

新 制
理
955
京大附図

学位申請論文

北島 真

学位申請論文

# 大腸菌グルタミンイルtRNA合成酵素

-ドメイン間の機能的相互作用-

北畠 真

## 論文要旨

筆者は、低分子RNAの研究からRNAとタンパク質の認識の問題に興味を持ち(主論文の基礎となる論文2)、所属する研究室において洗練された系が確立している

「大腸菌のtRNA<sup>Gln</sup>とグルタミニルtRNA合成酵素(以下GlnRS)の相互認識」をモデルケースとして研究した。伝統的に行われてきた分子遺伝学的なアプローチに新しい分子生物学的手法を取り入れることによって、酵素とRNAのダイナミックな相互認識を示唆する、新奇な*glnS*変異体を得た。さらにその株に対して、Yale大学のDieter Söll教授の協力を得て生化学的な解析を加え、アミノアシルーションにおけるGlnRSの機能構造について、興味深い結果を得ることが出来た。

変異体の分離に際しては、GlnRSの温度感受性株から偽復帰株を取るという方法を用いた。それらをグルタミンtRNAの変異株であるsu<sup>+2</sup>を持つλphageとクロス・ストリークすると、su<sup>+2</sup>に対するチャージングに変化の見られるクローンが観察された。増殖速度や野生型*lacZ*の発現を調べると、変異株#1の持つGlnRSは、野生型のtRNA<sup>Gln</sup>に対してはもとの温度感受性株と同様のチャージング活性が観察されたが、su<sup>+2</sup>に対しては温度感受性株の約3分の1の効率でしかチャージ出来ないことが分かった(30℃での結果)。tRNA<sup>Gln</sup>とsu<sup>+2</sup>では、アンチコドンがCUGからCUAに変化しているだけであり、このGlnRS変異株はグルタミンtRNAのアンチコドンの三文字目の違いを見分けていることになる。また#1以外に、su<sup>+2</sup>に対する認識が逆に上昇した変異株もあった(主論文の基礎となる論文3)。

#1株が示すsu<sup>+2</sup>に対する特徴的な識別の原因を調べるため、*glnS*遺伝子をクローニングし、塩基配列より変異の位置を同定した(主論文の基礎となる論文1)。変異の位置は意外にもアンチコドン認識部位ではなく、それとは遠く離れたアクセプター・ステム結合部位(C171G)であった。このことは、生体内でのアミノアシルーションにおいて、GlnRSがダイナミックな構造変化を行っていることを示唆している。さらに、もとの温度感受性株の持つE222K変異と、C171G変異によるGlnRSの性

質の変化を詳しく調べるために変異GlnRSをプラスミドより大量発現させ検討した。その結果、E222K株が単独で、su<sup>+</sup>3に対してミスチャージング活性を示すことが分かった。その後、精製した変異GlnRSを用いた実験では、E222Kはグルタミンに対するKmが非常に高く、C171Gの導入によりそれは緩和されることが示された。

以上の結果より、野生型GlnRS株に対してE222K、C171Gの変異が入ることによって酵素の性質が大きな影響を受け、tRNAに対する認識を変化させることが明らかにされた。この論文ではこの二つの変異が野生型のGlnRSに対してどのような構造変化をもたらすかを考察し、その変化がtRNAの認識にどのように影響するかについて、現在までに得られた成果をまとめた。

# 目次

## I. 序論

1. アミノアシルtRNA合成酵素
2. GlnRS（グルタミニルtRNA合成酵素）の研究
3. 分子遺伝学的スクリーニング方法の構築
4. 変異株の多角的な解析について

## II. 材料と方法

1. 変異株の分離と変異の同定にあたって
2. 変異株の*in vivo*での解析
3. 変異GlnRSの大量発現と精製
4. 変異GlnRSの*in vitro*での解析

## III. 結果

1.  $su^{+2}$ に対する認識効率が低い新奇なGlnRS変異株
2. 変異の位置とその効果
3. E222K変異株におけるミスチャージング活性
4. 二つの変異GlnRS酵素の精製と生化学的解析

## IV. 考察

1. 二重変異株は $su^{+2}$ に対して、特異的に低い認識効率を示す
2.  $su^{+3}$ へのミスチャージング
3. E222K株の温度感受性
4. E222KおよびC171Gの導入によるGlnRSのダイナミックな構造変化

## V. 参考文献

## VI. 謝辞

# 序論

## 1. アミノアシルtRNA合成酵素

タンパク質の生合成は、DNAから遺伝暗号を転写したmRNAに従い、tRNAを介してアミノ酸がリボゾーム上で結合することによって行われる。遺伝情報が正確にアミノ酸配列に変換されるためには、複製、転写、翻訳の三つの反応が正確に行われることが重要である。

アミノアシルtRNA合成酵素は、tRNAにアミノ酸を結合させる酵素である。大腸菌においては、二十種類のアミノ酸それぞれについて一つ（リジンの場合は二つ(4, 7)）の対応するアミノアシルtRNA合成酵素が存在しており、一つの酵素がcognateな数種類のtRNAを認識し、ATP加水分解のエネルギーと供役してアミノ酸をチャージする。このように、アミノアシルtRNA合成酵素はアミノ酸、tRNA、ATPの三つの基質を持つ。

正確なタンパク質合成は、アミノアシルtRNA合成酵素が正しいアミノ酸を活性化し、正しい（cognateな）tRNAを認識することで成り立っている。正確なアミノ酸認識の機構についてはこれまであまり研究がなされておらず、そのため現在この酵素で最も競争の盛んな研究分野になっている。その中でもIleRSなどのように、間違ったアミノ酸を活性化した後にそれを解離する、いわゆるproofreading（あるいはediting）活性が観察されているものもあり(9, 24, 25)、興味深い。また酵素のアミノ酸特異性を変化させる研究も盛んに行われており(1, 26)、近い将来にアミノ酸特異性を完全に転換させた酵素の作成も実現すると考えられる。

アミノアシルtRNA合成酵素が正しくcognateなtRNAを認識する機構については、tRNAと酵素の両面から研究されている。初期にはtRNAの変異体分離が行われ、多くの成果が得られた。変異の位置の解析により、酵素に認識・識別される「アイデンティティ」と呼ばれる重要な塩基が次々に明らかにされていき(13, 34)、その多くはtRNAのアクセプター・ステムとアンチコドン・ループに集まっていることが分かっ

た (reviewed in ref. 35)。

1973年になり初めて酵母のtRNA<sup>Phe</sup>の三次元構造が決定され (28, 37)、tRNA分子がL字型骨格構造をとっていることが明らかにされた。それをきっかけとして大腸菌tRNA<sup>Met</sup> (52) および酵母tRNA<sup>Asp</sup> (32) など他のtRNAについても構造が解析され、L字型骨格が普遍的であることが示された。その結果、アミノアシルtRNA合成酵素は互いに非常によく似た立体構造を持つtRNAを厳密に識別していることが分かり、そのメカニズムに興味を持たれた。

分子遺伝学的研究の結果、tRNA側のアイデンティティ因子の解析は大きな進歩を見せたが、アミノアシルtRNA合成酵素の持つアイデンティティ因子については現在でも不明の部分が多い。それは多くのアミノアシルtRNA合成酵素の遺伝子が大腸菌の染色体上に一つしかなく、大きな変異の導入が宿主菌の致死につながってしまうという事情によるものである。そのため、アミノアシルtRNA合成酵素の分子解剖には、立体構造からの推測か、巧妙な選択方法で微妙な変異体を分離するしか方法がない。

## 2. GlnRSの研究

大腸菌のグルタミンイルtRNA合成酵素 (以下GlnRS) はクラスIに分類され、単量体で働く比較的小さな酵素であり、現在までに最もよく研究されているアミノアシルtRNA合成酵素の一つである。遺伝学的な面からは筆者の研究室をはじめ伝統的に数多くの研究があり (14, 47, 50, 53)、また生化学的な研究も蓄積されている (GlnRSの生化学的解析については文献 (13) の総説を参照)。さらにGlnRSは、tRNAとの複合体の形で立体構造が解明された (42, 43) 初めての酵素であり、生物物理学的な解析も多くなされている (2, 36)。

GlnRSはアミノアシルアデニレート形成にtRNAを必要とすることが知られている (10, 27)。しかも、ジヌクレオチド結合部位からは30-40 Å離れた位置にあるにも関わらず、この反応にはアンチコドンの認識が必要とされる (30, 38, 40, 45)。このことは活性部位から離れたアイデンティティ要素が、グルタミンの活性化反応とアミノ

アシレーション反応に、GlnRSとtRNAの全体的な構造変化を通じて影響を与える、ということを示している。30 Å離れた位置の相互認識が、触媒反応に影響を与えるメカニズムはどのようなものか、現在のところ解明されているとはいえないが、いくつかのヒントとなる事実は報告されている。

GlnRSを用いたtRNA認識の研究で重要なものに、tRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup>3) のミスチャージングの問題と、tRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub> (su<sup>+</sup>2op) を用いた実験がある。前者はアクセプター・ステム結合部位についての研究であり、後者はアンチコドン認識ドメインについての研究であったが、一つの変異GlnRSを仲立ちとして、両者の機能構造の複雑な連関が明らかになることとなった。

野生型GlnRSはsu<sup>+</sup>3を見分け、グルタミンをチャージすることはないが、tRNAのディスクリミネータに変異がある場合 (5, 11, 16, 19, 48, 49) か、GlnRSのディスクリミネータ認識部位に変異がある場合 (21) に限り、tRNA<sup>Tyr</sup>由来であるsu<sup>+</sup>3に対してグルタミンをチャージする。tRNAのディスクリミネータがtRNA<sup>Gln</sup>型に変わった変異tRNAでは、本来のTyrRSからは認識されなくなり、ほぼ完全にグルタミンをチャージするようになることから、ミスチャージングの現象にはアクセプター・ステム上部の認識が関与していることが予測された。またGlnRSの変異株でsu<sup>+</sup>3をチャージするものを解析すると、D235Nというものが含まれていた。この残基は立体構造 (42) から、アクセプターステムの二・三番目の塩基対 (G2•C71/G3•C70) を認識していると考えられている。

さてその一方で、野生型GlnRSによりチャージされないtRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub> A3•U70に対して、グルタミンをチャージングすることの出来る変異GlnRSが分離された。この変異tRNAはもともと、tRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub>が主にトリプトファンをチャージし、グルタミンはほとんどチャージしない (22) ことから、負のアイデンティティ因子をアクセプター・ステムに入れることにより、完全にGlnRSからはチャージされないtRNAとして作られたものである (39)。したがってこのtRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub> A3•U70がGlnRSに認識されない主要な原因は、アンチコドンを三文字とも変えたことにあると考えられる。

このtRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub> A3•U70に対しグルタミンをチャージすることが出来るように

なった変異GlnRSを分離し解析したところ、K317R、Q318R、Q318Kといった変異に混じって、驚くべきことに、D235Nというアクセプター・ステムに結合する残基の、su<sup>+</sup>3へのミスチャージング活性を持つ変異と同じものが含まれていることが分かった(41)。さらに立体構造から解析を進めると、残りのK317およびQ318の二つの残基は、D235の隣にあるQ234とGlnRS中で結合していることが分かり、その二つの変異も結果的に、Q234を介してD235の位置に影響を与えていたことが明らかになった(41)。

D235は先に述べたようにアクセプター・ステムの上部に結合する残基で、noncognateなtRNAを識別し正しいtRNAを認識する残基である。この一アミノ酸の変化が、なぜtRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub>のアンチコドンに対する許容性をもたらすのかは、現在のところ分かっていない。ただこの報告によって、遠くで起きたアミノ酸置換が、別のアミノ酸の位置や酵素の部分的コンフォメーションに変化を与え、最終的に酵素の全体的な立体構造やコンフォメーションに影響を与えることがある、という事実が明らかにされた。

### 3. 分子遺伝学的スクリーニング方法の構築

筆者は、前項で触れたように現在までにほとんど明らかにされていないGlnRS側のアイデンティティ因子をさらに探索するために、大腸菌の系を用いて変異体分離を行うこととした。特にアンチコдонはtRNA側のアイデンティティ因子が集中しているところであり、立体構造から予測されているGlnRSのアンチコдон認識ドメイン(43)を、遺伝学的に同定することが当初の目的であった。

そのために筆者は、伝統的に遺伝学で行われてきた手法、温度感受性からの復帰株分離をBT52glnS<sup>ts</sup>株について行った。このようなタンパク質の分子解剖を遺伝学的に行おうとする場合、遺伝子内部に落ちる様々な変異を収集する必要がある。GlnRSについて、アンチコドンに直接結合する残基の変異はこれまでほとんど得られていなかった。そのため筆者は、変異アンチコдонを識別してチャージしなくなるような変異株を、積極的なスクリーニング法ではなく、様々なGlnRS変異のプールの中か

ら、クロスストリークで選択する、という方法を探ることにした。これは積極的なスクリーニング法はこれまで様々な角度から試されてきて、今後新しい変異体を見つける期待があまり持てなかったためでもある。

最終的には、BT52*glnS*<sup>ts</sup>より出来るだけ沢山の偽復帰株 (*glnS*<sup>ts</sup>に分子外サプレッサーが得られるとは考えにくく、偽復帰株のほとんど全ては*glnS*の二重変異株であると考えられる) を集め、su<sup>+</sup>2をクロスストリークすることにより、アンチコドン三文字目がtRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>のGからAに変わった、その違いによりsu<sup>+</sup>2に対する認識が変化した株を探すこと、を目標とした。

#### 4. 変異株の多角的な解析について

BT52*glnS*<sup>ts</sup>の持つGlnRSは、E222Kという変異を持つことが知られていた(29)。この位置をtRNAとGlnRSの複合体の結晶解析の結果(42)より調べると、アクセプター・ステムの最上段、ディスクリミネータのすぐ近くに位置することが分かった。先に触れたように、ディスクリミネータの認識は他のtRNA、特にsu<sup>+</sup>3の識別に大きな役割を果たすことが知られている。したがってE222K変異が温度感受性以外に、su<sup>+</sup>3へのミスチャージを行うのではないかという期待が当初よりあり、GlnRS (E222K) の大量発現の機会にミスチャージングの試験も行った。

また、新たに偽復帰株で導入された変異(C171G)は、GlnRS (E222K) 株の温度感受性を打ち消す変異であることから、こちらの株のミスチャージング活性にも興味を持たれ、並行して実験を行った。その結果E222Kはミスチャージング活性を持っているが、C171Gの導入によりそれは失われる、ということが分かった。

さらにE222K、C171Gの二つの変異の導入が、GlnRSの性質にどのように影響を与えるのかを調べるために、Yale大学のDieter Söll研究室を訪問し、二つの変異酵素の精製を行った。その結果、E222KとE222K&C171G株の化学反応論的な性質の違いが明らかになった。すなわち、E222Kの温度感受性の原因には、酵素そのものの不安定性に加え、グルタミンに対する親和性が極めて低いことが挙げられ、C171Gはそれらの性質を大きく改善する力がある、ということが分かった。

またE222K株自体、高温で不安定であるが、それは*in vivo*での結果ほどは鮮明ではなかった。これは*in vivo*においてはグルタミンの濃度が150  $\mu$ Mと低い(17)ため、グルタミンに対する $K_m$ が高いE222K酵素が、より大きな温度変化の影響を受けるためであろう。

## 材料と方法

### 1. 変異株の分離と変異の同定にあたって

#### a) 大腸菌株およびファージクローン

温度感受性復帰株の分離に用いた親株は、BT52*glnS*<sup>ts</sup>である。この株はGlnRSの遺伝子にE222Kという変異を持つことが知られていた(29)。さらにこの株の特徴として、*lacZ*<sub>am1000</sub>のマーカを持つことが挙げられる。すなわち、復帰株の分離後、tRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>由来のサプレッサーであるsu<sup>+</sup>2により相補実験を行う必要があるが、その際にグルタミン要求性のコドンを持つ*lacZ*<sub>am1000</sub>遺伝子を使うことで、他のアミノ酸が挿入されるようなバックグラウンドを低く抑えることが出来る。

相補性試験には、二つのファージクローンが用いられた。一つはλcI857psu<sup>+</sup>2である。この株は、クロスストリークによる相補性試験と、サプレッション効率の定量化に用いるLacZ活性の試験に使われた。サプレッション効率の定量化については後述する。

相補性試験に使われたもう一つのファージクローンは、φ80psu<sup>+</sup>3 A1G82である。このファージにはtRNA<sup>Tyr</sup>由来であるsu<sup>+</sup>3の変異体がクローン化されている。この変異体はディスクリミネータの塩基対がGlnRSに認識されやすいよう人工的に置き換えられているもので、本来のTyrRSによっては認識されず、GlnRSによってのみチャージングされる(19)。温度感受性復帰株はグルタミン要求性の*lacZ*<sub>am1000</sub>をもつため、φ80psu<sup>+</sup>3 A1G82をクロスストリークすることでこれらの株は相補されるはずである。この実験は、su<sup>+</sup>2による*lacZ*<sub>am1000</sub>のサプレス活性が低い株が、*lacZ*遺伝子の欠損によるものではないということを確認するために行われた。

三つの変異GlnRS、E222K、C171GおよびE222K&C171G二重変異についてミスチャージング活性を測定するにあたっては、大腸菌株BT32が使われた。この株は*lacZ*<sub>am1000</sub>と同時にsu<sup>+</sup>3を持つが、前述のようにsu<sup>+</sup>3によってこのマーカはサプレ

スされない。染色体から発現される野生型のGlnRSはsu<sup>+</sup>3にグルタミンをチャージすることができないので、この株がLacZ活性を示すためには、プラスミドより発現された変異GlnRSがsu<sup>+</sup>3を認識し、グルタミンをチャージすることが必要である。この株のLacZ活性を指標として、変異GlnRSのミスチャージング活性を検定した。

site-directed mutagenesisにより変異GlnRSのプラスミドを構築する際、GlnRSの温度感受性を指標としたが、その際に親株のBT52*glnS*<sup>ts</sup> (E222K) よりも感受性の強い*glnS*<sup>ts</sup>株として、UT172を使用した。BT52*glnS*<sup>ts</sup>株は37℃にて十分生育可能で、42℃においてははっきりとした温度感受性を示すのに対し、UT172は37℃で既に増殖の阻害が確認される (15)。

