

tRNA を標的とする毒素タンパク質の
作用機構と応用に関する研究

Studies on the substrate recognition of colicin E5 targeting specific tRNAs
and its expression in eukaryotic cells

小川哲弘

目次

序章

0.1 緒言	1
0.2 研究背景	
0.2.1 コリシンについて	4
0.2.2 コリシン研究の歴史的背景	6
0.2.3 コリシン E5 の研究意義	7
0.3 コリシン E5 に関するこれまでの研究成果	9
0.4 本論文の研究目的	16

第一章 E5-CRD によるタンパク合成阻害の観察

1.1 緒言	18
1.2 実験材料および方法	
1.2.1 S-30 の調製	18
1.2.2 タンパク合成反応液の調製	19
1.3 結果	
1.3.1 <i>in vitro</i> タンパク合成反応の条件検討	22
1.3.2 poly-(U)依存 poly-Phe 系に対する影響	22
1.3.3 MS2 フェージ RNA を鋳型とした反応系に対する影響	26
1.3.4 コリシンを作用させた大腸菌より調製した S-30 の タンパク合成の残存活性の評価	27
1.4 考察	28

第二章 コリシン E5 の tRNase 活性と殺菌活性との関連性の評価

2.1 緒言	32
2.2 実験材料および方法	
2.2.1 コリシン E5 の粗精製	33
2.2.2 感受性菌へのコリシン E5 の作用	34

2.2.3	コロニー形成率の測定および細胞内 tRNA の観察	34
2.3	結果	36
2.4	考察	38
第三章 E5-CRD の至適反応条件の検討		
3.1	緒言	41
3.2	実験材料および方法	
3.2.1	minihelix の調製	42
3.2.2	minihelix の精製	43
3.2.3	minihelix の標識	44
3.2.4	各アッセイにおける反応条件等	45
3.3	結果	
3.3.1	各 pH 条件における活性の評価	47
3.3.2	各塩濃度における活性の評価	49
3.3.3	E5-CRD の安定性の評価	49
第四章 E5-CRD の基質認識機構の解明		
4.1	緒言	55
4.2	実験材料および方法	
4.2.1	変異型 minihelix の調製	57
4.2.2	minihelix における切断部位の同定	58
4.2.3	minihelix を用いたアッセイの反応条件	59
4.2.4	tRNA ^{Thr} の E5-CRD に対する切断感受性の解析	60
4.2.5	dYMH を用いた YMH に対する競合阻害実験	60
4.3	結果	
4.3.1	E5-CRD の認識する基質残基の同定	61
4.3.2	基質による切断効率の違いについて	65
4.3.3	tRNA ^{Thr} の切断感受性について	68
4.3.4	E5-CRD の活性を阻害する RNA 分子について	74
4.3.5	基質の立体構造と切断感受性との関連性について	75

4.3.6	E5-CRD による deoxy minihelix の認識について	77
4.4	考察	
4.4.1	E5-CRD の認識特異性について	80
4.4.2	<i>in vitro</i> selection 法により取得した RNA 分子の 意義について	85
第五章 E5-CRD の基質認識の反応速度論的解析		
5.1	緒言	87
5.2	実験材料および方法	
5.2.1	オリゴヌクレオチドの調製、反応について	87
5.2.2	差吸収スペクトルに基づく反応速度論量の測定	88
5.2.3	HPLC を用いた反応速度論量の測定	89
5.3	結果	
5.3.1	E5-CRD によるジヌクレオチドの認識	90
5.3.2	GpUp と E5-CRD との反応生成産物の解析	91
5.3.3	GpUp を用いた E5-CRD の反応速度論量の pH 依存性	93
5.3.4	オリゴヌクレオチドを基質とした反応速度論量の解析	97
5.4	考察	
5.4.1	E5-CRD の至適 pH と触媒機構について	100
5.4.2	GU の 3' 側のリン酸基の意義について	102
5.4.3	E5-CRD の基質認識メカニズム	103
第六章 真核細胞内での E5-CRD の発現		
6.1	緒言	106
6.2	実験材料および方法	
6.2.1	酵母での発現プラスミドの構築方法	108
6.2.2	酵母細胞内でのタンパク発現および確認	109
6.2.3	ノザンハイブリダイゼーション	110
6.2.4	E5-CRD 発現後の生菌数の測定	111
6.2.5	ウサギ網状赤血球ライゼートと E5-CRD との反応	112

6.2.6	培養細胞の取り扱いについて	113
6.3	結果	
6.3.1	E5-CRD の酵母 tRNA の切断	114
6.3.2	酵母細胞内での E5-CRD の発現および表現型の観察	117
6.3.3	E5-CRD を発現している酵母の生菌数の経時的変化	121
6.3.4	E5-CRD を発現させた酵母の細胞内 tRNA の様子	124
6.3.5	E5-CRD が真核細胞 <i>in vitro</i> タンパク合成系に与える影響	126
6.3.6	培養細胞での発現および表現型の観察	128
6.4	考察	131
第七章 総合討論と今後の展望		
7.1	総括	
7.1.1	本論文のまとめ	133
7.1.2	コリシン D について	136
7.2	総合討論	
7.2.1	E5-CRD の認識と基質構造の関係について	145
7.2.2	結晶構造から見る E5-CRD の基質認識	148
7.2.3	TRECK 法への利用について	152
7.3	今後の展望	153
7.4	終わりに	156
論文の内容の要旨		160
引用文献		164
謝辞		171

序章

0.1 緒言

20 世紀は生命科学研究の幕開けであった。今日の分子生物学の発展の端緒になった出来事が、1953 年のワトソンとクリックによる DNA 二重らせん構造の発見¹⁾であることは、誰しもが認めるところであろう。その後の進展の早さには目を見張るものがあった。まず、アダプター仮説²⁾を経て tRNA が発見され³⁾、更に mRNA の発見^{4),5)}、遺伝暗号の発見⁶⁾、タンパク合成反応の解明に至り、遂には生命科学の最も根幹となる部分の「物語」が確立されたのである。様々な先駆者達により描かれたこの物語は実に巧妙で、もはや疑いの余地は残されていないかのように思われたが、それも完全ではなかった。遺伝情報の流れが DNA から RNA へ、そしてタンパクへと伝わるという「セントラルドグマ」が、Temin や Baltimore らによる逆転写酵素の発見^{7),8)}により、修正を迫られたことは大変有名であり、また、全ての生物において普遍的であると思われていた遺伝暗号も、ミトコンドリア等の一部で異なった読み方をされていたこと⁹⁾も驚きであった。更に、これまで「機能を持つ分子は蛋白質のみである」という概念が、Cech や Altman によるリボザイムの発見^{10),11)}や、最近の結晶構造解析により、リボソームがリボザイムであったと報告されたこと¹²⁾から、完全に否定されたことも記憶に新しい。つまり、現在の生命科学にあっては「今日の常識は、明日にはもはや常識ではない」のである。さて、30 億塩基対にもおよぶヒトゲノムの全塩基配列を全て決定しようとする「ヒトゲノム計画」が、DNA

の二重らせん構造の発見からちょうど半世紀後にあたる 2003 年の完成に向けて進められている。2001 年 2 月 16 日付の *Science* 誌に掲載された論文によると、既知の真核生物ゲノムと比較したコンピューター解析を用いても、発現が予測されるタンパクの 40%に相当する分子の機能は不明であるという¹³⁾。こうした事実は、生命反応の奥の深さの表れであり、生命科学者の好奇心を引きつけてやまない魅力のひとつであるが、つまりは、我々の知見は生命現象のほんの一部に過ぎないということである。そして、その背後には広大な未知の領域が横たわっており、これらの全貌が明らかになるまでは、今後も「常識」を覆すような現象の発見が相次ぐこととなるであろう。

本研究テーマであるコリシン E5 は、大腸菌および近縁細菌に作用するバクテリオシンであるが、著者らはこのコリシン E5 が特異的 tRNA を切断する活性を持つ、大変ユニークなリボヌクレアーゼ(RNase)であることを報告した^{14),15)}。さて、このリボヌクレアーゼであるが、生物界に普遍的に存在し、我々研究者にとって大変馴染みの深い一群であるにもかかわらず、その生理的意義については未だ不明な点が多い。このうち、これまでに最もよく研究されているのは牛膵臓から得られる Bovine Pancreatic Ribonuclease (RNase A)であり、その類縁分子は”RNase A super family”と呼ばれる一群を形成している¹⁶⁾。このファミリーに属するとされている RNase には、本来の RNA 加水分解活性からは想像もつかないような作用を示すものが存在する。例えば、BS-RNase はオリゴマータンパク質であり、このタンパクを構成するサブユニットは RNase A と 80%の相同性を示す一方、不妊、抗癌、神経

毒作用を示すことが報告されている¹⁷⁾⁻²¹⁾。また、血管新生に関与し、癌の増殖に影響を与えている angiogenin も RNase A と高い相同性を示すが、不思議なことに RNase としての活性は非常に弱いことが知られている^{22),23)}。他にも、植物の配偶子型における自家不和合性は、S-RNase と呼ばれる RNase により制御されており、これらは RNase T2 ファミリーに属する^{16),24)}。このように、単に RNA の加水分解活性しか持たないと思われていた酵素が、想像もしなかったような機能を持つことを受け、D'Alessio は *Trends in Biochemical Sciences* 誌において、これらの RNase を指して RISBASES(RIbonucleases with Special Bioactions)と呼んだ²⁵⁾。

こうした例に触れてみると、ユニークな機能を持つコリシン E5 が、単にバクテリオシンとして進化して来たということに違和感を覚える。何故、殺菌作用を示すためだけに、このような特異性が必要であったのか？非特異的な RNase 活性で十分ではなかったのか？実は、コリシン E5 の起源は現在のようなバクテリオシンではなく、特殊な役割を担うタンパク質であったのではなかろうか？つまり、コリシン E5 の起源こそ RISBASES だったのではなかろうか？本論文では、こうした疑問に答える糸口の探索を通して、コリシン E5 の本質的な謎に迫ってみたい。

0.2 研究背景

0.2.1 コリシンについて

生物はそれぞれのニッチを守るために様々な手段を講じており、それは単細胞である細菌にとっても例外ではない。バクテリオシン²⁶⁾とは、細菌が生産し、他の微生物、もしくは他の集団に属する微生物を殺す抗菌性タンパク質、もしくはペプチドを指すが、これは正に「縄張りを守るための武器」と言い換えることが出来る。

コリシンは、大腸菌および近縁細菌が持つ Col プラスミドにより生産されるバクテリオシンであり、「他の大腸菌に対して殺菌活性を示す」ものとして定義される。以降は、本研究テーマであるコリシン E5 が属するヌクレアーゼ型コリシンに限って説明する。ヌクレアーゼ型コリシンを発現する Col プラスミドでは、プロモーターの下流に *col* 遺伝子、*imm* 遺伝子、*lys* 遺伝子がオペロンを形成している。*col* 遺伝子は、N 末端より「感受性菌細胞膜の透過に必要なドメイン（以降、膜透過ドメインの表記に統一）」「レセプター結合ドメイン」「活性ドメイン」を持つ A タンパクを、そして *imm* 遺伝子は殺菌活性をマスクする B タンパクをコードしており、これらは AB ヘテロダイマーとして生産される²⁷⁾⁻²⁹⁾。このうち、B タンパクは活性ドメインに直接相互作用するインヒビタータンパクであり、一般的に Imm タンパクと呼ばれる（本論文では「Imm」という表記に統一する）³⁰⁾⁻³²⁾。A タンパクを単独で発現させると生産菌にとって致死になるが、このように Imm タンパクを同時に発現することにより、生産菌が自身の生産したコリシンによる「自殺」から逃れること

を可能としている³³⁾。これを「免疫性」と呼んでいるが、コリシンと、それぞれに対応する Imm タンパクとの特異性は高く、わずかアミノ酸数残基の違いにより、みごとに特異性を保っている³⁴⁾。尚、現在までに同定されているコリシンの分類法としては、一般的に次の方法に基づく場合が多い。まず、コリシンが細胞内透過に利用する、感受性菌細胞表層レセプターの違いにより分類する。そして更に、Imm タンパクに対する「免疫性」により小分類するというものである。最近、DNase 型コリシン（詳細は後述）である E9 の活性ドメインと ImmE9 との共結晶構造が決定されたが、それによると、ImmE9 は E9 活性中心の正面にちょうど口を塞ぐ形で結合するのではなく、活性中心の裏側に結合している³⁵⁾。また、その後に発表されたコリシン E3 と ImmE3 との共結晶構造においても、E9 の活性ドメインおよび ImmE9 と同様の相互作用が見られた³⁶⁾。尚、当研究室においてコリシン E3 と高い相同性を示すコリシン E6 の活性ドメインと ImmE6 においても、同様の結合様式が見られることを明らかにしている³⁷⁾。

コリシンの発現制御は Col プロモーターによって行われており、栄養飢餓、紫外線照射、およびマイトマイシン C 添加に対する SOS 応答により活性化され、下流の遺伝子の発現が引き起こされる^{38),39)}。発現したコリシンとインヒビターとのヘテロダイマー複合体は、*lys* 遺伝子にコードされた Lysis タンパク質により、生産菌からの透過性が増大し、培地中へと放出される^{40),41)}。培地中へと放出されたコリシンは、これらに対するインヒビターを発現しない他の細菌集団に対し感染、死滅させることにより、生産菌と同種の集団の生存に有利に働く。すなわち、コリシンの生産は

利他的行動であり、こうした戦略により生産菌の集団としての生き残りを図っていると思われる⁴²⁾。

0.2.2 コリシン研究の歴史的背景

コリシン研究は、Fredericq による膨大なコリシンのタイピング研究に端を発する⁴³⁾。1964年に、野村らにより”Transmission theory”が *PNAS* 誌上で提唱され⁴⁴⁾、コリシンの作用機構に関する分子レベルの研究に拍車がかかった。”Transmission theory”とは、コリシンが感受性菌の細胞表層にとどまった状態で、細胞内に影響を与えるという、概念的には一種のシグナル伝達のようなものであった。この報告は、結論から言えば正しいものではなかったが、この仮説に触発されて、以降、各々のコリシンの作用機構が次々に明らかにされていった⁴⁵⁾。また、研究の対象は、コリシン分子が、生産菌から放出されてから標的に達するまでの連続的な動的変化へも向けられていった^{46),47)}。更に、構造生物学の発展により、作用機作の明らかにされたコリシンの構造解析も急速に進んでいった^{35),36),48)-55)}。タンパク調製方法の確立や、測定に用いる器材の性能の向上に加え、これまで困難とされてきた細胞表層レセプターの構造が次々に決定されたこと⁵⁶⁾⁻⁵⁹⁾も追い風となった。この成果の一つとして、細胞死に関与する Bcl-2 ファミリーの構造と、イオンチャンネル型コリシン（詳細は後述）の活性ドメイン構造との類似性の発見があり、Bcl-2 ファミリーの機能解明に大きく係わるようになった⁶⁰⁾。2001年には、感受性菌細胞膜に存在する LepB プロテアーゼにより、A タンパクの C 末端活性ドメインが切りだされた後、細胞内

へと侵入していく様子が *Molecular Cell* 誌に発表された⁶¹⁾。このようなモデルは古くから提唱されていたが、実験的に直接証明された点で、大変画期的な研究であった。また、ほぼ同時期に、Chak らのグループにより、DNase 型コリシンであるコリシン E7 も活性ドメインが切り出されて細胞内へと侵入することが報告されている⁶²⁾。

0.2.3 コリシン E5 の研究意義

本研究テーマであるコリシン E5 は、E 群コリシンと呼ばれるグループに属する。E 群コリシンとは、ビタミン B₁₂ の取り込みに関与する BtuB レセプターを共通して利用し、感受性菌内へと侵入するコリシンの総称である⁶³⁾。E 群コリシン同士で A タンパクのアミノ酸配列を比較すると、膜透過ドメイン、レセプター結合ドメインで高い相同性が見られるが、C 末端の活性ドメイン、および Imm タンパクにおいて相違が見られる。

E 群コリシンの殺菌活性の作用機構には、これまでに次の三つの様式が知られていた(Fig. 0-1)⁴⁵⁾。

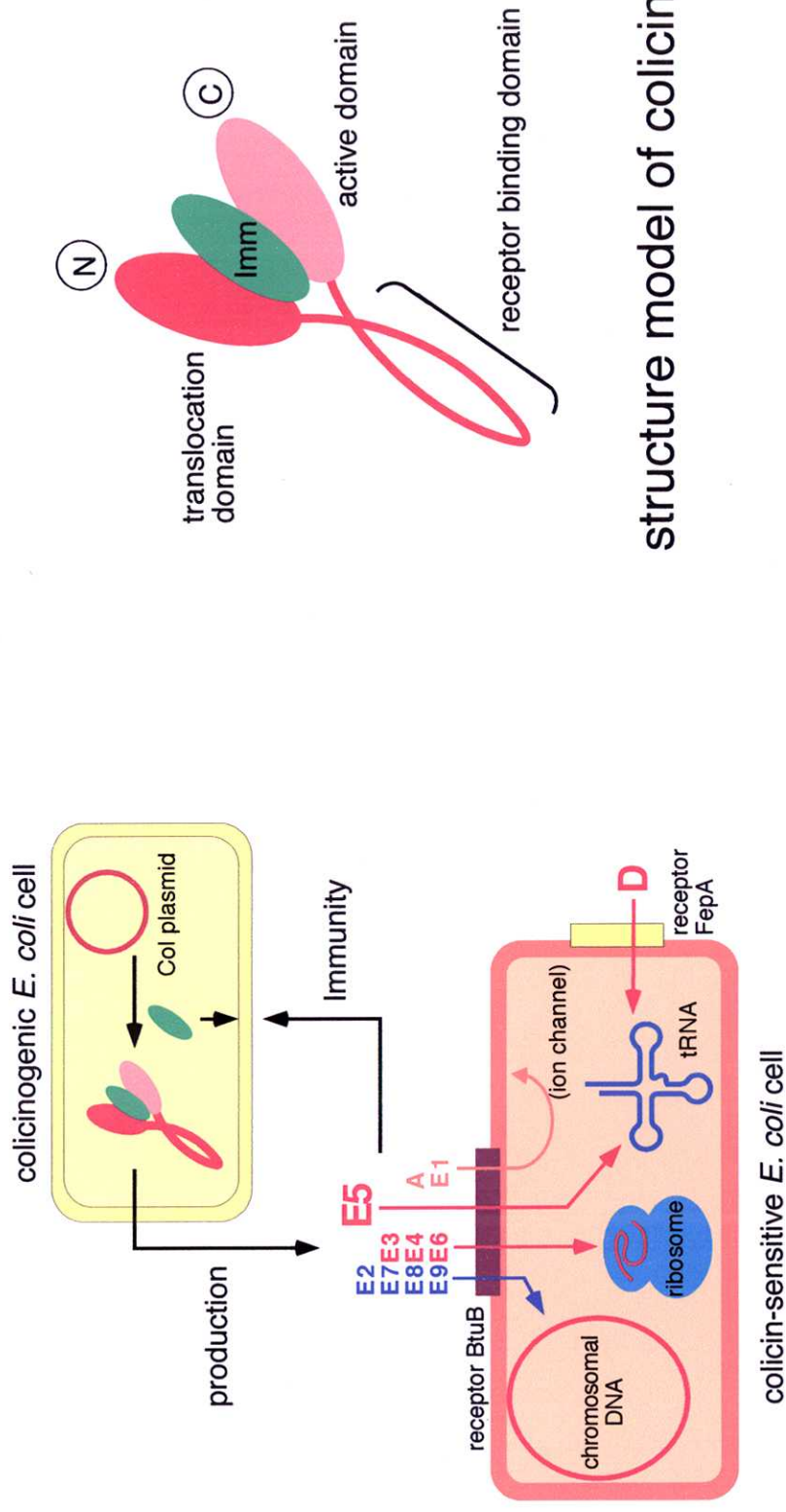
(1)細胞膜に作用し、イオン勾配を減少させるイオンチャンネル型

(2)染色体を非特異的に切断する DNase 型

(3)rRNA を特異的に切断し、リボソームを失活させる RNase 型

イオンチャンネル型コリシンとしては A, E1 が、DNase 型コリシンとしては E2, E7 ~E9 が、そして RNase 型コリシンには E3, E4, E6 が属する。RNase 型コリシン

modes of action of colicins



structure model of colicins

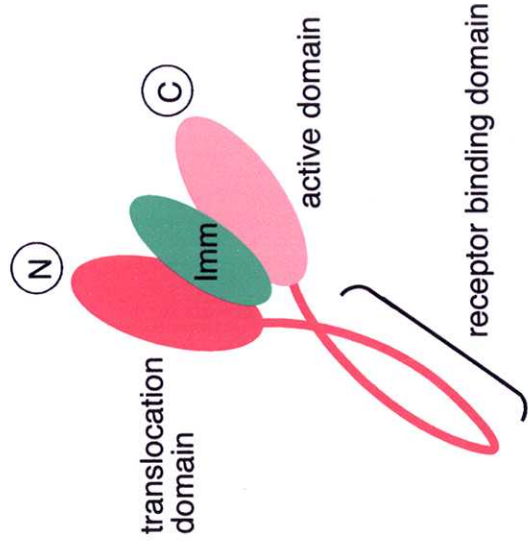


Fig. 0-1 E群コリシンの作用機構

E群コリシンの作用機構は(1)細胞膜に作用するイオンチャンネル型(2)染色体DNAを非特異的に切断するDNase型(3)16S-rRNAの3'末端を特異的に切断するRNase型に加え、(4)特異的tRNAを切断するtRNase型の4種類の機構が存在する。(1)にはA, E1、(2)にはE2, E7-E9、(3)にはE3, E4, E6、そして(4)にはE5が属する。

においては、E3 に関する研究が最も有名である。作用機構も詳細に明らかにされており、リボソーム 30S サブユニットに含まれる 16S-rRNA の 3'末端ループ内の特定部位を切断することによりリボソームを失活させる⁶⁴⁾⁻⁶⁶⁾。また、前述の様に、コリシン E3 と ImmE3 との共結晶構造が発表され³⁶⁾、これまでに蓄積された生化学的実験データを構造学的に解釈することが可能となった。さて、E4, E5, E6 であるが、Mock と Pugsley により、これらが E3 同様、*in vivo* で感受性菌のタンパク合成を阻害することを示唆する報告がなされていたが⁶⁷⁾、実際の作用機構は明らかにされていなかった。このうち、E4, E6 はアミノ酸配列上、E3 と高い相同性を示すため^{68),69)}、E3 と同様のリボソーム失活活性を持つと予想されていたが、事実、当研究室において、E4 および E6 の活性ドメインを用いて、この予想が全く正しいことを示した^{70),71)}。しかし、残る E5 に関しては、活性ドメイン領域において E3, E4, E6 と全く相同性が見られず⁶⁹⁾、更に他のタンパク質との相同性も見られないことから(Fig. 0-2)、作用機構の予測は不可能であった。また、poly-(U)依存 poly-Phe 合成による *in vitro* タンパク合成系では、E5 は明確なリボソーム失活活性を示さなかった¹⁴⁾。このことから、E5 は E3, E4, E6 とは異なる、全く新規の作用機構を持つことが期待された。また、E5 の活性ドメインには、他の多くのヌクレアーゼが活性中心に持つ His 残基が存在しないことから、その反応触媒機構についても大変興味を持たれた。

