

## 第五章 E5-CRD の基質認識の反応速度論的解析

### 5.1 緒言

第四章において、E5-CRD の基質認識について検討した結果、GU が認識に必須であることが明らかになり、更に、GU の両側の塩基が、基質の切断感受性に影響を与えることが示された。さて、酵素と高分子基質との相互作用を考える上で、「サブサイト」<sup>102)</sup>という概念は無視出来ない。サブサイトとは、基質を構成する個々の単位と結合する酵素側の単位のことであり、こうした単位の組み合わせにより活性中心が構成される酵素の様子が、アミラーゼやリボヌクレアーゼにおいて、生化学的実験<sup>103)</sup>や X 線結晶構造解析<sup>104),105)</sup>より明らかにされている。GU の両側の塩基が切断感受性に影響を与えることは、E5-CRD が、これらの塩基に対するサブサイト構造を持つからではなかろうか。そこで、本章では、様々なオリゴヌクレオチドを用いた E5-CRD の反応速度解析を中心に、E5-CRD による基質認識メカニズムを、サブサイトの概念を考慮した上で、更に詳細に検討した。

### 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

本章で用いたオリゴヌクレオチドは GENSET 社(Paris, France)、もしくは Dharmacon Research 社(Colorado)に合成を依頼した。また、GpUp のみ、Sigma

社から未精製品を購入し、HPLC にて精製した。精製には、逆相カラムである Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mmI.D.) (GL サイエンス株式会社) を用いた。バッファーには 100 mM トリエチルアミン溶液(pH 7.0) (WAKO)を用い、アセトニトリルによるグラジエントにより溶出した。また、解析に際しては、より短い長さのカラム(150 mm×4.6 mmI.D.)を用い、解析時間の短縮化を図った。尚、オリゴヌクレオチドの記載に関しては、例えば GpU は”Guanylyl (3'→5') Uridine”を、GpUp は”Guanylyl (3'→5') Uridine 3'monophosphate”を表す。また、3'末端リン酸基の有無を特に明示しない場合は単に「GU ジヌクレオチド」と表記する。オリゴヌクレオチドを用いた実験の反応溶液の組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM 塩化ナトリウム, 100 µg/ml BSA とし、反応温度は基本的に 37℃で行った。E5-CRD の希釈には、20 mM リン酸バッファー(pH 7.0), 100 µg/ml BSA を用いた。BSA は、E5-CRD のエッペン等に対する非特異的吸着を防ぐ目的で用いた。

### 5.2.2 差吸収スペクトルに基づく反応速度論量の測定

GpUp を基質とし、GpUp が 2',3'-cGMP と 3'-UMP とに分解される時の波長 275 nm の吸光値の増大に基づき反応進行度を測定した。尚、実際の計算は $\Delta\epsilon=1150$

( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ )として行った ( $\epsilon$ はモル吸光係数を表す)<sup>106)</sup>。吸光値の測定には、DU-65 Spectrophotometer (Beckman)を用いた。反応液の組成は 5.2.1 項で述べた通りであり、反応温度のみ 25℃で行った。これは、文献 106)における GpUp のモル吸光係数が 25℃で測定されているからである。基質は 21~78 µM、酵素濃度は 276~322

pM とし、反応液 1 ml を石英キュベットに入れた後、25℃に保温した。これに対し、20  $\mu$ l の E5-CRD 溶液を添加し、パラフィルムで軽くフタをしてから 2 回倒置混和した後、分光光度計にセットして反応および測定を開始した<sup>107)</sup>。系時的に反応進行度を追跡し、初速度を求めた。 $k_{cat}$  および  $K_m$  は、 $[S]_0 - [S]_0/v$  プロットに基づいて計算した<sup>108)</sup> ( $[S]_0$ ; 基質初濃度、 $v$ ; 初速度)。

### 5.2.3 HPLC を用いた反応速度論量の測定

反応液の組成および E5-CRD の希釈方法は 5.2.1 項で述べた通りであり、反応液の体積は 200  $\mu$ l とした。基質の絶対量が少なかったために、ApGpUpA のみ反応液体積を 100  $\mu$ l としたが、反応体積の違いは、反応進行度に影響を与えなかった。用いた基質の量はそれぞれ以下の通りである。GpUp; 6~145.5( $\mu$ M), UpGpU; 12.8~770( $\mu$ M), UpGpUp; 25.4~254.0( $\mu$ M), GpUpA; 36.0~228( $\mu$ M), UpGpUpA; 37.1~307.4( $\mu$ M), ApGpUpA; 30.6~275.4( $\mu$ M)。また、用いた酵素量は 304.9~1524.4(pM)とした。次に、実際の手順について述べる。希釈した E5-CRD を 3  $\mu$ l 添加することにより反応を開始すると同時に、反応液を 90  $\mu$ l サンプルングし、あらかじめエッペンに準備しておいた 30  $\mu$ l の 100%酢酸と混和し、反応を停止させた。Fig. 3-1 より、E5-CRD の至適 pH 条件はアルカリ側に偏っているため、酸性条件下では全く反応が進行しないので、この操作により E5-CRD の切断活性が完全に停止する。引き続き反応進行度が 1~2 割の、反応時間と反応産物の生成量とが比例関係にあるところまで反応させた後、反応開始時と同様にサンプルングした。これら

のサンプルを、直接逆相カラム(Inertsil ODS-3(150 mm×4.6 mmI.D.))にかけ、解析を行った。HPLC には、D-6500 系三次元クロマトシステム(HITACHI)を用いた。初速度は、反応開始直後の未反応基質のピーク面積と、反応を開始してからおよそ 10～15%の反応進行度の時の未反応基質のピーク面積との比較により算出した。また、毎回の測定に際して  $[S]_0 - [S]_0/v$  プロットを作成し、実験結果の妥当性を評価した。実際の速度論量の算出は以下の方法をとった。 $[S]_0$  値に対して  $[S]_0/v$  値が無限である時に、 $[S]_0/v$  のばらつきの程度が全て同じであると仮定し、最小二乗法により  $[S]_0$  に対する  $[S]_0/v$  の予測値を算出し、この予測値と実測値との残差を求め、これら全ての残差の標準偏差を求めた。そして、各  $[S]_0$  値に対する残差の絶対値が、算出した標準偏差の絶対値を上回るものを棄却した<sup>109)</sup>。こうして、少なくとも 16 点選び、Cleland のソフトウェアを用いて各反応速度論量を算出した。

YMH を基質とした時の反応速度解析は、当研究室の井上が分担した。尚、この時のアッセイ、および反応進行度の解析は第四章に準ずる。

## 5.3 結果

### 5.3.1 E5-CRD によるジヌクレオチドの認識

E5-CRD の基質認識には GU のみで十分であるか調べるために、GU ジヌクレオチドを基質として E5-CRD と反応させ、切断の有無を調べた。このジヌクレオチドが認識、切断されるのであれば、この基質アナログを用いることにより、E5-CRD

と基質との共結晶構造解析に用いる等の利用法が考えられる。事実、様々な RNase において、低分子基質アナログとの共結晶構造解析が行われており、例えば RNase T1 に関しては、特異的阻害ヌクレオチド(2'-GMP)<sup>110),111)</sup>、生成物ヌクレオチド(3'-GMP)<sup>112)</sup>、また、グアノシンの 2'-OH をフッ素に置換した合成ジヌクレオチド(GflpA, GflpU)<sup>113)</sup>との共結晶が取得されており、反応触媒や基質認識機構の解明に役立っている。まず、GpU, GpUp が E5-CRD により切断を受けるか調べた。また、G, U それぞれのピリミジン塩基を別のピリミジン塩基へ、プリン塩基を別のプリン塩基へと置換した GpC, GpCp, ApU, ApUp、G と U の位置を逆にした UpG, UpGp に対しても同様に実験を行った。Fig. 5-1 は、反応産物を逆相カラムにより解析したチャート結果である。切断を受けた場合、"control"のチャートとは異なる位置にピークが現れる。結果は、GpUp を E5-CRD と反応させた時に、反応前とは異なる保持時間の位置に二つのピークが見られた。すなわち、GpUp は E5-CRD により切断を受けることが明らかとなった。予想外だったことは、今回の条件では GpU の切断が見られなかったことである。このことから、U の 3'リン酸基は基質認識、もしくは反応触媒に何らかの形で関与していることが考えられる。

### 5.3.2 GpUp と E5-CRD との反応生成産物の解析

E5-CRD により切断を受けた GpUp の生成産物の同定を行った。tRNA を基質とした時の反応生成物を解析した結果<sup>15)</sup>から、GpUp を基質とした場合に生じると予想される生成産物は、2'3'-cGMP と 3'-UMP である。そこで、これらと、生成産物

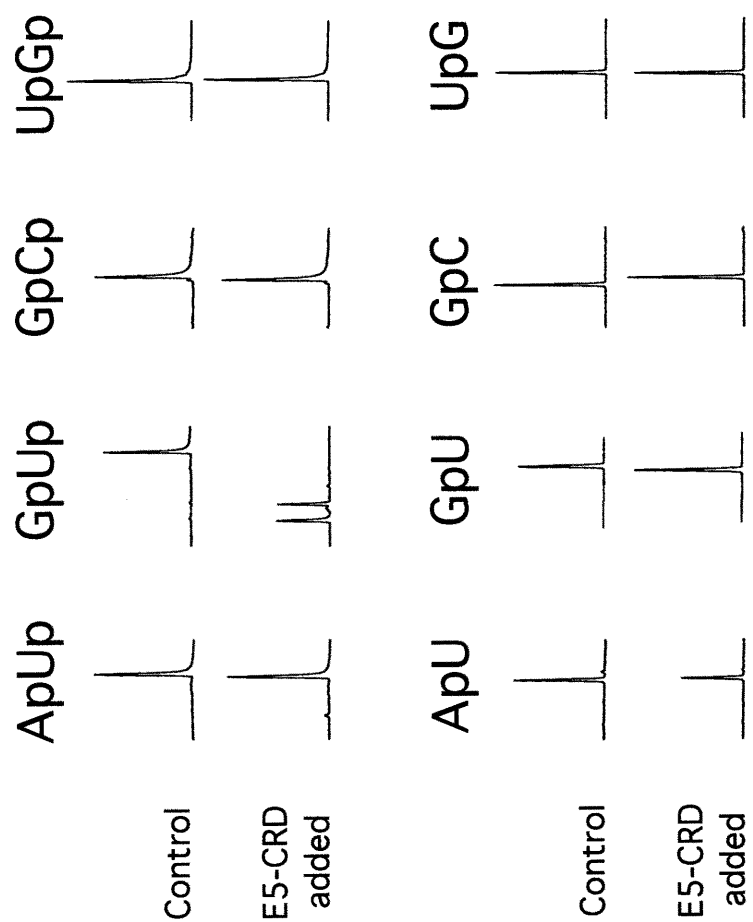


Fig. 5-1 様々なオリゴヌクレオチドとE5-CRDとの反応

様々なオリゴヌクレオチドをE5-CRDと反応させ、反応前と反応後の溶液を逆相クロマトグラフィーにて解析した。"Control"は、反応前の基質を、"E5-CRD added"は、反応後の生成物（分解を受けない場合は反応基質と同一）を表す。各オリゴヌクレオチドごとに、"Control"と"E5-CRD added"とのチャートの横軸の保持時間が一致するように並べた。

とのカラム内保持時間を比較した。また、一般的な RNase の様に、第二段階まで反応が進行した場合に生じる 3'-GMP の保持時間とも比較を行った。この実験に際して、逆相カラムによる保持時間の再現性に若干問題があることに加え、2'3'-cGMP と 3'-UMP の保持時間がかかなり近接していることから、別々に求めた保持時間では、正確な比較が出来ないと思われた。そこで、2'3'-cGMP, 3'-UMP, 3'-GMP を別々に GpUp 反応産物に加え、同時にカラムにアプライした。生成産物が 2'3'-cGMP, 3'-UMP, 3'-GMP のいずれかと一致した場合、そのピークの高さが大きくなることから判別可能である。Fig. 5-2 より、保持時間の小さい方のピークが 3'-UMP であり、大きい方のピークが 2'3'-cGMP であることが分かった。

### 5.3.3 GpUp を用いた E5-CRD の反応速度論量の pH 依存性

Fig. 3-1 において、minihelix を基質として反応進行度を測定することにより E5-CRD の pH プロファイルを求めた。しかしながら、反応進行度は基質との親和性や酵素活性等、様々なファクターの総和であり、一般的に反応進行度の比較だけで酵素の反応を定量的に議論することは難しい。そこで、各 pH 条件における反応速度解析を行うこととした。しかしながら、minihelix を基質とした反応速度解析は、基質の大量調製に困難を要した。そこで、ここでは 5.3.1 項より E5-CRD による切断を受けることが明らかになった GpUp を基質に用いることにした。ジヌクレオチドを用いた反応速度解析では、反応基質の分解により反応溶液の吸収が増大することに着目した差吸収スペクトル法を適用することが出来る<sup>114)</sup>。この方法の利点は、

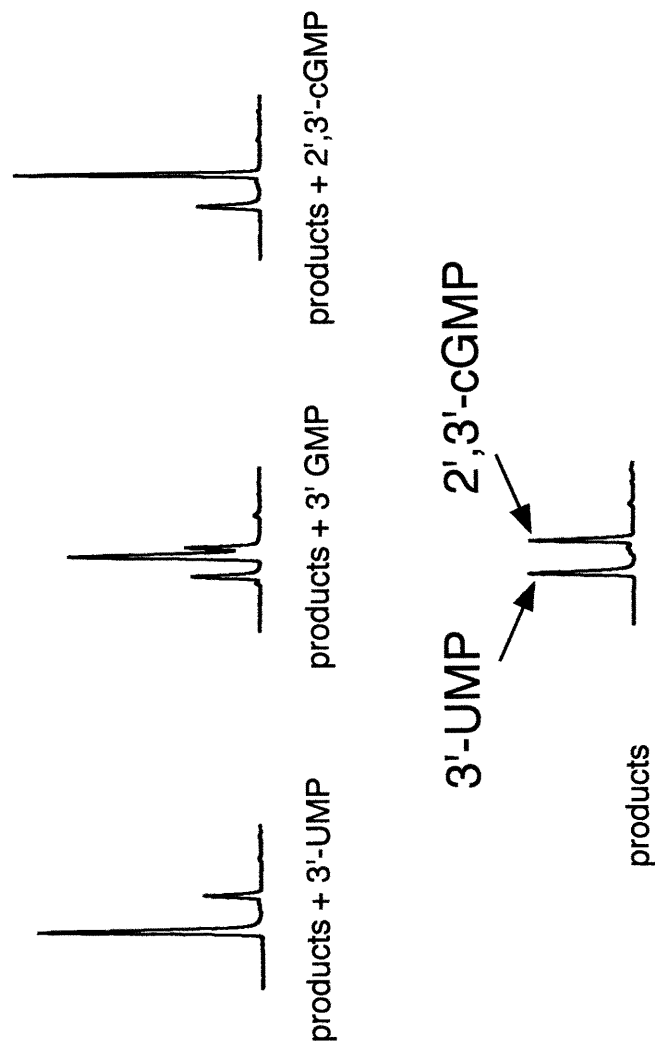


Fig. 5-2 GpUpをE5-CRDと反応させた時の生成物の同定

E5-CRDとGpUpとを反応させた溶液に対し、それぞれ3'-UMP, 3'-GMP, 2',3'-cGMPを加え、逆相クロマトグラフィーにて解析した。



一定時間間隔で吸光値を測定することが可能な装置（経時的に測定出来る分光光度計等）があれば、石英キュベットの中で反応を開始させるだけで、自動的に反応進行度を測定することが可能である。欠点としては、測定機器の精度に比べ、差吸収値そのものが大変小さいことから生じる誤差が大きいことである。そこで、一般的に反応速度論量を求めるためには  $K_m$  の近傍を多く測定することが良いとされるが、ここでは  $K_m$  より高めのところで測定を行った。これにより、未反応基質の吸光値が増大するのを犠牲にして、差吸収値を大きくした。また、これまでのアッセイでは、酵素の非特異的吸着を防ぐ目的で反応液中に BSA を添加していたが、BSA 自身、波長 275 nm に吸収を持つので、反応液中に BSA を加えることは測定値にゲタをはかせることになる。その結果、それだけ測定の出来る基質濃度の範囲が狭められることになると考え、当初は BSA を添加しないで実験を試みていた。しかしながら、測定値が全く安定しなかったので、最終的には BSA を添加して反応させることとした。差吸収により反応速度解析を行うにあたって、一番の問題となるのは、初速度を求める際の誤差である。最初は、初速度を求めるために  $t=0$  での傾きを計算により導き出すようにしたが、反応時間と反応進行度とが直線性を示す領域のみで計算を行うことは大変誤差を生みやすいと考えられた。そこで、測定を行った全ての点（基質がほぼ完全分解するまで測定を行った）に関して最小二乗法による 2 次近似を行い、得られた方程式を微分し、 $t=0$  の時の傾きを計算することにより初速度を求めた。Fig. 5-3 より、 $k_{cat}$ ,  $K_m$  共に、pH の上昇につれて増大する傾向が見られた。pH 9.25 の時の反応速度論量を pH 7.5 のものと比較すると、 $K_m$  は約 6 倍、

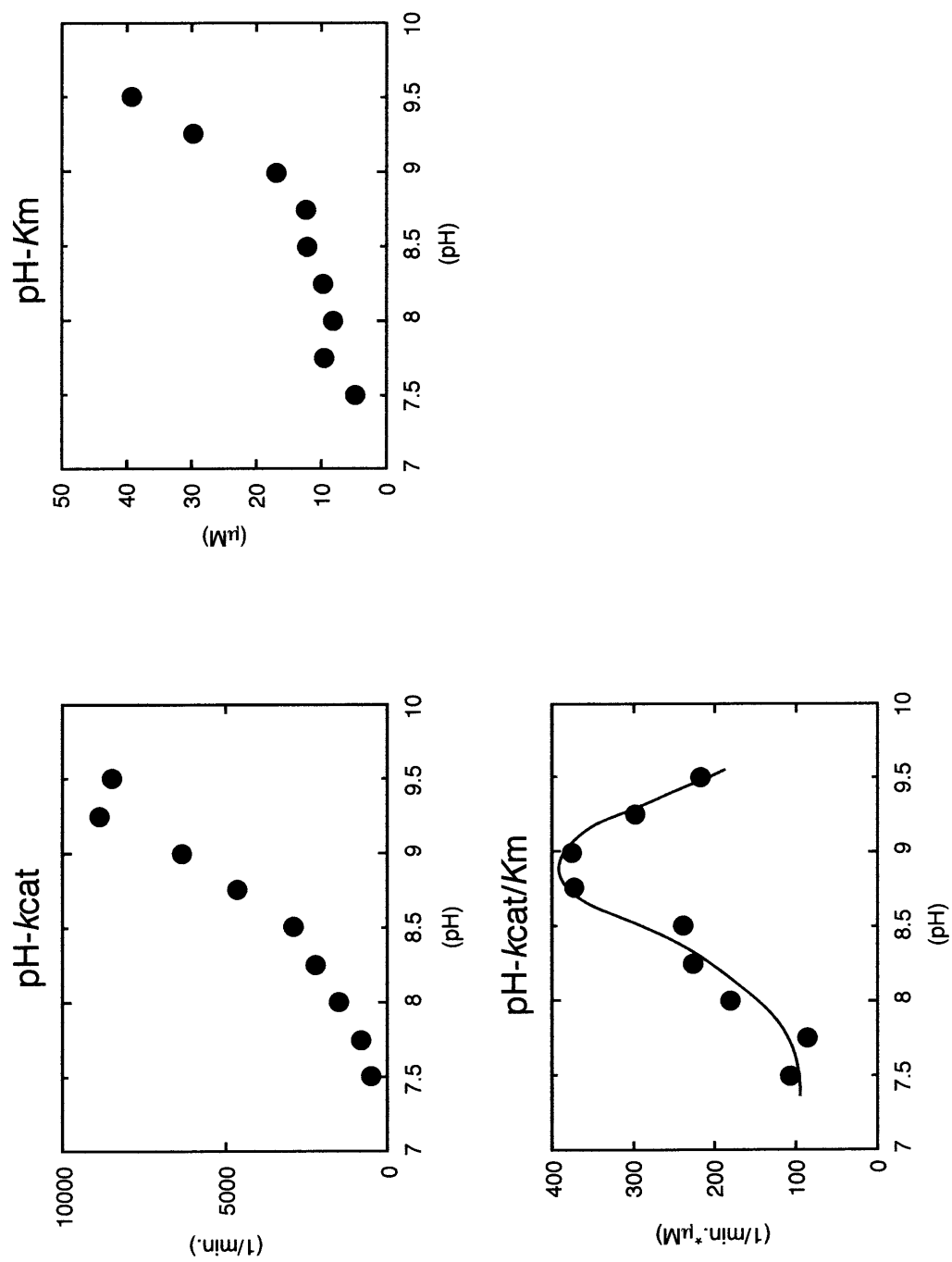


Fig. 5-3 GpUpを用いたE5-CRDの反応速度論量のpH依存性

$k_{cat}$  は約 17 倍に上昇していた。pH の上昇につれて  $K_m$  も上昇することから、pH 条件により、結合に関与するアミノ酸残基と基質の相互作用に変化が生じることが考えられる。酵素の触媒効率を評価する時に用いられる  $k_{cat}/K_m$  は、Fig. 5-3 に見られるように、おおむね minihelix を基質とした時と同様の傾向を示した。そして、pH 9.0 の時に最も高い値を示した。ちなみに、Fig. 3-1 では、反応進行度は pH 9.5 で一番高い値を示していた。この違いは、解析に用いたデータが、一方は反応速度論量であり、もう一方が反応進行度であるということが原因であるか、もしくは、今回の実験では基質が GpUp であるのに対し、Fig. 3-1 の実験における基質は minihelix であるという基質の違いが原因であると思われる。

