The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	合成tRNAフラグメントの再構成並びにRNAリガーゼによる結合反応に関する研究
Author(s)	西川, 諭
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32034
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

【3】

氏名・(本籍)	西川　諭（にしかわ　さとし）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第　4253　号
学位授与の日付	昭和53年3月25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	**合成tRNAフラグメントの再構成並びにRNAリガーゼによる結合反応に関する研究**
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 冨田　研一

論文内容の要旨

緒　論

近年の分子遺伝学の発展は目ざましく，核酸の化学合成もその解明に大きな役割を果してきた。最近では人工的に合成された$tRNA^{Tyr}_{su^+}$の遺伝子が実際に in vivoでその機能を発現し，[1] 又合成したSomatostatineの遺伝子を組み込んだ大腸菌からは，Somatostatineがproductiveに得られるに至っている。[2] 一方RNAの化学合成はDNAのそれに比べ，2′水酸基が存在するために，困難かつ労力を要し，特定の塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドとしては9 mer[3][4] が最長のものである。又DNAリガーゼのような結合酵素の存在も最近まで明らかでなく，より長鎖のものを得ることは困難であった。しかし機能を持つ核酸として最初に一次構造が決定されたのはtRNA[5] で今までに50種以上のものの構造が明らかにされている。当初からその構造と機能との関係は「蛋白質と核酸の相互作用」の観点から興味が持たれ，様々な方法でその相互作用を明らかにする試みがなされてきたが，未だ完全な解明には至っていない。tRNAの化学合成は有機化学的にも興味ある課題であるが，この相互作用を解明する上にも，有効な方法であると考えられる。

今回演者は，先ず，化学的に合成されたYeast $tRNA^{Ala}$フラグメントと天然フラグメントを再構成しそのアラニン受容活性を調べ，合成フラグメントが天然由来のものと同様アミノ酸受容活性を持つことを初めて明らかにした。[6] 次に最近発見されたT4 RNAリガーゼ[7] による合成フラグメントの結合反応を試みた。その結果，RNAリガーゼ反応についていくつかの新しい知見を見出す[8] とともに，E. coli $tRNA^{fMet}$の3′末端の17mer[9] 及び5′末端の10merの合成を行った。

本　論

第一章　合成オリゴヌクレオチドとtRNAフラグメントの再構成

tRNAをRNaseで限定分解し，得られた断片を組み合わせアミノ酸受容活性の回復から認識部位を探る方法（再構成）[10] がある。化学的に合成されたtRNAフラグメントがアミノ酸受容活性を持つかどうかは興味ある問題なので，演者は先に当教室で合成されたYeast tRNA^{Ala}の3′末端9 mer C-G-U-C-C-A-C-C-A[3] 及び5′末端の2つの6 mer G-G-G-C-G-U[3], G-U-G-G-C-G[6] とTorula YeasetRNA^{Ala}のRNase T_1限定分解フラグメント[11]（図1）との再構成を表1に示す条件で行なった。

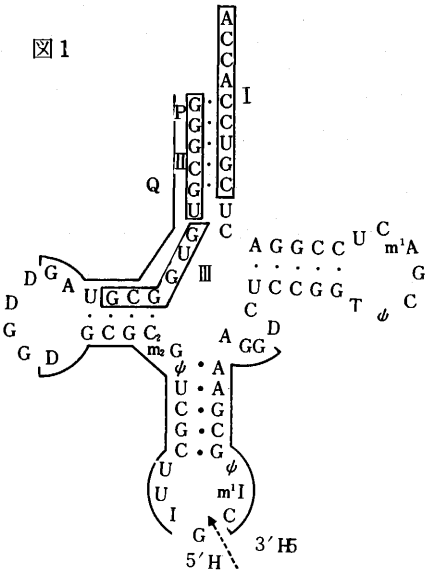


図1

図1.