0.3 コリシン E5 に関するこれまでの研究成果

本項では、著者が修士論文で報告した研究内容についてまとめる。感受性菌に対

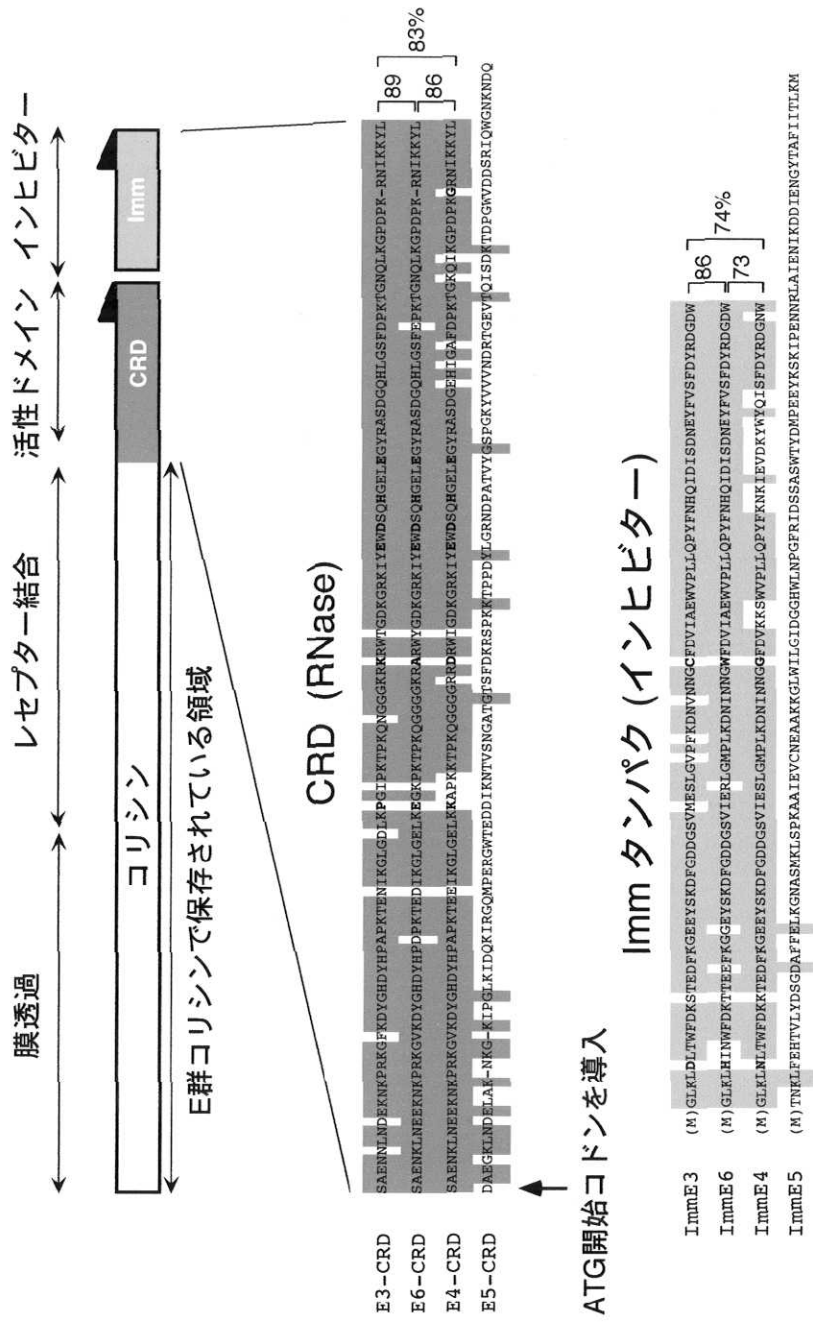


Fig. 0-2 RNase型コリシンのアミノ酸配列比較

E群に属するRNase型コリシン間で、C末端活性ドメインのアミノ酸配列を比較した。E3, E4, E6の間で高い相同性が見られる。また、これらは全く同じ活性を持つ。一方、E5は、E3, E4, E6と全く相同性が見られない（相同性領域を色をつけて示した。また、矢印は、CRDの開始メチオニンの位置を示す）。

するコリシンの活性を評価する場合は、膜透過、レセプター結合ドメインを備えた構造を必要とするが、*in vitro*での実験では、これらのドメインを必要としない。そこで以降は、活性ドメインの N 末端側に膜透過ドメインとレセプター結合ドメインを持つ、天然の分子型を「コリシン E5」、活性ドメイン型だけにしたものを「E5-CRD」と区別して呼ぶことにする。コントロールに使用した E3, E4 についても同様である。CRD とは、「Carboxyl-terminal Ribonuclease Domain」の略である。これまで、コリシン AB 複合体をトリプシン処理することによって得られる断片のうち、Imm タンパクと結合している小断片を T2A と呼び、活性ドメインとして議論してきたが、本研究における CRD は T2A 断片と同一ではなく、T2A 断片より N 末に 13 アミノ酸余分に配列を持つ。尚、修士論文で登場する「E3C」、「E4C」、「E5C」は、それぞれ E3-CRD, E4-CRD, E5-CRD と同一のものである。

E5-CRD と ImmE5 とのヘテロダイマー複合体を発現するプラスミドは、文献 71) に記載されている E4-CRD/ImmE4 発現プラスミド(pYG401)構築法に従って作製した(pTO501)。このプラスミドから得られた E5-CRD および ImmE5 は、アミノ酸シーケンスの結果、N 末端のメチオニンがプロセスされていた（開始メチオニンを除いた場合、E5-CRD は 115 アミノ酸であり、ImmE5 は 108 アミノ酸である。尚、文献 69) に記載されている ImmE5 の翻訳開始位置は正しくない。また、本論文において、アミノ酸番号は全て N 末端の開始メチオニンを含めて計算してある）。また、ImmE5 に関して、おそらくは PCR クローニングの際に生じたと思われるが、62 番目の Ile(ATA)が Met(ATG)へと変異していた。しかし、この変異型 ImmE5 の

阻害活性を野生型と比較した結果、明確な差違は認められなかったため、修士論文の研究に限り、この ImmE5(I62M)を使用した。尚、本論文においては、pTO501と同じ構築方法で、ImmE5 が野生型配列を持つように再度プラスミドを作製し直した(pTO502)。

著者らは、これまでにコリシン E5 が *in vitro* (Fig. 0-3) , *in vivo* (Fig. 0-4) で感受性菌の tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} を特異的に切断することを明らかにしている (tRNA^{Tyr} には、tRNA^{Tyr}₁ と tRNA^{Tyr}₂ の二つのアイソアクセプター-tRNA が存在するが、本論文では特に区別することなく用いている場合が多い) ^{14),15)}。

これら 4 つの tRNA はコドン表上では第 3 列に属し、NAY(Y=pyrimidine) に対応する。また、特筆すべき共通点として、アンチコドン 1 文字目にキューイン (Q 塩基 ; ヌクレオシドではキューオシン) が存在する(Fig. 0-5)^{72),73),74)}。キューインは、tRNA に見られる様々な修飾塩基の一つであり、構造の複雑性から、"hyper modified nucleotide"とも呼ばれる。この塩基は、前駆体 tRNA のアンチコドン 1 文字目に存在するグアニンが塩基置換され、更に修飾を受けることにより導入される(Fig. 0-5)。この反応を触媒する酵素は tRNA グアニントランスグリコシラーゼ (TGT)であり ⁷⁵⁾、前駆体 tRNA のアンチコドンループ内に存在する UGU 配列を認識する ⁷⁶⁾。

コリシン E5 の基質認識には、当初 Q 塩基が直接関与していると予想されたが、実際は *tgt* 変異株 ⁷⁷⁾ (tRNA グアニントランスグリコシラーゼを欠失しているため、コリシン E5 の基質 tRNA のアンチコドン 1 文字目はグアニンのままである) に対

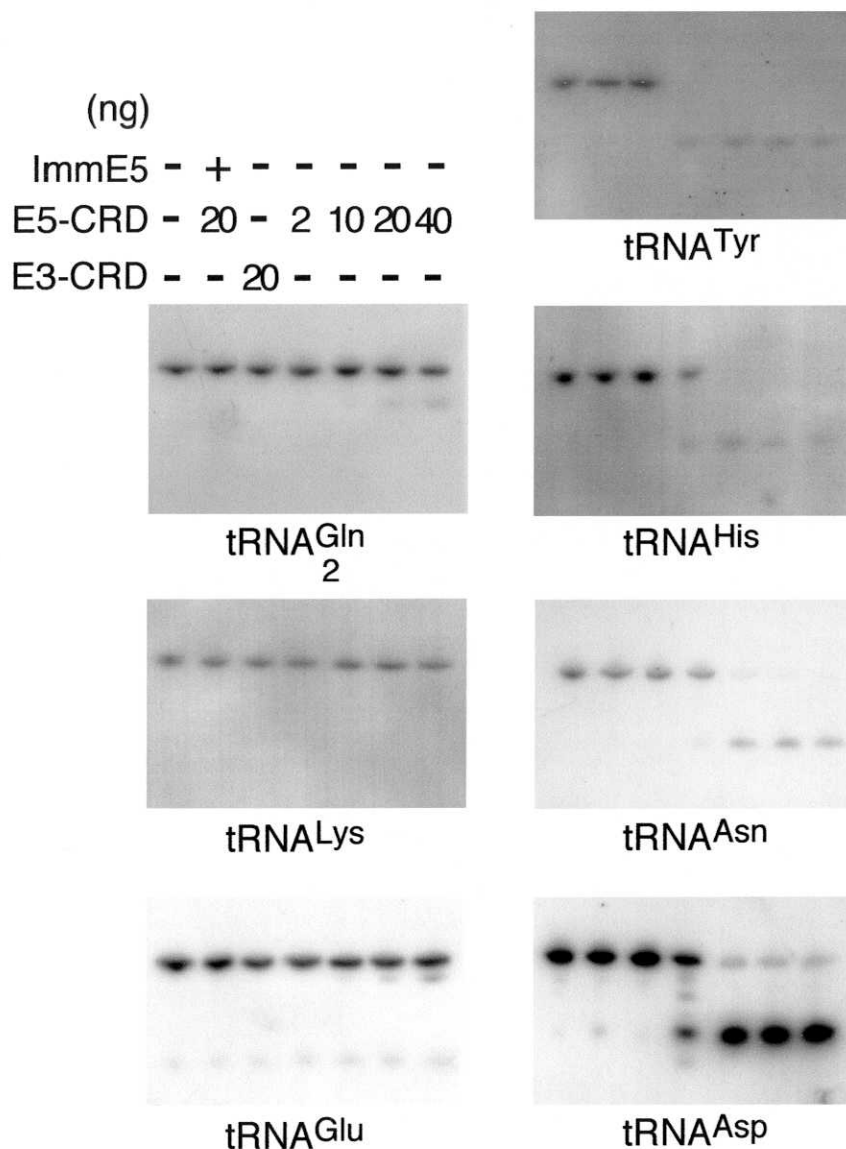


Fig. 0-3 E5-CRDと反応させた大腸菌全tRNAに対するノザン解析

大腸菌全tRNAに対し、濃度を変えてE5-CRDと反応させた後、10%アクリルアミドゲルにて泳動を行った。その後、それぞれのtRNAに対するプローブを用いてノザン解析を行った。用いたプローブに対応するtRNAを、それぞれのパネルの下部に示した。

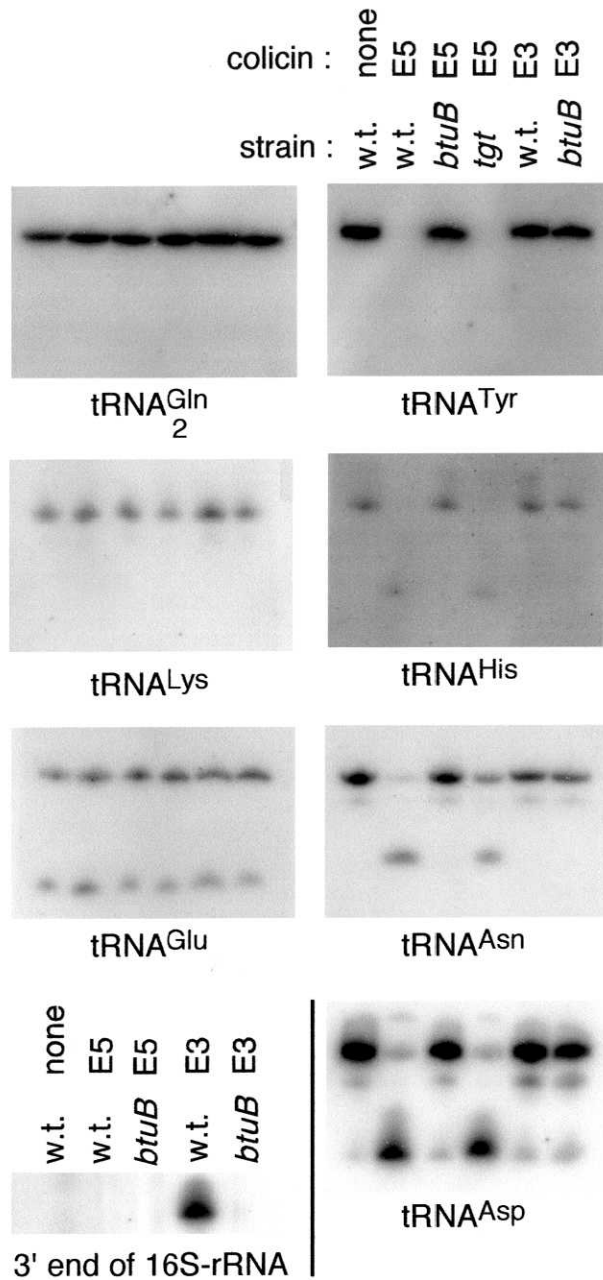


Fig. 0-4 コリシンE5と反応させた大腸菌細胞内のtRNAの様子

それぞれの大腸菌株に対し、コリシンE5/ImmE5複合体溶液を添加し、培養した後、全tRNAを抽出し、Fig. 0-3と同様にノザン解析を行った。w.t.; 野生型、*btuB*; コリシンの利用するレセプターに変異を持つ株、*tgt*; tRNAグアニトランスグリコシラーゼ(TGT)欠損株。

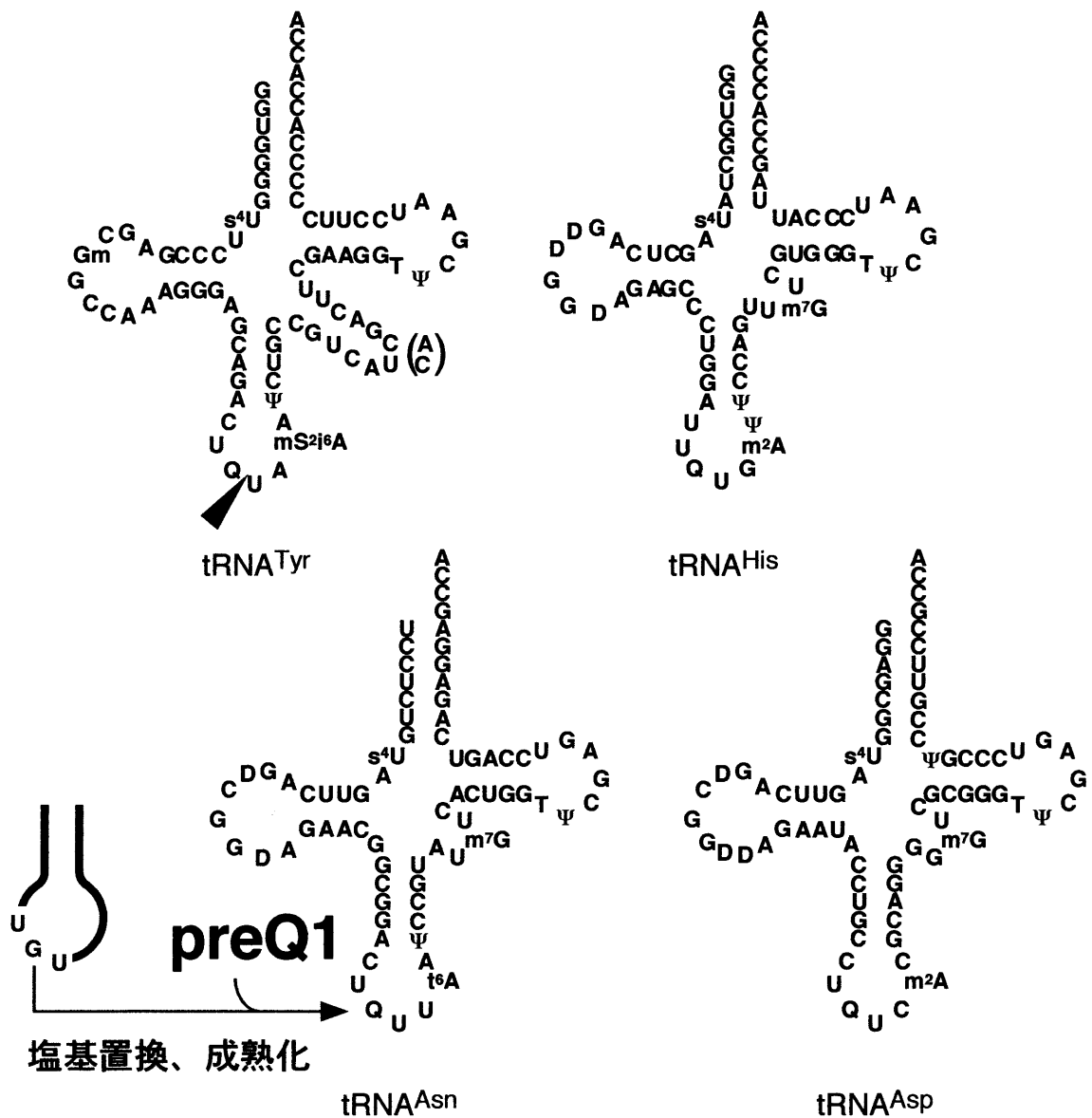


Fig. 0-5 Q塩基を持つ大腸菌tRNA

Q塩基を持つ大腸菌tRNAを示した。Q塩基は、これらの前駆体tRNAのアンチコドン1文字目に存在するグアニンがPreQ₁へと塩基置換された後、₀Qを経て更に修飾を受けることにより導入される。高等生物はQ塩基のシクロペンテン環に糖が結合した、より複雑な構造となるが、Q塩基自身は直接合成出来ないで、主に細菌からの摂取による。尚、酵母tRNAはQ塩基を持たない（コリシンE5による切断部位を矢印にて示した）。

し殺菌活性を示すこと、そしてこの株の tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} も特異的に切断を受けることから、Q 塩基は認識に必須ではないことが示された^{14),15)}。尚、E5-CRD による tRNA^{Tyr} の切断部位は、34 位の Q と 35 位の U の間であり、2',3'-サイクリックリン酸を残す形で切断する¹⁵⁾ (tRNA の各塩基の番号は文献 78) に従った)。

0.4 本論文の研究目的

本論文では、大きく分けて二つの目標を持つ。一つは、コリシン E5 の基質認識メカニズムについて明らかにすることである。50 種類にも及ぶ、構造的にも配列的にも似た tRNA 分子集団の中から、コリシン E5 がどのようにして基質 tRNA を識別しているかを明らかにすることは、核酸とタンパク質との相互作用の解釈の上で、大変重要である。また、こうした相互作用に関する情報は、個々のタンパク質の機能を分子レベルで解明しようとするプロテオーム解析に対しても、多いに貢献出来るものと思われる。そして、もう一つは、コリシン E5 の「毒素」としての面を応用的に利用するための方法論の確立を目的とした。ここでは具体的に、奈良先端科学技術大学院大学河野憲二教授らにより開発された、標的細胞特異的ノックアウト法 (TRECK 法)⁷⁹⁾への利用を目指す。コリシン E5 は作用機構が明らかになっている上、様々な活性中心変異体も取得されており、その実用性は十分期待出来る。そこで、その第一段階として、真核細胞内でコリシン E5 を発現させ、それにより観察される細胞応答について検証を加える。

以上に基づき、本論文は以下の構成をとる。

第一章、第二章では、コリシン E5 の感受性大腸菌に対する殺菌活性が、特異的 tRNA の切断に由来することの直接証拠を示す。第三章では、第四章および五章における酵素学的解析の準備として、E5-CRD の酵素学的諸性質について解析を行う。第四章では、E5-CRD が直接認識する基質残基の同定を、tRNA のアンチコドンステム/ループに基づいて作製した RNA 分子(minihelix)を用いて行う。第五章では、第四章において明らかにされた E5-CRD の認識配列を含む様々なオリゴヌクレオチドを用いて E5-CRD の反応速度解析を行い、第四章の結果も踏まえて、コリシン E5 の基質認識メカニズムについて考察を加える。第六章は、主に酵母を中心として、E5-CRD の真核細胞内での発現により見られる現象の観察を行う。そして、最終章である第七章では、全章の結果を総合的に討論し、今後の発展性について検討する。

第一章 E5-CRD によるタンパク合成阻害の観察

1.1 緒言

コリシン E5 は、以下の実験結果からタンパク合成を阻害する活性を持つことが示唆されていた。まず、放射能標識したアミノ酸を含む培地で培養した大腸菌に対し、コリシン E5 を一定時間作用させた後、集菌する。その後、菌体の放射エネルギーを測定したところ、コリシン E5 を作用させない菌体のものと比べ、放射エネルギーが有意に低下していた⁶⁷⁾。これはコリシン E5 を作用させた菌体のアミノ酸取り込み能が減少することを意味しており、事実、リボソームを失活させることにより、タンパク合成を阻害するコリシン E3 においても同様の結果が得られた。しかしながら、この結果はコリシン E5 がタンパク合成を阻害するという直接証拠とはならない。そこで、コリシン E5 の作用機構解明の手始めとして、本章では、まずコリシン E5 がタンパク合成を阻害することを、より直接的な実験法で再確認することを目的とした。

1.2 実験材料および方法

1.2.1 S-30 の調製

文献 80),81)に記載されている方法を基に改変した。1 l の LB 培地 (1% Bacto Tryptone (Difco), 0.5% Yeast Extract, 1% 塩化ナトリウム) にて *E. coli* K12 A19 株を培養し、対数増殖中期 ($OD_{660} \cong 0.5$) になった時点で集菌した。集菌した菌体

に 5 g のアルミナ、2 ml の A バッファー(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 塩化マグネシウム, 50 mM 塩化カリウム, 1 mM DTT)を加え、乳鉢を用いて破碎した。4℃、8000 rpm で 20 分遠心することにより上清を回収した。沈殿画分を再度 A バッファーに懸濁した後、4℃、10000 rpm で 30 分遠心することにより上清を回収し、先に回収したものと合わせた後、更に 4℃、30 K×g で 30 分遠心することにより S-30 画分を得た。Centricon 10 (Amicon)で濃縮後、分光光度計を用いて 260 nm の波長で測定し、 $A_{260}=200$ になるように A バッファーで希釈した。コリシン処理した大腸菌からの S-30 の調製は以下のように行った。1l×4 の L 培地 (1% Bacto Tryptone (Difco), 0.5% Yeast Extract, 0.5% 塩化ナトリウム) に終夜培養した *E. coli* K12 W3110 株を 1%接種し、37℃で培養した。OD₆₆₀≒0.8 に達したら、コリシン E2/ImmE2, コリシン E3/ImmE3, コリシン E5/ImmE5 複合体タンパクを、それぞれ 200 μg 添加し、更に 1 時間培養を続けた後、集菌した。尚、それぞれのコリシン複合体の調製方法は文献 14)に従った。