プラスミドの増幅や抽出には、一般的に用いられているDH5αを使用した。またファージの増殖には指示菌としてLE392を使用した。なお、これらの大腸菌株・ファージ株については、図1に文献とともにまとめてある。

#### b) 培地等の条件

変異株の増殖にはグルコースを含まないLB培地を用いた。LacZ活性の定量化も同じLB培地中で行い、クロスストリーク試験にはIPTGとX-galをあらかじめ含んだLB培地を使用した。プラスミドを抽出する際は、液体培地として2 x YTを用いた。プラスミドのトランスフォーメーション後に行われるプレーティングには通常の（グルコースを含まない）LB培地に、50μg/mlのアンピシリンを含んだプレートを使用した。

以上の培地とタンパク質精製のための緩衝液について、その組成を図2の表にまとめてある。これ以外の一般的な方法については、Sambrookらの方法に従った (44)。

#### c) 変異株の分離

図3にまとめたとおり、LB液体培地中で、30℃にて終夜培養したBT52*glnS*<sup>ts</sup>株を、LB寒天培地に0.1mlずつ (3 x 10<sup>8</sup> cells) プレーティングし、42℃にて一晩保温した。この実験は独立なクローンを得るために、シングルコロニーの段階から独立に、並行

大腸菌株	主な遺伝子型	参考文献
LE392	<i>supE44, supF58, hsdR514, galK2, galT22, metB1, trpR55, lacY1</i>	3
DH5 $\alpha$	<i>supF44, <math>\Delta</math>lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	12
UT172	<i>glnS172 (T266P)</i>	8
BT32-13 <i>glnS</i> <sup>ts</sup>	<i>lacZ3213, su<sup>+</sup>3, met<sup>-</sup>3am, glnS1 (E222K)</i>	18
BT52 <i>glnS</i> <sup>ts</sup>	<i>lacZ 1000am, glnS1 (E222K)</i>	21
BT32	<i>lacZ3213, su<sup>+</sup>3, met<sup>-</sup>3am</i>	21

ファージ株	参考文献
$\lambda$ cI857 <i>psu</i> <sup>+2</sup>	20
$\Phi$ 80 <i>psu</i> <sup>+3</sup> A1G82	19
$\lambda$ gt11	54

図1 本研究に使用した大腸菌株およびファージ株

	2 x YT	1.6 % bacto-tryptone, 1.0% Yeast extract, 0.5% NaCl
	LB	1.0 % bacto-tryptone, 0.5 % Yeast extract, 1.0 % NaCl
	Buffer A	20 mM diethanolamine-HCl, 100 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 10% glucerol, pH 8.5
	PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluoride, 0.5 mM per gram wet cells
	Buffer B	20 mM bis-tris-HCl, 100 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 10% glycerol, pH 5.4
	Buffer C	20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 10% glycerol)
	Amino-acylation buffer	20 mM HEPES-KOH, 10 mM Mg-Acetate, 50 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, 0.75 $\mu$ M [ $^3$ H] glutamine, 10 mg/ml total tRNA from <i>E. coli</i> MRE600 (Boehringer)

## 図2 使用した培地等の条件

本研究で使用した培地および緩衝液を表にまとめた。

- 
- 
1. BT52*glnS*<sup>ts</sup>株をプレーティングし、42度で生育できる株をとる。
  2. single colony isolation
  3. カルチャーにし、 $\lambda$ cI857su<sup>+</sup>2および $\phi$ 80su<sup>+</sup>3 A1G82にクロス・ストリーク。
  4. *lacZ*<sub>am</sub>のサプレッション・パターンを比較し、特徴的な株を選び出す。
  5. それぞれの株に、 $\lambda$ cI857su<sup>+</sup>2あるいは $\lambda$ gt11 (*lacZ*<sup>+</sup>)を溶原化する。
  6. 変異株と、それぞれのファージ溶原菌について、LacZ活性を測定。
  7. サプレッサー特異的にチャージング効率の変化した株を選び、*glnS*遺伝子の塩基配列を決定する。
- 
- 

### 図3 変異株分離のスキーム

復帰株をとるのに用いたBT52*glnS*<sup>ts</sup>株は*lacZ*<sub>am</sub>のマーカールを持っているため、*lacZ*<sup>+</sup>やsu<sup>+</sup>2を外部から導入し、LacZ Unitを測定することができる。この方法によりサプレッサー特異的にチャージング効率の変化した株を3株見つけ、そのうち最も安定な一株について*glnS*遺伝子の塩基配列を解析した。

した30の系で行った。一晚の培養の後、30枚のプレートは1個から約200個までの、様々な数のコロニーを形成した。それらの株は、増殖の良い大きなコロニーから非常に増殖速度の遅い小さなコロニーまで、さまざまなコロニーサイズを示していた。

それらの温度感受性復帰株より、増殖速度がもとのBT52*glnS*<sup>Δs</sup>株と変わらないものをコロニーサイズを指標として、各プレートから一つずつ、合計30株選んだ。これは、GlnRSのtrue revertant（すなわちこの場合、E222E株）を避けるためであった。なぜならこの実験の目的は、偽復帰株（Pseudo revertant）を多数分離することで、*glnS*内の様々な箇所に変異の落ちた大腸菌を出来るだけ多く分離することだからである。その意味で、温度感受性復帰株が様々なコロニーサイズを示すということは好ましいことであった。このことはこのE222Kという温度感受性変異が、多くの偽復帰株を産生しやすい変異であったことを物語っている。実際にこの温度感受性変異株は、後述のように37℃でも増殖可能であり、あまりsensitive過ぎない株であった。

そのようにして得られた温度感受性復帰株30株を、30℃のLB液体培地中で振盪し、終夜培養液を作った。IPTGとX-galを含んだLB寒天培地に、前項で触れた二種のファージ、 $\lambda$ cI857psu<sup>+</sup>2と $\phi$ 80hpsu<sup>+</sup>3 A1G82（それぞれ $2 \times 10^9$  pfuを確認している）を50 $\mu$ lずつ線状にのせて乾かした。このプレートに対し、先の終夜培養液を、1ループ（およそ20 $\mu$ l）ずつクロスストリークしていった。 $\lambda$ cI857psu<sup>+</sup>2は低温においてより溶原化しやすく、鮮明なサプレッション・パターンを期待できるため、プレートの保温は30℃で行った。

#### d) 変異の位置の同定

興味深い性質を示した1株について、図4に示した*glnS*プライマーを用いてPCRを行った。酵素には東洋紡のTaq polymeraseを使用し、クローニングにはプロメガ社のTA cloning systemを用いた。得られたプラスミドのうち一つの、*glnS*遺伝子を全長に渡ってシーケンスした。酵素にはUSBのSequenase ver. 2.0を、ポリアクリルアミドゲ

1 ttttaaaaaa ctaacagttg tcagcctgtc ccgcttataa gatcatacgc cgttatacgt  
MD30 G3  
61 tgttttacgct ttgaggaatc cacgatgagt gaggcagaag cccgcccgac taactttatc  
121 cgtcagatca tcgatgaaga tctggccagt ggtaagcaca ccacagtaca cacccgtttc  
181 ccgccggagc cgaatggcta tctgcatatt ggccatgcga aatctatctg cctgaacttc  
G4  
241 gggatcgccc aggactataa aggccagtgc aacctgcggt tcgacgacac taaccggta  
301 aaagaagata tcgagtatgt tgagtcgatc aaaaacgacg tagagtggtt aggttttcac  
G5  
361 tggctctggta acgtccgta ctctccgat tattttgatc agctccacgc ctatgcgatc  
421 gaactgatca ataaaggcct ggcgtacggt gatgaactga cgccggaaca gatccgcgaa  
G6  
481 taccgcgga ccctgacgca accgggtaaa aacagcccgt accgcgaccg cagcgttgaa  
541 gagaacctgg cgctgttcga aaaaatgcgt gccggtgggt ttgaagaagg taagacctgc  
601 ctgcgtgcga aaatcgacat ggcttcaccg tttatcgtga tgcgcgatcc ggtgctgtac  
G7  
661 cgtattaaat ttgctgaaca ccaccagact ggcaacaagt ggtgcatcta cccgatgtac  
721 gacttcaccc actgcatcag cgatgcctg gaaggtatta cgcactctct gtgtacgctt  
G8  
781 gagttccagg acaaccgtcg tctgtacgac tgggtactgg acaacatcac gattcctggt  
841 caccgcgccc agtatgagtt ctgcgcctg aatctggaat acaccgtgat gtccaagcgt  
G9  
901 aagttgaacc tgctggtgac cgacaagcac gttgaaggct gggatgacct gcgatgccg  
961 accatttccg gtctgcgctg tcgtggttac actgcggtt ctattcgtga gttctgcaa  
G10  
1021 cgcacggcg tgaccaagca ggacaacacc attgagatgg cgtcgcgga atcctgcatc

図4 *glnS*遺伝子の全配列とプライマー（次頁に続く）

1081 cgtgaagatc tcaacgaaaa tgcgccgcgc gcaatggcgg ttatcgatcc ggtgaaactg  
 1141 gttatcgaaa actatcaggg cgaaggcgaa atggttacca tgccgaacca tccgaacaaa  
 G11 →  
 1201 ccggaaatgg gcagccgtca ggtgccgttt agcggtgaga tttggattga tcgcgccgat  
 1261 ttccgcgaag aagctaacaa gcagtacaaa cgtctggtgc tgggtaaaga agtgcgtctg  
 G12 →  
 1321 cgtaatgctt atgtgattaa ggcagaacgc gtcgagaaag atgccgaagg taatatacacc  
 1381 accatcttct gtacttatga cgccgatacc ttaagcaaag atccggcaga tggtcgtaaa  
 1441 gtcaaaggtg ttattcactg ggtgagcgcg gcacatgcgc tgccggttga aatccgtttg  
 G13 →  
 1501 tatgaccgtc tcttcagcgt gcctaacca ggtgctgcgg atgatttcct gtcggtgatt  
 1561 aaccgggaat cgctggtgat caaacagggc tttgctgaac cgtcgctgaa agatgcggtt  
 G14 →  
 1621 gcgggtaaag cattccagtt tgagcgtgaa ggttacttct gcctcgatag ccgccattct  
 1681 acggcggaaa aaccggtatt taaccgcacc gttgggctcc gtgatactgg gcgaaagtag  
 1741 gcgagtaatt ttaagtttcg ctatgccgga tggggcgttt acgtcgcac cggcaaggaa  
 ← MD1782  
 1801 cagacaaaca gtttcaaacg ctaa

(Primers for site-directed mutagenesis)

E222K-1; tgccctgaaaggattacgcactc  
 E222K-2; gtgcgtaatacctttcagggcatc  
 C171G-1; aaagccggcctgcgtgcaaaaac  
 C171G-2; ttttcgcacgcaggccggctttac

(glnS ORF; 88-1746)

## 図4 *glnS*遺伝子の全配列とプライマー

本研究に使用したプライマーの配列を示した。プライマーには、1) *glnS*のPCRに使われたもの、2) *glnS*遺伝子のシーケンスに使われたもの、3) overlap extension mutagenesisに使用したもの、の3種類がある。なお、1)のプライマーは、overlap extensionにも使用した。

プライマーはバイオロジカおよびクルアケム株式会社に発注した。

ル電気泳動にはロングレンジャーを使用した。データベースにある *glnS* 遺伝子配列と比較して、このクローンには合計五つの変異が見つかったが、それらのうちいくつかはPCR時の複製エラーによるものであると考えられた。そのためPCRの段階から独立に得られた変異 *glnS* プラスミドを、その五カ所に限ってシーケンスすることにより、変異の数は二つにしばられた。なお、プライマーからの伸長により配列を決定できない部分については、部分的に欠失変異を作成した。その方法にはPCRを用いた新しい方法(主論文の基礎となる論文1)が使用された。

*glnS* 内部に設計されたプライマーについては、図4にまとめてある。

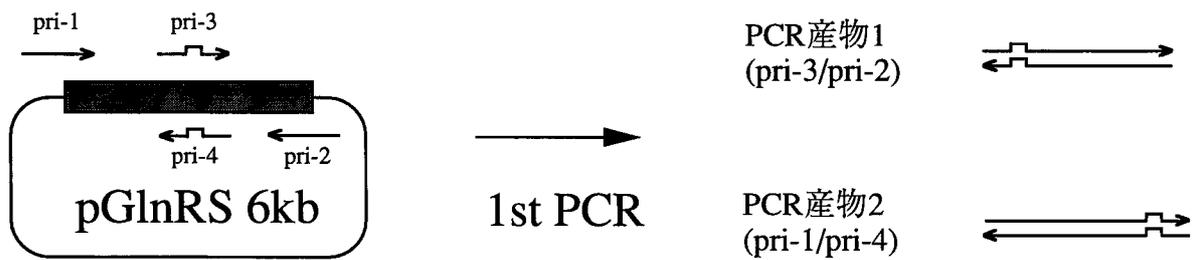
#### e) 変異 *GlnRS* プラスミドの作成

図5に示した方法により変異 *GlnRS* プラスミドを作成した。

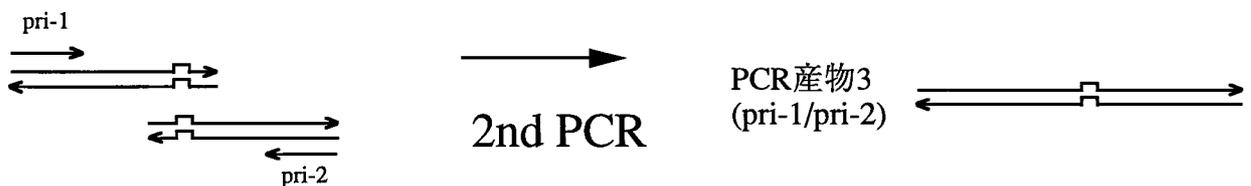
この変異 *GlnRS* を生化学的に解析するには、プラスミドにクローニングし直す必要があった。変異の位置を決めるために行ったクローニングでは、酵素として Fidelity の高くない Taq polymerase を使用したため (これは TA cloning (33) に必要であった)、本来染色体上にない変異まで含んでプラスミドにのせてしまっていた。そのため、正確にその二つの変異しか持たない *glnS* をプラスミドにのせる必要があった。

検討した結果、新たにクローニングするのではなく、pBR322 プラスミドにクローニングされた野生型 *glnS* を、site-directed mutagenesis によって変異させることにより、正しく二つの変異のみを持つ変異 *glnS* クローンを得ることを試みることとなった。

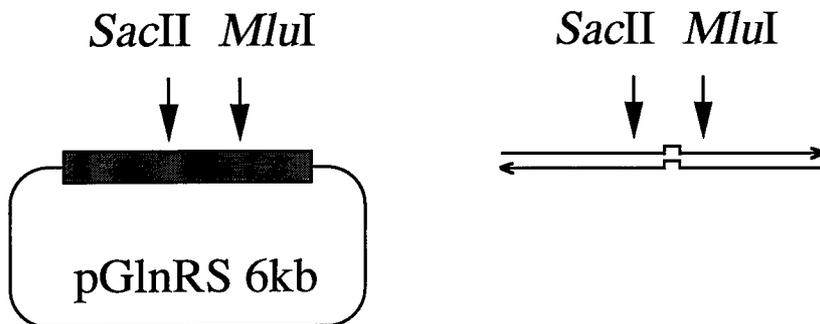
site-directed mutagenesis は、PCR を利用した overlap extension 法 (33) を用いた。プライマーおよび操作の流れは図5の通りである。得られたクローンを *glnS<sup>ts</sup>* 株である UT172 に導入し、温度感受性を確認した。その結果、E222K の導入により *glnS* 温度感受性のプラスミドが得られ (得られた8株のうち6株が温度感受性を示した)、独立な4株をシーケンスしたところ、その全てが正しい E222K 変異株であった。同様に温度感受性株に対して C171G を導入することにより、37°C での耐性が若干向上した UT172 株を得ることが出来た (図16参照)。この場合にも、独立な3株をシーケンス



第一段階でのPCR。野生型GlnRSプラスミドを鋳型とし、pri-3とpri-2、pri-1とpri-4の二種類のPCRを、独立に行った。得られた二種のPCR産物をアガロースゲル電気泳動により精製し、第二段階のPCRの鋳型とした。



第二段階でのPCR。上記の二種のPCR産物を鋳型とし、pri-1とpri-2によりPCRを行った。その結果、E222Kが導入された変異glnS遺伝子の断片が得られた。



*glnS*を一カ所のみで切断し、プラスミドの他の部分を切断しない酵素、*SacII*と*MluI*を用いて、プラスミド上の*SacII* *MluI*断片をPCR産物3の同断片と置換した。ライゲーション、トランスフォーメーションの後、ダイデオキシ・シーケンシング反応によりDNA上でのE222K変異の導入を確認した。変異導入効率は100%であった。また同様に、野生型pGlnRS 6kbを鋳型にしてC171G変異を導入し、同時に並行して上記E222K変異pGlnRS 6kbを鋳型にしてE222K/C171G二重変異株を作成した。

図5 変異GlnRSプラスミドの構築方法

したうちその全てが、正しい二重変異株 (E222K&C171G) であった。なお後の実験でコントロールとして用いるため、この第二段階の変異導入時に、鑄型として野生型の *glnS* プラスミドを用い、single mutant (C171G) も同時に作成した。

これらに使われた野生型の *GlnRS* プラスミドは、Yale大学のKwang-won Hong博士より贈られた。

## 2. 変異株の *in vivo* での解析

### a) 増殖速度の比較

増殖速度の比較は、変異株の終夜培養液 (30℃でLB培地で培養したもの) を、あらかじめ保温しておいた同じ培地に対してO.D.<sub>600</sub> = 0.005となるように希釈し、30℃で振盪培養することで行った。菌数の指標としてはO.D.<sub>600</sub>を用い、初めに20ml培養した中から0.5mlずつとって一時間毎にO.D.メータにのせる、という方法をとった。

