

- 3) Bruneau, B.G. (2010) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **20**, 505–511.
- 4) Lickert, H., Takeuchi, J.K., Von Both, I., Walls, J.R., McAuliffe, F., Adamson, S.L., Henkelman, R.M., Wrana, J.L., Ros-sant, J., & Bruneau, B.G. (2004) *Nature*, **432**, 107–112.
- 5) Hang, C.T., Yang, J., Han, P., Cheng, H.L., Shang, C., Ashley, E., Zhou, B., & Chang, C.P. (2010) *Nature*, **466**, 62–67.
- 6) Nimura, K., Ura, K., & Kaneda, Y. (2010) *J. Mol. Med.*, **88**, 1213–1220.
- 7) Lucio-Eterovic, A.K., Singh, M.M., Gardner, J.E., Veerappan, C.S., Rice, J.C., & Carpenter, P.B. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**, 16952–16957.
- 8) Nimura, K., Ura, K., Shiratori, H., Ikawa, M., Okabe, M., Schwartz, R.J., & Kaneda, Y. (2009) *Nature*, **460**, 287–291.
- 9) Marango, J., Shimoyama, M., Nishio, H., Meyer, J.A., Min, D. J., Sirulnik, A., Martinez-Martinez, Y., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Zhou, M.M., Waxman, S., Leibovitch, B.A., Walsh, M.J., & Licht, J.D. (2008) *Blood*, **111**, 3145–3154.
- 10) Schlesinger, J., Schueler, M., Grunert, M., Fischer, J.J., Zhang, Q., Krueger, T., Lange, M., Tönjes, M., Dunkel, I., & Sperling, S.R. (2011) *PLoS Genet.*, **7**, e1001313.
- 11) He, A., Kong, S.W., Ma, Q., & Pu, W.T. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **108**, 5632–5637.

二村 圭祐

(大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学)

Epigenetic regulation of transcription in heart development
Keisuke Nimura (Division of Gene Therapy Science, Osaka
University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka,
Suita, Osaka 565-0871, Japan)

真正細菌におけるグルタミル tRNA 生合 成の構造的基盤

はじめに

複製，転写，翻訳というステップから成り立つセントラルドグマは，すべての生物に共通するものであり，生命現象の根幹を成すものである。このうち，複製と転写は塩基対の形成を基に反応が進行し，比較的少ない因子で正確な反応を行うことが可能である。一方，翻訳は3文字の塩基配列であるコドンのそれぞれを20種類あるアミノ酸の一つあるいは翻訳の開始や終止に対応させる必要があり，これは塩基対の正確性だけでは成し得ないものである。そのため，翻訳のステップを保障するために，翻訳装置であるリボソームをはじめとする数多くの生体分子が関わっている。

その中で，アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) によるアミノアシル tRNA (aa-tRNA) の生成は翻訳の正確性の鍵となるステップである。各アミノ酸の aaRS は，対応する tRNA とアミノ酸を選び aa-tRNA を合成する。aaRS による反応の正確さは，そのまま翻訳の正確さへと繋がる。しかしながら，多くの真正細菌と全ての古細菌はグルタミン (Gln) 用の aaRS を持っていない。その代わりに2段階の反応によってグルタミル tRNA (Gln-tRNA^{Gln}) を合成することが知られている。第一の反応はグルタミル tRNA 合成酵素 (GluRS) によるグルタミン酸 (Glu) の付加 (グルタミル化) であり，これによって Glu-tRNA^{Gln} が生成される。GluRS は本来 tRNA^{Glu} のみに働く酵素であるが，tRNA^{Gln} にも働くものは非識別型 GluRS と呼ばれる。第二の反応は，アミド基転移酵素による Glu-tRNA^{Gln} から Gln-tRNA^{Gln} への変換である。Gln-tRNA^{Gln} が Glu-tRNA^{Gln} を経由して合成されることは1960年代に明らかにされていたが¹⁾，アミド基転移酵素が同定されたのは1997年のことであった²⁾。一部の真正細菌と古細菌は，グルタミンに似たアミノ酸であるアスパラギン (Asn) についても，グルタミンの場合と同様に，Asn-tRNA^{Asn} 合成する際に最初にアスパラギン酸 (Asp) を付加して Asp-tRNA^{Asn} 経由する2段階反応を用いていることが知られている。

