



Title	蛋白質生合成における修飾ヌクレオチドの作用に関する研究
Author(s)	村尾, 捷利
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30806
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【11】

氏名・（本籍）	むら 村	お 尾	かつ 捷	とし 利
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	2717	号	
学位受与の日付	昭和48年3月10日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	蛋白質生合成における修飾ヌクレオチドの作用に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 池原 森男			
	(副査) 教授 上原喜八郎 教授 田村 恭光 教授 近藤 雅臣			

論文内容の要旨

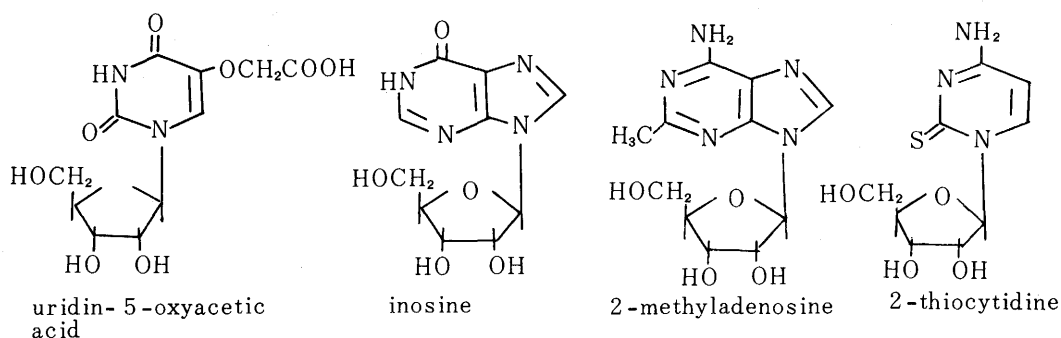
緒論

蛋白質生合成に関与するリボ核酸(RNA)には大きく分けて三種類ある。1)ポリペプチドのアミノ酸配列を決定づけるメッセンジャーRNA(messenger RNA-mRNA)、2)ポリペプチドの合成がおこなわれる場所であるところのリボソームを構成しているリボソームRNA(ribosomal RNA-rRNA)、そして3)メッセンジャーRNAの情報通りのアミノ酸をリボソーム上に運搬するトランスファーRNA(transfer RNA-tRNA)の三種である。RNAの主要構成成分は四ヌクレオチド、アデニル酸(A)、グアニル酸(G)、シチジル酸(C)、ウリジル酸(U)であり、その他の構成成分は一般に微量成分と呼ばれる。mRNAには微量成分は含まれず、rRNAにはわずかにメチル化ヌクレオチドが見られるだけだが、tRNA中にはいまだに構造の未知の化合物も含め数十種類も発見されている。一方tRNAの構造研究も大いに進んで、大腸菌では約20種、酵母の16種を初め、サルモネラ菌、スタフィロコッカス、ラット肝、ファージT₄などのtRNAの構造も決定されている。そして二次構造上の共通構造(クロバー葉モデル)がほぼ確立され、機能部位が明るみに出てきた。そこには微量成分が位置していることが多い。特にmRNA上の三つのヌクレオチド配列(コードン)に対して適正なアミノ酸を転移するためにコードンと水素結合により結合する部位、すなわちアンチコードン部位にはほとんど必ず微量成分が存在し、重要な役割を占めている。一つのtRNAがいくつかのアミノ酸コードを認識できるambiguityという現象を理解するためにもtRNAの全塩基配列の決定と共に微量成分の構造とその役割の解明も重要である。

