

を用いて *in vitro* 酵素反応を行い、液体高速クロマトグラフィ-質量分析 (LC-MS) によるメタボローム解析で基質を特定し、機能同定に成功している¹¹⁾。

紹介してきた手法は、特殊な代謝経路を持つ生物種やゲノムアノテーションが遅れている生物種などにも有効性を示すと思われる。また、機能未知酵素のスクリーニングの他、既知酵素の新しい活性や酵素阻害剤の探索などにも適応可能だろう¹²⁾。しかし、手法としていくつかの問題点もある。特にこの方法の最大のボトルネックは、化合物同定のステップと考えている。実際に筆者らのスクリーニング過程において、変化のあった物質の特定ができずに機能同定に至らず、酵素候補が放置されているような現状もある。こういったメタボロミクス自体の技術的問題点もあり、本手法や類似する方法を用いた酵素同定の例はまだ少ないが、今後のメタボローム解析技術の発展とともに、生化学の新しいツールとして普及する日がくると期待している。

謝辞

本研究は慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授をはじめ、多くの研究員、技術スタッフの努力により開発されたメタボローム測定技術を基盤として行われたものです。また、本研究内容の酵素スクリーニングで大きな貢献を果たした慶應義塾大学修士卒業生の河内隼太郎氏にお礼申し上げます。最後に、本研究は山形県、および鶴岡市のサポートにより行いました。県民および市民の皆様にごの場をかりて深く感謝申し上げます。

- 1) Keseler, I.M., Bonavides-Martinez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R.P., Johnson, D.A., Krummenacker, M., Nolan, L.M., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, A.G., & Karp, P.D. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, D464-470.
- 2) Chen, L. & Vitkup, D. (2007) *Trends Biotechnol.*, **25**, 343-348.
- 3) Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., & Nishioka, T. (2003) *J. Proteome Res.*, **2**, 488-494.
- 4) Ohashi, Y., Hirayama, A., Ishikawa, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Ueno, Y., Tomita, M., & Soga, T. (2008) *Mol. Biosyst.*, **4**, 135-147.
- 5) Saghatelian, A., Trauger, S.A., Want, E.J., Hawkins, E.G., Siuzdak, G., & Cravatt, B.F. (2004) *Biochemistry*, **43**, 14332-14339.
- 6) Baran, R., Kochi, H., Saito, N., Suematsu, M., Soga, T., Nishioka, T., Robert, M., & Tomita, M. (2006) *BMC Bioinformatics*, **7**, 530.
- 7) Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T.,

- Inamoto, E., Toyonaga, H., & Mori, H. (2005) *DNA Res.*, **12**, 291-299.
- 8) Saito, N., Robert, M., Kitamura, S., Baran, R., Soga, T., Mori, H., Nishioka, T., & Tomita, M. (2006) *J. Proteome Res.*, **5**, 1979-1987.
- 9) Saito, N., Robert, M., Kochi, H., Matsuo, G., Kakazu, Y., Soga, T., & Tomita, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 16442-16451.
- 10) Breitkreuz, K.E., Allan, W.L., Van Cauwenberghe, O.R., Jakobs, C., Talibi, D., Andre, B., & Shelp, B.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 41552-41556.
- 11) de Carvalho, L.P., Zhao, H., Dickinson, C.E., Arango, N.M., Lima, C.D., Fischer, S.M., Ouerfelli, O., Nathan, C., & Rhee, K.Y. (2010) *Chem. Biol.*, **17**, 323-332.
- 12) Saito, N., Ohashi, Y., Soga, T., & Tomita, M. (2010) *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 358-362.

齋藤 菜摘, ロベール マルタン
(慶應義塾大学先端生命科学研究所)

Metabolomics approach for enzyme discovery
Natsumi Saito and Martin Robert (Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan)

心臓発生におけるエピジェネティックな転写制御

1. はじめに

先天性心疾患は、全出生児のおよそ1%に生じる最も発症頻度の高い先天性疾患であり、様々な内因性また外因性の要因によって生じると考えられている。遺伝学的解析によって転写因子をコードする遺伝子の変異が先天性心疾患の発症につながるということが明らかにされてきたが、これらの転写因子がどのように機能し転写を制御しているかについて不明な点が多い。最近、心臓発生において重要な転写因子がヒストンメチル化酵素と相互作用して協調的に転写制御を行うことが明らかにされ、今まで不明であった心臓発生時の転写因子の機能が明らかになり始めている。また、先天性心疾患の原因遺伝子どうしが物理的、機能的に相互作用していることから、転写因子やクロマチン制御因子が心臓発生を担う転写制御ネットワークを形成し機能していることが明らかになりつつある。心臓発生には成長因子やシグナル伝達など様々な要因も重要であるが、本稿ではエピジェネティックな転写制御機構を中心に解説する。

