1P125

X線結晶構造解析によるメチオニル tRNA 合成酵素の tRNA 認識機構の解明

○中西 孝太郎、小木曾 由梨、中間 崇、深井 周也、瀧木 理 (東工大院・生命理工・生命情報)

タンパク質の生合成は、メチオニル tRNA と mRNA 上の開始コドン AUG との塩基対形成により開始する。メチオニル tRNA は、メチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) によって開始メチオニン tRNA または伸長メチオニン tRNA (tRNA^{Met}_m) にメチオニンが付加して生成されるが、これら 2 つの tRNA^{Met} の塩基配列はアンチコドン以外は似ていない。これまでの多くの生化学実験の結果から、MetRS がアンチコドン CAU を認識することで 2 つの tRNA^{Met} を他の tRNA から識別することが示唆されてきたが、その機構の詳細は MetRS と tRNA^{Met} の複合体の構造決定を待たなければならなかった。今回我々は、*Aquifex aeolicus* MetRS と tRNA^{Met}_m の複合体の結晶構造を 2.8 Å 分解能で決定し、MetRS が tRNA^{Met} のアンチコドンループを湾曲させて引き寄せ、アンチコドン 3 塩基のみを特異的に認識して tRNA^{Met} を識別している機構を明らかにした。特に、tRNA^{Met} が MetRS に認識されるために必須とされてきたアンチコドン 1 文字目 C34 の塩基は、Trp422 とスタックすると同時に Arg357 とワトソン-クリック型塩基対を形成して厳密な認識を受けていた。Trp422 とスタックした C34 は、さらに A35、A38 の 2 塩基と共に 4 連続スタック Trp422-C34-A35-A38 を形成してアンチコドンループを湾曲させている。また、アンチコドンループ内で塩基同士が形成する水素結合ネットワークは、ループの湾曲した形を安定化して MetRS がアンチコドン認識しやすいように塩基を配向させている。このように、tRNA^{Met} は一方的に MetRS に認識されるのではなく、MetRS と協調して複合体を形成することが明らかになった。

K. Nakanishi, Y. Ogiso, T. Nakama, S. Fukai and O. Nureki: Structural basis for anticodon recognition by methionyl-tRNA synthetase

1P127

翻訳の 1 分子ダイナミックスの測定系の構築

○中山 秀喜^{1,2}、嶋本 伸雄^{1,2}、伊藤 耕一³ (¹遺伝研・構造遺伝学研究センター、²総合研究大学・生命科学、³東大・医科研)

生体分子複合体の形成解離の履歴を解明するには、1 分子実験が必須である。翻訳終了時におけるリボソーム 50S/30S サブユニットの解離と mRNA の解離との前後関係の決定、つまり mRNA は 70S リボソームから解離するか、30S から解離するのかを目的に、翻訳系の 1 分子系を構築し、以下の点について検討を行った。

まず、His-tagged GFP 融合リボソームを特異的に固定でき、非特異的吸着の少ない基板として、NTA/cysteine コートされたスライドガラスを作製した。次に、作製した基板に対して His-tagged GFP 融合リボソームの固定および、解離の観察を行った。その結果、NTA が固定化してある部位に特異的に His-tag-GFP 融合リボソームが固定されることが観察された。この固定化リボソームは、250mM Imidazole により解離した。したがって、固定は、非特異的ではなく、大部分が His-tag と NTA との結合によることが示された。次に、スライドガラスに固定された His-tagged -GFP 融合リボソームのまわりの溶液から、Mg²⁺ イオンを除去したところ、スライドガラスから、GFP の蛍光が消失したので、50S/30S が解離できる状態でスライドガラス上に固定されている事が認められた。このようにして、1 分子実験に必要なリボソーム固定系が確立した。

つぎに、スライドガラス上の固定化リボソームにおいて、中間レベルをへずに 1 段階で消光したことから、観察されたリボソームは 1 分子であると考えられる。このようにして翻訳のダイナミックスを 1 分子レベルで測定できる系が構築できた。現在、70S リボソーム：mRNA 複合体から、50S/30S が解離する条件について検討を行っている。