表1　Reaction conditions

annealing

tRNA fragments (10—20μM of 3′-terminus)
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
10 mM $MgCl_2$
in 10 μl

55° 5 min in water bath
slow coolin over night
4° C

aminoacylation

0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.7)
4 mM ATP
20 mM KCl
10 mM $MgCl_2$
25 μM ^{14}C-alanine (50 μCi/μmole or 130 μCi/μmole)
ARSase (partially purified)
total 60 μl

0 ℃ 6 hr

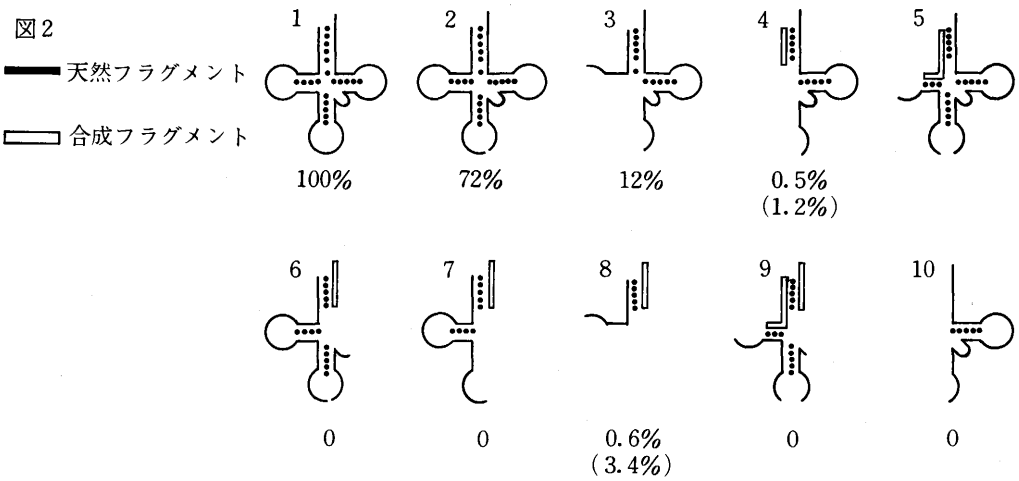
結果を表2，図2に示す。

表2

Components	3′-Component	^{14}Cincoroorated	Alanine/3′component	Activity *cf.* 1
	nmol	counts/min	mol/moi	1
Toluta tRNA^{Ala}(1)	0.0578	7362	0.631	100
3′H+5′H(2)	0.164	15112	0.456	72.2
3′H+5′Q(3)	0.164	2590	0.078	12.4
3′H+Ⅱ(4)	0.164	96	0.003	0.47
3′H+Ⅱ+Ⅲ+F_{20-34}(5)	0.164	207	0.006	0.95
Ⅰ+F_{36-46}+5′-H(6)	0.22	35	—	—
Ⅰ+5′H(7)	0.22	22	—	—
Ⅰ+5′Q(8)	0.22	157	0.004	0.63
Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ+F_{20-34}+F_{36-46}(9)	0.22	41	—	—
3′H(10)	0.164	35	—	—

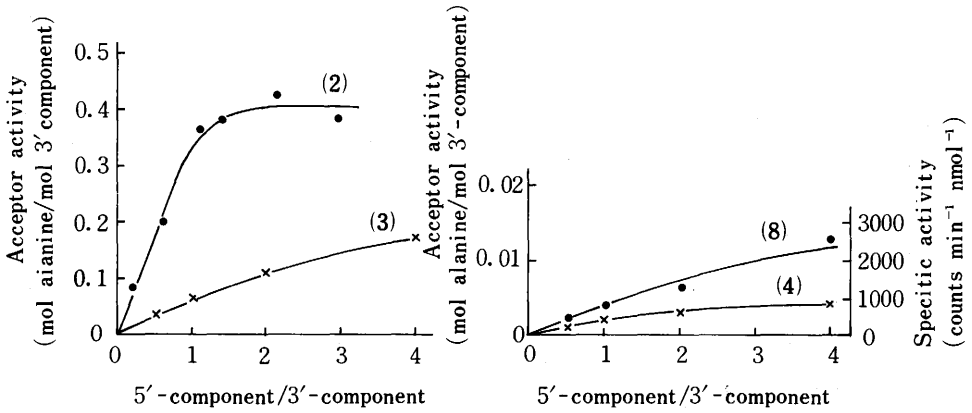
3′ halb単独(10)ではアラニン受容活性は全くない。3′ half＋5′-half(2) はintact tRNA(1)に対して72％ 又3′- half＋5′-quarter(2)も12％の活性が認められた。従ってD loopからanticodon loopまではアラニン受容活性にあまり重要でないと考えられる。