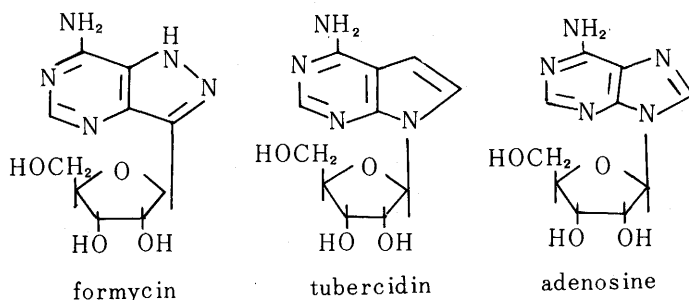
バリンのコードはGUU、GUC、GUA、GUGの四種、アルギニンのコードはCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、AGGの六種ありコード認識の機構が興味深い。大腸菌のバリンtRNAは二種発見され、そのうちtRNA^{Val}₁のアンチコードン部位には構造未知の“V”と呼ばれるヌクレオシドが存在するこ

とがわかっており、¹²⁾このtRNA^{Val}はGUA、GUG、GUUの三つのコードを認識できた³⁾。演者はこの機構を解明するために、Vの化学構造を検討し合成表品とも合わせてUridine-5-oxy acetic acidであることを決定した。uridineはAやGを認識できるがUは認識できないので、ウラシル核の5位に置換基が導入され、Uとも水素結合が可能になったものと思われる。

大腸菌のアルギニンtRNAは少くとも五種発見され⁴⁾コード認識能についても研究されていたが一次構造の法定はされていなかった。演者は大腸菌からtRNA^{Arg}を精製し主要画分のtRNA^{Arg}の全塩基配列と決定した。その結果、大腸菌としては初めて、イノシン(I)がアンチコードン1字目に存在することを見出し、IがVとは異なって、C、A、Gを認識することにより、このtRNA^{Arg}はCGC、CGA、CGGを認識するtRNAであることがわかった。このtRNA^{Arg}にはアンチコードン部分に2-メチルアデノシン、2-チオシチジンも含んでおりコード認識に何らかの役割を占めていると思われる。



以上のようにtRNAには多くの微量成分が含まれ、蛋白合成におけるコード認識に種々の貢献をしていることがわかったが微量成分を含まないmRNAに人工的に主要四成分以外のヌクレオチドを導入した時どのような影響が見られるであろうか。演者は、ヌクレオシド型抗生物質であるフォルマイシン、ツベルシジンの作用機作の理解とも合わせてこれらのヌクレオシドを含むポリヌクレオチドをmRNAとした場合の影響について研究した。



フォルマイシン、ツベルシジンの三リン酸を基質として、RNAポリメラーゼによりポリヌクレオチドを合成し、それらをメッセンジャーRNAとして、アミノアシルtRNAのリゾホームへの結合促進効果や大腸菌無細胞蛋白合成系におけるポリペプチド合成を行なうかどうか検討した。

本 論

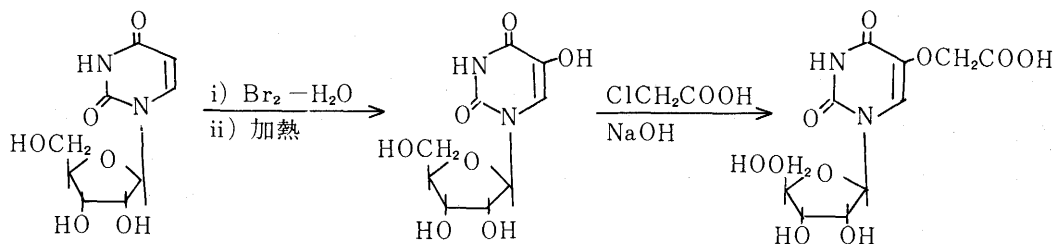
第一章 tRNA中に含まれ、遺伝コード認識に関与する微量成分

1. tRNA^{Val}に含まれるuridine-5-oxyacetic acid

大腸菌tRNA^{Val}の一次配列はHaradaら¹⁾⁵⁾⁶⁾ Yanivら²⁾により個別に発表されており、アンチコード一字目に構造未知のVと略称されるヌクレオシドを含んでいる。HaradaらはVはAとGそれに、それらの20%くらいの効率でUも認識したと報告した。演者は未分画の大腸菌tRNAから大量にVを単離することに成功したので、それをもとに化学的・物理的諸性質を測定し推定構造を設定し、合成標品により、完全に構造を決定することができた。