H. Nakayama, N. Shimamoto and K. Ito: Construction of measurement system for single-molecule dynamics of translation

1P126

Q β レプリカーゼの酵素学：鋳型 RNA が Q β レプリカーゼを罠に捕らえる

○細田 一史¹、北 寛士^{2,4}、松浦 友亮^{3,5}、塚田 幸治³、ト部 格³、四方 哲也^{1,2,3,4} (¹阪大・生命、²阪大・情、³阪大・工、⁴ERATO,JST、⁵PRESTO,JST)

ポリメラーゼ、制限酵素、遺伝子調節タンパク質などのタンパク質・核酸認識は、生化学において最も重要な機構の一つである。非常に大きい核酸のうち、特異的な部位を探し出すのは容易なことではない。本研究では、タンパク質・RNA 認識機構を理解するために、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである Q β レプリカーゼに注目した。Q β レプリカーゼは RNA の立体構造を認識し、鋳型特異性が適合した場合にはこれを鋳型としてその相補鎖 RNA を合成する。その酵素的知見は非常に多いが、未だ説明不十分な点が存在する。本研究では、Q β レプリカーゼは鋳型 RNA に対して、複製反応が開始可能な“正”結合と、不可能な“誤”結合をもち、この“誤”結合により擬似的に酵素濃度が減少され、基質自身に阻害を受けるメカニズムを、速度論的解析から明らかにした。その結果から、Q β レプリカーゼの鋳型 RNA の一つである mdv1 RNA に対する、“正”結合の結合定数である Michaelis 定数 Km は約 30 nM であるのに対し、“誤”結合の結合定数 Ki は、その 30 倍強い 1 nM 程度であった。以上から、Q β レプリカーゼにおいて、鋳型 RNA の特異的認識は困難であることがわかった。

K. Hosoda, H. Kita, T. Matsuura, K. Tsukada, I. Urabe and T. Yomo: Enzymology of Q beta replicase: Template RNA catches "Q beta replicase" in a trap

1P128

Holliday 構造 DNA 分岐点移動反応に関与する RuvA-RuvB 蛋白質複合体の動力学的解析

○韓 龍雲¹、谷 知己¹、林 真人¹、横田 浩章¹、菱田 卓²、岩崎 博史³、品川 日出夫^{2,4}、原田 慶恵^{1,4} (¹都臨床研、²阪大・微研、³横浜市大院・総合理学、⁴CREST・JST)

大腸菌 RuvA-RuvB 蛋白質複合体は相同組換え中間体である十字型の Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進する。RuvA は Holliday 構造に特異的に結合する蛋白質で、2 個の RuvA 四量体が DNA の十字型分岐点を上下から挟み込んでいる。RuvB 蛋白質は六量体のリング構造を形成し DNA を取り囲む。2 つの六量体リングが RuvA を挟み込んで、RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体を形成する。RuvB は ATP 加水分解能を持ち、モーター蛋白質として働く。分岐点移動は RuvB 六量体リングから DNA を押し出すことで起こり、その時 DNA は二重らせんに沿って回転しながら移動すると考えられている。昨年の大会で我々は 1 分子計測法 (Tethered Particle 法) を用いて、十字型 DNA の一方の端をスライドガラス基板に固定し、その反対側に磁気ビーズをつけて、DNA の回転をビーズの回転として観察する系を構築し、反応速度や RuvA-RuvB が生み出すトルクを報告した。今回、我々は分岐点移動の速度を生化学的解析から求め、1 分子計測の結果と比較した。高 ATP 濃度 (100~500 mM) では 1 分子解析で得られた速度は生化学的解析で求めた速度の 1/3~1/2 であったが、低 ATP 濃度 (10 mM) においては両者の速度はほぼ同程度であった。これらの結果は、高 ATP 濃度では DNA の回転は一部しかビーズに伝えられていない、またはモーター蛋白質がスリップしていると考えられる。そして、低 ATP 濃度において DNA の回転はほぼビーズの回転として伝えられたことが示唆される。現在、我々は低 ATP 濃度でより短い DNA を使い、ビーズの揺らぎを抑えることで DNA の回転がステップで観察できるか試みている。本大会ではこれまでに得られた結果から、RuvA-RuvB 蛋白質複合体による Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応機構について考察したい。

Y.-W. Han, T. Tani, M. Hayashi, H. Yokota, T. Hishida, H. Iwasaki, H. Shinagawa, Y. Harada: Kinetic analysis of Holliday junction branch migration mediated by RuvA-RuvB