1.2.2 タンパク合成反応液の調製

タンパク合成反応に用いる試薬、条件等は文献 81)に従った。タンパク合成反応におけるエネルギー供給には ATP を用い、ピルビン酸キナーゼによりホスホエノールピルビン酸からピルビン酸を生産する反応により、ATP を再生させた。すなわち、50 mM ホスホエノールピルビン酸 (和光純薬工業), 300 μg/ml ピルビン酸キナーゼ (SIGMA), 10 mM ATP (ヤマサ醤油), 2 mM GTP (ヤマサ醤油) の組成に

なるように調製したものを使用時に 10 倍に希釈し、タンパク合成系に添加した (10×E 溶液)。また、調製にあたっては、pH が中性になるように、あらかじめホスホエノールピルビン酸, ATP, GTP を中和した後、ピルビン酸キナーゼを加えることにより、pH によるピルビン酸キナーゼの変性を防いだ。鋳型 RNA には、MS2 RNA (Boheringer Mannheim) および polyuridylic acid(5') (poly-(U)) (SIGMA)を用いた。MS2 RNA はエタノール沈殿により 5 mg/ml になるようにし、poly-(U)は 10 mg/ml になるように直接再蒸留水に溶解させた。Asn, Gln, Cys, Trp, Met を各 10 mM になるように調製し、タンパク合成系へのアミノ酸の補強に用いた (10×cold アミノ酸)。

活性測定に用いる E3-CRD と ImmE3、もしくは E5-CRD と ImmE5 をリボソームバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM 酢酸マグネシウム, 50 mM 塩化カリウム, 0.2 mg/ml BSA) 溶液中で 37°C、10 分プレインキュベートさせることにより、CRD/Imm 複合体を形成させた。反応後は氷上に静置しておいた。また、Imm との複合体を形成させない E3-CRD, E5-CRD 単独のフラクションにおいても全く同様の操作を行うことにより、全てのサンプルのインキュベート時間を統一した。尚、それぞれの CRD, Imm の希釈にはリボソームバッファーを用いた。前述のように、リボソームバッファー中には BSA が含まれているため、タンパクのプラスチック器材への非特異的吸着を防ぐことが可能である。*in vitro* タンパク合成反応は以下の手順で行った。まず、S-30 内在性の mRNA 除去のために 50 μ l の S-30 に対し、2 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 7.8)、7 μ l の 10×E 溶液を加え 10 μ l ずつ分注した後、37 °C、

7分インキュベートした (iS-30)。インキュベート後、iS-30 に残りの反応混合液を加え、mRNA を添加することによりタンパク合成反応を開始した。最終的なタンパク合成反応液の組成は、2 A₂₆₀unit iS -30, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 60 mM 塩化アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM DTT, 1×E 溶液 (5 mM ホスホエノールピルビン酸, 30 µg/ml ピルビン酸キナーゼ, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP) とし、反応液量は 60 µl で行った。mRNA と基質アミノ酸については、MS2 ファージ RNA 系の場合、MS2 ファージ RNA を 0.5 mg/ml、ラベルされたアミノ酸として 37 mBq/ml [¹⁴C] Amino acid mixture (Amersham)を 6 µl、更に Amino acid mixture に含まれていない Asn, Gln, Cys, Trp, Met を各終濃度が 0.2 mM になるように加えた。poly-(U)依存 poly-Phe 合成系の場合、poly-(U)を 1 mg/ml、アミノ酸として 1.85 MBq/ml L-[U-¹⁴C] Phe (Amersham)を 3 µl 加えた。反応は 37 °C で 18 分間行い、6 分おきに反応液から 10 µl ずつサンプリングし、濾紙(3MM Chr (Whatmann))にスポットした後、この濾紙をあらかじめ氷上で冷やしておいた 10% TCA に入れ、タンパク合成反応を停止させると同時に合成されたタンパク質を濾紙上に固定した。次に、濾紙の入った TCA 溶液を煮沸することにより、アミノアシル化した tRNA からアミノ酸を除去した (デアシル化)。5% TCA 溶液で濾紙を洗浄した後、液体シンチレーションカウンターにて放射エネルギーを測定し、得られた強度を合成されたタンパク質量とした。

1.3 結果

1.3.1 *in vitro* タンパク合成反応の条件検討

in vitro タンパク合成系の反応条件においては、マグネシウムイオン濃度が大変重要である。そこで、まずマグネシウムイオンの至適濃度を決定した(Fig. 1-1)。この条件検討実験においては、特に mRNA を添加することはせず、内在性の mRNA によるタンパク合成反応を行った。天然の mRNA を用いる場合、一般的にマグネシウムイオン濃度を 10 mM とすることが多いので、ここでは 10 mM を中心に条件をふった。その結果、やはり 10 mM で一番高い活性が得られたので、以降はこのマグネシウムイオン濃度条件を採用した。次に、MS2 ファージ RNA 量の検討を行った(Fig. 1-2)。その結果、MS2 ファージ RNA 添加量の増加に応じた、タンパク合成量の上昇が見られた。また、RNA 量を 0.5 mg/ml から 1 mg/ml に上げてもそれほどタンパク合成量の上昇が見られなかったことから、以降、加える MS2 ファージ RNA は 0.5 mg/ml とした。尚、poly-(U)の量は、以前に行った実験を参考に設定した¹⁴⁾。

1.3.2 poly-(U)依存 poly-Phe 系に対する影響

in vitro で E5-CRD がタンパク合成を阻害することを、S-30 によるタンパク合成系を用いて確認した。まず、poly-(U)依存 poly-Phe 系によるタンパク合成系に対して E3-CRD、および E5-CRD を作用させた(Fig. 1-3, c and d)。この系では、mRNA として poly-(U)を加えることにより、翻訳のイニシエーション、ターミネ

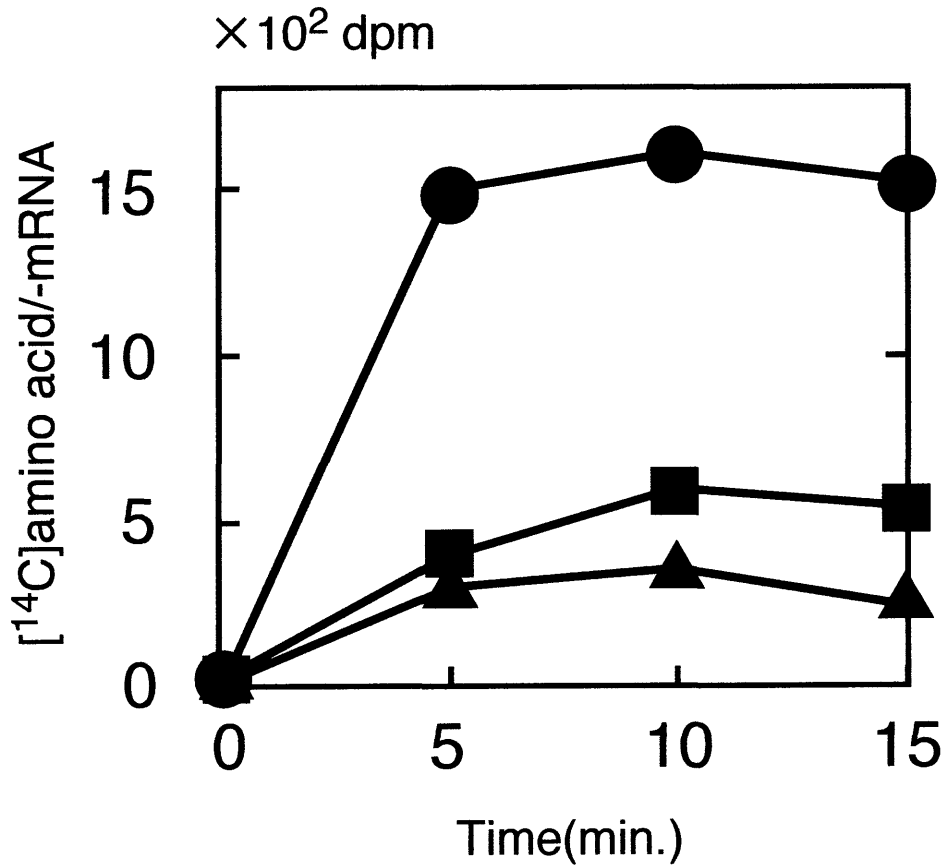


Fig. 1-1 酢酸マグネシウム濃度と*in vitro*タンパク合成活性

反応液に添加する酢酸マグネシウム濃度を5 mM(▲), 10 mM(●), 20 mM(■)と変化させ、S-30内在性のmRNAによるタンパク合成反応を行うことにより、反応溶液中のマグネシウムイオン濃度とタンパク合成活性との関係を見た。

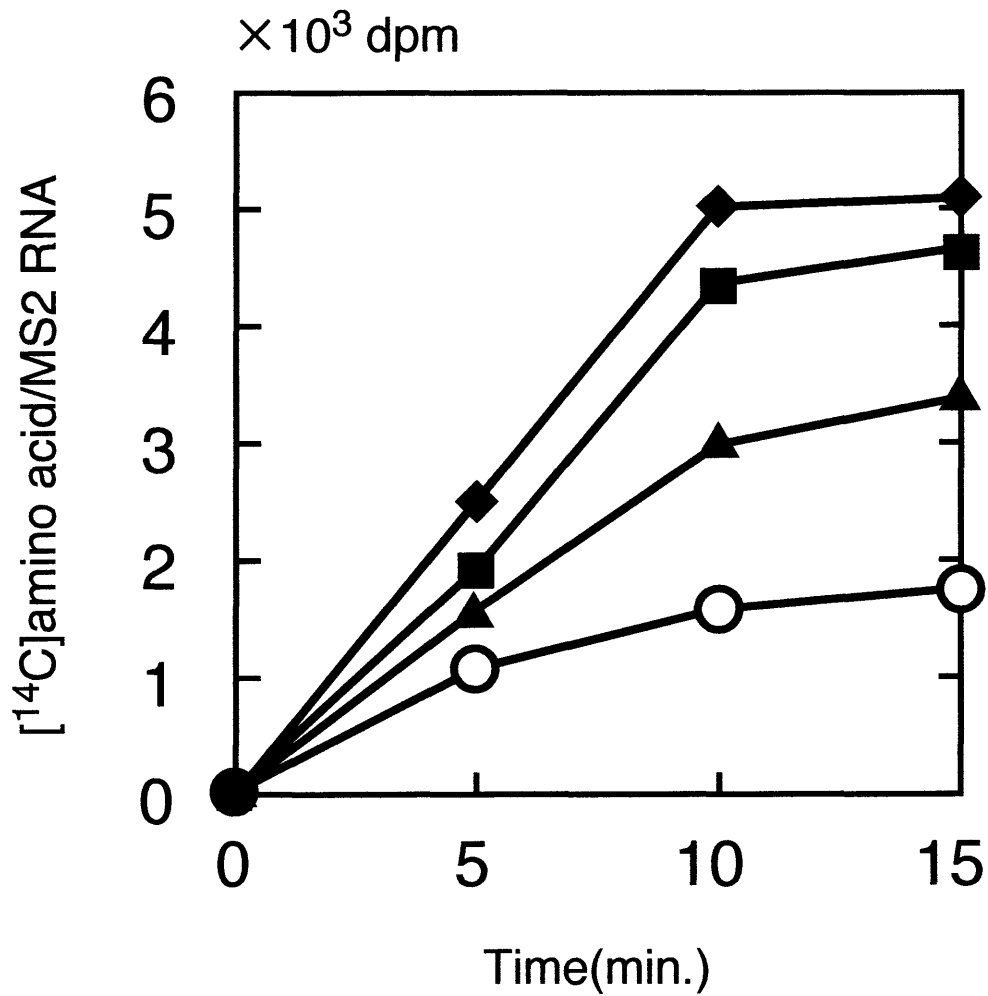


Fig. 1-2 MS2ファージRNA量とタンパク合成活性

鑄型に用いるMS2ファージRNA量を0 mg/ml(○), 0.1 mg/ml(▲), 0.5 mg/ml(■), 1 mg/ml(◆)と変化させることにより、反応溶液中のmRNA濃度とタンパク合成活性との関係を見た。

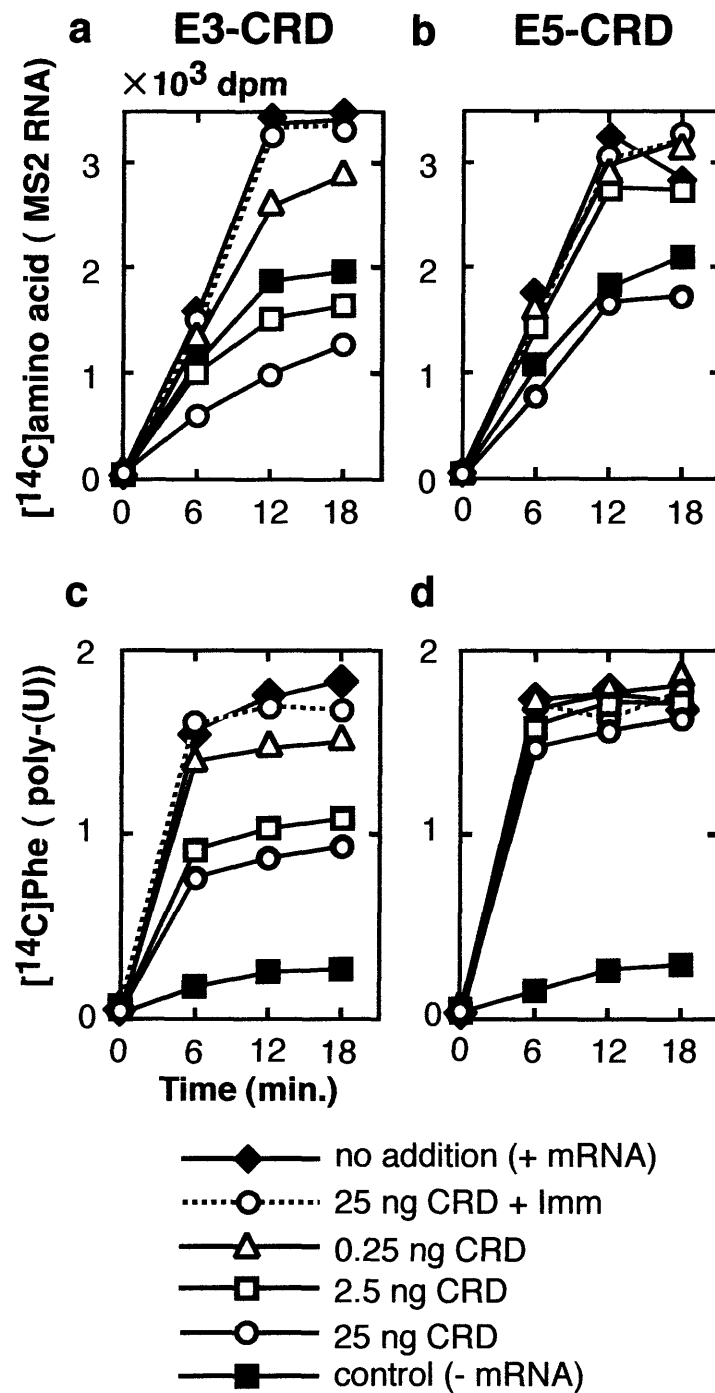


Fig. 1-3 E5-CRDによる*in vitro*タンパク合成阻害

S-30を用いた*in vitro*タンパク合成系に対し、E5-CRD(b, d)およびE3-CRD(a, c)を添加し、タンパク合成活性に与える影響を調べた。鑄型には、MS2ファージRNA(a, b)、poly-(U)(c, d)をそれぞれ用いた。

ーション非依存的に poly-Phe が合成される。最初、ラベルされたアミノ酸として、Amino acid mixture を使用していたが、iS-30 に内在すると思われる mRNA により、バックグラウンドの値が高めに出る傾向が見られた。そこで、ラベルされたアミノ酸を Phe だけにすることにより、バックグラウンドをほぼベースライン近くまで下げることが出来た。コントロールに用いた E3-CRD において、加える量を 0.25(Δ), 2.5(\square), 25(\circ) ng と多くするにつれ、合成されるタンパク量の低下が見られた(Fig. 1-3c)。また、E3-CRD のインヒビターである ImmE3 を添加することによりタンパク合成の阻害が見られなくなることから(点線と \circ で表される)、タンパク合成阻害を示す原因が内在性のヌクレアーゼ等、他の翻訳阻害因子ではなく、E3-CRD 自身による活性であることが分かる。一方、同様の方法で E5-CRD を添加したが、合成反応に全く影響を与えなかった(Fig. 1-3d)。E5-CRD は tRNA^{Phe} を切断しないので、今回の結果は予想の範囲であった。また、E5-CRD は tRNA 以外のタンパク合成因子には作用しないことも示された。

1.3.3 MS2 ファージ RNA を鋳型とした反応系に対する影響

次に、MS2 ファージ RNA を用いたタンパク合成系に対する影響を調べた。この系は、MS2 ファージのゲノム RNA を mRNA として用いる反応である。このゲノム RNA は、ファージのコートプロテイン等、全部で 4 つの遺伝子をコードしており、これらのタンパクが合成される反応を観察することになる。また、poly-(U)依存 poly-Phe 合成系とは異なり、天然のタンパク合成反応に近いので、イニシエーショ

ン、エロンゲーション、ターミネーションといった、翻訳反応の全てのステップの観察が可能である。今回調製した反応系においては、1.3.2 項で述べたように、内在性の mRNA に基づくタンパク合成によるバックグラウンド(■で表す)が高く出てしまう。今回は、iS-30 調製時のインキュベート時間を 7 分間としたが、これを 1 時間とすることにより、タンパク合成活性を損なうことなく、バックグラウンドを下げる事が可能であることが後に分かり、その意味では系を更に改良する余地はあると言える。しかしながら、本アッセイに用いたタンパク質合成系は、mRNA を加えることにより、mRNA 無添加の場合と比較して有意に高い活性を示すので、今回の実験の目的に限っては、このままで十分であると判断した。先ほど述べた方法と同様に、E3-CRD を様々な濃度で添加すると、濃度に応じたタンパク合成阻害が見られた(Fig. 1-3a)。また、2.5 ng あるいは 25 ng の E3-CRD を加えた場合、mRNA 非添加の場合より低いタンパク合成活性が観察されるが、これはリボソームの失活により、内在性の mRNA によるタンパク合成までも阻害されることが原因であると思われる。次に、E3-CRD の代わりに E5-CRD を添加したところ、E3-CRD と同様、濃度に応じた阻害活性が見られた(Fig. 1-3b)。これは、poly-(U)依存 poly-Phe 合成系において、E5-CRD が全く阻害活性を示さなかったこととは対照的である。

1.3.4 コリシンを作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成の残存活性の評価

コリシンを作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成能を *in vitro* で

比較することにより、それぞれのコリシンによる感受性大腸菌のタンパク合成阻害能を定量的に評価した(Fig. 1-4)。この際、コリシンを作用させることにより変化した感受性大腸菌の細胞内環境を保つために、内在性の核酸除去を目的としたプレインキュベーションは行わなかった。コリシン E2 は DNase 活性を持つことから、本来タンパク合成を阻害しないが、コリシン E2/ImmE2 複合体を作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成活性は、コリシンを作用させない大腸菌から調製した S-30 のものと比べ、いくぶんの低下が見られた。コリシン E3/ImmE3 複合体を作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成能は、予想通り著しい低下を示した。リボソームを標的にすることで、コリシン E3 が非常に効率良く翻訳を阻害することが分かる。コリシン E5/ImmE5 複合体を作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成能は、コリシン E2/ImmE2 複合体を作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成活性よりは低いが、コリシン E3/ImmE3 複合体を作用させた大腸菌より調製した S-30 のものよりは高かった。

1.4 考察

1.3.3 項および 1.3.4 項の結果を素直に解釈すると、コリシン E5 一分子当たりのタンパク合成阻害活性は、コリシン E3 のそれより低いと判断出来る。しかしながら、この結果は必ずしもコリシン E5 の酵素学的現象の反映ではないことも考えられる。つまり、E3-CRD の場合はリボソームを失活させるので、ラベルされたアミノ酸を取り込んだペプチド鎖の伸長はほとんど起こらない。一方、E5-CRD の場合は、理

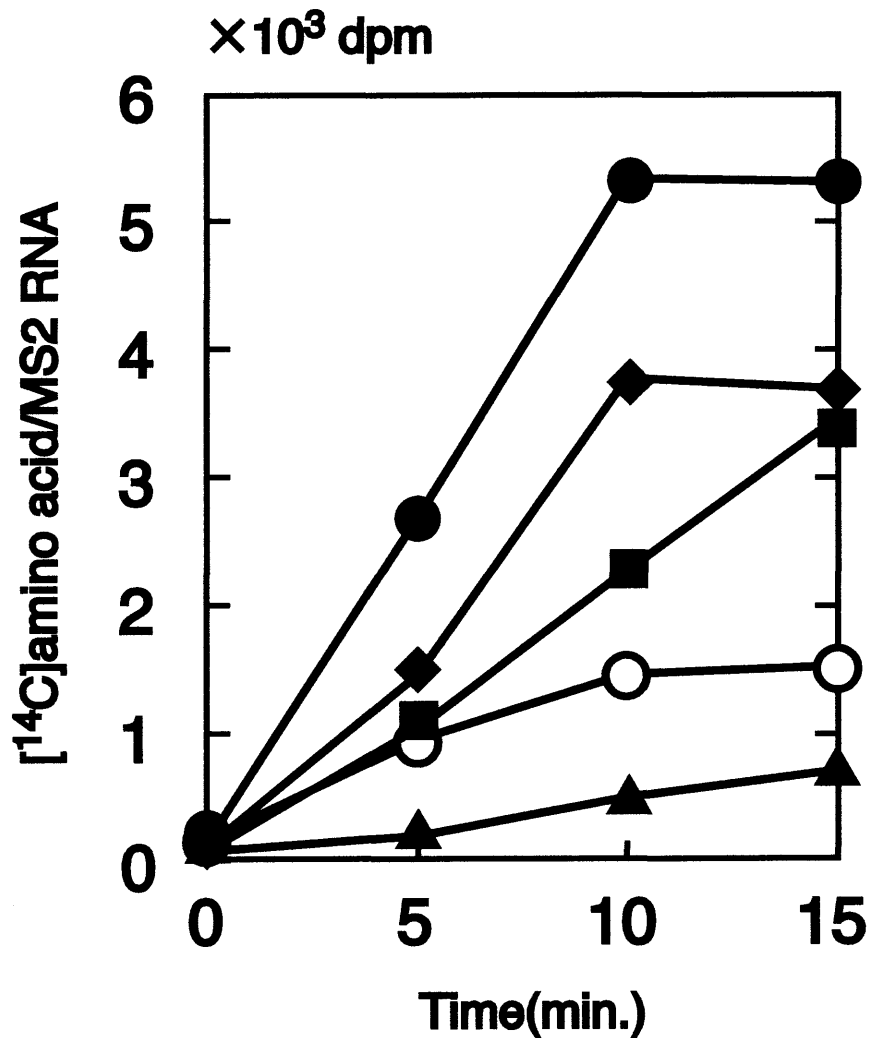


Fig. 1-4 コリシンを作用させた大腸菌から調製したS-30タンパク合成の残存活性

それぞれのコリシンを作用させた大腸菌より調製したS-30のタンパク合成能を、MS2ファージRNAを鋳型に用いて*in vitro*で測定した。

● ; コリシン無添加、○ ; コリシンおよびmRNA無添加、◆ ; コリシンE2/ImmE2複合体添加、■ ; コリシンE5/ImmE5複合体添加、▲ ; コリシンE3/ImmE3複合体添加。