### b) 温度感受性

変異 *glnS* をもつプラスミドを検定する場合など、温度感受性の強さを判定する場合、1ループの終夜培養液を、プレートの4分の1区画にストリークし、30℃あるいは42℃で一晩保温する、という方法をとった。感受性の強度は生えてきた菌の濃淡により、目分量で測定した。したがって *in vivo* での温度感受性を定量化したデータはない。

### c) サプレッション効率の評価

変異株#1、#5、#11ともとのBT52 *glnS*<sup>ts</sup> 株について、su<sup>+</sup>2によるサプレッション効率を定量化し、評価した。前述のλcI857psu<sup>+</sup>2をそれぞれに溶原化し、プロファージが安定に保たれる溶原菌のシングルコロニーを単離した。

それらの株をLB液体培地で培養し、Millerらの方法 (31) によってLacZ Unitを測定した。また、そこで得られたLacZ Unitの差異が、LacZ発現そのものの変化に起因す

るものではないことを確認するため、4株のサンプルそれぞれに $\lambda$ gt11 (54) を溶原化したものを用い、それぞれのLacZ Unitを測定した。 $\lambda$ gt11は野生型のLacZを発現するため、ここで得られたLacZ Unitはそれぞれの株がLacZを発現する能力を示している。この数値を使って、先に得られたサプレッションによるLacZ活性の値を標準化した。

#### d) ミスチャージング活性

プラスミド上に構築された三つの変異GlnRSを使って、tRNA<sup>Lys</sup>由来のsu<sup>+</sup>3に対するミスチャージング活性を測定した。前述のBT32株を用い、プラスミドを導入した後、定法に従ってLacZ活性を定量した。このLacZ活性によるミスチャージング活性の定量化は、図6に簡単にまとめてある。

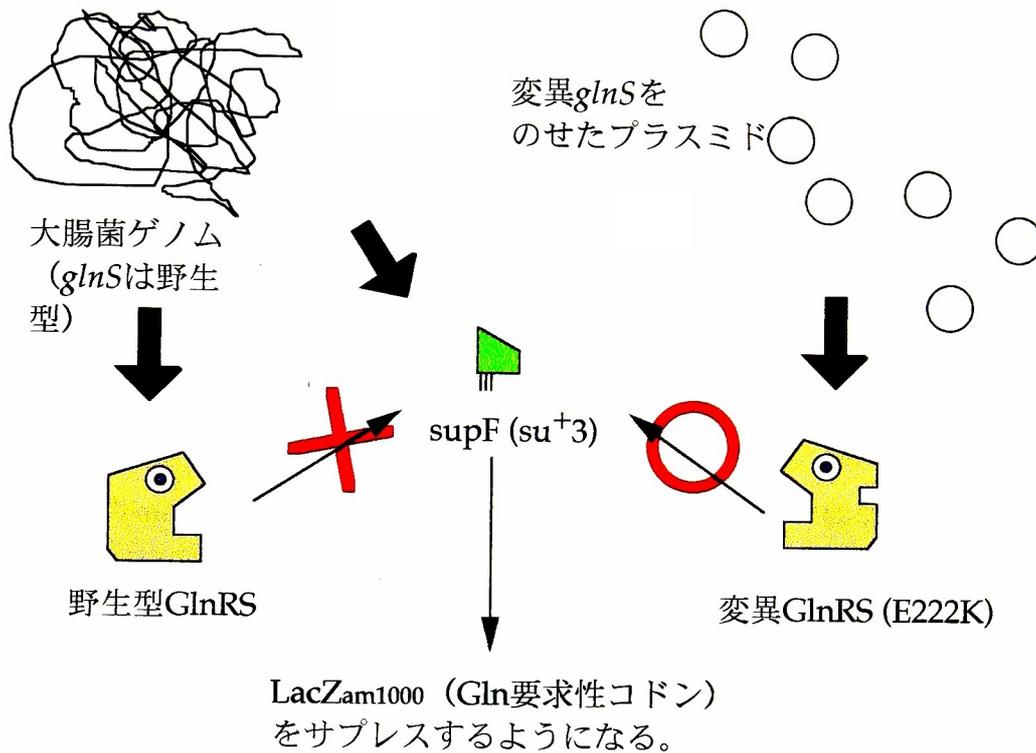
### 3. 変異GlnRSの大量発現と精製

#### a) 菌株と培養方法

変異GlnRSの二つ、E222K株とC171G&E222K株について、大量発現し、タンパク質精製を行った。前者のプラスミドの宿主株としてはBT32-13*glnS*<sup>ΔS</sup>株を使用した。この株は温度感受性株で、E222K変異を持つ*glnS*遺伝子を染色体上に持っている。また後者のプラスミドには、宿主株として、当の変異*glnS*を分離した温度感受性復帰株#1を用いた。どちらの場合にも、プラスミドから発現されるGlnRSと、染色体から発現されるGlnRSは、同じ変異を持っている。

E222Kプラスミドについては、BT32-13*glnS*<sup>ΔS</sup>株に導入した時点で温度感受性のチェックを行い、37℃まではしっかりしたコロニーを形成するものの、42℃では全く生育できない、ということを確認した。

タンパク質精製のための培養は500mlのLBにより行った。アンピシリンの濃度はプラスミドのコピー数を高く保つために100 $\mu$ g/mlとし、振盪中、O.D.<sub>600</sub> = 0.7となった時点でアンピシリンをさらに50 $\mu$ g/ml加えた。これは培養中に分解されて低くなっ



## 図6 ミスチャージング活性の測定方法

活性を測定した三種の変異GlnRSは、それぞれBT32株に保持されたプラスミドより発現された。BT32株は野生型のGlnRSを持つが、野生型GlnRSはほとんど $su^{+3}$ に対しグルタミンをつけることが出来ないの  
で、図17で確認されたLacZの活性は概ねプラスミドの変異GlnRSによるものと考えられる。BT32株のもつLacZ<sup>am1000</sup>というマーカーはグルタミンにより活性を持つようになるが、自分の生産する $su^{+3}$  (チロシン) では活性を持たない。そのため、図17で観察されるLacZの活性は、プラスミド由来の変異GlnRSが誤って $su^{+3}$ を認識してしまう効率を反映していると考えられる。

たアンピシリン濃度を補うためである。この時点でアンピシリンの最終濃度は150 $\mu$ g/mlとなった。このままO.D.600 = 1.4 まで培養した。

#### b) タンパク精製の手順

GlnRSタンパクの精製はYale大学のDieter Soll研究室において、筆者自身が行った。大まかな手順については図7にまとめてある。

#### c) 活性の検定

精製されたGlnRSの検定には、図8のような条件を用いた。放射性同位元素で標識されたグルタミンなどの基質を含んだAminoacylation buffer (図2) 20 $\mu$ lに対し、FPLCによりmono-Qカラムを使って分離した51分画のうち、偶数分画を3 $\mu$ l加え、30 $^{\circ}$ Cで二分間保温した。その後全量を、10% TCAに浸した25枚の3MMフィルタにそれぞれのせ、アミノアシルーション反応を停止させた。フィルタの洗浄は4 $^{\circ}$ Cにおいて、10% TCAで10分 5% TCAで5分振盪し、最後に70% エタノールですすいだ後、85 $^{\circ}$ Cで15分間乾燥させた。チャージされたtRNAはTCAに不溶となり、フィルタ上に残るが、 $^3$ H標識されたグルタミンのうちアミノアシルーションに使われなかったものはTCAに可溶なため、洗浄時に除かれる。

放射活性の測定は液体シンチレーション カウンターで、 $^3$ Hの取り込みを一分間、測定した。

このようにして得られた活性分画を、次の段階のアフィニティ カラム (GlnRS抗体) に使用した。

### 4. 変異GlnRSの *in vitro*での解析

#### a) Gln kinetics

精製したGlnRS変異体の性質を調べるために、二種の酵素 (E222K株およびE222K&C171G二重変異株) について、37 $^{\circ}$ Cにおいてグルタミンに対するkineticsを

---

---

### #Day 1

Inoculate 2 x 5 mls LB-AP100; grow O/N

### #Day 2

Use 2 x 5 mls to inoculate 500mls LB-AP100; grow to ~0.7 (OD<sub>600</sub> ). Add AP50.

Harvest cells at OD<sub>600</sub> 1.2-1.4; Spin 10 mins, 6000 rpm.

Wash cells in PBS; re-spin.

Re-suspend cells in ~10 mls buffer A + PMSF.

Sonicate; spin 12,000 rpm, 10 mins.

Remove supernatant & Spin at 40,000 rpm, 90 mins.

Keep supernatant & adjust to 70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Stir gently for 1h at 4°C.

Spin 20 mins, 12,000 rpm.

Keep pellet & re-dissolve in ~3mls buffer A.

Dialyze O/N against 100 volumes buffer A.

### #Day 3

Change buffer & Dialyze for 3h.

Apply sample to Mono-Q.

Elute with pH gradient from buffer A (pH 8.5) to buffer B (pH 5.4).

Assay fractions for activity.

Pool active fractions & Dialyze O/N against PBS/5% Glycerol.

### #Day4

Apply sample to anti-GlnRS column & elute GlnRS.

Dialyze sample for 4h against 10 volumes buffer C containing 10% glycerol.

Dialyze against 100 volumes buffer C containing 50% glycerol O/N.

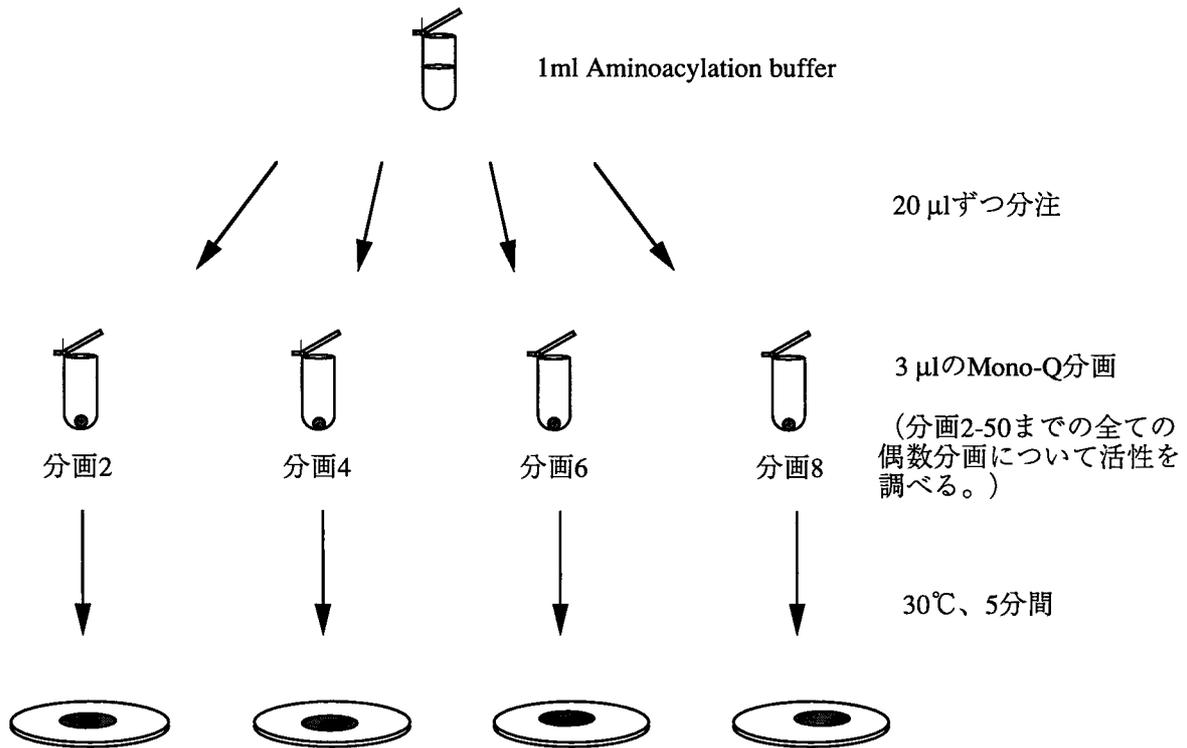
Store at -20°C

---

---

## 図7 GlnRS精製のアウトライン

使用した試薬等は図2にまとめて掲載した。



あらかじめ100µlの10% TCAで湿らせた3MMペーパーに22µlの反応液全てをのせる。

300mlの10% TCAに入れ、4°Cで10分間振盪。さらに5% TCAにより5分間洗う。

70% EtOHにより軽くすすぎ、80°Cで15分間、完全に乾燥させる。

液体シンチレーション カウンターにより、トリチウムの取り込みを一分間、計測する。

## 図8 GlnRS assayの方法

GlnRS精製の際の活性確認には、上のプロトコールを使用した。各成分を混合後、20µlをとり、あらかじめエッペンチューブに分注しておいた3µlのmono-Q分画に加えた。反応は30°Cで5分間行った。

行った。初めの段階ではグルタミンの濃度を50, 100, 200, 400, 800, 1600 (mM) としたが、二つの酵素とも非常に高いKm値を示したので、最終的には200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 (mM) という濃度を用いた。反応液は全量で30 $\mu$ l、反応時間は0, 15, 30, 45, 60, 75 (s) を使った。反応の停止には図8と同じ方法を用い、その後の洗浄と<sup>3</sup>Hのカウントも図8の方法に従った。また、グルタミン以外の成分については、図2の Aminoacylation buffer と等しくした。

#### b) 温度感受性の確認

この研究で精製したE222KおよびE222K&C171Gの二つの変異GlnRSに、Yale大学のMichael Ibba博士から譲られた野生型GlnRSを加えた三つの酵素に対し、温度感受性を検定する実験を行った。用いた温度は25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 (°C) であり、反応液は全量で25 $\mu$ l、時間は0, 15, 30, 45, 60, 75 (s) であった。反応液の組成は以下の通りである。

ATP;	5 mM		
total tRNA from E. coli;	4 $\mu$ g/ $\mu$ l		
HEPES;	100 mM		
Mg Acetate;	10 mM		
Glutamine;	2 x Km, i.e. for	E222K,	6 mM
		E222K&C171G,	3 mM
		Wild type,	500 $\mu$ M
Enzyme;		E222K,	40nM
		E222K&C171G,	40nM
		Wild type,	10nM

## 結果

### 1. su<sup>+</sup>2に対する認識効率が低い新奇なGlnRS変異株

#### a) BT52*glnS*<sup>ts</sup>から得られるさまざまな偽復帰株

「材料と方法」1-c) で示した方法で、BT52*glnS*<sup>ts</sup>より独立に30の偽復帰株を選択した。選択の過程で様々なコロニー・サイズを確認し、親株の持つ変異GlnRS (E222K) が、多種の偽復帰株を産生しうる温度感受性変異であることが推測された。

得られた偽復帰株のうち初めの11株について、シングル・コロニーを単離し、LB液体培地を用いて30℃にて増殖曲線を描く実験を行った。30℃という温度を用いたのは、親株であるBT52*glnS*<sup>ts</sup>と増殖速度を比較するためである。図9にその結果を示したが、これら11株の偽復帰株は、野生型とは大きく異なり、BT52*glnS*<sup>ts</sup>とほぼ同じ増殖速度を示すことが分かった。BT52*glnS*<sup>ts</sup>自身はλ*glnS*<sup>wt</sup>の導入により増殖速度を回復する（図16参照）ので、これらの株の増殖速度はそれぞれのもつGlnRSの活性と正の相関関係があると考えられる。コロニー・サイズの同等な株を選択しているため、図9の結果となった。

これらの結果から、初めの11株については、真の復帰株 (true revertant) ではなく、偽復帰株であると結論した。一枚のプレートからそれぞれ一つしかコロニーを選ばなかったが、コロニー サイズが同程度のものを選択しているため、中には当然同じ変異を持つ株も含まれ得る。しかしながら出来るだけ偽復帰株の多様性を確保するために、独立なプレートより変異株を採集した。

この方法を用いて、最終的には、*glnS*内部の様々な箇所に変異を持ち、しかも野生型tRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>に対する認識効率（GlnRSの活性）がほぼ等しいGlnRSの変異株が、独立に30株集められたことになる。

