



Title	ホルミルメチオニンtRNAとそのアンチコドン変換分子の合成
Author(s)	福元, 良一
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33193
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

氏 名・(本籍)	ふくもと りょういち 福 元 良 一
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 6 3 5 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	ホルミルメチオニンtRNAとそのアンチコドン変換分子の合成
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

核酸と蛋白質の相互作用の本質は今日まで多くの研究者によって研究されているが、なお充分には解明されていない。この本質を解明して行く上で、tRNAの蛋白質による識別は非常に魅力的な系の1つである。

蛋白質の生合成におけるtRNAの機能はmRNAのコードに従いアミノ酸を運ぶことである。その過程でアミノアシルtRNA合成酵素がアミノ酸に対応するtRNAを認識しアミノアシル化する特異性は、蛋白質と核酸の相互作用の問題として興味を持たれる。

一方近年、核酸の化学合成の進歩は目覚ましいものがある。特に糖部の2'-位に水酸基を持つRNAにおいて、その化学合成はDNAに比べ従来困難であったが、保護基の改良やトリエステル法の導入でRNAにおいても10鎖長程度のオリゴマーが比較的容易に合成できるようになった。

また1972年にHurwitz等¹⁾によって1本鎖RNAの結合を触媒するRNA ligaseが発見された。この酵素を用いることで、化学合成で得たオリゴマーを酵素的に結合してより長鎖のオリゴマーにすることが可能になった。

そこで著者は合成フラグメントが天然フラグメントと同様にアミノ酸受容活性を示すか否かに興味を持ち、E.coli tRNA^{Met}の5'-末端から20番目まで (5'-側 $\frac{3}{4}$ 分子)に相当する合成フラグメントと3'-末端から57番目まで (3'-側 $\frac{3}{4}$ 分子)の天然フラグメントを再構成し、そのアミノ酸受容活性を調べた。その結果、合成フラグメントも天然フラグメントと同じアミノ酸受容活性を持つことを明らかにした²⁾。

さらにこれを発展させて全て合成フラグメントからなる nascent tRNA^{Met}を合成し、そのアミノ酸受容活性を調べた³⁾

次にtRNAのanticodonとアミノアシルtRNA合成酵素による認識の関係を調べる目的で、anticodonを化学合成フラグメントに変換した E. coli tRNAを合成し、そのアミノ酸受容活性を吟味した。

本 論

第一章 化学合成tRNA^{Met}フラグメント (5'-側 $\frac{1}{4}$ 分子) と天然3'-側 $\frac{3}{4}$ 分子の再構成

E. coli tRNA^{Met}の5'-側 $\frac{1}{4}$ 分子 (bases 1—20) に相当するフラグメントを図1に示されているルートで合成した。合成された5'-側 $\frac{1}{4}$ 分子は調製用の polyacrylamide gel電気泳動で単離した。

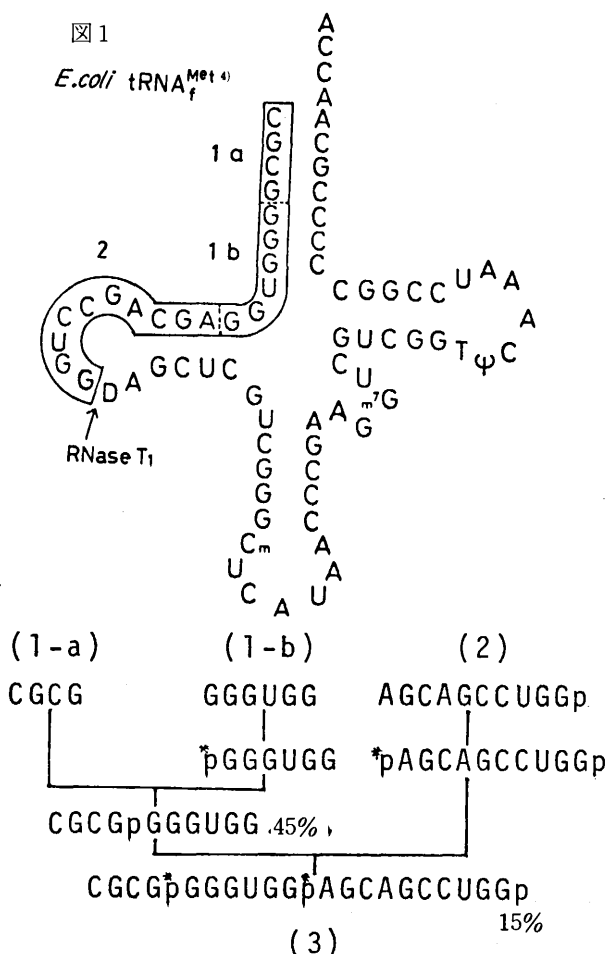
合成フラグメントと再構成する為、E. coli tRNA^{Met}をSeno等⁵⁾の方法でRNase T₁限定分解を行なった。フェノール抽出で反応を止め酸処理して反応中間体である末端2', 3'-環状リン酸を加水分解し、これを7M Urea存在下pH 2.7のDEAE-Sephadex A-25で分離した (図2)。