未分画大腸菌tRNA 5 gを仔牛すい臓RNase (RNaseI) 100mgで完全に分解し7M尿素存在下DEAE-セファデックスA-25のカラムクロマトグラフィーによりジヌクレオチドの次に溶出する小ピークから得られるモノヌクレオチドは、tRNA^{Val}から得られるVpとU₂-V吸収曲線、ペーパークロマトグラフィー・電気泳動の挙動が一致したのでこれを用いて構造研究を行った。

①VはU₂-V吸収曲線(中性、酸性、アルカリ性で $\lambda_{\max}$ が278nmからあまり変化しない)、二次元ペーパークロマトグラフィーの位置、Vのりん酸ジスエステル誘導体と思われた。②VpがDEAE-セファデックスカラムでジヌクレオチドの後ろに溶出されVは電気泳動でウリジン2',3'環状りん酸と同じ泳動度を示したことからヌクレオシドVはnegative chargeを1ヶ持っていると思われる。またこのpKa値は約2.9であったことからカルボン酸が推定された。③D₂O中でのNMRスペクトルからウリジンの核が存在し、 τ 2.43のH-6のプロトンはあるがH-5プロトンが消失していること、新たに τ 5.60にsingletで2個のプロトンが検出されたことからウラシル核の5置換体と思われた。④5置換ウリジン誘導体のUV吸収を比較してみると、5-carboxyuridine ($\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 275nm)、5-carboxymethyluridine ($\lambda_{\text{max}}^{\text{pH}7.0}$ 266.5nm)、5-acetyluridylylate ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 283nm)、5-hydroxyuridine ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 276nm)などであった。このことからVの5置換基は-COCH₂-または-OCH₂-を介したカルボン酸であることが示唆された。⑤しかしながら、活性メチレン試薬に対してVはnegativeであったので-COCH₂-は除外された。そこで①~⑤の結果からuridine-5-oxyacetic acidの構造が一番妥当のように思われたので、化学合成して諸性質を比べてみた。



上記の方法により得た標品は水から再結晶し、元素分析値は理論値によく一致した。このuridine-5-oxyacetic acidを天然標品と比較してみると、①各pH値でのUV吸収曲線、②二次元のペーパークロマトグラフィーおよび7種類の溶媒系でのクロマトグラフィーのRf値、③電気泳動の移動度④NM

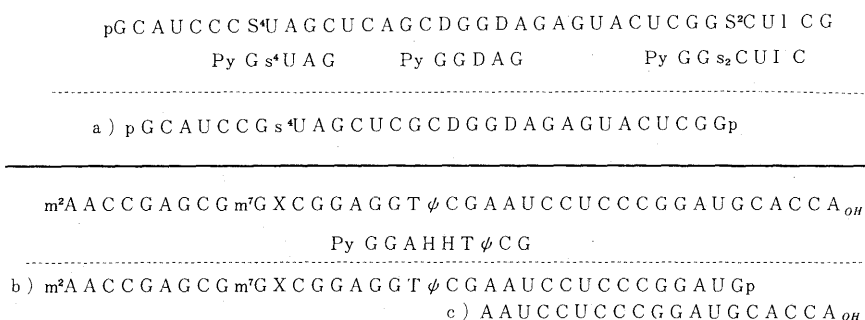
Rスペクトル⑤IRスペクトル⑥そしてさらにV-TMS-TMF (Vをtrifluoroacetylationとtrimethylsilylationしたもの)のmassスペクトルで示されるmolecular ionのすべての点で完全に一致した。この結果Vはuridine-5-oxyacetic acidであることが決定された。