図2



一方，合成フラグメントを含む再構成分子では，(4)，(5)，(8)，に僅かながら活性が認められた。そこでこれらの活性が実際にcomplexを形成してアミノ酵を受容しているのかどうかを検討するため，3′-componentと5′-componentの量比を変えて，活性の変化を調べた。(図３)

図3



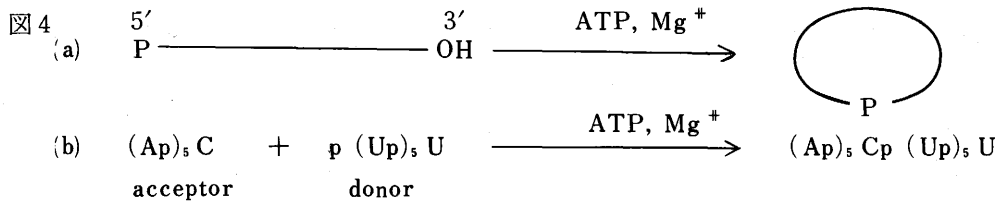
(2)は3′ halfに対し5′-halfが１～２当量で受容活性は一定になったが，(3)，(4)，(8)，は5′-componentを４当量加えるとそれぞれ25％，1.2％，3.4％に増加した。これは(3)，(4)，(8)のようにフラグメントが短い場合，１対１の量比では，complexの形成能が低く，5′-componentを過剰に加えることによりcomplexが増加するためと考えられる。

これらの結果，初めて合成tRNAフラグメントが天然由来のものと同様にアミノ酸受容活性を持つことが認められた。5′夫端の２つの６merをつなぐことができれば，5′quarterに近いフラグメントとなり(3)の結果と比較することができ，又フラグメントを再構成した後，切断箇所で再結合することも興味あることである。

第二章　RNAリガーゼの反応について

Hurwitzらにより発見されたRNAリガーゼは図4-(a)のようにlinearなpoly（rA）の3′-OHと5′-Pを分子内で環化結合する反応を触媒する。その後Uhlenbeckらは図4-(b)のようにオリゴマー同士でも基質，酵素とも高濃度の条件を用いると，分子間で結合の起ることを見出した。[12]

図4



演者はこのRNAリガーゼを用いてより長い特定の塩基配列を持つリボオリゴマーの合成を目的とし，先ずhomooligomerを基質としその反応を調べた。

1．ピロリン酸中間体の同定（$(Ap)_5A$をacceptorとし，$\overset{*}{p}(Up)_3U$をdonorとする反応を表3の条件で行ない次の2つの方法で調べた。

表3

reaction condition	
acceptor molecule	1 -15 nmole (0.1—1.5mM)
donor molecule	70—1000 pmole (7100 μM)
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	
10 mM $MgCl_2$	
10 mM DTT	
0.1 mM ATP	
0.5 μg BSA	
T4 RNA Ligase	0.4—2 unit
10 μl, 37°	

(A)大腸菌アルカリホスファターゼ（BAP）低抗性countの検出

(B)塩基非特異性のRNase Mによるnearest neighbour analysis

その結果，product，$(Ap)_5A\overset{*}{p}(Up)_3U$（34%），原料，$\overset{*}{p}(Up)_3U$（36%）とともに未知物質X（30%）の存在を認めた。Xは(A)の結果$\overset{*}{p}(Up)_3U$と解離の数が似かよったものであることがわかった。RPC5カラムクロマトグラフィーでXを単離し，ホモクロマトグラフィー（図5）で調べると，$\overset{*}{p}(Up)_3U$と同位置に動くが，acceptorに$(Ap)_5A$を用い，ATP（—）の条件下RNAリガーゼ反応を行なうと，productの位置に移行した。この結果XはRNAリガーゼ反応の中間体で，DNAリガーゼの反応機構[13]から類推して，donorの5′-PがATPで活性化されたA(5′)pp$(Up)_3U$と推測された。実際に5′,5′ピロリン酸結合も水解する蛇毒のホスホジエスラーゼ(VPDase)で水解すると，pUが得られ，ATPの代りに〔d-^{32}p〕·ATPと用いた時のXを水解すると$\overset{*}{p}A$と$\overset{*}{p}U$が当moleの割合で得られ（図6），上記の構造が確認された。

