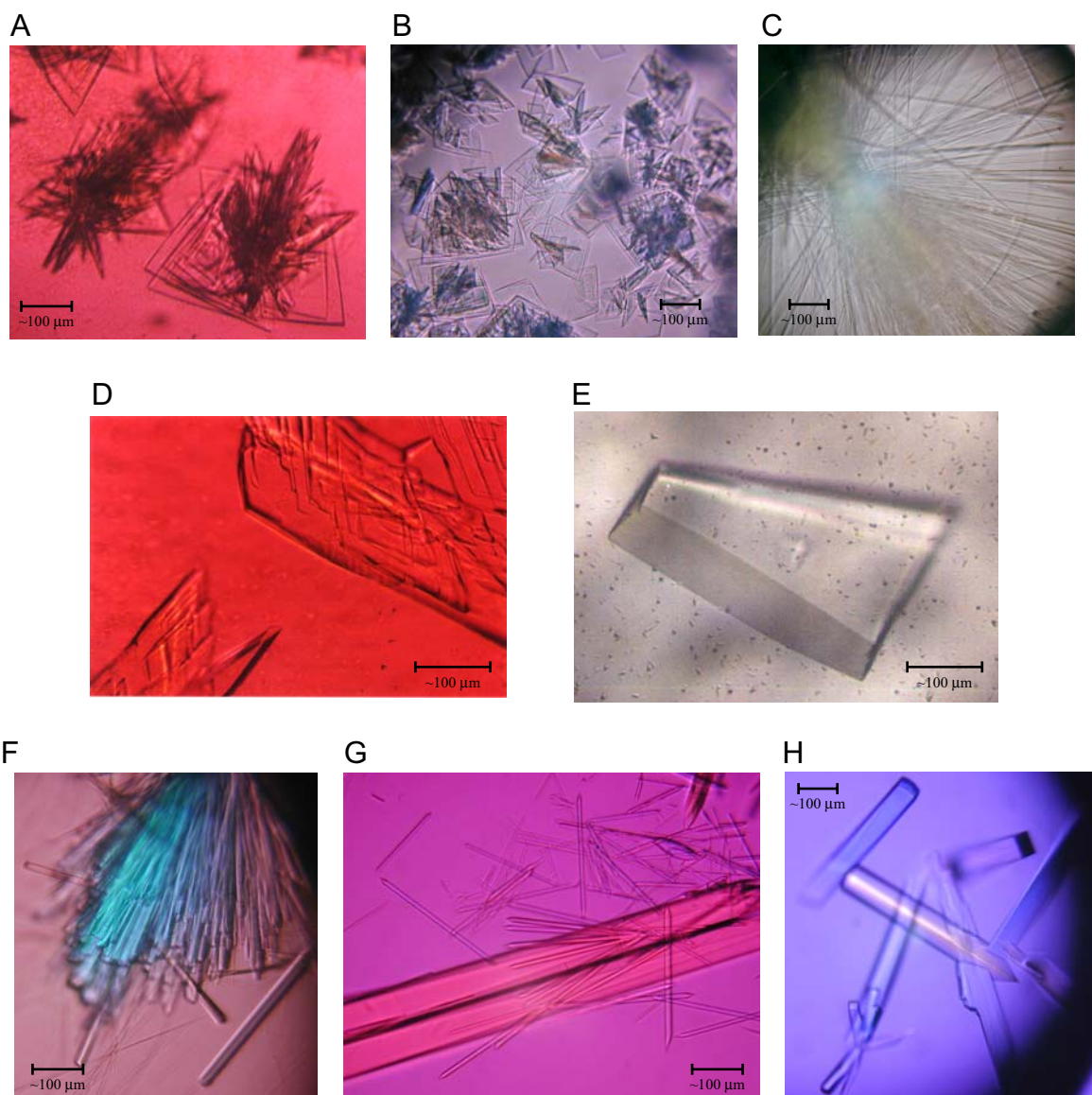


図 2-4 リガンド・フリー ArcTGT の結晶の写真

(A) A 型結晶, (B) A' 型結晶, (C) A'' 型結晶, (D) B 型結晶, (E) 最適化後の B 型結晶, (F) C 型結晶, (G) 最適化後の C 型結晶, (H) セレノメチオニ化 ArcTGT の C 型結晶. 写真中に線で大まかな寸法を示した.

当初は培養液 8 l から 1 mg 程度しか ArcTGT が得られなかったが、この方法で、最終的に 50 mg 程度得ることができた (図 2-3, 16 ページ).

2.2.1.2 動的光散乱の測定

サンプルが結晶化に適する状態であるかどうか調べる為、光散乱を測定したところ $C_p/R_h=23.7\%$ と単分散であることが分かった. また、分子量が約 124 kDa ($R_h=4.67$ nm) と見積もられたことから、溶液中で 2 量体化していることが示唆された. 一方、高温 (60°C) で測定したところ、分子量の見積もりもが約 131 kDa ($R_h=4.77$ nm) となり同様に二量体化していることが示唆された.

2.2.1.3 結晶化と回折像の測定

温度 20°C における結晶化スクリーニングの結果、磷酸ナトリウム・カリウムを沈殿剤とした条件において、板状結晶 (A 型, 図 2-4, 17 ページ, パネル A) を得ることができた. この他に硫酸アンモニウムや磷酸二水素アンモニウムを沈殿剤とした条件でも良く似た結晶が得られた. また、硫酸リチウムを沈殿剤とした条件では、非常に細い針状結晶が得られた (図 2-4・表 2-1, 12 ページ).

板状結晶のほうが有望そうであったので、磷酸ナトリウム・カリウムの条件で得られた A 型結晶の改善を試みた. 添加物スクリーニングの結果、ベンズアミジン塩酸塩を 2% 加えることで板状の厚みが増すこと

表 2-2 リガンド・フリー ArcTGT の結晶化条件

	緩衝剤	沈殿剤	塩	添加剤
A 型	0.1 M Na・HEPES (pH7.5)	0.8 M KH_2PO_4 0.8 M NaH_2PO_4		
A' 型	0.1 M Na・Acetate (pH4.6)	2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
A'' 型	50 mM Na・Cacodylate (pH 6.5)	1.3 M Li_2SO_4	10 mM Mg・Acetate	
B 型	0.1 M Na・HEPES (pH7.5)	0.8 M KH_2PO_4 0.8 M NaH_2PO_4		2% ベンズアミジン塩酸塩
C 型	0.1 M Na・HEPES (pH7.5)	0.8 M KH_2PO_4 0.8 M NaH_2PO_4	0.84 M Na・Acetate	2% ベンズアミジン塩酸塩

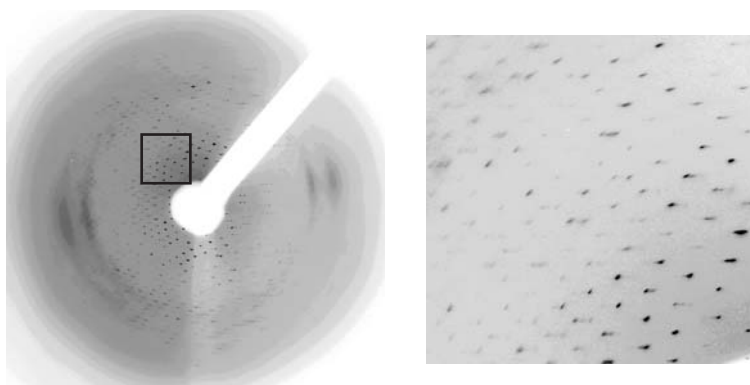


図 2-5 B 型結晶の回折像

SPring-8 BL45PX にて、波長 1.070 Å, カメラ距離 420 mm, 振動角 3.0° で測定. X 線検出装置として RaxisIV (理学電機) を使用. 右上は枠内を拡大したもの.

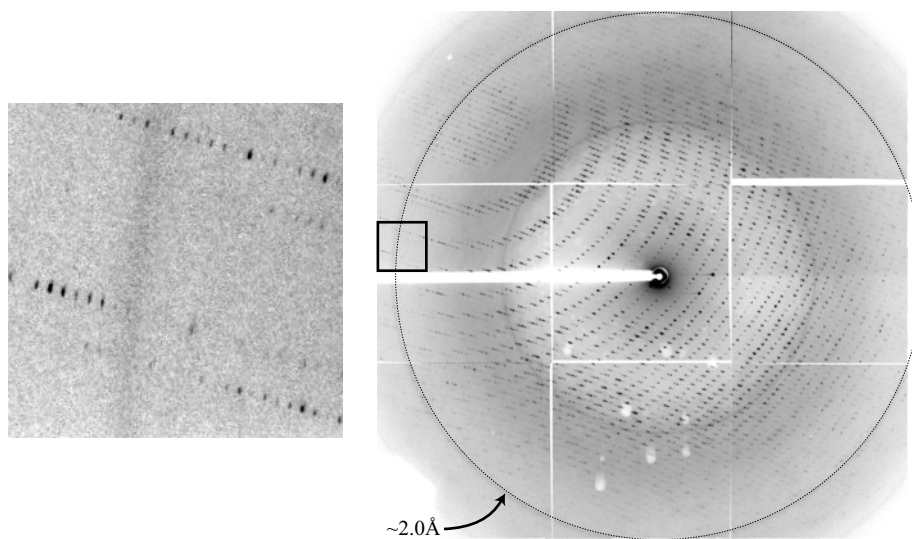


図 2-6 C 型結晶の回折像

SPring-8 BL44XU にて、波長 0.900 Å, カメラ距離 215 mm, 振動角 1.0° で測定. X 線検出装置として PX210 CCD (Oxford) を使用. 点線は 2.0 Å 分解能を示す. 左上は枠内を拡大したもの.

が判明した (B 型結晶; 図 2-4, パネル D). さらに結晶化条件の改善を試みたところ, 酢酸ナトリウムやイソプロパノールを加えると, かなり厚みのある板状結晶になることが分かった (図 2-4, パネル E).

B 型結晶の回折像を実験室系の装置で測定したところ, 室温では殆ど回折不いことがわかった. 抗凍結剤としては, MPD や PEG400 等は高イオン強度により

相分離を起こし使用できなかった. 12.5% グリセロールを加えた条件で凍結しないことが分かったが, この条件では結晶が急激に溶けてしまった. さらに塩濃度を上げて結晶を溶けないようにする必要があったが, KH_2PO_4 の溶解度が低い上に, グリセロールの影響で塩の溶解度が下がる為不可能であった. (エチレングリコールでも同様の結果であった.)

	B 型結晶		C 型結晶 (native)	
Wavelength (Å)	1.070		0.900	
Resolution (Å)	50–3.8	3.94–3.8	50–2.2	2.24–2.2
Total reflections	65,812	—	530,165	—
Unique reflections	29,493	—	88,967	—
Redundancy	2.2	—	6.0	—
Completeness (%)	74.9	65.8	95.3	93.0
$I/\sigma(I)$	5.8	1.9	34.0	7.1
R_{sym} (%)	17.3	40.0	9.2	25.6

	C 型結晶 (SeM, High)		C 型結晶 (SeM, Low)		C 型結晶 (SeM, Peak)		C 型結晶 (SeM, Edge)	
Wavelength (Å)	0.97392		0.98203		0.97916		0.97931	
Resolution (Å)	50–3.2	3.26–3.2	50–3.2	3.26–3.2	50–3.2	3.26–3.2	50–3.2	3.26–3.2
Total reflections	383,965	—	381,037	—	383,410	—	385,326	—
Unique reflections	31,670	—	31,757	—	31,708	—	31,624	—
Redundancy	12.1	—	12.0	—	12.2	—	12.1	—
Completeness (%)	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.9
$I > 3\sigma(I)$ (%)	91.3	74.5	88.2	67.0	90.7	73.2	92.1	76.1
R_{sym} (%)	8.7	19.5	8.9	23.5	8.4	20.2	9.2	18.7

表 2-3 B, C 型結晶の回折像統計値

NaH_2PO_4 の溶解度が高いことに着目し、カリウム塩を全てナトリウム塩に置き換え、さらに全塩濃度を 3.2 M に上げたところ、12.5% グリセロール存在下でも結晶がかなり安定に存在することが判明した。ここで、酸性の二水素塩を多量に加えている為 pH が下がっている可能性があったが、実際測定したところ、3.5 とかなり低くなっていた。塩基性で溶解度の高い K_2HPO_4 を加えて結晶化条件と同じ pH 4.5 に合わせたところ、殆ど溶けなくなることが判明した。

以上の条件で、B 型結晶は、実験室系の測定において 4 Å 程度まで回折することが分かった。さらに SPring-8 BL45PX で測定を行ったところ、3 Å 以上の回折像が得られた。しかしながら、結晶軸のある一方向に対し非常にモザイク性が高く (図 2-5, 18 ページ)、指数付けが困難であった。データ処理の結果、晶系は単斜晶系、空間群 $C2$ に属し、格子定数は $a=139.8$ Å, $b=227.7$ Å, $c=133.2$ Å, $\beta=117.8^\circ$ であることが分かった。モザイク性が高く正確に回折強度の積分が行えない為か、多くの反射がスケーリングの段階で棄却され、completeness が非常に悪くなった (表 2-3, 19 ページ)。

以上の事から B 型結晶は構造解析には不適と判断し、さらに結晶化条件の改善を試みた。沈殿剤であるリン酸塩を徐々に酢酸ナトリウムに置換したところ、

NaH_2PO_4 を置換したところで結晶が板状から針状に変化することがわかった (C 型; 図 2-4, 17 ページ, パネル F・表 2-2, 18 ページ)。さらに結晶化を 4°C で行うことで針状から最大 $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ 程度の柱状結晶が得られた (図 2-4, パネル G)。

C 型結晶に関して抗凍結剤の検討を行ったところ、15% グリセロールの存在下で結晶が安定に存在しかつ凍結しないことが分かった。この条件下で結晶はかなり安定で、数日置いても結晶に変化は見られなかった。実験室系で測定を行ったところ、最高で 3 Å 程度まで回折することが分かった。さらに SPring-8 BL44XU での測定では、最高で 2.0 Å 程度まで回折することが分かった。しかしながら、X 線による損傷が大きく、5 秒露光 1.0° 振りの測定条件下では、 30° 程度で分解能が 3 Å まで落ちてしまうことがわかった。照射する X 線を弱くすることも考えられたが、他のビームラインでの測定で照射 X 線が弱いと到達分解能が 3 Å 以下まで下がることがわかっていて、行わなかった。結晶が長いことを利用し、X 線があたる部分をずらしつつ測定することで、2.2 Å の分解能を保ちつつ 100° 分のデータを収集することができた。

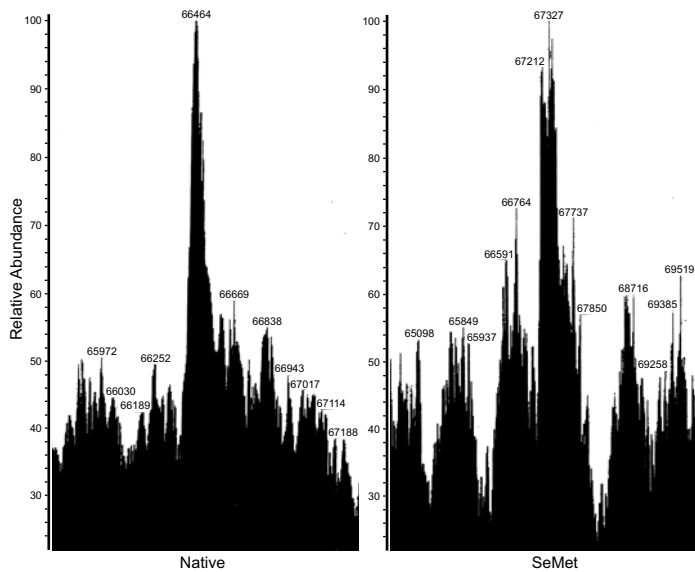


図 2-7 セレノメチオニン化した酵素と native 酵素の質量分析

開始コドンに由来するメチオニンが失われているとして計算した native 酵素の分子量は 66463.9 Da、セレノメチオニン化酵素の分子量は 67214.2 Da であり、それぞれ図中のピーク 66464 と、67212 に対応していると考えられる。セレノメチオニン化酵素での最も大きいピーク 67327 が何に由来するものかは不明。

2.2.1.4 データセットの測定と処理 (C 型結晶)

C 型結晶は空間群 $P4_12_12$ あるいは $P4_32_12$ に属し、格子定数 $a=b=99.28 \text{ \AA}$ 、 $c=363.74 \text{ \AA}$ であった。結晶のモザイク性も全体にわたり 0.7–0.8° 程度と、良いとはいえないまでも構造解析に問題ない程度であることが分かった。回折像と回折データの統計値を図 2-6 (18 ページ)、表 2-3 (19 ページ) に示す。

一方、結晶の 4 回螺旋軸は結晶の外形の長い方向と一致している為、普通にマウントすると螺旋軸がスピンドル方向に向く為、容易に completeness の高いデータが収集できたようである。また、同様の理由で長い軸が振動方向と垂直になる為、モザイク性が高めにも関わらず回折像が重なることが殆どなかった。データは 1° 振りで測定したが、2° 振りでも問題なく測定できたと考えられる。

C 型結晶は非対称単位あたり 2 分子の ArcTGT を含むと考えると溶媒含量 64% ($V_M=3.4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) となり妥当である。これは光散乱の ArcTGT が 2 量体化しているという結果と符合する。

2.2.1.5 重原子同型置換体の探索

2.1.1.8 節 (13 ページ) で示したさまざまな重原子化合物に対してスクリーニングを行ったが、非同型になるものと、重原子が浸潤しないものしか得られなかった。ハーベスト溶液に高濃度のリン酸イオンを含む為、ランタノイド・アクチノイドの重原子化合物は試すことができなかった。

さらには、高濃度のリン酸イオンが重原子の蛋白質への特異的な結合を阻害している可能性も考えられた

為、ハーベスト溶液中のリン酸イオンを他の沈殿剤に置換することを試みた。PEG 等では結晶が溶けてしまうが、硫酸塩ではほぼ元の条件と同程度に安定であることが判明した。この条件で K_2PtCl_4 を浸潤させたところ、長時間では褐色に着色した。ただ、沈殿剤置換の為か、結晶に損傷がおこり回折点が流れたようになることがあった。さらに条件を詰めて測定することで、良い重原子置換体を得られた可能性があるが、この時点で MAD 法による位相決定に成功した為、重原子置換体の探索を中止した。

2.2.1.6 分子置換法による位相決定の試み

AMoRe を用いた分子置換の結果、使用する反射の分解能上限を変える等して、 $P4_12_12$ 、 $P4_32_12$ ともに試したが、解は得られなかった。

P. horikoshii ArcTGT の N 末端領域と、*Z. mobilis* QueTGT 全長の配列の類似性は、356 残基中 26% 同一であり、ほぼ折り畳みは同一であると類推される。しかしながら、ArcTGT は C 末端に 226 残基もの独自の領域を持っており、これが原因で、分子置換法では解が得られなかったものと考えられる。

2.2.1.7 セレノメチオニン標識蛋白質の大量調製

発現に関しては、native 蛋白質と異なり、37°C で培養し誘導をかけても非常によく可溶化した。原因は不明である。(ちなみに、この結果に基づいて native 蛋白質も LeMaster 培地で培養したが、特に可溶化量は増えなかった。)

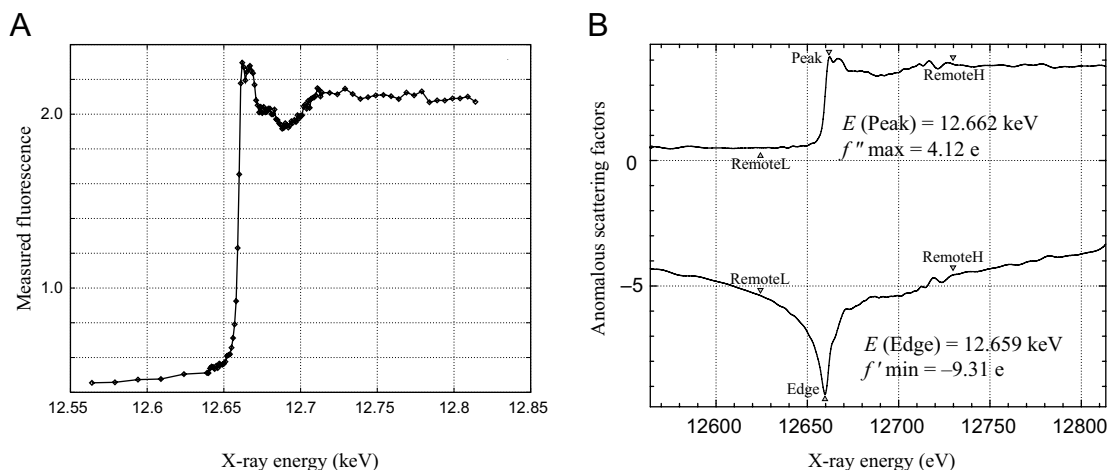


図 2-8 X線蛍光スペクトルの測定

(A) セレノメチオニン化した結晶のX線蛍光スペクトルと、(B) それから計算したSe原子構造因子の異常散乱項 f' と f'' の値。

精製は native 蛋白質と同様に行ったが (2.1.1.1 節, 11 ページ参照), 疎水性カラムでは native 蛋白質よりよく吸着する傾向にあった。他のカラムでの挙動は native のものと同様であった。精製後, セレノメチオニンへの置換率を確認する為, 質量分析を理研・生体分子解析室に依頼したところ, ほぼ完全に置換されていることが確認された (図 2-7, 20 ページ)。

2.2.1.8 セレノメチオニン標識蛋白質の結晶化

Native 蛋白質と同じ条件で結晶化したところ, 小さな結晶がたくさん出て native と同程度の大きさまで成長しなかった。その為, セレノメチオニン化結晶用にさらなる条件の最適化を行った。その結果, 沈殿剤濃度を低くすることで $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ 程度の測定に適した大きさの結晶を得ることができた (図 2-4, 17 ページ, パネル H)。

2.2.1.9 セレノメチオニン標識結晶の回折像測定とデータ処理

C 型セレノメチオニン標識結晶は, native と同様に空間群 $P4_212$ あるいは $P4_3212$ に属し, 格子定数 $a=b=100.15\ \text{\AA}$, $c=363.64\ \text{\AA}$ であった。XAFS 測定の結果を図 2-8 (21 ページ) に, 回折データの統計値を表 2-3 (19 ページ) に示す。

2.2.1.10 MAD 法による位相決定

P. horikoshii ArcTGT は開始コドンに由来するメチオニンを除けば, 1 分子あたり 16 のメチオニン残基を含

む。その為, 非対称単位あたり 16 個あるいは 32 個の異常散乱原子を含むと予想された。

まず, peak 波長のデータセットに対し, 異常分散パターン関数を計算し rsps による解釈を試みたが, 異常散乱原子が多すぎるせいか, 解釈できる解は得られなかった。その為, 直接法プログラム SnB による異常散乱原子の位置決定を試みた。まず, 結晶の空間群を $P4_212$ であると仮定し, 非対称単位あたり ArcTGT 1 分子と 2 分子の場合を仮定して, それぞれについて乱数の seed を変えて数回計算を行った。その結果, どの解においても, ピークの上位 12 個程度は (対称性により許される併進を考慮したうえで) 同じ解が出ることが確認できた。また, 各 SnB 試行毎の R_{min} 値に関するヒストグラムでは, ピークが二つ現れる形の分布になり, 正しい解が得られていることが示唆された。(正しい解が得られている場合, 2 峰型分布になり, R_{min} の大きい方の集合は誤った解で小さい方の集合が正しい解である。)

上記で得られた解を用いて, mlphare による重原子サイトの精密化と位相計算を行った。重原子サイト数を徐々に増やしながら計算を行い, 計算の結果占有率が 0 あるいはそれ以下になるものは誤ったサイトと考えて除去した。最終的には, 分解能 $3.5\ \text{\AA}$ までの反射と, 14 個の重原子サイトを用いて位相計算を行った。さらに dm を用いた溶媒平滑化による位相の改善を試みた。この時点では非対称単位あたりの分子数がかぎりしていなかったため, 1 分子と 2 分子の場合を考えて溶媒含量を振って計算を行った。しかしながら, 解釈できる電子密度は得られなかった。同じ重原子サ

表 2-4 結晶中の異常散乱原子の位置

位相計算に使用した 22 個の Se サイトの sharp による精密化後の分率座標, 占有率, 温度因子 (\AA^2). 「実体」はセレン原子がどのセレンメチオニン残基に属していたかを示している.

番号	精密化後の分率座標	占有率	温度因子	実体
1	(0.5677, 0.1624, 0.9264)	0.7187	44.6802	B566
2	(0.7776, 0.6846, 0.9217)	0.8576	46.8701	B263
3	(0.7314, 0.7980, 0.9124)	0.5769	49.7624	B55
4	(0.9027, 0.9035, 0.9451)	0.7821	45.3095	A55
5	(0.0313, 0.8648, 0.9687)	0.9245	51.2306	A37
6	(0.8686, 0.5756, 0.8848)	0.6931	38.9236	B243
7	(0.8856, 0.9506, 0.9010)	0.8373	43.0158	A295
8	(0.0833, 0.6942, 0.9550)	0.5851	39.2081	A243
9	(0.6093, 0.7532, 0.9081)	0.5972	64.0533	B45
10	(0.6196, 0.0119, 0.8885)	0.4378	37.6326	B218
11	(0.1482, 0.6437, 0.9736)	0.6762	58.5663	A218
12	(0.7136, 0.7958, 0.9563)	0.6447	52.4317	B295
13	(0.7164, 0.6839, 0.8820)	0.9163	51.3496	B37
14	(0.6205, 0.0031, 0.9836)	0.6356	36.5410	A566
15	(0.9915, 0.8373, 0.9282)	0.9233	46.1532	A263
16	(0.8190, 0.1922, 0.9966)	0.5363	41.4118	A187
17	(0.9851, —, 0.9529)	0.6035	50.4731	A45
18	(0.8384, 0.6148, 0.9032)	0.0027	197.9318	—
19	(0.9322, 0.6454, 0.9160)	0.0900	169.7108	—
20	(0.6941, 0.0973, 0.8882)	0.0017	—	—
21	(0.2665, 0.4353, 0.9041)	0.0520	45.1575	—
22	(0.8099, 0.7749, 0.9345)	0.2235	7.2700	亜鉛

表 2-5 Sharp による位相計算の統計値

位相計算を行った分解能範囲 (50.0–3.2 \AA) における統計値を示した. Iso は isomorphous, Ano は anomalous, Cen は centric, Acen は acentric の略.

	Peak		Edge		High-energy remote		Low-energy remote	
	Iso	Ano	Iso	Ano	Iso	Ano	Iso	Ano
Phasing power (Cen)	1.604	—	—	—	1.653	—	1.520	—
Phasing power (Acen)	2.400	3.064	—	2.482	2.500	2.445	2.235	0.8165
R_{cullis} (Cen)	0.6552	—	—	—	0.5896	—	0.6706	—
R_{cullis} (Acen)	0.6380	0.6016	—	0.7313	0.5546	0.7294	0.6451	0.9825

イトに対して sharp と solomon を用いて位相計算・溶媒平滑化を行ったが, 同様に解釈できる電子密度は得られなかった.

空間群が誤っている可能性を考え, $P4_32_1$ と仮定して SnB による異常散乱原子の位置決定から計算をやり直したところ, 前回よりもピークの高い解が得られた (ただし, 解の座標は前回と鏡像になっている点を除いて同じものが得られた). また, mlphare での重原子サイトの精密化でも, 前回よりも多い 22 個 (表 2-4,

22 ページ) のサイトまで含めて計算を行うことができた. 3.2 \AA までの分解能で計算した統計値を (表 2-5, 22 ページ) に示す. 図 2-9, 23 ページに, φ_0 を用いて peak 波長のデータに対して計算した異常分散フーリエマップと, 最終的に得られた ArcTGT モデルにおけるセレン原子の位置を示す. また, 位相改良前の $|F_o|$, φ_0 を用いて計算したフーリエマップを, 図 2-10 (23 ページ) パネル A に示す. さらに dm を使用して溶媒平滑化を行ったところ, 溶媒領域と蛋白質領域が

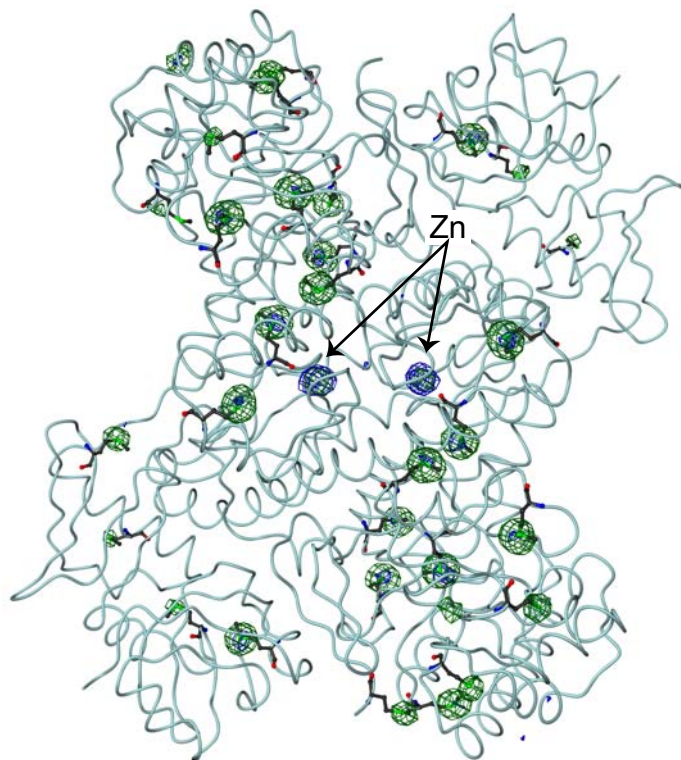


図 2-9 異常分散差フーリエマップ

ピーク波長 (0.97916 Å; 緑, 4σ レベルで表示), 低エネルギー側リモート波長 (0.98203 Å; 青, 4σ レベルで表示) における異常分散差フーリエマップ. 各波長における $D_o (= |F_o^+| - |F_o^-|)$ と, MAD 法による位相計算の結果得られた φ_o を用いて計算. 低エネルギー側リモート波長ではセレン原子構造因子の異常分散項の虚数成分 f'' は亜鉛に比べて小さい為, 亜鉛原子のピークの方が強くなる.

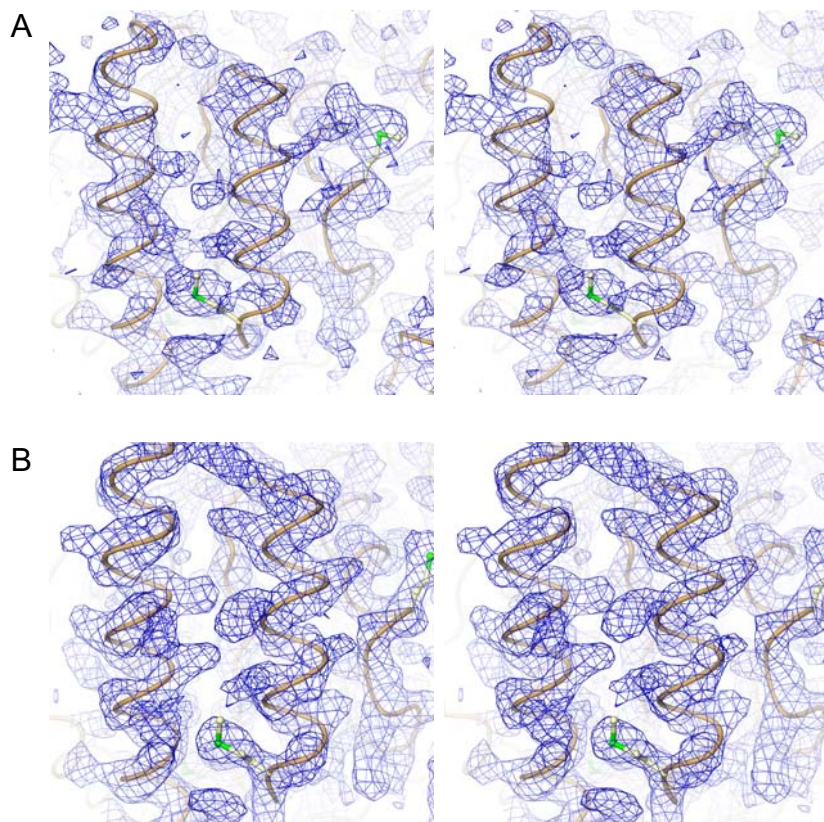


図 2-10 ArcTGT の実験的位相マップ

全てステレオ図. (A) MAD 法により決定した位相とピーク波長における構造因子 F_o を用いて計算したフーリエマップ (1.1σ レベルで表示). (B) さらに溶媒平滑化, 電子密度平均化により位相改善を行った結果得られた電子密度マップ (1.1σ レベルで表示). 両者とも, 酵素をチューブモデルで, セレノメチオニン残基をボールスティックモデルで示した.

表 2-6 リガンド・フリー ArcTGT と各リガンドとの複合体の構造精密化統計値

	Native	Guanine	preQ ₀	Guanosine	dG-analog
Resolution (Å)	50–2.2	50–2.3	50–2.5	50–2.8	50–2.8
Number of					
Reflections	91,138	82,093	63,193	46,316	47,060
Protein atoms	9,304	9,304	9,304	9,304	9,304
Ligand atoms	0	11	13	22	38
Ions	4	4	4	4	4
Water atoms	295	184	142	76	96
R.m.s.d.					
Bond length (Å)	0.00634	0.00669	0.00730	0.00687	0.00714
Bond angles (Å)	1.28	1.33	1.37	1.32	1.37
Impropers (°)	0.857	0.872	0.916	0.87	0.90
Ramachandran plot					
Most favored (%)	90.7	90.7	87.1	86.1	87.7
Additionally allowed (%)	9.0	8.5	12.3	13.0	11.8
Generously allowed (%)	0.3	0.7	0.6	0.8	0.5
<i>R</i> _{work} (%)	22.7	22.9	23.1	19.1	19.2
<i>R</i> _{free} (%)	26.1	27.1	27.8	24.7	24.7
σ_A coordinate error (Å)	0.27	0.47	0.67	0.5	0.36

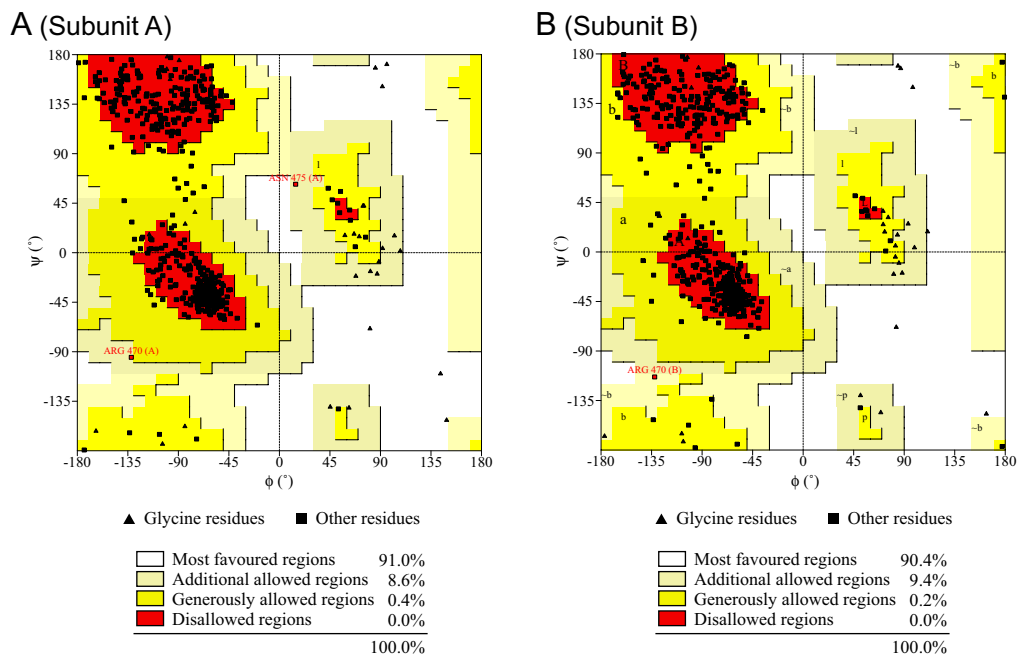


図 2-11 リガンド・フリー ArcTGT のラマチャンドランプロット
(A) サブユニット A の, (B) サブユニット B のラマチャンドランプロット.

