



Title	RNAリガーゼの精製とそれによるtRNA3'末端の修飾
Author(s)	上村, 春樹
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33185
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	上	村	春	樹
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	5630	号	
学位授与の日付	昭和57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	RNAリガーゼの精製とそれによるtRNA3'末端の修飾			

論文審査委員	(主査) 教 授 池原 森男
	(副査) 教 授 北川 熊 教 授 富田 研一 教 授 田村 恭光

論文内容の要旨

緒論

mRNAの遺伝情報が、タンパク質のアミノ酸配列に正しく反映されるのは、各tRNAがどのアミノ酸と結合するかによって決まる。同じアミノ酸を受容するtRNAが同一細胞中に2種以上存在することがあるが、両者の結合を触媒するaminoacyl-tRNA synthetase (ARSase) は、各アミノ酸ごとに1種類しかなく、しかも異なる起源のtRNAをも認識する場合が多い。ARSaseによるtRNAの認識の機構をさぐる目的で種々の研究がなされているが、はっきりした結論は得られていない¹⁾。任意の一部のみを他の塩基に置換したtRNAが得られるようになれば、tRNAの構造と機能の相関を研究する際に、有効な手段となり得ると考えられる。

筆者はまず、これらの研究に用いることの出来るRNaseの混入のないRNA ligaseを調製し²⁾、それを用いてE. coli tRNA^{Met}の修飾塩基を含まないnascent strandの3'-half分子を合成した³⁾。さらにtRNAの3'末端付近の修飾に応用し、E. coli tRNA^{Met}の3'末端から4番目の塩基（“識別位塩基”とよばれ、ARSaseによるtRNAの認識に関与していると考えられていた）のみを変換したanalog⁴⁾を合成し、そのアミノアシル化を行った。4番目をどの塩基にしたanalogでもE. coli Met RSaseによってメチオニンを受容し、4番目の塩基は、少なくともE. coli Met RSaseの場合、認識に直接関与していないことが明らかになった⁴⁾。

第1章 RNAリガーゼの精製

RNA ligaseは、オリゴリボヌクレオチドの分子内及び分子間で、5'リン酸基と3'水酸基の結合を触媒し、RNA合成に有用な酵素である^{5)~9)}。鎖長が長くなれば結合反応が進行しにくくなり、大量の

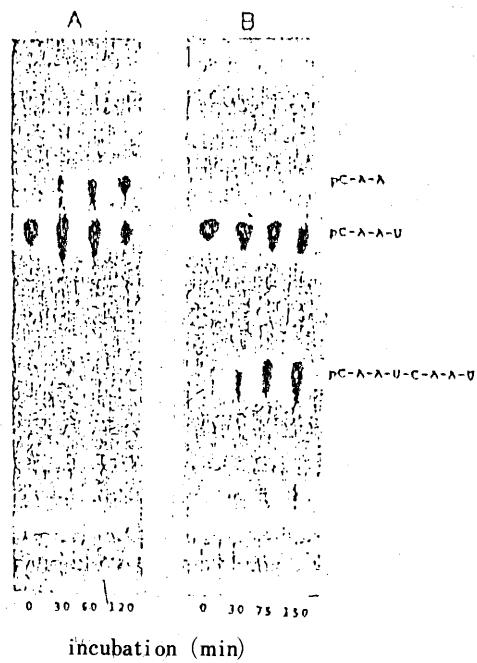


Fig. 1. Homochromatography of the reaction mixtures containing [$5'$ - ^{32}P] pCAAU and RNA ligase before (A) and after (B) chromatography on 2: $5'$ -ADP Sepharose 4B.