今までこのような化合物は各種核酸の中から発見されたことはなく、生合成という点でも興味深い。5位に $-OCH_2COOH$ という置換基が入ることにより、ウラシル核とも水素結合が可能となる機構についてはさらに、物理化学的検討が必要である。その後Ishikuraら⁷⁾によりtRNA^{Arg}と同じようなタイプのコード認識をされると言われていた大腸菌tRNA^{Ser}のアンチコード1字目にVがあることが報告された。また、未確認ながらtRNA^{Ala}にもVが存在すると言われている。酵母ではIがあり、大腸菌ではVに変わっているという進化の点でも興味深い。

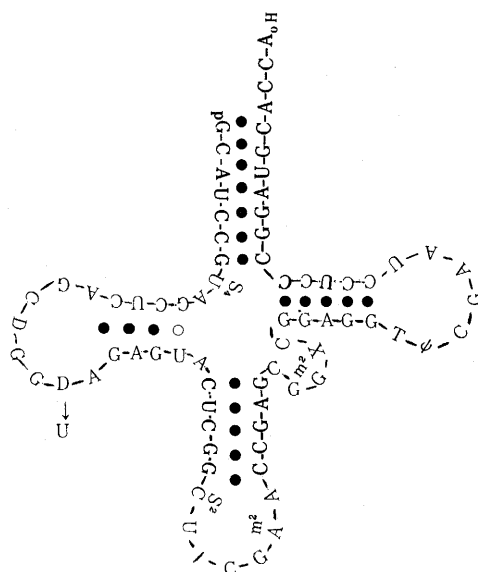
2. tRNA^{Arg}の全塩基配列とその中に含まれる微量成分

大腸菌tRNAは少くとも五種あるといわれ、アルギニンのコードも六つあるので、コードン-アンチコードンの相互作用の面からも構造には興味深い。演者は未分画の大腸菌tRNA^{Arg}中には、大腸菌としては初めてInosineを0.4mol見出した。そこで種々のカラムクロマトグラフィーの組合わせにより主要成分であり、Inosineを含むtRNA^{Arg}を95%以上の純度で精製した。このtRNAはInosineの他に、4-Thiouridine、Dihydrouridine、2-Thiocytidine、2-Methyladenosine、7-Methylguanosine、Ribothymidine、Pseudouridineを含んでいた。これらの微量成分はすべて既知のものであり、UV吸収、ペーパークロマトグラフィーなどにより確認した。また構造未知の化合物も1mole含んでいる(このものをヌクレオシドXと仮称する)。このXはUV吸収が $\lambda_{\max}^{PH2.0}$ 264nm、 $\lambda_{\max}^{PH7.0, 12.0}$ 263nmを示し、ウリジン誘導体と思われるがまだ、その構造は不明である。大腸菌のtRNA^{Phe}に報告されているXとよく似ている⁸⁾。

tRNA^{Arg}の全塩基配列はすでに常法となったRNaseT1の完全分解、RNase Iの完全分解のオリゴヌクレオチドの配列を各種の酵素を使って決め、さらにRNaseT1の限定分解による、より長いオリゴヌクレオチドの単離による重ね合わせ手法を用いることにより決定できた。オリゴヌクレオチドの分別には従来のDEAE-セファデックス7M尿素系の他にSangerら⁹⁾の開発した二次元電気泳動法も取入れた。この方法は限定分解産物の分析には特に有用であった。



この一次配列をtRNAの共通のモデルとなったクロバー葉モデルに組みなおすと、図の如くなり機能部位と微量成分の関係がよくわかる。



最も重要なことはInosineがアンチコードン1字目に存在しICGというアンチコードンを形成し、このtRNAのコードであるCGU、CGC、CGAの認識をしているということである。酵母とラットのtRNAには何種類かInosineを含んでいるものがあるが、大腸菌では初めての発見である。