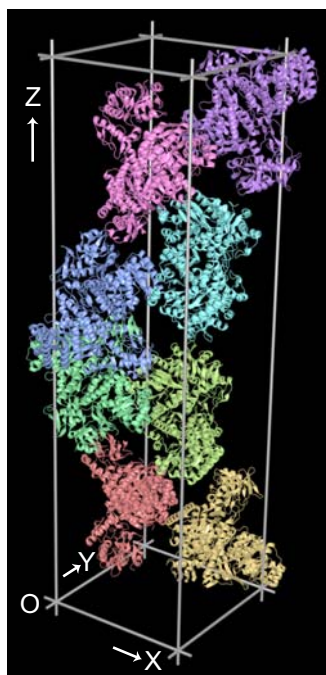


図 2-12 C型結晶のパッキングの様子

単位方を枠で, X, Y, Z 軸を矢印で示した. また, 単位胞中の 8 つの結晶学的対称単位内の 2 分子をそれぞれ異なる色で示した.

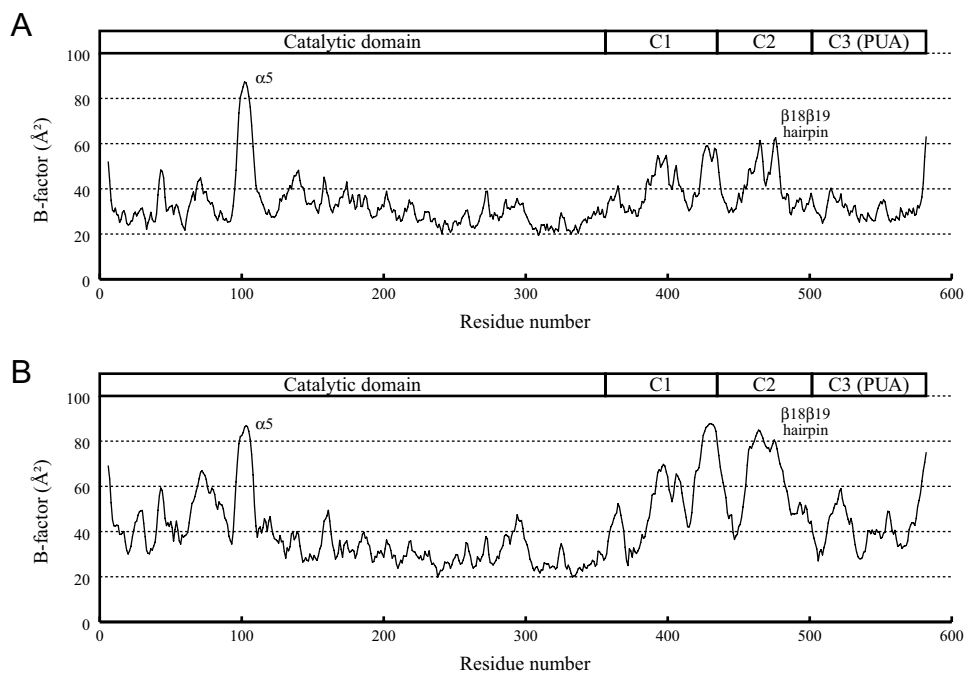


図 2-13 リガンド・フリー ArcTGT の主鎖の温度因子分布

パネル A はサブユニット A の, B はサブユニット B のグラフを, また, グラフの上に対応する構造を模式図で示した. Disorder しているヘリックス $\alpha 5$ の部分が相対的に高い温度因子を示している. しかし, 温度因子の精密化において, W_B (温度因子の restraint に関する項の重み因子) を精密化しなかった為, 周囲の低い温度因子に影響されて絶対的にはそれほど高い値にはなっていない. また, クリスタルコンタクトの違いにより, サブユニット B, 特に C 末端ドメインの温度因子が高くなっている.

明確に分かれた電子密度が得られ, α ヘリックスを見出すことができた. 次に, 同じサイトに対して sharp と solomon を用いて位相計算・溶媒平滑化を行い, 得られた電子密度に対して *Z. mobilis* QueTGT のモデルを重ね合わせたところ, 非対称単位あたり 2 分子存在することが確認できた. (mlphare よりも sharp の方が非同型性による誤差や最尤推定法の尤度を正確に見積

もっており良い電子密度が得られると考え, 最終的には sharp による結果を用いた.) 2 つの QueTGT のモデルから NCS 行列とマスクを計算し, dm を用いて電子密度平均化による位相改善を行った. さらに, その結果得られた電子密度を用いて, C 末端ドメインの大まかな主鎖のトレースを行った. この C 末端ドメインのポリアラニンモデルを用いて NCS 行列とマスクを

表 2-7 各リガンドとの複合体の回折像統計値

	Guanine		preQ ₀		Guanosine		dG analog	
Wavelength (Å)	1.020		1.020		0.900		1.000	
Resolution (Å)	50–2.3	2.34–2.3	50–2.5	2.54–2.5	50–2.8	50–2.8	50–2.8	2.9–2.8
Total reflections	567,949	—	282,730	—	466,918	—	588,077	—
Unique reflections	82,107	—	63,242	—	46,419	—	47,239	—
Redundancy	6.9	—	4.4	—	10.0	—	12.4	—
Completeness (%)	98.4	96.7	96.0	92.3	99.2	97.0	98.7	89.4
$I/\sigma(I)$	19.6	3.78	8.69	2.14	20.4	2.56	33.3	4.58
R_{sym} (%)	10.7	38.2	8.4	20.2	11.1	29.7	6.1	19.9

計算し、ArcTGT 全体に対して電子密度平均化を行った。同時に、2.8 Å までの反射に対して位相拡張を行ったところ、十分にトレース可能な電子密度が得られた (図 2-10, 23 ページ, パネル B)。

2.2.1.10 原子モデルの構築と精密化

主鎖, 側鎖のトレースの結果, N 末端の 6 残基と 97–106 番残基以外はモデルをおくことができた。モデルの精密化は, 最終的に native 結晶の 2.2 Å 分解能までの反射を用いて行った。その結果, $R_{\text{work}}=22.7\%$, $R_{\text{free}}=26.1\%$ まで精密化することができた。モデル精密化に関する統計値を表 2-6 (24 ページ) に, Ramachandran プロットを図 2-11 (24 ページ) に示す。また, 結晶中の各分子のパッキングの様子を図 2-12 (25 ページ) に, 温度因子の分布を図 2-13 (25 ページ) に示した。決定した ArcTGT の座標は Protein Data Bank に登録した (PDB ID: 1IQ8)。

2.2.2 ArcTGT とリガンドとの複合体の構造解析

2.2.2.1 複合体結晶の回折像測定とデータ処理

リガンドを浸潤させた結晶は, いずれもリガンド・フリーの結晶とほぼ同じ格子定数であった。各複合体の回折データの統計値を表 2-7 (26 ページ) に示す。どの結晶もリガンド・フリーの結晶に比べて分解能が

悪くなっているが, 結晶自体の大きさが原因と考えられる。一方グアノシン, デオキシグアノシン類似体の結晶は分解能が他のものに比べてかなり悪くなっているが, これはビームタイム等の都合上, 検出装置面積が狭い CCD で測定せざるをえなかった為である。

2.2.2.2 複合体のモデル構築と精密化

まず, preQ₀ との複合体のモデル精密化を基質をモデルに含めずに行った。 $2|F_o|-|F_c|$ 電子密度図を見たところ, $(\alpha/\beta)_8$ バレル構造の中心部分に preQ₀ と思しき電子密度を見出すことができた (図 3-9, 34 ページ, パネル C)。さらに, disorder していた 97–106 番残基も電子密度中に見出され, α ヘリックスを形成していた (図 3-9, パネル C)。最終的に preQ₀ のモデルを含めて精密化を行ったところ, $R_{\text{work}}=23.1\%$, $R_{\text{free}}=27.8\%$ となった。他の基質との複合体においても, 同様に, preQ₀ と同じ位置に基質の電子密度が見出された (図 3-9, パネル B・図 3-12, 37 ページ)。各基質との複合体のモデル精密化に関する統計値をまとめて表 2-6 (24 ページ) に示す。決定した ArcTGT・グアニン複合体, ArcTGT・preQ₀ 複合体の座標は Protein Data Bank に登録した (PDB ID: 1IT7, 1IT8)。

□

第3章

ArcTGT 単独, リガンドとの複合体の結晶構造

本章では, *P. horikoshii* ArcTGT 単独の結晶構造に基づいて, 二量体化の様式や, 未知であった C 末端ドメインの構造と機能について述べる. さらに, リガンドとの複合体の結晶構造に基づいて, リガンド認識の機構や, 塩基交換反応の機構について述べる.

3.1 材料と方法

結晶構造の解析 (構造の比較・図の作成等) には, O (Jones *et al.*, 1991), DINO (Philippsen, 2002), 自作の結晶構造可視化ソフト Que (Ishitani, 2002) を使用した. 分子間の接触面積は CCP4 の areaimol を使用して算出した. 蛋白質の一次構造の比較には, blastp (Altschul *et al.*, 1990) と CLUSTAL_X (Thompson *et al.*, 1997) を使用した.

3.2 結果と考察

3.2.1 ArcTGT の結晶構造

3.2.1.1 全体構造

ArcTGT の全体構造を図 3-1 (28 ページ) に示す. ArcTGT は, N 末端側の触媒ドメインと C 末端側の C 末端ドメインからなっている. 触媒ドメインは独特のモチーフを含む亜鉛結合サイトを有している. 一方, C 末端ドメインは他の生物種の ArcTGT との配列比較や立体構造から, 3 つのドメイン (C1, C2, C3) に分けることが出来る. ArcTGT の二次構造とドメイン構成を図 3-2 (29 ページ) に模式的に示した.

3.2.1.2 亜鉛結合サイト

ArcTGT は触媒ドメインに亜鉛イオンを結合していた (図 3-2). この金属イオンが亜鉛イオンであることは, 波長 0.98203 Å で測定した回折データを用いて計算した異常分散フーリエマップにより確認できる (図 2-9, 23 ページ). この亜鉛結合サイトは QueTGT にも共通して存在しており, そのモチーフ配列は CXCX₂CX_nH であるが, このような亜鉛結合モチーフは現在のところ TGT ファミリー以外には見出されていない. QueTGT においてこの亜鉛イオンと触媒作用の関連が詳細に研究されているが (Garcia *et al.*, 1996) その結果によると, 亜鉛イオンは直接塩基交換反応に関与しているわけではなく, 酵素の構造形成に重要であることが示唆されていた. ArcTGT においても, 亜鉛結合サイトが触媒サイトから離れていることから, この亜鉛結合サイトは, QueTGT の場合と同様に酵素の構造形成に重要であると考えられる.

3.2.1.3 ArcTGT の二量体化

ArcTGT は, 結晶の非対称単位あたり 2 分子含まれており, お互いの分子は上記の亜鉛結合サイトと C1 ドメインを介して密に接している (図 3-1). 二量体化の結果生じる分子間の接触面積は約 2,200 Å² 平方である. 二量体化に関わっている蛋白残基間の相互作用とその距離を表 3-1 (28 ページ) に示した. 溶液中での光散乱の結果 (17 ページ) などとも考慮すると, この相

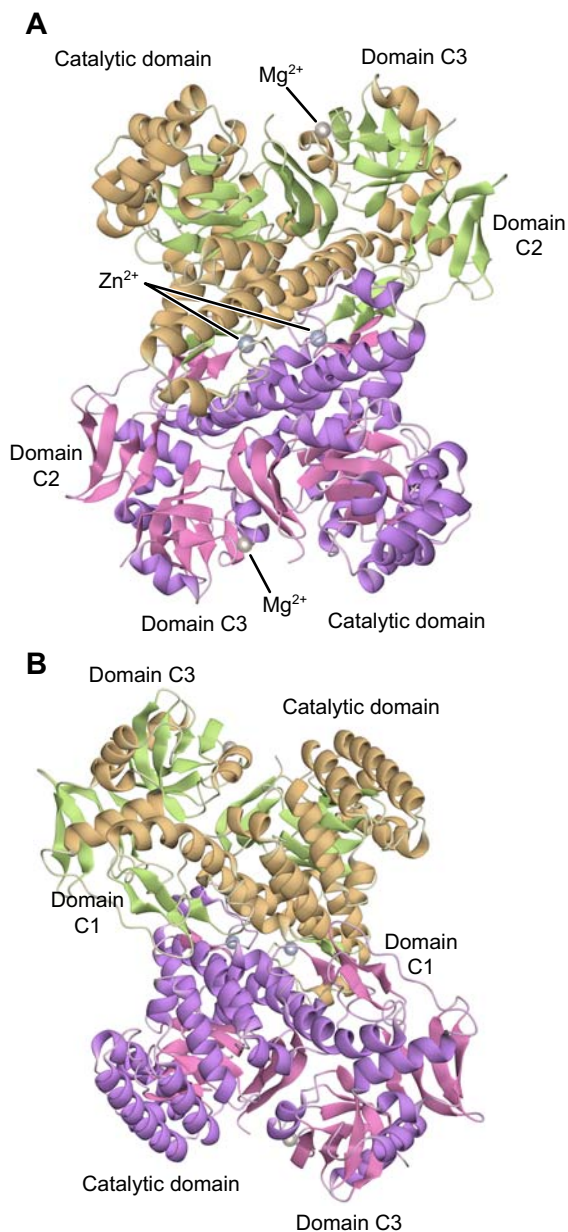


図 3-1 リガンド・フリー ArcTGT の結晶構造
 一つのサブユニットを茶色・緑色で、もう一つサブユニットを紫色、ピンク色で示した。(A) は分子の Zn 結合サイト側から、(B) はその逆側から見た図。

相互作用はクリスタルコンタクトによるものではなく、生体内でも二量体を形成していると考えられる。

一方で、QueTGT も多量体化が示唆されている (Garcia *et al.*, 1993) が、*Z. mobilis* QueTGT の結晶構造では非対称単位あたり 1 分子しか見出されなかった (Romier *et al.*, 1996a). Romier らは結晶学的な対称分子との相互作用を指して二量体化の可能性を議論している。この Romier らが提唱している二量体化の様式も亜鉛結合サイトを介しているが、ArcTGT の二量体化は C1 ドメインも介しており、これとは全く異なったものになっている (図 3-1)。

表 3-1 二量体化に関わっている原子の組とその距離

リガンド・フリー ArcTGT 結晶構造中において、非対称単位に存在する 2 つの ArcTGT 分子において、お互いの相互作用に関わっているとみなされる原子の組とその距離 (3 Å 以下) を示した。

A サブユニット側		B サブユニット側		距離 (Å)
Glu32	O ^{e1}	Tyr 276	O ^g	2.66
Glu266	O ^{e2}	Glu 334	O ^{e1}	2.43
Lys269	N ^c	Glu 325	O ^{e2}	2.78
Asp275	N	Gln 321	O ^{e1}	2.83
Tyr276	O ^g	Glu 32	O ^{e1}	2.75
Ser280	O ^g	Glu 314	O ^{e2}	2.94
Glu314	O ^{e2}	Ser 280	O ^g	2.62
Lys317	N ^c	Phe277	O	2.87
Gln321	O ^{e1}	Asp 275	N	2.81
Arg330	N ^e	Arg 337	O	2.72
Glu334	O ^{e1}	Glu 266	O ^{e2}	2.59
Arg 335	N ^{h1}	Glu 334	O ^{e1}	2.99
Arg 337	N ^{h1}	Ile 371	O	2.84
Lys 341	N ^c	Ala 422	O	2.64
Ile371	O	Arg 337	N ^{h1}	2.83
Glu 421	O ^{e2}	His339	N ^{e2}	2.89
Ala422	O	Lys 341	N ^c	2.62
Glu 423	O ^{e1}	Lys 347	N ^c	2.85

3.2.1.4 触媒ドメインの構造

ArcTGT の N 末端側に位置する触媒ドメインの構造は、QueTGT 全長の構造とよく似ており、(α/β)₈ バレル構造を主体とした構造からなっている (図 3-3, 29 ページ)。亜鉛結合サイトはこの (α/β)₈ バレルの 8 番目の β シートと α ヘリックスの間に挿入されている。また、TGT の (α/β)₈ バレルは、バレルの底にあたる部分に、蓋をするように β シートが存在している点特徴的である (図 3-3)。 (α/β)₈ バレルを持つ多くの酵素 (糖鎖分解に関わるグリコシラーゼ等) にはこのような蓋は存在しない。

3.2.1.5 QueTGT の構造との比較

ArcTGT の触媒ドメインと QueTGT は二次構造のトポロジーはほぼ同じであるが、分子表面に位置するアミノ酸側鎖に大きな違いが見られる。その結果、図 3-4 (30 ページ) のように、表面電荷の分布は全く異なったものになっている。QueTGT は亜鉛結合サイトの付近に比較的大きな正電荷のパッチを有しており、さらに、この部分に QueTGT 間のみで保存された

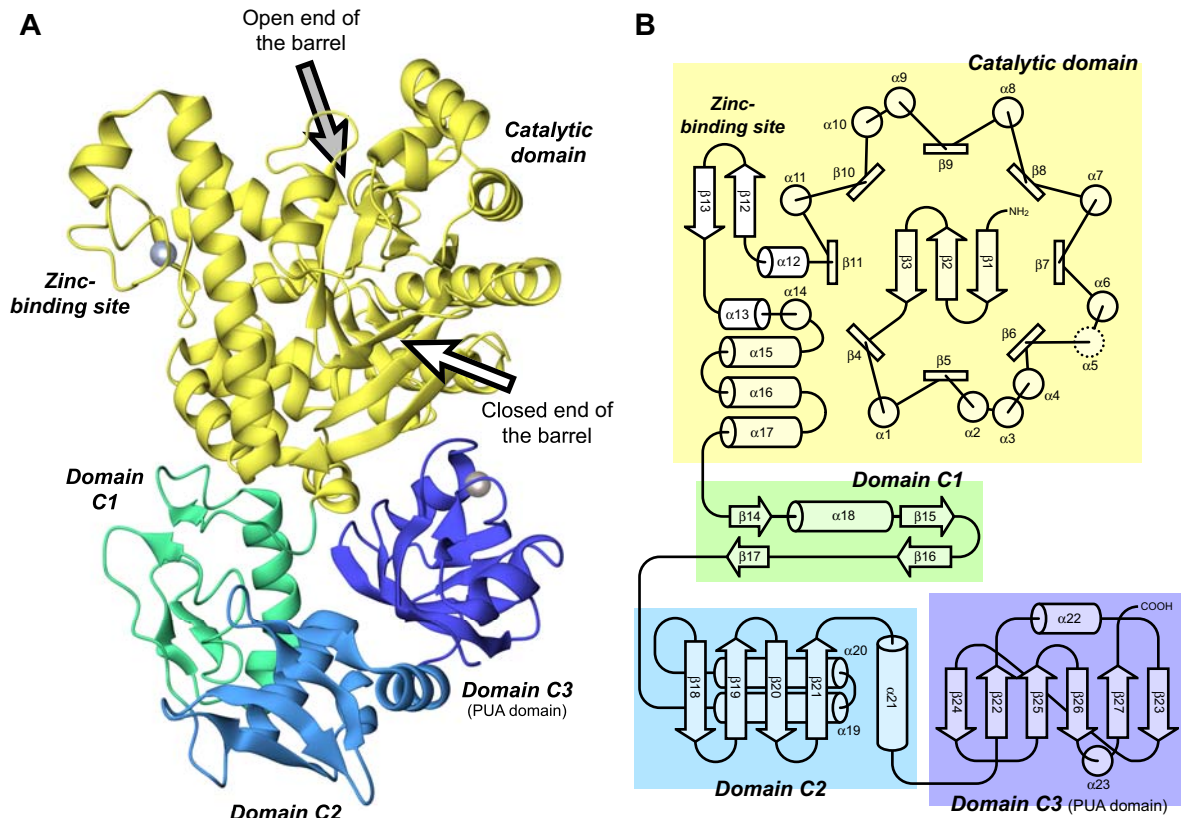


図 3-2 ArcTGT のドメイン構成

(A) ArcTGT のドメイン構成と (B) 二次構造模式図. (A), (B) ともに、触媒ドメインは黄色で、ドメイン C1 は明るい緑色で、ドメイン C2 は水色で、ドメイン C3 は青色で示した。

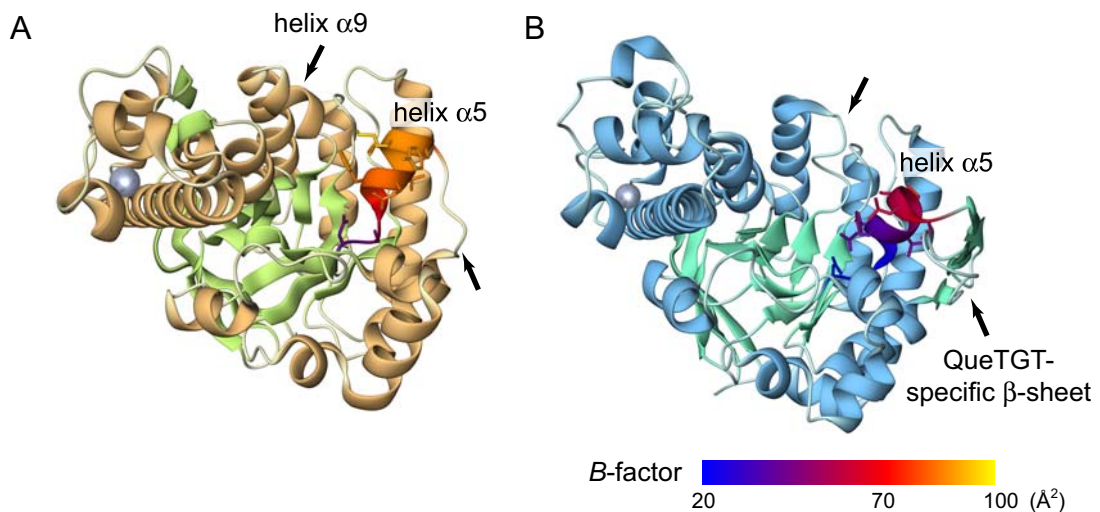


図 3-3 触媒ドメインの比較

リガンド・フリー ArcTGT の触媒ドメイン (A) と、同じくリガンド・フリー QueTGT (B) の構造の比較. 触媒サイトに蓋をするヘリックス $\alpha 5$ については、リボンモデルだけでなく側鎖もスティックモデルで示し、温度因子に対応させて色を表示した. ArcTGT と QueTGT で構造が異なっている部分を矢印で示した。

Arg 残基が存在し、tRNA アンチコドン・ループの燐酸バックボーンを結合する部分ではないかと推測されている (Romier *et al.*, 1997). 一方で、ArcTGT の亜鉛結合サイトは正電荷を帯びてはいるものの、その範囲は QueTGT に比してかなり縮小しており、逆に、ArcTGT

に特有の C 末端ドメイン上に大きな正電荷のパッチが存在している。

ArcTGT の触媒ドメインと QueTGT の構造は、上記の表面電荷の違い以外にも幾つかの相違点が見られる。まず、QueTGT はヘリックス $\alpha 5$ と $\alpha 6$ の間に逆平

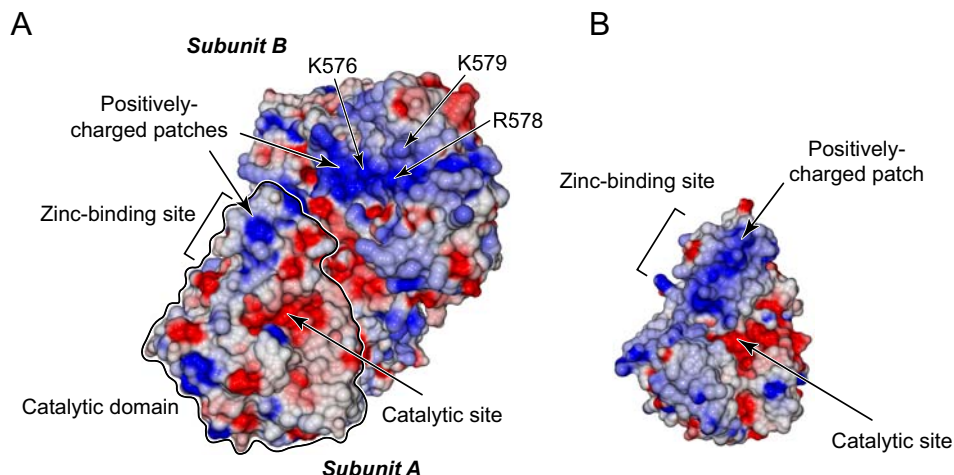


図 3-4 ArcTGT と QueTGT の分子表面, 表面電荷の比較

(A) ArcTGT, (B) QueTGT をそれぞれ表面モデルで示した。電荷は, -10 kT/e から 10 kT/e の範囲を赤から青色で示した。また, 比較しやすいように ArcTGT の触媒ドメインを線で囲んだ。

行 β シートを有しており, 高次構造上ではバレル構造の側面に貼り付くような形で存在している (図 3-3, 29 ページ; 図 3-5, 31 ページ)。この β シートが QueTGT でどのような役割を果たしているかは不明である。QueTGT にのみ存在することから tRNA 認識に関わっているとも考えられるが, Romier らが提唱している QueTGT と tRNA のドッキングモデルではこの部分は tRNA と接触していない (Romier *et al.*, 1996a)。次に ArcTGT のヘリックス $\alpha 9$ は QueTGT には存在しない (図 3-5)。3.2.2.3 節 (37 ページ) で述べるように, この α ヘリックスが, ArcTGT と QueTGT の基質認識の違いに関連しているようである。さらに, ArcTGT は触媒ドメインの末尾に付加的にヘリックス $\alpha 16$ と $\alpha 17$ を有しているが (図 3-5), これは ArcTGT の触媒ドメインと C 末端ドメインをつなげる役割を果たしていると考えられる。

3.2.1.6 ドメイン C3 の構造

ArcTGT の C 末端ドメインのうち, C1 と C2 は既知の他の蛋白質と配列上, 構造上ともに相同性があるものは存在しないが, C3 は真核生物, 古細菌の RNA 修飾酵素に広く存在する「PUA ドメイン」(Aravind & Koonin, 1999) と相同性がある (図 3-6, 32 ページ)。PUA ドメインは, ArcTGT 以外にはシュードウリジン合成酵素などに見出されており (PUA は Pseudouridine synthase/Archaeosine TGT の略), RNA 認識・結合に関連したドメインであることが推測されている。その中でも, 酵母 Cbf5p は snoRNP 複合体のコンポーネントのひとつであり (Lafontaine *et al.*, 1998; Watkins *et al.*,

1998), rRNA や snRNA のシュードウリジン化を行う RNA 修飾酵素である。この遺伝子のヒトの相同分子種である dyskerin は, 先天性角化異常症と呼ばれるヒトの遺伝病の原因遺伝子であることが分かっている (Heiss *et al.*, 1998)。Cbf5p, dyskerin の PUA ドメインと ArcTGT の PUA ドメインは幾つかの保存された塩基性残基を有しており (Lys576, Arg578, Lys579), これらの残基は ArcTGT の C 末端ドメイン上に大きな塩基性パッチを構成している (図 3-4, 30 ページ)。一方で, 構造上の類似性をみると, ArcTGT の PUA ドメインは真正細菌の tRNA シュードウリジン合成酵素 TruB (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001) の C 末端ドメインとある程度の類似性を持っており, 二次構造のトポロジーが似ている。しかし一方で, PUA ドメインにはループやヘリックス $\alpha 23$ の挿入があるなど, 異なる点も多い (図 3-7, 33 ページ)。TruB と RNA 複合体の結晶構造から, この TruB の C 末端ドメインは tRNA のアクセプター・ステムのリン酸バックボーンを認識することが分かっている。ArcTGT の核酸認識に関する議論は 5.3.3 節 (55 ページ) で行った。

さらに, ドメイン C3 には金属イオンらしき電子密度が見られた (図 3-1, 28 ページ)。Ala528, Val531, Met566, Ile567 の主鎖のカルボニル基, 水分子がこの電子密度ピークに対して正八面体状に配位しており, 配位数などからマグネシウムイオンの可能性が高いと思われる。分子モデルではマグネシウムイオンを置いて精密化を行った。

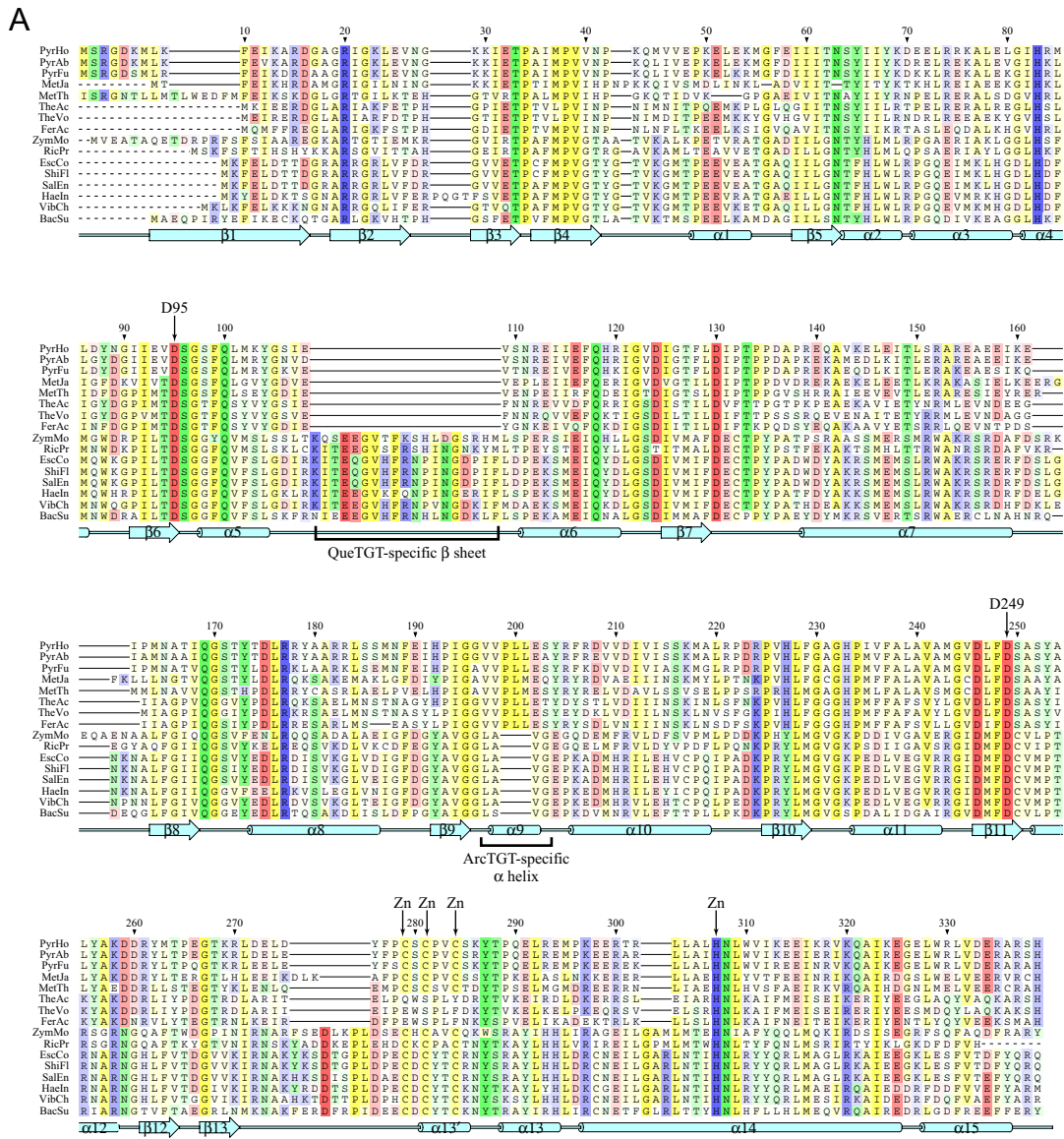


図 3-5 TGT ファミリーの触媒ドメインの配列アラインメント

(A) ArcTGT の触媒ドメインと QueTGT の配列アラインメント。ArcTGT に関しては、*Pyrococcus horikoshii* (PyrHo), *Pyrococcus abyssii* (PyrAb), *Pyrococcus furiosus* (PyrFu), *Methanocaldococcus jannaschii* (MetJa), *Methanothermobacter thermautotrophicus* (MetTh), *Thermoplasma acidophilum* (TheAc), *Thermoplasma volcanium* (TheVo), *Ferroplasma acidarmanus* (FerAc) の配列を示した。真正細菌由来 QueTGT に関しては、*Zymomonas mobilis* (ZymMo), *Rickettsia prowazekii* (RicPr), *Escherichia coli* (EscCo), *Shigella flexneri* (ShiFl), *Salmonella enterica* (SalEn), *Haemophilus influenzae* (HaeIn), *Vibrio cholerae* (VibCh), *Bacillus subtilis* (BasSu) の配列を示した。また、配列の上に *P. horikoshii* における残基番号を、配列の下に *P. horikoshii* における二次構造を模式的に示した。(32 ページに続く)

3.2.1.7 ドメイン C1, C2 の構造

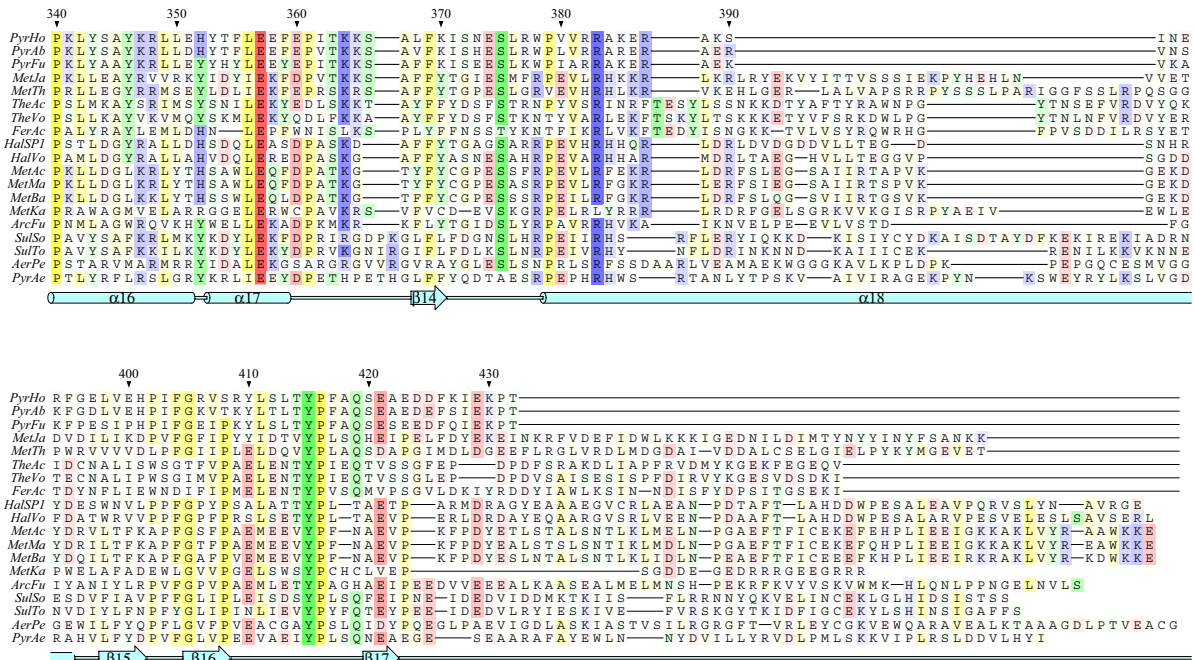
ドメイン C2 は、4 本の逆平行 β シートとそれを裏打ちする 2 つの α ヘリックスからなっている。β シート上には保存された塩基性残基 (Lys465, Arg470, Arg483) が存在しており、上述のドメイン C3 の保存された塩基性残基とともに、C 末端ドメイン上に大きな塩基性パッチを形成している (図 3-4, 30 ページ)。

一方、ドメイン C1 (とくに C 末端側) は ArcTGT 間でも保存性が低く、好熱性メタン古細菌類では長い挿入配列が見られる (図 3-6, 32 ページ)。 *P. horikoshii*

の構造では、挿入がある部分に相当する 430 番付近の残基は温度因子が非常に高くなっている (図 2-13, 25 ページ)。この部分は C2, C3 と触媒ドメインを接続するのが主な役割である為か、進化の過程で大きく変化していると推測される。

3.2.1.8 他の古細菌ではドメイン C2・C3 を欠く ArcTGT が存在する

P. horikoshii ArcTGT と他の古細菌由来の ArcTGT の配列比較を blastp や CLUSTAL_X を用いて行ったとこ



(31 ページから続く) (B) ArcTGT の触媒ドメインと C1 ドメインの配列アラインメント. (A) に挙げた生物種に加え, *Halobacterium* sp. NRC-1 (HalSP1), *Haloferax volcanii* (HalVo), *Methanosarcina acetivorans* (MetAc), *Methanosarcina mazei* (MetMa), *Methanosarcina barkeri* (MetBa), *Methanopyrus kandleri* (MetKa), *Archaeoglobus fulgidus* (ArcFu), *Sulfolobus solfataricus* (SulSo), *Sulfolobus tokodaii* (SulTo), *Aeropyrum pernix* (AerPe), *Pyrobaculum aerophilum* (PyrAc) の配列も示した. (B) で追加したこれらの古細菌由来の ArcTGT は, ドメイン C2, C3 を欠いており, $\alpha_2\beta_2$ サブユニット構成になっていると推測される (3.2.1.8 節, 31 ページ参照). また, ドメイン C2, C3 を有する α_2 サブユニット構成の ArcTGT でも, ドメイン C1 と C2 の間 (425–435 のループの部分) に長い挿入配列を持つものがあることがわかる. (A), (B) ともに配列アラインメントには CLUSTAL_X(Thompson *et al.*, 1997) を用いた.