Peak Nとpeak Lにそれぞれ $\frac{1}{4}$ 分子, $\frac{3}{4}$ 分子, $\frac{3}{4}$ 分子が含まれていたの、さらに7 M Urea存在下pH 8.0のDEAE-cellulose DE-24とpolyacrylamide gel電気泳動⁶⁾で精製した。

次に合成及び天然 $\frac{1}{4}$ 分子と天然 $\frac{3}{4}$ 分子を再構成し、その再構成分子のアミノ酸受容活性を調べた。結果を図3、表1に示す。 $\frac{3}{4}$ 分子だけではアミノ酸受容活性はほとんど認められなかったが (1%, B) 天然及び合成フラグメントと再構成することで75, 85%の活性が回復した (C, D)。この結果から合成フラグメントも天然フラグメントと同様に活性を持つことがわかる。天然フラグメントに存在するs⁴Uは合成フラグメントでは欠けている。s⁴Uの欠損は天然においてもアミノ酸受容活性に影響を与えないことがSeno等⁷⁾によって報告されているが、合成フラグメントを用いた実験結果もこれと一致した。5'-末端から10番までに相当する合成フラグメントと $\frac{3}{4}$ 分子との再構成においても10%であるが活性が回復した (E)。Seno等⁷⁾によって天然 $\frac{1}{4}$ 分子を venom phosphodiesteraseで3'-末端から限定分解し、色々な程度に消化したフラグメントと

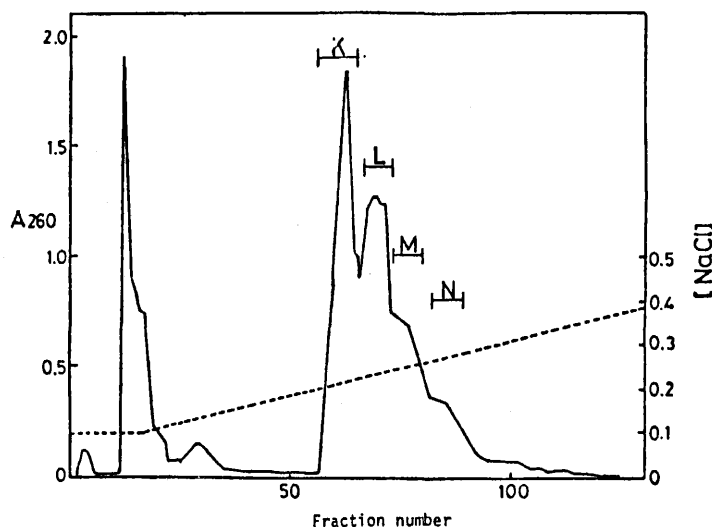
図 1

E. coli tRNA^{Met}_f



Synthesis of an eicosanucleotide from
E. coli tRNA^{Met}_f 5'-end with RNA ligase

図 2 .



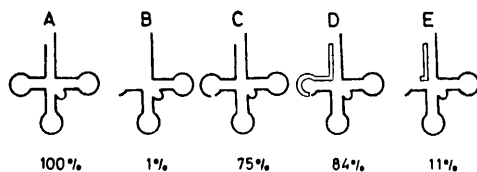
Chromatography of limited RNaseT₁ digestion of E.coli tRNA^{Met} on a DEAE-Sephadex column in 7M urea at pH 2.7

$\frac{3}{4}$ 分子との再構成分子の amino 酸受容活性が報告されている。この報告では D-loop から D-stem に至る部位が欠けても活性の回復が見られるが、acceptor-stem まで欠けると活性が失われていることが示されている。この報告も合成フラグメントの再構成のデータと一致している。

第二章 Nascent tRNA^{Met} の全合成

化学合成された 5'-半分子 (bases 1—34)、3'-半分子 (bases 35—77) を anticodon で結合し全合成 tRNA (図 4) を分離した。5'-半分子、3'-半分子は polyacrylamide gel 電気泳動で単離した。

図 3 .