論的には Tyr, His, Asn, Asp のペプチド鎖への取り込みを阻害するだけであり、MS2 ファージタンパクの翻訳反応において、これらのアミノ酸をコードするコドンに遭遇するまでは、翻訳中のペプチド鎖の伸長が起こる。また、翻訳されたペプチド鎖の TCA による濾紙上への酸固定では、数残基のペプチドでも固定されるため、ある程度のペプチド鎖の伸長の起こりえる E5-CRD の場合の方が、測定した強度が高めに出る傾向、すなわちタンパク合成阻害の程度が見掛け上低くでる傾向があるのではないだろうか。ちなみに、ここでは特にデータを示さないが、コリシン E3 とコリシン E5 とを比較して、タンパク質モル量当たりの殺菌力の比活性にそれほど差はないことを明らかにしている。

1.3.4 項において、*in vivo* でのコリシン E5 のタンパク合成阻害活性を定量的に評価することを試みたが、この系では、本来タンパク合成を阻害しないコリシン E2 であってもタンパク合成を阻害するような結果が得られてしまうため、実験系が不適切であると考え、これ以上の実験は行わなかった。コリシン E2/ImmE2 複合体を作用させた大腸菌より調製した S-30 のタンパク合成能が低下していた原因としては、コリシンと感受性菌とのインキュベーション時間が適切でなかったことが理由であるかも知れない。あるいは、*in vitro* タンパク合成で、内在性 DNA の転写・翻訳カップリングが起こっていることが原因である可能性もあるが、詳細は分からない。

E3-CRD は、16-rRNA を 3'末端から数えて 49 番目と 50 番目の間(A50-G49)で切断する。16-rRNA 上の、これより一塩基だけ 3'側に移動した 3'末端より 49 番目と 48 番目には、GU 配列が存在する(G49-U48)。以前の实验より、70S リボソーム

に対して E5-CRD を作用させ、その後に RNA 画分を抽出、電気泳動を行うと、E3-CRD により 70S リボソームから切り出される、いわゆる「E3 フラグメント」とサイズの的に酷似したバンドが出現するという結果が得られた¹⁴⁾。しかしながら、これは G49 と U48 の間を E5-CRD が切断することにより生じたものであり、コリシン E5 がコリシン E3 と同様のリボソーム失活活性を持つためではない。このことは、今回のアッセイにおいて、E5-CRD がリボソームを失活させないことから言える。尚、この 16S-rRNA 上の切断部位はループ構造を形成しており、ヌクレアーゼによる攻撃を受けやすいことで知られているが、このことも、コリシン E5 により切断を受けやすいことの原因であると思われる。

第二章 コリシン E5 の tRNase 活性と殺菌活性との関連性の評価

2.1 緒言

第一章において、コリシン E5 がタンパク合成を阻害する直接的な証拠を示した。コリシン E5 は、特定の tRNA を切断する活性を持つことから、この切断活性がタンパク合成阻害の原因である可能性が高いが、そう結論づけるには、まだ論理的に飛躍がある。例えば、tRNA の供給量が、コリシン E5 による tRNA の分解量を上回れば、タンパク合成系はひとまず問題なく動くであろう。こうしたギャップを補うために考えられる実験のひとつとして、標的 tRNA を高発現している感受性菌の、コリシン E5 に対する耐性を調べる事が挙げられる。標的 tRNA の高発現により、コリシン E5 に対して耐性を獲得するようであれば、コリシン E5 の target が tRNA であるとする強力な証拠となるであろう。以前、我々のグループでは、コリシン D の primary target の同定を目的として、感受性菌内での標的 tRNA の高発現による、コリシン D 活性の抑制実験を行った⁸²⁾。詳細は第七章で述べるが、コリシン D は、ICG, CCG, U*CU, CCU をアンチコドンに持つ4種類のアイソアクセプター-tRNA^{Arg}を特異的に切断し、感受性菌に対して殺菌活性を示す tRNase であり⁸³⁾、コリシン E5 と同様、tRNase 型コリシンに属する。しかし、コリシン D が殺菌活性を発揮するためには、4 種類全ての tRNA^{Arg} を等しく切断する必要があるかということに疑問が持たれた。そこで、これら4種類の tRNA を個々に大腸菌内で高発現するプラスミドを構築し、このプラスミドにより形質転換した大腸菌株に対し

てコリシン D を作用させ、形質転換株のコリシン D 耐性度を調べた。この結果、ICG をアンチコドンに持つ tRNA^{Arg} を高発現する株において、コリシン D の殺菌活性が抑制された。この実験結果については、個々の tRNA の発現量が統一されていない等の諸問題があり、まだ完全な結論には至っていないが、コリシン D の主要な標的が tRNA であるということを知るに足る結果であった。コリシン E5 でも同様の実験を行うことも考慮したが、コリシン D での実験の経験から、4 種類の遺伝子を個々に制御することの煩雑さが問題になった。そこで、本章ではこれとは異なるアプローチによる証明を試みた。すなわち、コリシン E5 を作用させた感受性菌の生菌率の変化と、その時の細胞内 tRNA の様子を比較することにより、両者の間にどのような相関性が見られるかを調べることにした。コリシン E5 の tRNase 活性が殺菌活性の原因であるのならば、細胞内 tRNA の分解に応じた生菌率の低下が見られるはずである。

2.2 実験材料および方法

2.2.1 コリシン E5 の粗精製

文献¹⁴⁾に従って、コリシン E5/ImmE5 複合体を粗精製した。精製した後、グリセロールを終濃度 50%になるように加え、-20℃にて保存した。濃度の定量には Bio-Rad 社のプロテインアッセイを用い、Bradford 法⁸⁴⁾により測定した。精製後の SDS-PAGE 結果より、目的のタンパク質以外のバンドも見受けられたので、こ

の SDS-PAGE の写真結果をスキヤニングし、NIH Image によりコリシン E5 および ImmE5 のみのタンパク量を見積もった。段階希釈には、L 培地に BSA を終濃度で 0.1 mg/ml になるように添加したものをを用いた。希釈は、0.57 mg/ml のものを段階的に二倍希釈し、全部で 16 段階用意した。

2.2.2 感受性菌へのコリシン E5 の作用

枝付きフラスコに入れた 200 ml の L 培地にて *E. coli* K12 W3110 を 37°C で培養し、 $OD_{660}=0.2$ になった段階で氷冷することにより、一時的に生育を止めた。培養液の温度を低く保ちながら、1 インチ試験管に 20 ml ずつ分注することにより、各試験管内の培養液の濁度を揃えた。これらの試験管は、再度培養を開始するまで氷上にて静置した。準備が整った段階で、一分ずつずらしながら 37°C で再度培養を開始した。培養開始後、30 分たった試験管 ($OD_{660} \doteq 0.2$ となっていることが期待される) に対し、希釈調製したコリシン E5/ImmE5 溶液を 25 μ l ずつ順に加えていった。コントロールとなるコリシン E5/ImmE5 複合体無添加の試験管には、希釈溶液のみを加えた。コリシンを添加してから更に 30 分培養した後、氷冷することにより培養を停止した。

2.2.3 コロニー形成率の測定および細胞内 tRNA の観察

加えたコリシンの濃度に対するコロニー形成率を測定するために、培養終了後のそれぞれの試験管より培養液を一定量サンプリングした。サンプリングした培養液

を 0.5 % のソフトアガーに混ぜてプレートに流し込み、一晚培養した後、コロニー数を計測した。この際、1 枚のプレートに対し、多くても 500 コロニー程度となるように、サンプリングした培養液を適宜希釈して調整した。

細胞内 tRNA の状態を調べるために、コロニー形成率測定用のサンプリングを終えた各試験管の培養液より集菌し、文献 85) に従って全 tRNA を調製した。以下に手順を示す。集菌した菌体ペレットと同体積の Solution D (4 M グアニジンチオシアン酸塩(WAKO), 25 mM クエン酸ナトリウム(pH7.0), 0.5% N-ラウロイルサルコシンナトリウム (東京化成工業), 0.1 M 2-メルカプトエタノール) を加え十分に菌体を懸濁した後、ボルテックスにて 2 分程度攪拌した。これに対し、加えた Solution D の 1/10 体積の 2 M 酢酸ナトリウム、同体積の milli-Q 飽和フェノール、1/5 体積のクロロホルム/イソアミルアルコール(クロロホルム : イソアミルアルコール = 29:1) を加え、ボルテックスにて 1 分攪拌した後、4°C にて 15000 rpm で 15 分遠心し、上清を回収した。この上清に対し、同体積のイソプロパノールを加え、-20°C で 30 分放置した。0°C にて 15000 rpm, 15 分遠心し、上清を捨ててから 100 μ l の 0.3 M 酢酸カリウムに懸濁した後、250 μ l の 100% エタノールを加え、-20°C で 30 分保存した。0°C にて 15000 rpm, 15 分遠心し、得られた沈殿物を 70% エタノールでリンスした後、適当な体積の milli-Q 水に溶解した。調製した tRNA を 260 nm の波長により測定し、濃度を統一した後、0.2A₂₆₀unit ずつ採取し、等量の 2×Loading solution (9 M 尿素, 0.02% XC, 0.02% BPB) を加え、変性アクリルアミドゲル (7 M 尿素, 10% アクリルアミド, 1×TBE) にて電気泳動を行った。尚、ここで用いたアク

リルアミドおよびTBEは、それぞれ40%アクリルアミド（アクリルアミド：ビスアクリルアミド=19:1）、10×TBE（0.89 M Trizma base(SIGMA), 0.89 M ほう酸, 20 mM EDTA）をストックとして調製し、適宜希釈して用いた。泳動後、エチジウムブロマイド染色にてバンドのパターンを確認した後、ノザンハイブリダイゼーション法により、細胞内 tRNA の様子を観察した。実験方法、および用いたプローブは、基本的に文献 14) で使用したものと同一であるが、tRNA^{Tyr} および tRNA^{Phe} に対するプローブに関しては、以下の配列を持つ DNA を新たに合成した。尚、tRNA^{Tyr} には二つのアイソアクセプターが存在するが、このプローブは、両者を区別することは出来ない⁸⁶⁾。

tRNA^{Tyr} プローブ : 5'-GGTGGGGGAAGGATTCGAACCTTCGAAGTC-3'

tRNA^{Phe} プローブ : 5'-GGACTCGGAATTCGAACCAAGGACACGGGGA-3'

ハイブリダイゼーションの温度は 50℃とした。ただし、tRNA^{His}, tRNA^{Asn} のみ 37℃で行った。

2.3 結果

各段階希釈したコリシン E5/ImmE5 溶液を添加した時の生菌率と、その時の細胞内 tRNA の様子を Fig. 2-1 に示す。コリシン E5/ImmE5 溶液の添加量を増やすにつれ、生菌率はシグモイド曲線状に低下した。また、各生菌率を示した大腸菌の、細胞内 tRNA の様子をノザンハイブリダイゼーション法により解析したが、コリシンの添加量を増やすことにより、tRNA の分解量が増加する様子が観察された。こ

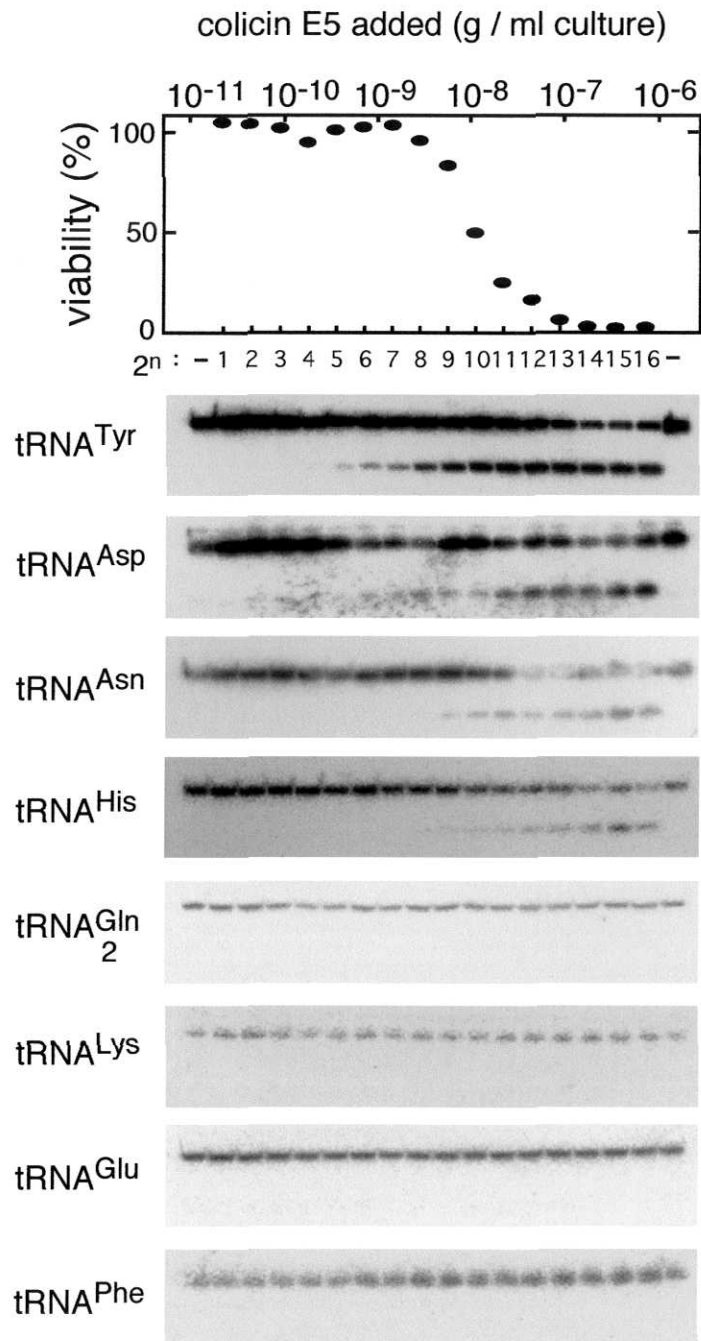


Fig. 2-1 コリシンE5添加による生菌率の変化と細胞内tRNAの様子

コリシンE5/ImmE5複合体を段階的に希釈し、大腸菌培養液に作用させ、細胞内tRNAの様子をノザン解析により解析すると共に生菌率を測定し、それぞれを比較した。ノザン解析に用いたプローブは、各パネルの左に記されたtRNAの3'側に相補的なDNAを用いた。

の分解量増加の傾向は、例えば生菌率がほぼ 0%になるようなコリシン濃度より濃い条件で、やっと tRNA の切断が見られる、などといったようなことはなく、生菌率の低下に応じた tRNA 分解の進行が見られた。tRNA^{Trp} を例にとると、tRNA の 20% が分解を受けたくらいから生菌率が低下し始め、50%が分解した時点で生菌率はほぼ 0%となっている。最も濃い濃度のコリシンを添加しても、全ての tRNA が切断されることはなかった。このことは、大腸菌細胞内での tRNA の転写、成熟化の速度の速さを示しているものと思われる。

2.4 考察

今回用いたコリシン E5/ImmE5 溶液の濃度は、 $2.18 \times 10^{-5} \sim 0.72 \mu\text{g/ml}$ である。コリシン溶液添加時の濁度を約 0.4 と仮定すると、 0.4×10^8 細胞/ml であり、一つの試験管中にはおよそ 10^9 個の大腸菌が存在することになる。コリシン複合体の分子量を約 10 万とすると、今回加えた量は、およそ $10^{15} \sim 10^{20}$ 分子程度ということになり、一番少ない時でも、一つの大腸菌細胞当たり、 10^6 分子が添加されていることになる。一番コリシン濃度の低いところでは、生菌率の低下が全く見られないが、コリシンは本質的には一細胞当たり一分子で殺菌活性を示すことが可能であるという実験証拠⁸⁷⁾があり、今回の結果は矛盾する様に思われるが、実際にはエアレーションの条件や、細胞表層上のレセプターの数に限られている等、様々な要因から、これほどの好条件で殺菌活性を示すことはないようである。

今回の結果で、特に注目すべき点としては、低濃度のコリシン溶液を添加した時

に、大腸菌の生菌率には全く影響が見られないにもかかわらず、tRNA の分解が見られることである。これは、裏返すと、ある程度の tRNA の切断は許容可能であり、生育には影響を与えないことを示唆する。第七章でも述べるが、当研究室の井上により、E5-CRD と基質アナログとの共結晶構造に基づき、活性中心変異体を作製している⁸⁸⁾。これら変異体には、スポットテスト実験において全くハ口を形成しないものもあるが、それであっても、かなり微弱ながら tRNase 活性を保っている。以上のことから、tRNA の分解量が、ある「閾値」を上回って初めて感受性菌に対して殺菌活性を示すと考えられる。また、先ほど述べたように、tRNA の生合成速度が速いことは、このような「閾値」の想定と矛盾しないと思われる。

今回行った実験結果からは、コリシン E5 の 4 種類の基質 tRNA が、殺菌の標的であることを本質的に証明したことにはならない。第四章で詳細に述べるが、コリシン E5 は配列特異的に認識する酵素であり、コリシン E5 の認識配列を持つ、例えば mRNA も理論的には切断可能であるため、何が primary target となっているかを厳密に限定するのは大変難しい。しかしながら、Fig. 2-1 の結果は、殺菌に伴う高感度な細胞内変化の様子を捉えており、tRNA が殺菌の真の標的であるという解釈を十分に許容出来るものであった。

今回の結果から、コリシン E5 は、基質によって切断の効率が異なることが推定される。生育に影響を与えない濃度でコリシンを加えた時に、tRNA^{Tyr} および tRNA^{Asp} が最も高感度に切断され始める。そして、生菌率に影響が出始める濃度を与えたころから、tRNA^{His} および tRNA^{Asn} の切断が観察されるようになる。基質 tRNA の存

在量比は、 $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}:\text{tRNA}^{\text{His}}:\text{tRNA}^{\text{Asn}}:\text{tRNA}^{\text{Asp}}=5:4:6:8$ と計算され⁸⁹⁾、それほど偏りが
ないことから、今回の結果に見られる切断効率の違いは、基質分子自身が原因で
あると思われる。これに関しては第四章で詳細に解析を試みているので、ここでは
特に触れないが、このことは、E5-CRD の基質認識を明らかにする上で大変興味
を持たれる点である。

第三章 E5-CRD の至適反応条件の検討

3.1 緒言

第一章、第二章において、コリシン E5 の tRNase 活性が感受性菌のタンパク合成を引き起こし、これが原因となって細胞死へとつながることを示した。本章から第五章までは焦点を変え、コリシン E5 の分子レベルでの機能解析を試みる。E5-CRD は、特異的 tRNA を切断するという大変ユニークな活性を持つことはこれまで述べてきた通りであるが、その他にも興味深い点がある。まず、分子内に His 残基を持たないことである⁶⁹⁾。一般的に、作用機構が解明されている RNase の多くは活性中心に His 残基を持つ。例えば RNase A においては、N 末端より 12 番目と 119 番目の His 残基が一般酸塩基触媒として活性を示すことが明らかになっている¹⁶⁾。それぞれの酵素における至適 pH は、触媒反応に関わるアミノ酸残基の pKa に依存することが多いことから、E5-CRD においても、各 pH 条件における活性を調べることにより、触媒残基を絞り込むことが出来るかも知れない。また、コリシン E5 の活性ドメインと、アミノ酸一次配列上、相同性のあるものは、一例が存在するのみであることから、分子メカニズムの解明は単純なアナロジーでは達成できない。このことから、これまで知られていなかった、全く新しい作用機構の発見につながる事が期待される。尚、前述の一例とは、最近、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株のゲノムにコードされていることが明らかになったピオシン S4^{90,91)}である（詳細は第七章に譲る）。

これまでに、我々はコリシン E5 の活性ドメインである E5-CRD が、基質 tRNA

のアンチコドン/ステムループ領域の配列からなる 17 残基の化学合成 RNA 分子 (minihelix) を効率良く切断することを明らかにしている。そこで本章では、この minihelix を化学合成、もしくは *in vitro* 転写により調製し、これを用いて E5-CRD の反応至適条件を検討することにより、*in vitro* での反応条件を確立させることを目的とした。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 minihelix の調製

基質に用いた minihelix は、GENSET 社(Paris, France)に合成を依頼、もしくは *in vitro* 転写により調製した。*in vitro* 転写による調製方法は、文献 92)に従った。鋳型に用いる DNA は GENSET 社に合成を依頼した。配列は以下の通りであり、全て脱保護基処理を行い、未精製のものを用いた。それぞれの濃度は約 100 μM である。

Top strand: 5'- TAATACGACTCACTATA-3'

Bottom strand (YMH):

5'- GCAGATTACAGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

N 末端に His-tag を持つ T7 RNA ポリメラーゼの調製法は東京大学大学院工学系研究科（現新領域創成科学研究科）鈴木勉博士に御指導いただいた。

10×転写バッファー（400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM 塩化マグネシウム, 50

mM DTT, 10 mM スペルミジン)、pH 8.0 に調製した 20 mM (each) NTP mix および 100 mM 5' GMP をストックとして用意した。inorganic pyrophosphatase (SIGMA)は、1 unit/ μ l になるように 20 mM リン酸バッファー、50% グリセロールに溶解した。*in vitro* 転写反応は 1 種類につき 1 ml スケールで行った。Top strand 550 pmol と Bottom strand 450 pmol とをエッペンに入れ、95°C で 3 分インキュベートした後、0°C で急冷することにより鑄型となる二本鎖を形成させた。反応液組成は 1×転写バッファー、2 mM NTP, 20 mM 5' GTP, 8 mM 塩化マグネシウム, 1 unit inorganic pyrophosphatase, 50 μ g/ml BSA とし、これに対し 20 μ l T7 RNA ポリメラーゼ(カラムより溶出したものを、希釈せずそのまま使用した)を加え、37°C で反応させた。1 時間後に再度 T7 RNA ポリメラーゼを 20 μ l 加え、更に 1 時間反応を続けた。反応は 2×Loading solution を 500 μ l 加えることにより停止した。この後に続くゲル精製に際しては、この反応液をエタノール沈殿等による濃縮を経ることなく、直接電気泳動ゲルのウェルにチャージした。

3.2.2 minihelix の精製

精製は、変性アクリルアミドゲル(組成は 7 M 尿素, 20%アクリルアミド, 1×TBE とし、ゲル版のサイズは 20 (幅) × 40 (長さ) × 0.1 (厚さ) (cm) とした)により電気泳動を行い、目的のバンドを UV shadowing 法により特定し、切り出しを行った。切りだしたゲル断片を、溶出バッファー(500 mM 酢酸アンモニウム, 10 mM 塩化マグネシウム, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) と共に 50 ml サイズのファルコンに入

れ、37°Cで30時間以上振とうした。振とう後、10,000 rpm、15分遠心し、ゲル断片を取らないように注意しながら上清を回収した。上清をエッペンに移し、更に15000 rpm、15分遠心し、上清に混入したゲルを除いた後、エタノール沈殿を行った。遠心により沈殿物を回収し、milli-Q 水に懸濁した後、再度エタノール沈殿を行い、尿素等の残存を防いだ。遠心後、適当な量の milli-Q 水に懸濁し、260 nm の波長にて濃度を測定した。測定に際しては、DU 530 (BECKMAN)に付属のソフトウエアにより、minihelix の配列に基づいて計算を行った。