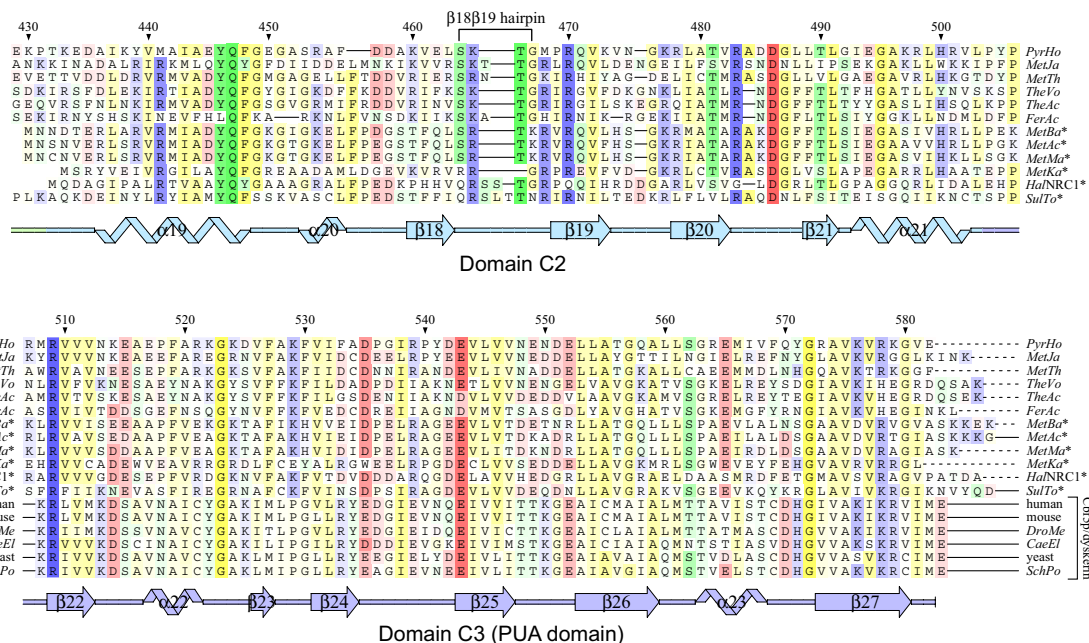


図 3-6 ArcTGT のドメイン C2, C3 と Cbf5p Ψ 合成酵素の PUA ドメインの配列アラインメント

配列アラインメントには CLUSTAL_X(Thompson *et al.*, 1997) を用いた. ArcTGT に関しては, *Pyrococcus horikoshii* (PyrHo), *Methanocaldococcus jannaschii* (MetJa), *Methanothermobacter thermautotrophicus* (MetTh), *Thermoplasma volcanium* (TheVo), *Thermoplasma acidophilum* (TheAc), *Ferroplasma acidarmanus* (FerAc) のドメイン C2, C3 の配列を示した. ドメイン C2, C3 だけの独立した ORF が存在すると推定される古細菌に関しては, *Methanosarcina barkeri* (MetBa), *Methanosarcina acetivorans* (MetAc), *Methanosarcina mazei* (MetMa), *Methanopyrus kandleri* (MetKa), *Halobacterium* sp. NRC-1 (HalNRC1), *Sulfolobus tokodaii* (SulTo) の配列を示した. また, Cbf5p/dyskerin に関しては, human, mouse, *Drosophila melanogaster* (DroMe), *Caenorhabditis elegans* (CaeEl), 出芽酵母 (yeast), *Schizosaccharomyces pombe* (SchPo) のものを示した. さらに, 配列の上に *P. horikoshii* における残基番号を, 下には二次構造の模式図を示した.

る、一部の古細菌ではドメイン C2 と C3 を欠いている事が明らかになった。さらにドメイン C2 と C3 のみの配列を用いて blastp 検索を行ったところ、これらの C 末端ドメインを欠く ArcTGT をもつ生物種に限り、ドメイン C2 と C3 のみの配列からなると思われる短い ORF が検出された (図 3-6, 32 ページ)。以上のことから、C 末端ドメインを欠く ArcTGT を持つ古細菌においては、ArcTGT は全体として $\alpha_2\beta_2$ 四量体 (α =触媒ドメイン+ドメイン C1, β =ドメイン C2+C3) を形成して機能している可能性が高いと考えられる。最初に ArcTGT が発見された好塩性古細菌 *Haloferax volcanii* の ArcTGT は、ドメイン C2C3 を欠いているタイプに属している。 β サブユニットは分子量が 16 kDa 程度と α サブユニット (56.3 kDa) に比べてかなり小さい為、*H. volcanii* ArcTGT のクローニング (Watanabe *et al.*, 1997) において見出すことができなかつたのであろう。さらに、この C2C3 を欠く *H. volcanii* ArcTGT 発現ベクターに組み込み、組み換え体の調製を試みたところ、殆どが不溶性画分に沈殿してしまつたらしい (行木博士私信)。ArcTGT が正しく折り畳むには、ドメイン C2, C3 からなる β サブユニットが必要なのではないかと推測される。

このように一部の古細菌で C2, C3 ドメインが分離した ORF になっているということから、*P. horikoshii* の ArcTGT も、元来このように $\alpha_2\beta_2$ 四量体構成であった

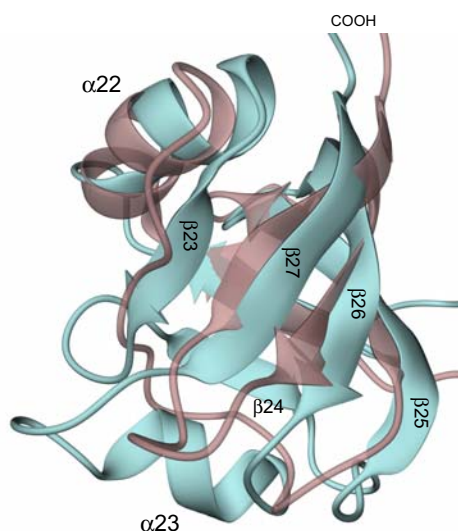


図 3-7 TruB Ψ 合成酵素の C 末端ドメインとの比較

ArcTGT のドメイン C3 (PUA ドメイン) を水色で、TruB Ψ 合成酵素の C 末端ドメインを半透明のピンク色で示した。また、ArcTGT については、二次構造の名称も示した。重ねあわせには lsqkab (CCP program suite) を使用した。

ものが、進化の過程で融合して α_2 二量体構成になったのではないかと推測される。TGT ファミリーのバレル構造が全ての生物種に存在するが、C 末端ドメイン (あるいは β サブユニット) に存在する PUA ドメインが真核・古細菌にしか存在しないことから、かなり古い時期から存在したであろう QueTGT に C1 ドメインが付加して α サブユニットが出来、一方では PUA ドメインに C2 ドメインが付加して β サブユニットが出来て ArcTGT が完成し、一部ではさらに進化して α と β サブユニットが融合した ArcTGT が出来上がったのではないだろうか。一方、現在配列がわかっている ArcTGT の系統樹を作成すると図 3-8 (33 ページ) のようになった。これからは、 α_2 型 ArcTGT には 2 グループあり、上述のような融合がそれぞれのグループに対して個別に起こった可能性が示唆される。この、*Thermoplasma acidophilum* 等を含む、別系統の α_2 型 ArcTGT は、亜鉛結合モチーフを含まない等 (図 3-5, 31 ページ)、他の TGT とは殊更異なつた特徴を示している。

ところで、この例のように、ある生物種では 1 つの ORF にコードされている酵素が、他の生物種では分かれた ORF になっている例は幾つか挙げられる。例えば、tRNA^{Leu} にロイシンを結合させるロイシル tRNA 合成酵素 (LeuRS) は、通常 1 つのポリペプチド鎖からなるが、真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の酵素は ORF

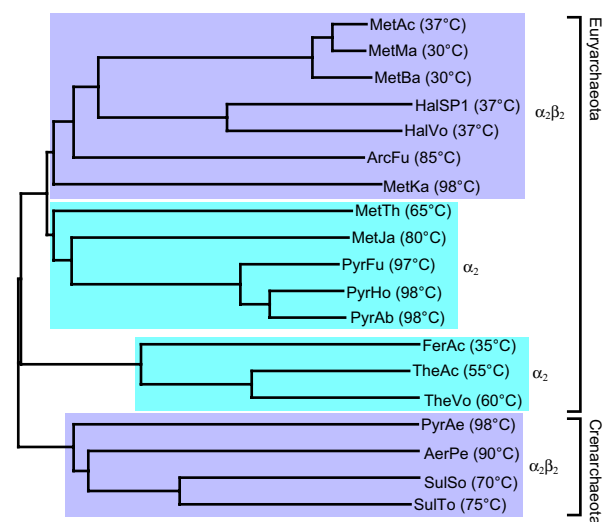


図 3-8 ArcTGT の系統樹

$\alpha_2\beta_2$ サブユニット構成になっていると推測される ArcTGT に関しては、 α サブユニット (触媒ドメイン+ドメイン C1) を用いた。 α_2 , $\alpha_2\beta_2$ サブユニット構成の ArcTGT を異なる色で囲って示した。系統樹の作成には CLUSTAL_X (Thompson *et al.*, 1997) を使用した。生物種の略称は図 3-5 (31 ページ) に準ずる。また、生物種名の横に生育温度を示した。

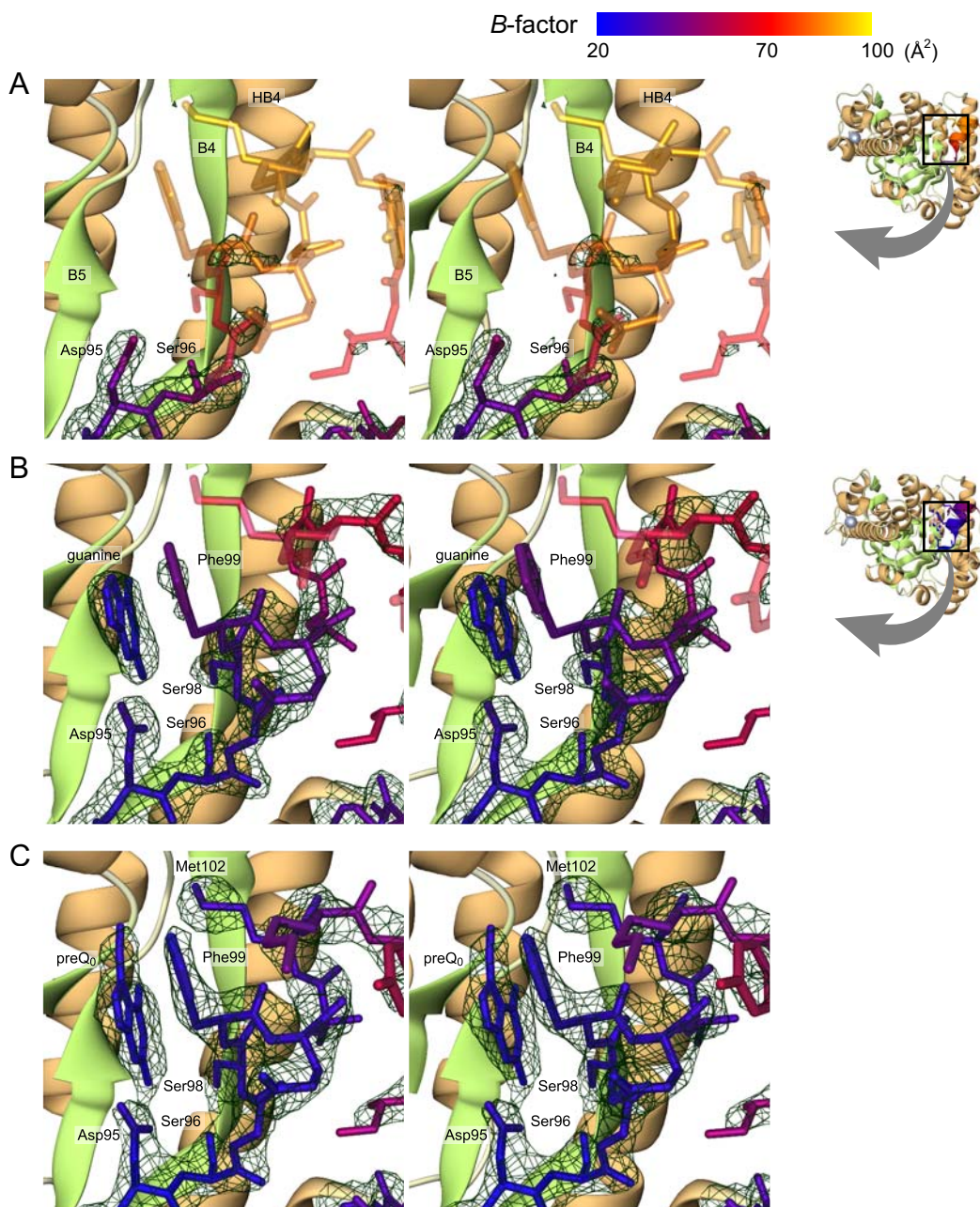


図 3-9 リガンド・フリー, グアニン, preQ₀ との複合体それぞれにおける触媒サイトの構造

全てステレオ図。(A) はリガンドフリー, (B) はグアニンとの複合体, (C) は preQ₀ との複合体の構造. 残基 94-110 とリガンドをスティックモデルで, それ以外はリボンモデルで表示した. スティックモデルの部分に関しては, 温度因子に対応して, 青 (20 Å²), 赤 (70 Å²) から黄色 (100 Å²) で表示した. またそれぞれの構造について, 残基 94-110 とリガンドをオミットして計算した $2|F_o| - |F_c|$ 焼き鈍しオミットマップを暗緑色で示した.

が二つに分かれていることが報告されている (Gouda *et al.*, 2002). *A. aeolicus* は起源が古い真正細菌であるといわれており, その為, LeuRS は元々ヘテロ二量体を形成していて, 進化の過程で単量体の酵素になったと推測されている (Gouda *et al.*, 2002). *A. aeolicus* LeuRS の分断は “Leucyl-specific insertion domain” と呼ばれる, 異なる生物種間で配列の変化が大きいサイトで起こっている. 一方で, ArcTGT の分断もドメイン C1 と C2

の境界で起こっているが, 好熱性メタン古細菌類ではこの部分に長い挿入配列があり, 生物種間で大きく異なっている部分である, という点で共通している (図 3-5, 31 ページあるいは, 図 3-6, 32 ページ).

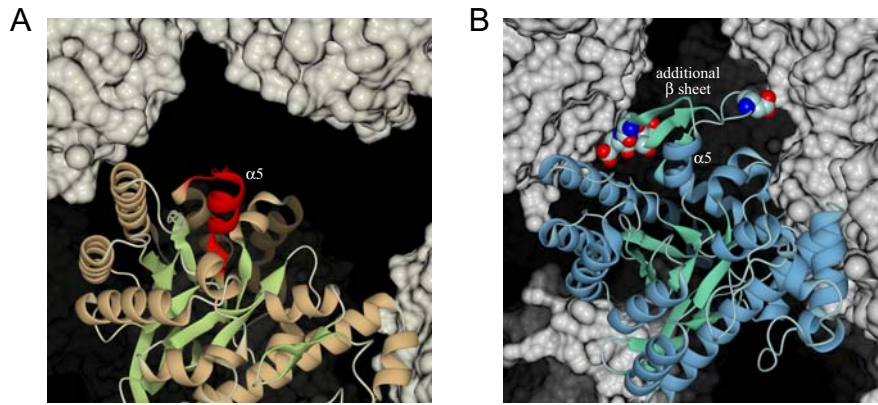


図 3-10 ArcTGTの触媒ドメインと QueTGTのクリスタルコンタクトの比較

両者とも酵素の主鎖をリボンモデルで、結晶中に存在する周囲の分子を表面モデルで示した。(A) ArcTGT に関しては、触媒サイトに蓋をするヘリックス $\alpha 5$ を赤色で示した。ヘリックス $\alpha 5$ と周囲の残基が全くクリスタルコンタクトに関わっていないことが分かる。一方、(B) QueTGT に関しては、ヘリックス $\alpha 5$ に直接接続している QueTGT に特有の additional β sheet (図 3-5, 31 ページ, パネル A) 上の残基がクリスタルコンタクトに関わっており、それらの残基を CPK モデルで示した。

3.2.2 ArcTGT・リガンド複合体の結晶構造

3.2.2.1 リガンド・フリー型 ArcTGT と グアニン、preQ₀ 結合型 ArcTGT の比較

リガンド・フリー型の結晶構造では触媒サイト付近の残基 97-106 が disorder していたが (2.2.1.11 節, 26 ページ参照), グアニンとの複合体の構造では 97-106 の主鎖が order し、ヘリックス $\alpha 5$ として電子密度中に見出された。しかし側鎖はかなり disorder して殆ど見えなかった (図 3-9, 34 ページ)。一方, preQ₀ との複合体でも同様に, 97-106 の主鎖が order し電子密度中に見出された。さらに側鎖も order し、特に Phe99 と Met102 の側鎖がはっきりと見られた。この構造変化は、基質塩基と Ser96, Ser98 の側鎖の水素結合と、Phe99, Met102 の疎水的な相互作用により引き起こされているようである (図 3-9)。

構造変化を起こすヘリックス $\alpha 5$ は、触媒ドメインのバレル構造の入り口部分に蓋のように存在している。触媒サイトにリガンドがない状態ではヘリックス $\alpha 5$ が動きやすくなり、触媒サイトにリガンドが取り込まれやすくなっていると考えられる。一方、リガンドが触媒サイトに取り込まれた状態では、ヘリックス $\alpha 5$ が触媒サイトに蓋をすることで、水分子等により求核置換反応が阻害されないように保護しているのではないかと考えられる (図 3-9)。

ところで、この構造変化を起こすヘリックス $\alpha 5$ は QueTGT にも存在するが、QueTGT ではリガンドあり・なしのどちらの場合でも ArcTGT のような構造変化は起こっていない (Romier *et al.*, 1996a)。温度因子

の若干の変化はあるものの、disorder して見えなくなるということはないようである。QueTGT の結晶構造は ArcTGT に比べて溶媒含量が低く、ヘリックス $\alpha 5$ に接続している QueTGT 固有の β シート (図 3-5, 31 ページ) 等で結晶学的対称分子と密に接触している (図 3-10, 35 ページ)。これらの接触が、ArcTGT で見られたような構造変化を妨げている可能性が高い。

3.2.2.2 グアニンと preQ₀ の認識様式

グアニンと preQ₀ の構造は 7 位の置換基を除き同じである。両者の共通部分は ArcTGT によりそれぞれ同様に認識されていた。すなわち、N1, N2 が Asp130 の O^{δ1}, O^{δ2} と水素結合し、O6 が Gln169, Gly196 と水素結合している (図 3-11, 36 ページ)。さらに、Asp95 の O^{δ1}, O^{δ2} がグアニンの N2, N3 とそれぞれ水素結合している (図 3-11)。中性 pH におけるグアニンの N2 はプロトン化しており、N3 はプロトン化していない。一方、中性 pH でアスパラギン酸のカルボキシル基は電離している。その為、この結晶構造のように Asp95 の O^{δ2} と N3 が水素結合できる距離に存在するには (図 3-11)、少なくとも間にプロトンが取り込まれている必要があるだろう。

一方 preQ₀ との複合体では、preQ₀ に特異的な 7 位のシアノ基は Val198 の主鎖のアミノ基と水素結合できる距離にある (図 3-11)。生体高分子の結晶構造でシアノ基が水素結合を形成している例は見られないが、シアノ基の窒素原子は孤立電子対を持つ為、水素結合の受容体として働くことは十分考えられる。一方、グアニンとの複合体では、7 位は水分子を

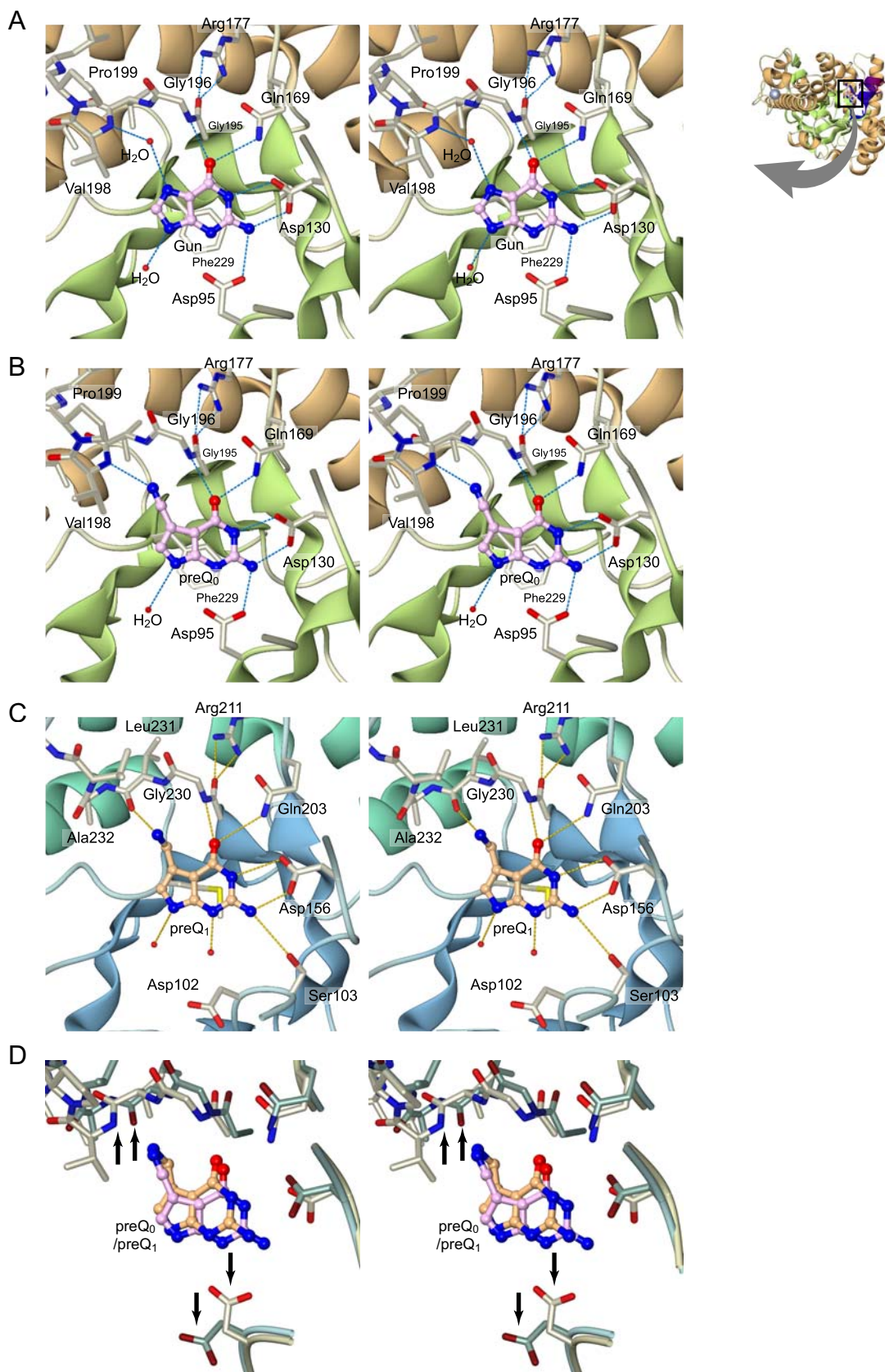


図 3-11 ArcTGT のリガンド認識と, QueTGT のリガンド認識の比較

全てステレオ図。(A)はArcTGTとグアニン, (B)はArcTGTとpreQ₀との複合体の, (C)はQueTGTとpreQ₁との複合体の構造。酵素側の構造はリボンモデルで示した。また、リガンド認識にかかわる酵素側の側鎖をスティックモデルで表示した。リガンドはボールスティックモデルで表示した。(D)はArcTGT・preQ₀複合体とQueTGT・preQ₁複合体の構造比較。両者の酵素側の主鎖を, lsqkab (CCP4 program suite)を用いて最小二乗法で重ね合わせて表示した。QueTGT・preQ₁複合体の座標は, EMBL ハイデルベルグ研究所の Dietrich Suck 博士より頂いた。

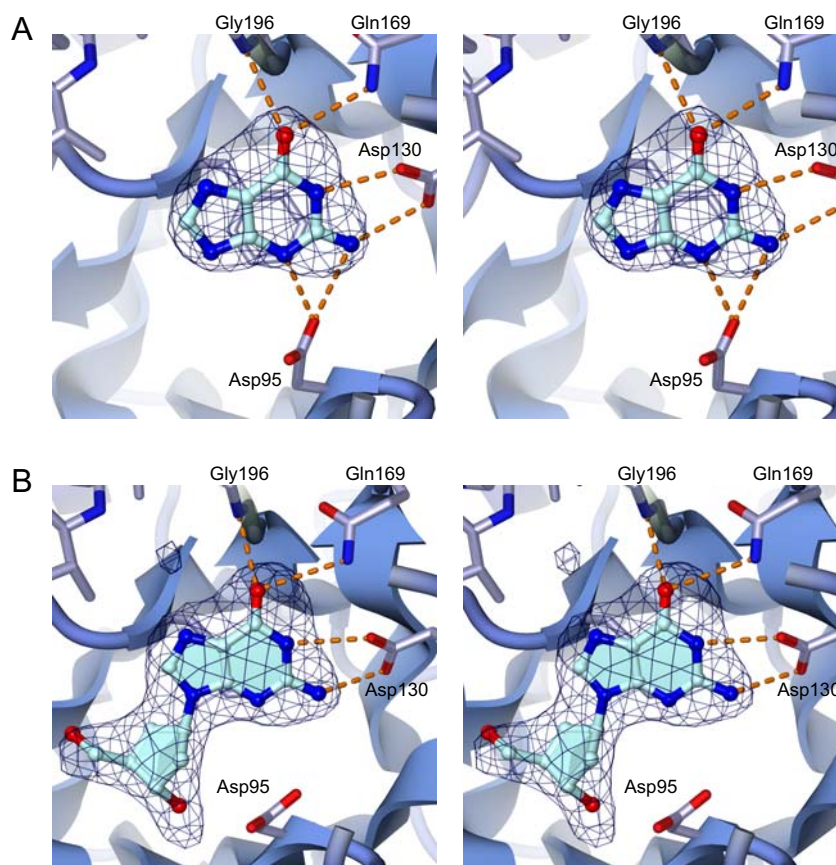


図 3-12 ArcTGT によるリガンドの認識 (その 2)

全てステレオ図。(A) がグアノシンとの複合体, (B) がデオキシグアノシン類似体との複合体。すべて図 3-11 (36 ページ) と同じ向きから表示した。また, リガンドをオミットした, $|F_o - F_c|$ 焼き鈍しオミットマップ (A は 6σ レベル, B は 4σ レベル) を暗青色で示した。

介して Val198 の主鎖のアミノ基と水素結合していた (図 3-11)。すなわち, preQ_0 の 7 位の置換基の代わりに水分子が位置している。

さらにリガンドの芳香環は Phe99 と Phe229 の芳香環に挟まれるようにスタックしている (図 3-9, 34 ページ)。このような疎水的な環境中に上記の水素結合が存在することからも, リガンドの認識が非常に強固かつ厳密なものであることが推定される。ArcTGT は, このように, 異なる基質の共通部分を厳密に認識することで, グアニンと preQ_0 を同様に認識することが出来るのだろう。

3.2.2.3 QueTGT による preQ_1 認識との比較

1.3 節 (4 ページ) でも述べたように, ArcTGT と QueTGT は同様の反応を触媒すると考えられているが, 使用する基質が異なっている。すなわち, QueTGT はグアニン, preQ_1 , preQ_0 ともに基質とするが, ArcTGT はグアニン, preQ_0 のみ基質とする (Watanabe *et al.*, 1997)。

Z. mobilis QueTGT とその基質である preQ_1 との複合体の結晶構造が報告されている (Romier *et al.*, 1996a) が, preQ_1 とグアニンは 7 位の置換基を除き構造が同じであり, この共通部分に関しては, QueTGT による preQ_1 認識と ArcTGT によるグアニン・ preQ_0 認識はほぼ同じであった (図 3-11, 36 ページ)。ただ, QueTGT では, 求核触媒と考えられている Asp102 (ArcTGT の Asp95 に相当) の側鎖が回転し, 塩基と逆方向に向いている (図 3-11)。さらに, QueTGT では基質ポケット内に水分子が入り込み, Asp 残基の代わりに基質と水素結合している (図 3-11)。ArcTGT と QueTGT は同様の機構で反応を触媒していると考えられているが, 触媒残基と考えられている Asp 残基になぜこのような構造の違いがあるのかは不明である。本論文では, 6.1 節 (65 ページ) において, Asp95 の役割と他の残基が求核触媒である可能性を再検討した。

一方, preQ_1 に特異的な 7 位のアミノメチル基は, Leu231 (ArcTGT の Val197 に相当) の主鎖のカルボニル基と水素結合している (図 3-11, 36 ページ, パネル

C). ArcTGT と QueTGT の基質ポケットを重ね合わせた図 3-11 (パネル D) からわかるように, ArcTGT と QueTGT では, 基質ポケット 7 位の置換基を収納する部分の構造が大きく異なっている. すなわち, ArcTGT では主鎖のアミノ基が基質の方を向いているのに対し, QueTGT では主鎖がフリップして, カルボニル基が基質の方を向いている. これは, ArcTGT の基質ポケットは負に分極した preQ₀ の 7 位のシアノ基を認識するようになっているが, QueTGT の基質ポケットは正に帯電した preQ₁ の 7 位のアミノメチル基を認識するようになっている為だろう. さらに, この主鎖の構造の違いは, ArcTGT に特異的に存在するヘリックス $\alpha 9$ (198–202) によるものと考えられる (図 3-5, 31 ページ). ArcTGT では, この挿入されたヘリックスの為, Val198 (QueTGT の Ala232 に相当) が基質側に押し下げられ, その結果 Val198・Val197 間のペプチド結合の向きが QueTGT と逆になっている.

ArcTGT が preQ₁ を結合しないという実験結果は, 上記のモデルでよく説明できる. 一方, QueTGT は preQ₀, preQ₁ ともに基質とすることができるが, これは以下のように説明できる. すなわち, QueTGT の 7 位ポケットはヘリックス $\alpha 9$ (198–202) に相当する部分がないだけ ArcTGT に比べて広がっている (図 3-11, パネル D). QueTGT の基質ポケットに preQ₀ が入った場合, preQ₀ のシアノ基と QueTGT のポケットに面しているカルボニル基との間に電荷の反撥が起こる可能性があるが, ポケットが広がっている分距離が離れる為問題なく結合できるのであろう.