#### b) su<sup>+</sup>2およびsu<sup>+</sup>3 A1G82を用いたサプレッション効率の試験

上述のように集められた30株に対し、サプレッサーに対する認識効率をチェック

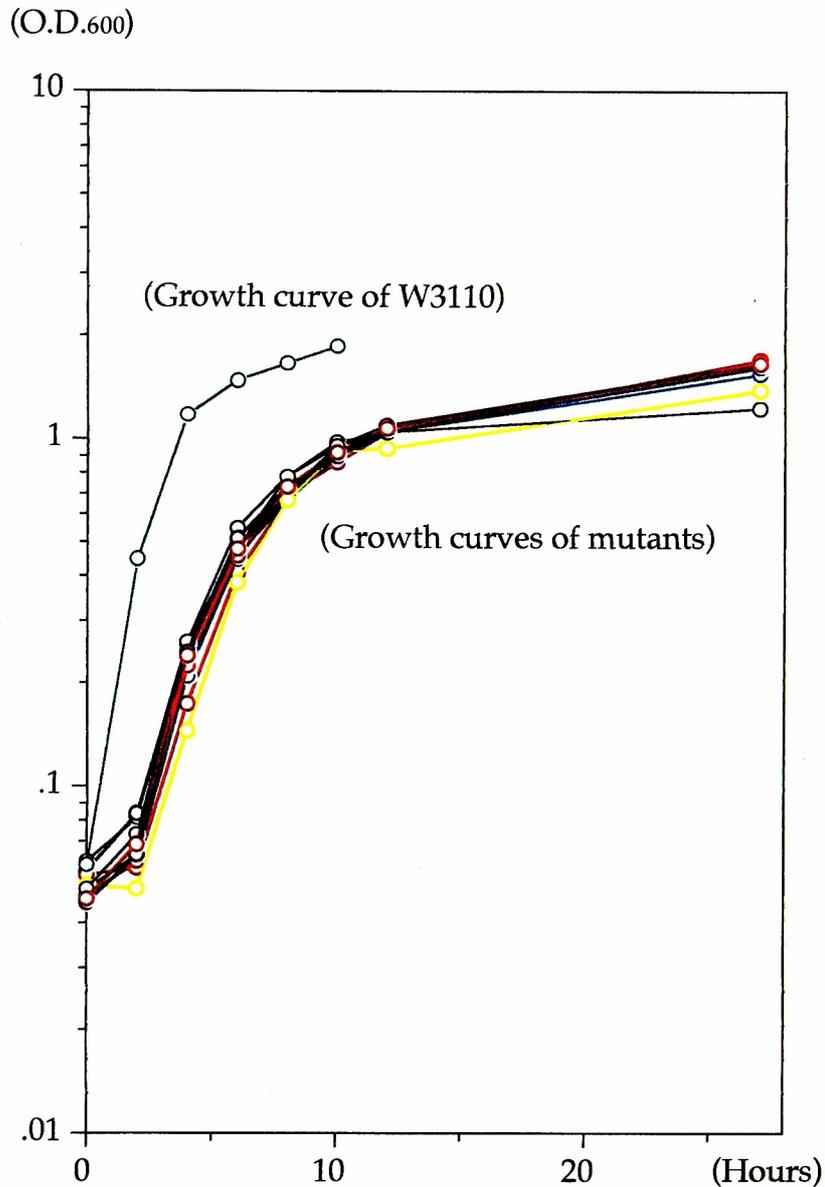


図9 BT52*glnS*<sup>ts</sup>株から得た復帰株の、30℃での増殖曲線

復帰株9株と、もとのBT52*glnS*<sup>ts</sup>株について、30℃における増殖速度を比較した。参考として野生株W3110の同条件での増殖速度を提示してあるが、選択の過程で同程度のコロニーサイズのものを選んでいたので、これらの復帰株で増殖速度が野生株並に回復するものは見られなかった。温度感受性株と同程度であった。なお、野生型*glnS*をファージを使って導入することによりこれらの株の増殖速度は回復するので、これらの増殖速度は*glnS*の活性に依存していると考えられる。

するため、su<sup>+</sup>2およびsu<sup>+</sup>3 A1G82をそれぞれ生産するファージを使って、クロス・ストリーク実験を行った。これらの株は全てlacZ<sub>am1000</sub>を持つため、グルタミンをチャージするサプレッサー-tRNAを導入することでIPTG/X-galプレートを青く着色する。大腸菌株およびファージ株についての詳細は「材料と方法」1-(a)にまとめた。

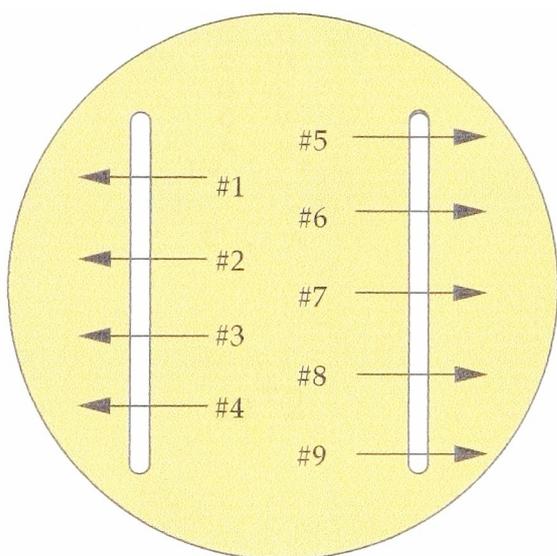
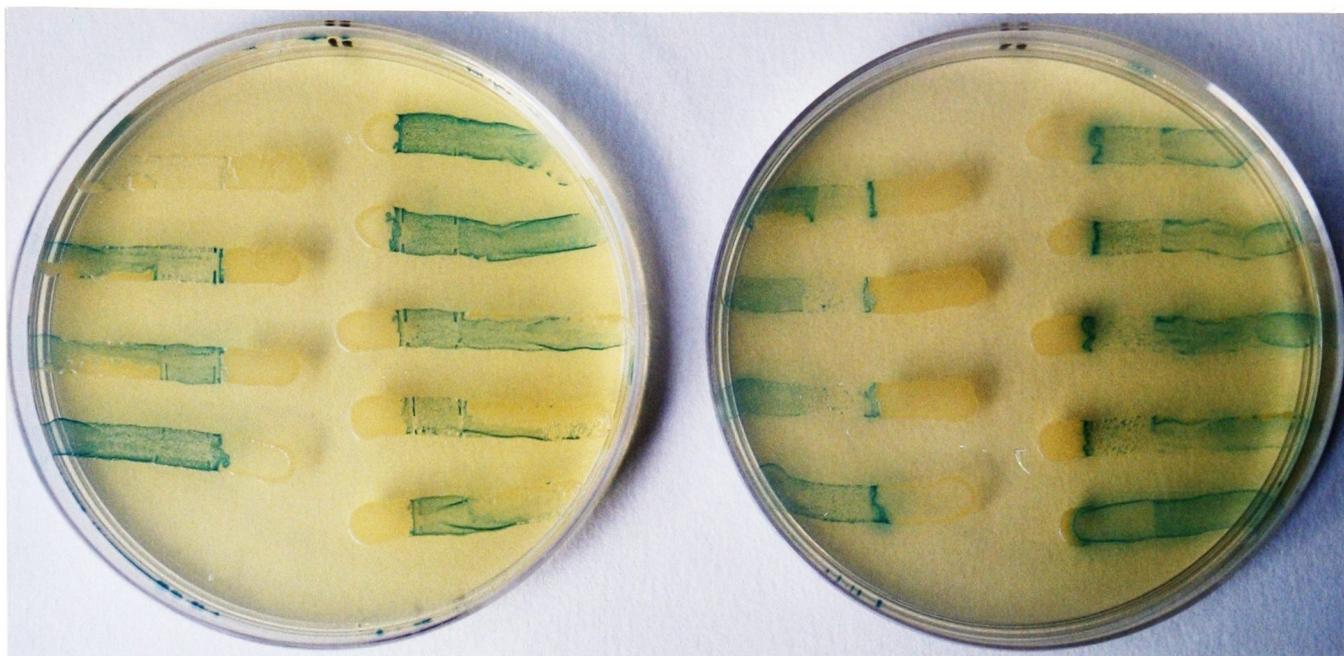
初めの9株について調べた結果を図10に示してある。それぞれ、#1から#30までの名前を付けたが、この中では#1がsu<sup>+</sup>2によるサプレッション効率が低い、ということが分かった。前項で触れたように#1から#11については増殖速度から、野生型tRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>に対するGlnRSの認識はほぼ等しいということが分かっており、サプレッション効率の低さは、変異GlnRSの一般的な活性の低さによるものではない。この実験では同時に、ディスクリミネータ付近に変異を持つためにグルタミンをチャージするようになったsu<sup>+</sup>3 A1G82 (su<sup>+</sup>2とsu<sup>+</sup>3の比較を図11にのせた) とのクロス・ストリークを示しているが、それによれば#1株は他の株と同様、非常に効果的にサプレッスされている。これは#1の持つlacZ<sub>am1000</sub>自体は変異を受けていないことを示す。

#1以外にも、サプレッション効率の低い株#11や、逆により効率的にサプレッスされるようになった#5などの株が見られた。#12以降の株についても同様の割合でsu<sup>+</sup>2に対する認識効率に異常の見られる株が見られたが、ここでは増殖速度の検討から野生型tRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>に対する認識効率もとのBT53glnS<sup>ts</sup>とほぼ等しいと考えられる初めの11株のうちから、次の段階の定量化を行う変異株を選択した。またこの実験系においては同時に、グルタミンtRNAとしての強い正のアイデンティティA1G82を持つsu<sup>+</sup>3を、認識することの出来ない変異GlnRSが現れることを期待したが、30株のうちにはそのような株は現れなかった。

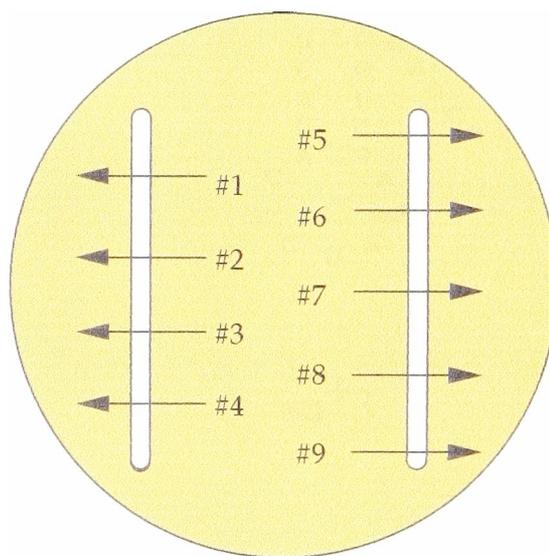
#### c) LacZを用いたsu<sup>+</sup>2に対する認識効率の定量化

クロス・ストリーク実験によりsu<sup>+</sup>2に対する認識効率に異常が見られる株 (#1, #5, #11) を選び、LacZ単位の測定によるsu<sup>+</sup>2認識効率の定量化を行った。方法の詳細は「材料と方法」2-(c)の通りである。結果を図12に示す。

λcI857psu<sup>+</sup>2を上記三つの変異株およびBT52glnS<sup>ts</sup>に溶原化させ、サプレッションに



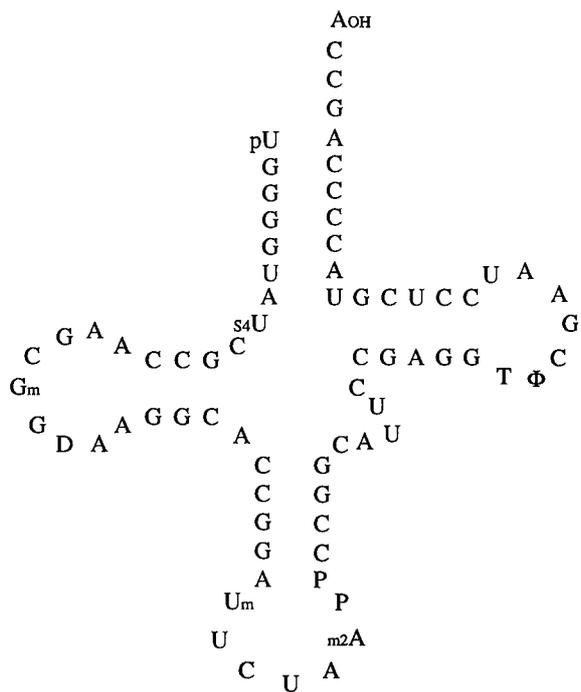
λcI857 su<sup>+</sup>2



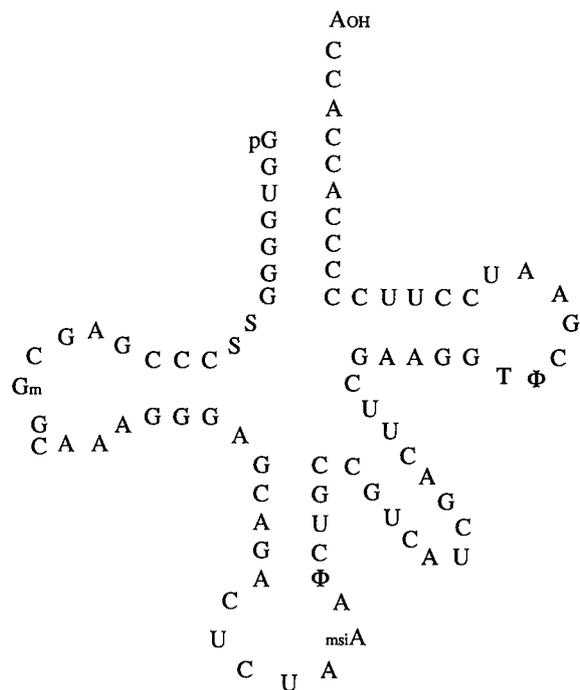
φ80 su<sup>+</sup>3 A1G82

### 図10 二重変異株 (C171G&E222K) の性質

su<sup>+</sup>2を生産するラムダファージとクロスストリークすると、この二重変異株は他の株に比べてLacZ-amの相補効率が悪いことが分かる。プレートにはIPTGとX-galが含まれている。なお、#1が今回取り上げている変異株であり、この写真でテストしている他の株は、同時に得られたglnS E222Kからの他の偽復帰株である。



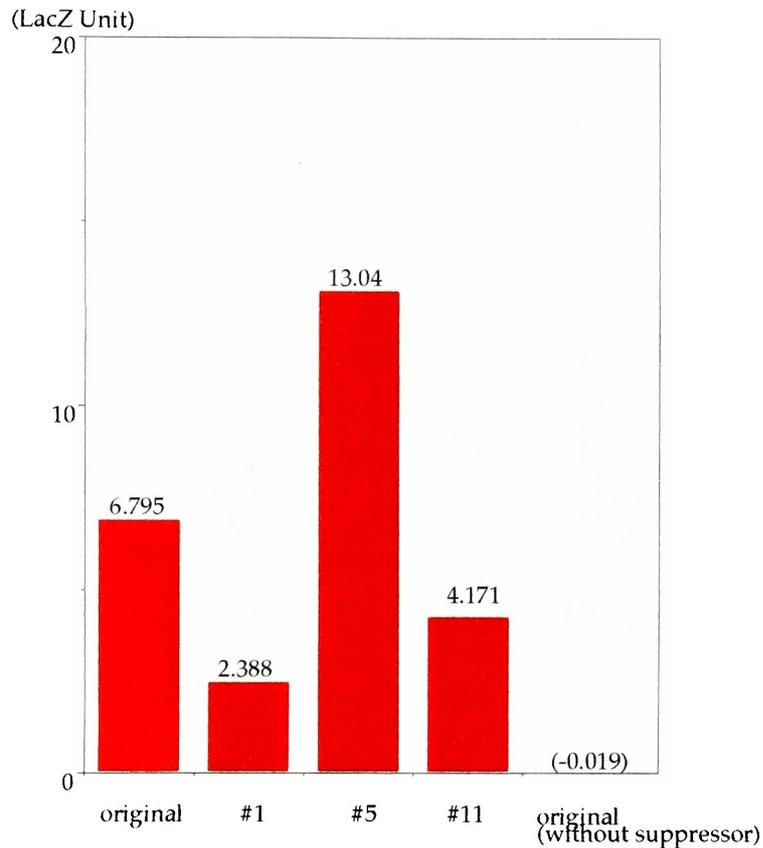
su<sup>+</sup>2



su<sup>+</sup>3

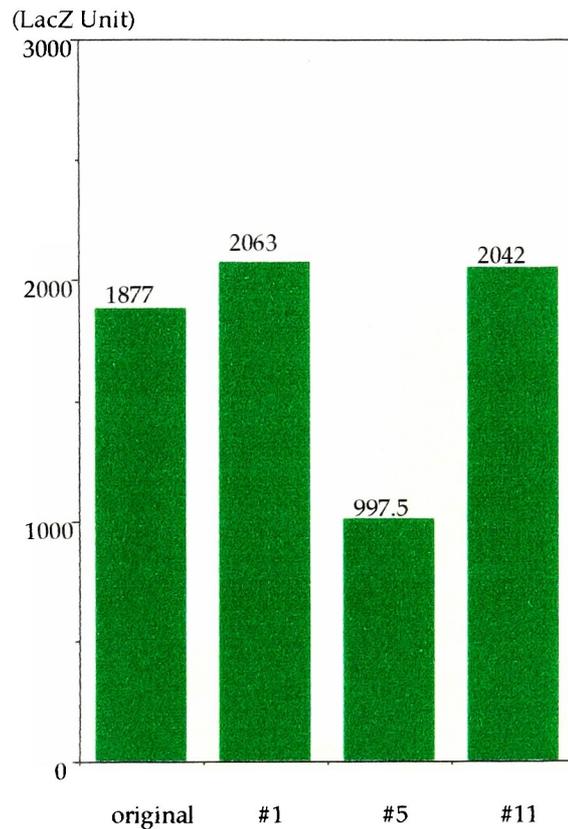
図11 su<sup>+</sup>2とsu<sup>+</sup>3

su<sup>+</sup>2およびsu<sup>+</sup>3のクローバ・リーフ構造。su<sup>+</sup>2のディスクリミネータがU・Aなのに対し、su<sup>+</sup>3ではG・Cである。



## 図12 LacZ活性による変異株の解析(A)

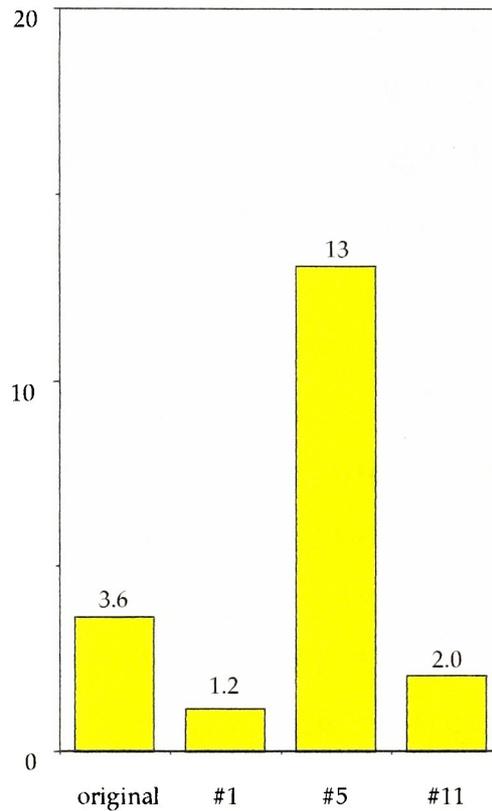
それぞれの変異株に、 $\lambda$ CI<sub>857</sub>Su<sup>+</sup>2を溶原化し、*lacZ*<sub>am</sub>がどの程度サプレスされるかを測定した。図2の写真から予想されたとおり、#1および#11株はもとの株と比較してサプレッションの活性が低かった。