#### 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

第四章の結果より、minihelix を基質とした場合、基質の切断感受性は GU の両側に位置する塩基により影響を受けることが分かった。この原因が、これら GU の両側の塩基に対するサブサイトを E5-CRD が持つためか、それともこれらの塩基の置換によりループの局所構造が変わるためか、結論が出ていなかった。そこで本項では、GU ジヌクレオチドの両側に塩基を伸ばした様々なオリゴヌクレオチドを用いて反応速度解析を行い、サブサイト構造の有無について検討を行った。オリゴヌクレオチドは特定のループ構造を取らないことから、塩基との直接的な相互作用が観察出来ると思われる。GU の 5'もしくは 3'末端に塩基をのばすことにより、反応速度論量に明確な変化が見られれば、その塩基に対するサブサイトが存在する証拠

となる。結果を Table 5-1 に表す。図からも分かるように、今回用いたオリゴヌクレオチドの中では、GpUp は大変良い基質となっており、用いたオリゴヌクレオチドの中では  $k_{cat}/K_m$  値が 2 番目に高かった。次に、GpUp の 5'側に塩基を伸ばした UpGpUp は、GpUp と比較すると  $K_m$ ,  $k_{cat}$  値それぞれに若干の相違が見られるが、実験誤差等を考慮すると、本質的な変化であるとは言えない。UpGpUp の反応速度論量を UpGpU のものと比較すると、 $K_m$  が約  $1/3$ 、 $k_{cat}$  が約 10 倍となり、 $k_{cat}/K_m$  値は約 30 倍である。これは、U の 3'末端のリン酸基が重要であるという前述の考察と矛盾しない。また、UpGpU が、効率が悪いながらも切断を受けることから、U の 3'リン酸基は反応の効率に大きく影響を与えるが、必須ではないことが分かる。このことを踏まえると、第五章のアッセイ条件では GpU は切断されなかったが、詳細に条件を検討することにより、切断が観察されるかも知れない。しかし、仮に観察されたとしても、その感受性は GpUp と比べて著しく低いものであると思われる。このことに関しては、当研究室の井上により現在解析が行われている。

GpUpA の  $k_{cat}$  値は、GpUp の  $k_{cat}$  値の約  $1/4$  である。GpUpA の 3'末端の A は、tRNA のアンチコドン 3 文字目に相当し、この位置の塩基は、Fig. 4-6 の結果より、各基質 tRNA の切断効率の違いに関与していると考えられる。minihelix では、アンチコドン 3 文字目が A であることが一番切断効率が高かったため、GpUp の 3'に A を付加することにより、切断効率が上昇することが期待されたが、実際はその逆であった。このことから考えると、Fig. 4-6 において、アンチコドン 3 文字目が A である時に最も切断感受性が高くなったことの原因が、E5-CRD が A を直接

Substrate	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}}(\text{sec}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m(\times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1})$
GpU	ND <sup>a</sup>	ND	ND
GpUp	32.9 (5.5)	42.9 (3.2)	1.30 (0.59)
UpGpU	143 (38)	3.57 (0.34)	0.0251 (0.0091)
UpGpUp	41.3 (16)	34.0 (3.5)	0.823 (0.23)
GpUpA	53.6 (16)	11.7 (1.1)	0.218 (0.071)
UpGpUpA	59.5 (18)	84.2 (7.1)	1.42 (0.39)
ApGpUpA	90.6 (23)	65.8 (6.4)	0.73 (0.28)
YMH	4.95 (0.99)	45.2 (0.33)	9.14 (0.33)

ND<sup>a</sup>, not detected.

The number in parentheses indicates S. E. for n>16 experiments.

Table 5-1 GUを含むオリゴヌクレオチドを用いたE5-CRDの反応速度解析

認識することではないようである。

UpGpUpA は、今回調べた基質の中で、E5-CRD に対して最も感受性の高いオリゴヌクレオチドであった。また、ApGpUpA の  $k_{cat}/K_m$  値は、UpGpUpA の値より小さいが、せいぜい  $1/2$  である。一方、Fig. 4-5 において、GU 配列の 5'末端残基をプリン塩基にすると、ピリミジン塩基である場合に比べ、著しく切断効率が低下することから、GU 配列の 5'側の塩基に対するサブサイトを想定していたが、今回の結果を考慮すると、実際にサブサイトが存在するとは考えづらい。よって、Fig. 4-5 において、GU 配列の 5'側の塩基は、この塩基自体が認識されていたのではなく、この位置の塩基の置換によりループ構造の変化が生じたため、感受性が変化したと思われる。

今回のように、オリゴヌクレオチドを用いた実験では、正に直鎖状の基質に対する反応速度論量を見ていることになると考えられる。GpUp が良い基質であるのは、一番コンパクトであるから、ちょうど活性中心ポケットに収まるからではなかろうか。

## 5.4 考察

### 5.4.1 E5-CRD の至適 pH と触媒機構について

Fig. 5-4 に、*Aspergillus oryzae* の生産する RNase である RNase T1、およびその類縁酵素の pH 依存性を示した<sup>115)</sup>。この表からも分かるように、多くの RNase

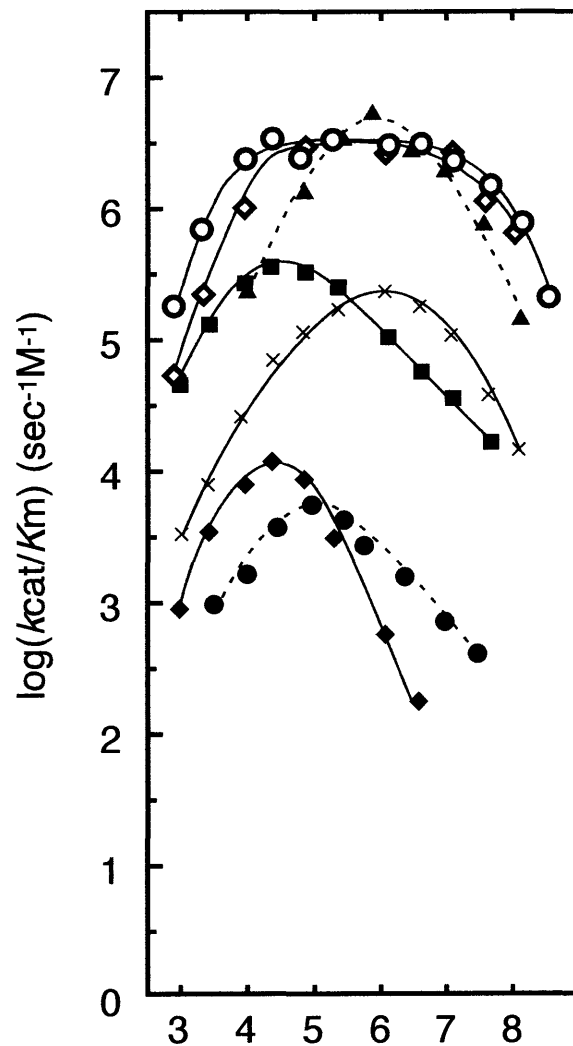


Fig. 5-4 RNase T1および類縁酵素の触媒活性のpH依存性

○:RNase T1, ■:RNase Ms, ×:RNase St, ◇:RNase F1, ◆:RNase U2, ●:バルナーゼ, ▲:RNase A。基質特異性を考慮し、RNase AはUpA, バルナーゼはGpA, その他はGpCを基質とした。(文献115)より引用。一部修正を加えた。)

は中性付近に至適 pH を持つ。また、一般的に幅広い pH 条件下で活性を損なわないことから、酵素として利用しやすいため、配列決定等の遺伝子工学のツールとしても用いられる。RNase A を例にとると、12 番目と 119 番目のヒスチジンが一般酸塩基触媒として活性を示すため、pH 6 の周辺が至適 pH となると説明される<sup>16)</sup>。

一方、第三章、および 5.3.3 項の結果から E5-CRD の至適条件は、高 pH の領域に存在していた。このことから、E5-CRD の触媒に関与するアミノ酸残基の側鎖の pKa が高いことが推察される。第七章にて詳細に述べるが、E5-CRD と基質アナログである dGpdU との共結晶構造解析により、K25, R33, K60 が触媒に関与していることが示唆されている。Lys, Arg の pKa は順に 10.79, 12.48 であり、結晶構造からの予測と良く一致するが、この pKa はフリーの状態の時の値であり、タンパク質中の値ではない。このアミノ酸が触媒に関与している場合、各 pH 条件において、このアミノ酸の側鎖の挙動を NMR 等により解析すれば、より直接的な理解が得られると思われる。尚、井上から出された現在の最新のモデルでは、水分子が触媒に直接関与しており、K25, R33, K60 は中間段階のリン酸基を安定化させていると考えているが、まだ検討中である。

#### 5.4.2 GU の 3'側のリン酸基の意義について

5.3.1 項より、GU の 3'側のリン酸基が、E5-CRD の触媒、もしくは認識に関与していることが示唆された。ジヌクレオチドの 3'末端リン酸基が活性に影響を与えるという現象は、バルナーゼを用いた研究においても見られる。バルナーゼは



*Bacillus amyloliquefaciens* が生産する RNase であり、RNase T1 ファミリーに属する<sup>16)</sup>。バルナーゼは、既知の RNase の中でインヒビターが同定されている数少ない例であり、この点でヌクレアーゼ型コリシンと比べられることが多い。このバルナーゼにおいて、GpN に対する GpNp の反応速度論量を比較すると、 $K_m$  にして 1/10 倍、 $k_{cat}$  にして 100 倍もの相違が見られる<sup>106)</sup>。この理由としては、Giraldo らにより、GpN と GpNp の構造の違いに原因があることが示唆されている<sup>116)</sup>。さて、E5-CRD の場合であるが、Table 5-1 から、UpGpU と UpGpUp の切断効率の違いは、主に  $k_{cat}$  に由来すると考えられるが、高々 10 倍程度であり、バルナーゼ程の違いは見られない。従って、バルナーゼの例とは本質的に異なる現象なのかも知れない。本章では、これ以上の議論は出来なかったが、最近、当研究室の井上が、E5-CRD と ImmeE5 との相互作用の面から、このリン酸基の役割の解明に取り組んでいる。

#### 5.4.3 E5-CRD の基質認識メカニズム

以上のことをまとめる。第四章において認識される GU の両側の塩基に対するサブサイト構造が E5-CRD に存在すると予想した。しかし、本項において、GU の両側に塩基を伸ばしたオリゴヌクレオチドと GpUp との反応速度論量を比較した結果、これまでの実験結果を説明出来るような結果は得られなかったことから、想定していたサブサイト構造が確実に存在するという結論には至らなかった。すでに様々なところで述べているが、Fig. 4-5 や Fig. 4-6 で見られた結果は、塩基の置換により

ループ構造にバリエーションが生じ、このうち E5-CRD にとって認識されやすい構造を持つ minihelix が高い感受性を示したのだと思われる。尚、GU 配列の 3'末端にリン酸基を付加することにより、特に *k<sub>cat</sub>* 値の大幅な上昇が見られることから、このリン酸基に対するサブサイトは存在すると考えている。事実、E5-CRD(R33Q) と dGpdUp との共結晶構造から、このリン酸基に対して 60 番目の Lys の側鎖が相互作用していることを示唆するデータが得られている。第四章、第五章および構造解析のデータから総合的に解釈した E5-CRD の基質認識メカニズムを Fig. 5-5 に示す。

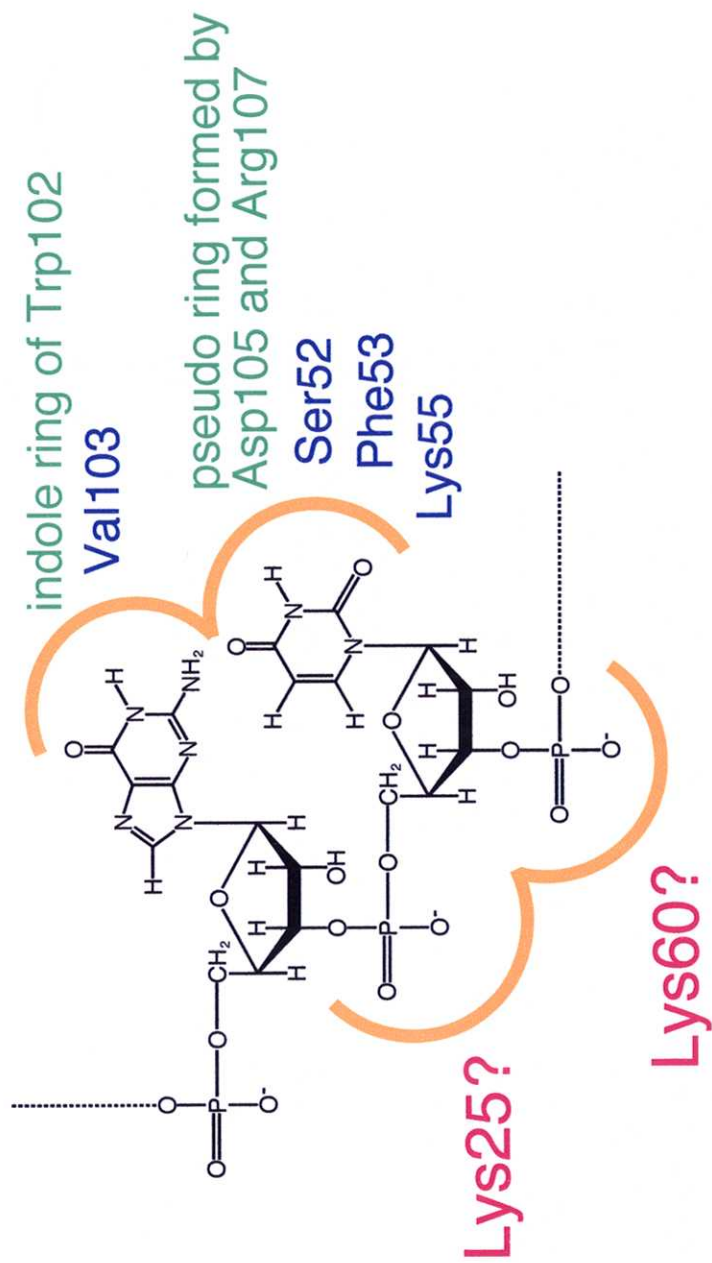


Fig. 5-5 推定されるコリシンE5の基質認識機構

青字および赤字は、基質塩基と水素結合を形成すると予想されるアミノ酸残基を表す。

## 第六章 真核細胞内での E5-CRD の発現

### 6.1 緒言

本章では、序章で示した二大目標のうちの残りの一つである、コリシン E5 の応用的利用法の確立に関して述べる。コリシン E5 は tRNA を標的とする tRNase であるが、本来の生理的機能は毒素である。毒素の利用法としては、例えば、ジフテリア毒素と癌細胞特異的抗体とを組み合わせたイムノトキシン<sup>117)</sup>の開発が挙げられる。イムノトキシンの開発においては、意図しない細胞に対して毒素が作用しないことが重要である。コリシン E5 は、RNase としては珍しく特異的インヒビターが存在するので、これを併用することにより機能の制御が比較的容易に図れると思われる。また、導入した結果、生じる細胞応答があらかじめ予想できることも重要である。ジフテリア毒素と同様に、RNase も、多くの研究者により細胞への導入実験が行われてきた。しかしながら、作用機構が明らかにされている RNase は、基質特異性があっても 1 塩基認識のものばかりであり、大部分が細胞内 RNA を非特異的に切断してしまう（特定の配列を認識するものもあるが、その認識配列は大幅に限定されたものであるため、汎用性の高いものではない）。従って、仮に表現型が変わったとしても（多くの場合は致死になる）、primary target を絞り込むことは容易ではない。一方、E5-CRD は、少なくとも大腸菌に対しては tRNA を特異的に切断することが明らかになっているので、標的の特定が比較的容易であると思われる。E5-CRD を用いることの利点は、他にも挙げられる。例えば、E5-CRD は分子量 1 万程度の低分子タンパクであり、かつ、比較的安定であることから、実験材料として扱いやすいということである。これらに加え、重要なことは、E5-CRD の活性中

心変異体が多数取得されていることである<sup>88)</sup>。これだけを考えても、E5-CRD を実験に用いることは大変有効であると思われる。

細胞内 tRNA の分解が宿主細胞に与える影響について、詳細に実験を行った例は、著者の調べる限りではほとんど見受けられない。これについて考えられる原因としては、やはり tRNA の冗長なコピー数のため、全ての遺伝子を破壊することが難しいからであると思われる。一方、ミトコンドリア tRNA の変異により発症する、いわゆる「ミトコンドリア病」<sup>118),119)</sup>に関する研究は幅広く行われているが、これは逆に、ミトコンドリアの遺伝子がシングルコピーであるため、何らかの変異がオルガネラの表現型として現れやすいからであろう。いずれにせよ、E5-CRD を用いれば、遺伝子操作によることなく、特定の tRNA を細胞内から除去出来る。従って、これまで知られていなかった現象の発見につながる事が期待される。

尚、本項で述べたことは将来的な指針であり、現段階で想定しているのは、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、標的細胞ノックアウト法 (TRECK 法)<sup>79)</sup>への応用である。序章でも述べた通り、TRECK 法とはジフテリア毒素のレセプターを利用した細胞特異的ノックアウト法である。マウスの細胞はジフテリア毒素を発現していないので、本来毒素に対して非感受性である。河野教授らのグループは、肝細胞特異的に毒素レセプターを発現するトランスジェニックマウスを作製し、これに対し毒素を投与したところ、肝細胞が特異的に壊死することを明らかにした。文献 79)では、細胞を殺す武器の部分にはジフテリア毒素を用いているが、現在、この毒素に替えて E5-CRD を用いることを検討している。その準備段階として、真核細胞に対して E5-CRD を作用させた時に見られる細胞応答を詳細に調べる必要がある。そこで、本章では、まず真核細胞のモデルである酵母細胞

で、次に、動物細胞で E5-CRD を発現させることを試みた。

## 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

発現実験に用いる酵母株、およびシャトルベクターは、奈良先端科学技術大学院大学河野憲二教授より恵与された。発現株には *Saccharomyces cerevisiae* KFY1(MATa *ura3-52 leu2Δ1 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 lys2 Δ 202*)<sup>120)</sup>を用いた。以下に、発現プラスミドの構築方法について述べる。PCR による部位特異的変異導入法により、ColE5 プラスミドの E5-CRD から ImmE5 までをコードする遺伝子の 5'末端に *Xba* I 部位を、そして 3'末端に *Sac* I 部位を導入した。ImmE5 までをクローニングしたのは、大腸菌内でのプラスミドの安定化のためである。これら制限酵素部位の導入と同時に、E5-CRD の N 末端に FLAG タグを持つように、遺伝子配列を挿入した。こうして得られた断片を pRS316<sup>121)</sup>, pYO326 の *Xba* I および *Sac* I に挿入した。次に、培地中の Met 欠乏により活性化される *MET3* 遺伝子のプロモーター、および *MET3* 遺伝子の 5'部分配列を含む領域<sup>122)</sup>を pUC19 の *Bam* H I 部位と *Eco* R I 部位との間にクローニングしたプラスミドである pHAM8 より、プロモーター活性に必要な領域を全て含む *Sal* I 部位から *Eco* R V 部位までを切り出し、先に E5-CRD から ImmE5 までをコードする遺伝子を挿入した pRS316 および pYO326 の *Sal* I 部位と *Sma* I 部位との間に挿入した(Fig. 6-4a)。このプラスミドを用いた形質転換株は、培地中の Met 欠乏 (0.05 mM 以下との報告がある) により、N 末端に FLAG タグを持つ E5-CRD が発現する。前述の通り、E5-CRD をコード

する遺伝子のクローニングに際しては、ImmE5 をコードする遺伝子領域まで含めているが、ImmE5 はこのプラスミドから発現しない。ここで用いた pRS316, pYO326, pHAM8 は東京大学大学院理学系研究科東江昭夫教授より恵与された。尚、pRS316 は *CEN6/ARSH4* により複製される低コピー、pYO326 は *2 μm ori* により複製される高コピープラスミドであり、プラスミドのコピー数により E5-CRD の発現量を調節した。

次に、ImmE5 を発現するプラスミドの構築方法を述べる。PCR による部位特異的変異導入法により、ImmE5 をコードする遺伝子の 5'末端に *BamH I* 部位を、そして 3'末端に *Kpn I* 部位を導入した。これら制限酵素部位の導入と同時に、ImmE5 の N 末端に His タグを持つように、遺伝子配列を挿入した。こうして得られた断片を pGMT10<sup>123</sup>の *BamH I* 部位および *Kpn I* 部位に挿入した(Fig. 6-4b)。このプラスミドを用いた形質転換株は、培地中にガラクトースを添加することにより、N 末端に His タグを持つ ImmE5 が発現するようになる。