以上のことからRNAリガーゼの反応機構は，DNAリガーゼの場合と同様，図7のように3段階を経て起こると考えられる。尚RNAリガーゼ，AMP complexはHurwitzらにより単離同定されている。[14]

図5

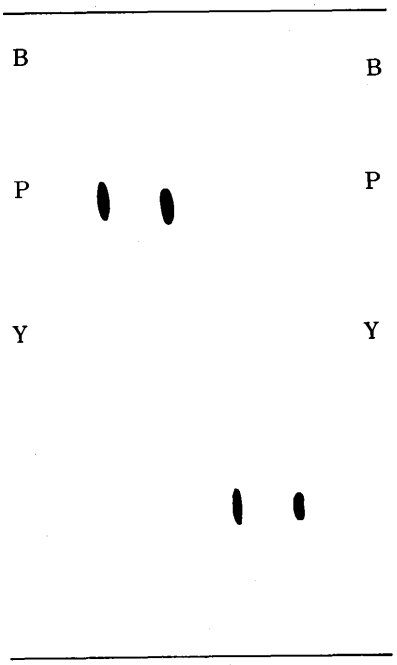
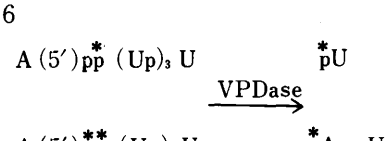


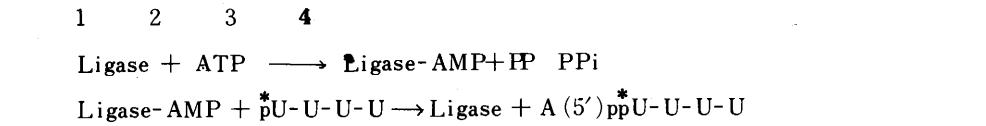
図6



1. $\overset{*}{P}$ $(U_P)_3$ U
2. X
3. X+$(A_P)_5$ A+RNAリガーゼ

C4G $(A_P)_5$ $A\overset{*}{p}$ $(U_P)_3$ U

図7



2. oligo (A)+p-oligo (Py) の反応と Oligo (Py)+p-oligo (A) の反応の比較

表4

Acoeptor nmole	Donor pmole	En unit	Time min	Joining %	RNase o pA *pUp	M digestion *pUp	A*p	U*p
A-A-A	15 *pU-U-U-U93	0.4	45	10	15	75	10	0
A-A-A-A	15 *pU-U-U-U93	0.4	45	33	42	25	33	0
A-A-A-A-A	15 *pU-U-U-U93	0.4	45	53	35	12	53	0
A-A-A-A-A	15 *pU-U-U-U53	1.2	15	~100[a]	—	—	—	—

a, observed in homochromatography.

表4にacceptorとしてoligo (A), donorとしてoligo (Py)を用いた場合の反応をまとめた。鎖長が短くなるに従い，収率が低下しているが，総じてこのtypeの反応はよく進行することが認められ

Acceptor nmole	Donor pomole	En unit	Time min	BAP resist.	RNaseM digestion *pAp	A*p	U*p	C*p
U-U-U-U	10 *pA-A-A-A-A	1000	2.0	15	57	43	55	2	—
U-U-U-U	15 *pA-A-A-A-A	68	0.4	45	27	63	24	3	—
U-U-U-U	15 *pA-A-A-A-A	72	0.17	120	9	91	9	0	—
C-C-C-C	15 *pA-A-A-A-A	72	0.17	120	30	70	24	—	6

た。一方acceptorとしてoligo（Py）donorとしてoligo（A）を用いた場合（表5），$U\overset{*}{p}$（3′），$C\overset{*}{p}$（3′）はほとんどなく，大部分$A\overset{*}{p}$（3′）が得られ，実際にproductを単離後RNase M水解で調べると，$A\overset{*}{p}$（3′）のみが得られた。これはacceptorを過剰に用いているにもかかわらず，図8のようにdonor分子が重合し，更に分子内で環化結合していることを示している。又3′末端にリン酸を持った