以降の minihelix の名称は、アルファベット 3 文字「XMH」で表す。そのうちの 1 文字目は、対応する tRNA と結合するアミノ酸の 1 文字表記を、2, 3 文字の MH は MiniHelix の頭文字を表す。例えば、tRNA^{Tyr} のアンチコドンステム/ループを元にデザインした minihelix は YMH (Y は Tyr の一文字表記) となる。

3.2.3 minihelix の標識

minihelix の 5' 末端標識は、数 pmol 程度の minihelix を [γ -³²P]ATP (370 GBq/mmol) (第一化学薬品株式会社) および T4 Polynucleotide kinase (TOYOBO) を用いて 37°C、1 時間反応させることにより行った。in vitro 転写産物は、5' 末端標識後、変性アクリルアミドゲル (組成は 7 M 尿素, 20%アクリルアミド, 1×TBE とし、ゲル版のサイズは 20 (幅) × 40 (長さ) × 0.03 (厚さ) (cm) とした) にて電気泳動を行った。電気泳動後、オートラジオグラフィーを取り、現像された X 線フィルムをゲル版の裏から当てて、バンドの像に従って標識された minihelix を

切りだした。切りだしたバンドをエッペンに移し、溶出バッファーを 400 μ l 加えた後、37°C にて一晩インキュベートすることにより溶出を行った。上清を回収し、エタノール沈殿を行った後、適当量の milli-Q 水に懸濁した。

3.2.4 各アッセイにおける反応条件等

至適 pH 条件検討には、pH 4.0, 5.0, 6.0 のクエン酸バッファー（クエン酸ナトリウムとクエン酸との混合による）、pH 6.0, 7.0, 8.0 のリン酸バッファー（ Na_2HPO_4 と NaH_2PO_4 との混合による）、そして pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 の Tris-HCl を用いた。反応液組成は、20 mM 各バッファー, 20 mM 塩化カリウム, 0.1 mg/ml BSA, 2.5 μ M YMH とし、E5-CRD は 1 nM 加えた（酵素：基質=1:2500）。基質である YMH には、5' 標識した YMH を痕跡量加えてある。37°C で 10 分反応させた後、液体窒素で反応液ごと凍結することにより反応を止めた。変性アクリルアミドゲル（7 M 尿素, 15% アクリルアミド, 1 \times TBE）により電気泳動した後、BAS 2000 (FUJIFILM) により各バンドの放射能強度を測定した。反応進行度の計算は以下の式に基づく。

$$\text{反応進行度 (\%)} = \frac{\text{(切断されたバンドの強度)}}{\text{(未切断のバンドの強度+切断されたバンドの強度)}} \times 100$$

尚、以降の minihelix を用いたアッセイの反応進行度の計算方法は、全て上記に従った。

塩濃度に対する反応進行度を評価する実験においては、20 mM Tris-HCl (pH8.5),

100 $\mu\text{g/ml}$ BSA にそれぞれ目的の終濃度になるように塩を加え、反応溶液を調製した。YMH は 5 μM とし、終濃度で 500 pM になるように E5-CRD を加えた後、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分反応させた。反応停止は 2 \times LS を等量加えることにより行った。また、反応に対する二価カチオン要求性を調べる実験では、EDTA は終濃度で 1mM になるように加えた。

熱に対する安定性を評価する実験は、以下の要領で行った。20 mM Tris-HCl (pH8.5), 50 mM 塩化ナトリウム, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 500 pM E5-CRD の反応液を調製した。このうち、95 $^{\circ}\text{C}$ でプレインキュベートした後、反応液を室温に放置することにより放冷したものと、氷上に静置し急冷したものを用意した。続いて各反応液に YMH を終濃度で 5 μM になるように加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分反応させた。プレインキュベートを行わない E5-CRD の反応進行度を比較に用いた。尚、プレインキュベートによる基質のアルカリ加水分解は、ここで用いた条件下では起こらないことをあらかじめ確認した。

各 pH 条件に対する安定性を評価する実験においては以下の要領で行った。20 mM 各緩衝液, 50 mM 塩化ナトリウム, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA となるような反応液を調製した。この反応液に対し、終濃度が 0.1 μM となるように E5-CRD を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間プレインキュベートした。プレインキュベート後、リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を終濃度で 200 mM になるように加えることにより、それぞれの反応液を中和した。その後、YMH を終濃度が 5 μM となるように加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分反応させた。

3.3 結果

3.3.1 各 pH 条件における活性の評価

反応溶液中の pH 条件を pH 4.0 から 9.0 まで変化させ、それぞれの反応進行度を調べた(Fig. 3-1)。結果のグラフから明らかな様に、E5-CRD が高い活性を示す領域は、アルカリ側に偏っていることが分かる。一方、生理的条件である中性領域では、反応進行度が著しく低くなっている。そして、pH が 7 を越えたあたりで急激に進行度が上昇している。これより、活性に関与する残基の pK_a 値が高いことが考えられる。

反応時間と反応進行度との間に直線的比例関係が成り立つのは、一般的に反応進行度が 1~2 割程度までであるとされる。その場合、今回の実験では、pH7.5~9.0 にかけての領域は、反応進行度が頭打ちになっている可能性が考えられた。そこで、Tris-HCl による pH7.0~9.0 において、酵素量を減らし、より低い反応進行度での観察を試みた。そこで、加える E5-CRD の量を 0.2 nM に下げ、酵素：基質=1:12500 とて再度実験を行ったが、この場合においても、ほぼ同様の結果が得られた。

今回採用した条件の範囲では、pH 9.0 の時が最も反応進行度が高かった。しかしながら高いアルカリ条件下では、RNA は加水分解反応を受けやすくなるため、反応条件としては不適切であると考えた。そこで、以降の反応条件には比較的高い反応進行度を保っている pH 8.5 で行うこととした。

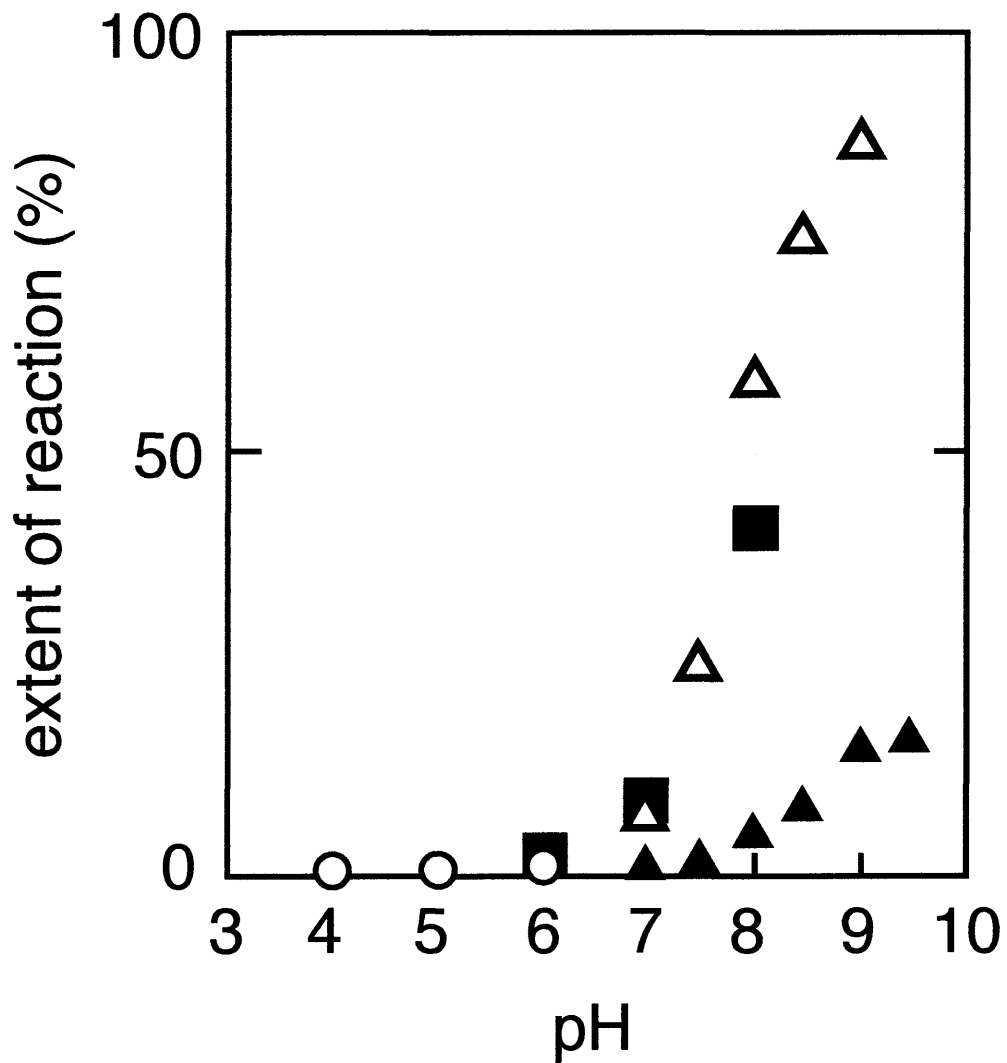


Fig. 3-1 各pH条件におけるE5-CRDの活性の評価

各pH条件におけるE5-CRDの活性を、反応進行度を元に評価した。○;クエン酸バッファー、■;リン酸バッファー、▲, △;Tris-HClバッファー。また、酵素と基質との量比は、E5-CRD : 基質=1:2500(○, ■, △)およびE5-CRD : 基質=1:12500(▲)とした。

3.3.2 各塩濃度における活性の評価

塩化ナトリウム、塩化マグネシウム濃度を変化させた条件で、YMH を基質として反応進行度を求めた(Fig. 3-2)。塩化ナトリウムを塩に用いた場合、50 mM までは塩濃度の上昇に伴い、反応進行度も上昇した。50 mM を越えると、逆に高い塩濃度は阻害的に働いた。また、塩化カリウムを用いて同様の実験を行ったが、塩化ナトリウムを用いた時の結果とほとんど変わらなかったことから、一価のカチオンに対して選択性はないと思われる。塩化マグネシウムを用いた場合では、20 mM で最も高い反応進行度を示した。一方、Fig. 3-3 の結果から、EDTA 存在下でも活性の著しい低下が見られないことから、E5-CRD の反応には、本質的には二価カチオンを必要としないと言える。

以上の結果を踏まえ、以降の反応条件には塩化ナトリウムを 50 mM の濃度で用いることにした。尚、 Mn^{2+} は E5-CRD の活性を阻害し、その効果は 5 mM という比較的 low 濃度から見られた。

3.3.3 E5-CRD の安定性の評価

E5-CRD の安定性を、以下のアプローチから調べた。まず、熱に対する安定性を調べた。E5-CRD を 95°C で 15 分加熱した後急冷し、残存活性を加熱しなかった時の活性と比較した(Fig. 3-4)。その結果、95°C で加熱した E5-CRD は、加熱しなかったものとはほぼ変わらない活性を示し、熱に対して安定であることが分かった。一般的に RNase は熱に対して安定であるとされるが、E5-CRD も同様であった。また、

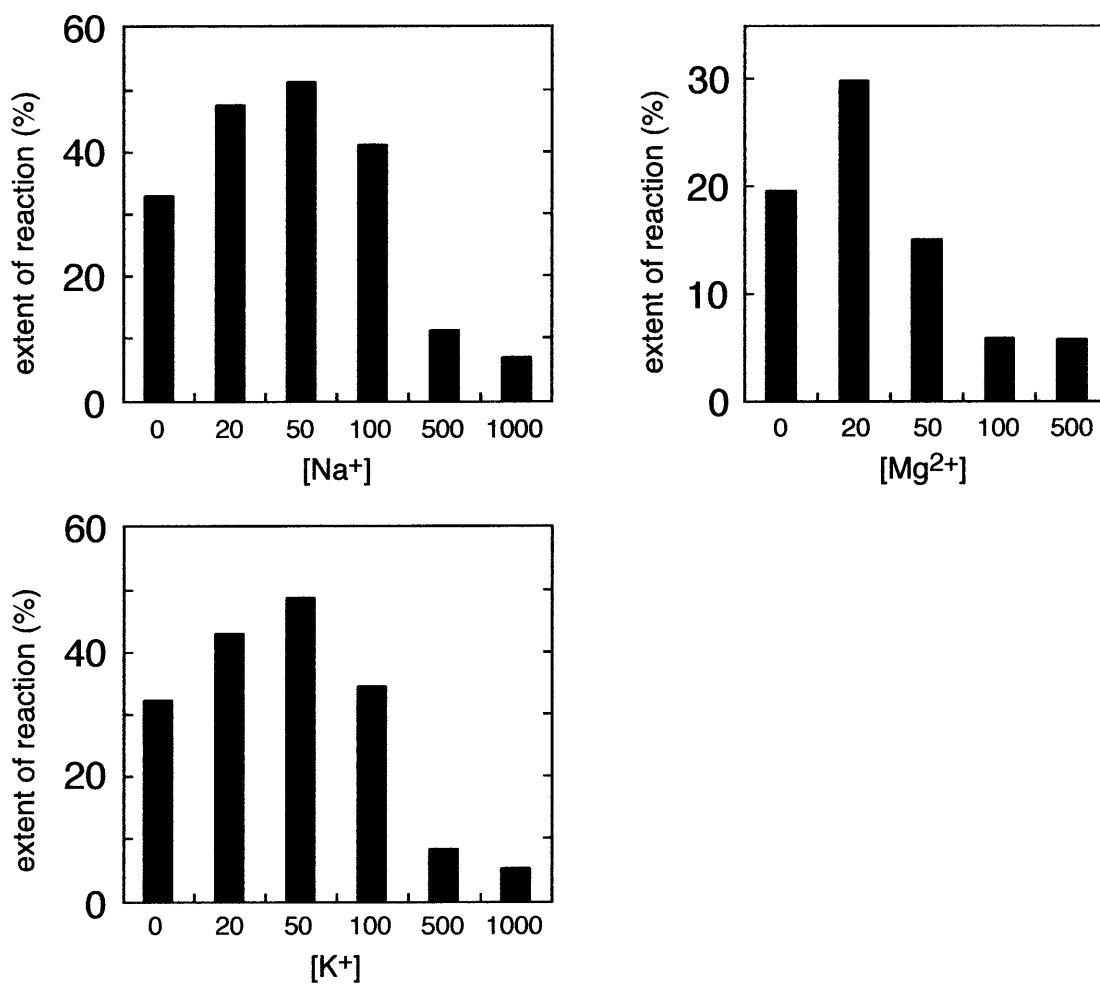
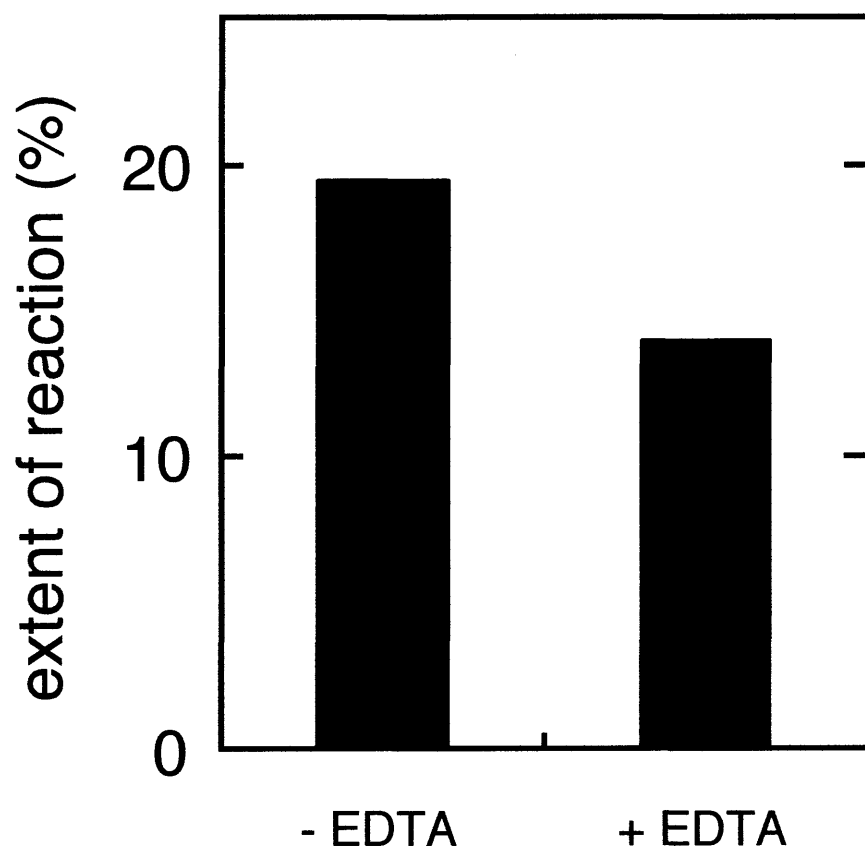


Fig. 3-2 様々な塩濃度条件での活性の評価

各塩濃度条件におけるE5-CRDの活性を、反応進行度を元に評価した。各実験はそれぞれ独立に2回行い、平均値を用いた。



**Fig. 3-3 E5-CRDの活性における二価カチオン
要求性の評価**

EDTAを終濃度で1 mMになるように添加することにより、二価カチオンを反応液中から完全に除いた系におけるE5-CRDの活性を、反応進行度により評価した。各実験はそれぞれ独立に2回行い、平均値を用いた。

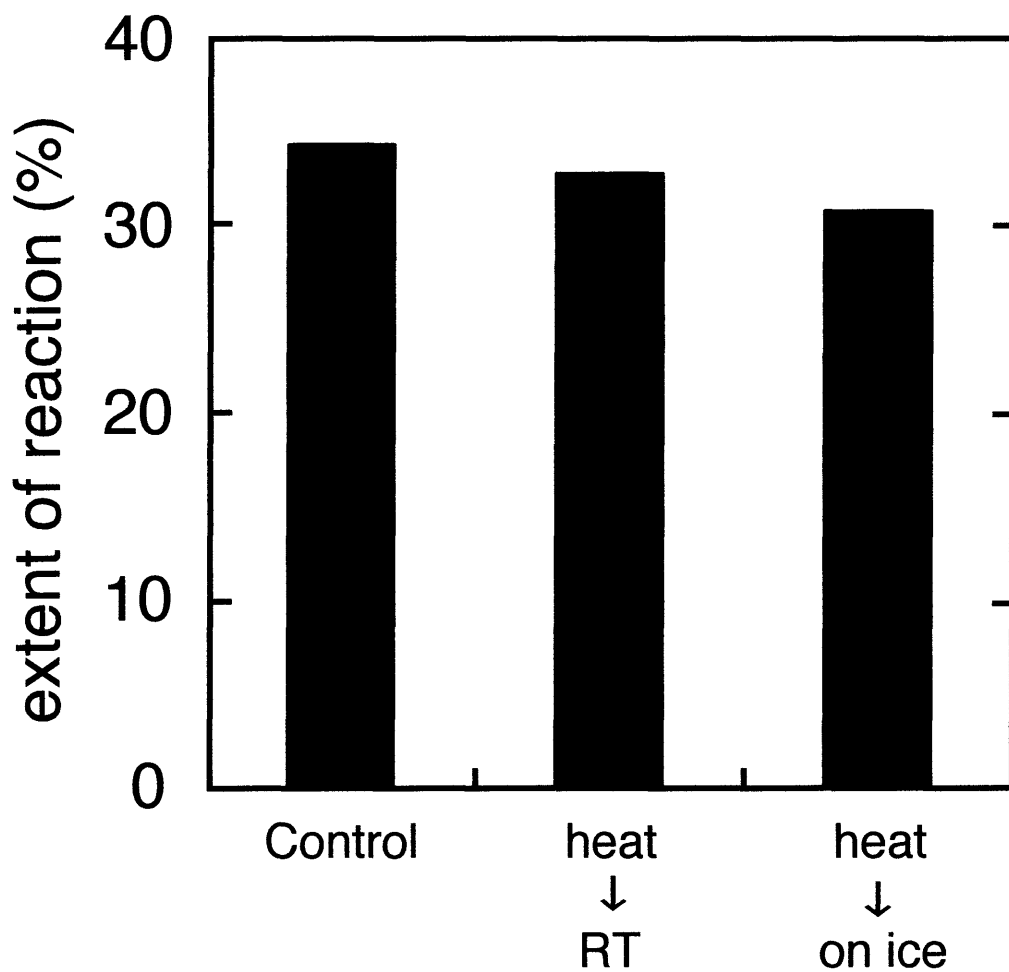


Fig. 3-4 E5-CRDの熱に対する安定性の評価

E5-CRDを95℃でプレインキュベートし、室温にて放冷(heat→RT)、もしくは氷上にて急冷(heat→on ice)した後、これらの残存活性をプレインキュベートしていないものと比較することにより、E5-CRDの熱に対する安定性を調べた。各実験は、それぞれ独立に2回行い、平均値を用いた。

95℃の加熱後、氷上で急冷することにより、急激にリフォールディングを起こさせ、失活させることを試みたが、この場合も加熱をしなかったものと比べ、活性の低下は見られなかった。E5-CRD が尿素処理による変性状態から、再度尿素を取り除くことにより容易に再生可能であることを考えても、構造的にフォールディングを取り易いと思われる。次に、様々な pH 条件下での安定性を調べた。pH 4~9 までの各 pH 条件にて 2 時間インキュベートした後の残存活性を、プレインキュベートしていない E5-CRD の活性と比較、評価した(Fig. 3-5)。結果から分かるように、今回調べた pH 条件の範囲においては、E5-CRD は活性を損なわなかった。ただし、反応進行度が約 7 割にも達していることから、この反応進行度では初速度が観察されていないことが考えられ、活性の低下が全く見られないとは言い切れない。しかしながら、仮に低下が見られたとしても著しいものではないと思われる。

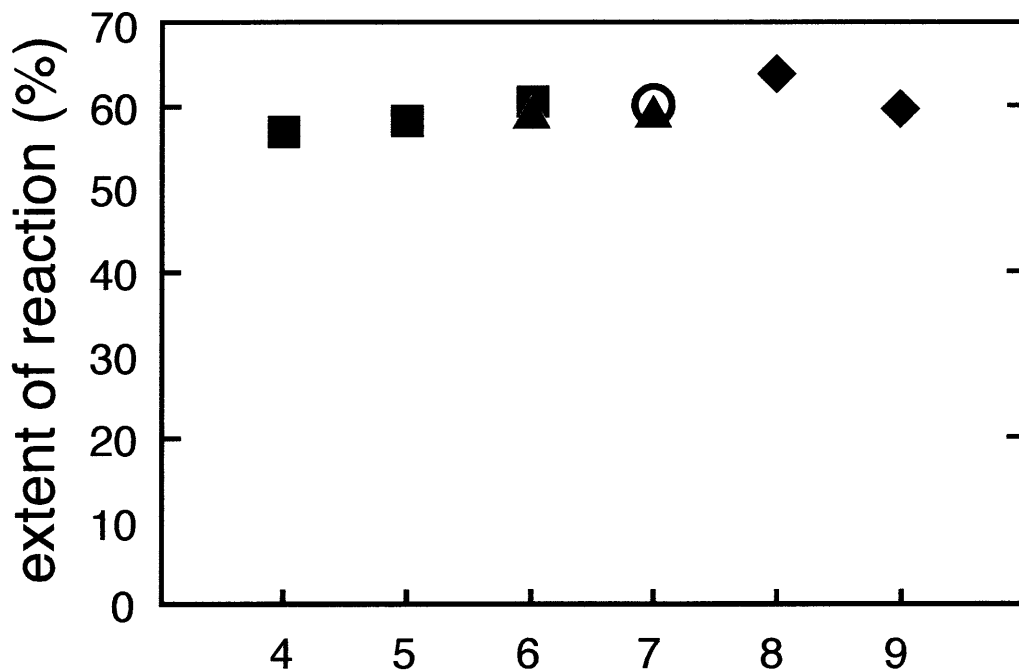


Fig. 3-5 E5-CRDの各pH条件下での安定性の評価

各pH条件下 (■;クエン酸バッファ、▲;リン酸バッファ、◆;Tris-HClバッファ) でプレインキュベートしたE5-CRDの残存活性を、プレインキュベートしていないE5-CRDの活性(○)と比較することにより、各pHに対する安定性を調べた。各実験はそれぞれ独立に2回行い、平均値を用いた。