## 図12 LacZ活性による変異株の解析(B)

サプレッションにより変異株の示したLacZの活性が、サプレッサーへのチャージング効率の差異によるものかどうかを調べるため、それぞれの株の中で野生型のLacZを発現させ、活性を測定した。その結果、サプレッション活性の低い株も野生型のLacZを通常レベル発現できることが分かった。これはこの株の変異GlnRSが、単に活性の低下していたりLacZのシステムそのものに欠損をおこしているものではない、ということを示している。

(Relative efficiency)



## 図12 LacZ活性による変異株の解析(C)

サブプレッション効率の差異を、野生型LacZを発現させた場合のLacZ活性によって標準化し、比較した。サブプレッションの効率が悪い#1と#11の他に、むしろもとの株より効率が良く、しかも野生型LacZや増殖速度などから見た野生型tRNA<sup>Gln</sup>へのチャージングは劣っている#5のような株も含まれていた。

よるLacZの発現量を、Millerらの方法によって定量化した（図12A）。図11の試験においてサプレッション効率が低いと見られていた#1と#11はもとのBT52*glnS*<sup>ts</sup>よりも低い発現量を示し、特に#1についてはもとの株の約3分の1のサプレッション効率であった。また、サプレッションが効率的に行われると考えられた#5については、親株と比較して二倍近いサプレッション効率が得られていることが分かった。

これらのデータを標準化するため、三つの偽復帰株#1, #5, #11およびBT52*glnS*<sup>ts</sup>のそれぞれに $\lambda$ gt11を導入した溶原菌を用い、LacZ活性を測定した（図12B）。これらの偽復帰株がsu<sup>+</sup>2によって示す特徴的なサプレッション効率が、これらの持つ変異GlnRSの一般的な活性によるものでないことを確認するためである。 $\lambda$ gt11は選択マーカーとして、完全な野生型*lacZ*を持つ(54)。

#1と#11は、ほぼ親株のBT53*glnS*<sup>ts</sup>と同程度のLacZ発現量を示した（図12B）。#5は、su<sup>+</sup>2の導入によりBT53*glnS*<sup>ts</sup>よりも強いサプレッション効率を示すにも関わらず、野生型*lacZ*を導入した場合のLacZ発現量は、他の株の半分程度であった。

野生型*lacZ*遺伝子によるLacZ発現量を用いて図12Aのサプレッション効率を標準化したのが、図12Cである。#1はやはり、BT52*glnS*<sup>ts</sup>に対して、約3分の1程度のサプレッション効率を示し、#5は対照的に3倍以上の高いサプレッション効率を示した。他の2株も非常に興味深い性質を示しているが、本稿では対象を#1株のみにしぼって、詳細な解析を進めることとした。

## 2. 変異の位置とその効果

### a) 遺伝子の上から#1株の変異の位置を同定する

変異株分離の方法からみて、これらの偽復帰株は温度感受性変異 (E222K) 以外にも一つ、*glnS*遺伝子の内部に変異を持つことが想定された。そこで*glnS*を増幅するためのプライマーを用いて、PCRによって変異*glnS*遺伝子を増幅し、プラスミドにクローニングして、ダイデオキシ法により遺伝子配列を決定した。その結果、図13と図14に示したように、C171GとE222Kという、二つの変異が検出された。このうち

```

      490      500      510      520      530      540
taccgcggcaccctgacgcaaccgggtaaaaaacagcccgtaccgcgaccgcagcgttgaa
Y R G T L T Q P G K N S P Y R D R S V E

      550      560      570      580      590      ggc
gagaacctggcgctgttcgaaaaaatgcgtgccgggtggttttgaagaaggtaaagcctgc
E N L A L F E K M R A G G F E E G K A C

      610      620      630      640      650      660
ctgcgtgcgaaaatcgacatggcttcaccgtttatcgtgatgcgcgatccgggtgctgtac
L R A K I D M A S P F I V M R D P V L Y

      670      680      690      700      710      720
cgtattaaatttgctgaacaccaccagactggcaacaagtggatctaccgatgtac
R I K F A E H H Q T G N K W C I Y P M Y

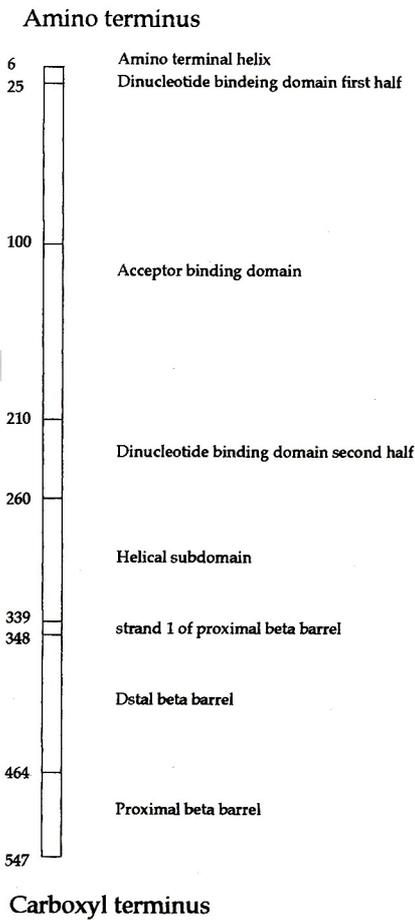
      730      740      750aaa      760      770      780
gacttcacccactgcatcagcgatgccctggaaggattacgcactctctgtgtacgctt
D F T H C I S D A L E G I T H S L C T L

      790      800      810      820      830      840
gagttccaggacaaccgctcgtctgtacgactgggtactggacaacatcacgattcctggt
E F Q D N R R L Y D W V L D N I T I P V

```

### 図13 変異の位置

*glnS*における変異E222KおよびC171Gの位置を示してある。  
 なお、*glnS*の全遺伝子配列については図4に掲載した。



## 図14 変異株#1のGlnRSにある変異の位置

変異の位置は、予想されたアンチコドン認識部位ではなく、むしろアクセプター・ステム結合部位であることが分かった。

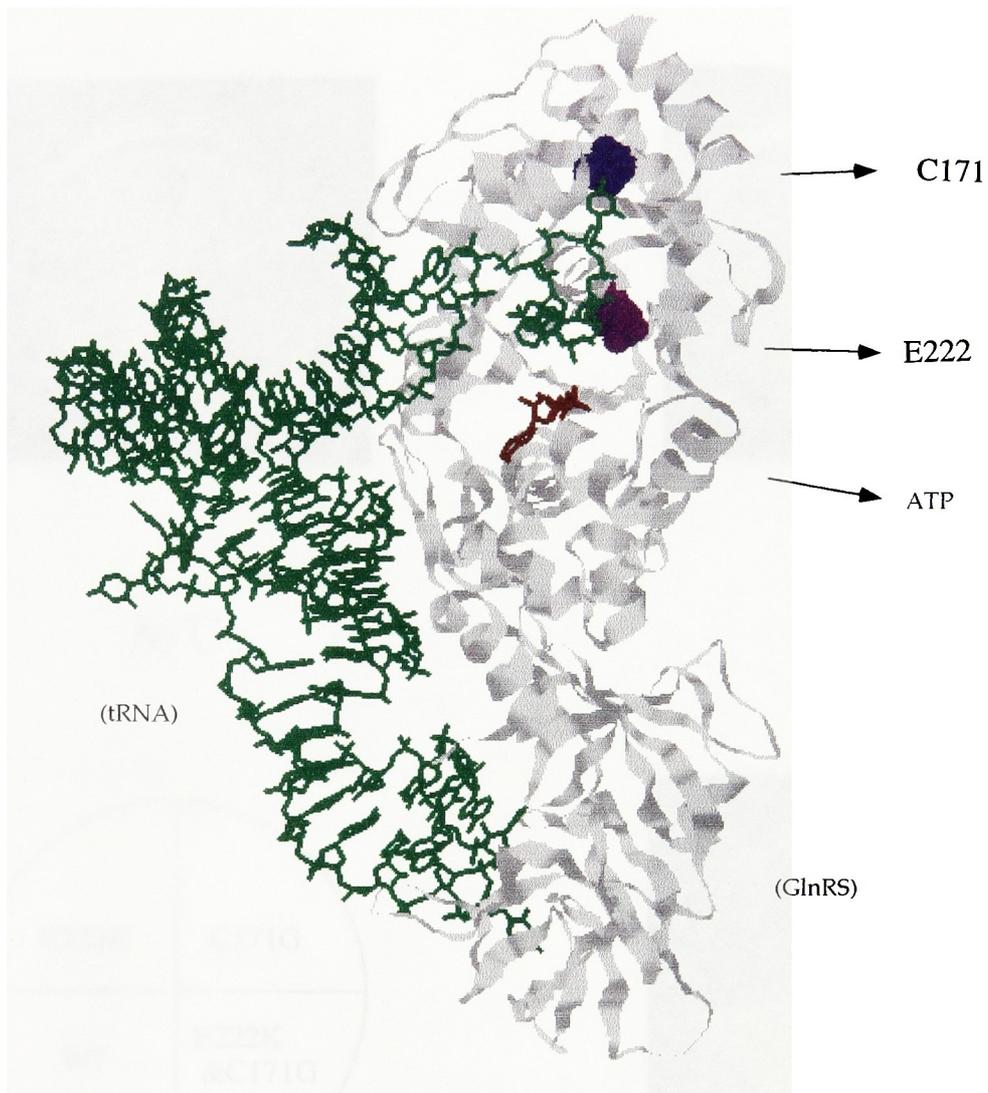
E222Kは、あらかじめ温度感受性の変異として報告されていた変異と同一であり、C171Gが今回のスクリーニングで得られた、温度感受性に関する復帰に関係した変異だと考えられる。なお、「材料と方法」1-(d)に記したように、PCRのエラーを考慮して調べた二つの全く独立なクローンにおいて、この二つの変異は共通して検出され、さらに他に二つのクローンに共通して見られる変異はなかった。

b) 変異はアクセプター結合部位にあった

これまでに分かっているGlnRSの機能構造から、今回の二つの変異、E222KとC171Gの位置は、意外にもアンチコドン認識部位から離れていることが分かった。さらにGlnRSは、tRNAと結合した形で立体構造が解明されている数少ないアミノアシルtRNA合成酵素の一つである。tRNAとの相互作用を示す三次元モデルの上で、二つの変異がtRNAのアクセプター・ステムに近い変異であることを確認した(図15)。特にE222K変異は、tRNAのCCA<sup>3'</sup>末端に非常に近いことが分かった。

c) 変異GlnRSプラスミドの高温での不安定な表現型

「材料と方法」1-(e)に記した方法で、(1) E222Kのみ、(2) C171Gのみ、(3) E222K&C171Gの二重変異、のそれぞれの変異を持った*glnS*プラスミドを作成した。これらのプラスミドをUT172*glnS*<sup>ts</sup>という(E222Kとは異なり、よりsensitiveな)温度感受性株に導入し、*glnS*<sup>ts</sup>の相補活性をみた(図16)。もとのBT52*glnS*<sup>ts</sup>は37℃でも生育することが出来、42℃において増殖に阻害が現れるのに対して、UT172*glnS*<sup>ts</sup>では37℃においても全く生育することが出来ない(15)。上記三つのプラスミドおよび野生型*glnS*を持つプラスミドをUT172*glnS*<sup>ts</sup>に導入し、様々な温度で保温したところ、E222Kは37℃でほとんどUT172*glnS*<sup>ts</sup>をサプレスできないのに対し、E222K&C171Gの二重変異*glnS*では37℃において、サプレッションが観察された(図16)。ただし42℃においてはほとんどサプレスすることが出来なかった。BT52*glnS*<sup>ts</sup>株は42℃に長時間保温すればある程度のコロニーが見られるので、E222Kの変異GlnRSの性質としてやや矛盾しているようだが、再現性のあるデータである。変異GlnRS (E222K)



## 図15 tRNAとGlnRSの相互認識

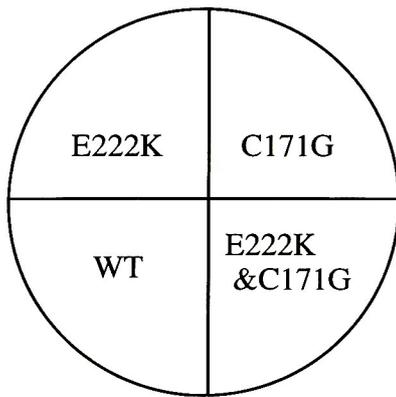
変異の位置を、文献 (42, 43) による立体構造の上で示した。  
 二つの変異はアンチコドンから離れた、アクセプター・ステム結合部位の  
 近くにある。



30°C



37°C



42°C

図16変異GlnRSプラスミドによるUT172のサプレッション

の温度に対する感受性の強さは、この段階でやや混乱しているように見えた。この混乱は変異GlnRSを精製し、生化学的な解析を行うことで最終的には解決した。

### 3. E222K変異株におけるミスチャージング活性

#### a) ミスチャージング活性を調べるに至った理由

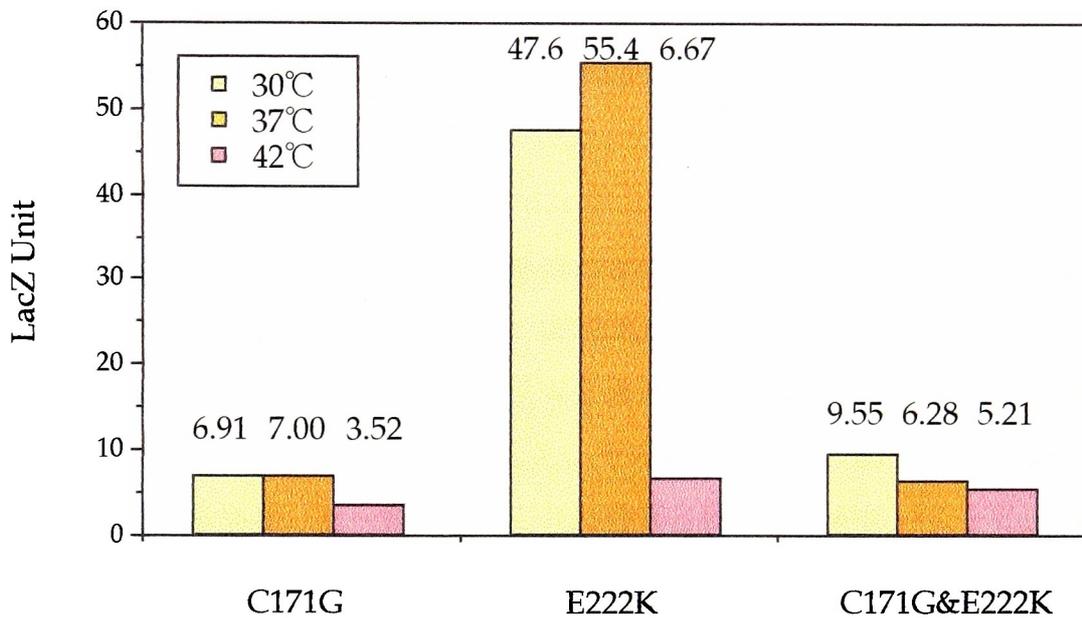
「結果」2-(b)で触れたように、E222K変異はtRNA<sup>Gln</sup>の、CCA<sup>3'</sup>末端の近傍であることが分かった。E222K変異株がC171Gという変異を導入し温度耐性になる過程で、su<sup>+</sup>2に対する認識効率以外にどのような性質の変化が現れるかを解析するために、su<sup>+</sup>3に対するミスチャージング活性を調べる実験を行った。

su<sup>+</sup>3のディスクリミネータにグルタミンの正のアイデンティティを持たせた、su<sup>+</sup>3 A1G82という変異体があるが、このtRNAは本来のチロシンではなく、グルタミンをチャージする(19)。つまり、GlnRSはディスクリミネータを認識し、変異を持たないsu<sup>+</sup>3がチャージすべきtRNAでないことを識別していると考えられている。今、温度感受性GlnRSの変異E222Kは、立体構造から見て、ディスクリミネータの近傍に存在することが分かっている(図15)。そのためtRNAのアクセプター・ステムに対する厳密な認識を欠いている可能性が想定された。

#### b) それぞれの変異株のミスチャージング活性

「材料と方法」1-(a)と図のようにBT32株を用いて、三つの変異*glnS*プラスミドによる、su<sup>+</sup>3へのミスチャージング現象を検定した。その結果、図17に記したように、E222K変異株はsu<sup>+</sup>3を誤って認識し、グルタミンをチャージしてしまう効率が非常に高いことが明らかになった。この現象は37℃以下で観察され、42℃では観察されなかった。このことはE222K変異を持つGlnRSが温度感受性であり、37℃までは増殖できるが42℃で増殖が阻害されるというデータとよく対応している。

また、E222Kに、温度感受性を緩和する作用のあったC171Gを加えた二重変異*glnS*プラスミドにおいては、どの温度でもミスチャージング活性は観察されなかった。



	30°C	37 °C	42 °C
C171G	6.91	7.00	3.52
C171G/E222K	9.55	6.28	5.21
E222K	47.6	55.4	6.67

## 図17 変異GlnRSプラスミドによるミスチャージング活性

図6の方法で行った、変異GlnRSのミスチャージング活性。温度感受性株E222Kにのみ、ミスチャージング活性が確認され、さらにその活性は42°Cにて失われた。

C171Gのみを持つGlnRSプラスミドでもミスチャージング活性は測定されなかった。

#### 4. 二つの変異GlnRS酵素の精製と生化学的解析

##### a) E222K株の精製

E222Kプラスミドを、同じ変異*glnS*を持つBT32-13*glnS*<sup>ts</sup>に導入した。図7の方法により、500 mlの培養液から、変異GlnRS (E222K) 酵素を精製した。菌液の超音波破碎と超遠心の後、FPLCによりmono-Qカラムを通し、得られた分画51のうち偶数番の25分画を、図8に記した方法で活性測定した。その結果を図18に記す。活性は野生型のGlnRSを精製する場合に比べ低いが、これは酵素自体の活性が低いことと、収量があまり多くないことが影響していると考えた。最終的には比較的活性のある7分画について、透析を行い、Anti-GlnRSによるアフィニティ精製を行った。