図8

$$(Up)_3U + \overset{*}{p}(Ap)_4A \xrightarrow{\text{RNAリガーゼ}} \underbrace{\overset{*}{p}(Ap)_4A\overset{*}{p}(Ap)_4A}_{((Up)_3U\overset{*}{p}(Ap)_4A)} \xrightarrow{\text{RNaseM}} Ap(3')$$

$\overset{*}{p}(Ap)_5$をdonorとした場合，重合反応は防ぐことができたが，$(Up)_3U\overset{*}{p}(Ap)_5$の増加は認められなかった。このようにoligo（A）はacceptorになりやすいのに対し，oligo（Py）はなりにくいという結果から，演者はRNAリガーゼには何らかの塩基特異性があると考えた。

第三章　X-Y-Z+$\overset{*}{p}$C-C-AのRNAリガーゼ反応

RNAリガーゼの塩基特異性及び特定の塩基配列を持つリボオリゴマーの合成にRNAリガーゼが利用できるか否かを明らかにするため種々の化学合成ribotripletを基質としその反応を検討した。

acceptorはdonorに対し5当量，RNAリガーゼ 1.05 unitを用い，先に示した条件で反応した。productはRPC5カラムクロマトグラフィーで単離し，先と同様の方法で同定した。結果を表6に示す。いずれの反応においても$\overset{*}{p}$C-C-Aの重合反応は認められず，更に$\overset{*}{p}$C-C-A単独でも中間体の段階で止まっていることがわかる。これは$\overset{*}{p}$C-C-Aが$\overset{*}{p}(Ap)_4A$とは異なり重合しにくいsequenceであることを示唆している。

表6

acceptor (1 nmol)	donor (nmol) *pC-C-A	En unit	tim min	temp ℃	product %	intermediata %
C-A-A	0.5	1.05	45	37	69	7
C-C-A	0.2	1.05	60	37	38	25
A-A-A	0.2	1.05	30	37	66	—
C-C-C	0.2	1.05	30	37	71	—
C-C-G	0.2	1.05	30	37	11	31
U-A-G	0.2	1.05	60	37	23	31
—	0.5	1.05	30	37	0[a]	31[a]
C-C-A (ONB)	0.5	1.05	30	37	1[a]	22[a]
C-A (oNB) A	0.3	1.05	30	37	40	17
U-U-C	0.2	1.4	30	37	25	23
U-U-C	0.2	3.5	30	37	46	13
C-C-G	0.2	2.1	60	37	26[a]	36[a]
C-C-G	0.2	0.7	60	30	43[a]	23[a]
U-U-U	0.2	0.7	60	30	50[b]	28[b]

a：estimated by PEP after treatments with RNase A and BAP.
b：estimated by PPC after RNase M digestion.

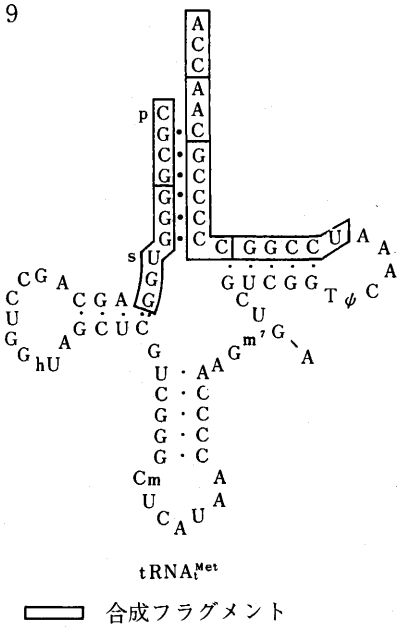
前章の結果と合わせて考えると，acceptorになりやすいのはAの多いsequence（A-A-A，C-A-A），なりにくいのは3′末端にGを持つsequence（U-A-G，C-C-G）及びPy塩基の多いsequence（C-C-A，U-U-C）と推論できる。しかしC-C-C＋$\overset{*}{p}$C-C-Aの結果が示すように，$(Py)_n$＋$\overset{*}{p}(A)_n$ の場合程critical なものではないようである。これは$\overset{*}{p}$C-C-Aが重合しにくいsequenceであることに関係していると考えられる。すなわち「$\overset{*}{p}$C-C-Aに対するRNAリガーゼのaffinityは小さく，acceptorは過剰に存在するので，sequenceにあまり関係なく比較的結合する。一方$\overset{*}{p}(A)_n$に対するaffinityは大きいので，affinityの小さい$(Py)_n$は認識されなくなる」と考えられる。一方合成の観点からはこのような特異性はできるだけ少なくする必要がある。そこでC-C-G，U-U-Cについて若干反応条件を変えてみた。その結果いずれも酵素量を増すことにより，productが増加し，又反応温度を下げげると更に効果のあることがわかった。この原因は明らかでないが，pHが少しアルカリ性に傾くためと考えられる。又基質と酵素のaffinityが増加することも考えられる。又，光照射により脱離できるo-ニトロベンジル基を糖部2′位に持つC-A^{ONB}-A[15]はC-A-Aに比べ収率は低下するが基質になること，しかしC-C-A^{-ONB}[15]は基質にならないことがわかった。従ってo-ニトロベンジル基はRNAリガーゼ精製の際に混入して来る3′-exonucleaseの作用を阻害する保護基，又donorの重合反応及び分子内環化反応を防ぐ保護基としても有効と考えられる。

