



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33185">https://hdl.handle.net/11094/33185</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名・(本籍)	上 村 春 樹
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 6 3 0 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 tRNA 3' 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 勲 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>、それを用いてE. coli tRNA<sup>Met</sup>の修飾塩基を含まないnascent strandの3'-half分子を合成した<sup>3)</sup>。さらにtRNAの3'末端付近の修飾に応用し、E. coli tRNA<sup>Met</sup>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analog'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<sup>4)</sup>。

### 第1章 RNAリガーゼの精製

RNA ligaseは、オリゴリボス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<sup>5)~9)</sup>。鎖長が長くなれば結合反応が進行しにくくなり、大量の

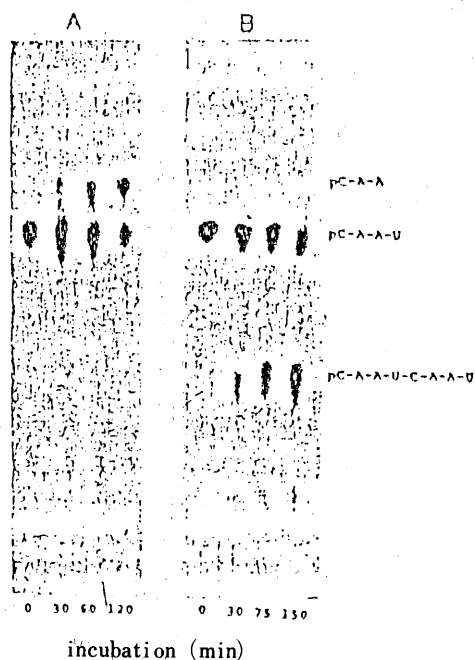


Fig. 1. Homochromatography of the reaction mixtures containing  $[5'-^{32}\text{P}]$  pCAAU and RNA ligase before (A) and after (B) chromatography on 2:5'-ADP Sepharose 4B.

末端を保護しておかなければならない。

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<sup>12-14)</sup> このことを利用して、 $\text{P}^1$ -adenosine 5'- $\text{P}^2$ -o-nitrobenzyl pyrophosphate (A (5') ppNB) により、光照射, phosphatase 処理で容易に脱保護出来る o-nitrobenzyl phosphate を、種々のオリゴボヌクレオチドの3'末端に導入した<sup>13)</sup> 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。

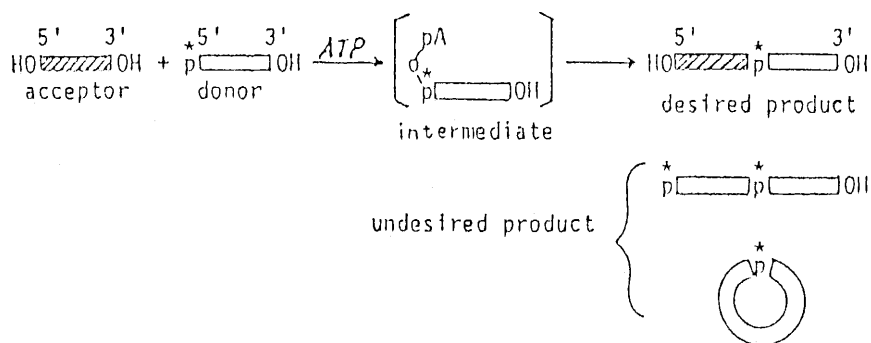


Fig. 2. T4 RNA ligase reaction.

酵素を用いなければならないが、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、<sup>10,11)</sup> 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、 $\text{Mg}^{2+}$ 存在下で吸着され、 $\text{Mg}^{2+}$ 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<sup>2)</sup> RNaseの混入がなくなっていることは、基質 $^*\text{pCAAU}$ 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

### 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<sup>7,9)</sup> 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'

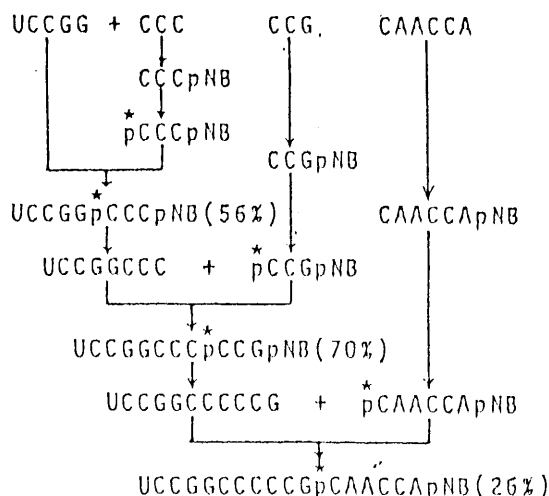


Fig. 3. Synthesis of the 3'-end 17mer.