3.2.2.4 グアノシン, デオキシグアノシン類似体との複合体の構造

ArcTGT とグアノシンの複合体の結晶構造では, $2|F_o|-|F_c|$ 電子密度マップ中にグアニン部分の電子密度は見られたが, リボース部分は全く見出すことが出来なかった (図 3-12, 37 ページ, パネル A). リボース部分の温度因子が高い為に disorder して見えていない可能性と, 塩基交換反応の第一段階目が S_N1 的に進行して *N*-グリコシド結合が切断され, リボースがなくなってしまう可能性が考えられた.

一方, デオキシグアノシンの類似体との複合体では, グアニンだけでなくリボース類似体に相当すると思われる電子密度が見出された (図 3-12, パネル B). このリボース類似体では, 4' 位の酸素がメチル基に変わっている為 (図 2-2, 14 ページ), 求核置換反応の遷移状態であるオキソカルベニウム・カチオンを生じることが出来ず, 結果として *N*-グリコシド結合が切断されなくなっている. 一方, それ以外の性質はグアノシンとほぼ変わらない (QueTGT で塩基交換反応は標的サイトの残基がデオキシ体でも反応が進むことが確認されている為 (Nonekowski *et al.*, 2002), 2' 位の違いの影響はないと考えられる). この類似体でリボースの電子密度が見られたということは, グアノシンとの複合体において disorder の為リボースが見えなかったという可能性は排除できる. すなわち, 塩基交換反応の第一段階目が途中まで進行した結果, *N*-グリコシド結合が切断された可能性が高い.

□

第4章

P. horikoshii 由来 ArcTGT・tRNA 複合体の X 線結晶構造解析

序論 1.2 節 (2 ページ) でも述べたように, tRNA 修飾酵素には, 通常の L 字型に折りたたんだ tRNA の高次構造に埋もれているサイトに修飾を導入するものが存在するが, これらの酵素は何らかの構造変化を起こした tRNA を認識している可能性が高い. ArcTGT はそのような修飾酵素のひとつであり, 高次構造に埋もれた tRNA の D ループ上 15 位にどのようにして修飾を導入しているかは不明であった. 一方, 過去の生化学的な実験から, ArcTGT の tRNA 認識には正しい L 字型をした tRNA は必要でなく, 塩基配列の特異性は 15 位の G 以外ないにもかかわらず, tRNA 上の 15 位を厳密に認識できるということがわかってきた (Watanabe *et al.*, 2000). これらの tRNA 認識の機構を解明することを目的とし, *P. horikoshii* 由来 ArcTGT・tRNA^{Val} 複合体の結晶構造解析を行った. 本章では, tRNA の調製から, ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化, X 線結晶構造解析についてまで述べた.

4.1 材料と方法

4.1.1 tRNA T7 転写産物の大量調製

P. horikoshii 由来 tRNA^{Val}_(UAC) 遺伝子は, 独立行政法人・製品評価技術基盤機構が解読した *P. horikoshii* ゲノム配列を参考に, ゲノムから PCR 法を用いてクローニングした. クローニングした遺伝子は, 上流に T7 プロモーター, 下流に制限酵素 *Mva* I の認識サイトを付加し, pUC119 上に導入した. この鋳型プラスミドを大腸菌株 DH5 α に導入して大量培養を行い, 得られた菌体からアルカリ法でプラスミドを抽出した. プラスミド DNA をさらに CsCl 濃度勾配遠心法で精製し, 制限酵素 *Mva* I で処理して T7 転写反応の鋳型 DNA とした. 本来, 3'-CCA 末端を揃える為の *Mva* I 処理は, CCA 末端にアミノ酸を結合させるアミノアシル tRNA 合成酵素の基質 tRNA を調製する場合に良く用いられる方法であり, G15 を修飾する酵素には不要である. しかし結晶化の上で末端の非一様性が悪影響を及ぼすことが憂慮されたので, なるべく一様な転写産物を得るために上記のような方法を取った.

上述の手順で得られた鋳型 DNA を用いて, 表 4-1 (40 ページ) の組成により 37°C, 3 時間 T7 RNA ポリメ

ラーゼによる転写反応を行った. 尿素変性 PAGE で生成物を確認した後, 7 M 尿素変性 10% PAGE (19:1) で生成物を全て泳動し, ゲルから切り出して精製した. 切り出した tRNA を含むゲルを約 50 ml の精製水で抽出した (37°C, 24 時間). さらに, 脱尿素と濃縮のために抽出した溶液をイオン交換カラム RESOURCE Q (Amersham Biosciences) にかけて塩濃度勾配で溶出した. 溶出した tRNA を含む画分は, エタノール沈殿によりさらに濃縮した. 最終生成物は緩衝液 A** (表 2-1, 12 ページ) に溶解し, -20°C に保存した. 精製 tRNA の濃度は紫外光の吸光度により, 1 OD₂₆₀=44 mg/l として測定した.

4.1.2 ArcTGT・tRNA 複合体の調製

ArcTGT の調製は 2.1.1.1 節 (11 ページ) と同じ方法で行った. 4.1.1 節 (39 ページ) で得られた tRNA と ArcTGT をモル比が 1:1 になるように混合した. ここで, 混合するときの ArcTGT 濃度, 緩衝液の塩濃度, pH を変化させ, 安定に可溶化しかつ単分散になる条件を探索した. 複合体サンプルの濃縮には M.W.C.O. 10,000 の Vivaspin500 (Viva science) を使用した.

表 4-1 tRNA の試験管内転写反応に使用した反応液組成

成分	濃度
HEPES・カリウム (pH 8.1)	80 mM
塩化カリウム	40 mM
塩化マグネシウム	24 mM
GMP	31 mM
スペルミジン	2 mM
1,4-ジチオスレイトール	16 mM
ATP, CTP, GTP, UTP	各 4 mM
牛血清アルブミン	20 mg/ml
RNase inhibitor (SIN-101, 東洋紡)	0.2 mg/ml
T7 RNA ポリメラーゼ	約 10 mg/ml
鋳型プラスミド	50 mg/ml

4.1.3 複合体状態での動的光散乱の測定, native PAGE, ゲルろ過

4.1.2 節 (39 ページ) で調製した複合体溶液の動的光散乱の測定を行った。測定には DynaPro MS (Protein Solutions) を用いた。サンプル濃度は ArcTGT の濃度が 3 g/l になるよう調製し、測定前に 0.1 μ m Ultrafree-MC filter (Millipore) により濾過した。得られたデータはプログラム DYNAMICS (Protein Solutions) を用いて解析した。また、4.1.2 節で調製した複合体溶液を非変性 (native) PAGE で泳動する、あるいはゲル濾過クロマトグラフィーにかけることで、一様な分子量の状態が存在しているかどうか確認した。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex200 (Amersham Biosciences) を使用した。

4.1.4 ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化

4.1.2 節、4.1.3 節で最適化した条件の複合体サンプルを用いて、結晶化スクリーニングを行った。結晶化スクリーニングの方法は 2.1.1.3 節 (12 ページ) と同様の方法で、ArcTGT 濃度 3 g/l、20°C の条件で行った。さらに、スクリーニングで得られた予備的な結晶を、2.1.1.3 節と同様の方法で最適化した。また、得られた結晶を溶かし、尿素変性 PAGE で泳動した後、臭化エチジウムと CBB 両者で染色することで複合体結晶であることを確認した。

4.1.5 ArcTGT・tRNA 共結晶の回折像測定

まず抗凍結条件の探索をおこない、はじめから極低温条件下で測定を行った。測定は、実験室系の回折計と、シンクロトロン放射光 (SPring-8 BL41XU) 両方で行った。なお、BL41XU における測定では、窒素ガスを用いたクライオ装置 (100 K) 以外に、ヘリウムガスを用いたクライオ装置 (30 K) も使用した。X 線検出装置は、marCCD165 (Mar Research) を使用した。

4.1.6 回折データの処理

2.1.1.7 節 (13 ページ) と同様に、HKL2000 package (Otwinowski & Minor, 1997) に含まれる denzo により指数付けとデンストメトリーをおこない、同 scalepack によりスケーリング、データリダクションを行って各指数に対する回折強度を求めた。

4.1.7 分子置換法による位相決定

複合体の位相決定は、CCP4 の MolRep (Vagin & Teplyakov, 1997) を用いて、分子置換法により行った。分子置換のモデルとしては、2.1.1.12 節 (14 ページ) で決定した ArcTGT 単独の結晶構造を 2 量体化した状態のまま使用した。(複合体でも 2 量体化していることが予想されたため、モデルとしては 2 量体化した状態の ArcTGT を用いた)。モデルの精密化は CNS で行った。具体的な方法は 2.1.1.12 節 (14 ページ) に準ずる。

4.1.8 tRNA モデルの構築と精密化

原子モデルの構築には O (Jones *et al.*, 1991) と一部 Que (Ishitani, 2002) を使用した。tRNA の構造で通常の tRNA と同じ構造をしていた部分に関しては、*T. thermophilus* GluRS・tRNA^{Glu} 複合体 (Sekine *et al.*, 2001) の構造を参考にモデル構築を行った。構築したモデルの精密化には CNS (Brünger *et al.*, 1998) を使用した。精密化に用いる構造因子の分解能範囲は、回折データの統計値と、さらに Wilson プロット等を参考に決定した。回折データの統計値に関しては、空間群や redundancy に左右される R_{sym} 値より、 $I/\sigma(I)$ を重視して分解能の上界を決定した。具体的な方法は 2.1.1.12 節 (14 ページ) に準ずる。

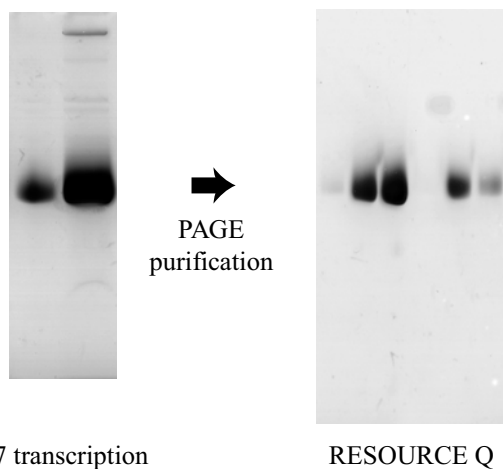


図 4-1 試験管内転写反応で調製した tRNA の精製

(A) T7 反応後と, (B) ゲル精製後 RESOURCE Q にかけての溶出画分.

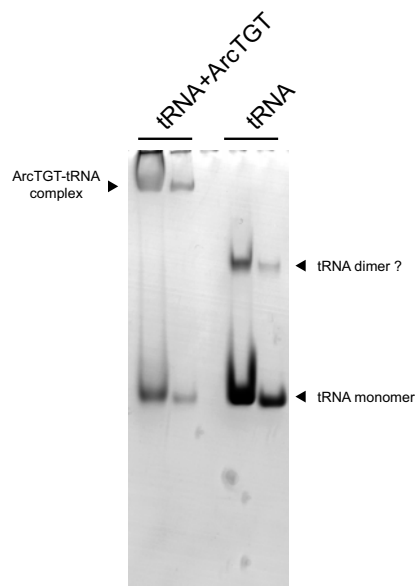


図 4-2 ArcTGT と tRNA によるゲルシフト・アッセイ

tRNA 転写物のみと, ArcTGT・tRNA 複合体を非変性条件下の 10% PAGE (0.5× TBE) で泳動したもの.

4.2 結果と考察

4.2.1 tRNA T7 転写産物の調製と精製

5.0 ml スケールの溶液で T7 転写反応を行い, 精製を行った. 最終的には 5.2 mg の精製されたサンプルを得ることができた (図 4-1, 39 ページ).

4.2.2 ArcTGT・tRNA 複合体の調製

まず, ArcTGT と tRNA を ArcTGT 4.4 g/l, tRNA^{Val} 1.8 g/l になるように, 100 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) NaCl 300 mM の条件下で混合したところ, 瞬時に白沈が生じた. この白沈は溶液を 75°C に加温すると溶解したが, 室温下では再び徐々に沈殿していった. 濃縮したものと混合すると沈殿する可能性があると考え, 両者とも 1.0 g/l 以下程度にしてから混合し, 複合体の状態に濃縮することを試みた. この場合は, ArcTGT の濃度が 10 g/l に達するまで濃縮しても沈殿は生じなかったが, 4°C に数十分ほど置くと白沈が生じた. この白沈は 37°C に加温すれば溶解したが, 再び 4°C に置くと沈殿していった. 塩濃度, pH に問題があると考えられたため, それぞれを振って小容量で濃縮を試みたところ, 100 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5 で NaCl 濃度が 400 mM 以上あれば, 4°C で ArcTGT 数十 g/l まで濃縮しても, 全く沈殿しないことが分かった.

次に, 非変性下の条件でおこなった PAGE では, 複合体のものと考えられるバンドが見られた (図 4-2, 41 ページ). バンドがはっきりと現れていることから, 一様な複合体を形成しており結晶化に適した状態であると考えられる. 一方, ゲル濾過クロマトグラフィーの結果では, 複合体のものと思われるピークが ArcTGT のピークより少々大きい分子量の画分に見られた.

更に, 上述の方法で調製した複合体溶液の動的光散乱測定を行った. 4°C で調製したサンプルを一度 70°C に加熱し, 急冷, 徐冷 (20 分), 徐冷 (100 分) の 3 通りの方法で 25°C に戻して測定した. その結果, 20 分かけて徐冷したサンプルで, 推定分子量 170 kDa ($R_h=5.3$ nm), $C_p/R_h=21.7\%$ となり, 単分散になることが判明した. 一方, 急冷, 徐冷 (100 分) とも $C_p/R_h \sim 40\%$, 推定分子量 200 kDa 以上と, 多分散になる傾向があることがわかった. 20 分かけて徐冷した場合の推定分子量は, ArcTGT 2 量体に tRNA が二つ結合した分子量に近い.

4.2.3 ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化スクリーニングと結晶化条件最適化

まず, 4.2.2 節にあるように一度沈殿したサンプルで無理にスクリーニングを行ったが, 複合体の結晶

表 4-2 ArcTGT・tRNA 複合体の結晶化条件

	緩衝剤	沈殿剤	塩	添加剤
A1 型	0.1 M ADA (pH6.5)	12% PEG4000	100 mM Li ₂ SO ₄	2% 2-propanol
A2 型	0.1 M ADA (pH6.5)	12% PEG4000	200 mM NaH ₂ PO ₄	2% 2-propanol
A3 型	0.1 M ADA (pH6.5)	12% PEG4000	200 mM NaH ₂ PO ₄	2% 2-propanol 0.3% sucrose
B1 型	0.1 M Na・Citrate (pH 5.6)	1 M NH ₄ H ₂ PO ₄		
B2 型	0.1 M Na・Citrate (pH 5.6)	1 M NH ₄ H ₂ PO ₄		0.3% xylitol
B3 型	0.1 M Na・Citrate (pH 5.6)	1 M NH ₄ H ₂ PO ₄		0.3% xylitol 0.1% agarose
C 型	0.1 M Na・Acetate (pH 4.6)	2 M Na・Formate		

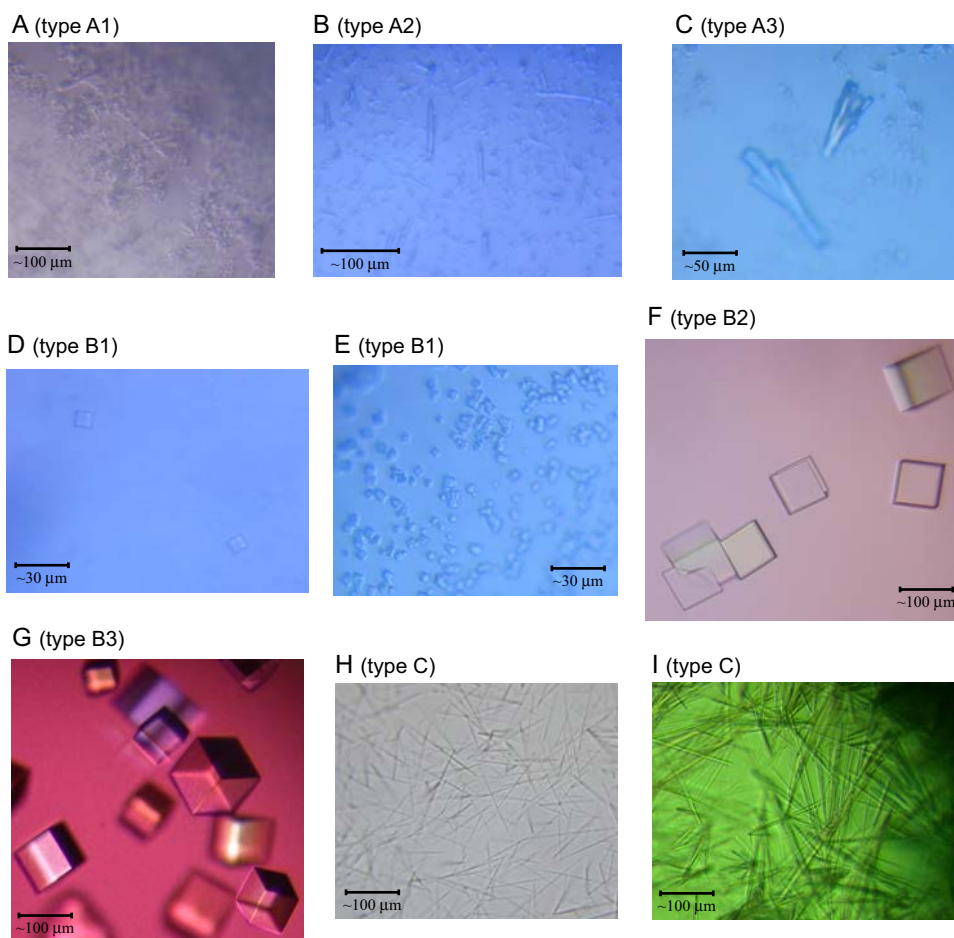


図 4-3 ArcTGT・tRNA 複合体の結晶

(A) A1 型結晶, (B) A2 型結晶, (C) A3 型結晶, (D) スクリーニング時の B1 型結晶, (E) 最適化後の B1 型結晶, (F) 最適化後の B2 型結晶, (G) B3 型結晶, (H) スクリーニング時の C 型結晶, (I) 最適化後の C 型結晶. 図中におおよその寸法を示した.

は得られなかった. 次に 4.2.2 節の手順を経て, 沈殿しないように ArcTGT と tRNA を混合して調製したサンプルを用いてスクリーニングを行ったところ, 2 週間ほどで 12% PEG4000 を沈殿剤とした条件 (表 4-2, 42 ページ, A1 型) で沈殿の中から針状結晶 (図 4-3, 42 ページ, パネル A) が得られた. さらに 1 ヶ月ほどで

磷酸アンモニウムを沈殿剤とした条件 (表 4-2; B1 型) で微小な六面体状の結晶 (図 4-3; パネル D) が得られた. また, 蟻酸ナトリウムを沈殿剤とした条件 (表 4-2; C 型) でも針状結晶 (図 4-3; パネル H) が得られた. まず, PEG4000 を沈殿剤として得られた結晶の最適化を, pH, 沈殿剤濃度の変化, 添加剤としての塩の種

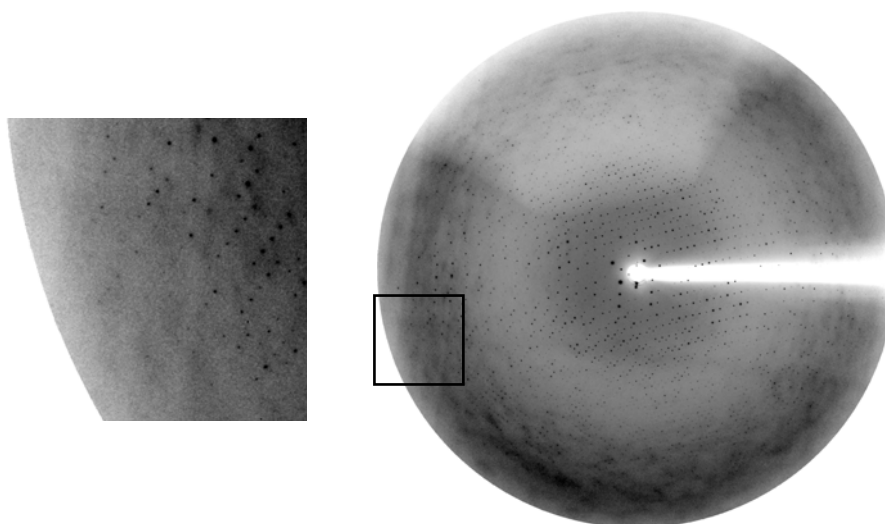


図 4-4 ArcTGT・tRNA 複合体 B2 型結晶の回折像

SPring-8 BL41XU にて波長 1.0 Å の X 線を用い、カメラ距離 250 mm、振り角 1.0° で測定。X 線検出装置は、marCCD165 (Mar Research) を使用。左図は、右図の枠内 (-3.3 Å) を拡大した図。

類・濃度の変化などで試みた結果、塩を 100 mM 硫酸リチウムから 200 mM 磷酸二水素ナトリウムに変えることで結晶が少し太く成長することが分かった (図 4-3, 表 4-2, A2 型)。さらに添加剤のスクリーニングを行ったところ、0.3% 蔗糖の存在下で棒状結晶になることが分かった (図 4-3, 表 4-2, A3 型)。しかし、この結晶は再現性が悪かったためこれ以上最適化するのが困難であった。

蟻酸ナトリウムを沈殿剤として得られた結晶の最適化を、pH と沈殿剤濃度の変化、添加剤のスクリーニングにより試みたところ、pH を 4.6 (酢酸ナトリウム) から 5.6 (クエン酸ナトリウム) に変えることで結晶が出やすくなることが分かった。しかし、長期的に見ると pH 4.6 の方が大きな結晶に成長した。また、ArcTGT 濃度 12 g/l にした条件で、結晶が太くなることが分かった (図 4-3, パネル I)。ただ、現在のところ回折像の測定を行えるほど良い結晶が得られるにはいたっていない。

磷酸アンモニウムを沈殿剤として得られた結晶の最適化を、他の結晶と同様に行ったところ、スクリーニングでは 1 ヶ月あまりかかったのに対し、サンプル濃度を 7.0 g/l にすることで、3 日で結晶化した。しかし、微小結晶が非常に多く出てしまうことが分かった。添加剤スクリーニングの結果、磷酸アンモニウムの濃度を 1.0 M にして、かつ 0.3% キシリトールを加えることで最大 100 mm × 100 mm × 100 mm 程度に成長することが分かった (図 4-3, 表 4-2, B2 型)。また、0.3% エタノールやイソプロパノールを加えた条件でも同程

表 4-3 ArcTGT・tRNA 複合体結晶の回折像統計値

Wavelength (Å)	1.000	
Resolution (Å)	50–3.3	3.42–3.3
Total reflections	334,265	~ 23,500
Unique reflections	41,049	4,055
Redundancy	8.1	~ 5.8
Completeness (%)	99.7	99.8
$I/\sigma(I)$	16.7	2.31
R_{sym} (%)	9.9	48.7

度の結晶が得られることが分かった。これらの添加剤が多量の種結晶の生成を抑えることで、大きな結晶が出やすくなるようである。また、この条件で得られる結晶は、成長中に種結晶が重力の影響によりドロップ界面に落下し、界面上で結晶が成長するため (図 4-3 パネル F では立方体に見えるが) 全方向に結晶が成長しないことが分かった。また、界面で成長した板状結晶は分解能やモザイク性が悪い傾向にあった。そのため、アガロースを加えてドロップ中のシードの移動を抑制し、結晶化を試みたところ、0.1% アガロースを加えるという条件で正六面体状の結晶を得ることができた (図 4-3, B3 型)。しかしながら、B2 型の最も良かった結晶に比べて格段に分解能が良くなるというような効果は得られなかった。さらに添加剤濃度などを変化させて最適化を試みたが、これ以上良い結晶は現在のところ得られていない。

一方、4.2.2 節 (41 ページ) で 70°C に一度加熱してから徐冷したほうが光散乱の結果は良くなっていたので、PEG4000 と磷酸アンモニウムを沈殿剤とした

表 4-4 分子置換により得られた解

MolRep による分子置換により得られた解 (オイラー角と分率座標), 相関係数と *R* 因子などを示した.

(A) 回転関数の解

順位	α	β	γ	Rf	Rf/ σ
1	31.57	78.47	99.02	2.388×10^5	7.42
2	37.76	85.85	11.15	2.172×10^5	6.75
3	37.04	90.00	333.00	1.587×10^5	4.93
4	82.23	90.00	187.85	1.572×10^5	4.88
5	56.80	85.08	214.11	1.481×10^5	4.60

(B) 回転関数 (順位 1) の解に対する並進関数の解

順位	X	Y	Z	Dens/ σ	R-fac	Corr
1	0.522	0.985	0.269	37.20	0.459	0.496
2	0.189	0.318	0.126	14.99	0.521	0.349
3	0.855	0.651	0.37	14.63	0.516	0.358

(C) 回転関数 (順位 2) の解に対する並進関数の解

順位	X	Y	Z	Dens/ σ	R-fac	Corr
1	0.294	0.634	0.155	34.53	0.474	0.466
2	0.961	0.967	0.442	14.55	0.530	0.331
3	0.626	0.299	0.297	14.11	0.531	0.333

表 4-5 ArcTGT・tRNA 複合体モデルの精密化統計値

Resolution (Å)	50.0–3.3
Number of	
Reflections used	41,391
Protein atoms	9,286
RNA atoms	3,163
Ions	6
Water atoms	41
R.m.s.d.	
Bond length (Å)	0.0119
Bond angles (Å)	1.56
Impropers (°)	1.49
Ramachandran plot	
Most favored (%)	82.1
Additionally allowed (%)	17.5
Generously allowed (%)	0.2
R_{work} (%)	22.5
R_{free} (%)	28.8
σ_A coordinate error (Å)	0.72

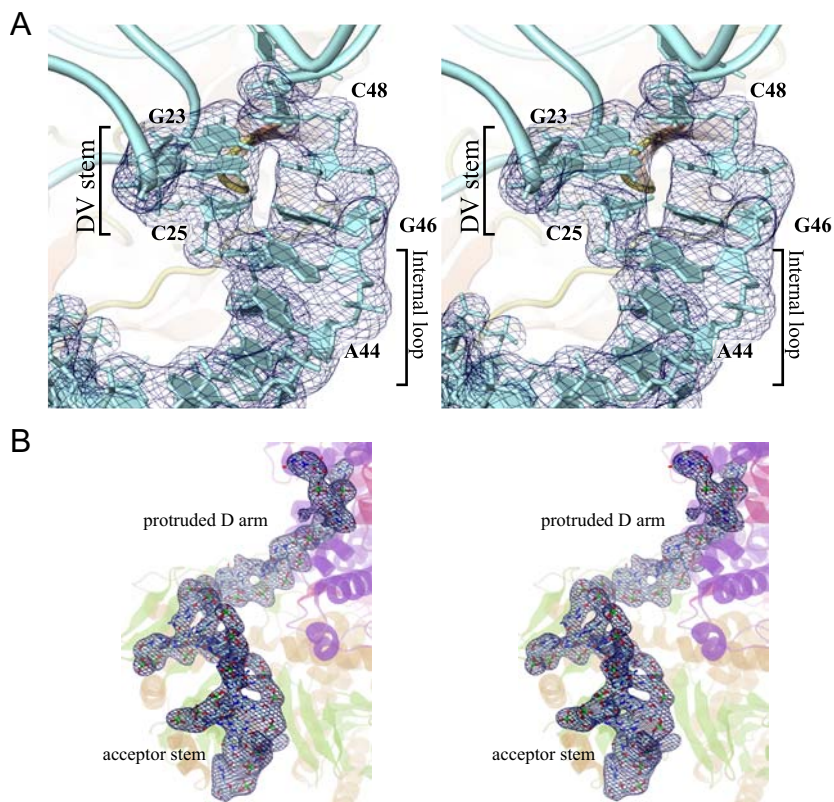


図 4-5 複合体結晶構造の電子密度

すべてステレオ図. (A) tRNA 分子中, D ステム, バリアブル・ループの一部と, アンチコドンアーム全て (G23 から C49) をオミットして計算した $|F_o| - |F_c|$ 焼き鈍しオミットマップ (2.6 σ レベルで表示). オミットした残基をボールスティックモデルで, それ以外の部分をチューブモデルで表示した. 酵素側の構造はリボンモデルで示した. (B) tRNA 分子中, アクセプター・ステムと, 飛び出した D アーム (G1 から U17, C66 から A76) をオミットして計算した $|F_o| - |F_c|$ 焼き鈍しオミットマップ (2.7 σ レベルで表示). オミットした残基をボールスティックモデルで表示した. 酵素側の構造はリボンモデルで示した.

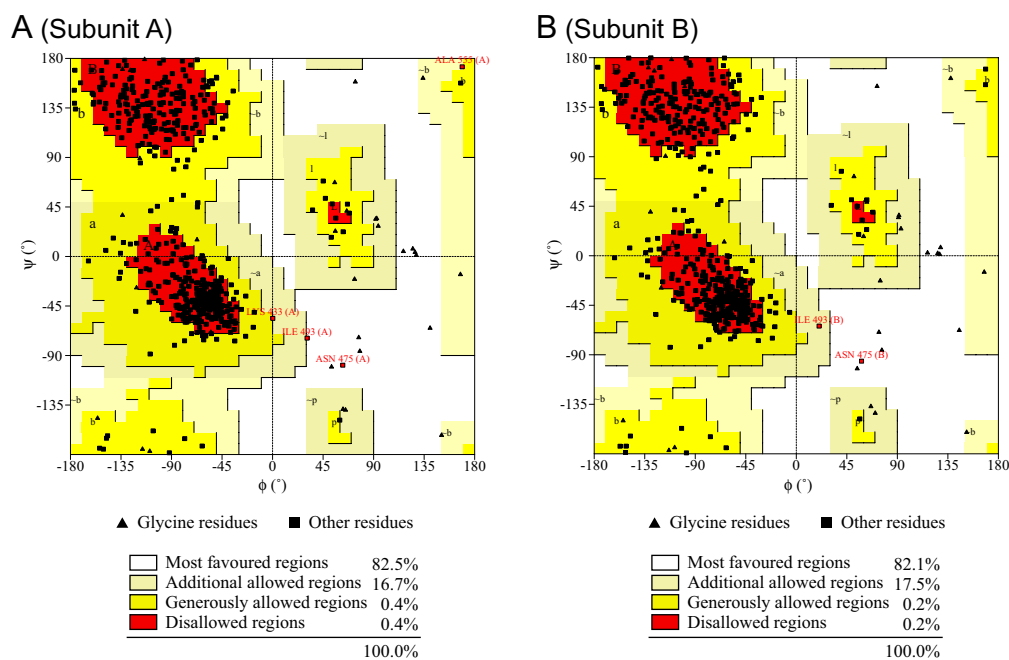


図 4-6 複合体 ArcTGT のラマチャンドランプロット

(A) 複合体構造中の ArcTGT サブユニット A と、(B) サブユニット B のラマチャンドランプロット。

条件で、同様に一度徐冷した上で結晶化を試みた。PEG4000 を沈殿剤とした条件では、結晶とともに現れる沈殿の量が減少した。しかし結晶が大きくなるような効果はなかった。一方、磷酸アンモニウムを沈殿剤とした条件では、徐冷すると全く結晶が出なくなることが分かった。

4.2.4 ArcTGT・tRNA^{Val} 複合体の回折像測定

磷酸ナトリウムを沈殿剤として得られた B2 型結晶 (図 4-3) について、極低温条件下での測定のため、抗凍結剤の検討を行ったところ、25% グリセロールが適していることがわかった。大きさが 50 mm 程度に成長したものを実験室系、シンクロトロン放射光 (SPring-8 BL41XU) で測定したが、両者とも全く回折像が得られなかった。さらに大きさが 100 μm 程度になったものを実験室系の回折計で数十 \AA 程度の回折像が得られた。Denzo で指数付けを行ったところ、結晶系が菱面体晶系の可能性が高いと推測された。さらにシンクロトロン放射光 (SPring-8 BL41XU) で測定を行ったところ、3.3 \AA 分解能までの回折像を測定することができた。ただ、100 K での測定では 5 秒露光 1° 振りで 20 フレーム程度測定した段階で、X 線によるダメージのため分解能が低下することが判明した。露光時間を短くする、X 線の強度を減衰させるなどの方法も試みたが、分解能が低下してしまうため、ヘリウ

ムガスを用いたクライオストリーム (30 K) で測定を行ったところ、最後 (90 フレーム) まで、3.3 \AA 程度の回折像が得られた。データ処理を行った結果、空間群 $R32$ 、単位胞が $a=b=230.840 \text{ \AA}$, $c=269.271 \text{ \AA}$ ($a=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$) であることがわかった。回折像を図 4-4 (43 ページ) に、回折データの統計値を表 4-3 (43 ページ) に示す。

4.2.5 分子置換法による位相決定

分子置換による位相決定を試みたところ、回転関数、並進関数ともに明瞭な解が得られた (表 4-4, 44 ページ)。得られた解をさらに CNS を用いた剛体精密化、エネルギー最小化、温度因子精密化で精密化し、 σ_A 重み付けされた $2|F_o|-|F_c|$ 電子密度を計算させたところ、蛋白質部分の電子密度が見出された。また、C 末端ドメインの付近や、2 量体インターフェイスの付近などに tRNA の電子密度が見出された。

4.2.6 tRNA モデルの構築とモデルの精密化

電子密度から明らかに tRNA の二重らせん部分と分かるところに対しては、GluRS・tRNA^{Glu} 複合体 (Sekine *et al.*, 2001) のモデルから tRNA の部分だけを借用して電子密度に当てはめた。また、T Ψ C アームに関しては電子密度から通常の tRNA と同様の構造を取ることが確認できたため、上記のモデルから部分を