第四章 E5-CRD の基質認識機構の解明

4.1 緒言

本章および第五章では、序章で述べた二大目標のうちの一つである、コリシン E5 の基質認識機構に関して述べる。tRNA は平均して約 76 塩基、分子量にして 27,000 程度と比較的低分子であることに加え、全ての tRNA 分子間で共通している塩基も多いことから、認識に用いることの出来る塩基はそれほど多くない。例えば、tRNA の 3'末端に、対応するアミノ酸を結合する酵素である「アミノアシル tRNA 合成酵素」であるが、この酵素は基質 tRNA 上のわずか数塩基を認識することにより、基質 tRNA を他の tRNA と区別している。この酵素により認識されるヌクレオシドを、それぞれの tRNA の「アイデンティティー決定因子」と呼ぶが、これらは tRNA 分子全体に分布しているのではなく、アンチコドンや「ディスクリミネーター」と呼ばれる 73 番目の塩基等、特定の領域に集中している⁹³⁾。コリシン E5 の活性ドメインである E5-CRD は、分子量にして約 12,000 の低分子量タンパク質であるが、このドメインのみで基質に対する特異性も有することから、基質認識に関与する領域も、この E5-CRD の中に含まれることが分かる。さて、前述のアミノアシル tRNA 合成酵素は、小さいものでも、分子量にして 40,000 以上もあることから、これより更に低分子である E5-CRD がアミノアシル tRNA 合成酵素に匹敵する認識をしているとも考えづらい。序章でも述べた通り、我々は当初、コリシン E5 の認識には基質 tRNA のアンチコドンの 1 文字目に存在する Q 塩基が必須であると予想していた。

しかしながら、コリシン E5 が *tgt* 変異株 (Q 塩基を持つ tRNA が存在しない) に対して殺菌活性を示すことや (Fig. 0-4)、化学合成した RNA (当然ながらこれらは修飾塩基を持たない) を大変効率良く切断することから^{14,15)}、Q 塩基を持つことが、コリシン E5 による認識に必須ではないことが分かった。これは、同時にコリシン E5 が Q 塩基と G とを識別していないことも意味している。Q 塩基以外で基質 tRNA 全てに共通した特徴としては、アンチコドンループ内に存在する UQU 配列 (前駆体 tRNA では UGU 配列) が挙げられる。序章でも述べた通り、前駆体 tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} のアンチコドン 1 文字目の G を Q 塩基へと塩基置換する酵素である tRNA グアニトランスグリコシラーゼ (TGT) は、前駆体 tRNA における UGU 配列を認識することが明らかとなっている。基質の共通性から、コリシン E5 も、TGT と同じ配列を認識している可能性は多いと考えられる。また、コンピューター解析により、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} を他の tRNA から識別するには、UQU 配列で十分であることも示されている⁹⁴⁾。そこで、本章では、コリシン E5 がこの U, G, U のいずれかの塩基を認識していると仮定し、以下の実験を試みた。すなわち、tRNA^{Tyr} のアンチコドンステム/ループに基づいた minihelix (YMH) の UGU に個々に変異を導入した変異体 minihelix を作成し、これらが E5-CRD により切断を受けるかを調べることにより、E5-CRD が直接認識している基質残基の同定を試みた。

4.2 実験材料および方法

4.2.1 変異型 minihelix の調製

野生型および変異型 minihelix の調製は、3.2.1 項に従った。また、一部のものに関して、理化学研究所平尾一郎博士に合成していただいた。*in vitro* 転写に用いた鋳型 DNA の配列を以下に示す。

Top strand: 5'- TAATACGACTCACTATA-3'

Bottom strand

GGYMH: 5'- GCAGATTTACAGTCTGCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

GGHMH: 5'- CTGGAATCACAATCCAGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

GGNMH: 5'- ACGGATTAACAGTCCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

GGDMH: 5'- CCTGCGTGACAGGCAGGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

GGTMH: 5'- CACCCTTACCAAGGGTGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

SELEX: 5'- GGGAGTTAAACACCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMH(U7A): 5'- GCAGATTTACTGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMH(U7G): 5'- GCAGATTTACCGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMH(U7C): 5'- GCAGATTTACGGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMH(A10G): 5'- GCAGATTCACAGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMH(A10C): 5'- GCAGATTGACAGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMH(A10U): 5'- GCAGATTAACAGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

YMHL: 5'-CGTCTTTTACAGTCTGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ECYMH:

5'-GGGAGCAGATTTACAGTCTGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ECYMH(A14G):

5'-GGGAGCAGATTACAGTCTGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ECYMH(A14C):

5'-GGGAGCAGATTGACAGTCTGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ECYMH(A14U):

5'-GGGAGCAGATTAACAGTCTGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

4.2.2 minihelix における切断部位の同定

E5-CRD による minihelix の切断部位は、5'末端標識した minihelix をアルカリ加水分解、および RNase T1 処理することにより生じるラダーに基づいて同定した⁹⁵⁾。3.2.3 項に従って標識した minihelix に対して 0.1 A₂₆₀unit/ μ l となるようにキャリア-tRNA を加えた（この溶液を「ラベル溶液」と呼ぶ）。キャリア-tRNA は、大腸菌より調製した全 tRNA に対し、DE52 カラムを用いて多糖類等を除去したものを使用した。アルカリ加水分解ラダーの調製は、以下のように行った。ラベル溶液 1 μ l に対し、H 液（50 mM 炭酸ナトリウム (pH 9.0)）を 4 μ l 加え、95°C で 2 分反応させることにより限定分解を行った。反応終了後、5 μ l の Urea-カクテル（30 mM クエン酸ナトリウム (pH 4.5), 1 mM EDTA, 0.02% BPB, 0.02% XC, 8 M 尿素）を加

えることにより反応を停止した。また、T1 ラダーの調製は、以下のように行った。

1 μl のラベル溶液と 10 μl の Urea-カクテルを混ぜたものに対し、RNase T1 (SIGMA) (粉末状のものを、30 mM 酢酸カリウム(pH 5.5), 50% グリセロールの組成で 100 unit/ μl になるように希釈した) を 0.5 μl 加えて 55°C で 5 分反応させた後、氷上にて静置した。解析には、グリセロール入りの変性アクリルアミドゲル (組成は 7 M 尿素, 20%アクリルアミド, 1×TBE, 10% グリセロールとし、ゲル版のサイズは 20 (幅) × 40 (長さ) × 0.03 (厚さ) (cm) とした) を用い、還流装置とウォータージャケットにより、ゲルを常に 55°C に保った。泳動後、片側のゲル版を取り外し、ゲルを使用済の X 線フィルムに吸着させ、ガラス板より剥がしとった。剥がしとったゲル (X 線フィルムについている) の全体をサランラップで包み、IP プレートにコンタクトさせ、FLA-2000(FUJIFILM)で解析した。

4.2.3 minihelix を用いたアッセイの反応条件

反応液組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 20 mM 塩化カリウム, 0.1 mg/ml BSA, 4 μM YMH とし、E5-CRD は終濃度で 0.2 nM となるように加えた。尚、反応液体積は 50 μl とした。E5-CRD を加えると同時に反応を開始し、一定時間ごとに 10 μl ずつサンプリングし、あらかじめエッペンに用意した 20 μl の 2×LS に加え、反応を停止した。電気泳動、および解析方法は第三章で述べたアッセイと同様である。Fig. 4-1 の実験のみ、BSA 濃度は 0.1 mg/ml とし、15 分反応した後、液体窒素により反応を停止した。

4.2.4 tRNA^{Thr} の E5-CRD に対する切断感受性の解析

in vitro 実験の反応液組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 100 µg/ml BSA, 1.25 mg/ml 大腸菌由来全 tRNA とした。これに対し、E5-CRD を 25, 8.3, 2.8 nM とするよう添加し、37°C で 15 分インキュベートした。また、ImmE5 による E5-CRD 活性の阻害を見るために、25 nM の E5-CRD に対し、ImmE5 を 125 nM 加え、ブレインキュベートした。また、コリシン E5 を作用させた大腸菌細胞内での tRNA^{Thr} の切断の有無を調べるために、以下の実験を行った。大腸菌 K12 W3110 株を 37°C で培養し、OD₆₆₀=0.5 となったら、20 µg のコリシン E5/ImmE5 複合体を加え、更に 30 分培養を続けた。集菌し、全 tRNA を抽出した後、ノザンハイブリダイゼーションにより解析を行った。tRNA^{Thr} 検出のために用いたプローブは以下の通りである。尚、tRNA^{Thr} には 2 種類のアイソアクセプター tRNA が存在するが、このプローブでは、これらを区別することは出来ない⁸⁶⁾。

tRNA^{Thr}: 5'-TGCTGATACCCAGAGTCGAACTGGGA-3'

tRNA^{Tyr} の検出には 2.2.3 項で示したプローブを用いた。

4.2.5 dYMH を用いた YMH に対する競合阻害実験

YMH の配列を全てデオキシリボヌクレオチドで合成した minihelix (dYMH と呼ぶ) は、GENSET 株式会社に合成、および HPLC 精製を依頼した。反応条件は 4.2.3 項に示した。また、YMH と dYMH との比が、モル比にしてそれぞれ 4:1, 2:1, 1:2.5, 1:5 となるように dYMH を反応溶液中に添加した。ラベルされた YMH に基づく反

応進行度を測定することにより、dYMH が競合することによる YMH の反応進行度の低下の度合いを調べた。

4.3 結果

4.3.1 E5-CRD の認識する基質残基の同定

緒言でも述べたように、E5-CRD が基質 tRNA 内の UGU 配列のいずれかの塩基を認識すると仮定した場合、この配列中の塩基を置換した変異体には、E5-CRD により切断を受けないものが存在すると想像される。そこで、YMH の UGU 配列に、それぞれ個々に変異を導入した変異体 YMH(U7C), YMH(G8A), YMH(U9C)を作製し、これを E5-CRD と反応させた(Fig. 4-1)。置換に際しては、プリン塩基は別のプリン塩基へ、ピリミジン塩基は別のピリミジン塩基へと変換した。結果であるが、まず、野生型 YMH は E5-CRD により効率良く切断された。また、作成した変異体のうち、YMH(U7C)は、野生型と同様に切断された。このことから、UGU 配列のうち、5'側の U は認識に直接関与していないことが分かった。一方、YMH(G8A), YMH(U9C)変異体は、全く切断を受けなかった。以上のことから、E5-CRD の認識には、UGU 配列のうち GU が必須であると考えられた。そこで、この妥当性を評価するために、本来 GU 配列をアンチコドンループ内に持たない minihelix に、新たに GU 配列を変異導入し、こうして作成した変異型 minihelix が E5-CRD により切断を受けるようになるか調べた。変異導入の対象としては、tRNA^{Lys} に対応する

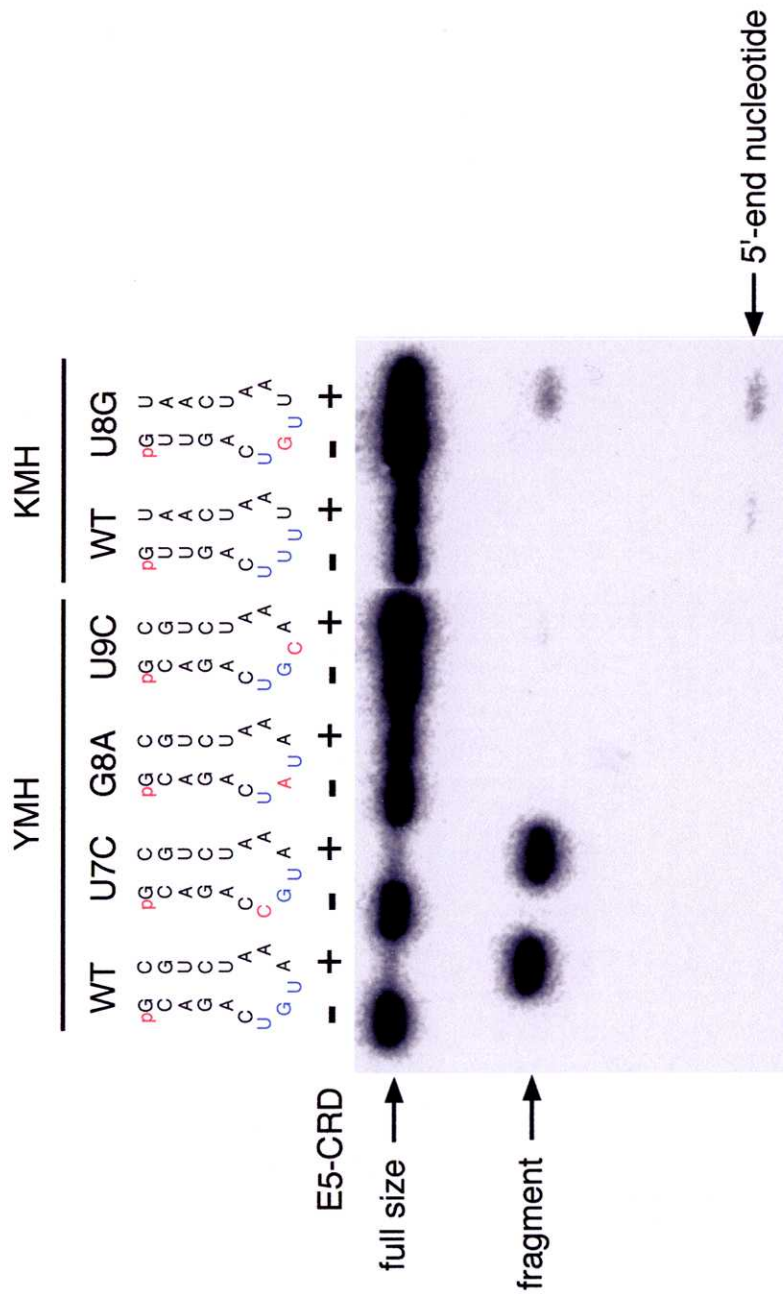


Fig. 4-1 野生型および変異型minihelixのE5-CRDに対する感受性

YMHのアンチコドンループ内に存在するUGU配列の各塩基に、個々に変異を導入した変異体minihelixを作成し、これらがE5-CRDにより切断を受けるか調べた。また、KMHにUGU配列を導入した変異体を用いて同様の実験を行った。基質minihelixは5'末端標識したものをを用いた。

minihelix である KMH を選んだ。KMH のアンチコドンループでは、YMH の UGU 配列に対応する部位は UUU となっている。そこで、この中央の U を G へと置換した KMH(U8G)を作成し、E5-CRD と反応させたところ、この変異体 minihelix は切断を受けるようになった。しかしながら、その切断効率は YMH に比べ非常に低いものであった。また、KMH および KMH(U8G)の切断片より更に低分子の位置にバンドが見られた。このバンドの正体は、これら二つの minihelix の 5'末端に存在する GU 配列が E5-CRD により認識、切断された結果生じた 5'p, 2'3'-サイック G であると考えている。この 5'末端の GU 配列はステム内に存在するが、それでは E5-CRD が二本鎖構造も認識、切断可能であるかという疑問が生じる。これに関して実験的には調べてはいないので正確なところは分からないが、末端部分がほどけて一本鎖状態になったところへ E5-CRD が作用したのではないかと思われる。つまり、E5-CRD は一本鎖特異的であると考えている。この様に想像する根拠の一つとしては、後の項で述べるが、変異型 E5-CRD に特異的に結合する RNA 分子（アダマー）を *in vitro* selection 法⁹⁶⁾により取得した結果、認識される GU 配列の大部分がループ内に存在していたことが挙げられる。

次に、切断を受けた YMH, YMH(U7C), KMH(U8G)の切断位置を決定した。(Fig. 4-2)。これからも分かる通り、全ての minihelix は 5'末端より 8 位と 9 位、すなわちアンチコドン 1 文字目の G と、アンチコドン 2 文字目の U との間で切断されており、これは tRNA を基質とした時の結果と一致する¹⁵⁾。尚、文献 15)では、tRNA^{Tyr}を用いて切断末端のリン酸基の形状の解析を行っており、tRNA の 5'切断片の 3'末

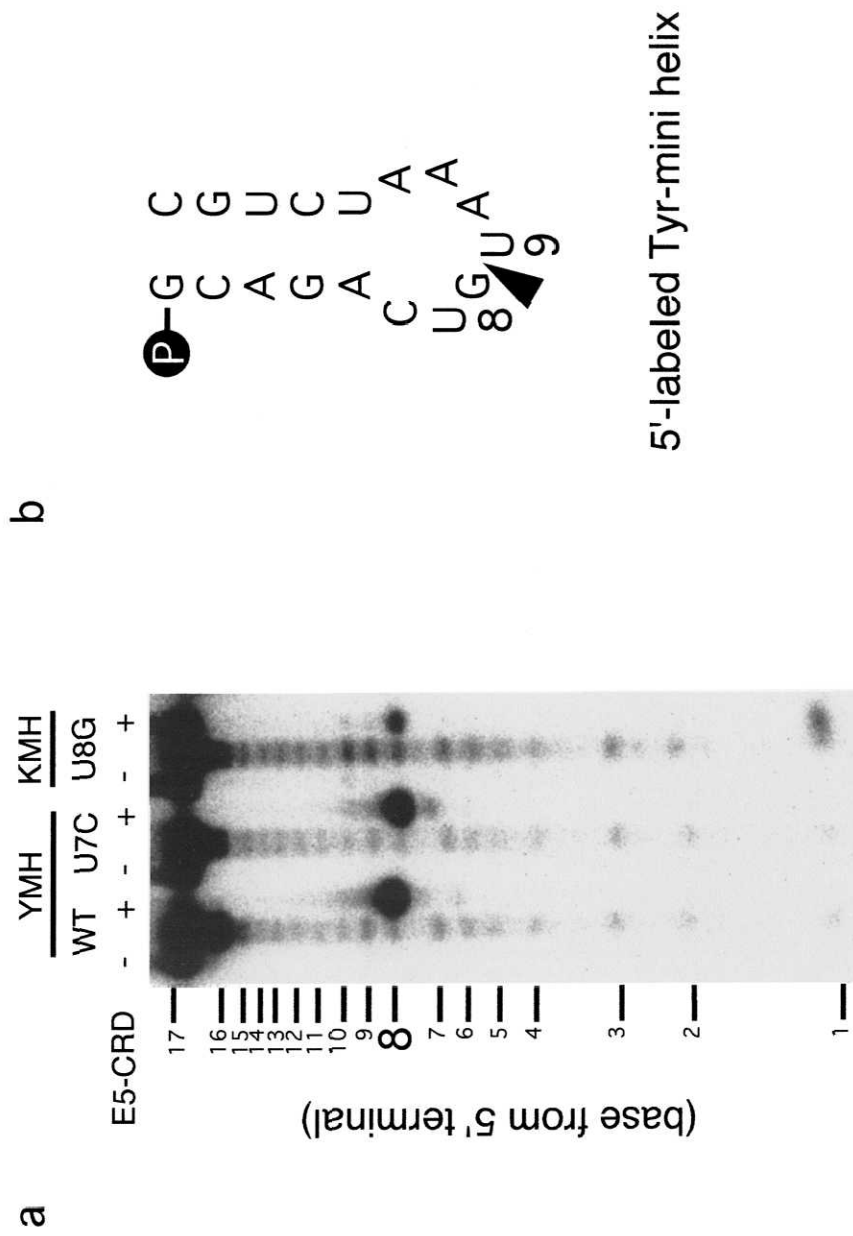


Fig. 4-2 E5-CRDによるmini helixの切断位置の同定

(a)E5-CRDによる、各mini-helixの切断位置をアルカリ加水分解ラダーとRNase T1ラダーを基に同定した。
 (b)YMHを元に、E5-CRDによる切断位置を示した(黒い矢印)。図中の数字は、5'末端からの塩基数を示し、また、5'末端の「P」は³²Pラベルされたリン酸基を表す。

端に 2', 3'サイクリックの形でリン酸基を残し、また、3'切断片の 5'末端は水酸基となることを示したが、今回はそこまで解析を行わなかった。

4.3.2 基質による切断効率の違いについて

全 tRNA を基質とした *in vitro* での切断実験の結果や、また Fig. 2-1 に見られる結果から、それぞれの基質により、E5-CRD の切断活性に対する感受性が異なることが想像される。つまり、E5-CRD には基質の「好み」があると思われる。そこで、この原因について調べた。まず、基質 tRNA の切断効率の違いを、同じ条件下で評価することを試みた。そのためには、個々の基質 tRNA を単離精製したものをを用いるのが最善であるが、tRNA の単離法は、固相化プローブ法⁹⁷⁾や HPLC 精製等、大変時間がかかる上に経験を要する。そこで、ここでは、4 種類の基質 tRNA のアンチコドンステム/ループに基づく minihelix を作製し、これを用いて比較を行った。基質の調製は、第三章と同様、*in vitro* 転写により行った。転写配列は 17 mer から成る native な配列ではなく、転写効率を上げるために 5'末端に GG をエキストラに付加した⁹²⁾。ここで調製された GGYMH, GGHMH, GGNMH, GGDMH(Fig. 4-3) は、それぞれ tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} のアンチコドンステム/ループ配列に基づく minihelix の 5'末端に GG が付加されたものを表す。これらの minihelix を E5-CRD と反応させ、切断感受性を反応進行度に基づいて比較した(Fig. 4-4)。その結果、切断感受性は、GGYMH>GGDMH>GGHMH>GGNMH となり、これは、Fig. 2-1 やこれまでの実験から、tRNA^{Tyr} と tRNA^{Asp} が特に切断を受けやすいとい

