

Title	ホルミルメチオニントRNA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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 4 】

氏名・(本籍)	と	い	たけ	ふみ
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	6	4	3
学位授与の日付	昭	和	59	年
学位授与の要件	薬	学	研	究
	科	薬	品	化
	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	富	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^{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-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^{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^{Met}_f
- 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^{Met}_f
- 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^{Met}_f
- iv) アンチコドンループを拡大したtRNA^{Met}_f
- v) Dループの欠除したtRNA^{Met}_f

vi) 5' 側半分子に *E. coli* tRNA₂^{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、T_Ψ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 t⁶A 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 t⁶A 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チドを基質としてRNAリガーゼによる結合反応を検討し、14, 17, 26鎖長の $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ 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 T₁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)、T Ψ CループをAUCに変換した分子(II)、3'側半分子を $\text{tRNA}_2^{\text{Gly}}$ 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 $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ 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なかったが、(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らる。