### 6.2.2 酵母細胞内でのタンパク発現および確認

作製したプラスミドを用いた酵母の形質転換には、酢酸リチウム法を用いた。E5-CRD および ImmE5 が正しく発現していることを確認するために、以下の方法により、それぞれのタンパクを発現させた。まず、各形質転換株を、SG(+Met, His, Leu, Lys)培地にて 2 日間培養し、前培養液とした。この培地中で培養した各形質転換株ではImmE5が発現している。これらの培養液を 20 ml SG(+Met, His, Leu, Lys)培地に終濃度で 10%になるように再度植菌し、本培養を開始した。OD<sub>660</sub>=0.5 になった段階で集菌し、蒸留水で菌体を洗った後、20 ml SG(+His, Leu, Lys)培地に懸

濁することにより培地中の Met を除いた。この培地中では、E5-CRD、ImmE5 の両方が発現している。2 時間培養した後集菌し、タンパク質を抽出した。タンパクの抽出は Y-PER Yeast Protein Extraction (PIERCE)を用いた。抽出後、蒸留水に対してタンパク抽出液を透析することにより、Y-PER Yeast Protein Extraction 溶液による SDS-PAGE 時の泳動の乱れを防いだ。透析後の抽出液中の全タンパク量を、BIO-RAD PROTEIN ASSAY (BIO-RAD)にて測定した。SDS-PAGE の分離ゲルは 14%とし、各レーン当たり 50  $\mu$ g のタンパクをロードした。マーカーには、Prestained SDS-PAGE Standards Broad (BIO-RAD)を用いた。野生型および変異型 E5-CRD、ImmE5 が正しく発現していることを、後述の抗体を用いたウエスタンブロッディング法により確認した。尚、E5-CRD は塩基性タンパクであり、一般的に使われているトランスファーバッファーではメンブレンへの転写がうまくいかなかった。そこで、塩基性タンパク用トランスファーバッファー (10 mM CAPS (pH 11), 10% メタノール) を使用した。E5-CRD の一次抗体には ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (SIGMA)を、二次抗体には Mouse Immunoglobulines/HRP (DAKO)を用いた。発光には、ECL (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。ImmE5 の抗体には Ni-NTA HRP conjugate (QIAGEN)を用いた。発色には、TMB Stabilized Substrate for HRP (Promega)を用いた。

### 6.2.3 ノザンハイブリダイゼーション

E5-CRD による酵母全 tRNA の *in vitro* 切断解析、および E5-CRD を酵母細胞内で発現させた時の細胞内 tRNA の様子の観察は、ノザン解析により行った。用いた各 tRNA 特異的なプローブの配列を以下に示す<sup>86)</sup>。



tRNA<sup>Tyr</sup> プローブ : 5'- AGTCGAACGCCCCGATCTCAAGATTT-3'

tRNA<sup>His</sup> プローブ : 5'- CTCCTAGAATCGAACCAGGGTTTCA-3'

tRNA<sup>Asn</sup> プローブ : 5'- GGGTTGAACTCACGATCTTGCGATT-3'

tRNA<sup>Assp</sup> プローブ : 5'- CGACGGGGAATTGAACCCCGATCTG-3'

tRNA<sup>Lys</sup> プローブ : 5'- CCCCTAACCTTATGATTAAGAGTCA-3'

実際の操作は文献 14)に従った。ハイブリダイゼーションの温度は 42℃とした。全 tRNA の抽出前に、集菌した菌体のペレットを 400  $\mu$ l の Zymolyase 溶液 (2 mg/ml Zymolyase 100T (生化学工業), 100 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.8), 1 M ソルビトール, 100 mM EDTA, 68.5 mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁し、37℃ で 1 時間インキュベートすることにより、細胞壁を溶解した。この後の tRNA の抽出は文献 85)に従った。

#### 6.2.4 E5-CRD 発現後の生菌数の測定

E5-CRD の発現後の、酵母形質転換体の細胞数の測定は以下の方法に従った。それぞれの形質転換株を 10 ml の SD(+Met, His, Leu, Lys)培地で培養し、OD<sub>660</sub>=0.3 ~0.45 程度になったところで集菌し、蒸留水で洗浄した後、10 ml の SD(+ His, Leu, Lys)培地に懸濁することにより、培地中より Met を除いた。濁度を測定し、OD<sub>660</sub>=0.2 になるように、SD(+ His, Leu, Lys)培地で希釈した後、再び培養を開始した。培養を開始するまでの操作は、全て氷上で行った。経時的に 25  $\mu$ l ずつサンプリングし、文献 14)に従って細胞数を計測した。

### 6.2.5 ウサギ網状赤血球ライゼートと E5-CRD との反応

*in vitro* 真核細胞タンパク質合成系には、Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease Treated (Promega)を、mRNA には Luciferase Control RNA (Promega)を用いた。また、ルシフェラーゼの基質にはピッカジーン（東洋インキ製造）を用いた。発光量の検出には、東京大学大学院農学生命科学研究科醗酵学研究室の器材を使用させていただいた。また、牛肝臓全 tRNA 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）鈴木健夫氏から恵与された。反応液組成は、Rabbit Reticulocyte Lysate を 35  $\mu$ l、リボヌクレアーゼ阻害剤（ヒト胎盤）、組換え体(WAKO)を 40 units、Amino Acid mixture（あらかじめ Amino Acid mixture, Minus Leucine と Amino Acid mixture, Minus Methionine とを等量混ぜることにより、欠失しているアミノ酸を補った）を 20  $\mu$ M、牛肝臓全 tRNA、および Luciferase Control RNA（mRNA として添加）を終濃度にしてそれぞれ 100  $\mu$ g/ml, 0.5  $\mu$ g/ml になるように加え、反応液体積を 50  $\mu$ l とした。加えた E5-CRD, ImmE5 は、終濃度にしてそれぞれ 40 nM, 800 nM とした。アッセイを開始する前に、それぞれ以下の操作を行った。○；反応液に E5-CRD を添加し、15 分インキュベートした後、ImmE5 を添加し、更に 5 分インキュベートすることにより E5-CRD の活性を阻害した。その後、牛肝臓全 tRNA を加え、10 分間インキュベートすることにより、反応液中のアミノ酸によるアミノアシル化を行った。●；○の操作から、牛肝臓全 tRNA の添加操作を省略した。□；○の操作から、E5-CRD の添加操作を省略した。■；○の操作から、E5-CRD および牛肝臓全 tRNA の添加操作を省略した。以上の方法で調製した反応液に対して mRNA を加えることにより、翻訳反応を開始した。翻訳反応開始後、経時的に 5  $\mu$ l ずつサンプリングした。各反応溶液中でのルシフェラーゼの合成量は、ルシフェラ

一ゼによる化学発光の強度を元に測定した。測定に際しては、サンプル 5  $\mu$ l に対し、再蒸留水を 5  $\mu$ l 加えて希釈した後、96 ウエルプレートに 50  $\mu$ l ずつ分注したピッカジーン(WAKO)に添加し、発光反応を開始した。発光量の減衰をなるべく避けるために、計測器による計測の直前に基質であるピッカジーンとサンプルとを混ぜるようにした。

#### 6.2.6 培養細胞の取り扱いについて

培養細胞を用いた実験は、奈良先端科学技術大学院大学河野憲二教授の研究室で行わせていただいた。また、実際の実験操作は、同研究室岩脇隆夫博士（現理化学研究所脳科学総合研究センター）よりご指導いただいた。目的の遺伝子を培養細胞に導入するためのシャトルベクターには、pIRES2-EGFP (CLONTECH)を用いた。PCR による部位特異的変異導入法により、ColE5 プラスミドの E5-CRD から ImmE5 までをコードする遺伝子の 5'末端に *Pst* I 部位を、そして 3'末端に *Bam*H I 部位を導入した。これら制限酵素部位の導入と同時に、E5-CRD の N 末端に FLAG タグを持つように、遺伝子配列を挿入した。こうして得られた断片を pIRES2-EGFP の *Pst* I 部位と *Bam*H I 部位との間に挿入した(Fig. 6-10)。培養細胞へのプラスミドの導入はリン酸カルシウム沈殿法により行った。このプラスミドの導入に成功した細胞は、IRES(Internal Ribosome Entry Site)から翻訳される EGFP による発光が観察される。

## 6.3 結果

### 6.3.1 E5-CRD の酵母 tRNA の切断

E5-CRD を発現させる真核細胞として、まず *Saccharomyces cerevisiae* を選択した。*S. cerevisiae* は、すでに全ゲノム配列が公開されている<sup>124)</sup>ことや、分子生物学的手法が整っているため、操作が容易である。また、動物細胞の持つ機能も多くの部分で保存されているので、真核細胞のモデルとしては十分であると考えた。

Fig. 6-1 に、大腸菌と酵母の tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> を示した。酵母の場合は、大腸菌の場合と異なり、tRNA<sup>His</sup> にアイソアクセプター tRNA が存在する。また、tRNA<sup>Tyr</sup> では、アンチコドン 2 文字目がシュードウリジン(Ψ)となっており、これが E5-CRD により切断を受けるか興味深い。まず、これらの酵母 tRNA が E5-CRD により切断を受けるかをノザン解析により調べた(Fig. 6-2)。E5-CRD を加えることにより、tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> の切断が観察されたことから、E5-CRD が酵母の tRNA も切断出来ることが示された。また、E5-CRD による切断は、tRNA<sup>Lys</sup> に対しては見られないことから、この tRNA の切断が特異的であることが分かる。tRNA<sup>Tyr</sup> を切断することから、E5-CRD は GΨ配列も認識出来ることが分かった。第七章でも述べるが、構造データより、U と Ψ との間で塩基の構造の異なる部分は、E5-CRD の認識に関与していないことが示され、今回の結果と矛盾しない。尚、反応は pH 7.5 の条件で行った。pH 8.5 の条件でアッセイを行うと、tRNA<sup>Lys</sup> においても切断片が見られるようになるが、これはアンチコドンループ以外の GU 配列も切断してしまうためであると思われる。このことは、第四章でも述べたように、E5-CRD の tRNA に対する特異性が pH 条件に大きく影響を受けて

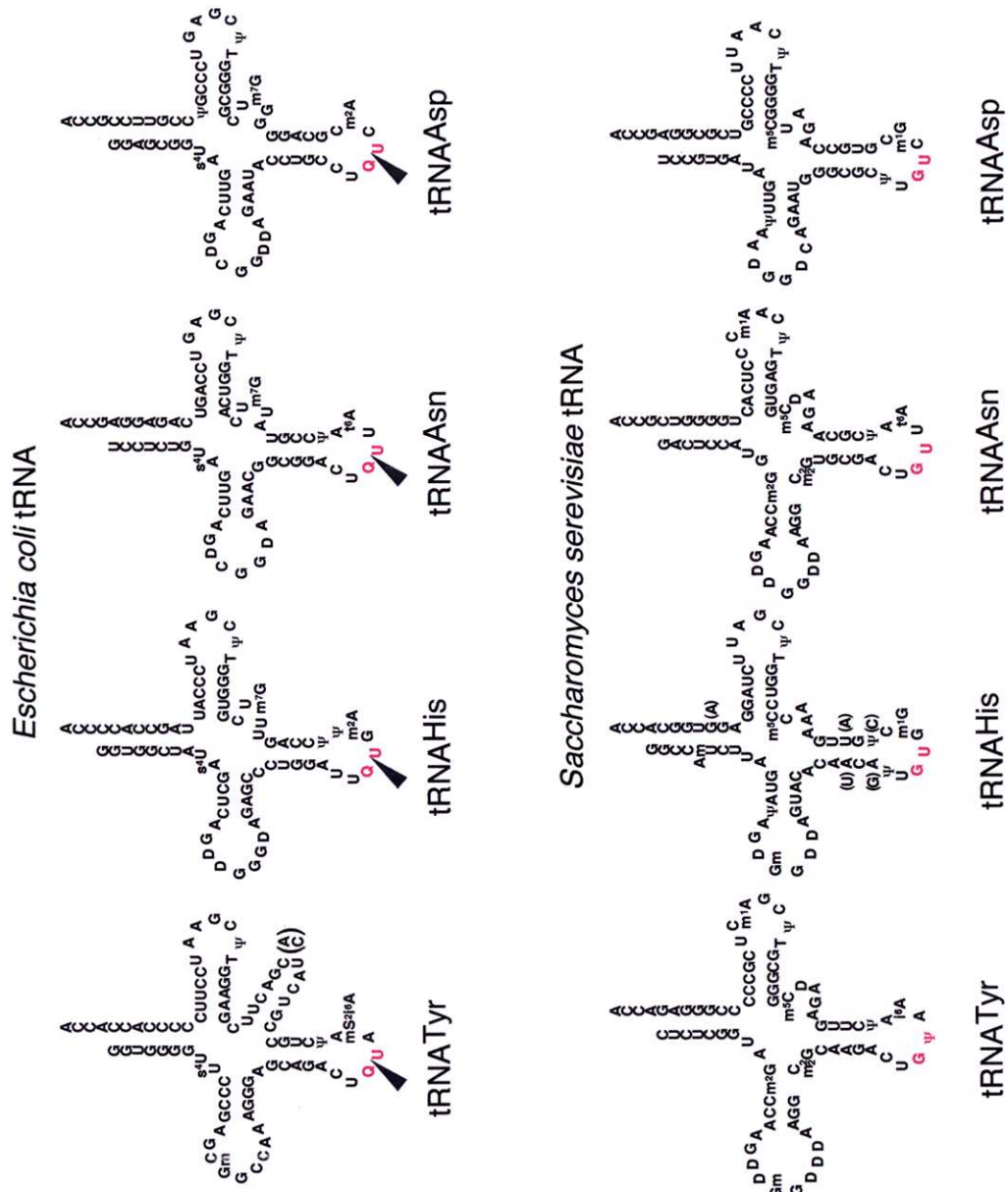


Fig. 6-1 大腸菌および酵母tRNAの比較



いるためであると思われる。今回の目的は、生理的条件下での様子を観察することが目的であるため、反応における pH 条件を中性にした。

### 6.3.2 酵母細胞内での E5-CRD の発現および表現型の観察

Fig. 6-3 は、酵母内で発現させる野生型および変異型 E5-CRD の、大腸菌に対する殺菌活性をスポットテストにより比較した結果である。スポットテストとは、寒天培地上に指示菌を重層し、その上に段階希釈したコリシン E5 溶液を滴下し、どの希釈段階までハロが形成されるかを観察することにより、コリシンの殺菌活性の力を定量的に評価する方法である。それぞれの変異体は、野生型に比べ著しく殺菌活性を低下させていることが分かる。そこで、これら E5-CRD および ImmE5 を 6.2.1 項に従ってベクターにクローニングした。各形質転換株において、E5-CRD および ImmE5 が正しく発現されていることを確認するために、それぞれのタンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロッディングを行った。Fig.6-5 にウエスタンブロッディングの結果を示す。GAL1 プロモーターにより発現させた ImmE5 は、検出に十分な量の発現が見られた。また、バンドのサイズも予想されたものであった。一方、E5-CRD においては、MET3 遺伝子のプロモーターにより低コピープラスミドから発現したものは、今回検出出来なかった。高コピープラスミドから発現したものは、予想された分子量のバンドが検出された。コントロールとして、GAL1 プロモーター下、低コピープラスミドにより発現させた E5-CRD も同時に検出したが、このバンドと比較すると、MET3 プロモーターにより発現させた E5-CRD のタンパク量は数分の 1 程度であった。ただし、GAL1 プロモーター、および MET3 プロモーターのそれぞれにおいて、発現の誘導時間が異なるため、このバンドの強弱がプ

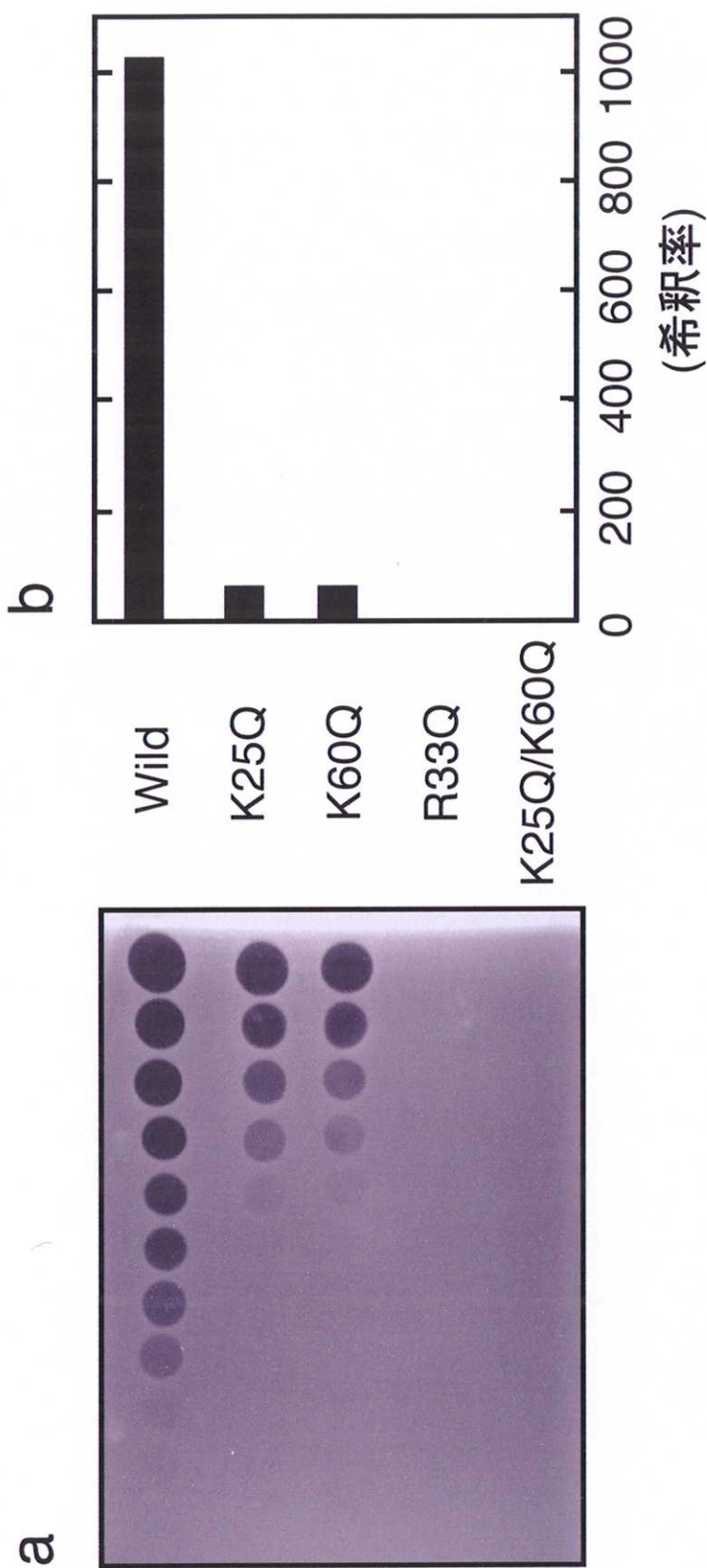


Fig. 6-3 実験に用いた野生型および変異型コリシンE5の大腸菌に対する殺菌活性

野生型および変異型コリシンE5の大腸菌に対する殺菌活性を比較した。

(a)各コリシン溶液を2倍ずつ段階希釈し、大腸菌を重層したプレートに滴下し、生育阻止斑（ハロ）の消失により力価を評価した。

(b)(a)のスポットテストにより得られたそれぞれの力価をスコア化して比較した。



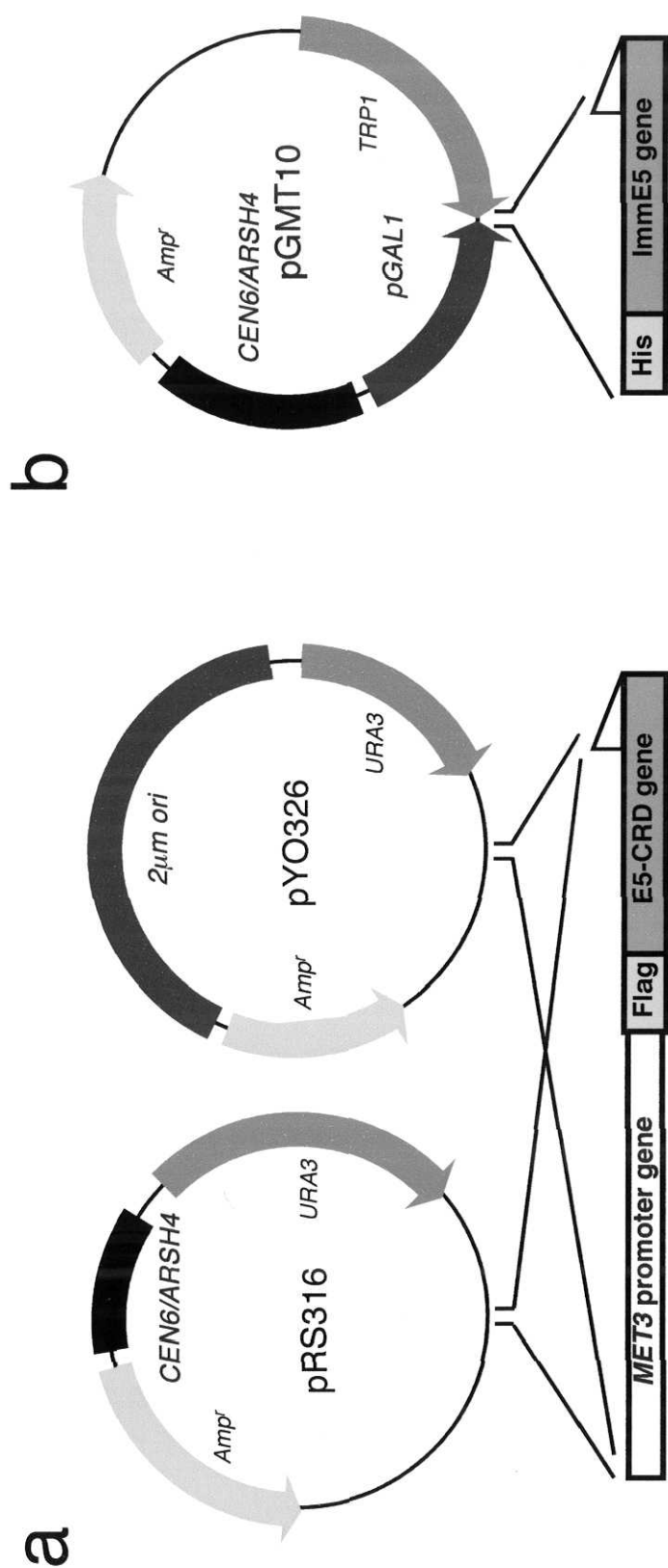


Fig. 6-4 E5-CRDおよびImmE5を酵母細胞内で発現するプラスミドの構築

野生型、変異型E5-CRDおよびImmE5を、独立的に発現するプラスミドを構築した。

(a)E5-CRDは、培地中よりMetを除いた条件で活性化するMET3遺伝子のプロモータを利用し、また低コピーおよび多コピーの2種類のプラスミドを用意することにより発現量を調節した。