Relative amount of [¹⁴C] L-Methionine charged to reconstituted molecules using the conditions shown in Table 1. The solid lines indicate natural fragments and enclosed lines show synthetic fragments

表 1 . [¹⁴C]Methionine-acceptor activity of reconstituted molecules

Molecule	Amount	[¹⁴ C]Methionine	charged (— background)	Methionine accepted	Relative amount
	pmol	counts/min	pmol	mol/mol	%
A	36.5	11725	20.5	0.562	100
B	30.2	90	0.1	0.003	1
C	19.0	4590	8.0	0.419	75
D	30.0	8088	14.1	0.470	84
E	41.1	1474	2.5	0.061	11
None	0	40	0	0	0

3'-半分子は donor とする為, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と PNkinase で 5'-末端をリン酸化した。

RNA ligase 反応は acceptor 5'-半分子 140 pmol $[4.7\mu\text{M}]$, donor 3'-半分子 200 pmol $[6.7\mu\text{M}]$, ATP 3 nmol $[100\mu\text{M}]$ を加え 37°C で 1 時間 preincubation 後, DMSO 10% (V/V) 存在下 RNA ligase 6 U $[200\text{U/mol}]$ 加え 4°C で 14 時間 incubation した。反応後ゲル濾過 (Sephadex G-200) で全合成分子を分離した (図 5)。peak 1 が全合成 tRNA で収率 49% であった。

図 4 .

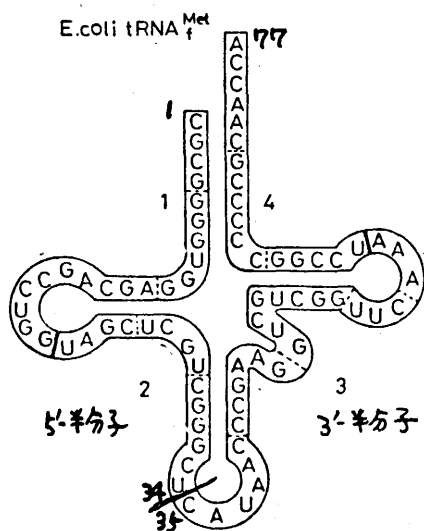
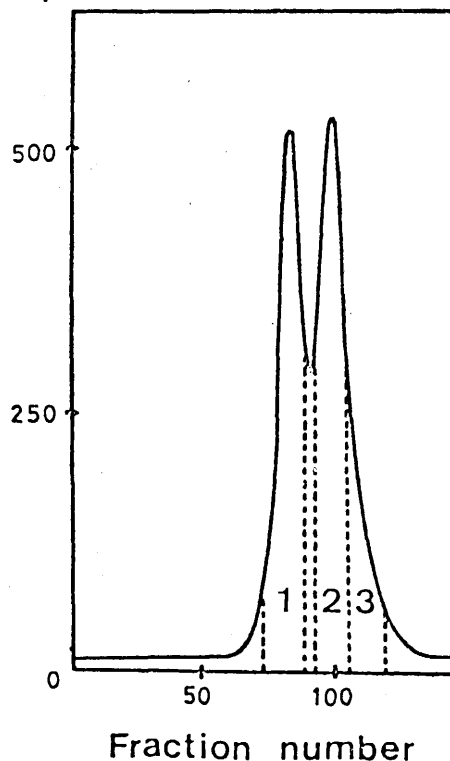


図 5 . cpm



次に全合成した nascent tRNA^{Met} のアミノ酸受容活性を調べた。アミノアシル化反応液をゲル濾過 (Sephadex G-50) にかけて tRNA を分離した。アルカリ条件で deacylation⁸⁾ し, ゲル濾過 (sephadex G-50) で遊離した $[^{14}\text{C}]\text{Met}$ が検出されるかを調べた。6% であるがアミノ酸受容活性が認められた。

全合成をスケールアップし, 修飾塩基を含まない nascent tRNA 及び合成フラグメントと天然フラグメントを結合させることで特定の修飾塩基を含まぬ, 又は特定の修飾塩基だけを含む tRNA などを自由に合成することが可能であり, 修飾塩基の役割を明らかにする上で有力な手段となるであろう。