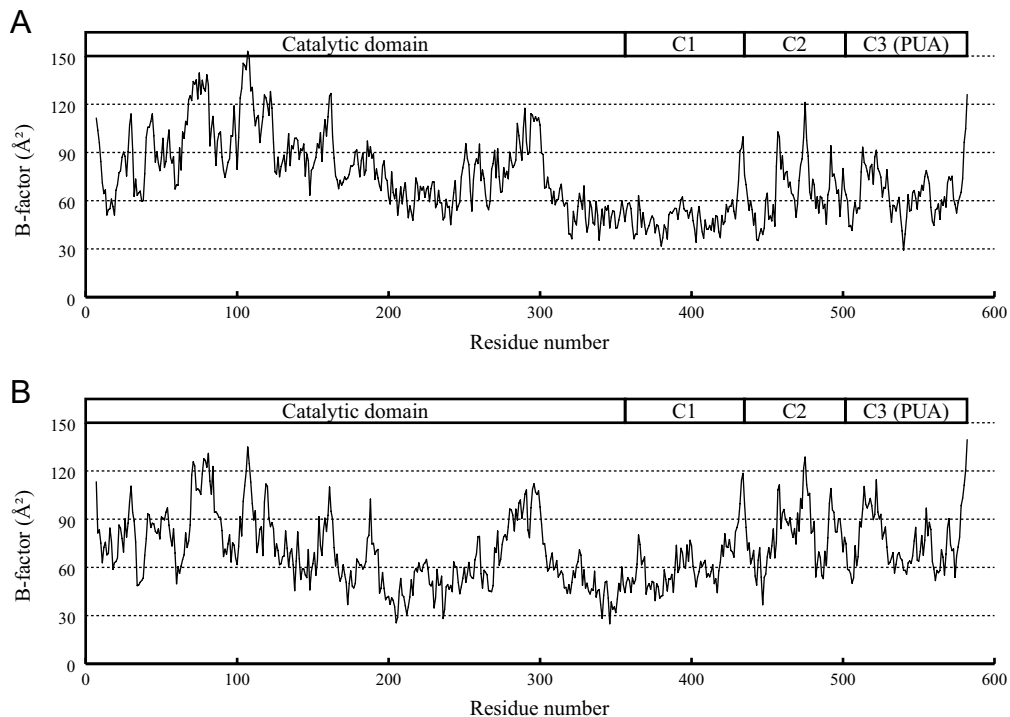


図 4-7 複合体 ArcTGT 主鎖の温度因子分布

(A) はサブユニット A の, (B) はサブユニット B のグラフを, また, グラフの上に対応するドメインを模式図で示した。

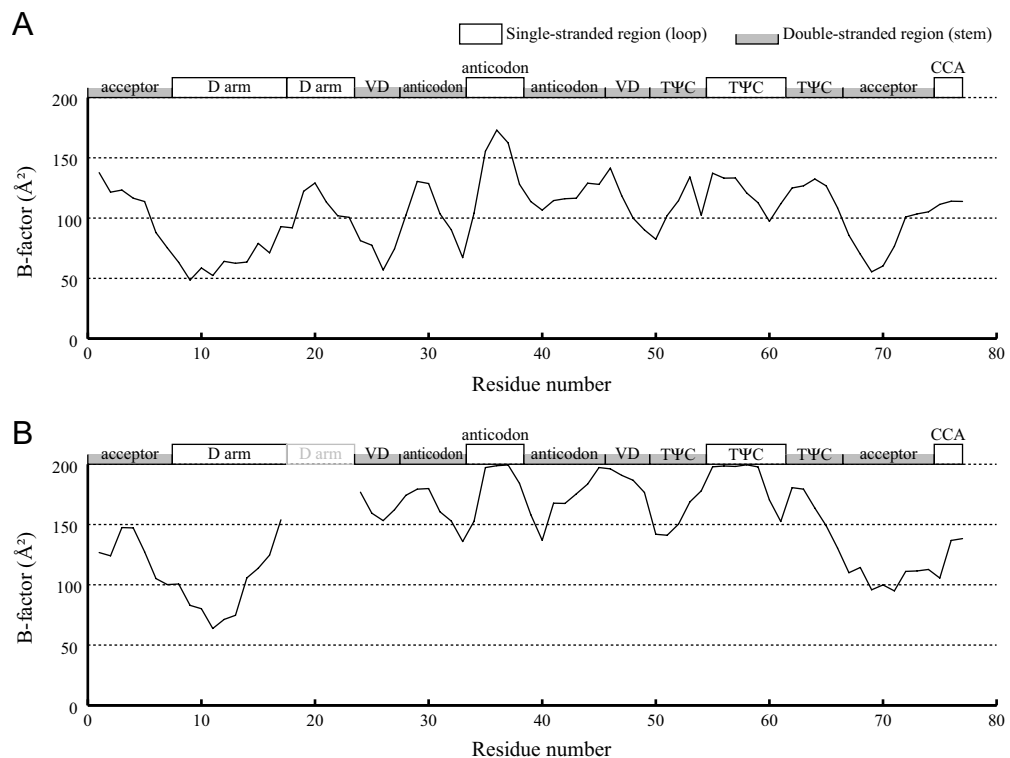


図 4-8 複合体構造中の tRNA 主鎖の温度因子分布

(A) は tRNA-I の, (B) は tRNA-II のグラフを, また, グラフの上に対応する構造を模式図で示した。tRNA-I は -II に比べてクリスタルコンタクトにより安定化されて, その結果, 全体的に低い温度因子になっている。

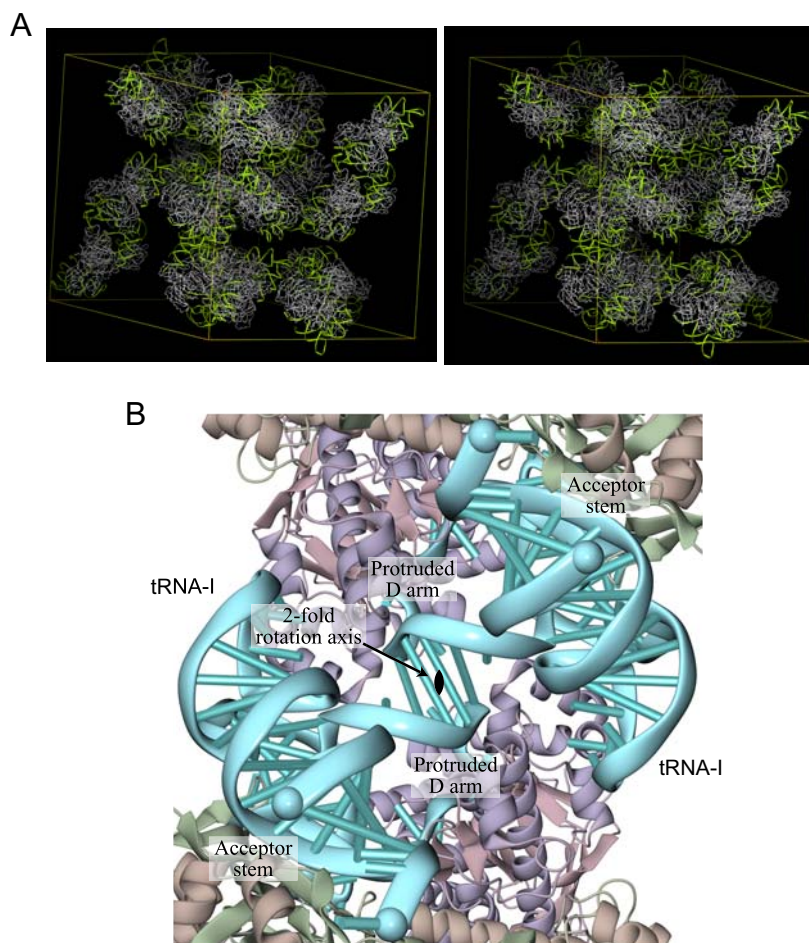


図 4-9 複合体結晶のクリスタルパッキング

(A) 単位胞中の結晶学的な対称分子 18 個をすべて表示した (ステレオ図)。単位方を黄色で、ArcTGT を薄黄色のリボンモデルで、tRNA を緑色のリボンモデルで表示した。三方晶系は六方軸と菱面体軸、2 通りの取り方があるが、この図では六方軸を表示している。(B) 非対称単位中 2 分子ある tRNA のうち、より温度因子の低かった tRNA-I は、図のように飛び出した D アーム (18–20a 位) の部分が結晶学的対称分子と塩基対を形成していた。結晶学的な 2 回軸を中心に示した。

借用して電子密度に当てはめた。アクセプター・ステム、T Ψ C アーム、アンチコドンステムの一部のモデルを置いた段階で CNS によりモデルの精密化 (剛体精密化・エネルギー最小化・温度因子精密化) を行い、 σ_A 重み付けされた $2|F_o| - |F_c|$ 電子密度を見たところ、モデルを置いた部分の電子密度が改善されるだけでなく、tRNA の電子密度が不明瞭であった部分にも、解釈できる電子密度が見出されるようになった。さらに tRNA モデルを構築し、CNS による精密化を行うことを繰り返したところ、B サブユニットの触媒ドメインに結合した tRNA (tRNA-I と呼ぶ) に関しては、全てモデルをおくことができた。一方、A サブユニットの触媒ドメインに結合した tRNA (tRNA-II と

呼ぶ) に関しては、D アームの G18 から U22 が最後まで disorder して解釈することができなかった。最終的には $R_{work}=22.5\%$ ($R_{free}=28.8\%$) までモデルを精密化できた (表 4-5, 44 ページ)。モデル精密化後の電子密度を図 4-5 (44 ページ) に示す。また、複合体結晶構造中の ArcTGT のラマチャンドラン・プロットを図 4-6 (45 ページ) に、酵素・tRNA それぞれの主鎖の温度因子分布を図 4-7 (46 ページ)、図 4-8 (46 ページ) に、クリスタルコンタクトの様子を図 4-9 (47 ページ) に示す。ArcTGT・tRNA 複合体の分子モデルと構造因子は、Protein Data Bank に登録した (PDB ID: 1J2B)。

□

第5章

ArcTGT による tRNA の認識機構

本章では、第4章で解明した ArcTGT・tRNA 複合体の結晶構造に基づき、本研究ではじめて明らかになった「tRNA 修飾酵素による構造変化を起こした tRNA 認識の機構」、「配列非特異的かつ位置特異的な tRNA 認識機構」について議論した。また、構造解析の結果に基づいてデザインした酵素・tRNA の変異体解析を行い、その結果について考察した。

5.1 材料と方法

5.1.1 ArcTGT 変異体の調製

酵素の一残基変異体 (D95N, D249N) は QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) により作成した。また、酵素の残基欠失変異体 $\Delta(463-466)$ は、欠失させる残基の前後の部分に貼り付くプライマーを作成し、遺伝子の部分とプラスミドを併せて一周 PCR で増幅させ、得られた断片を T4 DNA キナーゼでリン酸化したうえで T4 DNA リガーゼでセルフライゲーションさせて作成した。使用した DNA プライマーを表 5-1 (50 ページ) に示す。

作成した変異体遺伝子の乗った発現プラスミドを大腸菌株 BL21(DE3)TIR に導入することで組換え蛋白質を発現させた。方法は 2.1.1.1 節 (11 ページ) と同様である。発現した蛋白質を熱処理により精製し、活性測定を行った。活性測定の結果、全く活性がなかった変異体に関しては、それ以上の精製は行わなかった。一方、活性がわずかながら検出された $\Delta(463-466)$ 変異体に関しては、正確に酵素濃度を測定して活性測定条件を合わせる必要があると考え、2.1.1.1 節と同様のカラムクロマトグラフィーによる方法で精製して濃度測定を行い、活性測定を行った。また、変異体酵素が正しく折り畳んでいることを動的光散乱の測定により確認した。

5.1.2 tRNA^{Val} 変異体の調製

tRNA 変異体は図 5-1 (49 ページ) に示したものを、ミニヘリックス・マイクロヘリックス RNA は図 5-2 (50 ページ) に示したものを使用した。これらのうち、変異サイトが一部分だけの tRNA (1GGU) は QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) により作成した。一方、変異サイトが複数部分にまたがるものは、tRNA の前半部分と後半部分に対応する一本鎖 DNA を合成し、PCR 反応で二本鎖化させ、そのまま T7 転写反応の鋳型として使用した。T7 転写反応の結果得られた tRNA は、4.1.1 節 (39 ページ) と同様の方法で精製した上で濃度測定を行い、活性測定に用いた。ミニヘリックス・マイクロヘリックス RNA は、米 Dharmacon 社から購入したものをを使用した。

5.1.3 グアニン交換反応の活性測定

TGT はグアニンと修飾塩基だけでなく、グアニン同士も入れ替える活性を持つ。塩基交換反応の活性測定は、ArcTGT により tRNA 上の G15 がどれだけラベル体のグアニンと置換されたかを定量することで測定した。反応は 45°C 或いは 70°C の恒温水槽で行った。反応液の組成は、50 mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 7.5)、5 mM 塩化マグネシウム、400 mM 塩化ナトリウム、20

表 5-1 変異体作成に用いた DNA プライマー

変異体	方向	塩基配列 (5' → 3')
D95N	F	<u>TTTCAATGATGAGGACGAGGCT</u>
	R	<u>CAATATGATGAGGACGAGGCT</u>
D249N	F	<u>CGATATGATGAGGACGAGGCT</u>
	R	<u>CAATATGATGAGGACGAGGCT</u>
Δ(463-466)	F	<u>CGATATGATGAGGACGAGGCT</u>
	R	<u>TTTCAATGATGAGGACGAGGCT</u>
1GGU	F	<u>TATATGATGAGGACGAGGCT</u>
	R	<u>CAATATGATGAGGACGAGGCT</u>
DSTBL1	F	<u>CGATATGATGAGGACGAGGCT</u>
	R	<u>CGATATGATGAGGACGAGGCT</u>
DSTBL2	F	<u>CGATATGATGAGGACGAGGCT</u>
	R	<u>CGATATGATGAGGACGAGGCT</u>

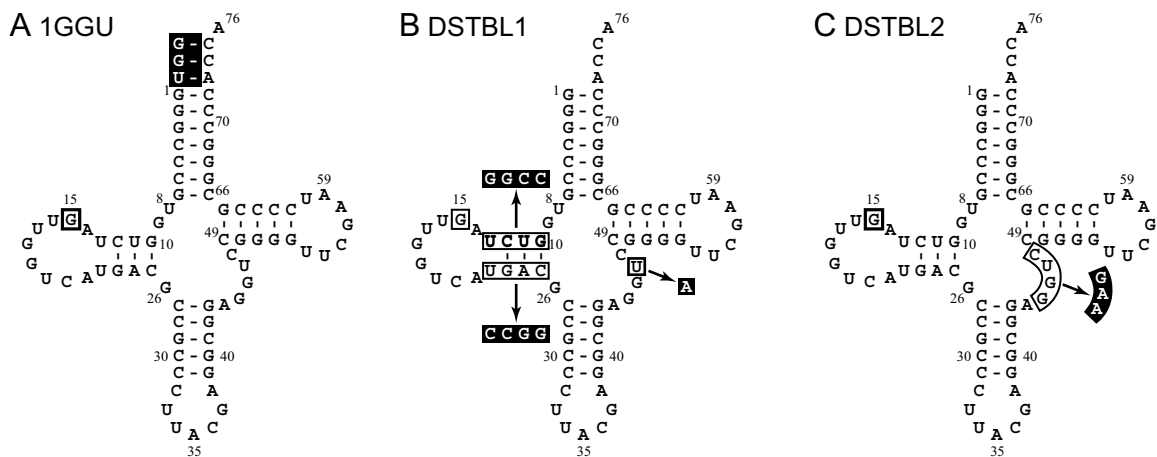


図 5-1 tRNA 変異体の 2 次構造模式図
tRNA 変異体, 1GGU (A), DSTBL1 (B), DSTBL2 (C), それぞれの 2 次構造模式図.



図 5-2 本研究で使用したマイクロヘリックス・ミニヘリックス
本研究で使用した (A) マイクロヘリックス RNA と, (B) ミニヘリックス RNA の 2 次構造模式図を示した.

μM 8-[¹⁴C] グアニン (53 mCi/mmol; Moravsek) とした。反応は、酵素の添加によって開始し、10% のトリクロロ酢酸 (TCA) を染み込ませて乾燥させた 3MM ペーパーに反応液を移すことによって停止させた。反応液を浸潤させた 3MM ペーパーを 10% TCA 溶液で 1 回、更に 5% TCA 溶液で 2 回洗浄して、未反応のグアニン

を除いた。更に、100% エタノールで 2 回洗って水分を除き乾燥させた後、非水系シンチレーションカクテルに浸し、シンチレーションカウンターで計測した。tRNA の変異体 1GGU, DSTBL1, DSTBL2 と、酵素の変異体 Δ(463-466) に関しては同じ条件で 2 度活性測定を行い、反応初速度の平均値と標準偏差を求めた。

表 5-2 酵素活性測定の結果
括弧の中に標準偏差を示した。

enzyme	Substrate tRNA	V_0 (cpm/min)		V_0 ratio (%)	
		45 °C	70 °C	45 °C	70 °C
Wild type	Intact	160 (4.5)	250 (2.0)	100	100
	1GGU	6.6 (0.15)	190 (11)	4.3	75
	DSTBL1	6.1 (0.45)	160 (0.52)	3.9	66
	DSTBL2	35 (2.2)	200 (9.2)	23	81
	Minihelix	90	—	58	—
	Microhelix	140	—	90	—
$\Delta(463-466)$	Intact	n.d.	66 (0.72)	0	26
D95N		—	n.d.	—	0
D249N		—	n.d.	—	0

5.2 結果

5.2.1 各変異体の活性測定

まず野生型の酵素と tRNA で活性測定を行い、酵素反応の速度論的定数 (K_M , k_{cat}) の測定を試みたが、基質濃度を予測される K_M 付近にすると誤差に比して十分な放射線のカウント数 (CPM) を測定することができず、正確に K_M , k_{cat} を測定することができなかった。これは、使用したグアニンのラベル体が 8 位のみラベルしたものであった為 1 分子当たりの放射活性が低く、誤差に比べて十分なカウント数を得ることができなかったことが原因であると考えられる。その為、渡辺らの論文 (Watanabe *et al.*, 2000) ではグアニンの炭素原子全てにラベルが入ったものを用いているが、そのようなラベル体は現在入手不可能であった。

以上の問題点の為、酵素活性は、十分に活性がありかつ反応が飽和に達しないよう条件を選び、反応の初速度をもって測定することにした。具体的には、温

度 45°C においては酵素 300 nM, tRNA 基質 80 mM で、温度 70°C においては酵素 100 nM, tRNA 基質 80 mM で測定を行った。表 5-2 (51 ページ) にそれぞれの酵素・tRNA 変異体の酵素活性測定の結果を示す。

5.2.2 ミニ・マイクロヘリックスの活性測定

図 5-2 (50 ページ) のミニヘリックス・マイクロヘリックス RNA の酵素活性の測定は、tRNA での活性測定と同様に、温度 45°C, 酵素 300 nM, RNA 基質 80 mM で行った。その結果、マイクロヘリックス RNA では野生型 tRNA と比べてほぼ同じ程度の活性があることが分かった。一方ミニヘリックス RNA では活性はあるものの、マイクロヘリックス RNA に比べると低くなった。これは、マイクロヘリックスの方が、配列が長く GC 含量も多い為、予期しない二次構造を取ってしまう為と考えられる。

5.3 考察

5.3.1 ArcTGT・tRNA 複合体の全体構造

ArcTGT・tRNA 複合体の結晶構造は、非対称単位当たり ArcTGT 2 分子 (A サブユニット, B サブユニット) と tRNA 2 分子 (tRNA-I, tRNA-II) を含んでいる。酵素単独の構造解析の結果や、複合体の動的散乱の結果から予測されたように、ArcTGT は二量体化した上で、2 分子の tRNA を認識していた。即

ち、ArcTGT の 2 つのサブユニットを架橋するように tRNA が結合している (図 5-3, 52 ページ)。二量体化した ArcTGT の両サブユニットの構造は殆ど同じであった。同様に、二量体化した ArcTGT の両側に結合した各 tRNA-I, tRNA-II 分子も殆ど同じ構造を取っていた。ただ、tRNA-I 側の温度因子がより低く、電子密度がより明瞭に見える為、以下の議論では tRNA-I 側のみについて議論する。

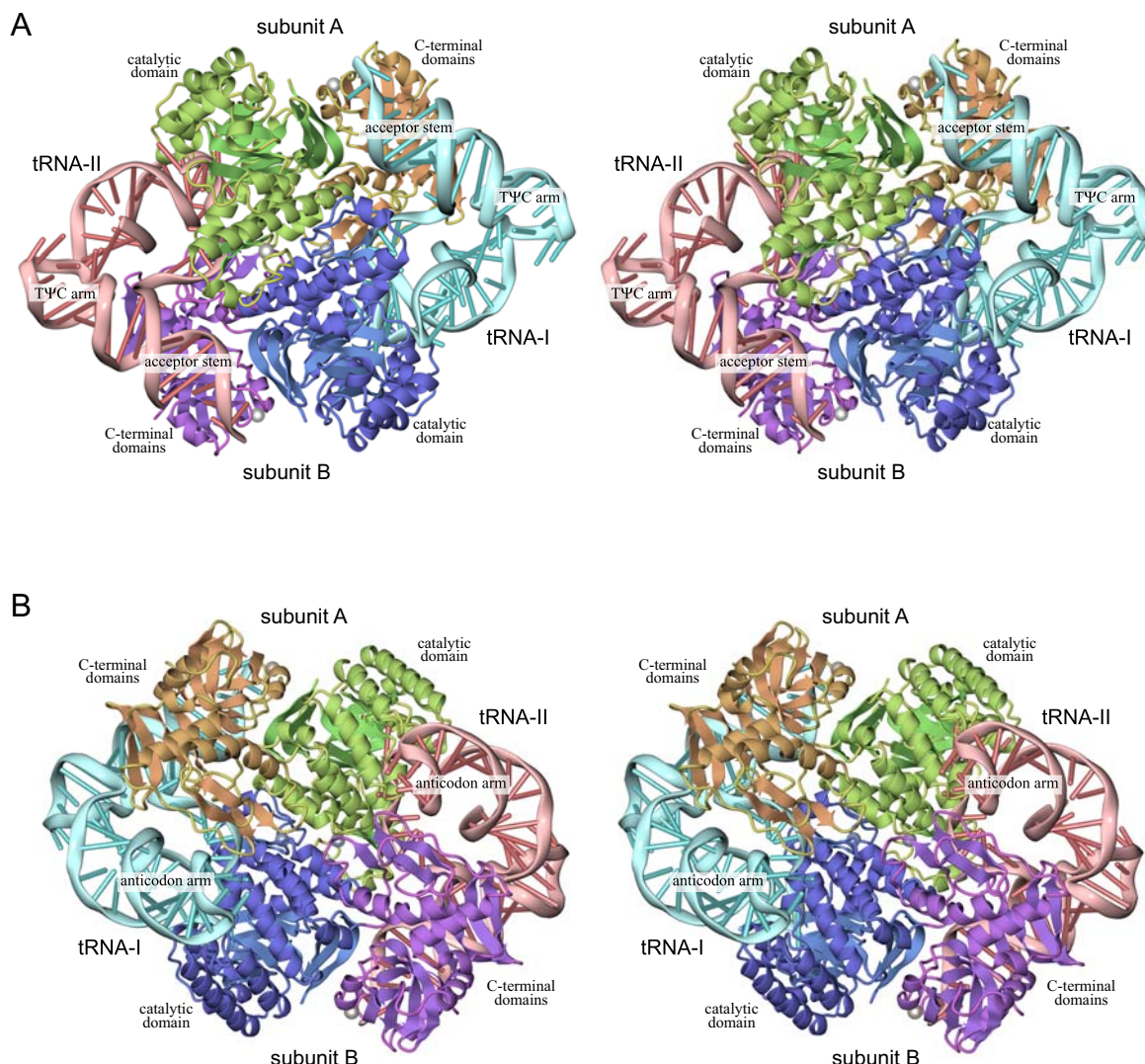


図 5-3 ArcTGT・tRNA 複合体の結晶構造
 全てステレオ図。(B)は(A)から180°回転して、裏側から見た図。

複合体結晶中の ArcTGT の構造は、リガンド・フリー状態の ArcTGT と、触媒サイト付近の残基を除き、殆ど同じ構造を取っていた。即ち、二量体化の様式も殆ど同じである。一方 ArcTGT に結合した tRNA には、通常の L 字型構造の tRNA に比して、非常に大きな構造変化が見られた (図 5-4, 53 ページ)。

5.3.2 ArcTGT に結合した tRNA の構造変化

ArcTGT に結合した tRNA は、D アームの殆どが tRNA 本体から飛び出している (図 5-4, 53 ページ)。通常の L 字型 tRNA では、D アームがコアの形成に重要な役割を果たしている。その為、D アームが tRNA 本体から飛び出しているこの tRNA では、新たなコア構造が形成されていた (図 5-6, 54 ページ)。即ち、D ステムの塩基対は完全に破壊され、その前半 (G10 か

ら C12) は酵素によって認識されている (5.3.4 節, 59 ページに後述)。一方、その相手側の残基 (G23 から C25) は、バリエブル・ループ (G46 から C48) と塩基対をつくり、ステム構造を形成していた (以降「DV ステム」と呼ぶ; 図 5-6, 54 ページ; 図 5-5, 53 ページ)。この構造変化した tRNA の新たなコア構造は、DV ステムを中心に構成されている。DV ステムはアンチコドンステムの上側に存在しており、両者は連続したステム構造を形成しているが、その間に塩基対が壊れた領域が存在している (インターナルループ領域; 図 5-5, 図 5-6)。このインターナルループ領域は、塩基対が作れないものの塩基同士が向き合ってスタックしており、不安定なステム構造を形成しているように見える。以上のように、DV ステム、インターナルループ領域、アンチコドン・アームは一続きのステム構造

を形成しているが(図 5-5), その主軸はインターナルループ領域の部分で約 30° 折れ曲がっている. その結果, アンチコドン・アームの部分は, ArcTGT A サブユニットの C 端ドメインと, B サブユニットの触媒ドメインの間に形成されているクレフトに収まる形となっている(図 5-8, 56 ページ).

一方, DV ステムの上方には TΨC アームが存在している. DV ステムの一番上側の塩基対 (G23:C48) は TΨC ループの A59 とスタックしているが(図 5-6, 54 ページ), この 3 者の相互作用は通常の tRNA に見られる, D ループ G15 とバリアブル・ループ C48 と TΨC ループ 59 位の相互作用に類似している(図 5-6). 一方, TΨC ループは, D ループとの相互作用を失っているが, 通常の tRNA とほぼ同じ構造を

取っていた. 更に TΨC ステム, アクセプター・ステムも通常の tRNA とほぼ同じ構造であった. このように, ArcTGT に結合した tRNA は, 歪ながらも, 全体的には L 字型構造を取っている(図 5-4, 53 ページ). 本論文では, この tRNA の構造を, tRNA がとりうるもう一つの高次構造という意味をこめて, **オルタナティブ型 tRNA** と呼ぶことにする.

オルタナティブ型 tRNA の形成に DV ステムがどのように影響しているかを検討する為, DV ステムを作れないような tRNA の変異体(図 5-1, 50 ページ, パネル B, C)を作成し, 酵素活性のアッセイを行った. その結果, 45°C においては, DV ステムを壊した変異体で野生型 tRNA に比べて 23% に活性が落ちた(表 5-2, 51 ページ, DSTBL2). 即ち, DV ステムはオルタナティ

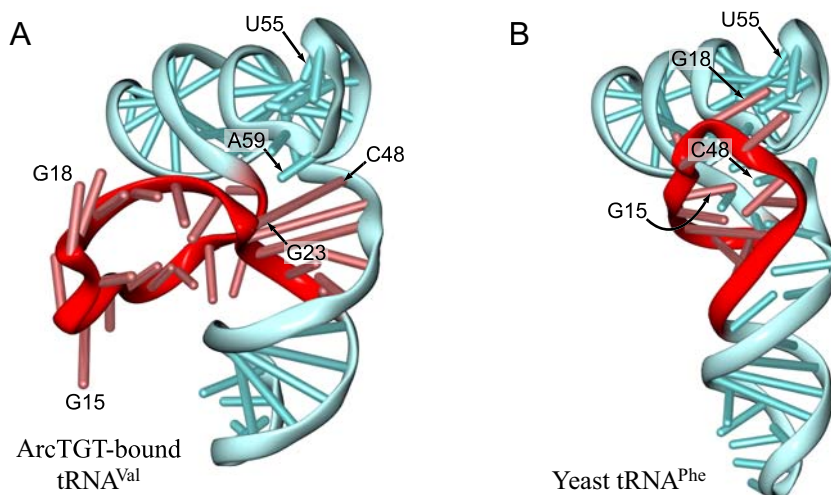


図 5-4 通常型とオルタナティブ型 tRNA の高次構造の比較

(A) ArcTGT に結合した状態の tRNA と, (B) 酵母 tRNA^{Phe} の結晶構造 (Shi & Moore, 2000) の比較.

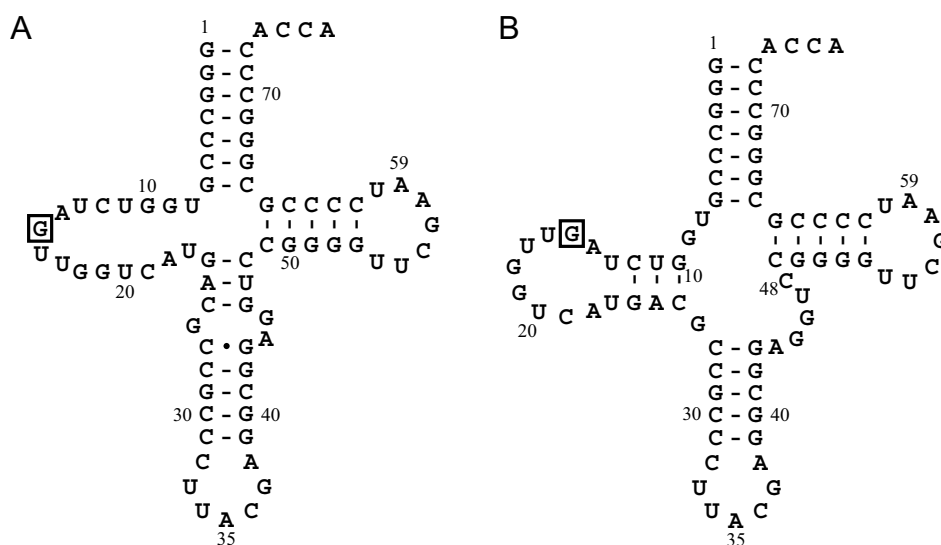


図 5-5 通常型とオルタナティブ型 tRNA の二次構造の比較

(A) ArcTGT に結合した状態の tRNA と, (B) 通常型 tRNA の 2 次構造模式図.

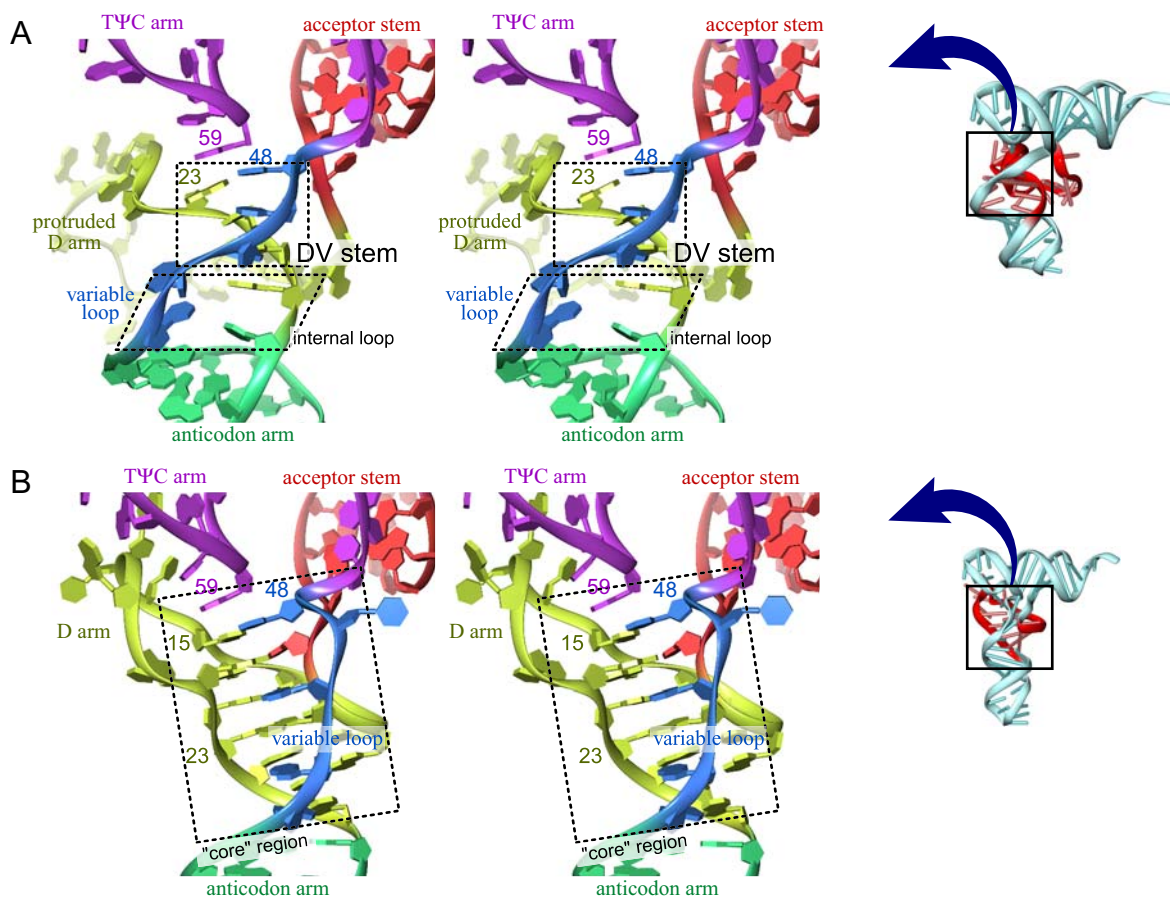


図 5-6 通常型とオルタナティブ型 tRNA のコア構造の比較

(A) ArcTGT に結合した状態の tRNA と, (B) 酵母 tRNA^{Phe} の結晶構造 (Shi & Moore, 2000) それぞれのコア部分の比較 (ステレオ図).

ブ型 tRNA の形成にある程度は寄与しているが, DV ステムが単独でオルタナティブ型 tRNA の方を通常型 tRNA よりエネルギー的に安定にしてしまう程の寄与はないと推測される. オルタナティブ型 tRNA が通常型 tRNA よりエネルギー的に安定になる為には, 5.3.3 節 (55 ページ) 以降に述べる酵素と tRNA の相互作用が欠かせないのであろう. 一方で, DV ステムを不安定にするだけでなく, D ステムをすべて G:C 塩基対に置換して安定化した変異体では大きく活性が低下した (表 5-2, DSTBL1). *P. horikoshii* 由来の tRNA は, 耐熱性の要請の為, ステムの塩基対の殆どが G:C ペアになっており, アクセプター, アンチコドン, TΨC ステムの GC 含量は平均で 95% 以上となっている. しかしながら, D ステムの GC 含量は, 平均で 60% 程度と, 大腸菌 tRNA のステムの GC 含量とさほど変わらない. 好熱菌の tRNA において, もし D ステムが他のステムと同様に高 GC 含量になると, この変異体の例のようにオルタナティブ型の折り畳みを取りにくくなると考えられる. 即ち, tRNA 熟成の過程に支障をきたさ

ないように, 低 GC 含量を保ったまま進化したのではないかと考えられる.

ところで, RNA の二次構造予測ソフトウェア mfold (Zuker, 1989) により, 通常型 tRNA とオルタナティブ型 tRNA の安定化エネルギー (ΔG) を計算したところ, 通常型 tRNA は $\Delta G = -36$ kcal/mol, オルタナティブ型 tRNA は $\Delta G = -35$ kcal/mol と, 両者ともほぼ同じであるという結果になった. しかし, このソフトウェアでは, 通常型 tRNA で初めて可能となる多くの高次の相互作用や, Mg²⁺ イオンの配位による安定化, 非ワトソンクリック型塩基対による安定化など, 多くの要素が無視されている. その為, 二価イオンが存在する溶液中では, 通常型 tRNA の方がエネルギー的に安定である筈である. ただ, ArcTGT がオルタナティブ型 tRNA に結合するには ATP 等のエネルギー源が不要であり, 更に 20°C でも結合できることから, 両者のエネルギー差とその間に存在するエネルギーバリアはそれほど高くないと推測される.