(b) ImmE5は、培地中にガラクトースを添加することにより活性化するGALIプロモーターを用いた。プラスミドは低コピーのもののみ用いた。

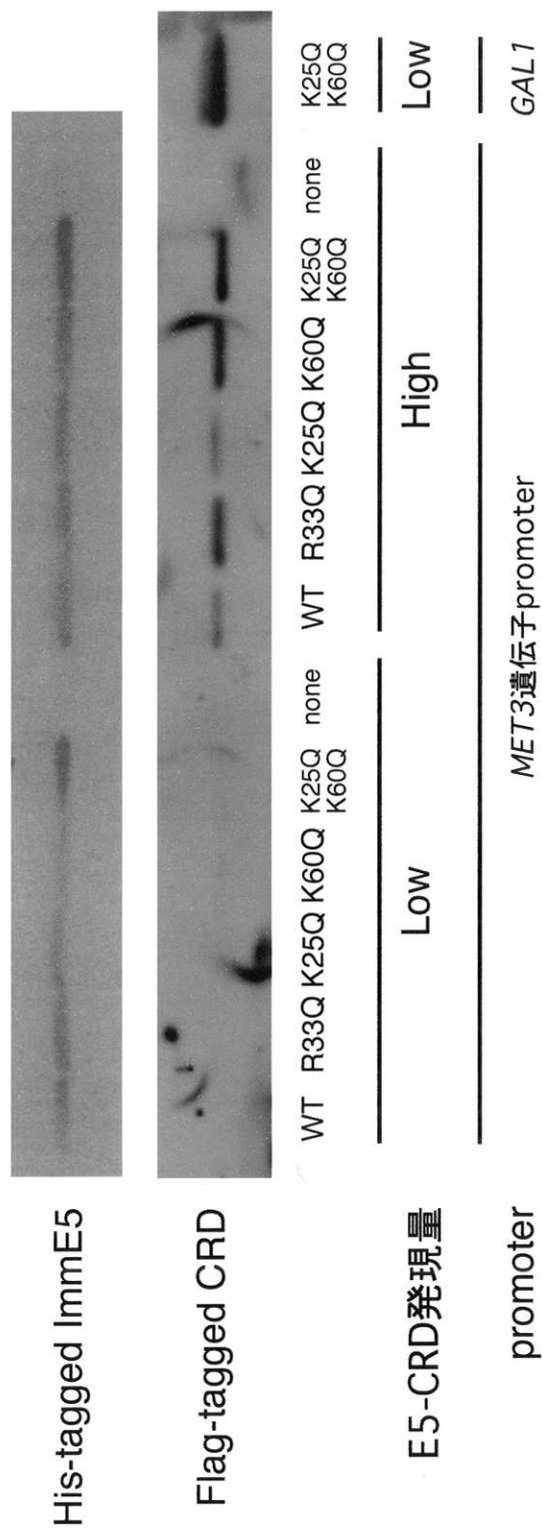


Fig. 6-5 E5-CRDおよびImmE5の酵母細胞内での発現の確認

E5-CRDおよびImmE5を発現させた酵母よりタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにて解析した。  
E5-CRDはN末にFlagタグを、ImmE5はN末にHisタグを持っている。

ロモーター活性の違いであるとは言えない。

次に、それぞれの形質転換株の表現型を調べた(Fig. 6-6)。野生型の E5-CRD を発現させた株では、変異型 E5-CRD を発現している株と比較すると、著しく生育が阻害されているのが分かる(Fig. 6-6, left panel)。また、E5-CRD の発現プラスミドのコピー数を上げることにより E5-CRD の発現量を増加させると、更に生育阻害効果が大きくなり、コロニーが全く観察されなくなった。変異体 E5-CRD の場合は、高コピープラスミドから発現させても、コロニー形成に全く影響を与えなかった。この生育阻害効果は、培地中に Met を添加することにより抑制されたことから、生育阻害の原因は、E5-CRD の発現によると言える (Fig. 6-6, middle panel)。更に、E5-CRD と ImmE5 とを同時に発現させることにより、野生型 E5-CRD による生育阻害効果が抑制されたことから、酵母細胞内でも ImmE5 により E5-CRD の活性が阻害されることが分かった(Fig. 6-6, right panel)。

### 6.3.3 E5-CRD を発現している酵母の生菌数の経時的变化

E5-CRD を発現させてからの細胞数の変化を経時的に計測した(Fig. 6-7)。コントロールとして、E5-CRD(K25Q/K60Q)を発現するプラスミドにより形質転換した酵母株を用いた。Fig. 6-3 の結果や、これまでの酵素学的実験結果<sup>88)</sup>より、E5-CRD(K25Q/K60Q)は各変異体の中で最も RNase 活性が低いことが分かっている。結果であるが、培地中から Met を除くことにより誘導をかけてから 1 時間のうちに、野生型 E5-CRD を発現させた形質転換株の細胞数が減少した。細胞数は、誘導開始後 12 時間経っても回復しなかった。一方、E5-CRD(K25Q/K60Q)を発現させた株は、順調な生育をみせた。また、野生型 E5-CRD を発現させた株のうち、発現量の

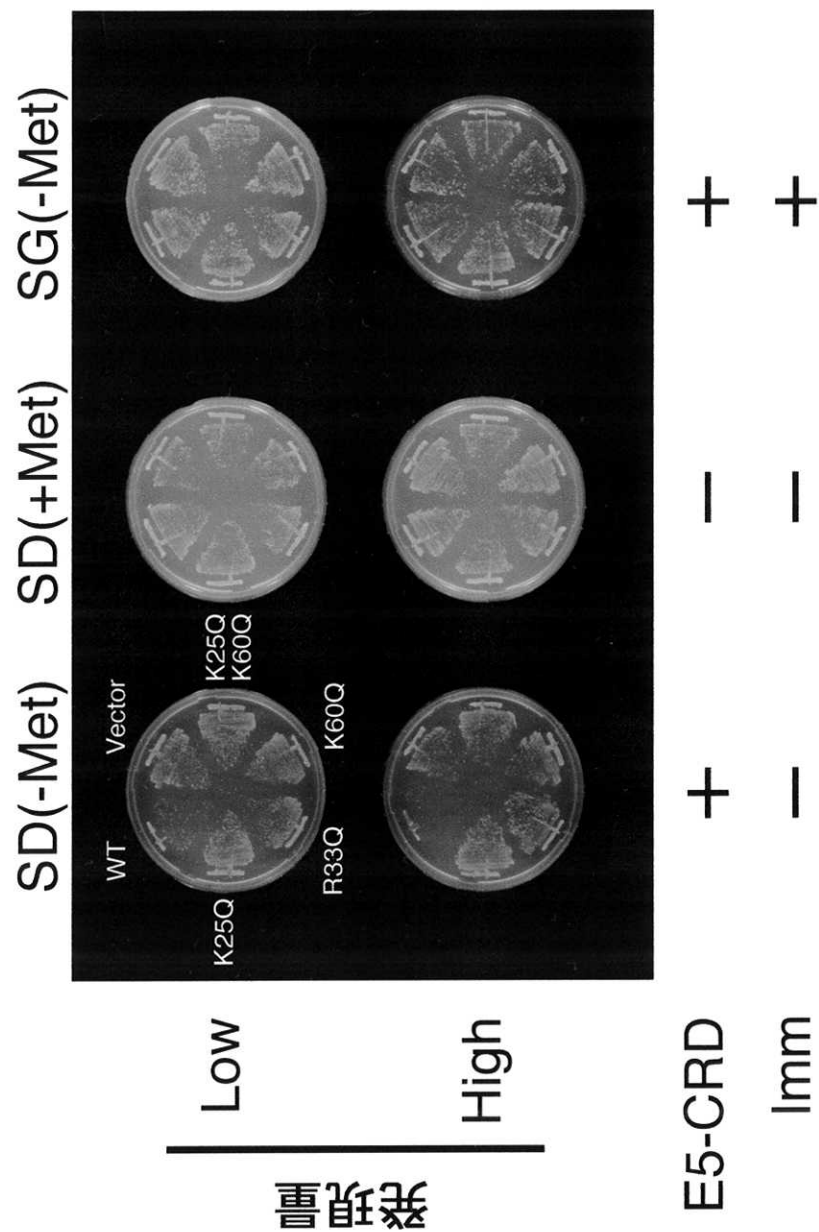


Fig. 6-6 E5-CRDおよびImmE5を発現させた酵母の表現型

E5-CRD、およびImmE5を個々に発現させた酵母の表現型をコロニーの観察により調べた。SD(+Met)の培地ではE5-CRDおよびImmE5の発現は起こらない。一方、SD(-Met)の培地ではE5-CRDが、SG(-Met)の培地ではE5-CRDおよびImmE5が発現する。

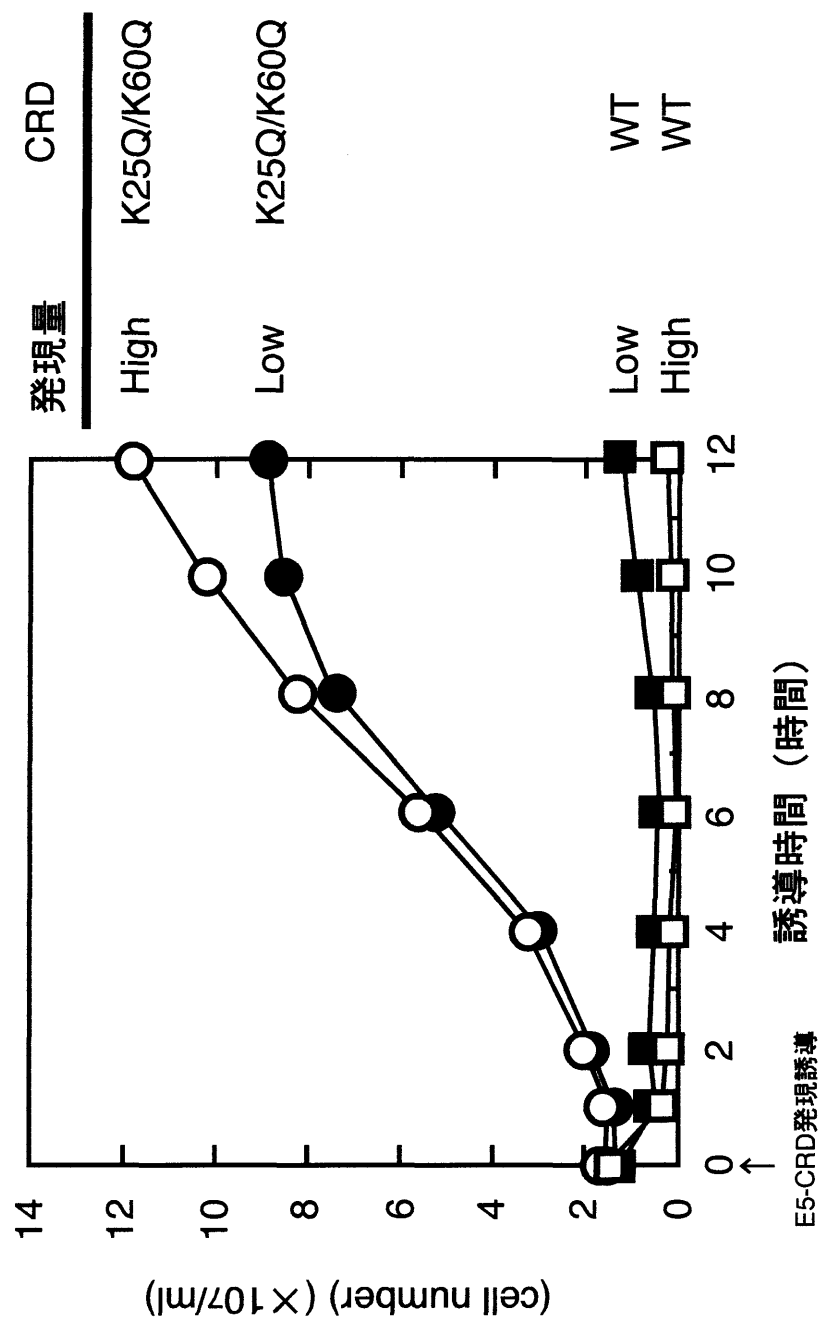


Fig. 6-7 酵母細胞内でのE5-CRD発現による生菌数の変化

多い株の方が、発現量の少ない株より強い生育阻害を受けていることが分かった。

#### 6.3.4 E5-CRD を発現させた酵母の細胞内 tRNA の様子

Fig. 6-7 の実験において、野生型および E5-CRD (K25Q/K60Q) を 12 時間発現させた後、酵母を集菌した。そして、全 tRNA を抽出し、ノザン解析により細胞内の tRNA の様子を調べた (Fig. 6-8)。 *in vitro* で E5-CRD と tRNA を反応させると、実際に tRNA の切断片が見られるが、今回の様に、細胞内で E5-CRD を発現させた場合には切断片が見られないことが多い。これは、Zymolyase 処理等の間に切断片が分解してしまったか、もしくは、細胞内では切断片が長時間に渡って安定的に存在出来ないからであると思われる<sup>15)</sup>。そこで、切断を受けていないインタクトな tRNA のバンドの濃淡により、切断を判断した。そのために、電気泳動時に全 tRNA が各ウエルに同量チャージ出来る様に濃度を調整した。結果は、 *in vitro* アッセイの時と同様、野生型 E5-CRD を発現させた株において、tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> の特異的切断が見られた。また、切断される tRNA の量は、E5-CRD を高発現させることにより、更に増加することも分かった。一方、E5-CRD (K25Q/K60Q) を発現させた株においては、tRNA の切断は見られなかった。また、tRNA<sup>Lys</sup> は、E5-CRD を発現させても切断は見られず、Fig. 6-2 の結果と同様、E5-CRD が特異性を保って tRNA を切断する様子が観察された。しかしながら、ノザン解析前に、泳動ゲルを染色により観察すると、tRNA 以外の RNA の分解と思われるスメア状のものが見られる。このことから、確実に tRNA のみに作用しているとは断定できない。

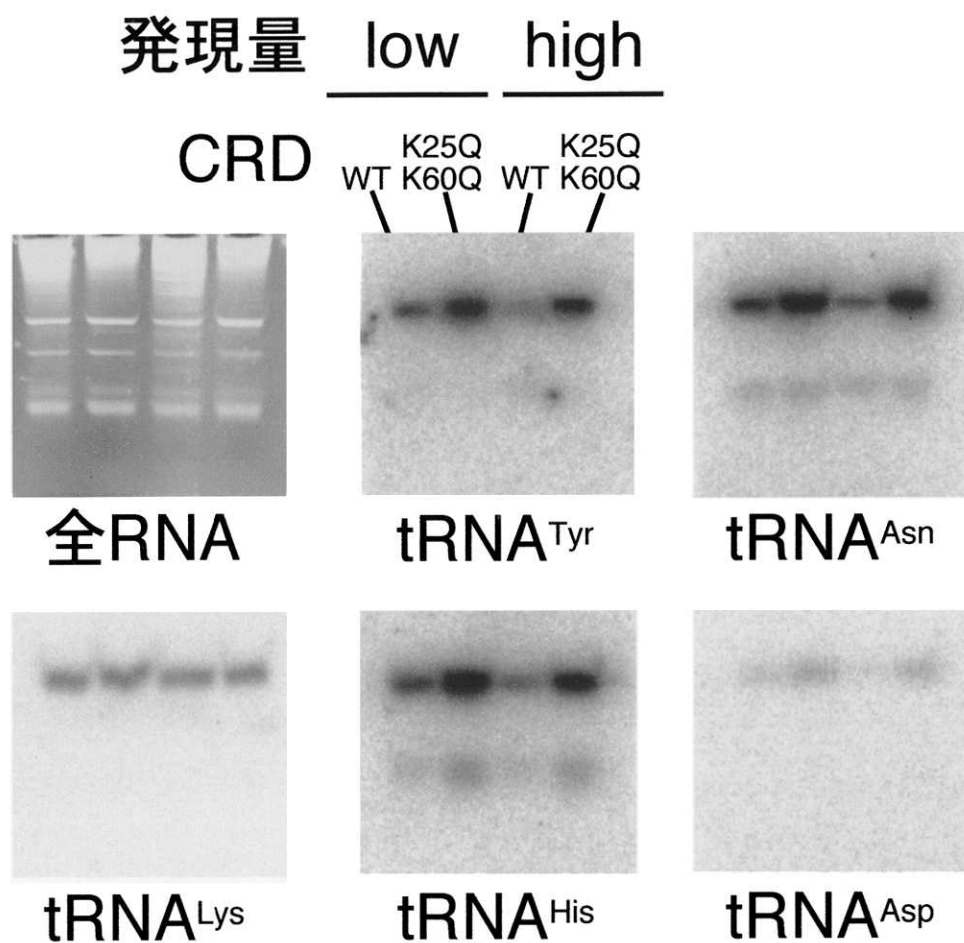


Fig. 6-8 野生型および変異型E5-CRDを発現させた酵母細胞内でのtRNAの様子

野生型および変異型E5-CRDを発現した酵母細胞内のtRNAの様子をノザン解析により調べた。電気泳動に際しては、各ウエルに同量のRNAをチャージした（全RNAの写真を参照）。

### 6.3.5 E5-CRD が真核細胞 *in vitro* タンパク合成系に与える影響

以上の結果から、E5-CRD は、期待通り、酵母に対して生育阻害効果を示すことが分かった。次に、動物細胞を用いて実験を行うことを試みた。尚、以降の実験は未だ進行中であるため、予備的であるが、あえて記載することとする。

まず、真核生物の *in vitro* タンパク合成系に対して E5-CRD がどのような影響を与えるか調べた。ここでは、ウサギ網状赤血球由来の *in vitro* タンパク合成系を用いた。Fig. 6-9 の下段に示した様に、4種類の系で実験を行った。●系において、ルシフェラーゼによる発光量、すなわちタンパク合成能が低下している。このことから、E5-CRD が動物細胞のタンパク合成を阻害することが分かる。次に、●系に対し、牛肝臓由来全 tRNA を強化した○系においては、E5-CRD を作用させないコントロールである■系とほぼ同量のルシフェラーゼが翻訳されていることから、tRNA の強化によりタンパク合成能が回復したことが分かる。更に、この系が元々 tRNA 量が律速になっていないこと、すなわち、添加する tRNA 量依存的に活性が上昇することはないことを示すために□系の実験を行ったが、■系と同様のタンパク合成活性を示すことから、○系が、単に tRNA を強化したことにより活性が上昇したわけではない、すなわち tRNA が系の律速になっていないことが示された。以上のことをまとめると、E5-CRD は、タンパク合成系内の tRNA を切断することにより、タンパク合成活性を低下させることが示された。尚、ウサギ網状赤血球由来のライゼートに対し、牛肝臓由来全 tRNA を強化したのは、この系に元から含まれている tRNA が牛肝臓由来だからである。真核細胞の *in vitro* タンパク合成系として一般的に広く利用されている系は、このウサギ網状赤血球由来のものと、小麦胚芽由来のものがある。小麦胚芽由来の系に対しても E5-CRD を作用させてみたが、