第三章 化学合成 anticodon を持つ tRNA^{Met} の合成

合成した tRNA は天然と同じ methionine の化学合成 anticodon CAU を持つもの, 終止 codon (amber, ochre) に対応すると化学合成 anticodon (CUA, UUA) を持つものである。Methionine (AUG) 対応の化学合成 anticodon CAU を持つ tRNA の合成を例にあげて全合成工程を述べる (図 6)。

E. coli tRNA を RNase A で限定分解し polyacrylamide gel 電気泳動で 5'-半分子, 3'-半分子を

図 6

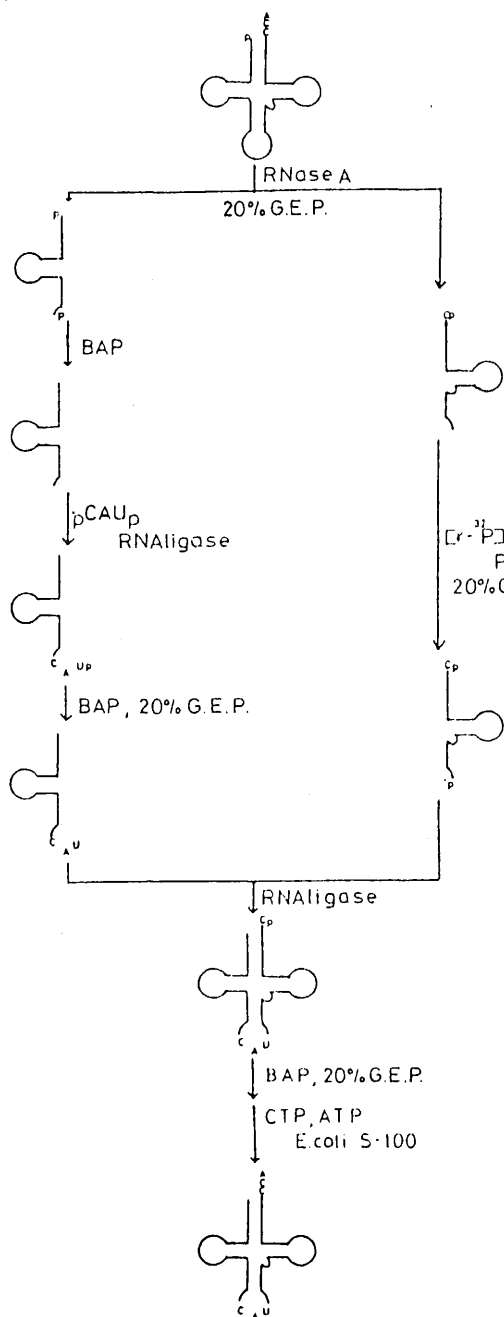
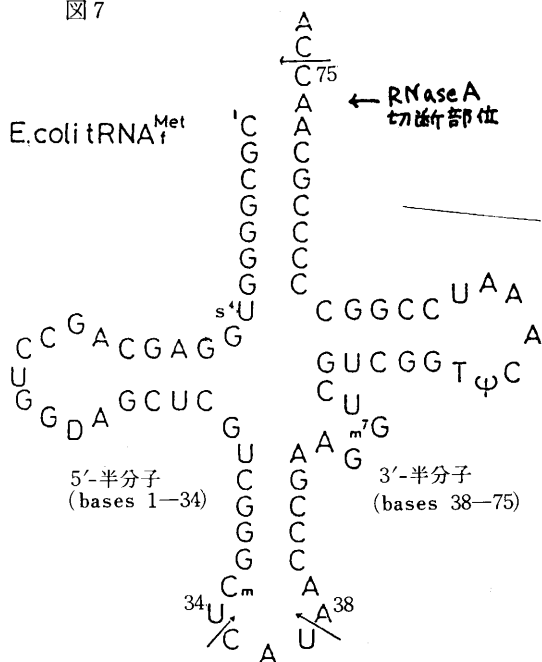


図 7



単離した。末端分析及び2次元homochromatographyによるsequencing⁹⁾より5'-半分子はbases 1—34, 3'-半分子はbases 38—75に相当することを確めた(図7)。即ち、図7において矢印で示した部位で切断が起った。5'-半分子をphosphatase処理した後、化学合成で得た[5'-³²P]pCAUpをRNA ligaseを用いて結合した。phosphatase処理後、polyacrylamide gel電気泳動でproduct 5'-半分子CAUを単離した。一部nearest neighbor analysisで2次元TLC¹⁰⁾によりCmU³²pを検出し結合部位が正しいことを確めた。