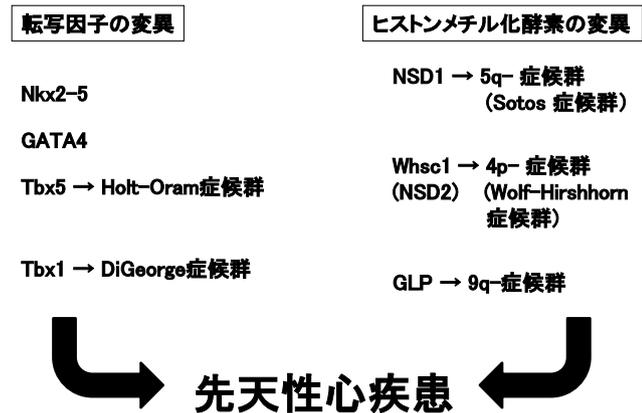


図1 先天性心疾患の原因となる転写因子とヒストンメチル化酵素

2. 心臓発生における転写因子

ヒトの先天性心疾患の原因遺伝子としていくつかの転写因子が同定され、代表的なものとしてNKX2-5, TBX1, TBX5, GATA4などが知られている^{1,2)}(図1)。NKX2-5はホメオボックスを持つ転写因子であり、TBX5やGATA4などと協調的に機能し転写を活性化する。ヒトにおいてNKX2-5遺伝子の変異は心房中隔欠損、心室中隔欠損、Fallot四徴症、刺激伝導系の異常の原因となる。TBX1, 5はT-box転写因子ファミリーに属している。T-box転写因子ファミリーは発生分化の様々なステップに関与している。TBX1遺伝子の変異はDiGeorge症候群、TBX5遺伝子の変異は心房中隔欠損、心室中隔欠損や刺激伝導系の異常を伴うHolt-Oram症候群の原因となる。またZincフィンガーを持つGATA4の変異は心房中隔欠損、心室中隔欠損の原因となる。これらの転写因子はヒトにおける先天性心疾患の例からもわかるように、心臓発生に極めて重要な役割を担っている。これら以外にも心疾患を引き起こす転写因子は複数明らかになっていることから、多数の転写因子が協調的に機能し、転写を正確に制御することによって正常な心臓発生が進行していくと考えられている。さらにこの正確な転写制御機構には様々なクロマチン制御因子が関わっていることが明らかになりつつあり、転写因子群とクロマチン制御因子群の協調的な転写制御が心臓発生に不可欠であることが理解され始めている。

3. 心臓発生におけるクロマチン制御因子

クロマチンを制御する因子として、ヒストン修飾酵素、DNA修飾酵素、リモデリング因子、ノンコーディング

RNAなどが存在する。心臓発生についての役割が明らかになっているものではヒストン修飾酵素とリモデリング因子があげられる。BRG1 (Brahma-Related Gene 1)/Brm (Brahma)-Associated Factor (BAF) クロマチンリモデリング複合体はATP依存的にDNAとヒストンの相互作用を変化させ、ヌクレオソームのポジショニングを変化させることで転写を活性化する。またBAFには複数の種類が存在しており、組織や細胞ごとによって使い分けられている³⁾。BAFのサブユニットの一つであるBAF60にはBAF60a, BAF60b, BAF60cの三つのアイソフォームがあり、発生中の心臓ではBAF60cが強く発現している。BAF60cは培養細胞の過剰発現の系においてBRG1と転写因子NKX2-5, TBX5, GATA4と相互作用し、レポーター遺伝子の転写を促進する⁴⁾。このBAF60cを*in vivo*においてノックダウンすると心臓発生に異常を呈する。また、Sm22α-creを用いて心筋細胞特異的にBRG1を欠損させると、心筋細胞の増殖や分化が阻害される⁵⁾。逆に心臓が肥大する肥大型心筋症の患者では症状と相関して発現量が増大することから、BRG1は心筋細胞の増殖、分化に必須であり、発生や病態に関連している遺伝子の転写制御を行っていることが最近明らかにされた⁵⁾。