更に, 他の tRNA でも DV ステムを作ることが出来るかどうかを検討した結果, *P. horikoshii*, *E. coli* の

tRNA のうちバリアブル・ループが (本研究で用いた *P. horikoshii* tRNA^{Val}_(UAC) と同じ) 5 残基であるものはすべて同様の DV ステムを組みうるということがわかった。更に, 4 残基タイプのものに関しては, 今回の結晶構造だけでは DV ステムがどのように形成されるかは不明ではあるものの, 少なくともどの tRNA においても 2 残基以上のステム構造を組みうる。一方, 長いバリアブル・アームを持つ Type-II 型 tRNA に関しては, *H. volcanii* の tRNA 解析から, 全てアーケオシンを有することがわかっている (Sprinzl *et al.*, 1998)。その為, 何らかのオルタナティブな高次構造を取る筈ではあるが, 実際どのような構造を取るかを理解する為には Type-II 型 tRNA と ArcTGT 複合体の高次構造解析が必要であろう。tRNA は本来, このようなオルタナティブな高次構造をとるように進化してきたのかもしれない。

5.3.3 C 末端ドメインによるアクセプター・ステムの認識

ArcTGT は, tRNA の中でも, アクセプター・ステム及び D アームの前半と多くの相互作用を形成し厳密に認識している (図 5-7, 55 ページ)。本節では C 末端ドメインによるアクセプター・ステム認識について議論する。

5.3.3.1 ドメイン C3 (PUA ドメイン) による認識

ドメイン C3 の β シート上には塩基性残基が集中しており, 特に Arg573, Lys576, Arg578 が tRNA G69 から C72 の磷酸バックボーンと静電的相互作用している (図 5-9, 56 ページ, パネル A)。更に, tRNA の負に帯電した磷酸バックボーン (3' 側) に対応するように, ドメイン C3 の分子表面には正電荷を帯びた大きなパッチが形成されており, ステム構造を認識してい

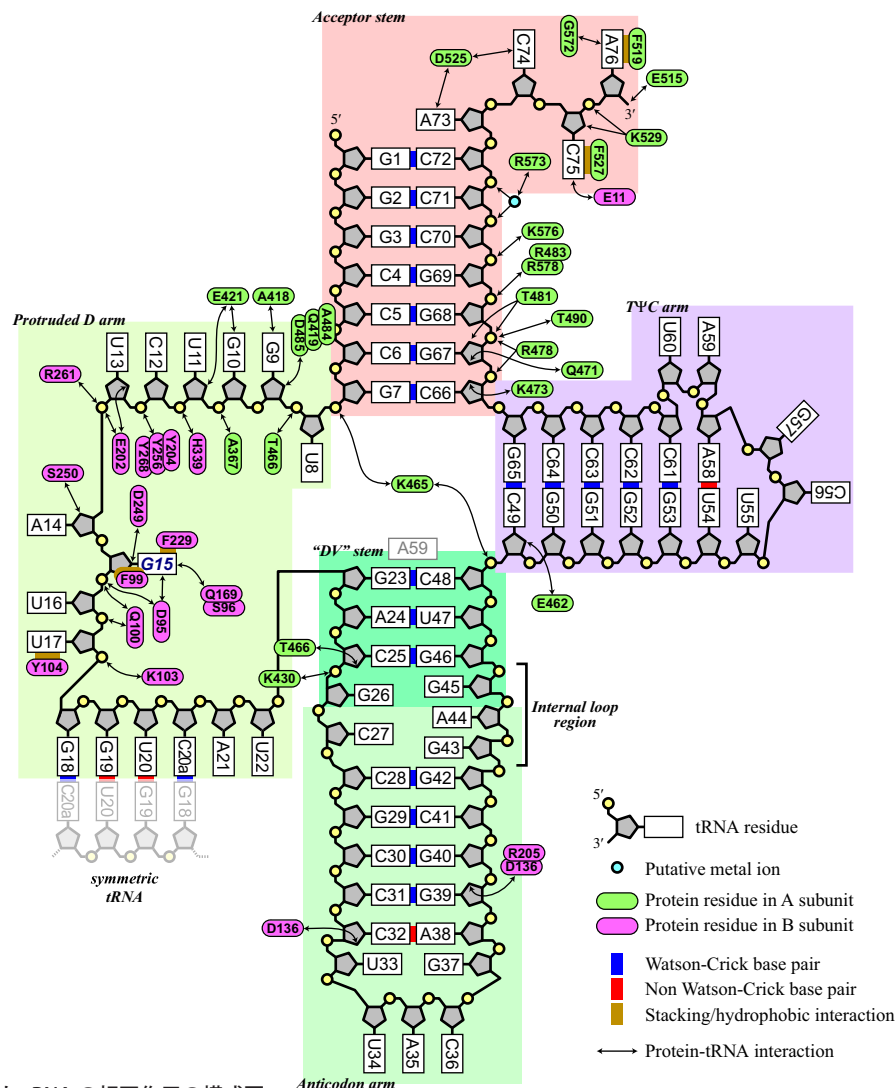


図 5-7 ArcTGT と tRNA の相互作用の模式図

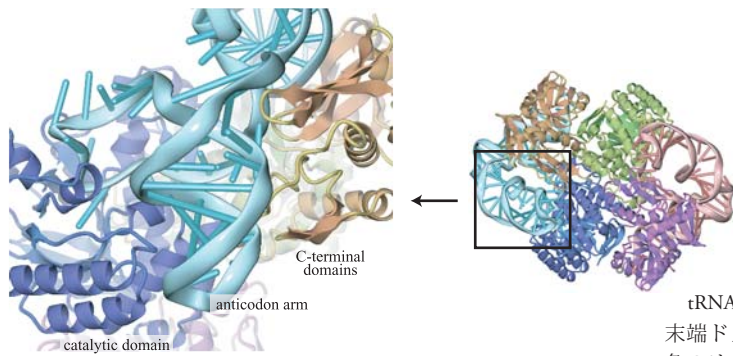


図 5-8 tRNA のアンチコドン・アームと ArcTGT の相互作用

tRNA を水色のリボンモデルで、酵素サブユニット A の C 末端ドメインを茶色、サブユニット B の触媒ドメインを紺色のリボンモデルで示した。

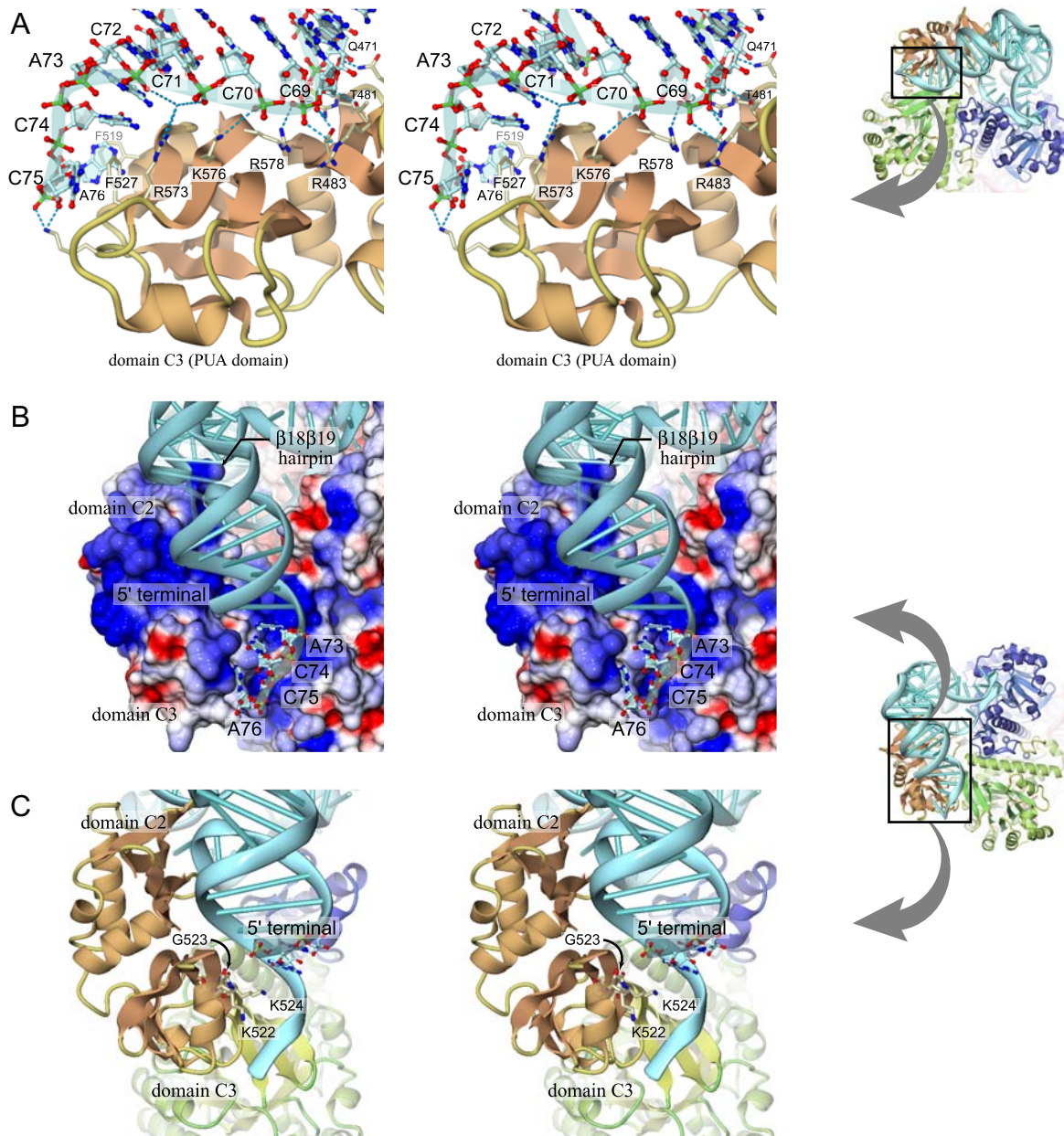


図 5-9 ArcTGT C 末端ドメインによる tRNA アクセプター・ステムの認識

全てステレオ図。(A) ArcTGT のドメイン C3 (PUA ドメイン) とアクセプター・ステムの相互作用。RNA と、相互作用にかかわる蛋白残基をスティックモデルで示した。(B) ArcTGT のドメイン C3, C2 とアクセプター・ステムの相互作用。酵素を表面モデルで示し、表面電荷により赤 (-10 kT/e)、白 (0 kT/e)、青 (10 kT/e) に着色した。tRNA はリボンモデルで示した。また、tRNA の CCA 末端をボールスティックモデルで示した。(C) ArcTGT のドメイン C3, C2 とアクセプター・ステムの相互作用。酵素, tRNA 共にリボンモデルで示した。また、tRNA の 5' 末端の残基と、それと相互作用している酵素側の残基をスティックモデルで示した。

る(図 5-9, パネル B)。一方, 5' 側の主鎖は酵素と逆側に位置しており直接的には認識されていないが, 5' 末端はドメイン C3 のヘリックス $\alpha 23$ の C 末端側と接するように配置されている(図 5-9, パネル C)。即ち, ドメイン C3 の表面は, 電荷だけでなくその形状もアクセプター・ステムの末端にフィットしている(図 5-9, パネル B)。

更に, ArcTGT では, tRNA の CCA 末端がドメイン C3 の縁で認識されている(図 5-10, 57 ページ, パネ

ル A)。具体的には, C75 と Phe527, A76 と Phe519 の芳香環がスタック相互作用している。ドメイン C3 のこれらの残基は ArcTGT の間で保存されている(図 3-6, 32 ページ)。一方で, 生化学的な実験結果からは, ArcTGT の触媒活性には tRNA の CCA 末端は必要でないことがわかっている(Watanabe *et al.*, 2000)。完成前の tRNA には CCA 末端を欠くものが存在し, tRNA 熟成の段階で CCA 付加酵素により付加される為(Aebi *et al.*, 1990), この生化学的な実験の結果はある意味妥

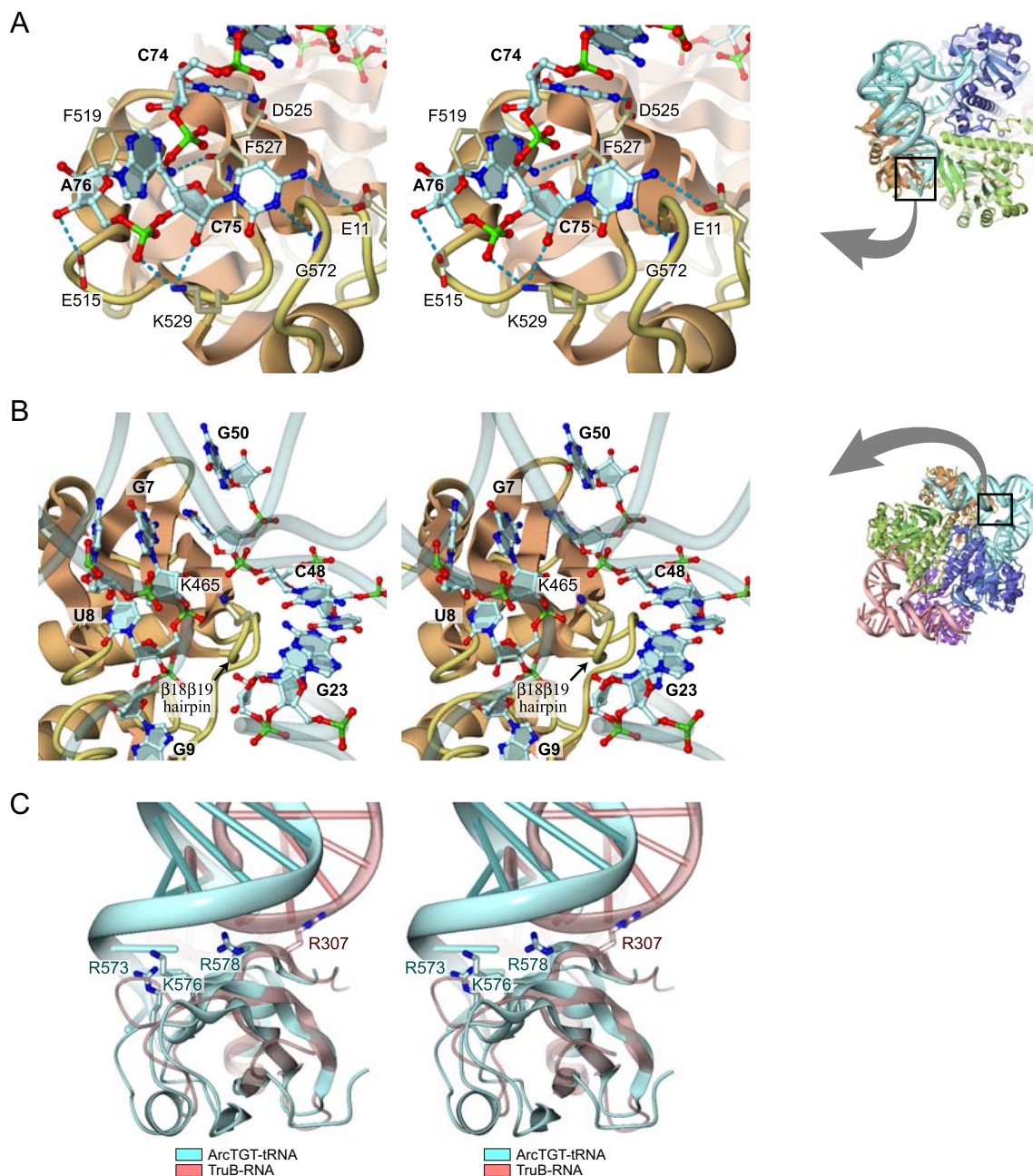


図 5-10 ArcTGT C 末端ドメインによる tRNA 認識 (その 2)

全てステレオ図。(A) ArcTGT のドメイン C3 (PUA ドメイン) による tRNA CCA 末端の認識。(B) ArcTGT のドメイン C2 の $\beta 18\beta 19$ ヘアピンと tRNA の相互作用。(C) ArcTGT のドメイン C3 (PUA ドメイン; 水色) と tRNA アクセプター・ステムの相互作用と, TruB の C 末端ドメイン (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001; ピンク色) とステム RNA の相互作用の比較。両酵素で RNA 認識に関わっている残基をスティックモデルで示した。両者とも主鎖の構造は良く似ているが, RNA 認識様式が大きく異なっている。

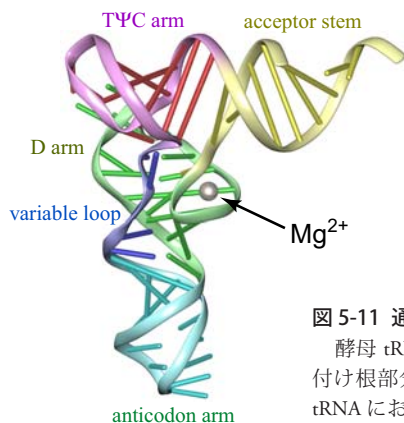


図 5-11 通常型 tRNA の D アームの付け根に配位した Mg^{2+} イオン

酵母 tRNA^{Phe} の結晶構造 (Shi & Moore, 2000) の結晶構造において, D アームの付け根部分に見られる Mg^{2+} イオンを金属球で示した. tRNA^{Phe} に限らず, 他の tRNA においてもこの位置に Mg^{2+} イオンが配位している.

当である. 今回の結晶構造で見られた CCA 末端とドメイン C3 の相互作用は, CCA 末端が他の相互作用の邪魔にならないように, 或いはふらついて分解されてしまわないように止めておく, という役割があるのではないだろうか. 逆に, 5' 末端或いは 3' 末端に一本鎖 RNA が付加したような, 末端のトリミングを受けていない状態の tRNA でも, ArcTGT に結合できると推測される. 即ち, ドメイン C3 と tRNA の相互作用の様式では, 5' 末端側の磷酸周囲は, 酵素のドメイン C3 と逆側の方向は溶媒に面しており (図 5-9, 56 ページ, パネル B), この方向に RNA 鎖が伸びた状態で結合することが出来るだろう. 一方, 3' 末端側も, A76 の塩基はドメイン C3 に結合しているが, リボース, とくに 3'-OH 基は溶媒に面しており (図 5-9, パネル B), この先に RNA 鎖が伸びたとしても立体障害は起こらない. このように, ArcTGT による修飾は, tRNA プロセシングの中で, tRNA の末端のトリミングより前の段階で行われている可能性があると考えられる.

一方, 5' 側或いは 3' 側にお互い相補的な RNA が付加し, アクセプター・ステムが伸びたような状態の tRNA の場合では, 5' 末端側がドメイン C3 のヘリックス $\alpha 23$ の C 末端側と立体障害を起こし, 結合できないと推測される. 実際に, tRNA の 5' 末端を延長してアクセプター・ステムを長くした変異体 (図 5-1, 50 ページ, パネル A) を作成し, 活性測定を行った結果, 45°C では劇的に活性が減少することがわかった (表 5-2, 51 ページ, 1GGU). このように, ドメイン C3 がアクセプター・ステムの末端構造を認識しているということは, ArcTGT が tRNA のアンチコドン・アーム等, 生体内に存在しているステムループ構造を持つ RNA に誤って結合してしまうのを防いでいるのではないだろうか.

5.3.3.2 ドメイン C2 による認識

ドメイン C2 の β シート上の塩基性・親水性残基 (Arg483, Arg478, Gln471, Thr481, Thr490) が tRNA C66 から C69 にかけての磷酸バックボーンを認識しており, ドメイン C2 の表面に塩基性パッチを形成している. この塩基性パッチは C3 上の塩基性パッチと同様に tRNA の磷酸バックボーンに沿うように存在している (図 5-9, 56 ページ, パネル B). 更に, ドメイン C3 と C2 の塩基性パッチは連続しており, ドメイン C3 と C2 は協同的に tRNA のアクセプター・ステムを認識している (図 5-9, パネル B). この協同的な認識が tRNA の G15 を正確に位置づけることを可能にしているのだろう.

更に, $\beta 18\beta 19$ ヘアピンとその先端に位置する Lys465 が, ドメイン C2 の表面から突き出しており (図 5-9, パネル B; 図 5-10, 57 ページ, パネル B), 構造変化した tRNA のコアの部分にめり込んでいる. ArcTGT と通常の L 字型 tRNA を結合させると, 丁度この部分が tRNA のコア構造とぶつかる (特に U8, C49, C25 と $\beta 18\beta 19$ ヘアピンの残基 Thr466, Lys465). 一方で, 構造変化した tRNA を結合している複合体の状態では, Thr466 は C25 の 2'-OH 基と水素結合し, Lys465 は U8, U49 の磷酸と静電的相互作用をしている (図 5-10; 図 5-7, 55 ページ). 即ち, この $\beta 18\beta 19$ ヘアピンが構造変化した tRNA を認識するのに重要であると考えられる. また, ArcTGT の間でこの $\beta 18\beta 19$ と先端の塩基性残基はかなり保存されている (図 3-6, 32 ページ).

一方, $\beta 18\beta 19$ ヘアピンの残基 463 から 466 を削除した変異体 $\Delta(463-466)$ では, かなりの活性の低下が見られた (表 5-2, 51 ページ). $\beta 18\beta 19$ ヘアピンが失われると, 通常の L 字型 tRNA でも ArcTGT に結合できるようになると推測される. その結果, 効率的に D ルー

プを触媒サイトに配置することができなくなり、結果として活性が大きく低下してしまうのだろう。ところで、通常型 tRNA の構造では、L 字型の脇の部分、D アームの付け根に Mg^{2+} イオンが特異的に配位するサイトが存在している (図 5-11, 58 ページ)。ArcTGT が tRNA に結合する際、まずこの Mg^{2+} イオンが $\beta 18\beta 19$ ヘアピン先端の Lys465 側鎖のアミノ基と置き換わり、それが引金となってオルタナティブ型への構造変化が起こるのかもしれない。

5.3.4 高次構造の壊れた D アームの認識

5.3.4.1 D アーム前半 U8 から U13 の認識

既に述べたように、ArcTGT に結合した tRNA の D アームは、通常の L 字型 tRNA のものと比べて、完全に高次構造が壊されていた (図 5-4, 53 ページ)。D ステムの前半 U8 から U13 は一本鎖状態になって酵素に結合している。各残基の塩基はお互いにスタックして溶媒側に向いており、バックボーン側を酵素の方に向けている。その結果、tRNA のこの領域と酵素の相

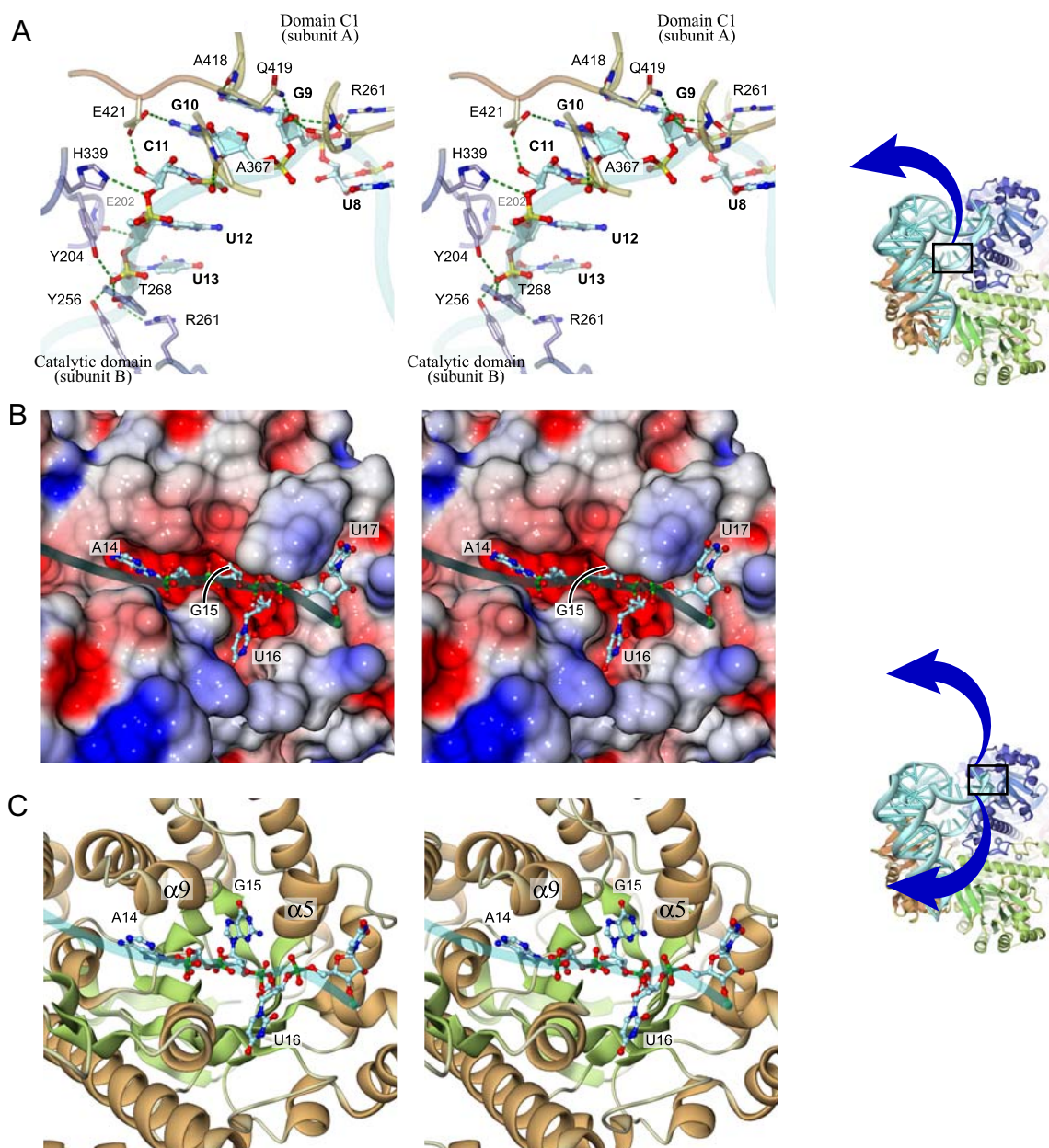


図 5-12 飛び出した D アームの認識

全てステレオ図。(A) 飛び出した D アームの、元 D ステム領域 (8-13 位) の認識。酵素の主鎖を細いチューブで、RNA の主鎖を太いチューブで示した。また、酵素の A サブユニットは黄色で、B サブユニットは紺色で示した。酵素と RNA の相互作用を点線で示した。(B)、(C) D ループ (14, 15, 16 位) 認識。(B) では酵素を表面モデルで、(C) ではリボンモデルで示した。

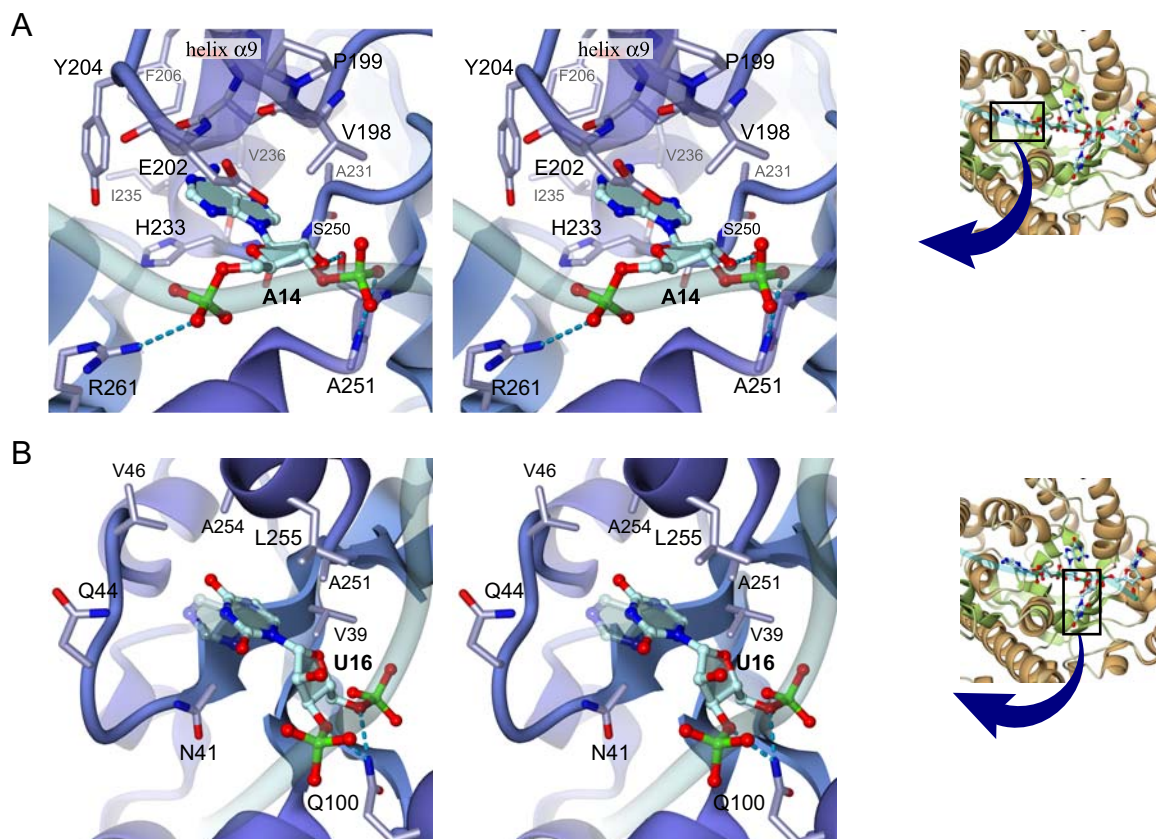


図 5-13 A14 と U16 の認識

全てステレオ図。(A) A14 の認識。(B) U16 の認識。いずれも、酵素の主鎖をリボンモデルで、認識に関わる酵素側の残基をスティックモデルで示した。また、tRNA の主鎖をチューブモデルで、A14、U16 残基をボールスティックモデルで示した。(B) に関しては、16 位にプリン塩基を置いた場合のモデルを、半透明のボールスティックで示した。

相互作用は、酵素側の塩基性・親水性の側鎖と tRNA 側の磷酸とによるものが主体となっている (図 5-12, 59 ページ, パネル A; 図 5-7, 55 ページ)。一方で, G9 と G10 の 2 位のアミノ基が酵素の Ala418, Glu421 とそれぞれ相互作用している (図 5-12, パネル A)。しかし, 2 位 (或いはそれに相当する位置) に置換基を持つ塩基は G のみであり, G 以外の残基が結合した場合でも, 水素結合はできなくなるが, 立体障害や電荷の反撥は起こらないだろう。即ち, この相互作用は, この位置の塩基をグアニンに限定するようなものではなく, 他の塩基でも収容できると推測される。更に, tRNA のこの領域の温度因子が他の部分に比べて低いことから (図 4-8, 46 ページ), 酵素により厳密に認識されていることがわかる。

ところで, ArcTGT は修飾された酵母 tRNA^{Phe} を殆ど基質としないことが報告されている (行木博士私信)。酵母 tRNA^{Phe} は G10 の 2-アミノ基がメチル化されており, 上述の G10 と Glu421 の相互作用が阻害されることが原因として考えられる。また, *H. volcanii* 全 tRNA の配列解析の結果 (Gupta, 1984) によると, G10

のメチル化と G15 のアーケオシン化はある程度相関があるが, 逆に例外も見られる。G10 のメチル化が ArcTGT の負の決定因子となっている可能性が示唆されるが, 更なる検討が必要であろう。

5.3.4.2 G15 とその前後の残基の認識

U8 から U13 の認識では塩基は酵素に殆ど認識されていないが, それに比べて A14, G15, U16 はバックボーンの部分だけでなく, 塩基の側も認識されている。A14 と U16 は, 触媒ドメインのバレル構造の縁にあるポケットに結合しており, 更に G15 はバレル構造の中央にある触媒サイトに結合している (図 5-12, 59 ページ, パネル B, C)。

A14 と U16 を結合しているポケットは, 主に疎水性の側鎖から構成されており, 塩基の特異性はないように見え, (図 5-13, 60 ページ) 他の塩基も結合する可能性が示唆される。特に U16 を結合しているポケットは, ピリミジンだけでなく, プリンも十分に結合できるスペースを持っている (図 5-13, パネル B)。一方で, G15 の塩基は酵素の側鎖と多くの水素結合を形

成しており、厳密に認識されている(図 5-14, 62 ページ, パネル A). 形成されている水素結合のパターンはほぼグアニンとの複合体(3.2.2.2 節, 35 ページ; 図 3-11, 36 ページ)の場合と同じであるが, tRNA との複合体における G15 の認識様式は, 5.3.5 節で後述するように, いくつか重要な違いがある.

5.3.4.3 ArcTGT はいかにして tRNA 15 位を探し当てているか

序論で既に述べたとおり, 過去の生化学的な実験の結果から, ArcTGT は tRNA の塩基配列の情報に頼らずにその 15 位を正確に探し当てることができることが分かっていた. 即ち, 15 位を G 以外の残基に置換し, 更にその前後を G にしても, 誤って前後の残基を交換してしまうことはない. 同様に, G15 より手前に残基を挿入した場合も活性は大幅に低下している. しかし, 逆に G15 より手前の残基(U8 から A14)をさまざまな配列に変えても(長さが変わらない限りは)もとの tRNA とほぼ同程度に認識することができる(表 1-1, 4 ページ; Watanabe *et al.*, 2000). 15 位の G が厳密に認識される機構はグアニンと ArcTGT の複合体の構造から解明されたが, どのようにして 15 位を探し当てているかは全く不明であった.

この ArcTGT の tRNA 認識機構は今回の結晶構造から以下のように説明される. 即ち, 5.3.3 節(555 ページ)から 5.3.4.2 節(60 ページ)にかけて述べたとおり, ArcTGT は tRNA の塩基を殆ど認識せずに各残基のバックボーンの糖・リン酸をひとつずつ認識し 15 位を活性サイトに配置しているのである. まずアクセプター・ステムをドメイン C2 と C3 が厳密に認識することで酵素に対してアクセプター・ステムを正確に配置し(図 5-9, 56 ページ), 次に, ドメイン C2 の $\beta 18\beta 19$ ヘアピンは D アームがコアから飛び出す根元の部分の位置を正確に規定している(図 5-9, パネル B; 図 5-10, 57 ページ, パネル B). 更に, コアから飛び出した D アームの U8 から U13 は酵素のサブユニットにまたがるクレフトの部分で長さが精密に認識されており(図 5-12, 59 ページ, パネル A), 結果として 14 位が触媒ドメインのバレル構造の縁にあるポケットに格納されるようになる.