グルタミン・トランスアミドソーム

Gln-tRNA^{Gln} の2段階反応による合成の際，反応中間体である Glu-tRNA^{Gln} が細胞質へ放出されて，もしもそのままリボソームへと運ばれれば，グルタミンのコドンにグルタミン酸が対応して誤って翻訳される可能性が高まる。それゆえに，Glu-tRNA^{Gln} が GluRS からアミド基転移酵素へ素早く受け渡される仕組みがあるのではないかと考えられてきたが，具体的な証拠は見出されていなかった。はたして tRNA^{Gln} と GluRS，アミド基転移酵素の3者はどのように機能しているのだろうか。

我々は *Thermotoga maritima* 由来の系を用いて3者の相互作用を検出することを試みた³⁾。 *T. maritima* においては，Glu-tRNA^{Gln} に対するアミド基転移酵素として働く GatCAB (Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase subunits C, A and B) というヘテロ3量体タンパク質が知られていた。GatB は Glu-tRNA^{Gln} を認識し，ATP と GatA により生成したアンモニアを用いて tRNA^{Gln} に結合したまま Glu を Gln へと変換する。GatC は GatB と GatA の二つのサブユニットの結合部位に巻きつくような構造をとっており，三つのサブユニットは安定した3量体を形成する。そこで tRNA^{Gln}，

GluRS, GatCAB を調製し, ゲルシフト法により相互作用を検証した. すると, これら3者が安定した複合体を形成することを見出した. 我々はこの3者複合体を『グルタミン・トランスアミドソーム』と命名した.

グルタミン・トランスアミドソームの結晶構造

我々はさらに GluRS-tRNA^{Gln} 2 者複合体と 3 者複合体であるトランスアミドソームの結晶構造を, それぞれ 2.9 Å および 3.35 Å の分解能で決定することに成功した(図1)³⁾. トランスアミドソームの中において, tRNA^{Gln} は GluRS と GatCAB の二つの酵素によって同時に認識されていた. tRNA^{Gln} のアクセプターアームは GluRS の活性部位へと向いており, tRNA^{Gln} の全体構造は, GluRS-tRNA^{Gln} 2 者複合体中の tRNA^{Gln} とよく似ていた. すなわち今回決定した結晶構造は, トランスアミドソームにおいてグルタミン酸を付加する「グルタミル化型」を反映したものであると考えられた.

GatCAB は, ヘリカルドメインとテールドメインからなるテールボディを用いて, tRNA^{Gln} の L 字の肩の外側部分を認識していた. 一方で, GatCAB の残りの部分からなる活性ボディは tRNA^{Gln} のアクセプターアームに相互作用することなく GluRS と接して安定化し, Glu-tRNA^{Gln} の生成を待ち構えていた.

tRNA^{Gln} におけるアミド化を決定する因子

今回決定した2者複合体の中の tRNA^{Gln} を, 以前決定された *Thermus thermophilus* GluRS-tRNA^{Glu} 2 者複合体⁴⁾ の中の tRNA^{Glu} と比較すると, D ループに大きな構造の差があることが明らかとなった. 具体的には, tRNA^{Gln} の C16 と U20 の構造に大きな差があった. 興味深いことに, GluRS-tRNA^{Gln} 2 者複合体とトランスアミドソームの構造を比較すると, GatCAB のテールボディは, tRNA^{Gln} と相互作用する際に C16 と U20 を強く認識し, tRNA^{Gln} の構造変化を誘発していることが見いだされた. すなわち, GatCAB は, D ループの tRNA^{Gln} 特異的な構造を認識し, tRNA^{Glu} と区別していることが示唆された.

そこで, tRNA^{Gln} の GatCAB に認識される配列を tRNA^{Glu} へと移すと, GluRS によるグルタミル化および GatCAB によるアミド化にどのような影響を与えるか調べた(図2). D ループと同様に tRNA^{Gln} に特徴的である U1-A72 ペアを移した tRNA^{Glu} バリエント(図2b レーン3) や, tRNA^{Gln} の D ループを真似て C20a を削った tRNA^{Glu} バリエント(図2b レーン4) は, GluRS によってグルタミン酸は付加されるものの, GatCAB によってアミド化されることはなかった. しかしながら, 上記の特徴を併せて持つ tRNA^{Glu} バリエント(図2b レーン5) の場合には, Gln-tRNA^{Glu} がいくらか生成されることが見出され, さらに 20 位を C から U