以上の結果，tripletのように短い基質でも比較的収率良くつながること，その際sequenceによってはつながりにくいものがあること，しかし条件により収率を向上させうることがわかり，特定の塩基配列を持つリボオリゴマーの合成にRNAリガーゼが有用であることが明らかになった。

第四章　RNAリガーゼによる合成$tRNA^{fMet}_{E.coli}$フラグメントの結合反応

E. coli $tRNA^{fMet}$[16]（図9）は蛋白質合成の開始に関与するtRNAでその機能とともに一次構造も他のtRNAとは異なる特徴を有している。

図9



演者は当教室で合成されたフラグメント，U-C-C-G-G,[17] C-C-C-C-C-G,[17] C-A-A，C-C-AをRNAリガーゼでつなぎ，3′末端の17merの合成及びC-G-C-Gと G-G-G-U-G-Gより5′末端の10merの合成を計画した。

1．$\overset{*}{p}$C-A-A$\overset{*}{p}$C-C-AX^{OEt}の合成

図10のようなrouteで$\overset{*}{p}$C-A-A$\overset{*}{p}$C-C-AX^{OEt}の合成を行なった。3′末端は今後5′方向に鎖長を伸ばして行くことから，分子内環化反応及び重合反応を防ぐために，酸処理で脱離できるエトキシメチリデンを保護基に用いた。名反応はホモクロマトグラフィーで確認し，DE23カラムクロマトグラフィーでproductを単離した。最終的にVPDaseの限定分解で$\overset{*}{p}$C-**A**-A$\overset{*}{p}$C-C-AX^{OEt}であることを確かめた。収率は21%であった。

図10

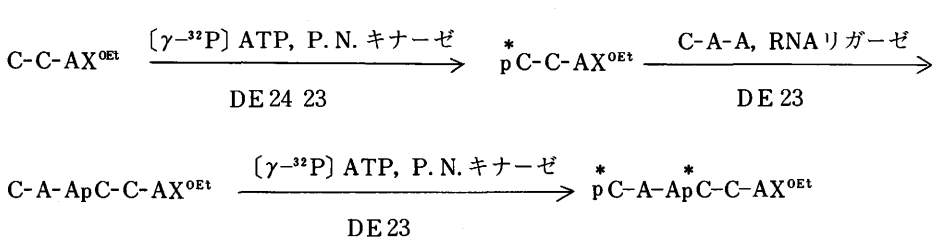
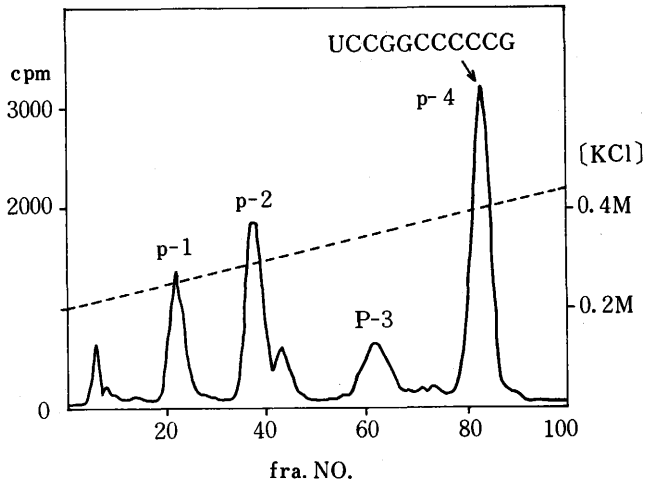