5.3.4.4 ArcTGT による認識に必要な RNA の最小構造

以上の結果に基づくと, ArcTGT による認識に必要な最小構造は図 5-2 (50 ページ), パネル A のよう

なステム構造に 9 残基以上の一本鎖領域が付加した RNA ということになる. 実際このような RNA を合成し活性測定を行った結果, 野生型 tRNA とほぼ同等の活性を有することが明らかになった(表 5-2, 51 ページ, Microhelix). このように, ArcTGT が認識する最小構造は, 一本鎖 RNA とそれに一部二本鎖領域を持つ RNA であることがわかる.

上述の最小構造は, 正規の折り畳みを持つ tRNA には全く見られない構造である(図 5-5, 53 ページ, パネル B). tRNA がオルタナティブな折り畳みになることで, この最小構造が tRNA の部分構造として現れてくるわけである. 即ち, 上述の DV ステムや新しい tRNA のコア構造は, tRNA が酵素に対してこのような部分構造を提示する為に必要であると考えられる.

ところで, *P. horikoshii* の生育温度(98°C)により近い 70°C では, どの tRNA 変異体においても一律に 60% ほど活性が上昇している. tRNA の折り畳みを維持するようなコンポーネントが全く存在しない *in vitro* のアッセイ条件下では, tRNA は予期しない(例えば一部変性した)高次構造を取っている可能性がある. 上述のように, ArcTGT の認識に必要な最小構造はかなり単純である(表 5-2, 51 ページ, Microhelix). この最小構造を持つように一部変性した tRNA が基質となり, 活性が上がっている可能性が高い. しかし高温では, 変性して一本鎖になった部分は容易に化学的, 或いは酵素的に分解されてしまうだろうし, 好熱菌の細胞内には tRNA の折り畳みを維持するコンポーネントが存在し, 自発的な tRNA の変性を防いでいると考えられる(例えば *Thermus thermophilus* 由来 Trbp111 など; Swairjo *et al.*, 2000). その為, *P. horikoshii* の細胞内において, 未修飾・修飾後 tRNA が単独でかつ変性した状態で存在しているとは考えにくい.

以上のような理由から, 70°C の測定結果より寧ろ 45°C の状態の方が生体内の状態を反映しているのではないだろうか. 更には, 中等度好熱性, 或いは常温古細菌を含め殆ど全ての古細菌に ArcTGT が見出されており, 配列アラインメント上に生育温度に相関した大きな違い(ドメイン構成の違いなど)は見出されない(図 3-5, 31 ページ; 図 3-6, 32 ページ). ArcTGT による tRNA 認識には温度による違いによらない共通の機構が存在すると推測され, それが ArcTGT と tRNA の相互作用や, DV ステムによるオルタナティブな tRNA 高次構造の安定化であると考えられる.

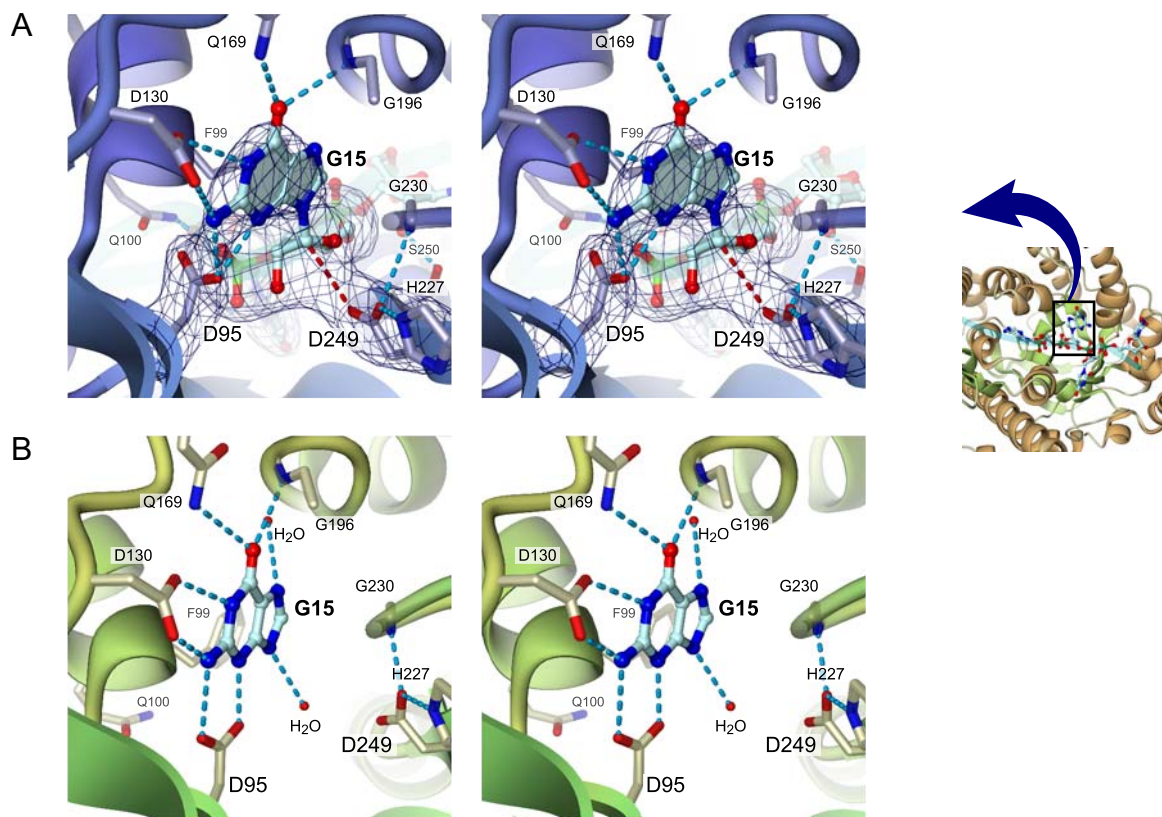


図 5-14 ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造

全てステレオ図。(A) ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造。(B) ArcTGT・グアニン複合体における触媒サイトの構造。酵素の Asp95, Asp249 残基と、tRNA の G15, U16 残基をオミットして計算した $|F_o - |F_c|$ 焼き鈍しオミットマップ (6.5 σ レベルで表示) を暗青色で示した。(A), (B) いずれも、酵素をリボンモデルで、核酸とその認識や触媒に関わっている酵素側の残基をスティックモデルで表示した。

5.3.5 触媒サイトの構造

ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造と G15 残基のグアニン基の認識様式は、3.2.2 節 (35 ページ) で述べた ArcTGT・グアニン複合体の結晶構造の場合と比較して劇的な変化は見られなかったものの、いくつかの重要な違いが見られた。

5.3.5.1 Phe99 の役割

塩基のみを結合した ArcTGT の結晶構造では Phe99 の芳香環は塩基の 5 員環とスタックしていたが (3.2.2.2 節, 35 ページ参照), tRNA との複合体では寧ろ G15 のリボースと相互作用しているように見える (図 6-2, 67 ページ, パネル E)。この Phe99 は ArcTGT, QueTGT で Tyr に保存されている。塩基交換反応の遷移状態では、G15 のリボース基はオキソカルベニウム・カチオンになるが、Phe99 は π -カチオン相互作用によりオキソカルベニウム・カチオンを安定化していると推測される。

5.3.5.2 Asp249 の役割

Asp249 は触媒サイトにみられる酸性残基の一つであり、求核触媒残基の候補のうちの一つであった。しかし、QueTGT 或いは ArcTGT と塩基のみとの複合体の結果からは、基質からかなり離れた位置に存在していた為 (図 5-14, 62 ページ, パネル B), 触媒に関与していないと推測されてきた。ところが、ArcTGT と tRNA の複合体においては、Asp249 のカルボキシル基が G15 のリボース基の C1' にかかなり近い位置 (3.5 Å) に存在している (図 5-14, パネル A)。この違いは、酵素に対して塩基が結合する位置が、塩基のみとの複合体の場合と tRNA との複合体の場合でかなり異なっていることに起因する (図 5-14, パネル A, B)。即ち、リボースやリン酸だけでなく、前後の残基も存在する tRNA との複合体状態では、塩基の位置が塩基のみとの複合体に比べ、Asp249 側に移動しているのである (図 5-14, パネル A)。一方で、従来求核残基であると考えられていた Asp95 は、C1' からかなり外れた (4.3 Å) 位置に存在していた。

以上の結果を踏まえて, Asp249 を Ala, Asn にそれぞれ置換した変異体を作成し活性測定を行ったところ, 両変異体とも全く活性が検出されなかった (表 5-2, 51 ページ). この結果は, Asp249 が Asp95 と同様に, 酸性残基である必要性を示している. また, Asp249 が単に触媒サイトを形作るだけでなく, 反応に直接関

わっているということを強く示唆する結果と言える. ArcTGT と小分子リガンドとの複合体構造解析 (2.2.2 節, 26 ページ) の結果も踏まえた塩基交換反応の機構に関する議論は, 6.1 節 (65 ページ) に詳述した.

□

第6章

総合討論

本章では、ArcTGT・tRNA 複合体の構造だけでなく、ArcTGT と小分子リガンドとの複合体の構造解析の結果も含め、「塩基交換反応の触媒機構」、「tRNA 修飾酵素による tRNA の認識機構」について総合的に議論した。また更に、本研究で解明された tRNA 認識機構が、他の系における酵素による RNA 認識の構造生物学的な基盤となる可能性等についても議論した。

6.1 塩基交換反応の触媒機構

6.1.1 Asp249 の役割

ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造から、G15 の C1' 原子に最も近く位置している酸性残基は、従来求核触媒残基であると考えられていた Asp95 ではなく、Asp249 であった(5.3.5.2 節, 102 ページ参照)。しかしながら、ArcTGT・tRNA 複合体の結晶構造は分解能が中程度であり、距離情報の信頼性が低いという問題点がある。

ところで、Asp や Glu 残基が求核触媒として働き、かつ、酵素と糖が共有結合した中間体をへてグリコシド結合が切断されるという反応は、他の酵素にもいくつか見られる。DNA 修復にかかわる DNA *N*-グリコシラーゼは、損傷を受けた DNA 残基の *N*-グリコシド結合を切断し、abase サイトを作り出す反応を触媒する (Cunningham, 1997 ; Krokan *et al.*, 1997)。 *E. coli* 由来 AlkA DNA グリコシラーゼはアルキル化された塩基を除去する DNA 修復酵素で、DNA との複合体が高分解能で解明されており、その結果から求核触媒残基 Asp による S_N1 的な反応機構が提唱されている (Hollis *et al.*, 2000)。 *E. coli* AlkA・DNA 複合体の構造と ArcTGT・tRNA 複合体の構造を標的残基のリボースの配置を元に重ね合わせると、AlkA の求核残基 Asp238 は ArcTGT の Asp95 よりも寧ろ、Asp249 とよく一致する (図 6-1, 116 ページ, パネル A, B)。また、

ArcTGT の Asp249 は His227 や Gly230 の主鎖のアミノ基と水素結合しているが、AlkA の求核残基 (Asp) も周囲の Trp272 残基の $N^{\delta 1}$ と水素結合しており、置かれている環境が類似している (図 6-1, パネル B)。この AlkA・DNA 複合体における求核触媒と C1' 相当原子の距離は 3.2 Å であった。今回の結晶構造でも Asp239 の $O^{\delta 1}$ から G15 の C1' の距離は上述のように 3.5 Å 程度である。即ち、他の系との共通性からも、ArcTGT において Asp249 が求核触媒として働いているという仮説が支持されるのである。

ただ、反応機構に関する Romier らの主張 (Romier *et al.*, 1996b) に問題点があったように、結晶構造と単純な変異体の活性測定のみから結果を結論付けることは危険である。TGT においてどの残基が求核触媒に関わっているかどうかを解明するには、TGT と tRNA が共有結合した中間体を質量分析等で解析し、実際にどの残基が共有結合を形成しているかを解明する必要があるだろう。

6.1.2 Asp95 の役割

従来求核触媒残基であると言われてきた Asp95 (*Z. mobilis* QueTGT では Asp102) も、その Ala や Asn への置換体は全く活性を失う。その為、Asp95 も触媒機構において何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。

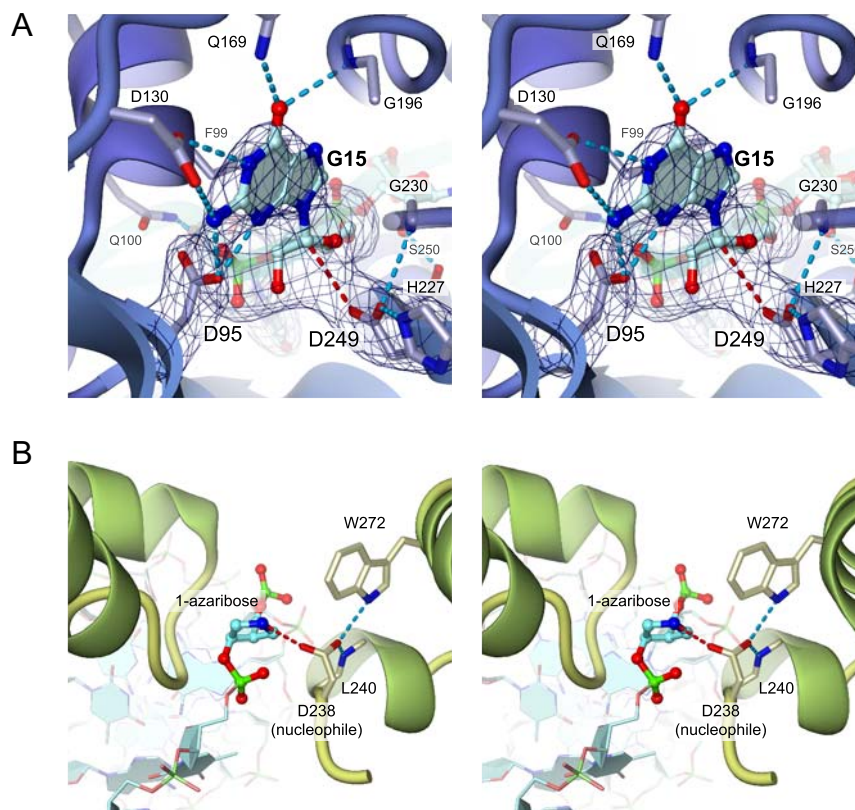


図 6-1 ArcTGT・tRNA 複合体と DNA 修復酵素 AikA・DNA 複合体構造の触媒サイトの比較

全てステレオ図。(A) ArcTGT・tRNA 複合体における触媒サイトの構造。図 5-14 (114 ページ)、パネル A と同じものを比較の為再掲した。(B) DNA 修復酵素 AikA・DNA 複合体 (Hollis *et al.*, 2000) の触媒サイトの構造。(A), (B) いずれも、酵素をリボンモデルで、核酸とその認識や触媒に関わっている酵素側の残基をスティックモデルで表示した。

リガンド・フリーの ArcTGT, 4 種類のリガンドとの複合体の構造を比較すると, Asp95 の側鎖が以下の 2 種類のコンフォメーションを取りうるということがわかる (tRNA との複合体も敢て比較すれば, (1) の分類に入る):

1. 側鎖が塩基のほうを向いたコンフォメーション。グアニン, preQ₀, (図 3-9, 67 ページ, パネル B, C) との複合体, 或いはグアノシンとの複合体 (図 6-2, 118 ページ, パネル C)
2. 側鎖が Asn63・Gln100 とそれらに水素結合した水分子の側を向いたコンフォメーション。リガンド・フリー, デオキシグアノシン類似体 (図 6-2, パネル A, B)。QueTGT・preQ_i 複合体の構造 (図 6-2, パネル D) もこれに近い。

すでに述べたように, 塩基の 3 位と Asp95 の O^{δ2} 両者が脱プロトン化した通常の状態では, Asp95 は両者の電荷の反撥により (1) のコンフォメーションを取りにくいと考えられる。塩基の 3 位と Asp95 の O^{δ2} の間にはプロトンが介在し, 水素結合を形成している可能性が高い。そう仮定すると, 通常の pH 環境下におけ

るグアニンの互変異性体では N3 は脱プロトン化している為, このプロトンは Asp95 によりもたらされた可能性が高い。N3 のプロトン化により, 基質ポケットに結合した状態の塩基にどのような変化が生じるかは未知であるが, 塩基に正電荷を付与することは確かである。この正電荷が塩基の 9 位の電荷状態に影響する (正に分極する) 可能性があると仮定すると, Asp95 による塩基のプロトン化が原因で N-グリコシド結合が切断されることになる。(N9 が正に分極すると, その電荷が N-グリコシド結合を通してリボースの O4' に転移しやすくなり, 結果として N-グリコシド結合が切断されてオキソカルベニウム・カチオンが生じる。図 6-3, 120 ページ参照。)

3.2.2.4 節 (57 ページ) で述べた, グアノシンとの複合体の構造 (図 3-12, 70 ページ, パネル A) においては, 上述のような変化が起こった結果として N-グリコシド結合が切断され, リボースが脱離した状態になっていると考えることができる。一方, デオキシグアノシン類似体との複合体では, Asp95 の側鎖は 2 のコンフォメーションを取っているが (図 6-2, パネル B), これ

は、何らかの理由で塩基の N3 と Asp95 の O² が水素結合を形成できないと考えられる。リボースの O4' が炭素に変わることによって間接的に塩基の互変異性が影響を受け、例えば N3 がプロトン化された状態が安定化されたとすると、プロトン化された Asp95 の O² は N3 と反撥し、(1) のコンフォメーションを取れなくなるだろう。(逆に塩基の N3 も、Asp95 の O² も、ともに脱プロトン化していても電荷の反撥により同じ結果になりうる。しかし、グアノシンとの複合体とデオキシグアノシン類似体との複合体で、異なっているのは

リガンドのほうであり、リガンド側の違いに起因してプロトン化していると考えた。)

ところで、Asp のカルボキシル基は通常の pH 下では電離していると考えられる。上述の議論のように、Asp95 が基質のない状態でもプロトン化しているには、周囲にその状態を安定化するような環境が必要である。(2) のコンフォメーション(例えばリガンド・フリー ArcTGT の構造)では Asp95 は水分子を介して Asn63 と水素結合している。この相互作用がプロトンの供給源になる可能性がある。

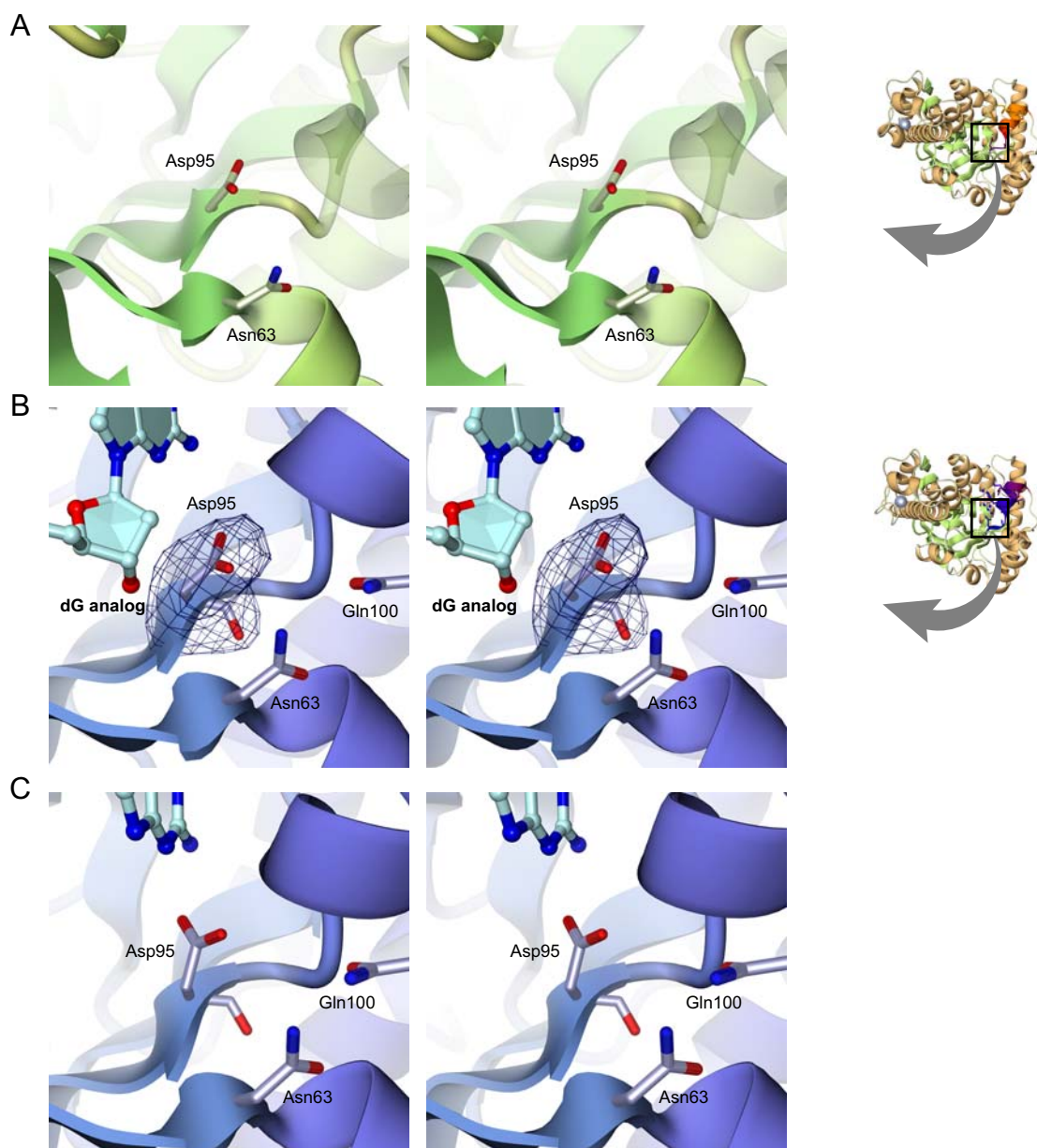
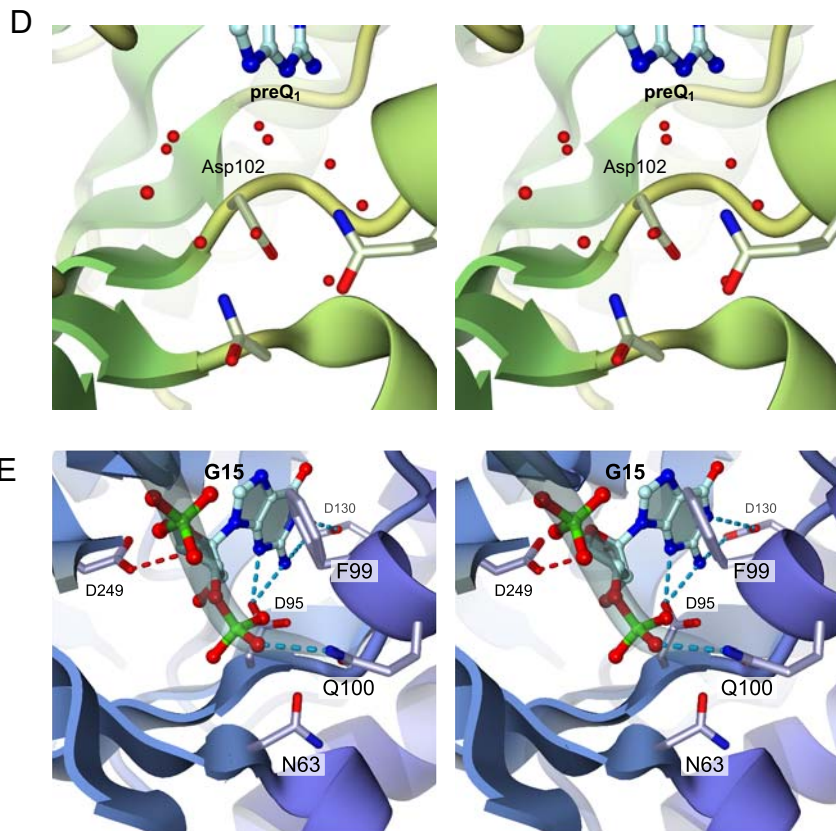


図 6-2 Asp95 の向きと比較

全てステレオ図。(A) リガンド・フリー、(B) グアノシン、(C) デオキシグアノシン類似体における、Asp95 (或いは相当残基) の配座を同じ向きから示した。(C) に関しては、Asp95 をオミットした $|F_o - |F_c|$ 焼き鈍しオミットマップ (4σ レベル) を暗青色で示した。(68 ページに続く)



(67 ページから続く)
 (D) QueTGT · preQ₁ 複合体, (E) ArcTGT · tRNA 複合体における, Asp95 (或いは相当残基) の配座を同じ向きから示した (ステレオ図).

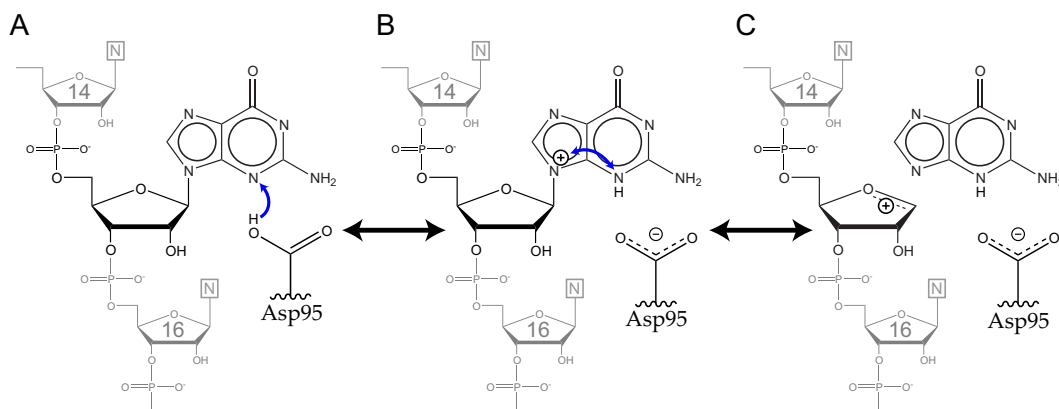


図 6-3 塩基交換反応・第一段階目の反応機構

塩基交換反応の第一段階目の求核置換反応で起こっていると考えられる電子移動の模式図。(A) まず触媒サイトに結合したグアノシンの N3 が酸触媒として働く Asp95 によりプロトン化される。(B) 正電荷は塩基の共役した π 電子により非局在化する。正電荷は、塩基と周囲の残基 (Asp130, Gln169, Gly196 等) との相互作用により、N9 位付近に非局在化するように制約されている可能性がある。(C) 更に正電荷がリボース上に転移すると N グリコシド結合が切れ、オキソカルベニウムイオンが生じる。このカチオンが Asp249 により攻撃されると反応が次の段階に進むが、逆に、正電荷が塩基の方に戻れば、反応は振り出しにもどることになる。

ただ、この「Asp95 が酸触媒として働き N-グリコシド結合の開裂を促進している」という仮説は、プロトンを観察することが出来る構造解析の手法 (NMR や中性子線回折) を用いて実証する必要があるだろう。更には、Asp95 変異体 ArcTGT とグアノシンとの複合体の結晶構造においてリボースが見出されるか等の検

証も必要であろう。一方で、Asp95 とそれに相当する QueTGT の変異体解析では、この残基が酸性残基であることが重要であると報告されているが (Kittendorf *et al.*, 2001), これは上述の仮説を支持するものであるといえる。

6.2 ArcTGT による tRNA 認識と他の酵素・RNA 相互作用の比較

6.2.1 QueTGT による tRNA 認識との比較

序論 8 ページでも述べたように、QueTGT は tRNA のアンチコドン・ループの 34 位にキューオシンを導入する反応に関わっている酵素である。QueTGT による tRNA 認識は詳細に研究されており、その反応には tRNA のアンチコドン・アームだけで十分であることが分かっている (Curnow & Garcia, 1995)。また、QueTGT は 34 位とその前後の残基、即ち U33-G34-U35 を配列依存的に認識している (Nakanishi *et al.*, 1994)。このように ArcTGT と QueTGT の tRNA 認識は全く対照的なものであるが、いくつか共通点が見出された。

即ち、5.3.4.2 節 (98 ページ) で述べたように、ArcTGT・tRNA 複合体の構造では、触媒ドメインのパレル構造のふちにあるポケットで A14, U16 が認識されていた。ArcTGT と QueTGT の分子表面を比較すると、この塩基結合ポケットは QueTGT にも保存されていることがわかる (図 6-4, 121 ページ)。上述のように QueTGT は tRNA の修飾標的の前後の残基 U33, U35 残基の塩基を特異的に認識するが、*Z. mobilis* QueTGT の結晶構造解析の結果から、Romier らは QueTGT と tRNA とのドッキングモデルを作成し、このポケットで前後の残基を結合すると予測していた (Romier *et al.*, 1996a)。更に、前後の U 残基を特異的に認識するのに重要であろう残基も推定されていた (Romier *et al.*, 1996a)。QueTGT の前後の U33, U35 残基を特異的に認識していると推定される残基 (*Z. mobilis* QueTGT の K52, K264, D267 等) は ArcTGT のポケットでは疎水性或いは小さな側鎖に置換している。その結果として ArcTGT のパレルのふちのポケットは 5.3.4.2 節 (98

ページ) で述べたとおり、塩基特異性がないものになっていると考えられる。

6.2.2 SnoRNP 複合体による基質 RNA 認識との対比

真核生物の rRNA, snRNA には非常に多くの修飾が含まれており (Gu *et al.*, 1996; Maden, 1990), これらの修飾は snoRNP により行われている (Kiss, 2001)。snoRNP 複合体の RNA 構成要素 snoRNA は、修飾される rRNA, snRNA 標的サイト付近と相補的な配列を持っている (図 6-5, 122 ページ)。snoRNA はこれらの基質 RNA と二重鎖を形成することで修飾サイトを決定するガイドとして働いている。即ち、snoRNA はこの相補領域の 3' 側下流に特徴的な保存配列を持ち、snoRNP の蛋白コンポーネントはこの保存配列を特異的に認識しつつ、この保存配列から標的サイトまでの距離と、ガイド・基質で形成された二重鎖を認識して修飾するサイトを決定していると言われている (Kiss, 2001, 2002)。例えば、rRNA と snRNA の Ψ 化にかかわる box H/ACA snoRNA は、H 或いは ACA box と呼ばれる保存配列と、その上流に修飾標的サイトと相補的な配列を持っている。標的サイトと H/ACA box の間は 14-16 残基と決まっており、snoRNP の蛋白質コンポーネントが両者を認識して RNA の Ψ 化を行っている (Bortolin *et al.*, 1999; Ganot *et al.*, 1997a; Ganot *et al.*, 1997b; Ni *et al.*, 1997; 図 6-5)。また、rRNA と snRNA の 2'-O-メチル化にかかわる box C/D snoRNA も、同様に、C 或いは D box と呼ばれる保存配列とその上流に修飾標的サイトと相補的な配列を持っており、これらの保存配列と標的 RNA との相補部分により修飾サイト

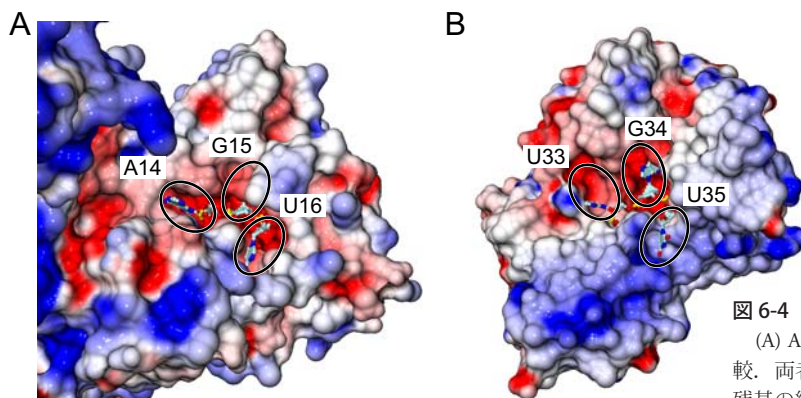


図 6-4 ArcTGT, QueTGT の RNA 結合ポケットの比較
(A) ArcTGT, (B) QueTGT の RNA 結合ポケットの比較。両者とも酵素は表面モデルで示した。また、RNA 残基の結合ポケットを円で示した。

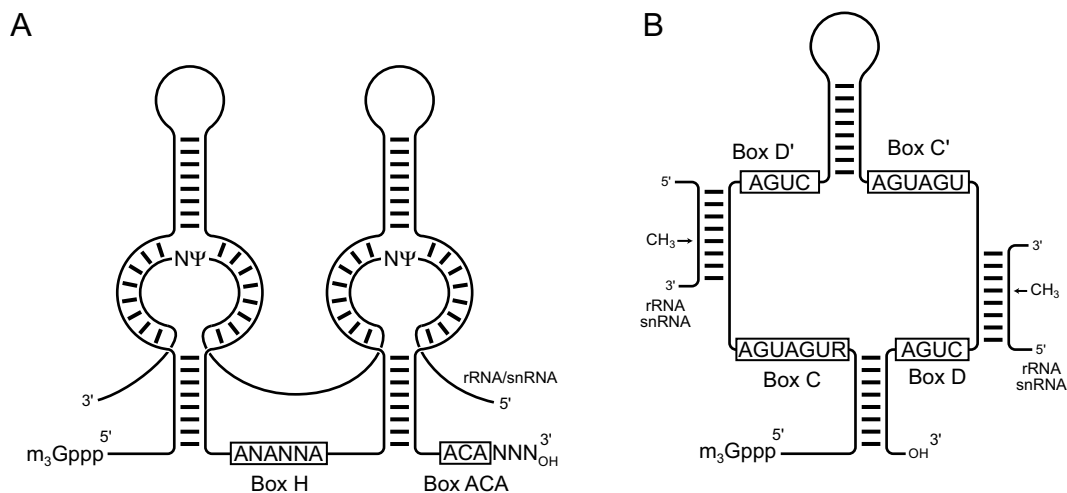


図 6-5 SnoRNA による基質 RNA 認識

(A) Box H/ACA snoRNA と rRNA 或いは snRNA との複合体の模式図。シュドウリジン化されるサイトを Ψ で示した。(B) Box CD snoRNA と rRNA 或いは snRNA との複合体の模式図。メチル化されるサイトを CH_3 で示した。

が決定されている (Cavaille *et al.*, 1996; Kiss-Laszlo *et al.*, 1996; Tycowski *et al.*, 1996; 図 6-5)。

このように、ArcTGT による tRNA 認識と snoRNP 複合体による基質 RNA 認識には「位置特異的な RNA 認識」という点において関連性が多い。ArcTGT は tRNA アクセプター・ステムの末端から 15 残基目 (途中で二重鎖部分を含む) の G を配列に依存せずに認識しているが、上記の box H/ACA snoRNP も、H/ACA box から 14-16 残基目 (途中で二重鎖部分を含む) を認識し、 Ψ を導入している。更に、この box H/ACA snoRNP の触媒コンポーネントである Cbf5p は C 末端に PUA ドメインを持っている。