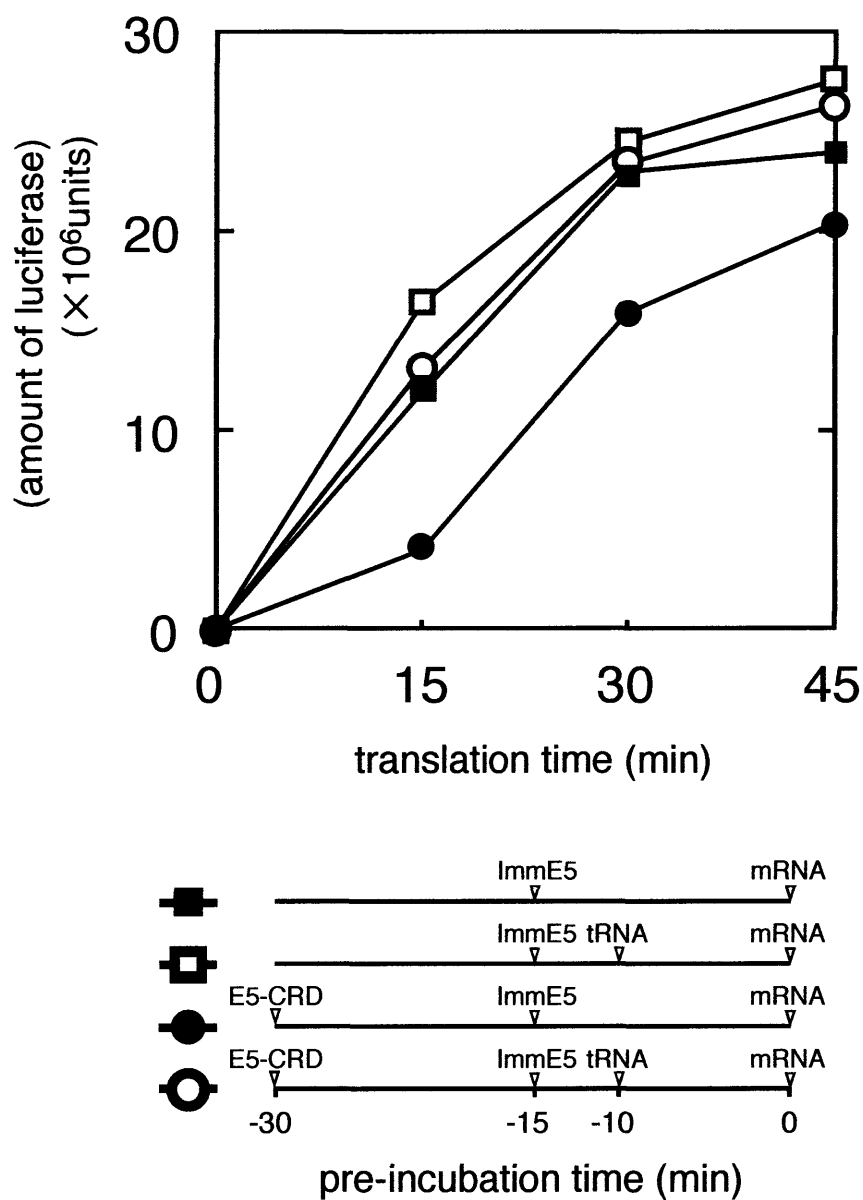


Fig.6-9 E5-CRDが真核細胞*in vitro*タンパク合成に与える影響

ウサギ網状赤血球由来の*in vitro*タンパク合成系に対するE5-CRDの阻害活性を見た。下段の様に反応液に対して前処理をした後、mRNAを添加することによりタンパク合成を開始した。

ウサギ網状赤血球由来のライゼートを用いた時の結果とほぼ同じであったので、以降は小麦胚芽の系は使用しなかった。

### 6.3.6 培養細胞での発現および表現型の観察

E5-CRD を培養細胞内に一過的に発現させた。今回用いた pIRES2-EGFP ベクターは、培養細胞に形質導入するとマルチクローニングサイトに挿入した遺伝子の発現に加え、IRES から EGFP が発現する。そのため、EGFP の発光により、正しくプラスミドが導入された細胞が識別出来るようになっている。導入に用いた細胞は、HeLa 細胞、および COS7 細胞とした。それぞれのプラスミドを各細胞に導入し、15 時間経過してから Hanks' バッファーで洗浄した後、更に 26 時間細胞を培養した。その後、細胞の様子を顕微鏡で観察した。また、同じ視野での EGFP の発光も観察することにより、プラスミドの導入された細胞を確認した(Fig. 6-11)。ベクターのみを導入した細胞においては、高頻度で EGFP により発光する細胞が観察された(Fig. 6-11, top panel)。一方、E5-CRD を発現するプラスミドを導入した細胞においては、全く発光が見られなかった(Fig. 6-11, bottom panel)。このことから、酵母の場合と同様、培養細胞内においても、E5-CRD を発現させることにより、細胞の生育が阻害されることが分かった。E5-CRD を発現させた時に、発光が全く見られないことについて、これが細胞に対し致死活性を示した結果であるのか、もしくは GFP が十分視認出来る程度に活発に細胞が生育することを E5-CRD が阻害した結果であるかは、この結果だけでは分からない。また、E5-CRD を発現させた HeLa 細胞において、シャーレ上に付着出来なくなった結果、丸くなって培地中に浮いたものが多く見受けられる。これは HeLa 細胞は、COS7 細胞に比べ、付着力

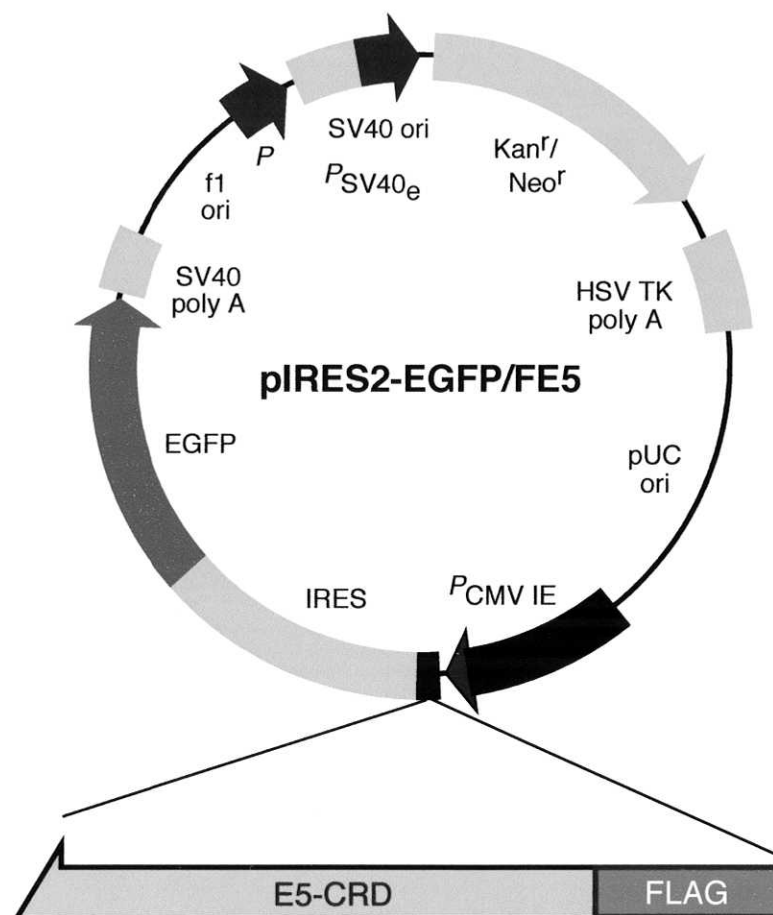


Fig.6-10 動物細胞内での発現プラスミドの構築

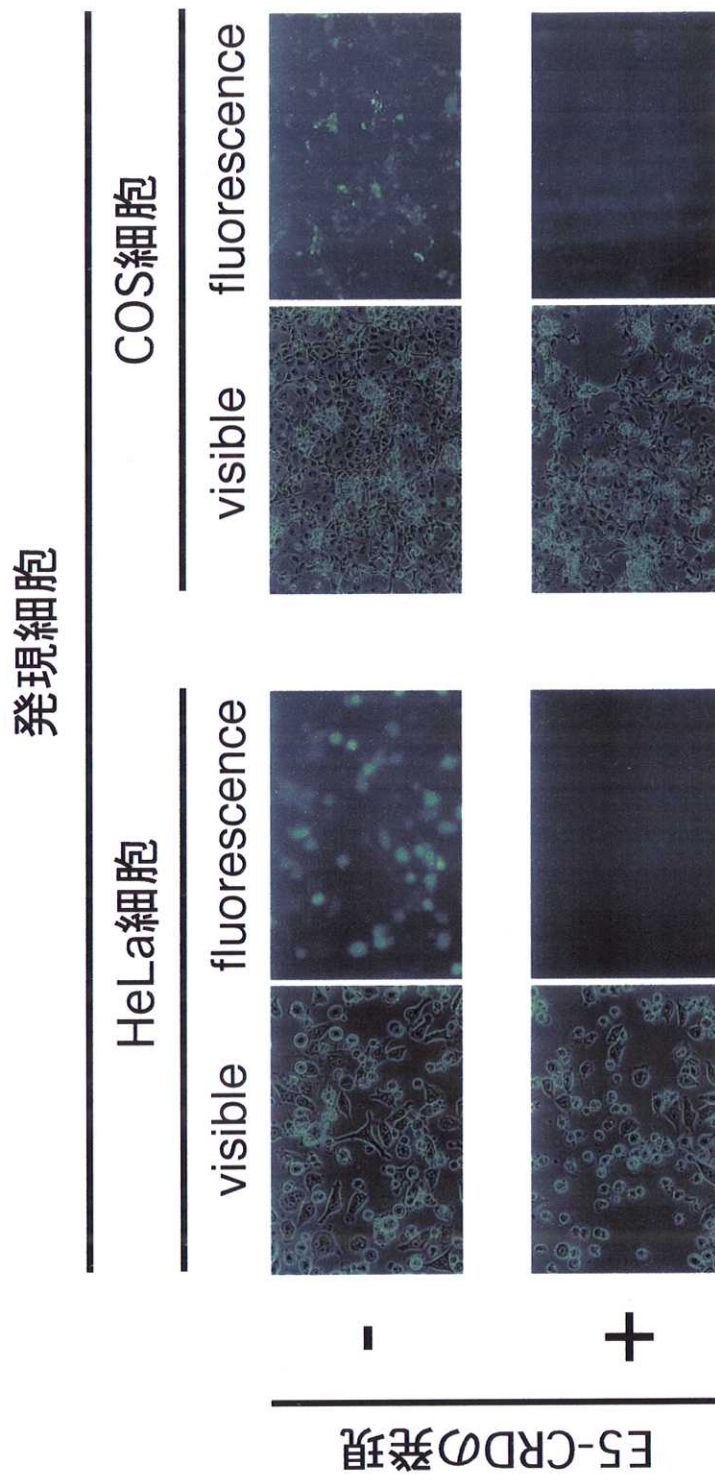


Fig.6-11 E5-CRDを発現させた動物細胞の表現型の観察

E5-CRDを発現するプラスミドを導入し、41時間経ってから、細胞の様子を顕微鏡にて観察した。プラスミドが導入された細胞はIRESよりEGFPを発現するので、細胞が発光することにより確認可能となる。

が弱いことに起因するらしい。

## 6.4 考察

本章の結果から、コリシン E5 の持つ tRNase 活性は、大腸菌のみならず、酵母や動物細胞といった真核細胞に対しても生育阻害を示すことが分かった。野生型 E5-CRD を酵母細胞内で発現させると、最初はコロニー形成が阻害されるが、そのまま培養を続けると、数日後にコロニーが観察されるようになる。このコロニーを、新たに E5-CRD を発現する培地へ移すと、再び生育阻害が見られることから、プラスミドの異常が原因ではない。また、Fig 6-7 において、E5-CRD の発現誘導後、6 時間を経過した頃に、若干であるが細胞数が回復するような傾向が見られるが、これらの間に関係があるかは分からない。E5-CRD 自身が細胞内で不安定なため、一過的にしか存在出来ない可能性も考えられる。以前、マイクロインジェクションにより E5-CRD を動物細胞内へ導入したが、細胞の生育に全く影響が見られなかった。このことも、E5-CRD の不安定さを示す一例であるかもしれない。尚、本章において、「生育阻害」と「生育致死」を曖昧に使用しているが、細胞内で発現させた E5-CRD がどちらの作用を起こしているかを実験的に証明はしていない。今後の課題の一つである。

次に、E5-CRD は真核細胞内において、本当に tRNA のみを切断しているのだろうか。それを示す実験の一つが Fig. 6-9 であるが、本実験においては、ライゼート中での E5-CRD の活性を停止してから mRNA を添加しているため、実験計画の段階から、E5-CRD が mRNA を標的とする可能性を除外してしまっている。従っ

て、E5-CRD が mRNA を切断することによりタンパク合成を阻害する可能性は、今回の結果からは否定出来ない。前述の通り、Fig. 6-8 において、全 tRNA の泳動写真を見ると、野生型 E5-CRD を発現させた時に、tRNA 以外の mRNA も若干ではあるがスミア状になって見られることから、何らかの作用をしていることも考えられる。この点については、今後更に解析を進める必要がある。mRNA と tRNA のどちらが E5-CRD の primary target であるか、ということは、以前の章でも述べた通り大変難しい問題である。E5-CRD は、tRNA に対して特異性が高いことは事実であるが、しかしながら 16S, 23S-rRNA を弱いながらも切断出来ることや、そもそも認識配列が GU という、かなり高頻度で出現する配列であることから mRNA が標的になっている可能性はない、とは断言できない。ただし、原核細胞に限って言えば、mRNA は tRNA に比べターンオーバーが速いため、仮に E5-CRD が mRNA を切断したとしても、次から次へと新しい mRNA が転写されること、もしくは、mRNA はポリソームを形成するため（これは真核細胞にも言える）、E5-CRD の mRNA へのアクセスが妨げられ、mRNA が攻撃を受けにくくなっているのではないかとと思われる。従って、むしろ安定して細胞内に存在する tRNA を標的としていると解釈した方が無理が無いと考えている。

## 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

まず、*in vitro* でのタンパク合成系（MS2 ファージ RNA を鋳型として用いた系）に対して E5-CRD を作用させることにより、E5-CRD がタンパク合成を阻害することを示した（第一章）。また、この阻害効果は、E5-CRD による切断を受けない tRNA<sup>Phe</sup> に依存したタンパク合成系（poly-(U)依存 poly-Phe 合成系）では、E5-CRD を作用させても観察出来なかったことから、E5-CRD は、E3-CRD とは異なりリボソームを標的としないことを裏付けている。また、E5-CRD による感受性大腸菌内の tRNA の切断と殺菌活性との間に高い相関性が見られることが分かった（第二章）。生菌率に影響の出始める濃度より更に低い濃度のコリシン E5 を感受性菌に作用させても、細胞内 tRNA の分解が見られることから、感受性菌はある程度の切断に対して耐えうることが示唆された。別の解釈をすると、感受性菌を死に至らしめるための tRNA の分解量には「閾値」が存在し、コリシン E5 の tRNase 活性がこれを上回ることで殺菌活性を示すとも考えられる。

第三章では、E5-CRD の酵素学的諸性質について調べた。反応溶液中に添加する塩濃度には一定の至適条件があり、高塩濃度では活性は阻害された。また、二価カチオンは必要としないことが分かった。E5-CRD は酵素として大変安定であり、熱や pH による変性作用を受けにくいことが示された。

第四章では、E5-CRD の認識に基質 RNA の GU 配列が必須であることを明らか

にした（コリシン E5 はアンチコドン 1 文字目が Q と G の両方を認識出来るので、正確には QU 配列、もしくは GU 配列と記載すべきところであるが、本論文では混乱をさけるために、特に断らない限り GU 配列に統一した）。また、minihelix を基質として実験を行った結果、GU の両側に存在する塩基も切断効率に影響を与えることが分かり、これらの塩基に対するサブサイトの存在が考えられた。しかしながら、第五章で、GU 配列の両側に塩基を伸ばした、様々なオリゴヌクレオチドを用いて反応速度解析を行った結果、上述の様なサブサイトの存在を示す明確な結果は得られなかった。唯一、GU の 3'リン酸基は活性に大きく影響することから、このリン酸基に対するサブサイトは存在すると考えている。第四章での minihelix を用いた実験結果と、第五章でのオリゴヌクレオチドを用いた実験結果が矛盾する理由としては、minihelix を基質とした場合、GU の両側の塩基を置換することにより、予期しないアンチコドンループの構造変化が生じてしまうからではないかと考えている。E5-CRD の切断活性は、基質の構造に影響を受けると思われ、実際、E5-CRD は直鎖状よりループ構造をとる RNA を効率良く切断する。また、tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> とは異なる位置に GU 配列を持つ tRNA<sup>Thr</sup> が *in vivo* で切断を受けないことから、ループ内での GU 配列の位置も重要である可能性がある。尚、pH 8.5 に調整した反応液中（E5-CRD の至適反応条件はアルカリ側に偏っている）においては、tRNA<sup>Thr</sup> は弱いながらも切断されることから、E5-CRD は本質的には tRNA<sup>Thr</sup> を切断出来る。

以上のことを考慮すると、次のことが考えられる。E5-CRD（コリシン E5 と置き換えても良い）の認識は GU 配列のみで十分であることから、基本的には全ての GU 配列を含む一本鎖 RNA を認識することが出来る。しかしながら、GU 配列を含む RNA



の局所構造が E5-CRD との親和性に影響を与えるために、それぞれの RNA に対する切断効率に差が生じるというものである。また、反応時の pH 環境が E5-CRD の特異性に大きな影響を与えていると考えている。これは、例えば tRNA<sup>Thr</sup> が、pH 8.5 の条件下、*in vitro* で切断を受けるが、コリシン E5 を作用させた感受性菌内で切断を受けないこと、また、高 pH 条件で反応を行うと、本来の切断部位であるアンチコドンループ以外の部位に存在する GU 配列も切断されてしまうという実験結果が根拠となっている。tRNA に特異性が高い理由として、E5-CRD の認識にアンチコドンループの何らかの構造が有利に働いていることも考えられるが、実験的な証拠はない。切断部位がむき出しになっている RNA 因子は割と限られており、このうちの 하나가 tRNA であることが理由であるかもしれない。

第六章では、E5-CRD を発現させた酵母株において、著しい生育阻害が見られることから、本来は大腸菌に対する毒素であったコリシン E5 が、真核細胞を含めた他の宿主に対しても、作用出来ることが示された。また、予想通り、GU 配列を持つ酵母の tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> が特異的に切断された。酵母細胞内での E5-CRD の活性は ImmE5 との共発現により阻害されたことから、細胞内においても、E5-CRD と ImmE5 は複合体を形成し、E5-CRD の活性を中和することが出来ることが分かった。アンチコドンの第 1 文字目と 2 文字目に GU を持つ tRNA は全ての生物種が持つため、コリシン E5 を細胞内で発現、もしくは直接マイクロインジェクションすることにより、理論的には全ての宿主に対して影響を及ぼすことが可能であると思われる。ただし、今回の発現条件では、tRNA 以外の RNA 分子も切断されていた。そのため、今回の実験結果を考察する上で、必ずしもタンパク合成阻害による現象だけを見ているのではない可能性も考慮すべきである。

### 7.1.2 コリシン D について

次に、コリシン D について、現状をまとめる。コリシン D は、Timmis らにより感受性菌のタンパク合成を阻害することが示唆されていた<sup>125),126)</sup>。しかしながら、その作用機構は全く未知であったが、最近、富田らにより、tRNA<sup>Arg</sup> を特異的に切断する活性を持つことが明らかにされ、コリシン E5 と同様、tRNase であることが示された<sup>83)</sup>。同じ tRNase というカテゴリーに属するコリシン D は、コリシン E5 について述べる上で大変重要であるため、本項では発見の経緯から現状までをまとめることとした。

コリシン D は、697 アミノ酸からなる分子量約 75,000 のタンパク質であり、87 アミノ酸からなる分子量約 10000 の ImmD との複合体として生産される。感受性菌内への侵入に際しては、E 群コリシンとは異なり、Fe の取り込みに関与するとされる FepA レセプターを利用する。また、同じ FepA レセプターにより細胞内へと侵入するコリシン B とは、N 末端より 1/2 の領域で高い相同性を示すことから、コリシン D は、他のコリシンと同様、残る C 末端に活性ドメインを持つと想像されていた。富田は、コリシン D を添加した大腸菌培養液より抽出した全 tRNA 画分に、コリシン D の作用に特異的な切断片があることを発見した。この断片を RNA シーケンスしたところ、これらは tRNA<sup>Arg</sup>ICG (tRNA<sup>Arg</sup> はアイソアクセプター tRNA を 4 種類持つので、それぞれのアンチコドンを添え書きすることにより区別する) の 5'末端より 1~34 位、および 39~76 位の二つの断片であった(Fig. 7-1)。この結果から、コリシン D が tRNA<sup>Arg</sup> を切断する活性を持つことが示唆された。そこで、コリシン D を添加した大腸菌より調製した全 tRNA の、個々のアミノ酸に対するアミノアシル化能を調べたところ、Arg に対する活性のみが低下していたことから、