<div[](https://i.imgur.com/3QDfDfD.png)

活性中間体の形のものを化学合成して基質として用いれば、本来基質とならない（活性中間体を形成することの出来ない）modified nucleoside, alkyl phosphate, あるいはsuger phosphateも、オリゴリボヌクレオチドの3'末端に導入出来ることが報告されている。^{12)~14)} このことを利用して、P¹-adenosine 5'-P²-o-nitrobenzyl pyrophosphate (A (5') ppNB) により、光照射、phosphatase 处理で容易に脱保護出来るo-nitrobenzyl phosphateを、種々のオリゴリボヌクレオチドの3'末端に導入した。¹³⁾ この方法は、RNAの3'末端ラベル法としても応用することが出来る。

酵素を用いなければならぬが、そのためには、RNaseの混入のない酵素が必要とされる。混入している少量のRNaseを除去するための種々の方法が報告されているが^{10, 11)}、いずれも満足な結果は得られていない。

筆者は、RNA ligaseが、2',5'-ADP Sepharose 4Bに、Mg²⁺存在下で吸着され、Mg²⁺非存在下で溶出されることを見出し、精製の最後の段階にこのクロマトグラフィーを加えた。²⁾ RNaseの混入がなくなっていることは、基質* pCAAUを用いて確認した (Fig. 1)。

第2章 RNAリガーゼの化学合成オリゴリ

ボヌクレオチド結合反応への応用

RNA ligaseの反応は、ATP由来のAMPがdonorの5'リン酸とピロリン酸結合した活性中間体を経て、Fig. 2. に示すような機構で進行することが知られている。^{7, 9)} Donorの3'末端が水酸基のままであると、donorの環化あるいは重合という副反応がおこる可能性があるので、3'

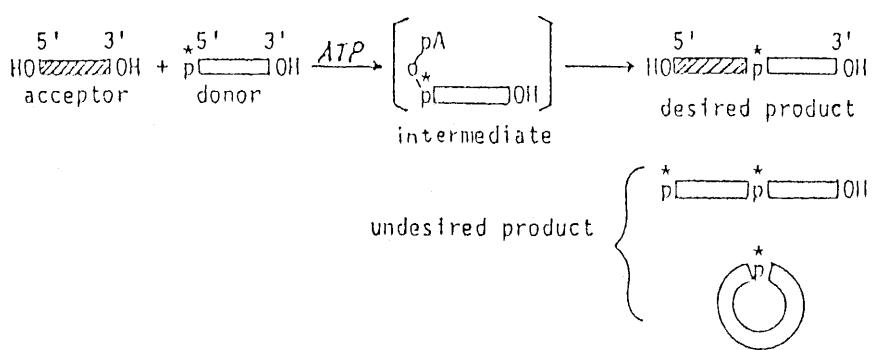


Fig. 2. T4 RNA ligase reaction.

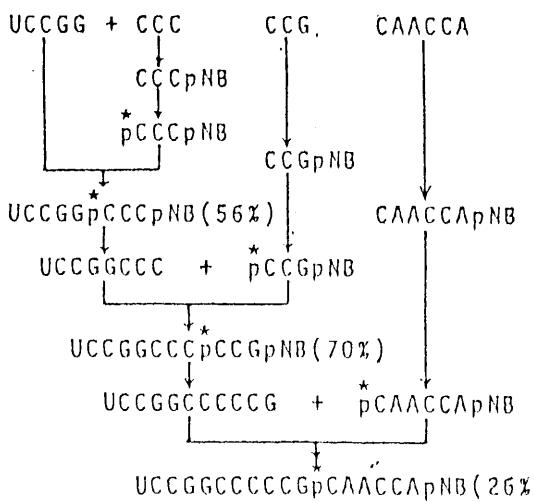


Fig. 3. Synthesis of the 3'-end 17mer.

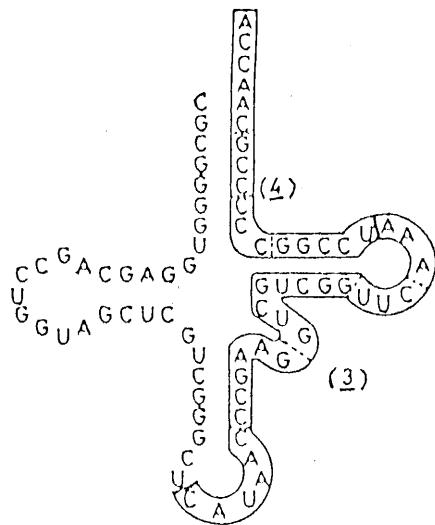


Fig. 4. E. coli tRNA_{Met} nascent strand.