ArcTGT のドメイン C3 は、序論で既に述べたように「PUA ドメイン」(Aravind & Koonin, 1999) と相同性がある。特に ArcTGT のドメイン C3 は、この Cbf5p の PUA ドメインと相同性が高い (図 3-6, 65 ページ)。ArcTGT でステム認識に関わっている上述の残基 (Lys576, Arg578) は Cbf5p においても保存されており、これらの残基が Cbf5p でも RNA ステムの認識に関わっている可能性がある。ArcTGT と Cbf5p の PUA ドメインは、「位置特異的な RNA 認識」において、RNA のステムを正確に認識して配置する、という共通の役割を担っている可能性がある。即ち、Cbf5p と snoRNP の他の構成要素は、H/ACA box を配列特異的に認識し、その部分から RNA バックボーンの磷酸を 1 残基ずつ数えるように認識しつつ、ArcTGT の場合と同様に rRNA/snRNA とガイド RNA により形成されるステム構造を PUA ドメインにより正確に認識し、

ターゲットとなる U 残基を正確に結合しているのではないだろうか。

ところで、序論 9 ページでも述べた、先天性角化異常症の家系において最も頻繁に見つかっている変異 A353V は、PUA ドメインの RNA 相互作用に関わっている面とは逆側に位置していた。その為、dyskerin の PUA ドメインが ArcTGT の PUA ドメインと同じ様式で RNA 認識に関わっていると仮定すると、この変異は RNA 認識を阻害するものではないと推測される。SnoRNP には Cbf5p/dyskerin 以外の蛋白質コンポーネントが数種類存在しており、A353 は蛋白・蛋白間の疎水的相互作用に関わっている可能性が考えられる。

6.2.3 構造変化による修飾導入は RNA 以外の系にありうるか？

生体高分子の化学修飾は、RNA のみならず、蛋白質にも数多く見出されている。特に、チロシン、セリンの磷酸化や塩基性残基のアセチル化、メチル化は、生体内で重要な役割を果たしている。しかし、これらはいずれも分子認識にかかわっているものであり (磷酸化は細胞内シグナル伝達系に良く見出され、アセチル化はヒストン蛋白質等に良く見出されている)、修飾サイトは分子表面に露出している。

一方で、構造安定化にかかわっている蛋白質の修飾は、コラーゲンのヒドロキシプロリンが挙げられる。コラーゲンは 3 本のポリペプチド鎖がより合わさった三重らせん (プロコラーゲン) を形成し、更にその三重らせんが複数会合して繊維を形成している。この三重らせん同士の相互作用にヒドロキシプロリンの水酸

基が重要であり、この修飾が正常に行われないと出血性の傷害が各器官に起こる「壊血病」になることは有名である。ただ、この修飾サイトは三重らせん繊維という単純な構造の表面に露出している為、コラーゲンの修飾には構造変化は不要である。

現時点では、RNA 以外の系において、大きな構造変化を伴って構造安定化する修飾が導入される例を挙げることが出来ないが、今後見つかる可能性は十分にあると考えられる。

6.3 オルタナティブ型 tRNA の意義

6.3.1 tRNA 修飾酵素の超分子複合体 “modificosome”

本研究で解明した ArcTGT・tRNA 複合体の結晶構造から、tRNA コアに埋もれた 15 位の修飾は、二次構造・高次構造を組替えたオルタナティブ型 tRNA を認識して行われていることがわかった。15 位の修飾は古細菌に特有のものであるが、tRNA コアには他に、 s^4U8 , m^1G9 , m^2G10 , $\Psi13$, m^1A22 , m^2G26 , m^7G46 , m^cC48 等、普遍的に存在する修飾を含め、数多くの修飾が存在している (Sprinzl *et al.*, 1998; 図 1-4, 4 ページ)。これらの修飾も、このようなオルタナティブ型の tRNA を認識して行われている可能性があると考えられる。

一方で、このような tRNA の大きな構造変化の繰り返しは、tRNA の熟成過程において大きな律速段階になると推測される (*P. horikoshii* ArcTGT の k_{cat} は 0.082 s^{-1} 程度である; Watanabe *et al.*, 2000)。更に、それぞれの tRNA コアを修飾する酵素が、個別に構造変化を起こした tRNA を認識していたのでは非常に効率が悪いだろう。また、構造変化の途中段階では、露出したコアがヌクレアーゼ等により分解されてしまう危険や、他の分子と誤った相互作用を起こし不可逆的な変性を起こしてしまう危険性も伴う。真核生物の rRNA や snRNA の熟成は、“processosome” と呼ばれる超分子複合体で行われているということが提唱されているが (Eichler & Craig, 1994)、tRNA の場合も、修飾酵素が細

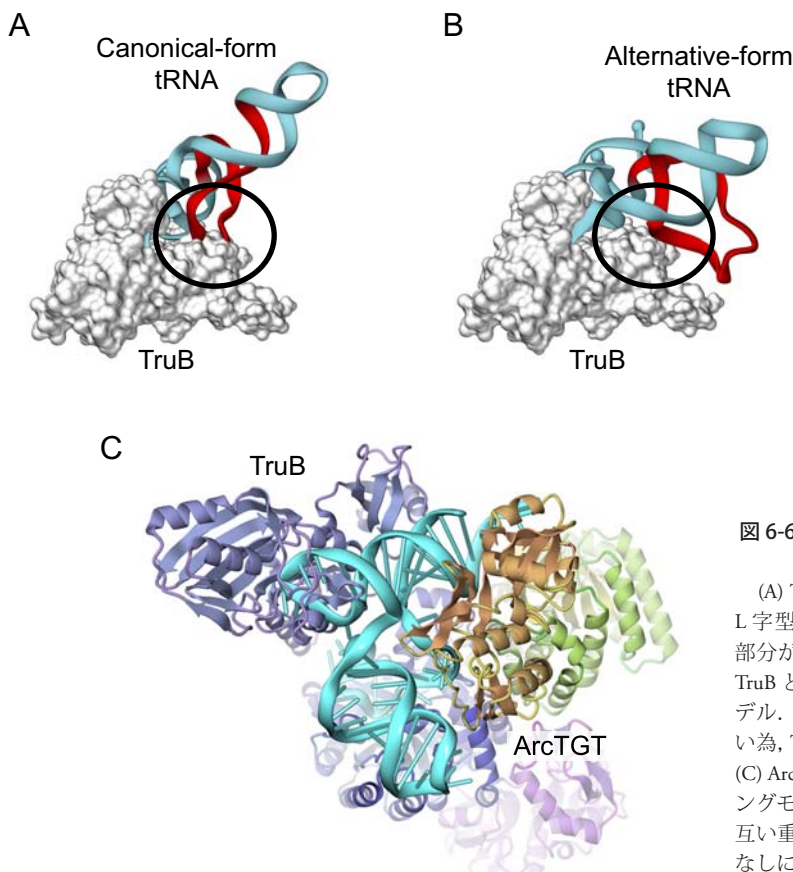


図 6-6 TruB によるオルタナティブ型 tRNA 認識の可能性

(A) TruB (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001) と正規の L 字型 tRNA とのドッキングモデル。D ループの部分が酵素にめり込んでしまうことがわかる。(B) TruB とオルタナティブ型 tRNA とのドッキングモデル。D ループは T Ψ C ループと相互作用していない為、TruB は立体障害なしに、tRNA に結合できる。(C) ArcTGT・tRNA 複合体に TruB が結合したドッキングモデル。ArcTGT と TruB の tRNA 認識領域は互い重ならない為、ArcTGT と TruB はぶつかることなくオルタナティブ型 tRNA に結合できる。

胞内で局在化して弱い超分子複合体を形成し、構造変化を起こした tRNA に一度に修飾を導入するような機構が存在するのではないだろうか。

6.3.2 Ψ 55 修飾酵素 TruB との比較

近年、tRNA 修飾酵素の一つである Ψ 55 合成酵素 TruB とステム・ループ RNA 複合体の結晶構造が解明された。その結果によると、TruB は T Ψ C ループに酵素の His43 とその前後の残基を挿入し U55 をフリップさせて触媒サイトに結合させていた (Hoang & Ferré-D'Amaré, 2001)。正規の tRNA においては、この His43 が存在する位置には、U55 と塩基対を形成している G18 が存在している。実際、TruB と正規の L 字型 tRNA のドッキングモデルを作成すると、D ループ側が TruB に大きくめり込んでしまうことがわかる (図 6-6, 126 ページ, パネル A)。ところで、ArcTGT に結合した状態のオルタナティブ型 tRNA では、D ループが tRNA から飛び出し、T Ψ C ループとの相互作用を完全に失っていた (図 5-4, 106 ページ, パネル A)。その為、TruB は D ループ側と全く衝突することなしにオルタナティブ型 tRNA と結合できる (図 6-6, パネル B)。

更に、ArcTGT と TruB は、このオルタナティブ型 tRNA に全くぶつかることなく同時に結合できる (図 6-6, パネル C)。ArcTGT は古細菌の酵素であるが、古細菌 tRNA にも Ψ 55 が存在する為、TruB の相同分子種は存在している筈である (*P. horikoshii* ゲノム上にも TruB と推定される ORF が存在する)。もちろん TruB 自体、*in vitro* で他のコンポーネントなしに tRNA を修飾できるが (Nurse *et al.*, 1995)、*in vivo* において、他の修飾酵素と共同し、より効率的に tRNA を修飾している可能性があるだろう。上述のような tRNA 修飾酵素の超分子複合体中で、この図のような状態がスナップショットとして存在しているのではないだろうか。

6.3.3 RNA シャペロンとしての ArcTGT

RNA 修飾酵素は、修飾を導入するだけでなく、RNA の折り畳みを助けるシャペロンとして働いている可能性が示唆されている (Gutgsell *et al.*, 2000; Ofengand, 2002)。即ち、修飾酵素は RNA に修飾を導入することで RNA の折りたたみの道筋に「しるし」を付け、誤って RNA が折りたたみの道筋を逆行したり、変性した状態に陥ったりしないようにする役割があると推測されている。

本研究の結果から、ArcTGT は主に tRNA のアクセプター・ステムと引き伸ばされた D アームを認識していることが明らかになったが、tRNA の D アームは他の部分と比べて誤ったコンフォメーションを取りやすく、誤った二量体化などに関与していることが示唆されている (Kholod *et al.*, 1998b)。更に、このような二量体化した tRNA が、アミノアシル tRNA 合成酵素の基質になりにくいことも報告されている (Kholod *et al.*, 1998a)。また、ミトコンドリア tRNA の遺伝子の変異が原因とされているある種のミトコンドリア病においては、D ループ上の残基の変異により tRNA の二量体化が促進されることと病気の関連が指摘されている (Wittenhagen & Kelley, 2002)。実際、*P. horikoshii* tRNA^{Val} の T7 転写産物も、非変性 PAGE の結果から、かなり割合で二量体化していると推測された (図 4-2, 81 ページ)。更に、この転写産物に ArcTGT を添加すると、二量体化していると推測されるバンドは完全に消失した (図 4-2)。ArcTGT は本来 D アームどうしで纏れやすい tRNA の D アームを引き伸ばして結合し、正常にコアを形成させるシャペロンとして働いていると推測される。更には、ArcTGT を含むほかの修飾酵素も、6.3.1 節 (125 ページ) で述べたような超分子複合体を形成して、順序だてて tRNA に修飾を導入しつつ、折り畳みを進行させている可能性がある。

6.4 オルタナティブ型 tRNA とミトコンドリア tRNA の対比

ミトコンドリアには、通常の tRNA とはかなり異なった二次構造をとると推測される tRNA が数多く知られており、中には完全に D アームを欠失しているものも存在する (Okimoto & Wolstenholme, 1990; Watanabe *et al.*, 1994; Wolstenholme *et al.*, 1987; Wolstenholme *et al.*, 1994). 正規の L 字型 tRNA の構造を元にしたモデリングから、D アームを欠失したミトコンドリア tRNA でも L 字型の構造を取りうることを推測されている (Steinberg *et al.*, 1994). また、D アームの大部分を欠失した *Ascaris suum* mt-tRNA^{Ser}_(UCU) の NMR 法による構造解析の結果からは、短くなった D アームとバリアブル・ループがステム構造を形成し、アンチコドンステムの上方にスタックしていることが判明している (Ohtsuki *et al.*, 2002; 図 6-7, 128 ページ). これらの研究結果から推定されるミトコンドリア tRNA の高次構造は、本研究で明らかになったオルタナティブ型 tRNA の高次構造と共通点が多い. 特に、オルタナティブ型 tRNA で見られた DV ステムを中心としたコア構造は、上記のミトコンドリア tRNA のコア構造と非常に類似している (図 6-7).

一方で、大幅に D アームを欠いた *A. suum* mt-tRNA^{Ser} と正規の tRNA の中間状態のような 2 次構造を持つミトコンドリア tRNA も存在する. 例えば、*Xenopus laevis* mt-tRNA^{Asn}_(GUU) (Roe *et al.*, 1985) は正規の tRNA とほぼ同じ長さの D アームを有するが、D ステ

ムの配列がワトソンクリック塩基対を組めないようになっている (図 6-7). これらの、D ステムが形成できない、或いは D アームを欠失したミトコンドリア tRNA は、以下のようなステップを経て、オルタナティブ型の tRNA から進化したのではないだろうか.

1. D ステムに変異が入り、D ステムが組めなくなった tRNA は、必然的に (正規の L 字型よりは) オルタナティブな L 字型構造をとりやすくなる. オルタナティブ型 tRNA は正規の L 字型 tRNA とアクセプター、アンチコドンの配置が類似している為、翻訳マシナリー中で (効率は落ちるかもしれないが) 正常に働くことが出来ると思われる (*X. laevis* mt-tRNA^{Asn} はこの段階に相当).
2. ステム・ループ構造が取れない D アームに欠失変異が起こり、短くなったとしても、オルタナティブ型構造の tRNA は L 字型構造を取ることが出来る (*A. suum* mt-tRNA^{Ser} はこの段階に相当).

このようにしてミトコンドリアの tRNA は、翻訳マシナリー中で機能できるという最小限の要求を満たしつつ、出来るだけ短い tRNA へと進化した可能性が考えられる.

□

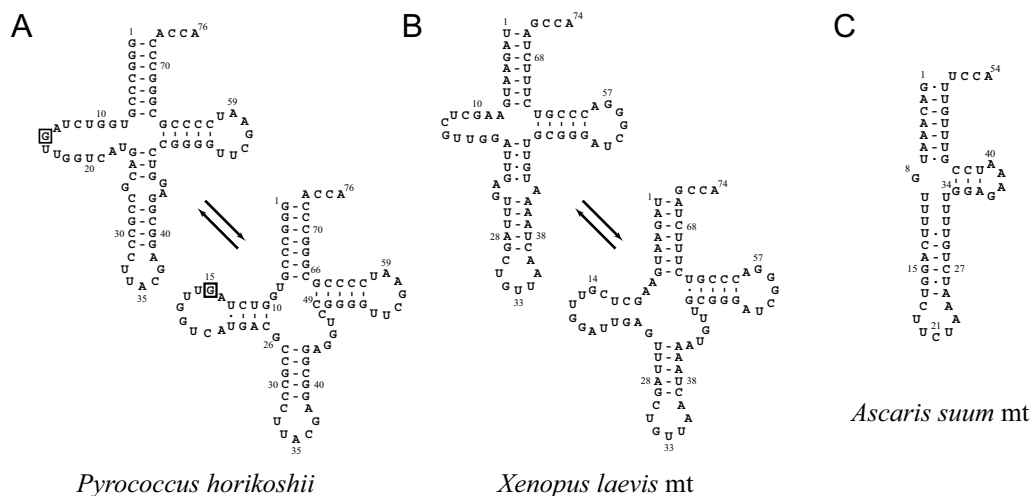


図 6-7 オルタナティブ型 tRNA とミトコンドリア tRNA の構造

(A) 通常の tRNA, (B) *X. laevis* ミトコンドリア tRNA^{Asn}_(GUU), (C) *A. suum* mt-tRNA^{Ser}_(UCU), それぞれの二次構造模式図. (A) と (B) に関しては、オルタナティブ型の状態の二次構造も示した.

Appendix. A 記号・略号及び備考

A.1 アミノ酸の略号

略号	英語表記	日本語表記
A, Ala	alanine	アラニン
C, Cys	cysteine	システイン
D, Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
E, Glu	glutamic acid	グルタミン酸
F, Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
G, Gly	glycine	グリシン
H, His	histidine	ヒスチジン
I, Ile	isoleucine	イソロイシン
K, Lys	lysine	リジン
L, Leu	leucine	ロイシン
M, Met	methionine	メチオニン
N, Asn	asparagine	アスパラギン
P, Pro	proline	プロリン
Q, Gln	glutamine	グルタミン
R, Arg	arginine	アルギニン
S, Ser	serine	セリン
T, Thr	threonine	スレオニン
V, Val	valine	バリン
W, Trp	tryptophan	トリプトファン
Y, Tyr	tyrosine	チロシン

A.2 核酸の略号

略号	英語表記	日本語表記
A, Ade	adenosine	アデノシン
C, Cyt	cytidine	シチジン
G, Gua	guanosine	グアノシン
Gun	guanine	グアニン
T, m ⁵ U	thymidine	チミジン； 5-メチルウリジン
U, Uri	uridine	ウリジン
Q	queuosine	キューオシン
preQ ₀	7-cyano-7-deazaguanine	7-シアノ-7-デアザグアニン
preQ ₁	7-aminomethyl-7-deazaguanine	7-アミノメチル-7-デアザグアニン
Ψ	pseudouridine	シュードウリジン
D	dihydrouridine	ジヒドロウリジン
s ⁴ U	4-thiouridine	4-チオウリジン
Gm	2'-O-methylguanosine	2'-O-メチルグアノシン
m ¹ G	1-methylguanosine	1-メチルグアノシン
m ² G	N ² -methylguanosine	N ² -メチルグアノシン
m ² ₂ G	N ² ,N ² -dimethylguanosine	N ² ,N ² -ジメチルグアノシン
m ⁵ C	5-methylcytidine	5-メチルシチジン
m ¹ A	1-methyladenosine	1-メチルアデノシン

A.3 その他の略号

略号	英語表記	日本語表記
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
TGT	tRNA-guanine transglycosylase	tRNA グアニントランスグリコシラーゼ
ArcTGT	Archaeosine TGT	アーケオシン TGT
QueTGT	Queuosine TGT	キューオシン TGT
TruB	tRNA Ψ 55 pseudouridine synthase	tRNA Ψ 55 合成酵素
GMP	guanosine 5'-monophosphate	グアノシン 5'-一リン酸
ATP	adenosine 5'-triphosphate	アデノシン 5'-三リン酸
CTP	cytidine 5'-triphosphate	シチジン 5'-三リン酸
GTP	guanosine 5'-triphosphate	グアノシン 5'-三リン酸
UTP	uridine 5'-triphosphate	ウリジン 5'-三リン酸
Tris	tris[hydroxymethyl]aminomethane	トリス [ヒドロキシメチル] アミノメタン
HEPES	<i>N</i> -[2-hydroxyethyl]piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid]	
ADA	<i>N</i> -[2-acetamido]-2-iminodiacetic acid	
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	
MPD	(\pm)-2-methyl-2,4-pentanediol	(\pm)-2-メチル-2,4-ペンタンジオール
DTT	dithiothreitol	ジチオスレイトール
2-ME	2-mercaptoethanol	2-メルカプトエタノール
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PMSF	phenyl-methylsulfonyl fluoride	フッ化フェニルメチルスルフォニル
r. m. s. d.	root-mean square deviation	
M.W.C.O.	molecular weight cut off	
NCS	non-crystallographic symmetry	
ORF	open reading frame	
tRNA	transfer RNA	転移 RNA
rRNA	ribosomal RNA	リボソーム RNA
snRNA	small nuclear RNA	核内低分子 RNA
snoRNA	small nucleolar RNA	核小体低分子 RNA
snoRNP	small nucleolus ribonucleoprotein	核小体低分子リボ核蛋白質
CBB	coomassie brilliant blue	クマジーブリリアントブルー
TCA	trichloro acetic acid	トリクロロ酢酸
MAD	multi-wavelength anomalous dispersion	多波長異常分散
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
MD	molecular dynamics	分子動力学法

A.4 備考

- 酸素，および窒素原子が 3.5 Å 以内の距離で相対し，適切な配向をとるとき水素結合を形成しているとみなした.
- 相対する原子が 5.0 Å 以内の距離に存在し，かつ両原子間の相互作用が水素結合とみなされない場合，van der Waals 相互作用を形成しているとみなした.
- アミノ酸，核酸の残基名，原子名は，PDB (Protein Data Bank) Format Description Version 2.2 に準拠する表記方法によった．ただし，' (prime) やギリシャ文字はそのまま表記している.

Appendix. B 参考文献

- Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr.* **D52**, 30–42.
- Aebi, M., Kirchner, G., Chen, J. Y., Vijayraghavan, U., Jacobson, A., Martin, N. C. & Abelson, J. (1990). Isolation of a temperature-sensitive mutant with an altered tRNA nucleotidyltransferase and cloning of the gene encoding tRNA nucleotidyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 16216–16220.
- Altman, S. (1990). Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Biosci Rep* **10**, 317–37.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999). Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery. *J. Mol. Evol.* **48**, 291–302.
- Auffinger, P. & Westhof, E. (1998). Effects of Pseudouridylation on tRNA Hydration and Dynamics: a Theoretical Approach. In *Modification and Editing of RNA* (Grosjean, H. & Benne, R., eds.), pp. 103–112.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905–920.
- Björk, G. R. (1995). Biosynthesis and function of modified nucleosides. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (Söll, D. & RajBhandary, U., eds.), pp. 165–205.
- Björk, G. R., Durand, J. M., Hagervall, T. G., Leipuviene, R., Lundgren, H. K., Nilsson, K., Chen, P., Qian, Q. & Urbonavicius, J. (1999). Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism. *FEBS Lett.* **452**, 47–51.
- Blessing, R. H. & Smith, G. D. (1999). Difference structure-factor normalization for heavy-atom or anomalous-scattering substructure determinations. *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 664–670.
- Bortolin, M. L., Ganot, P. & Kiss, T. (1999). Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs. *EMBO J.* **18**, 457–469.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905–921.
- Cavaille, J., Nicoloso, M. & Bachellerie, J. P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA *in vivo* directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* **383**, 732–735.
- CCP4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760–763.
- Cech, T. R. (1990). Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. *Biosci Rep* **10**, 239–261.
- Charette, M. & Gray, M. W. (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life* **49**, 341–351.
- Cunningham, R. P. (1997). DNA glycosylases. *Mutat. Res.* **383**, 189–196.
- Curnow, A. W. & Garcia, G. A. (1995). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition. *J. Biol. Chem.* **270**, 17264–17267.
- Davis, D. R. (1998). Biophysical and Conformational Properties of Modified Nucleosides in RNA (Nuclear Magnetic Resonance Studies). In *Modification and Editing of RNA* (Grosjean, H. & Benne, R., eds.), pp. 85–102. ASM Press.
- de La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Methods Enzymol.* (Carter, J., C. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. 276, pp. 472–494.
- Decatur, W. A. & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 344–351.
- Edmonds, C. G., Crain, P. F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C. H., Kowalak, J. A., Pomerantz, S. C., Stetter, K. O. & McCloskey, J. A. (1991). Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria). *J. Bacteriol.* **173**, 3138–3148.

- Eichler, D. C. & Craig, N. (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **49**, 197–239.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein-Structure Refinement. *Acta Crystallogr.* **A47**, 392–400.
- Ganot, P., Bortolin, M. L. & Kiss, T. (1997a). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**, 799–809.
- Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M. & Kiss, T. (1997b). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes Dev.* **11**, 941–956.
- Garcia, G. A. & Goodenough-Lashua, D. M. (1998). Appendix 3: General Properties of RNA-modifying and -Editing Enzymes. In *Modification and Editing of RNA* (Grosjean, H. & Benne, R., eds.), pp. 85–102. ASM Press.
- Garcia, G. A., Koch, K. A. & Chong, S. (1993). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Overexpression, purification and quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **231**, 489–497.
- Garcia, G. A., Tierney, D. L., Chong, S., Clark, K. & Penner-Hahn, J. E. (1996). X-ray absorption spectroscopy of the zinc site in tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 3133–3139.
- Giegé, R., Sissler, M. & Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5017–5035.
- Gouda, M., Yokogawa, T., Asahara, H. & Nishikawa, K. (2002). Leucyl-tRNA synthetase from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus* has a heterodimeric quaternary structure. *FEBS Lett.* **518**, 139–143.
- Gregson, J. M., Crain, P. F., Edmonds, C. G., Gupta, R., Hashizume, T., Phillipson, D. W. & McCloskey, J. A. (1993). Structure of the archaeal transfer RNA nucleoside G*⁻¹⁵ (2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-7-β-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide (archaeosine)). *J. Biol. Chem.* **268**, 10076–10086.
- Gu, J., Patton, J. R., Shimba, S. & Reddy, R. (1996). Localization of modified nucleotides in *Schizosaccharomyces pombe* spliceosomal small nuclear RNAs: Modified nucleotides are clustered in functionally important regions. *RNA* **2**, 909–918.
- Gu, X., Liu, Y. & Santi, D. V. (1999). The mechanism of pseudouridine synthase I as deduced from its interaction with 5-fluorouracil-tRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14270–14275.
- Gupta, R. (1984). *Halobacterium volcanii* tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs. *J. Biol. Chem.* **259**, 9461–9471.
- Gutgsell, N., Englund, N., Niu, L., Kaya, Y., Lane, B. G. & Ofengand, J. (2000). Deletion of the *Escherichia coli* pseudouridine synthase gene *truB* blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA in vivo, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells. *RNA* **6**, 1870–1881.
- Heiss, N. S., Knight, S. W., Vulliamy, T. J., Klauck, S. M., Wiemann, S., Mason, P. J., Poustka, A. & Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.* **19**, 32–38.
- Hoang, C. & Ferré-D'Amaré, A. R. (2001). Cocystal structure of a tRNA Ψ55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme. *Cell* **107**, 929–939.
- Hollis, T., Ichikawa, Y. & Ellenberger, T. (2000). DNA bending and a flip-out mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA. *EMBO J.* **19**, 758–766.
- Ishitani, R. (2002). Que Biomolecular visualization and modeling (<http://www.biomens.utd.edu/~ishitani/que>).
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* **A47**, 110–119.
- Katze, J. R., Gunduz, U., Smith, D. L., Cheng, C. S. & McCloskey, J. A. (1984). Evidence that the nucleic acid base queuine is incorporated intact into tRNA by animal cells. *Biochemistry* **23**, 1171–1176.
- Kawai, G., Yamamoto, Y., Kamimura, T., Masegi, T., Sekine, M., Hata, T., Iimori, T., Watanabe, T., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1992). Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group. *Biochemistry* **31**, 1040–1046.
- Kholod, N., Pan'kova, N., Ksenzenko, V. & Kisselev, L. (1998a). Aminoacylation of tRNA gene transcripts is strongly affected by 3'-extended and dimeric substrate RNAs. *FEBS Lett.* **426**, 135–9.
- Kholod, N., Vassilenko, K., Shlyapnikov, M., Ksenzenko, V. & Kisselev, L. (1998b). Preparation of active tRNA gene transcripts devoid of 3'-extended products and dimers. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2500–2501.
- Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* **20**, 3617–3622.
- Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**, 145–148.

- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J. P., Caizergues-Ferrer, M. & Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**, 1077–1088.
- Kittendorf, J. D., Barcomb, L. M., Nonekowski, S. T. & Garcia, G. A. (2001). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: molecular mechanism and role of aspartate 89. *Biochemistry* **40**, 14123–14133.
- Knight, S. D. (2000). RSPS version 4.0: a semi-interactive vector-search program for solving heavy-atom derivatives. *Acta Crystallogr.* **D56**, 42–47.
- Knight, S. W., Heiss, N. S., Vulliamy, T. J., Greschner, S., Stavrides, G., Pai, G. S., Lestringant, G., Varma, N., Mason, P. J., Dokal, I. & Poustka, A. (1999). X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the *DKC1* gene. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 50–58.
- Krokan, H. E., Standal, R. & Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.* **325**, 1–16.
- Lafontaine, D. L., Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M. & Tollervy, D. (1998). The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev.* **12**, 527–537.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Morris, A. L. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291.
- Luking, A., Stahl, U. & Schmidt, U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 259–296.
- Maden, B. E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **39**, 241–303.
- Marck, C. & Grosjean, H. (2002). tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* **8**, 1189–1232.
- McCloskey, J. A., Graham, D. E., Zhou, S., Crain, P. F., Ibba, M., Konisky, J., Söll, D. & Olsen, G. J. (2001). Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic *Methanococcales*. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4699–4706.
- Nakanishi, S., Ueda, T., Hori, H., Yamazaki, N., Okada, N. & Watanabe, K. (1994). A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32221–32225.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **A50**, 157–163.
- Ni, J., Tien, A. L. & Fournier, M. J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* **89**, 565–573.
- Nishimura, S. (1979). Modified Nucleosides in tRNA. In *TRANSFER RNA: Structure, Properties, and Recognition* (Schimmel, P. R., Söll, D. & Abelson, J. N., eds.), pp. 59–79. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nonekowski, S. T., Kung, F. L. & Garcia, G. A. (2002). The *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase can recognize and modify DNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 7178–7182.
- Nurse, K., Wrzesinski, J., Bakin, A., Lane, B. G. & Ofengand, J. (1995). Purification, cloning, and properties of the tRNA Ψ 55 synthase from *Escherichia coli*. *RNA* **1**, 102–12.
- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* **514**, 17–25.
- Ohtsuki, T., Kawai, G. & Watanabe, K. (2002). The minimal tRNA: unique structure of *Ascaris suum* mitochondrial tRNA^{Ser}_(UCU) having a short T arm and lacking the entire D arm. *FEBS Lett.* **514**, 37–43.
- Okimoto, R. & Wolstenholme, D. R. (1990). A set of tRNAs that lack either the T Ψ C arm or the dihydrouridine arm: towards a minimal tRNA adaptor. *EMBO J.* **9**, 3405–3411.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In *Methods Enzymol.* (Carter, J., C. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. 276, pp. 307–326. Academic Press.
- Philippson, A. (2002). DINO: Visualizing Structural Biology
- Roe, B. A., Ma, D. P., Wilson, R. K. & Wong, J. F. (1985). The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* **260**, 9759–9774.
- Romier, C., Meyer, J. E. & Suck, D. (1997). Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms. *FEBS Lett.* **416**, 93–98.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996a). Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *EMBO J.* **15**, 2850–2857.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996b). Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase reveal aspartate 102 as the active site nucleophile. *Biochemistry* **35**, 15734–15739.
- Sekine, S., Nureki, O., Shimada, A., Vassylyev, D. G. & Yokoyama, S. (2001). Structural basis for anticodon recognition by discriminating glutamyl- tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 203–206.
- Shi, H. & Moore, P. B. (2000). The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited. *RNA* **6**, 1091–1105.
- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. & Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 148–153.

- Steinberg, S., Gautheret, D. & Cedergren, R. (1994). Fitting the structurally diverse animal mitochondrial tRNAs^{Ser} to common three-dimensional constraints. *J. Mol. Biol.* **236**, 982–989.
- Swairjo, M. A., Morales, A. J., Wang, C. C., Ortiz, A. R. & Schimmel, P. (2000). Crystal structure of trbp111: a structure-specific tRNA-binding protein. *EMBO J* **19**, 6287–98.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
- Tycowski, K. T., Smith, C. M., Shu, M. D. & Steitz, J. A. (1996). A small nucleolar RNA requirement for site-specific ribose methylation of rRNA in *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14480–14485.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022–1025.
- Watanabe, M., Matsuo, M., Tanaka, S., Akimoto, H., Asahi, S., Nishimura, S., Katze, J. R., Hashizume, T., Crain, P. F., McCloskey, J. A. & Okada, N. (1997). Biosynthesis of archaeosine, a novel derivative of 7-deazaguanosine specific to archaeal tRNA, proceeds via a pathway involving base replacement on the tRNA polynucleotide chain. *J. Biol. Chem.* **272**, 20146–20151.
- Watanabe, M., Nameki, N., Matsuo-Takasaki, M., Nishimura, S. & Okada, N. (2000). tRNA recognition of tRNA-guanine transglycosylase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* **276**, 2387–2394.
- Watanabe, Y., Tsurui, H., Ueda, T., Furushima, R., Takamiya, S., Kita, K., Nishikawa, K. & Watanabe, K. (1994). Primary and higher order structures of nematode (*Ascaris suum*) mitochondrial tRNAs lacking either the T or D stem. *J. Biol. Chem.* **269**, 22902–22906.
- Watkins, N. J., Gottschalk, A., Neubauer, G., Kastner, B., Fabrizio, P., Mann, M. & Luhrmann, R. (1998). Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure. *RNA* **4**, 1549–1568.
- Weeks, C. M. & Miller, R. (1999). The design and implementation of SnB v2.0. *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 120–124.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327–339.
- Wittenhagen, L. M. & Kelley, S. O. (2002). Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 586–590.
- Wolstenholme, D. R., Macfarlane, J. L., Okimoto, R., Clary, D. O. & Wahleithner, J. A. (1987). Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1324–1328.
- Wolstenholme, D. R., Okimoto, R. & Macfarlane, J. L. (1994). Nucleotide correlations that suggest tertiary interactions in the TV- replacement loop-containing mitochondrial tRNAs of the nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4300–4306.
- Yokoyama, S. & Nishimura, S. (1995). Modified Nucleosides and Codon Recognition. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (Söll, D. & RajBhandary, U., eds.), pp. 207–223. ASM Press.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**, 48–52.

謝辞

本研究は、指導教官の横山茂之教授の熱心なご指導と温かい激励のもとでおこなわれたものです。心から感謝いたします。本研究の遂行にあたり、実験技術をはじめとする研究全般にわたって丁寧なご指導をして下さった横山研究室の濡木理助教授に心から感謝いたします。

SPring-8 での測定に関しては、理研播磨研究所の神谷信夫室長、高輝度光科学研究センターの河本正秀研究員、酒井久伸研究員（以上 BL41XU）、理研播磨研究所の足立伸一研究員（BL44B2）、河野能顕研究員（BL45PX）より惜しみない援助を頂きました。深く感謝いたします。本研究は、SPring-8 の高輝度な X 線なくしては、遂行できなかったであろうことを追記しておきます。

坂本健作助手をはじめとする横山研究室の皆様と、理研ゲノム科学総合研究センターの武藤裕博士、北畠真博士、行木信一博士、寺田貴帆博士には、研究面で多大なご助言、ご指導および激励を頂きました。特に、深井周也博士には結晶構造解析に関する多くの助言をいただきました。心より感謝いたします。秘書の武藤喜里子さん、武藤久美さんには、事務面で様々な便宜を図っていただきました。深く感謝いたします。

東京工業大学・生命理工学部・岡田研究室の岡田典弘先生、渡邊正勝博士、雉本禎哉さんには、酵素の精製や発現系を譲与して頂いただけでなく、数々の貴重なご助言を頂きました。深く感謝いたします。

理化学研究所・生体分子解析室の瀧尾擴士博士にはセレノメチオニン標識体酵素の質量分析をしていただきました。深く感謝いたします。

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・杉山弘先生にはデオキシグアノシン類似体を頂きました。貴重な試料を譲与して頂いたことを深く感謝いたします。

最後に、大学院での研究生活を支援して下さい下さった両親に心より感謝いたします。

2003 年 2 月

石谷 隆一郎