アンチコードンループには s^2C と m^2A はアンチコードン3'側隣の修飾プリン塩基というほとんどのtRNAの共通性を満足し、大腸菌のヒスチジン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸の各tRNAの同じ位置からも発見されている¹⁰⁾。 s^2C は、その後最近になってYamadaらにより大腸菌のtRNA^{ser}の全く同じ位置にも存在することが等告された¹¹⁾。アンチコードンの5'側隣りもピリミジン塩基が共通的に来るが、一般的にメチル化されたり ψ 化されたり修飾されているものも多い。このような微量成分の配置によりアンチコードンループの露出化、コードンとの相互作用性を高め、さらにはtRNAにアミノ配を受容させるアミノアシルtRNA合成酵素の認識にも寄与しているものと思われる。

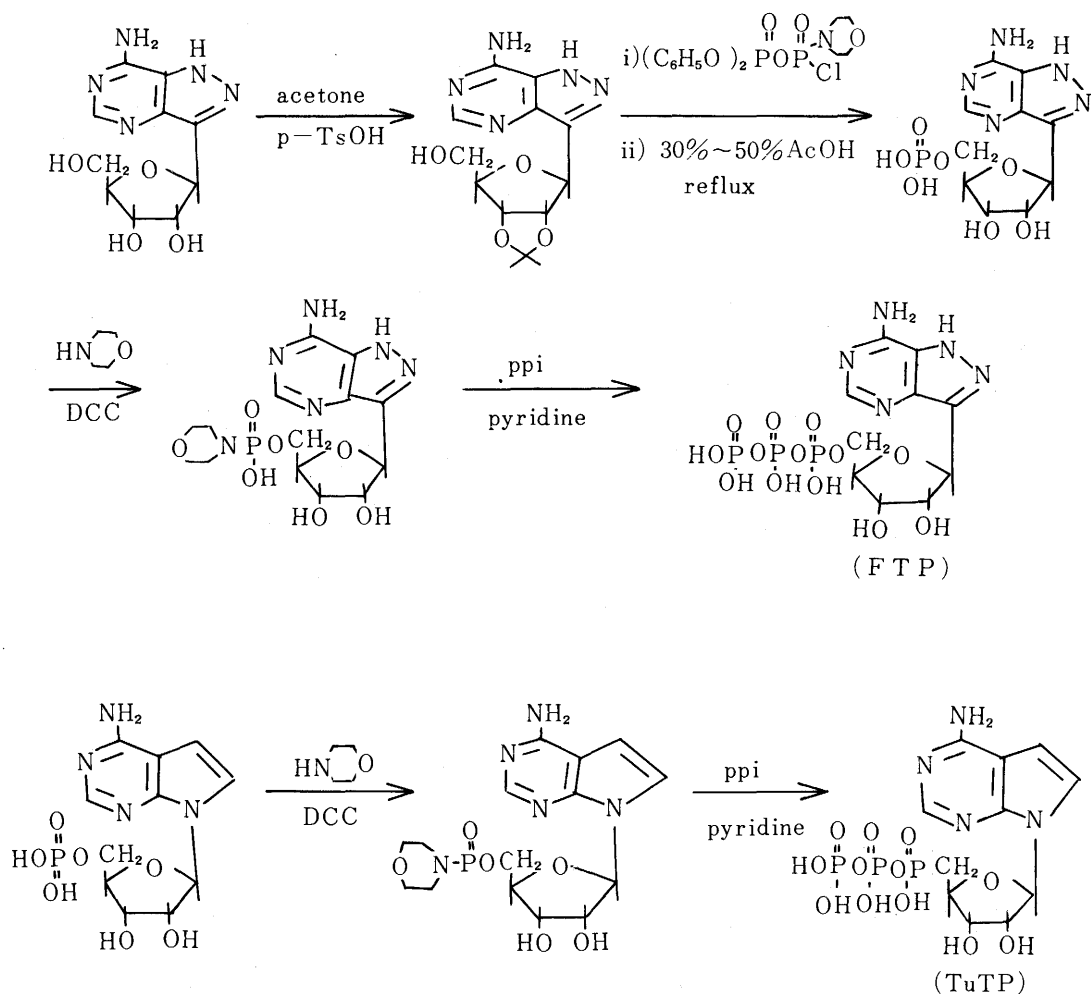
第二章 Formycin またはTubercidinを含むリボポリヌクレオチドのメッセンジャーRNAとしての機能