ヒストンメチル化はヒストンタンパク質のリジン残基、アルギニン残基にメチル基が1~3個付加される翻訳後修飾であり、これまでに多数のヒストンメチル化酵素が同定されている。ヒストンメチル化酵素は、それぞれ特異的なヒストン残基にメチル基を付加する活性を持つ。メチル化されたそれぞれのヒストンのアミノ酸残基は、それぞれのヒストンメチル化を特異的に認識するタンパク質を呼びこむシグナルとして機能し、転写の活性化、不活性化を制御する。これを行う酵素の一つGLP ((G9a related protein), 別名EHMT1, Eu-HMTase1)は、転写されているクロマチン領域のヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)に1~2個のメチル基を付加する活性を持ち、同様にH3K9に対してメチル化活性を持つG9aと複合体を形成して機能する。GLPは先天性心疾患を伴う9q-症候群の欠損領域に存在しており、原因遺伝子として考えられている⁶⁾(図1)。

次に、NSD (nuclear receptor-binding SET-domain-containing protein) ファミリーにはNSD1, NSD2 (別名WHSC1, 以後WHSC1 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1)と表記する), NSD3 (別名WHSC1L1)があり、がんや先天性疾患の病態に関与している⁶⁾。その中でNSD1は、ヒストンH3の36番目(H3K36)とヒストンH4の20番目のリジン(H4K20)をメチル化する^{6,7)}。NSD1の片アレル欠損は

先天性心疾患を伴い、過成長を特徴とする Sotos 症候群の原因となる (図 1)。WHSC1 は最近、我々によって Wolf-Hirschhorn 症候群 (別名 4p-症候群) の原因遺伝子の一つであることが明らかにされた H3K36 のメチル化酵素であり、以下でさらに紹介する⁸⁾(図 1)。

4. ES 細胞におけるヒストンメチル化酵素 Whsc1 の機能

WHSC1 遺伝子は、Wolf-Hirschhorn Syndrome の患者の染色体欠損領域に存在する。WHSC1 はヒストンメチル化活性を担う SET (Su (Var) 3-9, Enhancer of zeste, Trithorax) 部位を持ち、また HMG (High-Mobility Group) 部位、PHD (Plant Homeo Domain) 部位や、PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) 部位などの他のタンパク質やクロマチンと相互作用する部位を持つ。Whsc1 のメチル化活性を調べるためにリコンビナント Whsc1 タンパク質を作製した。昆虫細胞でタンパク質を作製しメチル化活性を測定すると、ヌクレオソーム中の H3K36 に対して 1~3 個メチル基を入れる活性があった。大腸菌で作成した Whsc1 の SET 部位のリコンビナントタンパク質は H3K4 や H4K20 にもメチル基を付加する活性があると報告されている⁹⁾。この違いを生む原因として、昆虫細胞で作成した全長 Whsc1 タンパク質と、大腸菌で作成した Whsc1 の SET 部位のみのタンパク質との構造の違いが考えられる。Whsc1 欠損 ES 細胞では H3K36 に三つメチル基の付いた H3K36me3 が特異的に減少していたことから、Whsc1 は H3K36 トリメチル化酵素であることがわかった。

Whsc1 の標的クロマチン領域の認識するメカニズムを明らかにするために ES 細胞における Whsc1 複合体を同定すると、クロマチンリモデリング因子 Brg1, ES 細胞に重要な転写因子 Sall1, Sall4, Nanog, ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1, 糖転移酵素 OGT, RNA 結合性タンパク質 hnRNP U, Raver1 などのタンパク質群が Whsc1 と相互作用していた (図 2)。この結果から Whsc1 は転写因子と相互作用することで、標的クロマチン領域において機能している可能性が推察できた。Nanog-Sall4 結合領域で Whsc1 が H3K36me3 に寄与しているか確認したところ、Whsc1 は Nanog-Sall4 結合領域に存在しており、Whsc1-Nanog-Sall4 結合領域近傍の H3K36me3 量は Whsc1 欠損によって減少した。さらに Whsc1-Nanog-Sall4 結合領域から転写される RNA 量は Whsc1 欠損によって増加したことから、Whsc1 は ES 細胞において転写因子や様々なクロマチン制御因子と共に転写量の調節を行っていることが推測された (図 2)。

