The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ホルミルメチオニンtRNA変換体の合成と活性
Author(s)	土井, 健史
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1569
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏名・（本籍）	土井健史（どいたけふみ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 6435 号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	薬学研究科 薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ホルミルメチオニンtRNA変換体の合成と活性**
論文審査委員	（主査） 教授 池原 森男 （副査） 教授 北川 勲 教授 冨田 研一 教授 田村 恭光

論文内容の要旨

tRNAは鎖長70～80の機能を有するRNAとしては最小の分子である。著者は化学合成フラグメントよりRNA ligaseを用いて種々のtRNA分子を合成し，この際これらのRNA ligase 反応における塩基特異性を見出した。このRNA ligaseによるRNA鎖構成という手法を用い，E. coli $tRNA_f^{Met}$ のアクセプターステム，Tψループ，Dループ，アンチコドンループを変換したtRNAを合成し，種々の蛋白質との相互作用を調べた。

I．RNA ligaseを用いた長鎖RNAの合成

鎖長3～6の比較的短鎖の化学合成オリゴマーを用いRNA ligaseで結合しtRNA ¼鎖長分子4種を合成し，これらを用いてtRNA 3' 及び5' 半分子を合成した。このRNA ligase反応においてacceptor側に関しては3' 末端にピリミジンープリン配列をもつ分子が，donor例では自己相補的な構造をもつ分子がそれぞれ反応し難いことがわかった。

II．E. coli $tRNA_f^{Met}$ 変換体の合成とその性質

1）E. coli メチオニルtRNA合成酵素との相互作用

E. coli メチオニルtRNA合成酵素との相互作用を調べるために以下のtRNA変換体を合成した。

i）アクセプターステムの5' 末端でG－C塩基対を形成する$tRNA_f^{Met}$

ii）TψループのTψCを真核生物のイニシエーターtRNAに特有のAUCに変換した$tRNA_f^{Met}$

iii）アンチコドンの5' 側隣接位の共通塩基Uを他の塩基に変換した$tRNA_f^{Met}$

iv）アンチコドンループを拡大した$tRNA_f^{Met}$

v）Dループの欠除した$tRNA_f^{Met}$

vi) 5′側半分子にE. coli $tRNA_2^{Gly}$ の塩基配列をもつ$tRNA_f^{Met}$

合成には天然のE. coli $tRNA_f^{Met}$ フラグメントと化学合成オリゴマーとを組みあわせ，これらをRNA ligaseで結合する方法を用いた。合成したtRNAについてアミノ酸受容活性を測定した。

アクセプターステムを変換したtRNAはもとの$tRNA_f^{Met}$と同等の活性を示したが，TΨループ，Dループを変換したtRNAはほとんど活性を失った。アンチコドンの5′側隣接位の塩基は活性に影響しなかった。ループを拡大したtRNAについては，2塩基付加したtRNAはメチオニルtRNA合成酵素に対する親和性は低かったが，CAU配列が存在すると活性を失わなかった。1塩基付加では5′側にUを付加したtRNAは3′側にAを付加したものより親和性が強かった。これはアンチコドンの5′側と3′側で塩基のこみ具合が異なり，5′側にはUを付加できる余裕が存在したためと考えられる。又，リボゾーム上でのmRNAとの結合実験より，5′側にUを付加したtRNAはアンチコドンのコンホメーションをある程度保持した構造をもつことが推測できた。

2) E. coli EF－Tuとの相互作用

アクセプターステムの5′末端でG－C塩基対を形成した$tRNA_f^{Met}$ についてE. coli EF－Tu との結合実験を行ない塩基対を形成した合成$tRNA_f^{Met}$ は一部EF－Tuと複合体を形成し，塩基対を形成しないものは形成しないことを見出した。このことから5′末端の塩基対はEF－Tuに対する親和性を強めることがわかった。

3) アンチコドンの3′側隣接位の塩基修飾

アンチコドンの1字目をC又はG，3字目をA，C，G，Uに置換した合計8種類のアンチコドン変換E. coli $tRNA_f^{Met}$ を合成し，Xenopus laevis oocyteの細胞質にマイクロインジェクト（アンチコドンの3′側隣接位Aを調べた。アンチコドンがCAU，GAUのtRNAのみt^6Aに修飾を受けることがわかった。又、この配列をもつtRNAは他の変換体に比べoocyte中で安定に存在できることを見出し，アンチコドン配列がtRNAの安定性に関与することをはじめて示した。

以上の結果をまとめると，

1. 短鎖の化学合成オリゴマーをRNA ligaseを用いて結合し，長鎖のRNA分子とした。この際RNA ligaseの基質特異性を見出した。

2. 1.の手法を用いて種々のE. coli $tRNA_f^{Met}$ 変換体を合成し，その性質を調べた。

i) E. coliメチオニルtRNA合成酵素との相互作用では，tRNA全体の3次構造とアンチコドン配列が重要で5′末端の塩基対は関係しないことがわかった。

ii) tRNAとE. coli EF－Tuとの複合体形成には，5′末端の塩基対がこれらの親和性を強めることを見出した。

iii) Xenopus laevis oocyteを用いた系では，アンチコドン配列によりtRNAの安定性が異なること，又E. coli中では修飾されないアンチコドンの3′側隣接位Aはこの系でt^6Aに修飾されることを見出した。

論文の審査結果の要旨

土井君は先ず合成オリゴリボヌクレオタイドを基質としてRNAリガーゼによる結合反応を検討し，14，17，26鎖長の$tRNA_f^{Met}$部分オリゴマーを合成した。その際アクセプターの3′末端の構造活性相関性を発見した。

次に天然tRNAをRNase T_1により部分切断し，そこに各種の合成オリゴマーをリガーゼを用いて結合することによって，3′末端水素結合分子(I)，TΨCループをAUCに変換した分子(II)，3′側半分子を$tRNA_2^{Gly}$に変換した分子(III)，D－ループ及びステムを欠損した分子(IV)，及びアンチコドンCAUをCAUA，CAUAA，UCAU，CCAU，ACAU，GCAU，UUCAUに変化した$tRNA_f^{Met}$分子(V)を合成し，夫々のアミノ酸受容活性及びIF－Tuとの反応を調べた。その結果，(I)及びXCAUを入れた(V)は受容活性に変化が無かったが，(II)，(III)及びCAUXを入れた(V)は活性を失った。又アフリカツメガエルの卵母細胞に於てアンチコドン5′隣のAが修飾されることを見出した。又(I)はEF－Tuと錯体を形成した。

これらの成果は博士号請求に値するものと考える。