The Biophysical Society of Japan General Incorporated Association

3P097

バリルtRNA合成酵素によるバリンtRNAの認識機構

○深井 周也[1]、濡木 理[1]、関根 俊一[2]、嶋田 睦[1]、Vassylyev Dmitry[2]、横山 茂之[1,2,3]（[1]東大・院理・生化、[2]理研播磨、[3]理研 GSC）

タンパク質合成が正確に行われるためには，アミノアシルtRNA合成酵素（aaRS）が，アミノ酸を対応するtRNAに正確に結合させることが不可欠である．そのため，aaRSはアミノ酸およびtRNAを厳密に識別する．バリル，イソロイシル，ロイシルtRNA合成酵素（それぞれValRS，IleRS，LeuRS）は，誤って活性化した類似のアミノ酸を，加水分解によって排除するという巧妙な校正機構（amino-acid editing）をもつ．われわれは，IleRSおよびValRSの結晶構造を決定し，校正機構に関して立体構造に基づいた解析をすすめてきた(Nureki et al., Science, 280, 578-582; Fukai et al., Cell, 103, 793-803)．ValRS・$tRNA^{Val}$・バリルアデニル酸類似体の三重複合体の結晶構造解析では，アミノアシル化反応と校正反応における基質認識部位の詳細を明らかにするとともに，間違って活性化されたアミノ酸がtRNAを介して二つの活性部位を移動するモデルを示した．さらに本研究では，ValRSによる$tRNA^{Val}$の認識機構に焦点をあて，アンチコドンの認識機構に加えて，ValRSに特徴的なC末端ドメインの役割を，機能・構造の両面から明らかにする．結晶構造から，ValRSのC末端ドメインは，$tRNA^{Val}$のD loop-TΨC loop相互作用を支える役割，すなわち，tRNAのL字型を維持する役割を担っていると推測される．また，現在解析を進めている，基質の結合していないValRSの結晶構造では，このC末端ドメインが，tRNA複合体の場合と比較して大きく動いている．現在，C末端ドメインを欠失したValRS変異体とD loop-TΨC loop相互作用を弱くした$tRNA^{Val}$変異体についての速度論的な解析を行っているところである．

S. Fukai, O. Nureki, S. Sekine, A. Shimada, D. Vassylyev, and S. Yokoyama : Recognition mechanism of valine tRNA by valyl-tRNA synthetase

3P098

基準振動モード解析法によるtRNA-ARS複合体のダイナミクス解析

○中村 周吾、清水 謙多郎（東大・院農・応生工）

アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)は，よく似たL字型立体構造をもつトランスファーRNA(tRNA)の中から，同族のtRNAを非常に正確に認識し，アミノ酸を付加することができる．近年のX線結晶解析技術の発達によって，さまざまなアミノ酸系でのtRNA-ARS複合体の構造が原子レベルで明らかにされてきている．

tRNA-ARSの分子認識メカニズムの研究は，これまで両分子の接触部位でのヌクレオチドとアミノ酸の相互作用の解析が中心であり，結晶構造をベースにした「静的な」観点からのものであった．しかし最近になって，この接触部位から離れた「tRNAコア」と呼ばれる部分の塩基の違いによって，tRNA-ARS複合体の結合の強さやアミノアシル化効率に大きな違いが生じることが明らかになってきており，ARSが正確にtRNAをアミノアシル化する過程において，分子の構造変化・ダイナミクスが深く関わっていることが示唆される．

われわれは，二面角系基準振動モード解析法をGln系のtRNA-ARS複合体に適用してフリー状態と複合体形成状態での両分子のダイナミクスについて解析を行い，低周波数領域において両分子が一体となった大きな協調的な運動をしていることを明らかにした．

本研究では，フリー状態と複合体形成状態のモード運動を比較することで，複合体形成によってもゆらぎの方向に変化がなかったモード運動を同定した．tRNA-ARSの分子認識にtRNAのダイナミクスが関わっているとすれば，これらのフリー状態のtRNAに内在している複合体状態でのモード運動が認識に重要な役割を果たす可能性があると考えられる．さらにコア内の塩基を置換してwild typeよりもARSとの結合能を高めたGln-tRNA変異体についても同様の解析を行い，wild typeの結果と比較することで，分子認識とダイナミクスの関係について議論する．

S. Nakamura and K. Shimizu : Analysis of dynamics of tRNA-ARS complex using normal mode calculation

3P099

λ及びCroリプレッサーと核酸の特異的相互作用の解析

○大畠 玄久[1]、王 翼飛[2]、河野 秀俊[3]、皿井 明倫[2]（[1]名城大・理工、[2]理研・筑波研、[3]Dept. Chem., Univ. Pennsylvania）