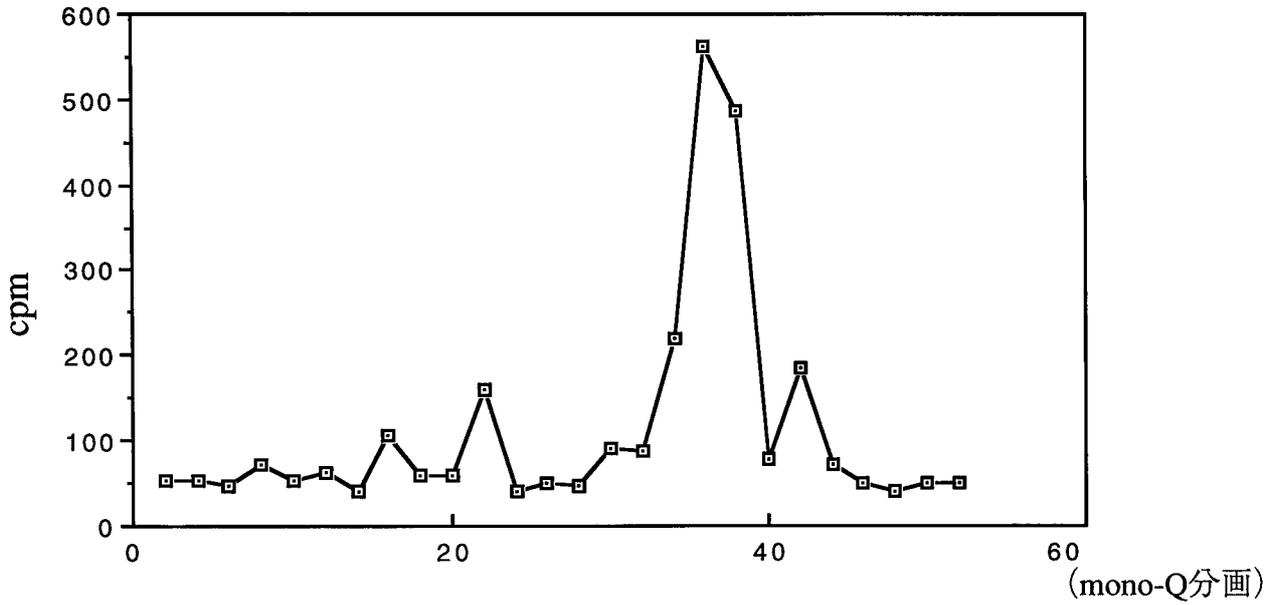
##### b) E222K&C171G株の精製

タンパクを生産させる宿主菌としては、もとの#1株を使用した。この株はE222KとC171Gの二重変異を持つGlnRSを生産しているため、他の（野生型などの）GlnRSの混入を避けることが出来る。E222Kの場合と同じく500 mlの培養液から始め、mono-Q分画に対して活性の測定を行った。結果を図19に示している。この場合もE222Kと同様、低い活性しか確認できなかった。この場合は6分画を採集した。

##### c) 精製された変異GlnRS

以上のように精製されたGlnRSを10 µl用いて、SDS-PAGEにより解析し、単一のバンドを示す純度で精製されていることが確認された（図19）。また、BioRad社のタンパク質定量システムを用いて、二つの変異GlnRSの濃度を定量したところ、E222Kが1.3 mg/ml、E222K&C171Gが1.0 mg/mlであることが分かった（図20）。GlnRSの分子量は43,346なので、モル濃度に換算するとそれぞれ、E222Kが2.05 µM、E222K&C171Gが1.58 µMである。この結果は図20のバンドの濃さをほぼ反映し

GlnRS assay of E222K &C171G (Double) mutant



GlnRS assay of E222K mutant

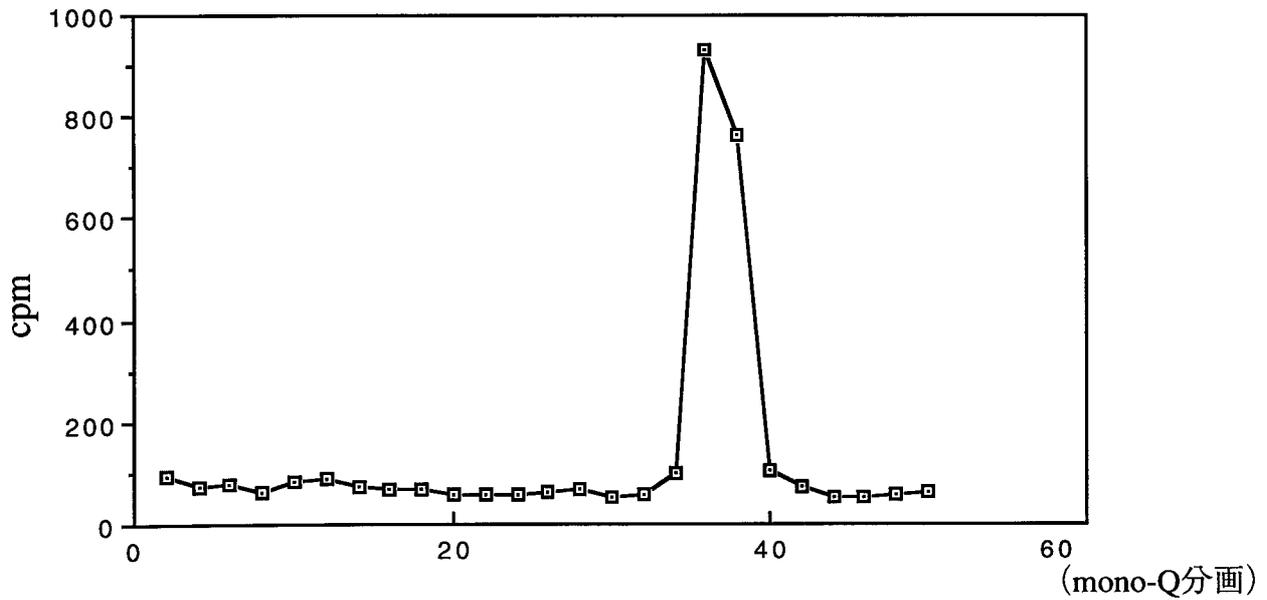


図18 精製された二種類の変異GlnRSのmono-Q分画と活性のチェック

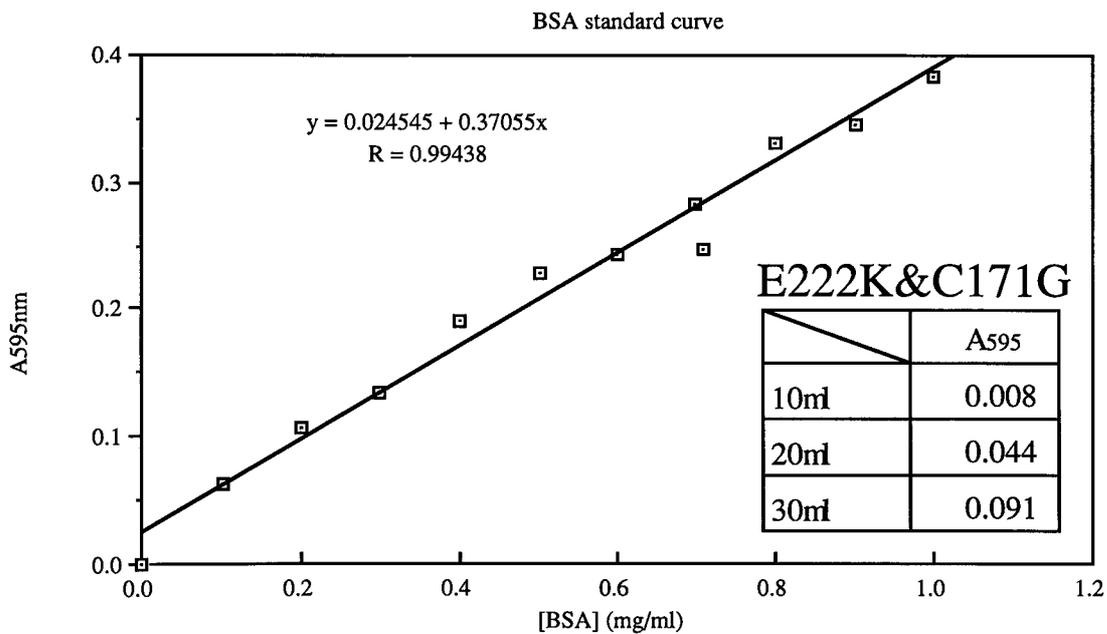
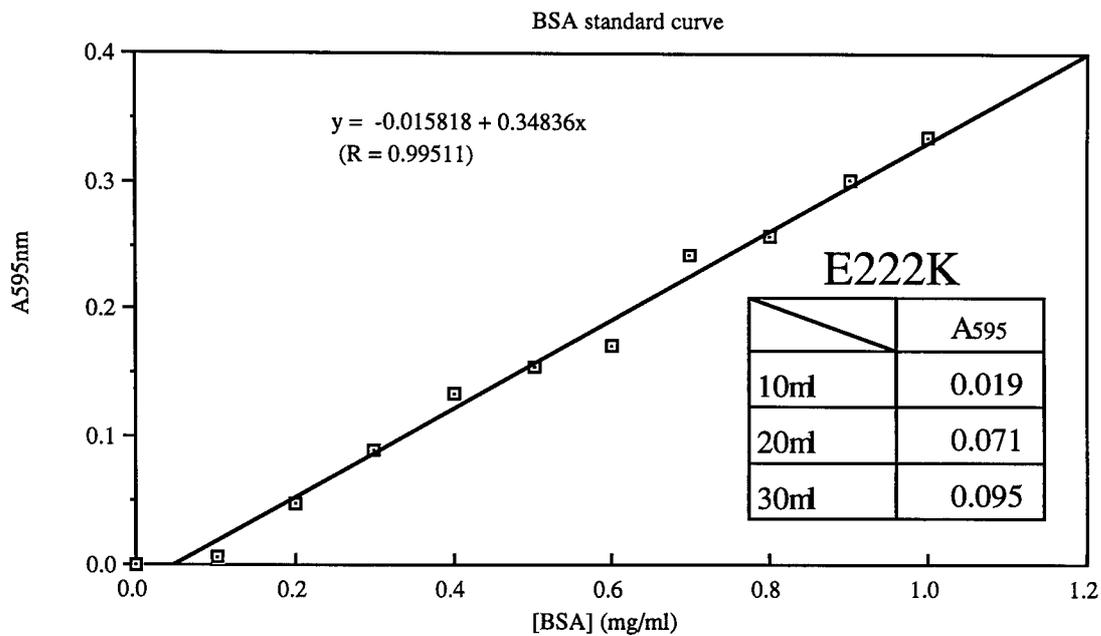
活性の測定は図8の方法で行った。二重変異株では分画34-39、E222K株では分画33-39がそれぞれ活性分画とみて、それらの分画についてアフィニティカラム精製を行った。

Wild type  
E222K  
E222K&C171G



## 図19 精製された変異GlnRS

本研究で精製した変異GlnRSを、野生型のGlnRSをコントロールとしてSDS-PAGEにより泳動した。シングルバンドが確認され、精製した蛋白の純度が証明された。また、バンドの濃さから、図21において計算した蛋白濃度が正しいことが確認できる。



## 図20 精製したGlnRSの定量

BIO-RADの蛋白定量化キットを用いて、精製したGlnRSを定量した。BSAにてスタンダードを計測した上で、酵素を三段階（10 $\mu$ l、20 $\mu$ l、30 $\mu$ l）用いて濃度測定反応を行い、スタンダードにより正確な濃度を計算した。それぞれの酵素の濃度は、E222Kが1.3mg/ml、E222K&C171Gが1.0mg/mlであった。

ている。

d) グルタミンに対するkinetics

「材料と方法」4-(a)の条件で、グルタミンに対するkineticsを行った。それぞれについてのデータを図21に示した。

e) 温度感受性の試験

精製した二つの酵素とYale大学のMichael Ibba博士から譲られた野生型GlnRSについて、温度感受性を検定する試験を行った。「材料と方法」4-(b)に記した実験を行い、図22のcpm値を得た。これを用いて、三つのGlnRSに対する温度効果をグラフに表したのが図23である。それぞれの酵素は2 x Km濃度のグルタミンを用いているため、反応は同じ条件ではない。そのため、それぞれのinitial velocity ( $s^{-1}$ )の最大値を使って標準化した。そのグラフを図24に示す。

	Km [ $\mu\text{M}$ ]	Vmax [ $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	Specific activity [cpm/pmol]	Kcat [ $\text{s}^{-1}$ ]	Kcat/Km [ratio]
E222K	3090	2.45	6.155	$6.12 \times 10^{-5}$	1.00
E222K&C171G	1510	1.42	5.994	$3.55 \times 10^{-5}$	1.14
Wild type	200	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

図21 精製された二つのGlnRSの、グルタミンに対する kinetics

Time (s)	E222K 25	DB 25	WT 25	E222K 28	DB 28	WT 28	E222K31	DB 31	WT 31
0	76	53	48	72	80	50	88	65	49
15	150	91	175	147	97	144	172	111	179
30	212	136	303	266	169	199		160	273
45	301	183	402	366	215	296			418
60	356	208	508	487	238	409	467	269	519
75	455	230	405	611	373	454	594	326	559

Time (s)	E222K 34	DB 34	WT 34	E222K 37	DB 37	WT 37	E222K 40	DB 40	WT 40
0	83	61	51	69	64	57	93	69	40
15	279	149	297	229	199	363	191	177	319
30	358	284	522	454	267	666	392	324	796
45	502	420	878	643	447	1013	619	479	1194
60	680	523	1142	833	523	1401	845	565	1383
75	711	629	910	844	686		841	656	1350

Time (s)	E222K 43	DB 43	WT 43
0	94	80	40
15	216	168	408
30	448	329	754
45	606	528	997
60	903	650	1093
75	988	842	1359

## 図22 温度感受性の *in vitro* assay

三つのGlnRSの温度感受性についての *in vitro*での検定。数値はcpmで表してある。この数値より初速度 (Initial velocity) を計算し、図24にグラフ化した。

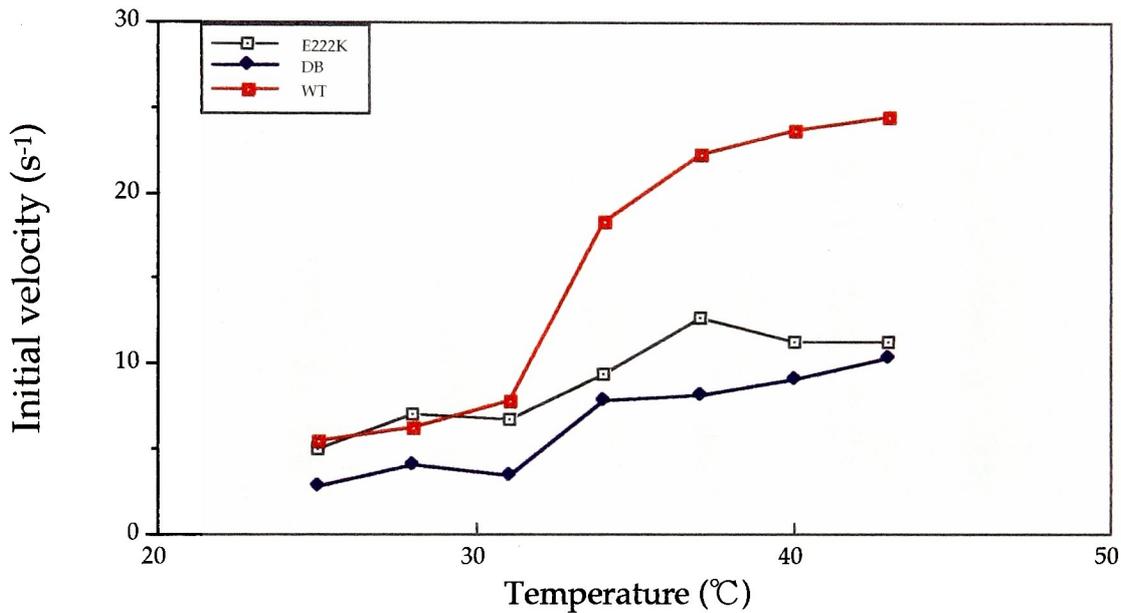
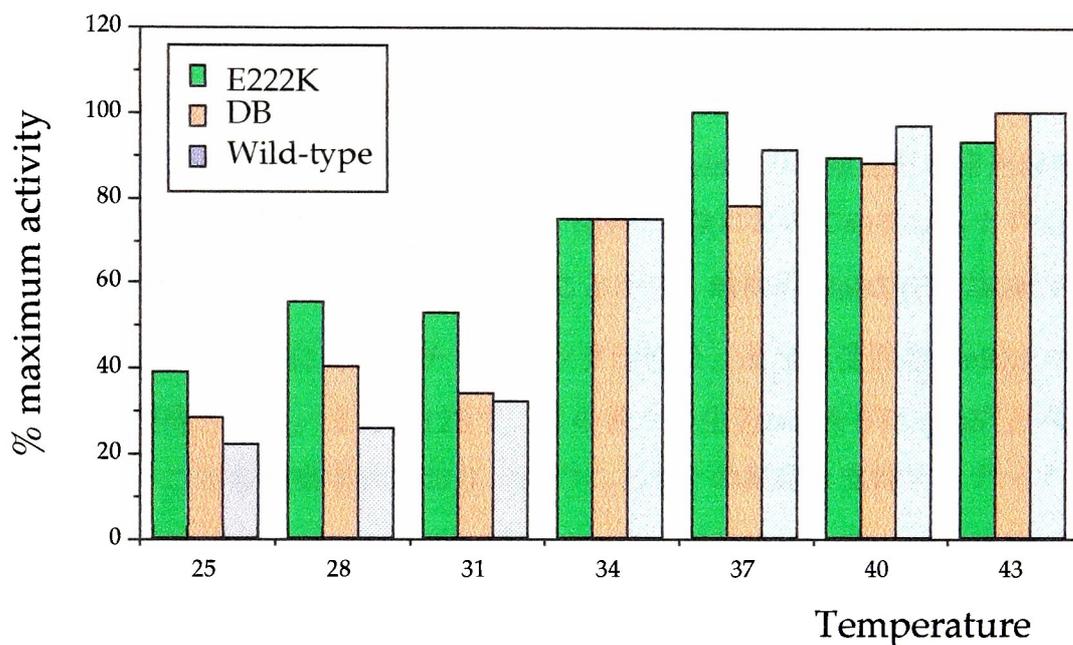