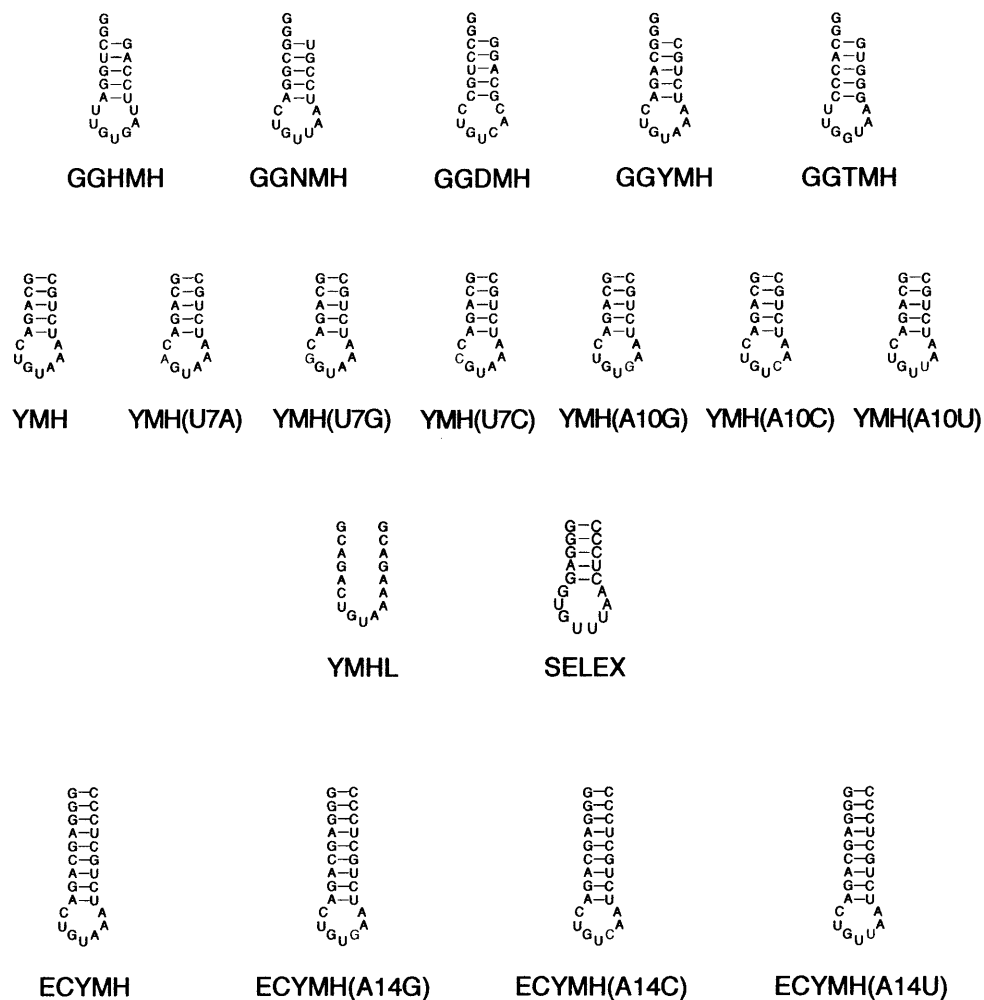


Fig. 4-3 実験に用いたminihelix

本章で用いたminihelixを示した。minihelixの名称は基本的にXMHとし、Xは対応するtRNAに結合するアミノ酸の一文字表記を表す。GGXMHは、転写の効率を上げるために本来のアンチコドンステム/ループの5'末端にGGをエキストラに付加したことを表す。尚、変異体に関しては、置換した塩基を赤色で示した。

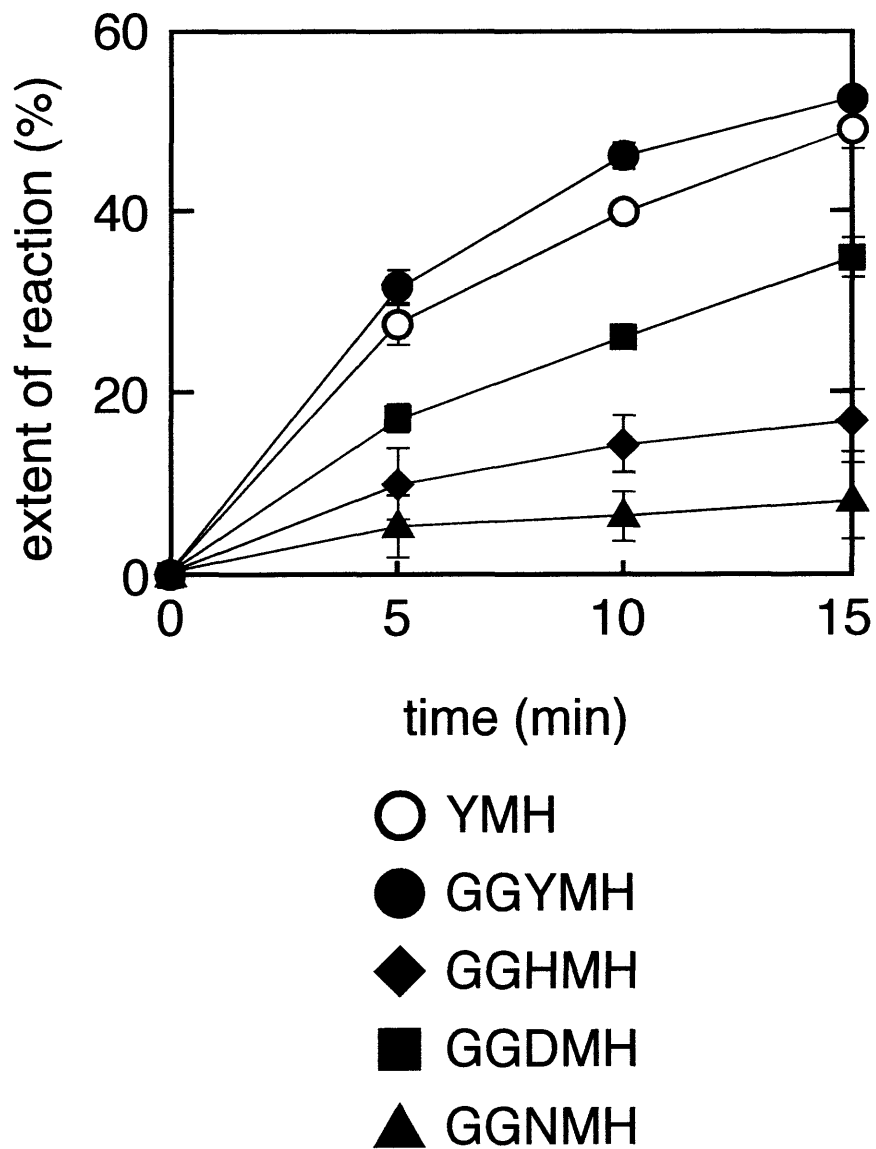


Fig. 4-4 基質tRNAに基づき作製したminihelixの切断感受性の比較

表中の誤差棒は、標準偏差を表す (Fig. 4-4~4-7, 4-9, 4-11においても共通)。

う結果とよく一致した。尚、GGYMH と YMH の反応進行度に大きな差は見られないことから、各 minihelix の 5'末端への GG の付加は切断効率に影響を与えないことが分かった (Fig. 4-4, ○ and ●)。よって、この切断効率の違いは、minihelix の配列、あるいは立体構造に基づくと言える。次に、認識される GU 配列の 5'あるいは 3'に存在する塩基を個々に置換し、これにより反応進行度がどのように変化するか調べた (Fig. 4-5 and 4-6)。Fig. 4-5 の結果より、GU の 5'側はプリン塩基よりピリミジン塩基である時に、E5-CRD に対して高い感受性を示した。尚、この位置の塩基は、大腸菌 tRNA に限っては全て U であり、また、天然の tRNA において、この位置がプリン塩基になることはごくわずかの例に限定されており、ほとんどの tRNA が C もしくは U である^{93),98)}。次に、Fig. 4-6 の結果より、GU の 3'側の塩基は A>C>G>U の順で切断に対する感受性が減少した。このことから、Fig. 4-1 において、KMH(U8G)の切断感受性が低かったことの原因として、KMH(U8G)の GU の 3'側の塩基が U であることが原因であることが考えられる。

4.3.3 tRNA^{Thr}の切断感受性について

アンチコドンループ内に GU 配列を持つ tRNA を大腸菌全 tRNA に対して検索した結果、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} 以外に tRNA^{Thr} も GU 配列を持つことが分かった。しかしながら、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} ではアンチコドン 1 文字目と 2 文字目に GU が存在するのに対し、tRNA^{Thr} では、アンチコドン 2 文字目と 3 文字目に存在する。そこで、tRNA^{Thr} が E5-CRD の基質となりえるかを調

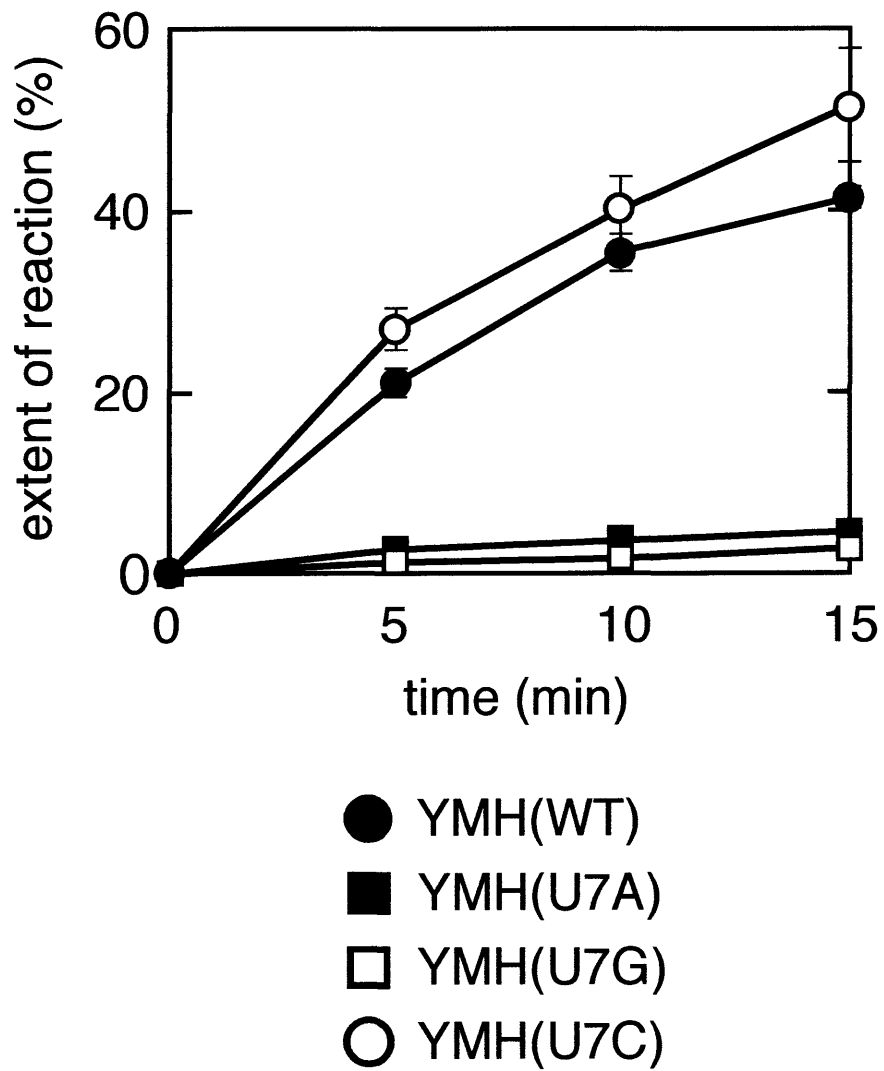


Fig. 4-5 YMHのU7変異体の切断感受性の比較

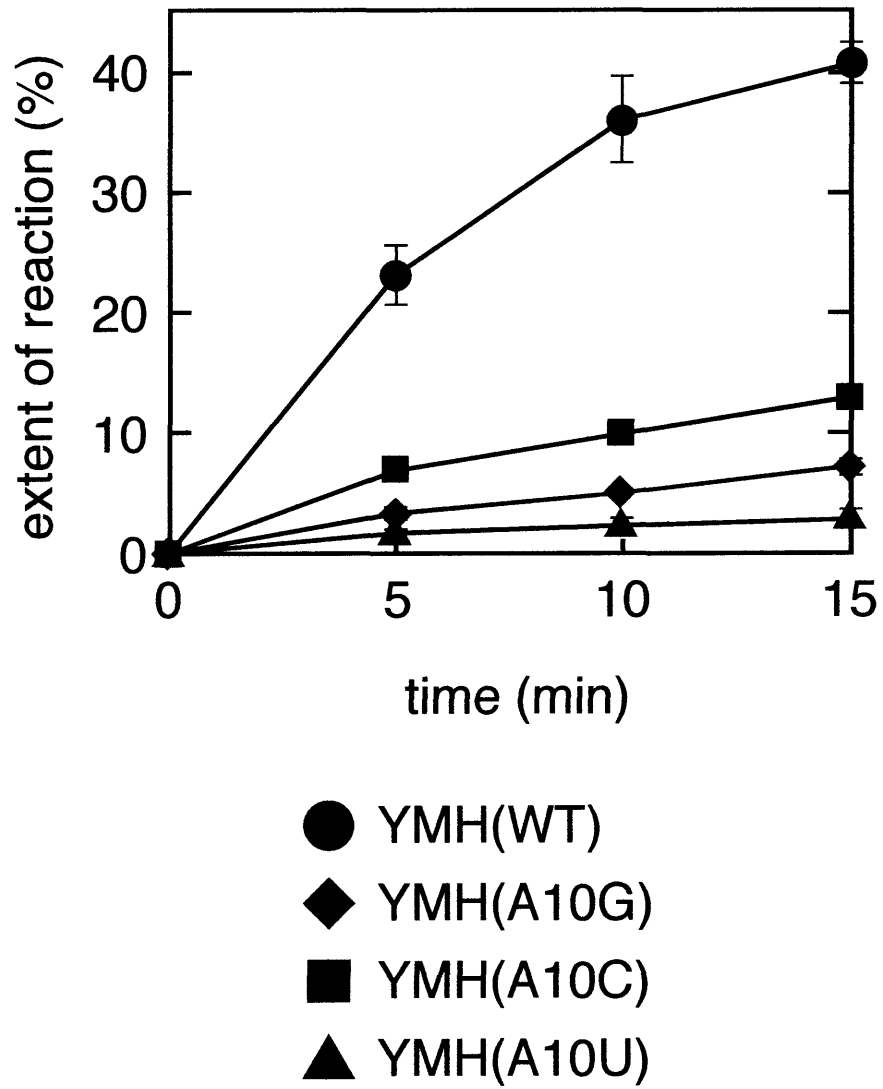


Fig. 4-6 YMHのA10変異体の切断感受性の比較

べるために、tRNA^{Thr}のアンチコドンステム/ループに基づいて minihelix を作製し、その反応進行度を YMH のものと比較した(Fig. 4-7)。尚、ここで作製した minihelix である GGTMH も、4.3.2 項で述べたのと同様、5'末端に GG を付加したものである。結果は、GGTMH は、YMH に比べ大変低い切断感受性を示した。GGTMH がこのような低い感受性を示すことの原因が、ループ内の GU の位置によるか、もしくは Fig. 4-5 で見られたような GU の 5'側の塩基の影響によるか(3'側の塩基は A であり、Fig. 4-6 の結果から切断感受性の低下の理由とは考えづらい)は断定出来ないが、他にも、U ターンなどのような、アンチコドンループの局所構造が関与する可能性も否定出来ない。仮に U ターンが認識に関与しているとする、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp}の GU 配列は、5'側に U ターンを含むが、tRNA^{Thr}内の GU 配列は U ターンから離れた位置にあり、可能性は十分考えられる。

次に、tRNA^{Thr}が切断を受けるかどうかを調べた。そこで、全 tRNA を E5-CRD と反応させ、ノザン解析により切断の有無を調べた(Fig. 4-8a)。その結果、tRNA^{Thr}は切断を受け、Fig. 4-7 の結果と矛盾しないことが分かった。しかしながら、コントロールに用いた tRNA^{Tyr}に比べ、tRNA^{Thr}の切断感受性はかなり低く、この点においても minihelix を用いた実験結果と一致した。次に、*in vivo*での切断の様子を調べるために、コリシン E5 を作用させた大腸菌から抽出した全 tRNA に対してノザン解析を行った(Fig. 4-8b)。すると、*in vitro*での実験結果とは異なり、tRNA^{Tyr}がよく切断を受けているのに対し、tRNA^{Thr}は全く切断されなかった。

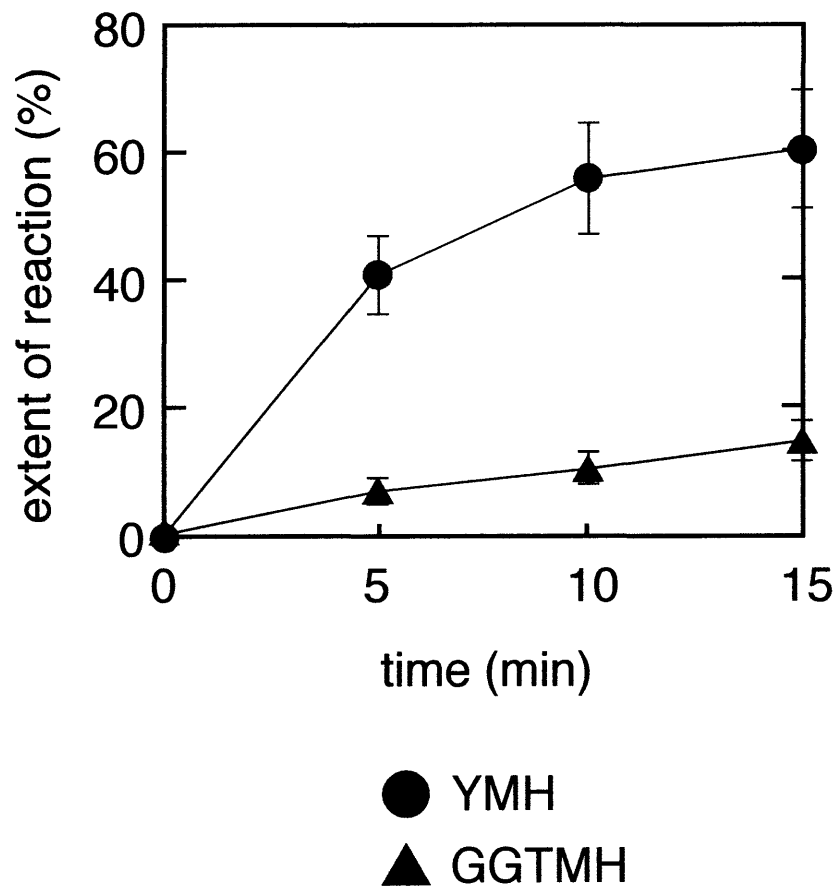


Fig. 4-7 YMHとGGTMHの切断感受性の比較

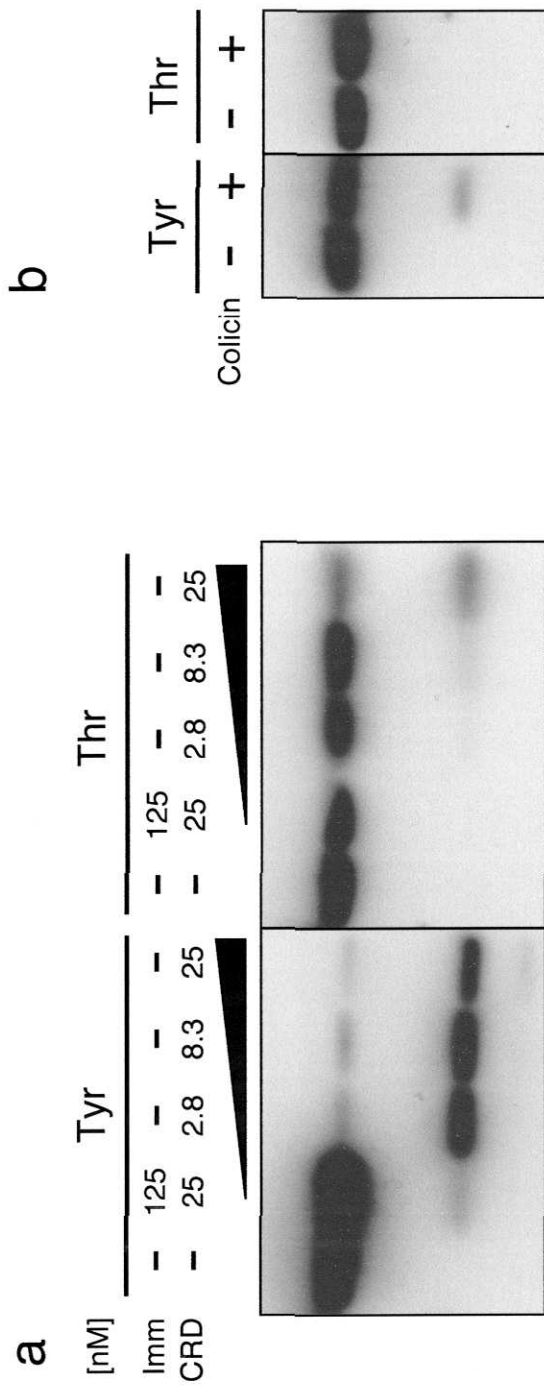


Fig. 4-8 tRNA^{Thr}のE5-CRDに対する切断感受性

- (a)大腸菌全tRNAをE5-CRDと反応させ、tRNA^{Tyr}またはtRNA^{Thr}に対応するプローブを用いてノザン解析を行った。
- (b)コリシンE5/ImmE5複合体を作用させた大腸菌より抽出した全tRNAに対し、(a)と同様にノザン解析を行った。

4.3.4 E5-CRD の活性を阻害する RNA 分子について

平尾一郎博士らのグループとの共同研究により、E5-CRD の活性を阻害する RNA 分子を *in vitro* selection 法により取得することを試みた。*in vitro* selection 法とは、RNA のランダムプールの中から、あるタンパク質に強く結合する分子を選択、濃縮する方法である。使用した E5-CRD としては、野生型の他に、活性中心候補の一つである N 末より 33 番目の Arg を Gln に変異させた変異体 E5-CRD(R33Q)も用いた。本実験においては、毎ラウンドごとにランダム変異を導入することは行っていないため、初発の RNA のランダムプールのデザインが大変重要である。そこで、以下の二種類の RNA ランダムプールを用いた。

(1)30 ヌクレオチドからなるランダム配列を含む RNA プール

(2)GU を中心とし、5'および3'方向に 15 ヌクレオチドからなるランダム配列を含む RNA プール

野生型 E5-CRD に対しては(1)のプールを用い、6 ラウンドの濃縮を行った。この中から 43 クローンのアプタマーを取得した。これらのアプタマーは、それぞれ 0~1 個の GU 配列を含んでおり、また、いくつかのファミリーに分類することが出来た。このうち、E5-CRD の活性を強く阻害する分子(W35)の二次構造を調べた結果、GU 配列がステムの中に存在していることが分かった。E5-CRD(R33Q)に対しては(2)のプールを用い、7 ラウンドの濃縮を行った。この中から 39 クローンのアプタマーを取得した。これら 39 クローンのうち、27 クローンには、共通配列(GUGUUUAA)

のループからなるヘアピン構造が見られた。また、この配列を含むアプタマーを野生型 E5-CRD と反応させることにより、GU↑GUUUAA の位置で切断されることが分かった。Primary な切断部位が G↑UGUUUAA でないことの原因として、1番目と2番目の塩基からなる GU においては、1番目の G がステムのちょうど根元にあたり、構造変化に対する自由度が少ないため、E5-CRD が活性中心にかみ込むのに不自由になるためであると想像している。

4.3.5 基質の立体構造と切断感受性との関連性について

これまでの実験結果から、E5-CRD の基質認識には、基質 RNA の構造が大きく影響を与えていることが考えられた。そこで、YMH、および YMH のステム部分を、塩基の対合が出来ないようにデザインした直鎖状の minihelix (Fig. 4-3; YMHL) を作成し、E5-CRD と反応させた時の反応進行度を YMH のものと比較することにより、基質の構造が切断感受性に与える影響について調べた (Fig. 4-9)。その結果、YMHL の切断感受性は、YMH より低下しており、初速度にして YMH のおよそ半分程度であった。YMH と YMHL との切断感受性の差は、もっと大きいものであると予測していたが、実際はそれほど差のあるものではなかった。