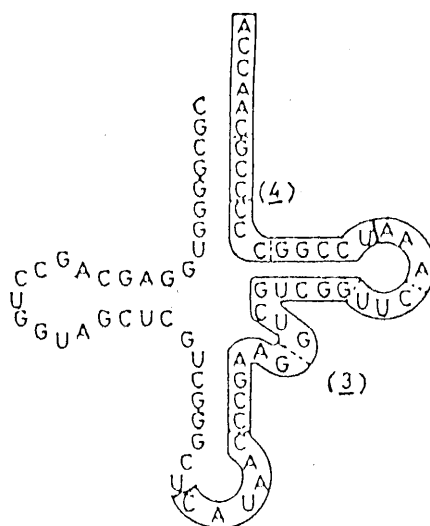


Fig. 4. *E. coli* tRNA<sup>Met</sup> nascent strand.

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* RNA<sup>Met</sup>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 CAUAACCCGAAGGUCGUCGGUCAA(3)をacceptorとして、RNA ligaseによる結合反応を行い、*E. coli* tRNA<sup>Met</sup>の3'-half分子43mer (Fig. 4)を合成した<sup>3)</sup>。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<sup>Met</sup>の修飾塩基を含まないnascent strandの全合成が行われた<sup>3)</sup>。

### 第3章 RNAリガーゼを用いる*E. coli* tRNA<sup>Met</sup> 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<sup>15)</sup> 化学修飾<sup>16)</sup> photocrosslinking<sup>17)</sup> 等、種々の方法で行われてきているが、統一的な見解は、まだ得られていない<sup>1)</sup>。

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、という仮説を提唱した<sup>18)</sup>。その後、現在までに200種以上のtRNAの一次構造が決定され<sup>19)</sup>、いくつか例外のあることもわかってきたが、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

まず E. coli tRNA<sup>Met</sup> 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<sup>Met</sup> (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<sup>Met</sup> 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。

coli tRNA<sup>Met</sup> analogs containing modified "discriminator site".

E.coli 16S rRNA<sup>Me</sup>

Diagram illustrating the tertiary structure of E. coli 16S rRNA, showing the arrangement of nucleotides (A, C, G, U) and the 3' terminal adenosine (A) with a methyl group (Me).

	cpm /10 pmol
tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub> intact	2203
tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub> (S1)	52
tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub> (S1) <sup>*</sup> pACCA	1381
" <sup>*</sup> pGCCA	793
" <sup>*</sup> pUCCA	1364
" <sup>*</sup> pCCCCA	664

4番目をどの塩基にしたanalogでもメチオニンを受容し、Km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、Vmax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。

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<sup>Met</sup> 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<sup>1)</sup>。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らせることが出来、tRNAと相互作用する酵素の研究に有用である。

*E. coli* tRNA<sup>Met</sup>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<sup>Met</sup> analogs terminating 8-substituted adenosine.

	cpm / 10 pmol Met RSase	
	5	100
tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub> (S1)	87	118
tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub> (S1) pACCA <sup>*</sup>	758	871
" pACCA <sup>*</sup> Br	116	93
" pACCA <sup>*</sup> N <sub>3</sub>	254	317
" pACCA <sup>*</sup> Me	69	98

## 結 論

- 1) 2',5'-ADP Sepharose 4Bによるアフィニティー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することが出来る。
- 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<sup>Met</sup>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<sup>Met</sup>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<sup>Met</sup>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<sup>Met</sup>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. Uhlenbenec, 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. Miyake, 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. Siglar, *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-

ニトロベンジン燐酸をRNAリガーゼを用いて導入した。これは $^{32}\text{P}$ 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 $\text{tRNA}^{\text{Met}}$ 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。 $\text{tRNA}^{\text{Met}}$ 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。