図23 三つのGlnRSに対する温度効果

二つの変異GlnRSと野生型のGlnRSに対し、反応温度が反応初速度に与える影響を調べた。反応条件が異なるのでそれぞれの酵素同士で比較は出来ないが、E222K株には高温による影響が見られ、E222K&C171G株においてはその影響は軽減されていた。これは2 x Kmの条件において、GlnRSがE222Kで温度感受性になり、さらにC171Gの導入により温度耐性に復帰することと対応している。



## 図24 GlnRS変異株に対する温度効果

図24で示した、温度による反応初速度の変化を、それぞれの反応速度の最大値を用いて標準化した。E222Kの温度感受性が示されている。また僅かではあるが、C171Gによる温度感受性の回復も見ることが出来る。

## 考察

1. 二重変異株#1はsu<sup>+</sup>2に対して、特異的に低い認識効率を示す

a) #1株のGlnRSの、野生型tRNA<sup>Gln</sup>に対する活性

図16の実験で、野生型の*glnS*遺伝子が温度感受性株BT52*glnS*<sup>ts</sup>の30℃での増殖速度を回復させることが示された。このことは、BT52*glnS*<sup>ts</sup>の増殖速度の律速段階が、GlnRSの活性にあることを意味している。図9の実験において#1株はもとの温度感受性株と同様な増殖速度を示したが、このことから、#1株のGlnRS (E222K&C171G) における野生型tRNA<sup>Gln</sup>に対するチャージング活性は、温度感受性型GlnRSの活性とほぼ等しいと期待された。また図12Bで、この株が野生型*lacZ*をBT52*glnS*<sup>ts</sup>と同程度発現するということが観察されており、このこともその推定を支持するデータである。

さらに精製した酵素において、GlnRS (E222K&C171G) のグルタミンに対するKmはGlnRS (E222K) よりも低く、Kcat/Kmは若干向上している (図21)。このことから、#1株の持つGlnRS (E222K&C171G) の活性自体が、GlnRS (E222K) のtRNA<sup>Gln</sup>に対するチャージング活性よりも劣る、とは考えにくい。

b) #1株が示す特異なサプレッション効率についての考察

野生型tRNA<sup>Gln</sup>に対する活性が変化していないにも関わらず、図11において、#1株はsu<sup>+</sup>2に対するチャージング活性がBT52*glnS*<sup>ts</sup>よりも低いことが示唆された。#1株はBT52*glnS*<sup>ts</sup>株よりspontaneousに得られた株であり、その*glnS*遺伝子はBT52*glnS*<sup>ts</sup>株の持つE222K変異に加えてさらにもう一つの変異を持つことが期待された。図12の一連の実験から#1はsu<sup>+</sup>2に対するチャージング活性がBT52*glnS*<sup>ts</sup>株の約3分の1であることが示されたが、この違いは#1株の*glnS*に加わった新たな変異によるものであることは明らかである。

su<sup>+</sup>2はtRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>のアンチコドンCUGが、CUAに変化した分子である。両者の違いはアンチコドン三文字目の一塩基のみである。したがって#1の持つGlnRSの特異な性質は、アンチコドン三文字目の違いに起因すると考えられる。すなわち、#1株に新たに入った変異により、アンチコドン三文字目の違いをより明確に識別できるようになった、ということである (図25)。

ここで注意しておきたいのは、GlnRS (E222K) 自体が、野生型tRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>とsu<sup>+</sup>2の違いを認識していないわけではない、ということである。Pallanckらによれば、tRNA<sup>Gln</sup>のアイデンティティは主にアクセプター・ステムとアンチコドンに位置する (35)。アンチコドンがUCAへと変化したtRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>はもはやグルタミンをチャージすることは出来ず、代わりにトリプトファンをチャージすることが報告されている (22)。そのため、野生型GlnRSであってもsu<sup>+</sup>2の一部にしかグルタミンをチャージ出来ない。つまり、GlnRS (E222K) のsu<sup>+</sup>2へのチャージング効率は、野生型の基質に対する効率と比べて低い (23)。

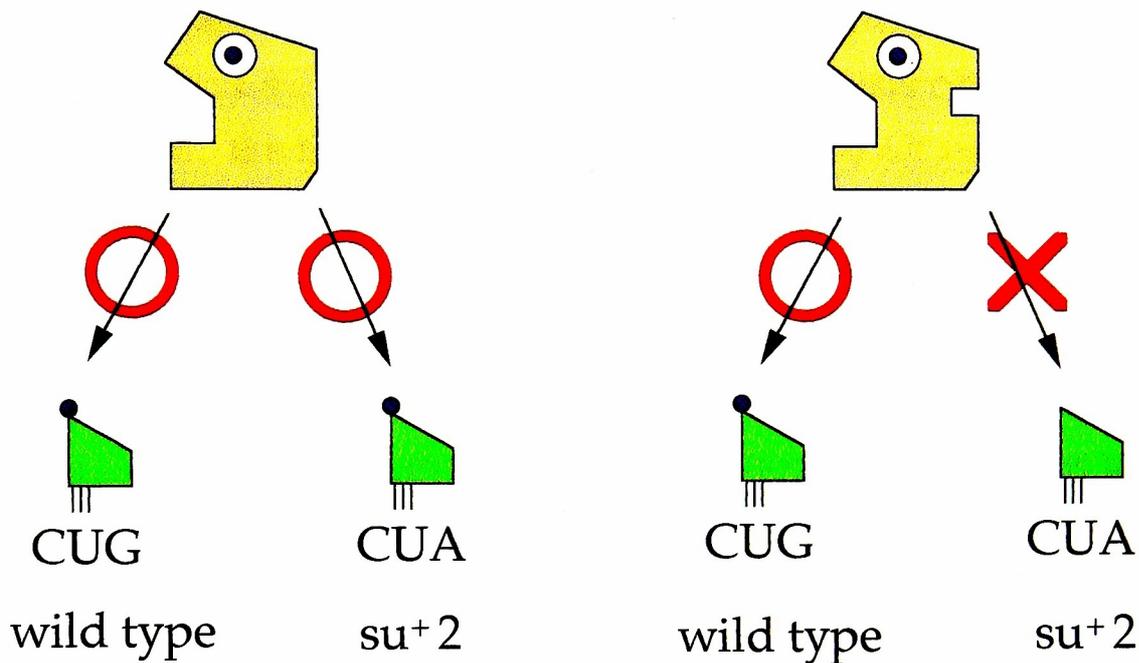
しかしながら本稿で解析している#1変異株は、もともとの株 (E222K株) の示すチャージング活性よりもさらに3分の1まで低下した活性を示しているのであり、この違いはやはり#1株に新たに加えられた変異 (C171) によると考えざるを得ない。筆者はこの段階で、#1の分離に際して加わった変異は、GlnRSのアンチコドン認識部位に同定されるものであろうと推測していた。GlnRSのアンチコドン認識部位については、*in vitro* mutagenesisを用いたWeygand-Durasevicらの詳細な研究 (51) があるが、今回得られた#1株は遺伝学的に得られた変異株であり、*in vivo*の観点から新たにアンチコドン認識部位を同定するという意味で、興味深いものであると考えていた。

### c) 変異の位置

さて、「材料と方法」で紹介した方法により変異の位置を確認したところ、興味深いことに、予想していたアンチコドン認識部位とは大きく異なる、アクセプター・ステム結合部位に変異は検出された。このことは、#1株の示すアンチコドン三文字目の識別能力の強化が、アンチコドンの塩基との直接的な相互作用によるも

wild type GlnRS

mutant GlnRS



● アミノ酸  
○ アミノ酸結合部位

### 図25 変異GlnRS (C171G&E222K Double)の性質

su<sup>+</sup>2は野生型tRNA<sup>Gln2</sup>のアンチコドンCUGが一塩基変化し、CUAに変わったものである。温度感受性GlnRS (E222K)は、su<sup>+</sup>2にグルタミンをチャージしLacZ<sub>am</sub>をサプレスすることが出来るが、この二重変異GlnRSは、tRNA<sup>Gln2</sup>に対するチャージング効率は温度感受性とほぼ等しいにもかかわらず、su<sup>+</sup>2に対するチャージング効率が約三分の一に低下している。

のではなく、GlnRSの立体的な構造変化による間接的な影響の結果であることを示している。C171Gというこの変異は、もともと温度感受性を相補する変異として分離されたものであり、酵素全体の大規模な構造変化はその点からも暗示されている。C171Gの導入により、GlnRSの温度感受性型（E222K）が生体内でダイナミックに構造を変化させ、離れたアンチコドン認識ドメインに影響を与えているということが明らかになった。このことはタンパクの構造の上からも興味深い結果である。

GlnRSは、グルタミン、ATP、tRNAの三つの基質を持つ酵素であり、それぞれに対する化学反応論的解析がよく進んでいる。また酵素のドメイン構造も明らかにされ、近年では酵素反応時における立体構造の動的な変化も明らかにされつつある

(2)。#1変異株（E222K&C171G）と温度感受性（E222K）株のGlnRSの性質を *in vivo* と *in vitro* において比較することにより、GlnRSにおける両残基の役割が明らかにされ、さらにN末のコンフォメーション変化が酵素の機能に与える変化を知ることが出来ると考え、生化学的な解析を行うこととした。

## 2. su<sup>+</sup>3へのミスチャージング

### a) 立体構造から見たC171G、E222K二つの変異

図15によれば、これら二つの変異は、tRNAのアクセプター・ステムに近い場所に位置している。特にE222Kの場合、アクセプター・ステムの上方、ディスクリミネータからCCA<sup>3'</sup>末端に接する部分に位置していることが分かった。

### b) 野生型GlnRSによるsu<sup>+</sup>3の識別

「材料と方法」の1.で触れたように、変異tRNAであるsu<sup>+</sup>3 A1G82は、野生型GlnRSによって認識され、グルタミンをチャージする。このtRNAは、チロシンをチャージするsu<sup>+</sup>3と比較して、ディスクリミネータの部分が改変されている。この事実は野生型GlnRSが通常tRNA<sup>tyr</sup>を識別する場合、ディスクリミネータを認識し、その二塩基付近を指標としてチャージングの可否を決定しているということの意味

している。

ところで今回の温度感受性GlnRSに含まれるE222K変異は、まさにそのディスクリミネータ認識ドメインに位置する変異である。野生型GlnRSではsu<sup>+</sup>3を識別し、排除するために使われているドメインが、一残基変異しているために、チロシン型のディスクリミネータを持つsu<sup>+</sup>3に対する識別能力が低下している可能性が考えられた。

#### c) E222K株はミスチャージング活性を持つ

図17に示したように、E222K変異を持つGlnRSは、プラスミドから大量発現した場合に、su<sup>+</sup>3に対しグルタミンをチャージしてしまうことが分かった。42℃でこの活性が失われてしまうのは、この酵素が高温で不安定なためであると考えられる。また興味深いことに、ミスチャージング活性はC171Gの導入によっても失われた。このことはミスチャージング現象が、単にE222K変異とディスクリミネータの単純な相互作用によるものではなく、アミノアシル ステム結合部位の全体のコンフォメーション変化によるものだということを示しているものである。

また、アミノアシルtRNA合成酵素がnoncognateなtRNAを識別しているのは、cognateなtRNAとのKmの違いではなく、Vmaxの違いによるところが大きい、というデータがある(6)。これは、非常に似通った立体構造を持つtRNAの識別が、結合のレベルではなく、酵素活性のレベルで行われていることを示すものであり、ミスチャージング現象がtRNAとアミノアシルtRNA合成酵素のコンフォメーション変化や立体構造の僅かなひずみによるものであることを表している。このことから、E222K変異の導入で変化したGlnRSのN末構造が、C171Gの導入により再び野生型に近い形に復帰している、ということが推定できる。

E222K株が温度感受性でかつミスチャージング活性を持つのは対照的に、野生型GlnRSと二重変異E222K&C171Gは温度に対し耐性を持ち、なおかつsu<sup>+</sup>3に対する厳密な識別能力を持つ。このことはE222K変異によりGlnRSのN末コンフォメーションが緩み、やわらかい構造になっていることを示しているものと思われる。新たに

C171G変異が入ることで、変異GlnRSのN末構造はよりタイトになり、ディスクリミネータの正しい識別および高温での耐性を回復するのであろう（図26）。

### 3. E222K株の温度感受性

#### a) E222KプラスミドとE222K&C171Gプラスミドによる *glnS*<sup>ts</sup> の相補

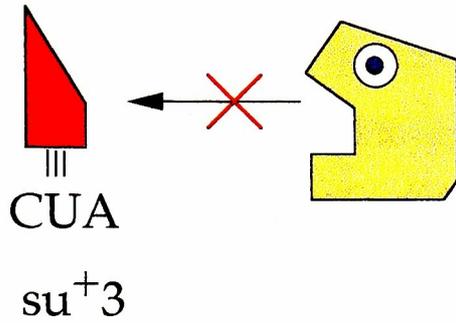
site-directed mutagenesisにより作成した変異*glnS*プラスミドを、UT172*glnS*<sup>ts</sup>株に導入することにより、プラスミド上の変異*glnS*の温度感受性を比較した（図16）。

「材料と方法」2-(c)に記したように、E222K株とE222K&C171G株の温度感受性の差異は、37℃において顕著に観察されたが、42℃においてはあまりはっきり見られなかった。42℃の温度に耐性となる株として分離したE222K&C171Gの二重変異株は、42℃においてほとんど生育することが出来ず、E222Kプラスミドによる相補パターンとの比較においてのみ、かろうじて温度耐性を確認できるのみであった。高温におけるプラスミドのコピー数の減少、という要因も考慮されたが、図16では野生型*glnS*プラスミドによって42℃での相補活性がはっきりと観察されているため、その要因による影響は大きくないと考えられる。

もともとのE222K株は42℃において温度感受性で、37℃では正常な増殖を示していた。また、ミスチャージング活性の試験では、E222K型の*glnS*は37℃以下の温度で活性を記録した。これらの事実から、BT系列の株では、E222K変異を持つGlnRSは37℃で正常に機能することが推定できる。つまり図16の実験では、E222K型のGlnRSは、BT系列の株とUT172の株の間で異なる表現型を示す、ということが明らかにされている。株により同じ変異酵素が異なる温度感受性を示す原因については後述する。

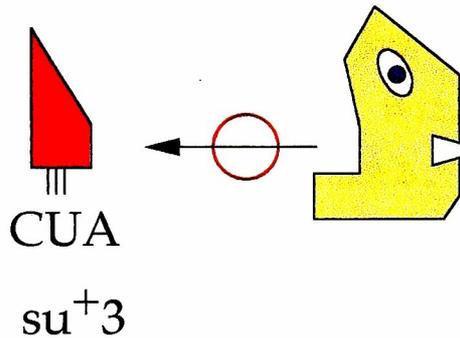
図16には多数のリバートアントが観察されるが、これは実験に用いたカルチャーの質に関わらず、再現性を持った現象であった。対照実験として作成したC171Gプラスミドは、同じく対照として使用した野生型*glnS*プラスミドと同様、どの温度においても鮮明なサプレッションを示した。

## wild type GlnRS



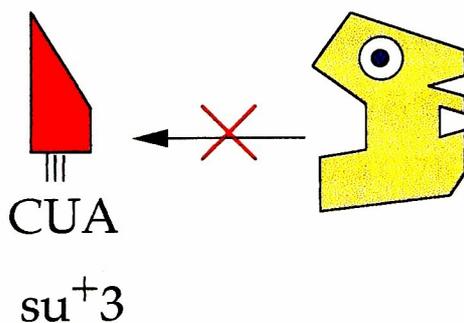
野生型GlnRSは、su<sup>+</sup>3を認識しない。

## E222K



E222Kは酵素全体の構造を変え、グルタミンに対する親和性を下げる。同時にアクセプター・ステムに対する認識が緩み、su<sup>+</sup>3にグルタミンをチャージする。

## E222K&C171G



E222Kに新しくC171Gが入ることにより、グルタミンに対する親和性とN末の構造は回復し、su<sup>+</sup>3に対するミスチャージングはなくなる。しかし同時にC末に構造の小さな変化が起こり、su<sup>+</sup>2に対する認識が悪くなる。

## 図26 E222KおよびC171G変異がGlnRSに与える影響

E222K変異株では、グルタミンの結合部位に変異があるため、グルタミンに対するKm値が高い。C171Gを導入することで、グルタミンに対する親和性とsu<sup>+</sup>3に対する識別能力が回復される。

#### b) 精製された変異GlnRSの性質

精製した変異GlnRSについて、グルタミンに対するkineticsを行った(図21)。その結果、表に示したように、E222Kのグルタミンに対するKmは非常に高く、E222K&C171G二重変異株においてはKmは半分までに回復していることが明らかになった。細胞内におけるグルタミンの濃度は150  $\mu$ M程度ということが知られており(17)、グルタミンに対するKmの低さによりE222K株が野生株より(30℃においてさえ)増殖速度が遅いことが、説明できる。また前項3-(a)で触れた、株によるE222K型GlnRSの表現型のばらつきも、株によってグルタミンの細胞内濃度が異なると仮定することで、解釈することが出来る。

#### c) 変異GlnRSの*in vitro*における温度感受性試験

2 x Kmのグルタミンを用いて、*in vitro*における温度感受性試験を行った(図22)。この結果を、温度を横軸にとり、initial velocityを縦軸にとったグラフにしたものが図23である。野生型GlnRSは反応温度の上昇に従ってinitial velocityが上昇していくのに対し、E222K株では活性は37℃で頭打ちとなり、40℃以上では低下してしまう。これはE222Kの*in vitro*での温度感受性効果を示す。