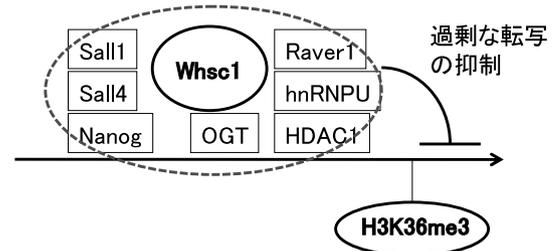


図 2 ES 細胞における Whsc1 複合体. ES 細胞において、Whsc1 は転写因子、ヒストン脱アセチル化酵素などと複合体を形成し、標的遺伝子の過剰な転写を Whsc1 の H3K36 のトリメチル化 (H3K36me3) 活性によって抑制している。

5. 心臓発生におけるヒストンメチル化酵素 WHSC1 の機能

心臓における Whsc1 の発現パターンを検討したところ、心内膜床を除く心臓全体で発現していた。心臓の表現型について詳細に解析してみると、Whsc1 +/- 胚では胎生 18.5 日で心房中隔の低形成が認められた。Whsc1 -/- 胚ではさらに心臓の異常が顕著になり、心房中隔の低形成が胎生 14.5 日で認められ、胎生 15.5 日、18.5 日胚では心房中隔と心室中隔の欠損が認められた。このことから Whsc1 は心房中隔、心室中隔形成に寄与していることがわかった。

心臓発生において Whsc1 と共に機能する転写因子を探索したところ、Whsc1 は心臓発生に重要な転写因子 Nkx2-5 と相互作用し、複合体を形成していた。ES 細胞と同様に胎仔心臓においても Sall1 や Sall4 は発現している。Whsc1 は Sall1 と相互作用していたが、Sall4 との相互作用は認められなかった。この理由は不明であるが、心臓における発現領域の違いによるのではないかと考えられる。

ES 細胞の結果から Nkx2-5 欠損によって発現上昇する遺伝子が Whsc1 欠損によっても発現上昇すると考えられたので、これらの遺伝子の転写量を調べた。Nkx2-5 欠損によって発現上昇する遺伝子 *Pdgfra*, *Igfbp5*, *Tnc*, *Isl1* が、Whsc1 欠損によっても発現上昇した。しかし、Nkx2-5 欠損で発現上昇する *BMP2* は Whsc1 欠損の影響を受けなかった。このことから Whsc1 は心臓発生に寄与する *Pdgfra* や *Isl1* などの発現に影響を与えることがわかった (図 3)。

Whsc1 と Nkx2-5 が直接的にこれらの遺伝子の発現制御を行っているかどうか検討した。胎生 12.5 日胚の心臓を用いて Whsc1 と Nkx2-5 のクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、Whsc1 と Nkx2-5 は *Pdgfra* 遺伝子座、

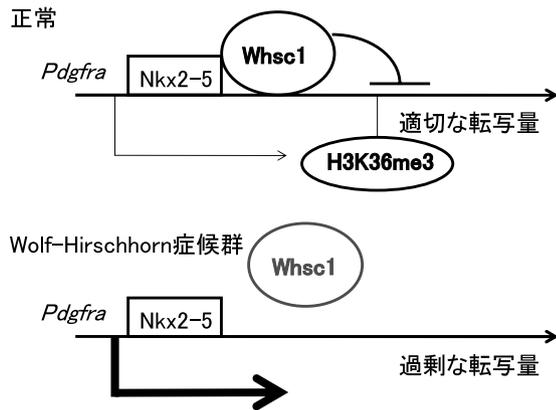


図3 心臓発生における *Whsc1* の転写制御メカニズム. *Whsc1* は *Nkx2-5* と共に *Pdgfra* 遺伝子の第一エクソンに結合し H3K36 のトリメチル化 (H3K36me3) によって転写量の調節を行っている. *Whsc1* の欠損によって転写量が過剰になり, その結果先天性心疾患を伴う Wolf-Hirschhorn 症候群の発症につながる.