図11



2．U-C-C-G-G＋*pC-C-C-C-C-C-Gの反応

p*C-C-C-C-Gは*pC-C-Aと同様に，重合しにくいsequenceであることが認められたので，3′末端を保護することなく，又acceptor U-C-C-G-Gも4当量の条件でRNAリガーゼ反応を行なった。productはRPC-5カラムクロマトグラフィー（図11）により単離した。ホモクロマトグラフィー，nearest neighbour analysis，及びP.N.キナーゼで5′位を〔^{32}P〕ラベル後VPDaseの限定分解で，P-がU-C-C-G-G*pC-C-C-C-C-C-Gであることを確認した。収率は34%であった。

3．U-C-C-G-G-C-C-C-C-C-G＋*pC-A-A*pC-C-AX^{OEt}の反応

acceptor 67μM，donor 17μM，RNAリガーゼ70units/mlの条件で反応し，24時間後に5%の収率でproductの生成を認め（図13），単離後，nearest neighbour analysisでU-C-C-G-G-C-C-C-C-C-G*pC-A-A*pC-C-AX^{OEt}であることを確認した。（図14）

4．C-G-C-G＋pG-G-G-U-G-Gの反応

この反応はGが多いsequenceのためself-aggregateしやすく困難なことが予想された。しかし反応に先立ち70℃，2分間の加熱処理を行なうことにより，25%の収率でproductの生成を認めた。

以上のようにしてE. coli tRNA^{fMet}の3′末端の17mer及び5′末端の10merを合成することができた。この17merは現在までに人工的に合成された最長のリボオリゴヌクレオチドである。

図14

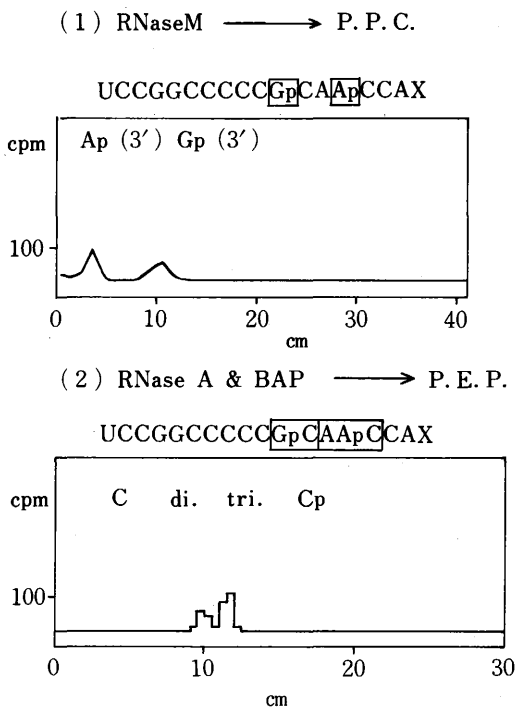
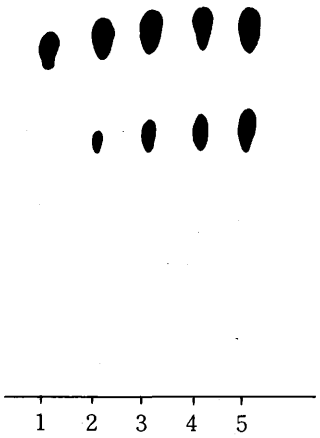


図13. ホモクロマトグラフィー

1, 4 : donor
5. : acceptor
2. : 1 hr reaction
3. : 3hrs mixture
6. : 24hrs

図15.
1. p*G-G-G-U-G-G
2. 30分
3. 60分 CGCG+p*G-G-G-U-G-G
4. 120分
5. 240分



結　論

1．合成tRNAフラグメントと天然tRNAフラグメントの再構成実験の結果，合成tRNAフラグメントが初めて天然由来のものと同様，アミノ酸受容活性を持つことを認めた。