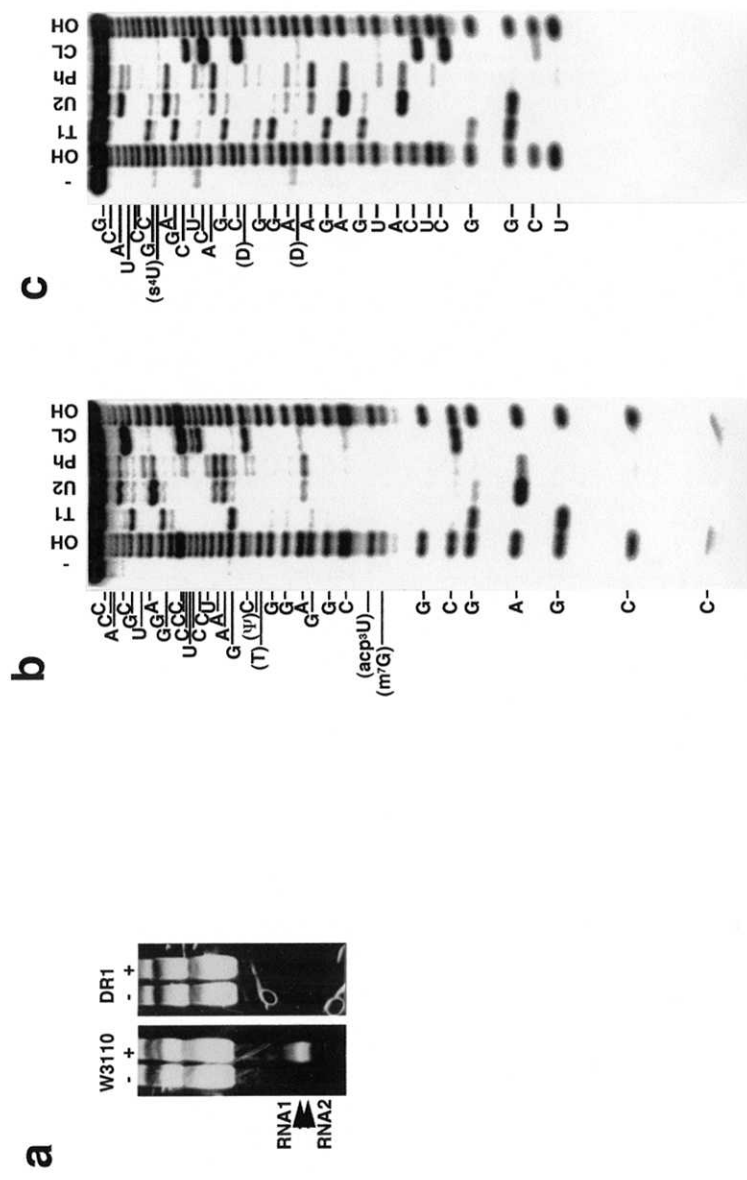


Fig. 7-1 コリシンDを作用させた大腸菌から抽出したRNA断片の解析

コリシンDを作用させた大腸菌より得られるRNA断片を解析した。

(a)コリシンDの作用依存的に見られる断片(RNA1, 2)。+, -はコリシン添加、無添加を表す。W3110,

DR1は、それぞれ野生型大腸菌およびコリシンD耐性大腸菌を表す。

(b)5'末端標識したRNA1断片の配列。tRNA<sup>Arg</sup>ICGの3'側断片と一致した。

(c)3'末端標識したRNA2断片の配列。tRNA<sup>Arg</sup>ICGの5'側断片と一致した。

コリシン D の作用により、*in vivo* で tRNA<sup>Arg</sup> が特異的に切断を受けることが分かった(Fig. 7-2)。また、ノザン解析により、tRNA<sup>Arg</sup>ICG のアイソアクセプター tRNA である tRNA<sup>Arg</sup>CCG, tRNA<sup>Arg</sup>U\*CU, tRNA<sup>Arg</sup>CCU も *in vivo* で切断を受けていることを示した(Fig. 7-3)。しかしながら、この特異的 tRNA の切断が、コリシン D の作用に応答した、他の細胞内生理作用である可能性も考えられた。そこで、より直接的な証拠を得るために、*in vitro* で全 tRNA をコリシン D と反応させ、ノザン解析を行ったところ、tRNA<sup>Arg</sup>ICG, tRNA<sup>Arg</sup>CCG の切断が観察された(Fig. 7-4)。また、この切断は、ImmD を作用させることにより阻害されることから、他の（例えばコンタミネーションによる）ヌクレアーゼの活性によるものではないことも示された。尚、tRNA<sup>Arg</sup>U\*CU, tRNA<sup>Arg</sup>CCU の切断は、今回の反応条件では観察出来なかった。以上のことから、tRNA<sup>Arg</sup> の特異的切断が、コリシン D により直接的に引き起こされる現象であることが示された。次に、切断部位を同定するために固相化プローブ法により単離、精製した tRNA<sup>Arg</sup>ICG, tRNA<sup>Arg</sup>U\*CU, tRNA<sup>Arg</sup>CCU (tRNA<sup>Arg</sup>CCG は単離出来なかった) を *in vitro* でコリシン D と反応させ、切断部位を解析したところ、38 位と 39 位の間であった。ただし、*in vivo* では 34 位と 35 位の間、および 38 位と 39 位の間で切断が起こるようである(Fig. 7-5)。詳細は分からないが、コリシン D の活性により 38 位と 39 位の間で切断された断片が、細胞内の他のヌクレアーゼ等により 2 次的に切断を受けた結果であると解釈している。次に、コリシン D の活性触媒残基の同定を試みた(Fig. 7-6)。これまでに触媒機構が明らかにされている RNase の大部分が活性中心に His 残基を持つことが分かっているが、コリシン D の C 末端領域にも His 残基が存在することから(Fig. 7-6a)、これらの His 残基のいずれかがコリシン D の触媒に関与していることが考えられた。

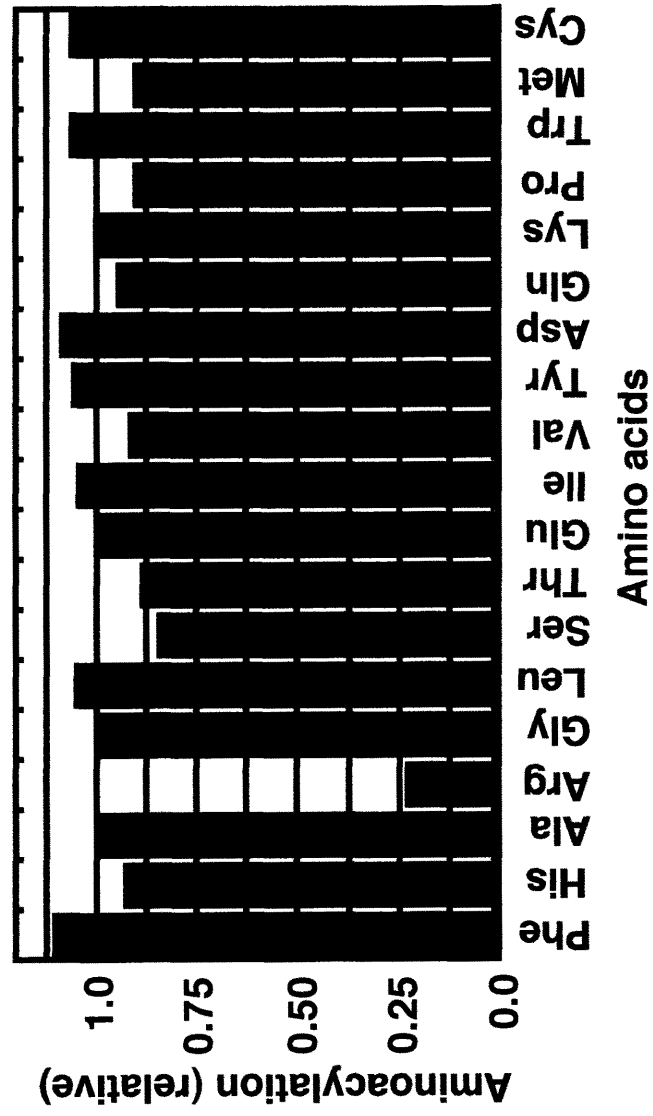


Fig. 7-2 コリシンD処理した大腸菌から抽出した全tRNAのアミノアシル化能

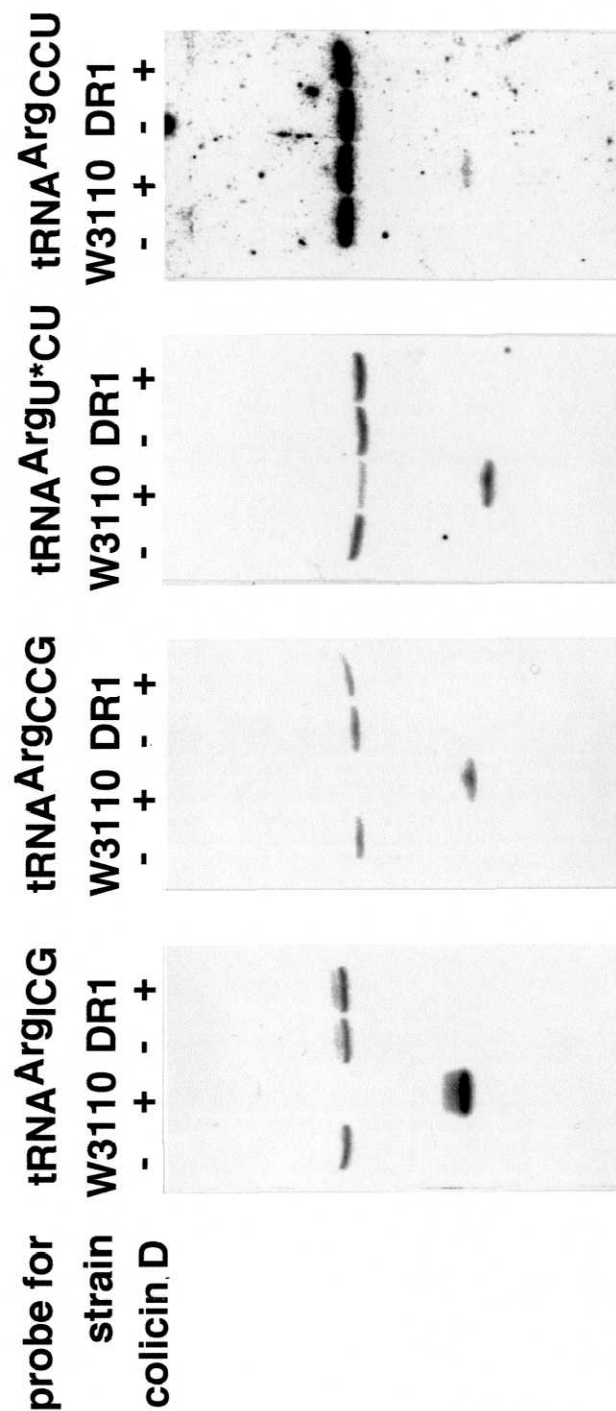


Fig. 7-3 コリシンD処理した大腸菌から抽出したtRNAに対するノザン解析

野生型大腸菌(W3110)、もしくはコリシンD耐性大腸菌(DR1)に対してコリシンDを作用させた後、全tRNAを抽出した。これに対し、上記のtRNAに対して特異的なプローブを用いてノザン解析を行った。

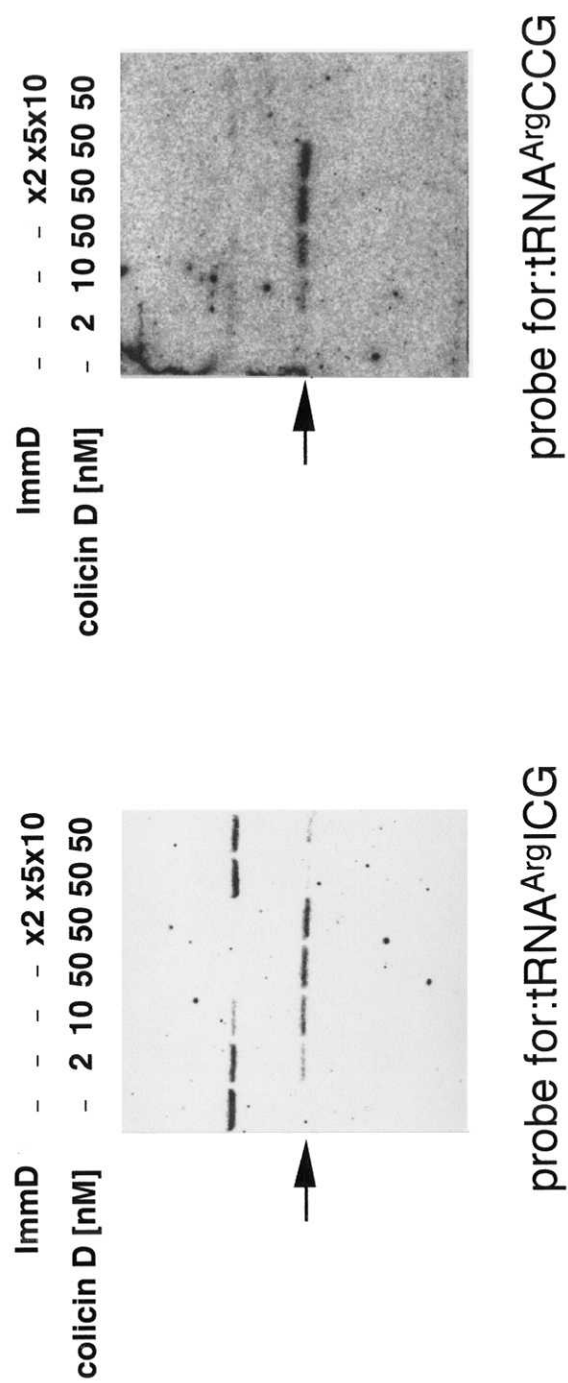


Fig. 7-4 コリシンDと反応させた全tRNAに対するノザン解析

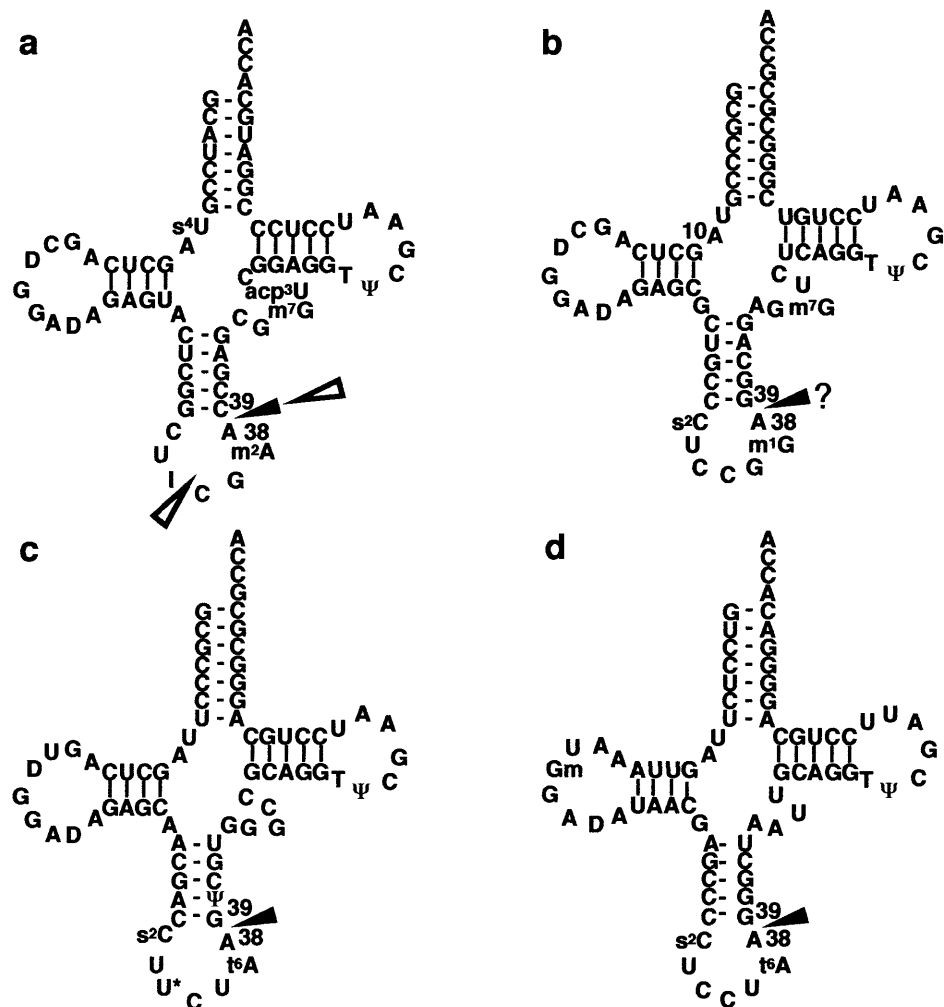


Fig. 7-5 コリシンDの基質tRNAおよび切断部位

(a)tRNA<sup>Arg</sup>ICG (b)tRNA<sup>Arg</sup>CCG (c)tRNA<sup>Arg</sup>U\*CU  
(d)tRNA<sup>Arg</sup>CCU

▲ : *in vitro*での切断部位。△ : *in vivo*での切断部位。  
tRNA<sup>Arg</sup>CCGの場合は推定される切断部位を示した。



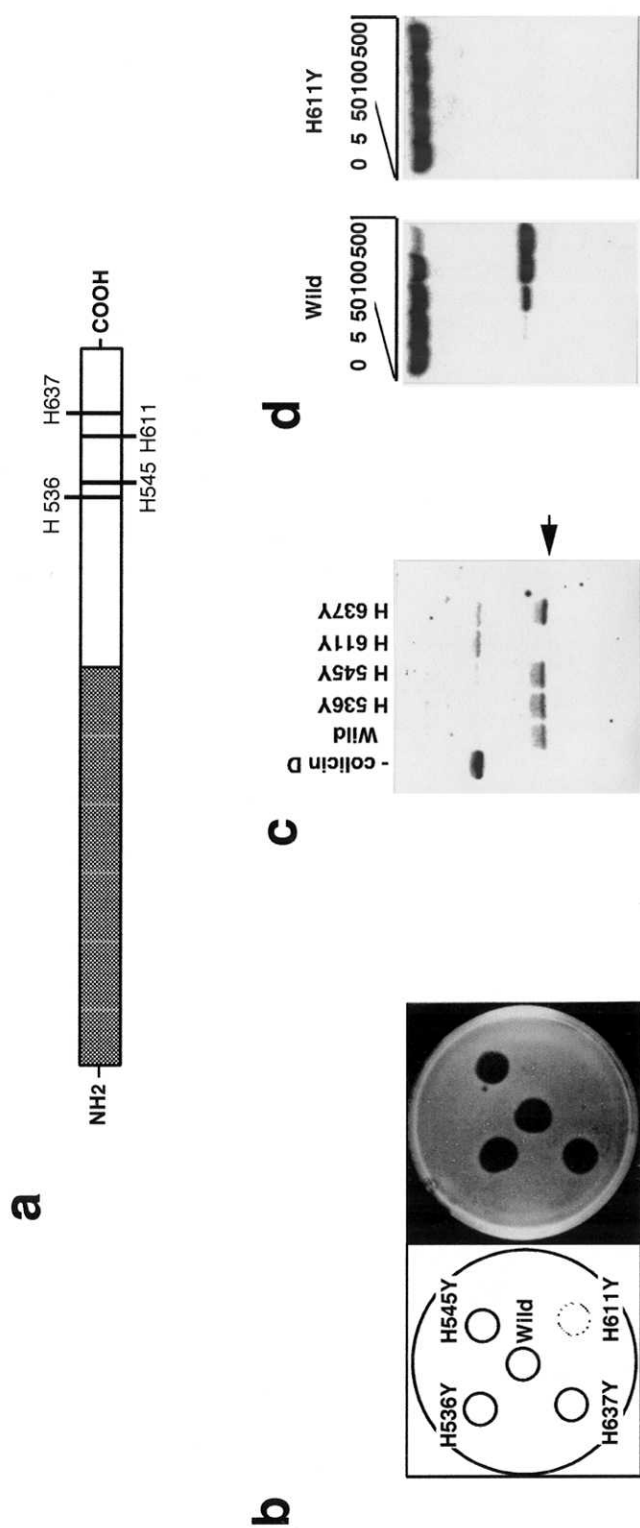


Fig. 7-6 コリシンDの触媒残基の同定

コリシンDのC末端領域に存在するHis残基を、それぞれTyrへと置換した各変異体の活性を調べた。

(a)コリシンDの模式図。C末端領域に4つのHis残基が存在する。

(b)野生型、および各変異型コリシンDの殺菌活性をスポットテストにより調べた。

(c)野生型、および各変異型コリシンDを作用させた大腸菌より全tRNAを抽出し、ノザン解析を行った。

(d)野生型、およびHis611をTyrへと変異させたコリシンDを精製し、tRNA<sup>Arg</sup>と反応させた後、ノザン解析を行った。

そこで、これらの His 残基を個々に Tyr へと変異させた変異型コリシン D の殺菌活性を調べたところ、コリシン D(H611Y)が殺菌活性を失っていたことから(Fig. 7-6b)、611 番目の His 残基が触媒残基に関与していることが示された。また、コリシン D(H611Y)は *in vivo*, *in vitro* の両方で tRNA 切断活性を失っていた(Fig. 7-6, c and d)。

以上の様に、コリシン D は tRNA<sup>Arg</sup> 特異的な tRNase であり、また、tRNA<sup>Arg</sup>ICG を高発現している大腸菌に対してはコリシン D の活性は抑制されること<sup>82)</sup>から、primary target が tRNA であることは明らかである。