また、二重変異株(E222K&C171G)は40℃以上でも、initial velocityの伸びは失われていない。このことはこのC171Gの導入によって、E222Kの温度感受性効果が抑制されている、ということを示している。

以上のようにGlnRSの、E222K変異の効果(温度感受性)とC171Gの効果(温度感受性の相補)が*in vitro*で明らかになったが、図から分かるように、40℃以上での酵素の失活の割合が、大腸菌株の表現型に比較して若干弱いように感じられる。このことは、おそらく変異GlnRSのグルタミンに対するKmの高さが原因になっているものと思われる。図23の反応においては、E222K株は6 mMものグルタミンを加えられており、その濃度は細胞内での150  $\mu$ Mという濃度から見ればあまりにも大量であ

る。細胞内でのグルタミン濃度では、ここで観察された温度感受性がよりくっきりと見られる、ということも十分に考えられる。*in vitro*反応の際、200  $\mu$ M以下のグルタミン濃度では反応が安定せず、initial velocityを計測することが出来なかった。同様に*in vivo*の状態では、42°Cにおいて変異GlnRSの活性が低下し、細胞内のグルタミン濃度が変異GlnRSにとっての閾値を割ってしまう、ということが考えられる。結果として温度感受性が*in vivo*では明確なのであろう。

また、30°Cにおいて、E222K型GlnRSは、E222K&C171G二重変異株よりも高いinitial velocityを記録しているが、この両者は異なるグルタミン濃度を用いた実験であり、このことから単純にE222K型の方が活性が高いという結論は導き出せない。それは、温度感受性株（E222K）の増殖速度が30°Cで野生型に比べ遅く、その速度は野生型glnSを導入することによりサプレスされるにもかかわらず、低温の範囲において野生型GlnRSとE222K型がほぼ等しいinitial velocityを示す、ということからも明らかである。

#### 4. E222KおよびC171Gの導入によるGlnRSのダイナミックな構造変化

以上の結果を表にまとめたのが図27である。

D235Nの変異を持つGlnRSは、初めsu<sup>+</sup>3に対するミスチャージングを行う変異として同定されたが(21)、後には全く独立に、アンチコドンの変化を許容する変異として分離された(41)。アクセプター・ステムの上方、ディスクリミネータから三塩基対のところに結合するこの残基は、GlnRS全体の構造を変化させ、結果として変異アンチコドン(UCA)に対する識別を緩和させる。

今回筆者が分離した#1株は、二つの変異E222KおよびC171Gを持っている。GlnRS(E222K)は高温で不安定であり、低温ではsu<sup>+</sup>3に対しミスチャージング活性を示す。この株にC171G変異が加わることは、上に述べたD235Nの効果と相似である。すなわち、D235Nの導入によりsu<sup>+</sup>3へのミスチャージング活性が上昇する(21)のと対照的に、C171Gの導入によりE222Kの持つミスチャージング活性は低下する(図27)。

項目	資料	GlnRS			
		野生型	E222K	E222K&C171G	C171G
UT株での相補活性 (30℃)	図16	+++	++	++	+++
UT株での相補活性 (37℃)	図16	++++	+-	+	++++
UT株での相補活性 (42℃)	図16	+++++		+-	+++++
su+2 認識効率	図12C	N.D.	3.6	1.2	N.D.
su+3 認識効率 (30℃)	図17	<1	47.6	9.55	6.91
su+3 認識効率 (37℃)	図17	<1	55.4	6.28	7.00
su+3 認識効率 (42℃)	図17	<1	6.67	5.51	3.52
Gln Km	図21	200	3090	1510	N.D.
Gln Vmax	図21	N.D.	2.45	1.42	N.D.
Gln Kcat	図21	N.D.	$6.12 \times 10^{-5}$	$3.55 \times 10^{-5}$	N.D.
Gln Km/Kcat	図21	N.D.	1.00	1.14	N.D.

## 図27 本稿で扱った変異GlnRSの性質

4種類のGlnRSについて、*in vivo*および*in vitro*で解析した結果をまとめた。それぞれの実験の詳細と表中の数字の単位表記については、表中に「資料」として記した各実験を参照されたい。

また、野生型GlnRSが認識できないtRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub>をGlnRS (D235N) が許容する (41) のと対照的に、GlnRS (E222K) が認識しているsu<sup>+</sup>2 (tRNA<sup>Gln</sup><sub>CUA</sub>)に対するチャージング効率が、C171Gを導入した株では低下している (図27)。

つまりD235N変異との比較で見た場合、E222Kに対するC171Gは、野生型GlnRSに対するD235N変異と全く反対の効果を与えていることになる。

C171GはE222Kの温度感受性に対するサプレッサーとして得られているものであり、間接的にこの二つの残基には相互作用があると考えられる。つまり、C171G変異の導入により、GlnRSのN末、その中でも特にE222Kが含まれるジヌクレオチド結合ドメインのコンフォメーションに変化が起こる。それがD235N変異の場合と同じように (位置が近いこともあり)、ディスクリミネータの認識やアンチコドンの認識に影響を与えているのである。その意味でこの#1変異株は、D235N株とは反対の方向から、ジヌクレオチド結合ドメインおよびグルタミン酸活性化部位 (GlnRSの中央部分) と、30 Å離れたアンチコドン認識部位およびアクセプター・ステム結合部位の機能的な相関関係の存在を、証明しているものである。なお、活性部位からそれぞれ30 Å以上離れたアンチコドンおよびアクセプター・ステムは、tRNA<sup>Gln</sup>のアイデンティティとなっている重要な部分であり、D235残基がGlnRSの高次構造を介してその両者の機能的な相関を結びつけている様子を、Rogersらは”functional communication”と表現している (41)。

今回の実験結果は、GlnRSの活性部位 (アミノ酸活性化部位) の構造変化がアンチコドン認識部位およびアクセプター・ステム結合部位の高次構造と直接的に相関しているということを示すこととなった。アクセプター・ステム識別能力が厳しくなる (ミスチャージングしなくなる) と、アミノ酸活性化部位の構造変化 (グルタミンのK<sub>m</sub>が下がる) を通じて、アンチコドン識別がより厳しくなる (su<sup>+</sup>2をチャージしない)。このことはRogersらの示した、「アクセプター・ステムの認識が甘くなると、D235Nを通じて、アンチコドン識別がより甘くなる (tRNA<sup>Gln</sup><sub>UCA</sub>をチャージ出来る)」という結果 (41) を、相補う現象である。

この二つの変異体の観察において、GlnRSによるtRNA<sup>Gln</sup>のアクセプター・ステム

認識特異性とアンチコドン認識特異性は、正の相関関係にある、という結果が得られた。このことはGlnRSのtRNA認識において、各アイデンティティ要素を認識するドメインが、お互いに緊密な構造を持っていることを暗示する結果である。

## 参考文献

1. Auld, D. S., Schimmel, P. (1995). Switching recognition of two tRNA synthetases with an amino acid swap in a designed peptide. *Science* **267**, 1994-1996.
2. Bhattacharyya, T., Roy S. (1993). A fluorescence spectroscopic study of substrate-induced conformational changes in glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **32**, 9268-9273.
3. Borck, K. (1976). The construction *in vitro* of transducing derivatives of phage lambda. *Mol. Gen. Genet.* **146**, 199.
4. Brevet, A., Chen, J., Leveque, F., Blanquet, S., Plateau, P. (1995). Comparison of the enzymatic properties of the two *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase species. *J. Biol. Chem.* **270**, 14439-44.
5. Celis, J. E., Hooper, M.L., Smith, J.D. (1973). *Nature New Biol.* **244**, 261.
6. Ebel, J. P., Giege, R., Bonnet, J., Kern, D., Befort, N., Bollack, C., Fasiolo, F., Gangloff, J., Dirheimer, G. (1973). Factors determining the specificity of the tRNA aminoacylation reaction. *Biochimie* **55**, 547-557.
7. Emmerich, R. V., Hirshfield, I.N. (1986). Mapping of the constitutive lysyl-tRNA synthetase gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**, 5311-5313.
8. Englisch-Peters, S., Conley J., Plumbridge J., Leptak C. Söll D. and Rogers M.J. (1991). Mutant enzymes and tRNAs as probes of the glutaminyl-tRNA synthetase: tRNA<sup>Gln</sup> interaction. *Biochimie* **73**, 1501-1508.
9. Fersht, A. R. (1977). Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **16**, 1025-1030.
10. Folk, W. R. (1971). Molecular weight of *Escherichia coli* glutaminyl transfer ribonucleic acid synthetase, and isolation of its complex with glutamine

- transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **10**, 1728-1732.
11. Ghysen, A., Celis, J.E. (1974). Mischarging single and double mutants of *Escherichia coli* sup3 tyrosine transfer RNA. *J. Mol. Biol.* **83**, 333.
  12. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557
  13. Hayase, Y., Jahn, M., Rogers, M.J., Sylvers, L.A., Koizumi, M., Inoue, H., Ohtsuka, E., Söll, D. (1992). Recognition of bases in *Escherichia coli* tRNA<sup>Gln</sup> by glutaminyl-tRNA synthetase: a complete identity set. *EMBO* **11** (11), 4159-4165.
  14. Hoben, P., Royal, N., Cheung, A., Yamao, F., Biemann, K., Söll, D. (1982). *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. II. Characterization of the *glnS* gene product. *J. Biol. Chem.* **257**, 11644-11650.
  15. Hong, K.W (personal communication).
  16. Hooper, M. L., Russell, R.L., Smith, J.D. (1972). Mischarging in mutant tyrosine transfer RNAs. *FEBS Lett.* **22**, 149.
  17. Ibba, M., Söll, D. (personal communication).
  18. Inokuchi, H. (personal communication).
  19. Inokuchi, H., Celis, J.E., Smith, J.D. (1974). Mutant tyrosine transfer ribonucleic acids of *Escherichia coli*: Construction by recombination of a double mutant A1G82 chargeable with glutamine. *J. Mol. Biol.* **85**, 187.
  20. Inokuchi, H., Kodaira, M., Yamao, F., Ozeki, H. (1979). Identification of transfer RNA suppressors in *Escherichia coli*. II. Duplicate genes for tRNA<sup>Gln</sup> 2. *J. Mol. Biol.* **132**, 663-677
  21. Inokuchi, H., Hoben, P., Yamao, F., Ozeki, H., Söll, D. (1984). Transfer RNA mischarging mediated by a mutant *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5076-5080.
  22. Inokuchi, H., Kazunori Kondo, Masami Yoshimura and Haruo Ozeki. (1990). Mutant of the glutamine transfer RNA gene as UGA suppressor in

*Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **223**, 433-437

23. Jahn, M., Rogers, M.J., Söll, D. (1991). Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA<sup>Gln</sup> are major recognition elements for *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Nature* **352**, 258-269.
24. Jakubowski, H., Fersht, A.R. (1981). Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3105-3117.
25. Jakubowski, H. (1995). Proofreading *in vivo*. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 17672-17673.
26. Kast, P., Hennecke, H. (1991). Amino acid substrate specificity of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase altered by distinct mutations. *J. Mol. Biol.* **222**, 99-124.
27. Kern, D., Potier, S., Lapointe, J., Boulanger, Y. (1980). The glutaminyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: purification, structure and function relationship. *Biochim. Biophys. Acta* **607**, 65-80.
28. Kim, S. H., Suddath, F.L., Quigley, F.L., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H.J., Seeman, N.C., Rich, A. (1974). Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**, 435-440.
29. Korner, A., Magee, B.B., Liska, B., Low, K.B., Adelberg, E.A., Söll, D. (1974). Isolation and partial characterization of a temperature-sensitive *Escherichia coli* mutant with altered glutaminyl-transfer ribonucleic acid synthetase. *J. Bacteriol.* **120**, 154-158.
30. McClain, W. H., Schneider, J., Gabriel, K. (1993). Association of tRNA<sup>Gln</sup> acceptor identity with phosphate-sugar backbone interactions observed in the crystal structure of the *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Gln</sup> complex. *Biochimie* **75**, 1125-1136.
31. Miller, J. H. (1992).  
A short course in bacterial genetics.  
CSHL press.

32. Moras, D., Comarmond, M.B., Fisher, J., Weiss, R., Thierry, J.C., Ebel, J.P., Geige, R. (1980). Crystal structure of yeast tRNA<sup>Asp</sup>. *Nature* **288**, 669-674.
33. Mullis, K. B., Ferre, F., Gibbs, R.A. (1994).  
The polymerase chain reaction.  
Birkhauser press, boston
34. Normanly, J., Abelson, J.W. (1989). tRNA Identity. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 1029-1049.
35. Pallanck, L., Schulman, L.H. (1992).  
Transfer RNA in Protein Synthesis. eds. Hatfield, D., Lee, B.J., Pirtle, R.  
279-318.  
CRC, Boca Raton, FL.
36. Perona, J. J., Swanson, R.N., Rould, M.A., Steitz, T.A., Söll, D. (1989).  
Structural basis for misaminoacylation by mutant *E. coli* glutaminyl-tRNA  
synthetase enzymes. *Science* **246**, 1152-1154.
37. Robertus, J. D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C.,  
Klug, A. (1974). Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3A resolution.  
*Nature* **250**, 546-551.
38. Rogers, M. J., Söll, D. (1990). Inaccuracy and the recognition of tRNA. *Prog.  
Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **39**, 185-208.
39. Rogers, M. J., Adachi, T., Inokuchi, H., Söll, D. (1992). Switching tRNA<sup>Gln</sup>  
identity from glutamine to tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3463-  
3467.
40. Rogers, M. J., Weygand-Durasevic, I., Schwob, E., Sherman, J.M., Rogers,  
K.C., Adachi, T., Inokuchi, H., Söll, D. (1993). Selectivity and specificity in the  
recognition of tRNA by *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochimie* **75**,  
1083.
41. Rogers, M. J., Adachi, T., Inokuchi, H., Söll, D. (1994). Functional  
communication in the recognition of tRNA by *Escherichia coli* glutaminyl-  
tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 291-295.
42. Rould, M. A., Perona, J.J., Söll, D., Steitz, T.A. (1989). Structure of *E. coli*

- Glutaminyl-tRNA Synthetase Complexed with tRNA<sup>Gln</sup> and ATP at 2.8Å Resolution. *Science* **246**, 1135-1142.
43. Rould, M. A., Perona, J.J., Steitz, T.A. (1991). Structural basis of anticodon loop recognition by glutaminyl-tRNA synthetase. *Nature* **352**, 213-218.
  44. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).  
Molecular cloning (2nd ed.)  
CSHL press.
  45. Schulman, L. H. (1991). Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **41**, 23-87.
  46. Sherman, J. M., Rogers, M.J., Söll, D. (1995). Recognition in the glutamine tRNA system: from structure to function.  
"tRNA: structure, biosynthesis, and function"  
eds. Söll, D., RajBhandary, U.L.  
ASM press
  47. Sherman, J. M., Rogers, M.J., Söll, D. (1992). Competition of aminoacyl-tRNA synthetases for tRNA ensures the accuracy of aminoacylation. *Nucleic Acids Res.* **20** (7), 1547-1552.
  48. Shimura, Y., Aono, H., Ozeki, H., Sarabhai, A., Lamfrom, H., Abelson, J. (1972). Mutant tyrosine tRNA of altered amino acid specificity. *FEBS Lett.* **22**, 144.
  49. Smith, J. D., Celis, J.E. (1973). *Nature New Biol.* **243**, 66.
  50. Swanson, R., Hoben, P., Sumner-Smith, M., Uemura, H., Watson, L., Söll, D. (1988). Accuracy of *in vivo* aminoacylation requires proper balance of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **242**, 1548-1551.
  51. Weygand-Durasevic, I., Rogers, M.J. and Söll, D. (1994). Connecting Anticodon recognition with the active site of *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* **240**, 111-118.
  52. Woo, W., Rich, A. (1980). The three dimensional structure of *E. coli* initiator tRNA<sup>Met</sup> *Nature* **286**, 346-351.

53. Yamao, F., Inokuchi, H., Cheung, A., Ozeki, H., Söll, D. (1982). *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. I. Isolation and DNA sequence of the *glnS* gene. *J. Biol. Chem.* **257**, 11639-11643.
54. Young, R. A., Davis, R.W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1194.

## 謝辞

井口八郎先生には、研究の初歩の段階から大変熱心にご指導いただき、技術・精神の両面を含めあらゆる側面から研究者としての態度を学ばせて頂きました。心よりお礼申し上げます。また山岸秀夫先生には、異なる視点からの貴重なアドバイスを多数頂きました。ありがとうございました。研究生生活の初めにはHSP研究所の中東憲治博士と基礎生物学研究所の小峰由里子博士、大阪大学医学部の宮本一政博士に丁寧にご指導いただきました。山之内製薬の西村耕一博士、中外製薬の安東英明氏には大変お世話になりました。感謝いたします。また、安達俊治氏にもこの場を借りてお礼申し上げます。

本研究の主要な部分であるGlnRSの精製と生化学的解析は、米国Yale大学のDieter Söll教授のもとで行われました。海外での研究の機会を与えて下さったSöll教授にこの場をかりて感謝いたします。またその際、生化学的方法をご指導下さいました、Kwang-Won Hong博士とMichael Ibba博士を初めとする多くの方々に感謝を申し上げます。

京都大学生物物理学教室の分子生物学講座の皆さんには、研究生生活のあらゆる面にわたってお世話になりました。特に同期の荒川央君と中屋敷徹君からは大変多くの刺激を受けました。また成田新一郎君、玉城礎野美さん、中野宏昭君には、本稿に掲載された全ての図表の作製において、大変お世話になっております。講座の皆さんの支えなしには五年間の大学院生活を無事に終えることは出来ませんでした。ありがとうございました。皆さんが優れた研究者になられることをお祈り申し上げます。

最後になりましたが、結果的に複雑に入りこんでしまった本稿を、辛抱強く読み通して下さった読者の方に、心より感謝いたします。ありがとうございました。