2．RNAリカーゼによるリボオリゴマーの結合反応を調べ，この反応がATP由来のAMPがdonorの5′位にピロリン酸結合したA(5′)pp (Up)$_3$Uなる構造を持つ中間体を経て起こることを明らかにした。

3．RNAリガーゼにより，ribotriplet同士のように短いものでも比較的収率良くつながることを認め，特定の塩基配列を持つリボオリゴマーの合成に利用できることを明らかにした。又その際，RNAリガーゼが塩基特異性を有する知見を得た。

4．RNAリガーゼにより，E. coli tRNA^{fMet}の3′末端の17mer及び5′末端の10merの合成を行なった。

引用文献

1) R. Biegaie, E. L. Brown, H. J. Fritz, M. J. Gait, R. G. Less, K. E. Norris T. Sekiya, R. Contreras & H. G. Khorana (1976) Abstracts of the 172nd Meeting of the American Chemical Society, CARB 12, San Francisco

2) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Boliver & H. W. Boyer Science, (1977) **198**, 1056

3) E. Ohtsuka, M. Ubasawa, S. Morioka & M. Ikehara (1973) J. Amer. Chem. Soc. **95**, 4725

4) T. Neilson & E. S. Werstink (1974) J. Amer. Chem. Soc. **96**, 2295

5) R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisse, S. H. Merrill, J. R. Penswick & A. Zamir (1965) Science, **147**, 1462

6) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, M. Ikehara & S. Takemura (1976) Eur. J. Biochem. **66**, 251

7) R. Silber, V. G. Malathi & J. Hurwitz (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **69**, 3009

8) a) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, M. Sugiura & M. Ikehara (1976) Nucleic Acids Res. **3**, 1613

b) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, R. Fukumoto, S. Tanaka, A. F. Markham, M. Ikehara & M. M. Sugiura Eur. J. Biochem. (1977) **81**, 285

9) 大塚栄子，西川　諭，池原森男，杉演昌弘，第6回分子生物学シンポジウム（大阪1977年11月）

10) a) N. Imura, G. B. Weiss & R. W. Chambers (1969) Nature, **222**, 1147

b) W. Wubbeler, C. Lossow, F. Fittler & H. G. Zachau (1975) Eur. J. Biochem. **59**, 405

11) a) S. Takemura, K. Ogawa & K. Nakazawa (1973) J. Biochem. **74**, 313

b) S. Takemura & K. Ogawa (1973) ibid. **74**, 323

12) G. C. Walker, O. C. Uhlenbeck, E. Bedows & R. I. Gumport (1975) Proc. Natl. Acad. **72**, 112

13) I. R. Lehman (1974) The Enzymes **X**, 237
14) J. W. Cranston, R. Silber, V. G. Malathi & J. Hurwitz (1974) J. Biol. Chem. **249**, 7447
15) E. Ohtsuka, S. Tanaka & M. Ikehara (1977) Chem. Pharm. Bull. **25**, 949
16) S. K. Dube, K. A. Marker, B. F. C. Clark & S. Cory (1968) Nature, **218**, 232
17) A. F. Markham, T. Miyake, E. Ohtsuka & M. Ikehara (1977) Heterocycles, **8**, 229

論文の審査結果の要旨

西川君の業績は第一に，当教室で化学的に合成された酵母アラニン＋RNAの3′末端ノナヌクレオチド及び5′-末端の２つのヘキナヌクレオチドを，同tRNAよりT_1RNase限定分解で得たフラグメントとの再構成により，初めてアラニンの受容活性を見出したこと。

次に大腸菌フオルミルメチオニンtRNAの化学合成フラグメントの中，3′末端の17ケ及び5′末端の10ケのヌクレオチド配列を含むものをRNAリガーゼを用いて結合を試み，その合成に成功した。又，この反応の途次，RNAリガーゼ反応の真の中間体はdonor分子の5′隣にAMPがピロ燐酸結合した分子であることを発見したことにある。

これらの成果は充分博士号請求に値いするものと考える。