3'-半分子はdonorとする為[γ-³²p]ATPとPN kinaseで5'-末端をリン酸化した。

5'-半分子と[5'-³²p]3'-半分子をRNA ligaseを用いて結合し、phosphatase処理後polyacrylamide gel電気泳動でproductを単離した。この結

合反応は収率よく(〜70%)進行していた。Anticodonにおけるloop構造がRNA ligaseの反応に有利である為と考えられる。

Nearest neighbor analysisでCmU³²pとU³²pを検出し結合部位が正しいことを確めた。

化学合成 anticodon CAUを持つtRNA^{Met}のアミノ酸受容活性を調べた。CCA末端が欠けているの

で修復の為E. coli S-100を用いた。その結果を表2に示した。天然に比べて70%の回復が認められた。CCA末端を欠いていること及び、数度のgel電気泳動を経ていることを考えれば、アミノ酸受容活はほぼ回復したと考えられる。

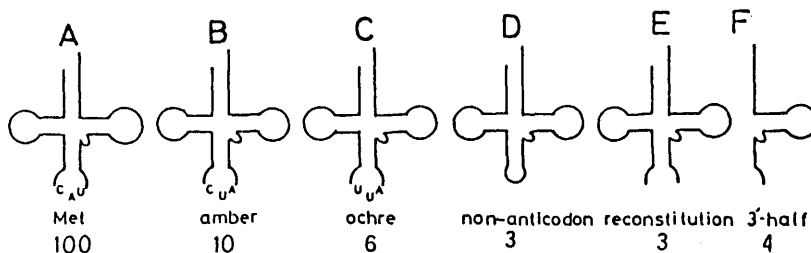
表2. tRNA 10pmol当りのアミノ酸受容活性

tRNA	[14 C]Met charged(cpm)	%relative activity to natural tRNA
tRNA with chemically synthesized CAU anticodon	1418	70
natural tRNA	2027	100

Kaufmann等¹¹⁾は化学処理により yeast tRNA^{Phe}の anticodon部位にある Y塩基をとばし切断して、RNA ligaseで再結合したと報告している。しかし、polyacrylamide gel電気泳動上で10%検出されたにすぎず、また単離もなされていない。またごく最近ではWang等¹²⁾も yeast tRNA^{Ala}をRNase T₁により anticodonで限定分解し、ただ RNA ligaseで再結合するだけの実験を行なっている。この再結合されたtRNAを単離し、アミノ酸受容活性を調べたところ80%の回復が認められたと報告している。著者の行なった合成は限定分解で得た半分子を再結合したのみでなく、anticodonに化学合成 trimerを組み込み活性を確かめた点で非常に有意義なものと言える。なぜなら、anticodonに化学合成 trimerを用いることで、この部位だけを任意の塩基配列に変換することが可能になったわけである。これは「tRNAの整形手術」とも言うべきもので、tRNAの各領域の中で最も重要な意味を持つ anticodonの役割を解明するのに有用な手段と言える。

次に終止 codon (amber, ocher) に対応する化学合成 anticodon (CUA, UUA) を持つ tRNA を合成した。工程、反応条件は前述の methionineの場合と同じである。また anticodonを欠いた tRNA も合成した。これは化学合成 trimerの結合工程を除いて直接5'-半分子と3'-半分子を結合させた。

以上合成した4種のtRNAのアミノ酸受容活性を調べた。その結果を図8、表3に示す。anticodonを終止 codon対応のものに変えたtRNAの活性は非常に低下した。(B, C) また anticodonを欠いた non-anticodon tRNA (D) 及び5'-半分子 (bases 1—34) と3'-半分子 (bases 38—75) の再構成分子は、わずかしき(3%)活性を示さなかった。(D, E) 演者の合成したtRNAはCCA末端のCAが欠け anticodonを任意の塩基配列に変換したものである。従ってアミノアシル化に至るまでにCCA末端修復の為CCA修復酵素に認識され、その後アミノアシル tRNA合成酵素によってアミノアシル化される。いずれの酵素による認識にしても methionine対応の化学合成 anticodonを持つtRNAが活性を示すことから、tRNA^{Met}の認識には anticodonが重要な部位であることがわかった。また amber対応の anticodonを持つtRNAが10%であるが活性を示したことは、in vivoにおける suppressor活性の可能性も期待できる。