次に、この保護基を用いて化学合成フラグメントの結合反応を行い、E. coli tRNA_{Met}の3'末端17merを、Fig. 3に示す順序で合成した。各反応の進行は、ホモクロマトグラフィーで確認し、結合位置が正しいことは、RNase T2によるnearest neighbour analysisで同定した。途中の結合生成物は、DEAE Sephadex A25カラムクロマトグラフィーで精製し、17merは、分離用の20% polyacrylamide disk gel electrophoresisで精製した。

さらに、得られた17mer UCCGGCCCCCGCAACCApNB(4)を、P. N. kinaseで5'リン酸化してdonorとし、別に合成された26mer CAUAACCCGAAGGUUCGUCCGUUCAAA(3)をacceptorとして、RNA ligaseによる結合反応を行い、E. coli tRNA_{Met}の3'-half分子43mer (Fig. 4)を合成した³⁾。生成物は20% polyacrylamide gel electrophoresisで分離した。なおこの3'-half分子と、別に合成された5'-half分子との結合反応により、E. coli tRNA_{Met}の修飾塩基を含まないnascent strandの全合成が行なわれた³⁾。

第3章 RNAリガーゼを用いるE. coli tRNA_{Met} 3'末端付近の修飾

Aminoacyl-tRNA synthetase (ARSase)によるtRNAの認識部位をさぐる研究は、tRNAフラグメントの再構成¹⁵⁾ 化学修飾¹⁶⁾ photocrosslinking¹⁷⁾等、種々の方法で行なわれてきているが、統一的な見解は、まだ得られていない¹⁾。

1972年、Crothers等は、それまでに一次構造の決まったtRNAを生物種を問わずすべて比較検討して、“tRNAの3'末端から4番目の塩基の種類は、そのtRNAが受容するアミノ酸の種類によって一定であり、化学的に似たアミノ酸は、その部位に同じ塩基を持つ傾向がある”ということに気付き、ARSaseによる特異的tRNAの認識に、この4番目の塩基が関与しているのではないか、という仮説を提唱した¹⁸⁾。その後、現在までに200種以上のtRNAの一次構造が決定され¹⁹⁾、いくつか例外のあることもわかつてきたが、大部分はこの仮説と良く一致している。

この仮説を実験的に確かめるためには、その部位の塩基のみを変換したanalogを合成して、そのアミノアシル化を見るのが最も確かであるが、これまでにtRNAの特定のある一部の塩基のみを変換

する方法はなかった。そこで筆者は、RNA ligaseを用いて、*E. coli* tRNA^{Met}の3'末端から4番目の塩基のみを置換したanalog (Fig. 5) を合成し、そのアミノアシル化を行った。

まず*E. coli* tRNA^{Met}をnuclease S1で処理することによって、3'末端の4塩基を除去したsampleを調製し (tRNA^{Met} (S1)と略す)、それに5'末端がA, G, U, Cの4種類のtetramer XCCA (X=A, G, U, C)をRNA ligaseで結合させて、intact tRNA^{Met}と同じもの、及び4番目の塩基のみを変換したanalogを初めて合成した。

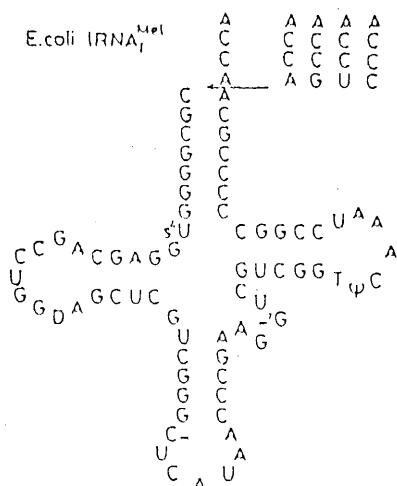


Fig. 5. Nuclease S1 cleavage site (←), and synthesised analogs.

Table 1. Aminoacylation of synthesised *E.*

coli tRNA^{Met} analogs containing modified "discriminator site".