また、最近、de Zamaroczy らにより、コリシン D の N 末端より 607 番目の Lys 以降 91 アミノ酸からなるドメインを、大腸菌 S-30 画分による *in vitro* タンパク合成系内で発現させると、反応系内の tRNA を切断することから、コリシン D の tRNase 活性に必要なドメインは、この 91 アミノ酸内に限定されることという結果が報告された<sup>61)</sup>。また、石田により、コリシン D の全長配列を 5'末端より様々な長さに deletion し、コリシン E5 の膜透過、レセプター結合ドメインをコードする遺伝子配列の 3'末端と融合させることにより、コリシン E5::D キメラタンパクを多数作成し、殺菌活性を評価した。その結果、コリシン D の 594 番目の Pro より始まるドメインとコリシン E5 の N 末端ドメインとのキメラタンパクは、野生型より弱いながらも殺菌活性を示すことが分かり<sup>127)</sup>、de Zamaroczy らによる結果と良く一致した。ちなみに、石田により作成された、殺菌活性を持つキメラタンパクのコリシン D ドメインは全て His611 を含んでいるが、このことは、H611 が触媒に関与するとする富田の説を支持した。中西により、開始メチオニンに続けてコリシン D の N 末端より 604 番目の Gln より始まるドメイン (94 アミノ酸) と ImmD との共結晶構造解析が決

定され、これまでの生化学的データとの対応付けを行っている<sup>128)</sup>。

コリシン D が認識する基質残基の同定も、伊藤、中西により試みられている。伊藤により、tRNA<sup>Arg</sup>ICG の A20, C35 , およびディスクリミネーターと呼ばれる 73 位の塩基を置換した変異体 tRNA<sup>Arg</sup> もコリシン D により切断されることが示され、コリシン D の認識は、少なくともアルギニル tRNA 合成酵素(ArgRS)とは違う機構であることが示唆された<sup>82)</sup>。また、転写産物を用いた網羅的な解析が中西により行われており、コリシン D が認識する基質残基が絞られつつある<sup>128)</sup>。

## 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

コリシン E5 の基質認識にとって、それがアンチコドンループ特異的であるかどうかは別としても、最適の基質構造が存在することはほぼ間違いないと思われる。他の章でも述べてきたが、アンチコドンループには U ターン構造という大変特徴的なモチーフ構造が見られる(Fig. 7-7)。U ターンの形成には、33 位の U の存在が大きく影響している。tRNA には、共通して保存されている塩基が多数存在するが、U33 もそのうちの一つであり、これまでに分かっている 2716 種類の tRNA 遺伝子のうち、97%が 33 位に U を持つ。尚、大腸菌においては、全ての tRNA において 33 位は U である。酵母 tRNA<sup>Phe</sup> の結晶構造<sup>100)</sup>や、他の分子に見られる U ターン構造との比較から、U ターンは以下の二つの水素結合により安定化されることが分かっている。

(1)U33 の 2'-OH と A35 の N<sup>7</sup> との間の水素結合

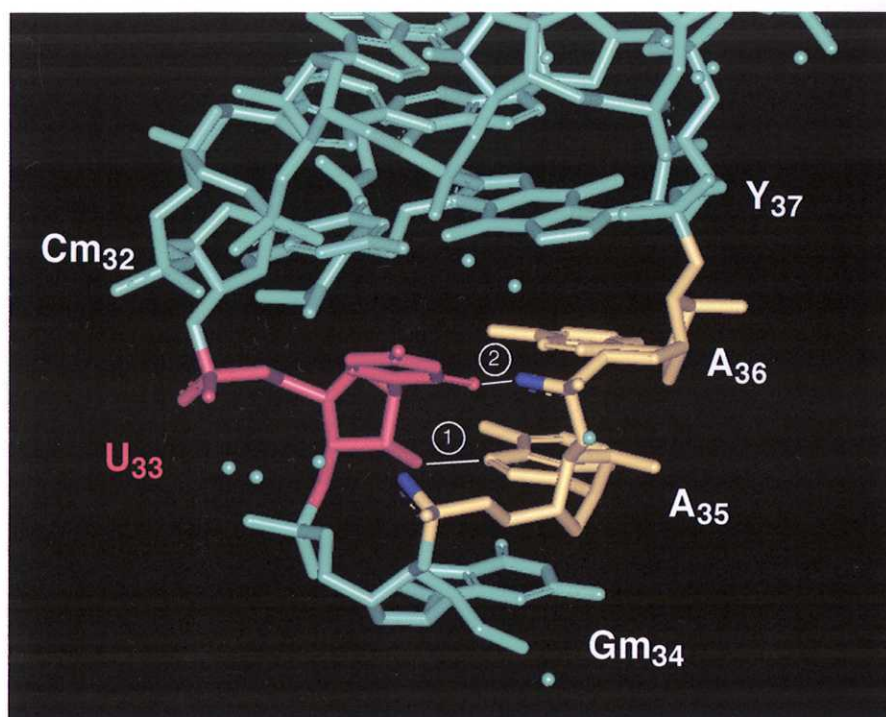


Fig. 7-7 tRNAのUターン構造

酵母由来tRNA<sup>Phe</sup>のアンチコドンループに見られるUターン構造。U33を赤で、A35, A36を黄色で示した。青い部分はリボソームと効率良く結合するのに重要であるとされる酸素原子である。①はU33の2'-OHとA35のN<sup>7</sup>との間の水素結合を、そして②はU33のN<sup>3</sup>-HとA36のリン酸基との水素結合を表す（文献130）より改変）。

## (2)U33 の N<sup>3</sup>-H と A36 のリン酸基との間の水素結合

U33 の存在が、タンパク合成反応に与える影響を、これまでに様々なグループが詳細に検討してきた。Wittenberg は、分子整形術により酵母 tRNA<sup>Phe</sup> の 33 位を、他の様々な塩基（修飾塩基を含む）に置換し、これら変異体のアミノアシル化能を測定したが、野生型と大きな差は見られなかった<sup>129)</sup>。しかしながら、野生型、あるいは transcript を用いた実験結果から、U33 はリボソーム（正確には poly-(U) と 30S サブユニットとの複合体）との結合に影響を与えることが分かった<sup>130)</sup>。すなわち、U33 は tRNA アンチコドンループが正しく機能出来る（つまり正しくリボソームへと結合出来る）ような構造を形成する上で重要であると解釈出来る。リボソームが U ターン構造を介して tRNA と結合するように、コリシン E5 もこの構造を利用して基質 tRNA と結合する可能性は大いにあり得る。この予測が正しいと仮定すると、Fig. 4-5 において、YMH の U7（tRNA の U33 に相当する）を A もしくは G に変えると切断効率の著しい低下が見られることは理にかなっている。しかし U7C が野生型 YMH とほぼ同じ反応進行度を示すことが矛盾する。それは、U7C 変異により、YMH が U ターン構造を形成出来なくなると予想されるからである。U33C の変異は、前述の U ターン形成に関与する相互作用のうち、(2)を阻害する。しかしながら、この水素結合をなくすことにより、アンチコドンループ構造がどこまで構造変化するか、詳細には分かっていない。植物、昆虫、および脊椎動物のイニシエーター tRNA には、33 位に C を持つものがあることが明らかになっている<sup>93)</sup>。何故この位置に C が存在するかは分かっていないが、人由来のイニシエーター tRNA が酵母細胞内で機能することから（酵母のイニシエーター tRNA の 33 位は U である）、33 位が C であっても、アンチコドンループの構造に大きな影響はないのかも知れない。もし

そうであるとすれば、前述の YMH(U7C)のアンチコドンループは野生型 YMH と構造的に大きな差はないため、E5-CRD に対する感受性を損なわなかったとも考えられる。

### 7.2.2 結晶構造から見る E5-CRD の基質認識

他の章でも述べたが、東京農業大学矢嶋俊介博士により、E5-CRD と ImmE5、および E5-CRD と基質アナログである dGpdU との共結晶がそれぞれ解かれた<sup>131)</sup> (Fig. 7-8)。ここで使用した基質アナログは dGpdU であるが、本論文において、E5-CRD は GpU を切断しないという結果を得ており、不都合のように見える。しかしながら、井上により、E5-CRD が効率が著しく悪いながらも GpU を切断するということが示され、この構造に基づいて議論を行うことに本質的な問題はないと考えていた。しかし、その後得られた dGpdUp と E5-CRD との共結晶構造と比較すると、Lys25 と Lys60 の側鎖の向きに違いが見られることから、用いた基質アナログによる結晶構造の違いを無視することは出来ず、今後詳細に比較検討する必要がある。

さて、dGpdU と E5-CRD との共結晶構造を見ると、dGpdU は、 $\beta$ シートを底にして左側にループ構造、 $\beta$ シートを裏打ちする $\alpha$ ヘリックス、そして C 末端ループより構成されたポケットの内部にはまり込む形で存在した (Fig. 7-8a, top)。また、ImmE5 は、E5-CRD の活性中心と直接相互作用することにより活性を阻害していることが明らかになった (Fig. 7-8a, bottom)。他のヌクレアーゼ型コリシンのインヒビターは、直接活性中心をふさぐのではなく、活性ドメインとの相互作用により、基質が活性ドメインにアクセスするのを防いでいる<sup>35)-37)</sup>という点で、ImmE5 の阻

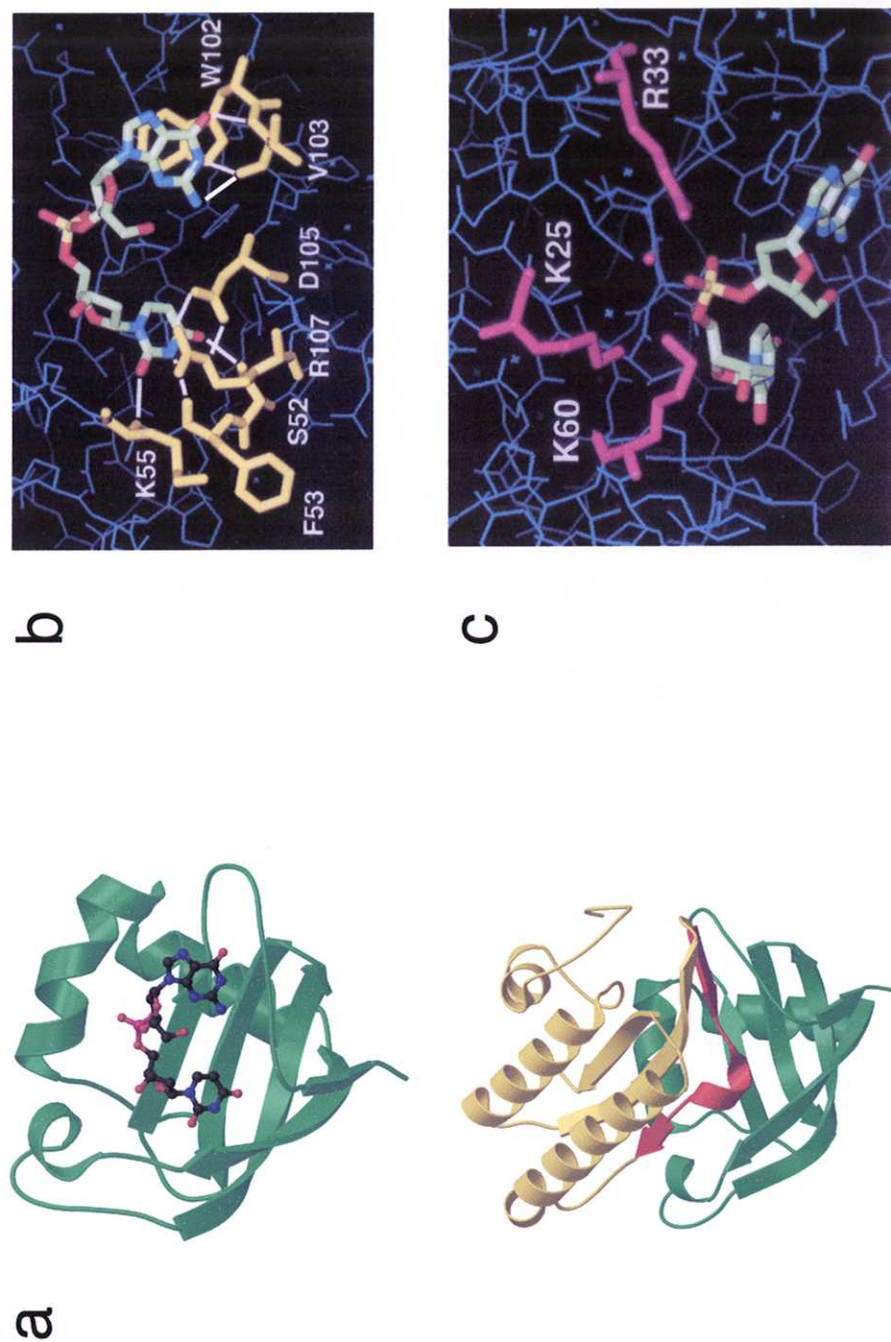


Fig. 7-8 E5-CRDの結晶構造

(a, top) E5-CRDと基質アナログであるdGpdUとの共結晶構造。(a, bottom) E5-CRDとImmE5との共結晶構造。(b) 基質認識に関与すると想像されるアミノ酸残基 (白線は予想される水素結合を表す)。(c) 触媒反応に関与すると想像されるアミノ酸残基 (K25とR33との間に水分子が見られる)。



害機構は他のヌクレアーゼ型コリシンと異なる。

dGpdU とタンパク表面のアミノ酸との相互作用は以下のものであった(Fig. 7-8b)。まず、G と Trp102 のインドール環とがスタックしている。更に、G は以下の三つの水素結合により固定されている。

(1)O<sup>6</sup> と Val103 の主鎖の N

(2)N<sup>1</sup> と Val103 の主鎖の O

(3)N<sup>2</sup> と Val103 の主鎖の O

この G を A に置換したとすると、これらの水素結合は形成されないと予想されることから、認識に G が必須であることが分かる。また、G が Q であったとしても、Q に見られる修飾部位はちょうど外側に向いていることから、これら水素結合の形成に全く影響を与えない。

また、U は以下の三つの水素結合により固定されている。

(1)O<sup>4</sup> と Ser52 の側鎖の O

(2)N<sup>3</sup> と Phe53 の主鎖の O

(3)O<sup>2</sup> と Lys55 の主鎖の N

更に、このピリミジン環が Asp105 のカルボキシル基と Arg107 のグアニジノ基から形成される疑似リングとスタックしている。仮にこの U を C に置換すると、たった一つの水素都合しか形成されなくなり、これも U を厳密に認識している理由であると思われる。酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> は、アンチコドンが GΨA となっているが、第六章の結果より、コリシン E5 は *in vitro* および *in vivo* でこの tRNA を切断する。よって、コリシン E5 は U とΨとを識別していないことになるが、U とΨの塩基の構造を比較すると、コリシン E5 との間に水素結合を形成するとされる 2, 3, 4 位は両塩基と



も共通しているので、上記の実験結果は全く矛盾しない。また、スタッキングに加えて、水素結合のほとんどが主鎖との間に形成されるため、変異の導入による基質認識の改変は大変困難であると思われる。GU の両側の塩基に対するサブサイト構造については、今回の構造データからは全く情報は得られない。少なくとも minihelix、理想的には tRNA との共結晶構造に基づかないと、正確な議論は出来ないのではなかろうか。

dGpdU と E5-CRD との共結晶構造は、反応触媒機構を明らかにする上でも大変有益であった(Fig. 7-8c)。まず、Lys25, Arg33, Lys60 が dGpdU の dG と dU との間の、切断を受けるリン酸基に対して側鎖を伸ばしていた。これらのアミノ酸の pKa は全て高く、仮に真の触媒残基であるとする、E5-CRD の至適 pH 条件がアルカリ側に偏っていることは理にかなっている。反応機構が詳細に明らかにされている RNase A においては、反応第一段階の 2',3'-サイクリックの形成時に、一般塩基とされる His12 の側鎖が 2'-OH に、一般酸とされる His119 の側鎖が 5'-O の近傍に向いている。これに E5-CRD と基質アナログとの共結晶構造を当てはめて考えると、E5-CRD においては Arg33 が一般塩基触媒であり、Lys25、もしくは Lys60 が一般酸触媒であると想像されるが、井上により出された最新のモデルでは、直接触媒反応を行うのは水分子であるとされることはすでに述べた通りである。

構造データから予想される触媒残基、および基質認識残基の正当性は、コリシン E5 のホモログとの比較からも保証される。ピオシンは緑膿菌のゲノムにコードされているバクテリオシンであり、コリシンと相同性が認められるものが多いことから、コリシンとピオシンとの間に進化的な関連性があることが指摘されている。最近、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株のゲノムが解読された結果、新しいタ

イプのピオシンが発見され、ピオシン S4, S5 と名付けられた。このうち、S4 はコリシン E5 の活性ドメインと高い相同性が認められる<sup>91),132)</sup>。尚、このピオシンが疑似遺伝子なのか、またはバクテリオシンとして実際に機能しているかは明らかになっていない。高萩は、ピオシン S4 の tRNase ドメイン(S4-CRD)を発現するプラスミドを構築し、S4-CRD を大腸菌内で発現、精製することに成功した。その結果、S4-CRD は、コリシン E5 よりは弱いながらも、同じ特異性により tRNA 切断活性を示した<sup>133)</sup>。S4-CRD においても、反応触媒に関与すると予想されている Lys25, Arg33, Lys60 は完全に保存されていた。一方、G と水素結合を形成する Val103 が Ala に、U と水素結合を形成する Phe53 が Ser へと置換していた。このことが、クローニングした S4-CRD の活性が弱い原因かも知れない。しかし、Val103, Phe53 の水素結合は主鎖からのものであるため、これらの置換は影響がない可能性もある。

### 7.2.3 TRECK 法への利用について

第六章の結果から、E5-CRD を TRECK 法に応用する利点は十分にあると考える。ただし、実際の実験計画の上で、いくつかの問題が指摘される。一つは、E5-CRD による作用が、筆者の意図する致死作用なのか、それとも単に生育を阻害しているに過ぎないのかがはっきりしていないことである。培養を続けることにより生育が回復することから、単に増殖を阻害するだけであるとも考えられるが、本質的には致死作用を及ぼすが、何らかの理由で殺しきれなかった細胞が再び増殖するということも考えられる。これについては、E5-CRD の発現を誘導した後、生菌、死菌を染色等により識別することにより判断可能であろう。

Fig. 6-6 の実験において、E5-CRD を発現させた状態で培養を続けると、最終的

には他のコントロール株と同等にまでコロニーが形成されるようになる。Pines らにより、酵母細胞内で RNase III を発現させると、やはり耐性菌と思われるコロニーが形成されるが、これは培養を続けることにより RNase III のオープンリーディングフレーム内に変異が入ってしまった結果であると結論づけられている<sup>134)</sup>。しかしながら、E5-CRD の場合、耐性菌と見られるコロニーを再度 E5-CRD を発現する培地へと移すと、再びコロニーを形成しなくなることから、少なくともプラスミドの変異が原因ではない。実験的な証拠はまだ出そろってはいないが、我々は、E5-CRD が細胞内で（おそらくはプロテアーゼ等により）切断されることが原因であることを示唆するデータを得ている。今後、詳細に検討する予定であるが、これが事実であるとすると、TRECK 法へ用いた時も同様の現象が起これと予想される。以前、応用動物科学専攻千田和広教授により、マイクロインジェクション法を用いて E5-CRD を動物細胞の導入を行っていただいたが、動物細胞の増殖に全く影響を与えなかった。今回の結果を考慮すると、このことも E5-CRD が細胞内で分解を受けることが原因であるかも知れない。

### 7.3 今後の展望

本論文では、生化学的な手法を中心として、コリシン E5 の基質認識について検討した。しかしながら、この方法ではどうしても限界がある。今後は、構造データを基にした議論を行いたい。そのためにはオリゴヌクレオチドではなく、少なくとも minihelix と E5-CRD との共結晶構造の解析が必要である（オリゴヌクレオチドと E5-CRD との共結晶化は矢嶋博士により試みられたが、よい結晶は得られなかった）。ただし、minihelix であっても、天然のステム構造を正しくとっているか不安

な点もあるので、理想的には tRNA 全長を用いたい。*in vitro* 転写により tRNA を大量調製する系も確立されているので、結晶化に必要な量を供給することは十分可能である。tRNA と E5-CRD との共結晶構造が得られれば、第五章の結果と比較することにより、E5-CRD のサブサイト構造について、更に詳細な議論が出来るであろう。E5-CRD に最適な基質 RNA のループ構造に関して、新たな知見が得られることも期待される。矢嶋博士により、tRNA の構造と E5-CRD とのドッキングシミュレーションも行われたが、こうしたシミュレーションにおいては、用いた tRNA の構造が、E5-CRD と実際に結合した時の構造を反映したものではないため、正確性を欠いてしまう。やはり、tRNA との共結晶構造から議論をすることが正しい解釈へとつながるであろう。

E5-CRD の応用的利用法であるが、TRECK 法への適用のためには、最低限 E5-CRD の不安定化を引き起こす要因を突き止める必要がある（それ以前に、本当に不安定化が原因となっていることを証明することが先決ではあるが）。そのためには、細胞内で E5-CRD がどのような挙動を取るかを、詳細に調べることを第一に行うべきであろう。これに関して現在、間接蛍光抗体染色法により E5-CRD の局在化を解析中である。不安定化の要因がプロテアーゼであれば、このプロテアーゼの標的配列を改変することにより、安定化が図れるかも知れない。TRECK 法も含めて、E5-CRD が細胞毒として応用的に利用されるためには、少なくとも標的細胞内で持続的に効果を発揮する必要がある。毒性がどれほど強力であっても、E5-CRD には特異的インヒビターが存在するので、標的以外の細胞に危害を加えないように工夫することは十分可能である。最終的には、細胞質 tRNA の傷害が引き金になり生じる細胞応答について調べてみたい。tRNA のみを分解する細胞毒性タンパクには、*Rana*