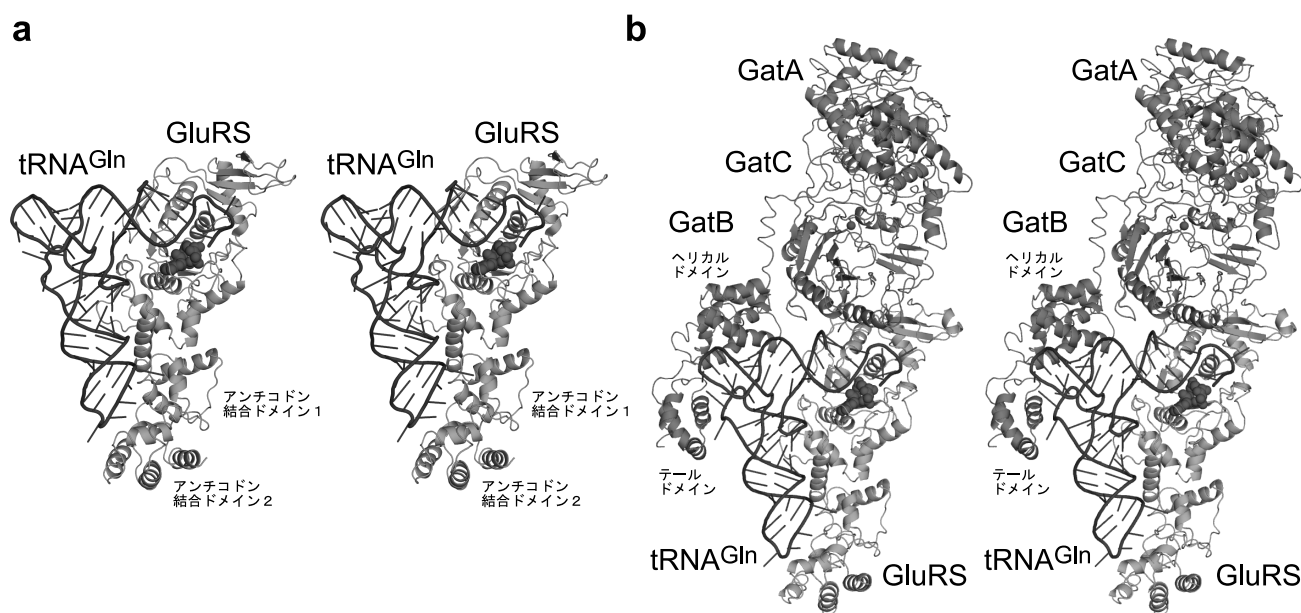


図1 (a) GluRS-tRNA^{Gln} 2 者複合体と (b) グルタミン・トランスアミドソームの結晶構造のリボンモデル図. ステレオ図で示した.