[¹⁴C]-Met accepter activity

	cpm /10 pmol
tRNA ^{Met} intact	2203
tRNA ^{Met} (S1)	52
tRNA ^{Met} (S1)p [†] CCA	1381
“ pGCCA	793
“ pUCCA	1364
“ pCCA	664

これらについて、メチオニン受容活性を調べると、4番目がAのもののみならず、G, CではAの50%, UではAと同程度アミノアシル化された (Table 1)。また各analogについて、*E. coli* Met RSaseに対するK_m値、V_{max}値を求めるとき、K_m値はどのanalogでも変わらず、intact tRNA^{Met}とも同じで 1.2×10^{-6} M、V_{max}値は各analogの間で若干の違いがみられ、controlの4番目がAの場合を基準 (1.0) とすると、Gの場合は0.35, Uでは0.64, Cでは0.32であった。

4番目をどの塩基にしたanalogでもメチオニンを受容し、K_m値も同じであることから、tRNAの3'末端から4番目の塩基がARSaseによる認識に関与しているというCrothers等の仮説は、少なくとも*E. coli* Met RSaseの場合には、あてはまらないことがわかった。むしろ4番目の塩基をかえることによって、V_{max}値に違いがみられたことから考えて、アミノ酸受容部位である3'末端のCCAとARSaseのcatalytic siteが、アミノアシル化に都合の良い立体的な配置をとるために、この4番目の塩基は何らかの役割りをはたしていると考えられる。

また各analogについて、メチオニン以外のアミノ酸の受容活性を調べたがどれも受容されず、Met RSase以外のARSaseは、これらを認識しないことがわかった。

次に、直接のアミノ酸受容部位であるtRNAの3'末端アデノシンの修飾にRNA ligaseを用い、種々の8置換あるいは2'置換アデノシンを有する*E. coli* tRNA^{Met} analogを調整した。それらのうちで、

8置換アデノシンはsyn型conformationをとることが知られており、従来のCTP (ATP) :tRNA nucleotidyltransferaseを用いる方法では、tRNAの3'末端に導入出来なかったものである¹。また、8-azide adenosineを有するtRNAは、photoaffinity labelによって種々の酵素と共有結合をつくることが出来、tRNAと相互作用する酵素の研究に有用である。

E. coli tRNA^{Met}の3'末端アデノシンを、syn型conformationをとる8置換アデノシンに置換すると、アミノ酸受容活性は減少した。このことから、ARSaseによるアミノアシル化に、3'末端アデノシンのconformationが、何らかの形で関与していることが示唆された。

Table 2. Aminoacylation of *E. coli* tRNA^{Met} analogs terminating 8-substituted adenosine.

	cpm / 10 pmol	
	Met RSase	S 100
tRNA ^{Met} _f (S1)	87	118
tRNA ^{Met} _f (S1) p [*] ACCA	758	871
.. p [*] ACCA ^{8Br}	116	93
.. p [*] ACCA ^{8N3}	254	317
.. p [*] ACCA ^{8Me}	69	98

結論

- 1) 2',5'-ADP Sepharose 4Bによるアフィニティクロマトグラフィーで、RNaseの混入のないRNA ligaseを精製し、長鎖オリゴリボヌクレオチドへの使用を可能にした。
- 2) RNAの3'末端に、光照射、phosphatase処理で脱保護出来るo-nitrobenzyl phosphateを導入する方法を示した。この方法は、RNAの3'末端ラベル法としても応用出来る。
- 3) o-Nitrobenzyl基を3'末端保護基として用い、化学合成フラグメントのRNA ligaseによる結合反応で、*E. coli* tRNA^{Met}の3'-half分子を合成した。なおこの3'-half分子と、別に合成された5'-half分子の結合反応により、*E. coli* tRNA^{Met}の修飾塩基を含まないnascent strandの全合成が行なわれた。
- 4) *E. coli* tRNA^{Met}の3'末端から4番目の塩基（“識別位塩基”とよばれてARSaseによる特異的tRNAの認識に関与していると考えられていた）のみを他の塩基に変換したanalogを初めて合成し、アミノアシル化を行った。4番目がどの塩基の場合でもメチオニンを受容し、少なくとも*E. coli* Met RSaseの場合、特異的tRNAの認識に、この部位が関与していないことを明らかにした。
- 5) *E. coli* tRNA^{Met}の3'末端に、従来の方法では導入出来なかったsyn型conformationを持つ8置換アデノシンを導入し、そのアミノ酸受容活性を調べた。3'末端のアデノシンを8置換アデノシンに置換すると、アミノ酸受容活性は減少し、ARSaseによるアミノアシル化に、この3'末端アデノシンのconformationが、何らかの形で関与していることを示した。