Khoranaらにより、塩基配列の繰返しのデオキシポリヌクレオチドを鋳型にして、それに相補的なリボポリヌクレオチドをRNAポリメラーゼにより合成し、さらにそれをメッセンジャーRNAとして、リボゾームへのアミノアシルtRNAの結合促進効果やポリペプチドの大腸菌無細胞系での合成などの方法が開発され、アミノ酸の遺伝コード解明に多大な貢献をした¹²⁾。この方法を応用してformycinおよびtubercidinを含むリボポリヌクレオチドの合成とmRNAとしての機能を調べた。

1. RNAポリメラーゼの基質の合成

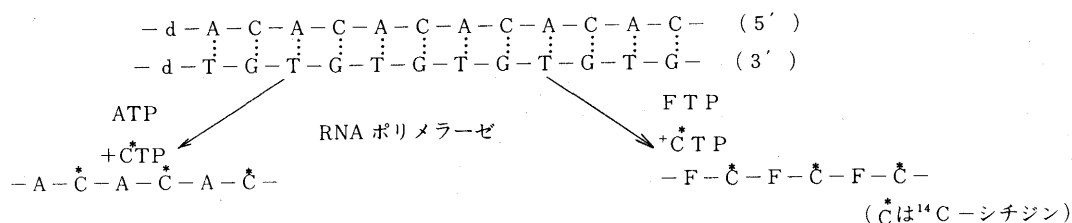
大腸菌のDNA依存RNAポリメラーゼはDNAを鋳型とし4種のリボヌクレオシド三リン酸(ATP、GTP、CTP、UTP)を基質としてDNAに相補的な塩基配列のリボポリヌクレオチドを作る酵素である。formycin 5'-triphosphate (FTP) およびtubercidine 5'-triphosphateを下図の方法により

収率良く合成した。



2. FormycinまたはTubercidinを含むリボポリヌクレオチドの合成

RNAポリメラーゼは大腸菌B株よりChamberlin、Bergの方法¹³⁾を用いて調整した。繰返しの配列をもった合成デオキシリボポリヌクレオチドは、Khorana博士より供与されたものでpoly d (A-T)、poly d (T-G)・d (C-A)、poly d (T-C)・d (G-A)である。これらはATP、UTP、CTP、GTPを基質として対応するリボポリヌクレオチドを生成することがわかっている。ATP、TuTPを基質としてリボポリヌクレオチドを合成した。



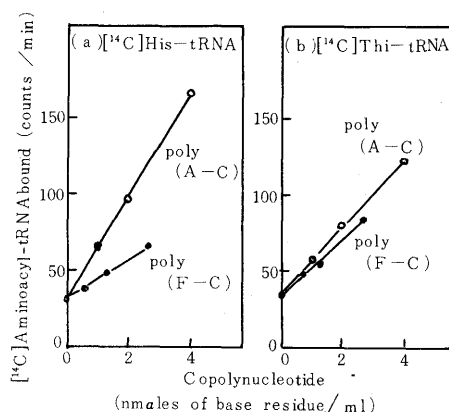
鋳型デオキシリボポリヌクレオチドに対し過剰のRNAポリメラーゼと基質により反応させ、酸不溶画分

への ^{14}C の取込みで合成量を比較するとpoly (F-U)、poly (F-C)、poly (F-C) · (G-U)の合成速度は poly (A-U)、poly (A-C)、poly (A-C) · (G-U)のそれに比べ51~67%であった。しかし、poly (F-G)、poly (F-G) (C-U)の場合は対応するAのポリマーとほとんど同じであった。このことからリボポリヌクレオチド合成においてATPの代りにFTPが使われることは template の塩基配列に強い影響を受けることがわかった。