[¹⁴C]Met-acceptor activity of tRNA with chemically synthesized anticodon

tRNA	[¹⁴ C]Met charged(cpm) per 10 pmol	%relative activity to Met tRNA
A Met	1295	100
B amber	130	10
C ochre	78	6
D non-anticodon	35	3
E reconstitution	43	3
F 3'-half	50	4

結 論

- 1) 化学合成した *E. coli* tRNA^{Met} の 5'-側³/₄分子 (bases 1—20) と天然の 3'-側¹/₄分子を再構成し、その再構成分子のアミノ酸受容活性を調べた。その結果、合成フラグメントと天然フラグメントが同じ活性を持つことを示した。
- 2) 化学合成によって得られた *E. coli* tRNA の 5'-半分子 (bases 1—34) と 3'-半分子 (bases 35—77) を RNA ligase で結合し nascent tRNA^{Met} を合成した。この全合成 tRNA を単離しアミノ酸受容活性を調べたところ 6% であるが活性が認められた。この nascent tRNA^{Met} は合成で得られた最長の RNA 分子である。
- 3) Methionine 対応の化学合成 anticodon CAU を持つ tRNA^{Met} を合成し、そのアミノ酸受容活性を調べた。その結果、ほぼ天然と同じ活性を持つことがわかった。これは天然の tRNA^{Met} の中へ合成フラグメントを組み込み、活性が示された最初のものである。
- 4) Anticodon を変換した各種の tRNA^{Met} を合成し、そのアミノ酸受容活性を調べ、anticodon が tRNA^{Met} の認識に重要な部位であることがわかった。

引用文献

- 1) R. Silber, U. G. Malathi & J. Hurwitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 3009 (1974)
- 2) E. Ohtsuka, S. Nishikawa, R. Fukumoto, H. Uemura, T. Tanaka, E. Nakagawa, T. Miyake & M. Ikehara, Eur. J. Biochem., **105**, 481 (1980)
- 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 & M.

- Ikehara, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78**, 5493 (1981)
- 4) S. K. Dube & K. A. Marcker, Eur. J. Biochem., **8**, 256 (1969)
 - 5) T. Seno, M. Kobayashi & S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta., **190**, 285 (1969)
 - 6) A. M. Maxam & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **74**, 560 (1977)
 - 7) T. Seno, M. Kobayashi, M. Fukuhara & S. Nishimura, FEB Lett., **7**, 343 (1970)
 - 8) P. S. Sarin & P. C. Zamecnik, Biochim. Biophys. Acta., **91**, 653 (1964)
 - 9) a) E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan & R. Wu, Nucleic Acids Res., **1**, 331 (1974)
b) M. Silberklang, A. M. Gillam & U. L. RajBhandary, *ibid.*, **4**, 4091 (1977)
 - 10) S. Hashimoto, M. Sakai & M. Muramatsu, Biochemistry, **14**, 1956 (1975)
 - 11) G. Kaufmann & U. Z. Littauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **71**, 3741 (1974)
 - 12) G. -H. Wang, L. -Q. Zhu, J. -G. Yan, F. Liu & L. -. Zhang, Biochim. Biophys. Acta., **652**, 82 (1981)

論文の審査結果の要旨

申請者は先ず大腸菌 tRNA^{Met} の RNase T₁ 限定分解により 5'-末端 20 塩基を除き、これに化学合成 20-mer を再編成して 100% の Met 受容活性を見出した。この結果を更に延長して、合成 3'-及び 5'-半分子の RNA リガーゼによる結合反応により人工 tRNA^{Met} の合成に成功した。このものにも Met 受容活性を認めた。

次に tRNA^{Met} の RNase 限定分解により、34 番目と 38 番目を切断し、アンチコドンを除いた半分子づつを得た。この 5'-側分子に化学合成 CAU (Met コドン)、CUA (アンバーコドン) 及び UUA (オーカーコドン) を RNA リガーゼで結合し、更に 3' 半分子と結合して、3 種の tRNA を得た。Met の受容活性は CAU のみに認められ、この tRNA がメチオニル tRNA 合成酵素によりアンチコドン部位をも認識されることを見出した。

これらの知見は学位請求に価するものと認める。