引用文献

- 1) P. R. Schimmel and D. Soll, Ann. Rev. Biochem., **48**, 601 (1978)

- 2) M. Sugiura, M. Suzuki, E. Ohtsuka, S. Nishikawa, H. Uemura and M. Ikehara, FEBS Lett., **97**, 73 (1979)
- 3) E. Ohtsuka, S. Tanaka, T. Tanaka, T. Miyake, A. F. Markham, E. Nakagawa, T. Wakabayashi, Y. Taniyama, S. Nishikawa, R. Fukumoto, H. Uemura, T. Doi, T. Tokunaga and M. Ikehara, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78**, 5493 (1981)
- 4) 大塚栄子, 上村春樹, 三宅哲雄, 池原森男, 第4回日本分子生物学会年会講演要旨集p. 60 (1981)
- 5) R. Silber, V. G. Malathi and J. Hurwitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 3009 (1972)
- 6) G. C. Walker, O. C. Uhlenbeck, E. Bedows and R. I. Gumport, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **72**, 122 (1975)
- 7) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, M. Sugiura and M. Ikehara, Nucleic Acids Res., **3**, 1613 (1976)
- 8) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, R. Fukumoto, S. Tanaka, T. Miyake, T. Wakabayashi, M. Ikehara and M. Sugiura, Biochemistry, **17**, 4894 (1978)
- 9) J. J. Sninsky, J. A. Last and P. T. Gilham, Nucleic Acids Res., **3**, 3157 (1976)
- 10) J. A. Last and W. F. Anderson, Arch. Biochem. Biophys., **174**, 167 (1976)
- 11) N. P. Higgins, A. P. Geballe, T. J. Snopek, A. Sugino and N. R. Cozzarelli, Nucleic Acids., **4**, 3175 (1977)
- 12) T. E. England, R. Gumport and O. C. Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **74**, 4830 (1977)
- 13) E. Ohtsuka, H. Uemura, T. Doi, T. Miyake, S. Nishikawa and M. Ikehara, Nucleic Acids Res., **6**, 443 (1979)
- 14) E. Ohtsuka, T. Mixake, K. Nagao, H. Uemura, S. Nishikawa, M. Sugiura and M. Ikehara, Nucleic Acids Res., **8**, 601 (1980)
- 15) T. Seno, M. Kobayashi and S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta, **190**, 285 (1969)
- 16) L. H. Schulman and H. Pelka, Biochemistry, **16**, 4256 (1977)
- 17) J. J. Rosa, M. D. Rosa and P. B. Sigler, Biochemistry, **18**, 637 (1979)
- 18) D. M. Crothers, T. Seno and D. G. Söll, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 3036 (1972)
- 19) D. H. Gauss and M. Sprinzl, Nucleic Acids Res., **9**, r1 (1981)

論文の審査結果の要旨

申請者はRNAフラグメントの結合に働くRNAリガーゼの精製を検討し, 普通の精製法に加えて2',5'-ADP Sepharose 4Bによるaffinity chromatographyによってRNaseのないRNAリガーゼを得た。次に化学合成リボヌクレオチドフラグメントの3'末端の保護の為, 光照射で脱保護可能のo-

ニトロベンジン磷酸をRNAリガーゼを用いて導入した。これは³²Pを用いて3'のラベル法としても応用出来る。この3'末端保護のオリゴマーを用いtRNA_f^{Met}の3'末端の17-merを合成し、これと27-merとをRNAリガーゼを用いて結合し、3'-半分子の43-merを合成した。tRNA_f^{Met}をRNase部分分解し、3'末から4塩基を除去し、これにXCCA (X=A, G, U, C)を結合し、その何れにもMetの受容能を見出した。これによりXが「識別塩基」ではないことを推論した。これらの成果は学位請求に価するものと認定する。