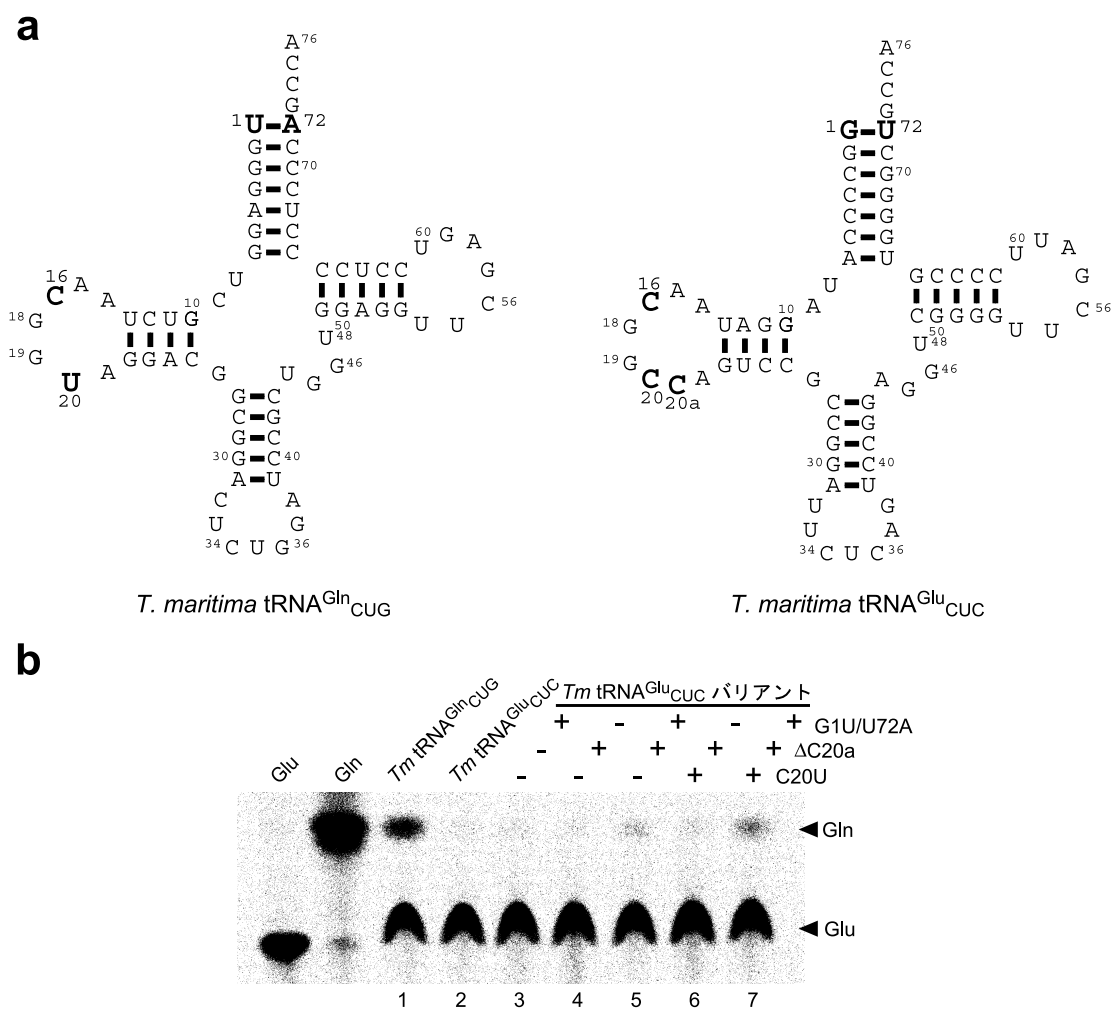


図2 (a) *T. maritima* 菌の tRNA^{Gln}_{CUG} と tRNA^{Glu}_{CUC} の RNA 配列. クローバーリーフモデルで示した.
(b) GluRS と GatCAB による tRNA のグルタミル化とアミド化の解析.

へと置換すると (図 2b レーン 7), 生成する Gln-tRNA^{Gln} の量が増えた. これらの実験結果は, tRNA^{Gln} の D ループの構造と U1-A72 ペアの 2ヶ所が Glu-tRNA^{Gln} と Glu-tRNA^{Glu} を識別する GatCAB によるアミド化の決定因子となっていることを明確に示すものである.

GluRS から GatCAB への中間体 Glu-tRNA^{Gln} の受け渡し機構

今回決定した tRNA^{Gln} に結合している GluRS を, 以前我々のグループで決定した tRNA に結合していない GluRS⁵⁾ と比較したところ, アンチコドン結合ドメイン 1 とアンチコドン結合ドメイン 2 の間に蝶番様の構造を見出した. 一方, 今回構造決定した *T. maritima* 由来の GatB を, 現在までに構造が決定されている他種の GatB と比較

すると, ヘリカルドメインの N 末端側および C 末端側の両側に蝶番様の構造を見出した.

これらの蝶番様構造を考え合わせ, 我々はトランスアミドソームにおける Gln-tRNA^{Gln} 生成機構のモデルを提唱した (図 3). 今回決定した結晶構造はグルタミル化型であったが, GluRS が Glu-tRNA^{Gln} を生成すると, GluRS は, その蝶番様構造の動きにより, 解離に時間のかかるアンチコドンとの結合は維持したままでも, 素早く Gln の付加されたアクセプターアーム部分から放れることができる. すると, グルタミル化されたアクセプターアームが GluRS から GatB 内の活性部位へ向かって動きうるスペースが生まれる (中間型). すると GatB にある蝶番様構造の働きにより, GatCAB の活性ボディは, GluRS と衝突することなく Glu-tRNA^{Gln} のアクセプターアームに近づき, 捉えるこ