TuTPの取込みについてはNishimuraらにより報告されている¹⁴⁾ので同じ条件でリボポリマーであるpoly (Tu-G)を合成した。これらのポリマーの繰返しの配列の規則性はRNase による分解で確認した。放射能を含まないポリマーを大量に合成して次節の実験に用いた。なお、この実験の際に、adenosineとは異なり formycinが通常ピリミジンヌクレオチドを基質とするRNase Iにより3'-5' phosphodiester結合が分解されるという事実を発見した。このことはformycin 2',3'-cyclic phosphateの分解という点でも確認された。

3. リボゾームへの結合促進効果

polyACはCACとACAというトリプレットの繰返しの配列をもつ。CACとACAは各々トレオニン、ヒスチジンをコードする。polyFCもpolyACと同様mRNAとしての機能を有するかどうか ^{14}C -His-tRNA、 ^{14}C -Thr-tRNAのリボゾームへの結合促進効果を、ポリマーの濃度を変えて調べてみた。リボゾームに結合した ^{14}C -アミノアシルtRNAをミリポアフィルター上に集めて放射能を測定すると下図の如くなり、結合のポリマー依存性が見られるとともにアミノ酸によって差が見られた。



4. 蛋白合成におけるメッセンジャーRNAとしての機能

polyAGはGAGという連続したトリプレットで形成されているので、これをmRNAとして大腸菌無細胞系で蛋白合成をさせるとアルギニン-グルタミン酸コポリペプチドができる。polyFG polyTuGも同様コポリペプチドを形成できるかどうかみた。 ^{14}C -アルギニンの不溶画分の取込みでみるとpoly FG、ポリTuGともにpolyAGと同じ効率を示した。

polyACは前述の如くヒスチジントレオニンポリペプチドを形成させる。polyFCは、ポリマー量をいろいろ変えて蛋白合成させてもpolyACと全く同じ効率を示した。

またコードするアミノ酸以外のものを間違えて取込まないかどうか、いわゆるmiscodingの検討もしてみたが高 Mg^{2+} 濃度においても読み違いは見られなかった。formycinはadenosineに代って充分mRNAの機能を発揮した。

結 論

1. 大腸菌 tRNA 中でアンチコードン 1 字目に存在して、コード認識に重要な役割を果たしている。Uridine-5-oxyacetic acid と Inosine を単離同定することができた。この二つのヌクレオシドは、tRNA^{Val}、tRNA^{Arg} 中においてそれぞれ、A、G、U および A、C、U を認識するユニークな存在である。

2. 大腸菌 tRNA^{Arg} の全塩基配列を決定し Inosine 以外にも 2-methyladenosine、2-Thiocytidine、構造未決定の X などの微量成分の役割などについて知見を得た。

3. ヌクレオシド型抗生物質 formycin および tuderocidin を含みリボポリヌクレオチドも adenosine を含む場合と変わらぬ m-RNA の機能を示すことが、アミノアシル tRNA のリボゾームの結合促進効果および大腸菌無細胞蛋白合成系でもポリペプチド合成により確められた。

論文の審査結果の要旨

本論文は、蛋白合成系に於てコード認識に重要な役割を果たしている uridine 5-oxyacetic acid 及び inosine を初めて大腸菌 tRNA より単離しその構造を決定したこと。これによりコード認識のモデルを提出し、又大腸菌 tRNA^{Arg} の全構造の決定を行うと共に新修飾ヌクレオチド、2-methyl adenosine、2-thiocytidine 及び他の一種のヌクレオシドを発見したこと。

更には抗生物質フォルマイシン及びツベルシゲンを含む messenger RNA のリボゾームへの aminoacyl tRNA 結合促進効果、又同 RNA の in vitro 合成に於けるフォルマイシンの作用、及び無細胞系蛋白合成に於ける当該 mRNA の活性等を検し、此等抗生物質の作用機作に一つの示唆を与えたこと、等を記述したものである。

此等の知見は、蛋白合成等に於ける修飾ヌクレオチドの役割について新しい知見をもたらしたものであり学位請求に値するものと認める。