Igfbp5 遺伝子座の第一エクソンに存在し, *Isl1* 遺伝子座においてはプロモーター領域と第一エクソンに存在することがわかった. 次に, それぞれの第一エクソン領域における H3K36me3 量を検討したところ, これらの領域の H3K36me3 量は *Whsc1* 欠損によって減少することがわかった. こままでの解析によって *Whsc1* は確かに *Nkx2-5* とともに標的遺伝子座に存在し, ヒストン H3K36 のトリメチル化に関与していることがわかった (図3).

それでは, *Whsc1* と *Nkx2-5* は協調的に標的遺伝子の発現制御を行い, 心臓発生を担っているのだろうか? この疑問に答えるために, *Pdgfra* の第一エクソンとプロモーターによるレポーターアッセイを行った. その結果, *Nkx2-5* によってレポーター遺伝子の発現は抑制され, *Nkx2-5* と *Whsc1* の共発現によりさらに抑制されることがわかった. *Whsc1* と *Nkx2-5* が結合している第一エクソンを欠損させたプロモーターはほとんど転写活性を示さなかった. このことから, *Pdgfra* 遺伝子座の発現制御において *Whsc1* と *Nkx2-5* の結合している領域は mRNA に転写されるのみならず, 転写活性自体に必要であり, 適切な mRNA 量を転写するために必要な領域だと考えられる (図3).

次に *Whsc1* と *Nkx2-5* のダブルヘテロノックアウトマウスを作製し, 心臓発生の過程での両因子の相互作用を検討した. *Whsc1*, *Nkx2-5* のそれぞれのヘテロノックアウトマウスでは心房中隔, 心室中隔欠損は生じない. しかし, *Whsc1* と *Nkx2-5* のダブルヘテロノックアウトマウスでは心房中隔欠損や心室中隔欠損が生じた. このことか

ら, 実際に *Whsc1* と *Nkx2-5* は遺伝学的にも相互作用し心房中隔や心室中隔の形成に寄与していることがわかった.

6. おわりに

先天性心疾患を引き起こす原因遺伝子として転写因子がよく研究されてきたが, *WHSC1* のようにヒストン修飾酵素の変異も先天性心疾患を引き起こす原因となりうることが明らかになった. また, それぞれ先天性心疾患を引き起こす原因遺伝子である *NKX2-5* と *WHSC1* が, 実は心臓発生時において相互作用し, 協調的に転写制御を行っていることが明らかになった. ヒストン修飾酵素は多くの種類があることから, 様々なヒストン修飾酵素が転写因子と協調的に転写を制御していると考えられ, そのような転写因子とヒストン修飾酵素をはじめとするクロマチン制御因子とが形成するネットワークが正常な心臓発生に重要であることが想像される. 最近, 培養心筋細胞 HL-1 を用いて, 心臓において機能している転写因子群とクロマチン制御因子や修飾をうけたヒストンの結合状態を網羅的に解析し, 心臓の転写ネットワークを解析した報告がなされた. 一つは, 四つの転写因子 *Gata4*, *Mef2a*, *Nkx2-5*, *Srf* の培養心筋細胞 HL-1 における結合領域を ChIP-chip 解析によって同定し, 転写活性化の指標であるアセチル化されたヒストン H3 (H3ac) などと, 発現量の相関を明らかにする試みであり¹⁰⁾, その結果, これらの転写因子群は協調的に転写活性化に寄与しており, 特に *Srf* と *Gata4* の結合している遺伝子は H3ac がある場合より強く転写されていることが明らかになった. もう一つは, この四つの転写因子と *Tbx5* をビオチンタグで標識したタンパク質を HL-1 に発現させ, ストレプトアビジンで回収し ChIP-seq 解析を行った報告であり¹¹⁾, この論文では転写のコアクチベーターであるヒストンアセチル化酵素 p300 の ChIP-seq も施行された. p300 と転写因子の結合領域を比較した結果, p300 が結合せず複数の転写因子が結合するエンハンサーのように働く領域が多く遺伝子で同定され, p300 に依存せず複数の転写因子群が協調して転写活性化状態を構築している可能性が示唆されている. 今後, 発生期の心臓を用いてゲノムワイドな転写ネットワークの解析をされることが待たれ, その結果は心臓発生の理解を深め, 先天性心疾患発症メカニズムの解明につながると考えられる.

- 1) Srivastava, D. (2006) *Cell*, 126, 1037-1048.
- 2) Bruneau, B.G. (2008) *Nature*, 451, 943-948.

- 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., Rossant, 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^{Gln} 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}，