YMH のステムは、5個の塩基対から成るが、文献 (99) から、今回のアッセイの反応温度である 37°C においては、50%以上が完全なステム構造をとっていない変性状態にあることを示唆する報告があった。そこで、ステムを長くすることにより、37°C において YMH より安定的にステム構造を取る ECYMH (Fig. 4-3) を *in vitro* 転写に

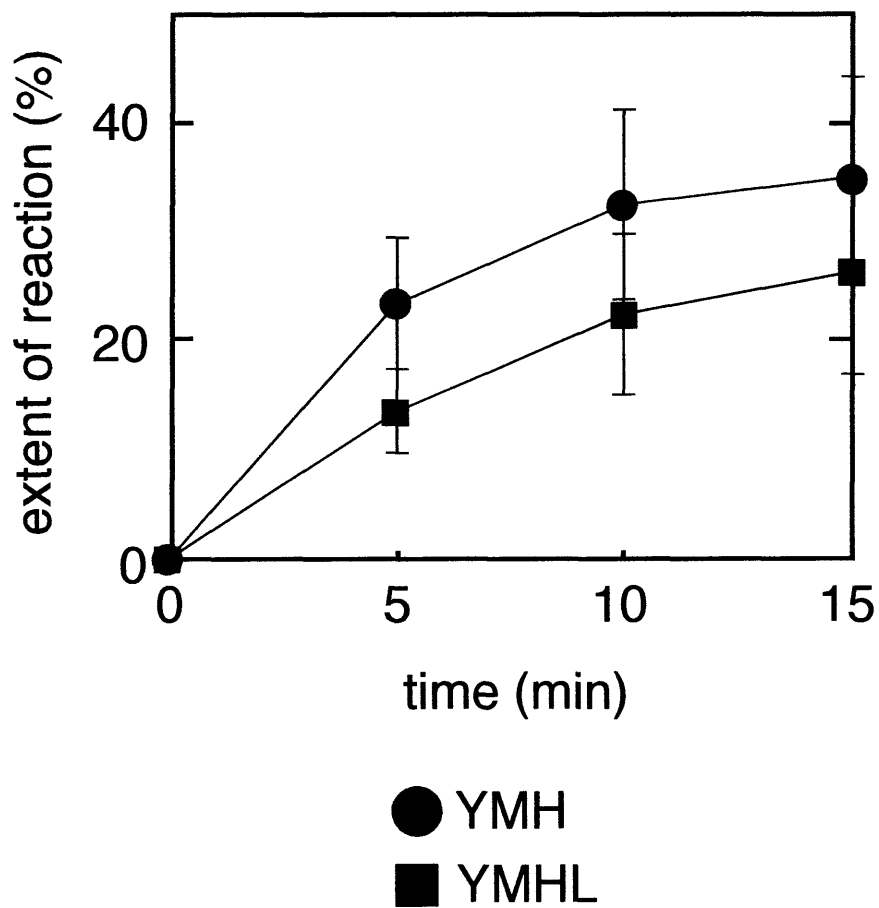


Fig. 4-9 立体構造に依存した切断感受性の比較

TMHのループ配列を持ち、ステム構造をとらないように設計した直鎖状RNA(YMHL)の反応進行度を、野生型のものと比較した。

より調製し、以下の実験を行った。Fig. 4-10 は、YMH, ECYMH を、それぞれ温度を変えて E5-CRD と反応させ、一定時間当たりの反応進行度を比較したものである。YMH は、温度を 25℃から 37℃へと上げると、若干ではあるが反応進行度が低下した。この結果は、37℃において変性、つまりステム構造がゆるんだ YMH の量が増加するために全体的な切断感受性が低下したと思われる。これに対し、ECYMH では、25℃から 37℃へと温度を変化させても、反応進行度に全く変化は見られなかった。このことから、ECYMH は、37℃においても安定してステム構造を維持していると思われる。本章の全てのアッセイは 37℃で行っているが、Fig. 4-10 の結果を考慮すると、今回の実験で用いた minihelix は、一部が変性している等、構造的に不均一であると思われ、そのために結果を見誤ってしまっている可能性も考えられた。そこで、ECYMH をもとに、アンチコドン 3 文字目を置換した minihelix を基質として、Fig. 4-6 と同様の実験を行ったが、両者の実験結果にそれほど差違は見られなかった(Fig. 4-11)。これより、本章の実験結果に対する解釈は、本質的には間違っていないと判断した。

4.3.6 E5-CRD による deoxy minihelix の認識について

E5-CRD が基質の塩基に依存した認識をするのであれば、全てをデオキシリボヌクレオチドで合成した deoxy minihelix も認識出来ると思われる。そこで、YMH の配列を全てデオキシリボヌクレオチドで合成した dYMH を用いて、YMH に対する競合阻害実験を行った。YMH:dYMH をそれぞれ 4:1, 2:1, 1:2.5, 1:5 の比で反応

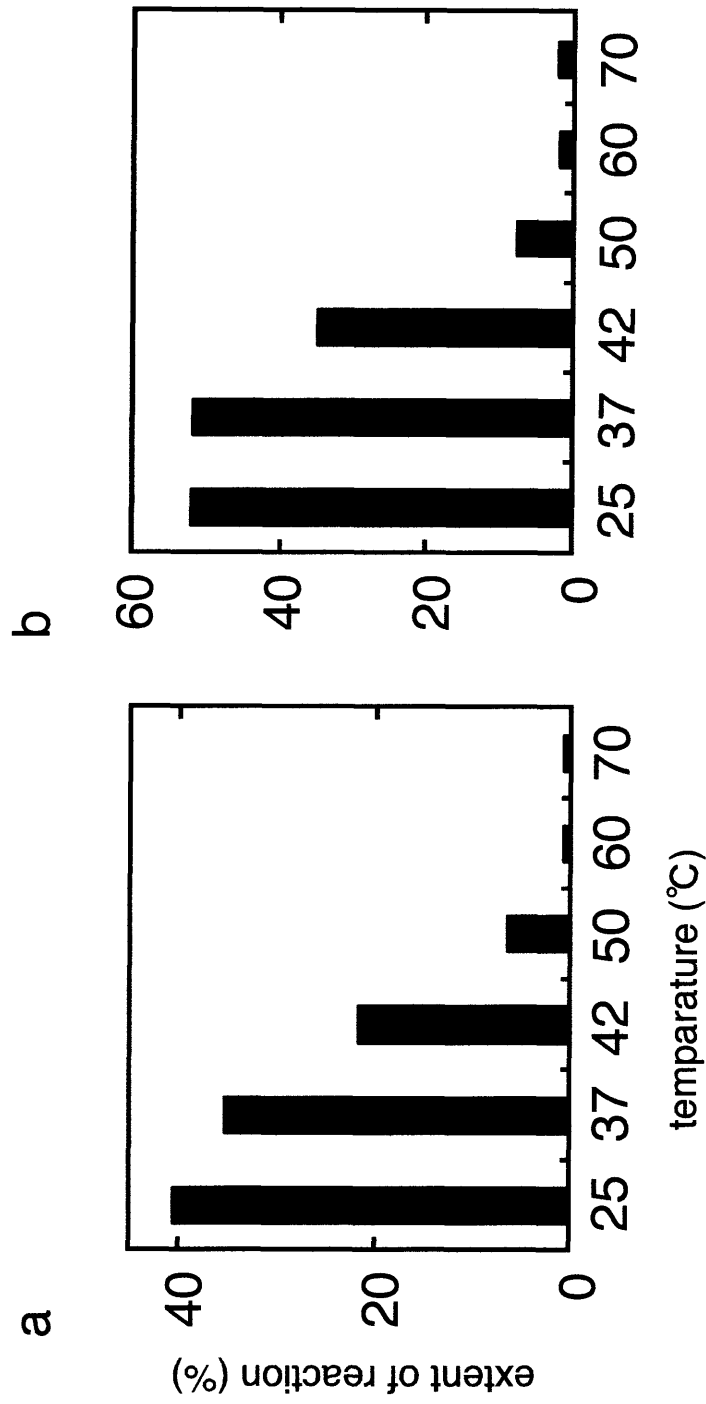


Fig. 4-10 ステム構造の安定性と切断感受性

YMH(a)およびECYMH(b)を基質とし、様々な温度条件でE5-CRDと反応させ、切断感受性の違いを反応進行度に基づいて比較した。

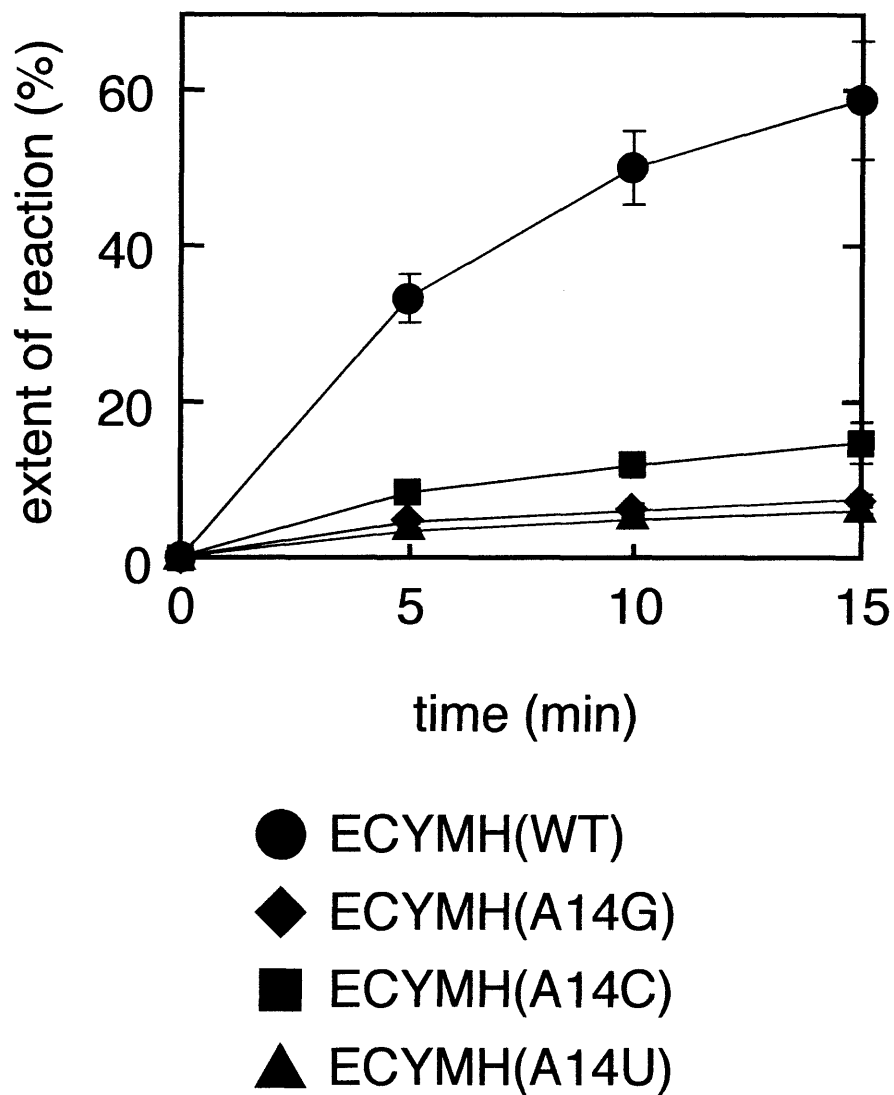


Fig. 4-11 ECYMHのA14変異体の切断感受性の比較

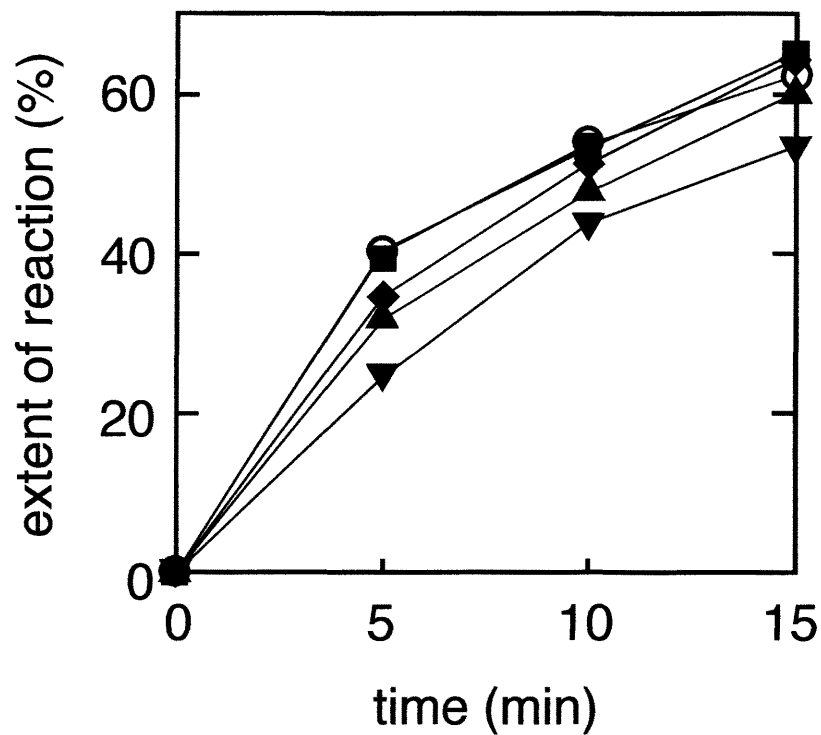
ECYMHを用いて、Fig. 4-6と同様の実験を行うことにより、ステム構造の安定性が実験結果に影響を与えるか調べた。

液中に添加し、YMH の反応進行度の変化を経時的に追跡した(Fig. 4-12)。YMH:dYMH=4:1 の比で dYMH を添加しても、添加しない場合とほぼ同じ反応進行度を示した。YMH:dYMH=2:1 で添加すると、若干ではあるが、YMH の反応進行度の低下が見られた。更に dYMH の濃度を増加させることにより、これに相関して反応進行度が低下した。そして、dYMH を一番高濃度に添加した YMH:dYMH=1:5 という条件下で、YMH の反応初速度はおよそ 50%にまで低下した。これより、dYMH は、E5-CRD により認識されることが分かった。実際、E5-CRD と基質との共結晶構造解析において、基質アナログとして、デオキシリボヌクレオチドで合成したジヌクレオチドを用いているが、この共結晶構造に見られる基質の結合様式は、これまでの生化学的実験結果を説明するのに十分であることから、デオキシリボヌクレオチドも E5-CRD により正しく認識されると考えられる。

4.4 考察

4.4.1 E5-CRD の認識特異性について

本章の結果より、E5-CRD は基質 tRNA のアンチコドンループ内に存在する QU もしくは GU 配列を認識することが明らかになった。これまで見つかっている RNase は、例えば RNase A や T1 などのように 1 塩基認識のものや、tRNA のプロセッシングに関与する RNase などのように特定の配列を認識、切断するものであった¹⁶⁾。一方、E5-CRD は 2 塩基を認識しており、その点において新規の RNase である。



YMH:dYMH= 4:1 ■
 2:1 ◆
 1:2.5 ▲
 1:5 ▼
 control ○

Fig. 4-12 YMHに対するdYMHの競合阻害実験

YMHの濃度を固定し、それに対し、dYMH(YMHと同じ配列であり、全てデオキシリボヌクレオチドで作成した。尚、YMHのUはdYMHではTとなっている)を濃度を変えて反応溶液中に添加し、反応進行度の変化を調べることにより、dYMHのYMHに対する競合阻害の様子を観察した。

しかしながら、単純に2塩基しか認識しないのであるならば、何故、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp}に対してこれほど高い特異性を示すか、という点に疑問が生じる。これについては、やはり tRNA のアンチコドンループ構造に特異的な要因があるように思われるが、実験的な裏付けはまだ行われていない。

4.3.2 項の結果から、GGYMH>GGDMH>GGHMH>GGNMH の順で切断に対する感受性が低下していたが、これら minihelix の GU 配列の 3'側の塩基、つまりアンチコドン3文字目に相当する塩基は順に A, C, G, U である。一方、Fig. 4-6 の結果より、YMH(WT)>YMH(A10C)>YMH(A10G)>YMH(A10U)の順に切断に対する感受性の低下が見られたが、ここにおいても、アンチコドン3文字目は順に A, C, G, U である。これらの結果だけで断定することは出来ないが、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} の間に見られる切断効率の違いが、アンチコドン3文字目の塩基の違いに由来することも考えられる。ところで、野生型 YMH に対する YMH (A10C) の反応進行度の差(Fig. 4-6 ● and ■)が、GGYMH に対する GGDMH の反応進行度の差(Fig. 4-4 ● and ■)に比べ、かなり大きくなっている。この理由としては、Fig. 4-6 の実験は全て YMH を基本構造として、これに対して変異を導入したものをを用いているため、YMH(A10C)には、アンチコドン3文字目の塩基の効果に加え、この変異導入による負の効果も影響しているのではないかと考えている。

GU の両側の塩基が切断効率に影響を与えることから、これらの塩基に対するサブサイト構造が存在することが考えられるが、本章の結果だけでは判断することは出来ない。tRNA 分子間では高度に保存されている塩基が存在し、これらの塩基は

周辺構造の形成、安定化に関与していることが知られているが、このことを考慮すると、4.3.2 項の結果に対する解釈も一通りではなくなるからである。例えば、GU の 5'側の塩基がプリン塩基ではなく、ピリミジン塩基であることが切断効率の上昇につながるという結果も、この位置の塩基がピリミジン塩基であることが、「E5-CRD の塩基の認識に好都合」であるのではなく、「切れやすいループ構造の形成に好都合」であったと解釈することも出来るであろう（後者の解釈では、GU の 5'側の塩基は、E5-CRD とは直接的には相互作用していないとする）。事実、GU の 5'側の塩基、つまり 33 位の塩基は、tRNA のループ構造において見られる、いわゆる「U ターン構造」^{100),101)}の形成に関与しており、tRNA のアンチコドンループの形成において重要とされる。E5-CRD のサブサイトに関しては、第五章において詳細に検討する。

さて、コリシン E5 が特異的に切断する tRNA は、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} に本当に限定されるのであろうか？他に切断を受ける可能性のあるのは tRNA^{Thr} であるが、4.3.3 項の結果より、少なくとも *in vivo* では切断されない。しかしながら、Fig. 4-8a では、tRNA^{Thr} は *in vitro* で切断を受けており、本質的には E5-CRD により切断可能である。ただし、*in vitro* での反応条件は pH 8.5 としており、E5-CRD の至適条件には近いが、当然ながら生理的条件からかけ離れている。従って、この結果は大腸菌細胞内での現象を反映しているとは言えない。こうした結果を考慮すると、E5-CRD は潜在的には tRNA^{Thr} を切断出来るが、大腸菌細胞内での生理的 pH 環境により、切断出来ないということが考えられる。このことを更

に一般化し、次の様に考えている。コリシン E5 は前述の 4 種類の基質 tRNA のみを認識しているのではなく、それぞれ親和性の違いはあるが、GU 配列を含む他の RNA 分子種 (mRNA も含む) も認識出来る。しかしながら、生理的環境下では pH 条件により切断される基質が限定され、結果的に tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} だけがコリシン E5 の基質となっているというものである。尚、前述の通り、16S-rRNA の 3'末端から数えて 48 番目と 49 番目の位置 (コリシン E3 の切断部位より 1 塩基分、3'側にずれている) に GU 配列が存在し、この位置は *in vitro* では E5-CRD に対して高い感受性を示す¹⁵⁾。しかし、*in vivo* では全く感受性を示さないことも、上記の様なことが原因であると思われる。

今回の実験結果から見ると、GGTMH の感受性は極端に低いものではなかった。Fig. 4-4 と Fig. 4-7 とを比較すると、GGTMH の感受性は、少なくとも GGNMH と同等であるように思われる。しかしながら、*in vivo* で tRNA^{Asn} は切断されるのに対し、tRNA^{Thr} は切断されない。我々は、大腸菌全 tRNA を高 pH 条件下で E5-CRD と反応させると、低濃度の E5-CRD では本来の切断部位であるアンチコドンループでの特異的切断が見られるが、E5-CRD の濃度を上げていくと、アンチコドンループ以外の GU 配列でも切断が起こるという実験結果を得ている。一方、中性域の pH 条件では、このような現象はほとんど見られない。こうしたことを考慮すると、*in vitro* での tRNA^{Thr}、もしくは GGTMH の感受性が予想以上に高い理由として、高 pH 条件下での認識の特異性低下、もしくはアルカリ加水分解により、RNA 自身の切断に対する感受性が上昇することにより、結果的に、GU 配列を持つてはいるが生理

的条件下では切断されない RNA も切断され易くなってしまふのではなからうか。

4.4.2 *in vitro* selection 法により取得した RNA 分子の意義について

4.3.4 項において、E5-CRD(R33Q)に特異的に結合する RNA 分子の共通配列は GUGUUUAA であったが、これは tRNA^{Asn} のループ配列に大変酷似している。大きく異なる点として、天然の tRNA のループが 7 残基からなるのに対し、今回取得したアプタマーでは、ループが 8 残基からなることである。tRNA のアンチコドンループを形成する 7 つの塩基のうち、アンチコドン以外の塩基の特徴は以下の通りである。まず、1 番目の塩基 (32 位) はピリミジン、2 番目の塩基 (33 位) は前述の U ターンを形成するのに必要とされる U が大部分を占める。そして、6, 7 番目の塩基 (37, 38 位) はプリンとなっており、それぞれの 66%, 78%が A である。GUGUUUAA 配列は、tRNA に見られるこうした特徴もよく満たしているが、塩基の数が異なることから、一次配列の上で似ていたとしても、構造的には全く異なることも考えられる。これらの実験は現在も進行中であり、この結果をもってして、E5-CRD が tRNA のループ構造を好むと判断することは出来ない。また、*in vitro* selection 法は、目的のタンパク質と安定的に結合する RNA を選択するため、RNase 等のように、結合すべき RNA を分解する酵素を用いて選択を行った場合、単に強い親和性を持つ RNA が濃縮されてくるとは思えない。濃縮された RNA は、親和性が高いことに加え、RNase による分解を受けづらい配列、もしくは構造を持つ必要があるであろう。今回用いた E5-CRD(R33Q)は、極めて低いながらも RNase 活性を

残していることから、今回得られたアプタマーは E5-CRD にとって最適な基質とはならないと思われる（もっとも、平尾博士の実験は、E5-CRD に対する RNA インヒビターの取得が第一目標であり、今回の結果は、本来の目標を十分に達成している）。実際、この共通配列に基づいた minihelix を作製し(Fig. 4-3; SELEX)、YMH をコントロールとして反応進行度を比較したが、今回の反応条件では、YMH は良好な切断反応の進行が見られるのに対し、SELEX は全く切断されなかった。尚、この配列は、本質的に切断を受けないのではなく、野生型 E5-CRD により切断されることは前述の通りである。この SELEX の切断感受性が低い理由については、詳細に解析を行っていないため、現段階は分からない。しかしながら、GU 配列の 3'側の塩基が U であることに加え、SELEX のループが 8 残基から成ることが原因ではなかろうか。