蛋白質が塩基を特異的に認識する機構を解明するために、蛋白質と核酸の複合体のX線構造解析とこの複合体の結合エネルギーが知られている λとCroリプレッサーを解析してきた。両蛋白質は 核酸に結合する helix-turn -helix の共通の motif をもっているニ量体であるが、異なった立体構造をとり、オペレータ配列の認識の仕方も異なる。一方、オペレータの塩基配列を他の3種類の塩基で置換した一塩基置換 DNA と両リプレッサーの結合エネルギー変化 ΔΔGが明らかになっている。 まず、蛋白質と塩基間の相互作用エンタルピーを通常の分子力場のエネルギー(Amber 3.0A) から求めた。次に、複合体と水との接触表面積を使うことによって鎖のエントロピーと水和エネルギーを計算した。この両者のエネルギーをたしあわせ, 複合体を形成していない状態のエネルギーから差し引く事によって複合体形成の結合エネルギー ΔGを求めることができる。 X線の構造をもとに、塩基配列を他の3種類の塩基で置換した一塩基置換 DNA をモデリングし、そのDNAとリプレッサーの複合体の相互作用エネルギーの最小化の計算を行い構造を最適化した。この構造から計算されるΔΔGの塩基依存性をエネルギーの成分に分けて解析した。λ リプレッサー の場合、ΔΔGはクーロン相互作用並びに水素結合と相関していたが、Cro リプレッサーの場合は異なった傾向がみられた。λ リプレッサー の場合、一塩基置換 DNA のエネルギーを解析すると、A-T 塩基の塩基置換では、主要なエネルギーとして van der Walls と水和エネルギーの組み合わせと静電力と水素結合の組み合わせの二つの typeが観測され、G-C 塩基の塩基置換では静電力と他のいろいろなエネルギーの組み合わせがみられた。

M. Oobatake, Y. Wang, H. Kono, A. Sarai : Anatomy of specific interactions between lambda and Cro repressor and operator DNA

3P100

cAMP受容蛋白質 (CRP) のDNAに対する結合様式: CRP-$(cAMP)_1$ と CRP-$(cAMP)_2$ の違い

松渕 亜希子、藤本 尚子、○外山 聡、竹内 英夫（東北大院・薬）

大腸菌のCRPは、カタボライト抑制に関与する遺伝子の転写調節を行う。CRPは同一サブユニットの2量体で、1つのサブユニットにcAMPが結合したCRP-$(cAMP)_1$ (複合体1) と、両サブユニットにcAMPが結合したCRP-$(cAMP)_2$ (複合体2) があり、複合体1が標的DNAに特異的に結合する。複合体2のDNAへの結合様式はX線結晶解析の報告では、コンセンサス配列 5'-TG^2TG^4A-3' の G^2 と G^4 のC6=Oがそれぞれ、CRPのR180とR185の側鎖と直接水素結合しているとされている。一方、複合体1とDNAの結合様式の詳細は未だ不明である。本研究では紫外共鳴ラマン分光法と選択的重水素ラベル法を併用し、コンセンサス配列中のグアニン G^2 および G^4 のCRP結合に伴う水素結合の変化を溶液中で解析した。

G^2 または G^4 のグアニン環C8位を重水素化した *lac* プロモータ22 mer (G2D体、G4D体) を合成した。未置換22 merの251 nm励起ラマンスペクトルからG2D体またはG4D体のスペクトルを差し引くと、重水素化した位置のグアニン由来のバンドが、1523 cm^{-1} 付近に負、1488/ 1466 cm^{-1} 付近に正負として (それぞれ ν_5'、ν_6/ν_6') 観測された。モデル化合物の実験より、ν_6/ν_6' はC6=O、ν_5' はN7の水素結合が形成されると高波数に現れることがわかった。22 merに複合体2が結合すると G^2、G^4 ともに、ν_6/ν_6' が高波数シフトし、ν_5' は変化しなかった。このことは、C6=Oと複合体2の間で水素結合が形成され、N7では水素結合状態が変化しないことを示している。C6=Oの水素結合の状態はX線結晶解析の結果と一致する。一方、複合体1が結合すると、G^2 の水素結合状態は複合体2結合時と同様であるが、G^4 はCRPと強い水素結合を形成していない。複合体1と2の活性の違いは、このような結合様式の相違に由来すると推定される。

A. Matsubuchi, N. Fujimoto, A. Toyama and H. Takeuchi : DNA Binding modes of cAMP receptor protein (CRP): difference between CRP-$(cAMP)_1$ and CRP-$(cAMP)_2$

NII-Electronic Library Service