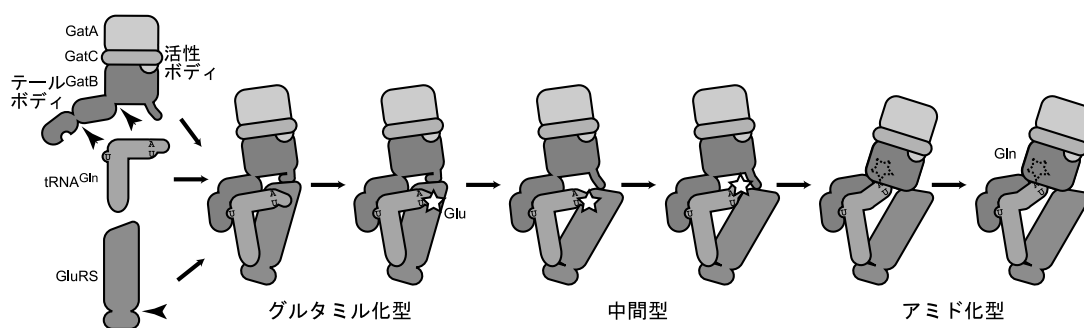


図3 グルタミン・トランスアミドソームによる Gln-tRNA^{Gln} 生成過程のモデル図。分子内に存在する蝶番様構造を矢尻で示した。

とが可能となり、その結果、「アミド化型」となったトランスアミドソームは、最終産物である Gln-tRNA^{Gln} を生成する。このモデルはグルタミントランスアミドソームが、中間体の Glu-tRNA^{Gln} を細胞質中へ放つことなく、2段階の反応を効率よく進められることをうまく説明するものである。

おわりに

グルタミンとアスパラギンは、生物の進化の過程において、20種類のアミノ酸の中では比較的最近に取り込まれたものと考えられてきた。今回見出したトランスアミドソームによる Gln-tRNA^{Gln} の生成機構は、tRNAのCCA末端にGluRSがグルタミン酸を付加するシステムに、GluRSの働きを妨げないようにアミド基転移酵素GatCABが加わって成立しているシステムであることから、上述の仮説を支持するものである。過去ではなく未来へと目を向ければ、今回のトランスアミドソームの立体構造は、タンパク質工学において非天然型アミノ酸をタンパク質へ導入するための新たな戦略の可能性を示したともいえる。すなわち、aaRSの改変だけでは成し得なかった種類の非天然型アミノ酸の導入についても、トランスアミドソームに倣った2段階反応を用いることによって、現実のものとなるかも知れない。

- 1) Wilcox, M. & Nirenberg, M. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, 229-236.
- 2) Curnow, A.W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T.M., & Söll, D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11819-11826.
- 3) Ito, T. & Yokoyama, S. (2010) *Nature*, 467, 612-616.
- 4) Sekine, S., Nureki, O., Dubois, D.Y., Bernier, S., Chênevert, R., Lapointe, J., Vassilyev, D.G., & Yokoyama, S. (2003) *EMBO J.*, 22, 676-688.

- 5) Ito, T., Kiyasu, N., Matsunaga, R., Takahashi, S., & Yokoyama, S. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66, 813-820.

伊藤 拓宏, 横山 茂之

(東京大学大学院理学系研究科構造生物学講座,
理化学研究所生命分子システム基盤研究領域)

Structural basis of the glutamyl-tRNA synthesis in bacteria
Takuhiro Ito and Shigeyuki Yokoyama (Laboratory of
Structural Biology, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; RIKEN Systems and Structural Biology Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama City, Kanagawa 230-0045, Japan)

TMEM16F による細胞膜リン脂質のスクランブル

1. はじめに

真核生物において、細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、ホスファチジルセリン (PS) は細胞膜内側に、ホスファチジルコリンは細胞膜外側に位置している。PSの細胞膜内側への移行にはフリッパーゼという酵素が関わっており、ATP依存的にPSを内側に保っている¹⁾(図1)。一方、リン脂質の非対称性は生体内において様々な局面で崩壊する。例えば、血小板が活性化するとPSが細胞表面に露出され、血液凝固因子が働く足場として作用する。また、アポトーシス時においてもPSが細胞表面に露出され、マクロファージによって認識、貪食され