*pipiens* の卵や初期胚から得られる RNase である onconase<sup>16),135)</sup>や、血管新生に関与するとされる angiogenin<sup>22),23)</sup>がある。しかしながら、これらは個々の tRNA に対する特異性はなく、tRNA 全てを分解してしまうため、細胞内での生理作用変化の解析に困難を伴う。これを克服出来るのは、特定の tRNA を切断出来るコリシン E5 や D である。

新しい tRNase の探索も行いたい。後ほど述べるが、tRNA を特異的に切断する酵素がこれらだけであるとは思えないからである。しかしながら、現在のところは有効な探索方法は見つかっていない。網羅的に探索を行うことは、ほとんど不可能と言ってよいであろう。出血性大腸菌 O157:H7 もコリシンを生産する株が多数存在するが、生産されるコリシンは、不思議なことに大部分がコリシン D であり、全体の 50%以上を占めている<sup>136)</sup>。そこで、新規 tRNase の探索を目的として、我々の持つ O157 株コレクションのうち、既知の透過経路、および免疫性による分類に当てはまらないコリシンを生産する株に的を絞って調べているが、今のところ新しい発見には至っていない。最近、日本の病原性微生物ゲノムプロジェクトにより、O157:H7 堺株の全塩基配列が決定された<sup>137)</sup>。O157 株のゲノムを K12 株のものと比較すると、約 4.1 Kbp に渡る領域が両者の間で高い相同性を示すことから、遺伝子構造の基本骨格は同じであると考えられるが、tRNA 遺伝子の構成に大きな違いが見られるという。O157 株には K12 株にはない tRNA 遺伝子が存在するが、これらの tRNA が認識すると考えられるコドンは ATA, CGA, CGG, AGA, AGG である。これらのコドンは、O157 ゲノムのうち、K12 株と共通である約 4.1 Kbp の領域ではきわめて使用頻度が低いのに対し、O157 株に特異的なオープンリーディングフレームにおいて使用頻度が劇的に上昇する。このことから、これらのコドンは O157 株特異的な

タンパク質の発現に関与していると想像されているが、興味深いことに ATA 以外の全てが tRNA<sup>Arg</sup> によって認識される。この事実と、O157 株においてコリシン D 生産株が多いことを考慮すると、次の様な仮説が考えられる。つまり、O157 株の生命維持に重要な役割を持つ遺伝子の発現に、上記のコドンが優先的に使用されており、一方、コリシン D は、tRNA<sup>Arg</sup> を介して、これらの遺伝子の発現を抑制することにより、効率的に異種の O157 株を殺すというものである。O157 株のゲノム配列から、この株が多くの外來性遺伝子を獲得したことが分かるが、これらの外來性遺伝子は、自身の発現の効率化のために tRNA 等、元の宿主の翻訳システムを伴って伝播するという説がある。そうであるとすれば、これを特異的に破壊するシステム、つまり、コリシン D が存在し、標的遺伝子の伝播を進化の上で追跡しているとも考えられる。

#### 7.4 終わりに

現在までに、tRNA を特異的に切断するとされる酵素として、コリシン E5, D の他に、アンチコドンヌクレアーゼ(ACNase, PrrC)<sup>138)</sup>が存在する(Fig. 7-9)。アンチコドンヌクレアーゼは、*prr* locus を持つ大腸菌に T4 ファージが感染することにより誘発される酵素であり、自身の tRNA<sup>Lys</sup> を切断し自殺することにより、T4 ファージの感染が他の細胞へと広がることを阻止する。尚、T4 ファージは、自身の持つ T4 DNA リガーゼ、および T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより、PrrC により切断された tRNA<sup>Lys</sup> を修復し、更に感染を続けようとする。コリシンはバクテリオシンであり、一方、PrrC は制限修飾系を構成する因子である等、これら tRNase は全く異なる形態を取るが、tRNA を特異的に切断することにより細胞死を引き起こすという

first letter	second letter			
	U	C	A	G
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
	UUC	UCC	UAC	UGC
	UUA Leu	UCA	UAA TRM	UGA TRM
	UUG	UCG	UAG TRM	UGG Trp
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
	CUC	CCC	CAC	CGC
	CUA	CCA	CAA Gln	CGA
	CUG	CCG	CAG	CGG
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
	AUC	ACC	AAC	AGC
	AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met	ACG	AAG	AGG
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
	GUC	GCC	GAC	GGC
	GUA	GCA	GAA Glu	GGA
	GUG	GCG	GAG	GGG

colicin D

colicin E5

PrrC

Fig. 7-9 tRNase World?

共通点もある。何故、特定の tRNA のみを切断する必要があるのでしょうか。細胞毒性を示すだけであるならば、全ての tRNA を非特異的に分解するだけで十分ではなかろうか。実際、前項でも述べたように、onconase や angiogenin は個々の tRNA に対する特異性はない。この謎に関して、次のような仮説を立てたい。それは、コリシン E5 や D の進化上の祖先は、今のようなバクテリオシンの形態ではなく、tRNA をベースとした何らかの調節系に関与していたのではないかということである。tRNA 分子の役割は、アミノ酸をリボソームへと運ぶアダプターとしてだけではない。有名なところでは、HIV の逆転写酵素が tRNA をプライマーに用いていることであろう<sup>139)</sup>。また、昨今、タンパク質をコードしていない RNA 分子(noncoding RNA; ncRNA)が細胞内の制御に係わっているとの報告<sup>140)</sup>が後を絶たないが、tRNA が未知の機能により、これに係わっている可能性も考えられる。仮に何らかの役割を担っているとして、その tRNA の役割が重要であれば重要である程、発現制御に厳密性を要するであろう。このような場合、発現を抑制するためには、プロモーターによる発現制御だけでは不十分であり、leaky に発現した tRNA 分子を積極的に分解する、つまり tRNase のようなものが必要であろう。こう考えると、tRNA の成熟化に関与する 5'および 3'tRNase は、成熟化した tRNA を次々に壊していくコリシン E5, D とは、表と裏の関係にあるとも解釈出来る。

さて、最後に、もう一つの仮説を立てたい。それは、個々の tRNA を特異的に分解する酵素群、つまり“tRNase family”とでも呼ぶべき集団の存在である<sup>141)</sup>。幸運にも、我々はコリシン E5 や D に出会うことが出来たが、実はこれらは氷山の一角であり、他にも我々に発見されることを待ち続けている tRNase が存在しているのではなかろうか。今後の tRNase の発見は、まだ見ぬ“tRNase world”への入り口へ



と続いているのかも知れない。

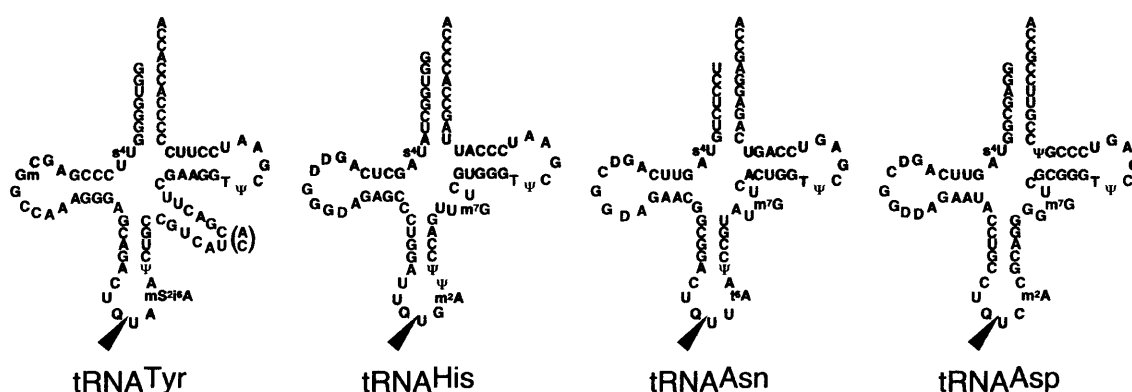
## 論文の内容の要旨

論文題目     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

氏 名     小 川   哲 弘

生物は、様々な手段を用いてそれぞれのニッチを守っている。微生物における「手段」とは、例えば抗生物質の生産や、バクテリオシンと呼ばれる抗菌作用を示す一群のタンパク質の生産である。本研究テーマであるコリシンは、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。ビタミン B<sub>12</sub> の取り込みに必須な BtuB レセプターを介して感受性菌内へと侵入するコリシンを E 群コリシンと呼んでいる。E 群コリシンには、これまでに(1)イオンチャンネル型、(2)DNase 型、(3)16S-rRNA を切断してタンパク合成を止める RNase 型、の三つの作用機構が知られていた。著者は、修士論文において、これまで殺菌のメカニズムが明らかにされていなかったコリシン E5 が、*in vitro* および *in vivo* で感受性菌の tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> を切断することを明らかにし、作用機構として第 4 番目の「tRNase 型コリシン」の存在を示した。コリシン E5 の基質 tRNA には共通してアンチコドン 1 文字目にキューイン (Q 塩基) という修飾塩基が存在し、切断はこのキューインの結合したリボースの 3'側で起こる。大腸菌細胞内には、およそ 50 種類もの tRNA 分子が存在する。このような中で、コリシン E5 がどのようにして特定の基質 tRNA のみを認識、切断するか大変興味深い。それぞれの tRNA を特異的に認識する酵素の代表例はアミノアシル tRNA 合成酵素である。この一群の酵素は、分子量 4 万~26 万であり、アンチコドンやディスクリミネーター塩基等の数塩基を厳密に認識して、正しい tRNA を見分けている。一方、コリシン E5 の C 末端活性ドメイン

(E5-CRD と呼ぶ) は分子量 1 万程度であり、アミノアシル tRNA 合成酵素のような複雑な基質認識は期待出来ない。そこで、本論文では、コリシン E5 の基質認識機構の解明を目指した。また、コリシン E5 は tRNA という、全ての生物を通じて普遍性の高い分子を切断する「細胞致死活性因子」であり、近年話題となっている Drug Delivery System との組み合わせにより、癌細胞等を標的とした創薬への利用が考えられる。こうした応用的な利用方法を探索する第一段階として、真核細胞内で E5-CRD を発現させ、それに対する細胞応答を調べた。



コリシンE5の切断する大腸菌tRNA (矢印は切断部位を表す)

## 1. コリシン E5 の持つ tRNA 切断活性と殺菌活性

コリシン E5 は、1982 年に Mock や Pugsley により、感受性菌のタンパク合成を阻害することが示唆されていた。そこで、E5-CRD を精製し、これが *in vitro* でタンパク合成阻害活性を示すかどうかを調べた。E5-CRD は、大腸菌由来のタンパク合成系を阻害し、この阻害活性は、インヒビターである ImmE5 の添加により抑制された。次に、コリシン E5 の tRNA 切断活性が、殺菌活性の原因となっているかどうか調べた。段階的に希釈したコリシン溶液を加えて大腸菌を培養した後、生菌数をコロニー形成数から計算して生菌数を調べる一方、集菌した菌体から RNA 画分を抽出した。この RNA に対し、基質 tRNA に相補的なプローブを用いてノザン解析を行い、細胞内の tRNA の状態を追跡した。結果は、生菌数に影響が出始める限界より低いコリシン濃度で tRNA<sup>Tyr</sup> と tRNA<sup>Asp</sup> の切断が観察された。尚、基質 tRNA の、切断活性に対する感受性には差があり、tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> は感受性が高いが、tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup> は低く、生菌数に影響が出始める頃から切断片が確認され始めた。以上の結果から、コリシン E5 による tRNA の切断と生菌数との間には高い相関が見られることが示され、コリシン E5 の殺菌活性の原因が tRNA 分解であると判断した。

## 2. コリシン E5 の酵素学的性質および基質上の認識残基の同定

E5-CRD は、tRNA<sup>Tyr</sup> のアンチコドンステム/ループを擬して作製した minihelix (YMH と呼ぶ)を切断する。そこで、YMH を用いて E5-CRD の酵素学的性質を調べた。E5-CRD は EDTA を添加しても十分活性があることから、二価カチオンは要求しないことが分かった。また、至適 pH 条件はアルカリ側に偏っていることが分かった。

次に、E5-CRD の認識する tRNA 上の残基の同定を試みた。E5-CRD の基質 tRNA に共通する塩基配列はアンチコドンループ内の UQU である。これらの tRNA に修飾塩基キューインを導入する酵素である tRNA グアニントランスグリコシラーゼは、前駆体 tRNA のアンチコドンループ内の UGU 配列を認識する。そこで、E5-CRD も同じ UGU 配列を認識する可能性を考え、YMH のループ内の UGU 配列に変異を導入し、その切断感受性から、認識に必須な塩基を調べた。その結果、UGU のうち、GU 配列を変化させると切断されなくなった。また、tRNA<sup>Lys</sup> のアンチコドンステム/ループを擬した minihelix に GU 配列を導入したところ、E5-CRD の切断を受けた。以上より、GU 配列が認識に必須であることが明らかになった。

## 3. コリシン E5 の切断活性に影響を与える因子について

tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> のアンチコドンステム/ループを擬した minihelix (順に GGYMH, GGHHMH, GGNMH, GGDMH と呼ぶ) を作製し、これらを基質として E5-CRD の活性を調べた。結果は、GGYMH>GGDMH>GGHHMH>GGNMH の順に、活性の低下が見られた。この原因が、E5-CRD の持つサブサイトによると考え、サブサイトと相互作用する可能性がある GU の両側の塩基に対し変異を導入し、これらの変異体 minihelix に対する E5-CRD の活性を調べることにした。まず、YMH の GU 配列の 5'側の塩基を、他の塩基に置換した変異体 minihelix(YMH(U7A), YMH(U7G), YMH(U7C))を作製し、活性を調べた。その結果、GU の 5'側にピリミジン塩基が存在すると高い活性を示した。一方、プリン塩基の場合、活性は著しく低下した。次に、GU の 3'側の塩基 (アンチコドン 3 文字目に相当) を、他の塩基に置換した変異体 minihelix(YMH(A10G), YMH(A10C), YMH(A10U))を作製し、同様に活性を調べた。その結果、A>C>G>U の順で活性が低下した。前述の天然型 minihelix において、GGYMH>GGDMH>GGHHMH>GGNMH の順に活性が低下することを示したが、これらのアンチコドン 3 文字目はそれぞれ A, C, G, U であり、アンチコドン 3 文字目の塩基が基質の感受性の決定因子になっている可能性がある。また、YMH とループ部分の配列は同一であり、ステムを作らないようにデザインした minihelix(YMHL)と YMH に対する E5-CRD の活性を比較したところ、ステムを形成する YMH の方が高いことが分かった。

#### 4. コリシン E5 の最小基質の同定、およびオリゴヌクレオチドに対する反応速度解析

様々なジヌクレオチドを作製し、E5-CRD と反応させた。その結果、GpUp が切断されることが分かった。これに対し、3'末端にリン酸基を持たない GpU は、今回の条件では切断は見られなかった。GpUp を基質とし、各 pH 条件における反応速度を解析したところ、pH の上昇に応じて、 $k_{cat}$  値の上昇が見られた。一方、 $K_m$  値には著しい変化は見られなかった。 $k_{cat}/K_m$  に基づく曲線は、前述の minihelix の反応進行度に基づいて描いた曲線とほぼ一致した。

次に、GpUp の両側に塩基を伸ばしたオリゴヌクレオチドに対する反応速度を解析したが、GpUp の両側の塩基は反応速度論量に大きな影響を与えなかった。このことから、GU の両側の塩基に対するサブサイトは存在しないと考えられる。一方、UpGpUp の  $k_{cat}/K_m$  値は、UpGpU のものと比較すると約 30 倍大きい。これは、GpUp と GpU との間に見られる結果と一致する。これより、U の 3'末端のリン酸基に対するサブサイトが存在する可能性がある。

#### 5. E5-CRD の酵母細胞内での発現

大腸菌と同様、酵母の tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> もアンチコドンに GU 配列を持つ。実際、E5-CRD は、*in vitro* で酵母由来の上記の tRNA を切断することから、E5-CRD は酵母に対して致死活性を示す可能性がある。そこで、E5-CRD と ImmE5 とを、独立のプラスミドに導入し、これらのプラスミドを用いて酵母を形質転換した。E5-CRD はメチオニン非存在下で、そして ImmE5 はガラクトースの添加により活性化するプロモーターで発現制御を行った。結果は、E5-CRD を発現すると、形質転換酵母の生育が阻害された。また、ImmE5 を同時に発現することにより、生育が回復した。一方、活性中心変異体 E5-CRD を発現させた株では生育に全く影響は見られなかった。また、野生型 E5-CRD を発現している酵母内の tRNA の状態をノザン解析により調べたところ、tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Asp</sup> の切断が見られた。以上のことから、E5-CRD は酵母に対して生育阻害効果を発揮することが示され、大腸菌のみならず、真核細胞を含めた様々な宿主に対しても作用しえりと結論した。将来的には、標的細胞へ特異的に送り込み、不要な細胞を消失させる治療技術への応用が期待される。

## 引用文献

- (1) Watson, J. D. & Crick, F. H. C., *Nature* **171**, 737 (1953).
- (2) Crick, F. H. C., *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**, 138 (1958).
- (3) Hoagland, M. B., Stehpenon, M. L., Schott, J. F., Hecht, L. I. & Zamecnik, P. C., *J. Biol. Chem.* **231**, 241 (1958).
- (4) Brenner, S., Jacob, F. & Meselson, M., *Nature* **190**, 576 (1961).
- (5) Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Risebrough, R. W. & Watson, J. D., *Nature* **190**, 581 (1961).
- (6) Nirenberg, M. W. & Matthaei, J. H., *Proc. Natl. Acad. USA* **47**, 1588 (1961).
- (7) Temin, H. M. & Mizutani, S., *Nature* **226**, 1211 (1970).
- (8) Baltimore, D., *Nature* **226**, 1209 (1970).
- (9) Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. & Young, I. G., *Nature* **290**, 457 (1981).
- (10) Grabowski, P. J., Zaug, A. J. & Cech, T. R., *Cell* **23**, 467 (1981).
- (11) Stark, B. C., Kole, R., Bowman, E. J. & Altman, S., *Proc. Natl. Acad. USA* **75**, 3717 (1978).
- (12) Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A., *Science* **289**, 905 (2000).
- (13) Venter, J. C. *et al.*, *Science* **291**, 1304 (2001).
- (14) 小川哲弘、修士論文(1998)
- (15) Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T. & Masaki, H., *Science* **283**, 2097 (1999).
- (16) D'Alessio, G. & Riordan, J. F. eds., *RIBONUCLEASES Structures and Functions*, Academic Press, New York (1997).
- (17) Tamburrini, M., Scala, G., Verde, C., Ruocco, M. R., Parente, A., Venuta, S. & D'Alessio, G., *Eur. J. Biochem.* **190**, 145 (1990).
- (18) Dostal, J. & Matousek, J., *J. Reprod. Fertil.* **33**, 263 (1973).
- (19) Matousek, J., *Experientia* **29**, 858 (1973).
- (20) Soucek, J., Chudomel, V., Potmesilova, I. & Novak, J. T., *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* **5**, 250 (1986).

- (21) Vescia, S., Tramontano, D., Augusti-Tocco, G. & D'Alessio, G., *Cancer Res.* **40**, 3740 (1980).
- (22) Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. & Vallee, B. L., *Biochemistry* **24**, 5480 (1985).
- (23) Saxena, S. K., Rybak, S. M., Davey, R. T., Jr., Youle, R. J. & Ackerman, E. J., *J. Biol. Chem.* **267**, 21982 (1992).
- (24) McCubbin, A. G. & Kao, T., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 333 (2000).
- (25) D'Alessio, G., Di Donato, A., Parente, A. & Piccoli, R., *Trends Biochem. Sci.* **16**, 104 (1991).
- (26) James, R., Lazdunski, C., Pattus, F., eds. *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1992).
- (27) Nomura, M., *Annu. Rev. Microbiol.* **21**, 257 (1967).
- (28) Hardy, K. G., *Bacteriol. Rev.* **39**, 464 (1975).
- (29) Pugsley, A., *Microbiol. Sci.* **1**, 168 (1984).
- (30) Schaller, K. & Nomura, M., *Proc. Natl. Acad. USA* **73**, 3989 (1976).
- (31) Jakes, K. & Zinder, N. D. & Boon, T., *J. Biol. Chem.* **249**, 438 (1974).
- (32) Hirose, A., Kumagai, J. & Imahori, K., *J. Biochem.* **79**, 305 (1976).
- (33) Masaki, H. & Ohta, T., *J. Mol. Biol.* **182**, 217 (1985).
- (34) Akutsu, A., Masaki, H. & Ohta, T., *J. Bacteriol.* **171**, 6430 (1989).
- (35) Kleanthous, C., Kuhlmann, U. C., Pommer, A. J., Ferguson, N., Radford, S. E., Moore, G. R., James, R. & Hemmings, A. M., *Nat. Struct. Biol.* **6**, 243 (1999).
- (36) Soelaiman, S., Jakes, K., Wu, N., Li, C. & Shoham, M., *Mol. Cell* **8**, 1053 (2001).
- (37) 大野光宏、博士論文(1998)
- (38) Shafferman, A., Flashner, Y. & Cohen, S., *Mol. Gen. Genet.* **176**, 139 (1979).
- (39) Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A. & Brent, R., *J. Biol. Chem.* **258**, 13258 (1983).
- (40) Pugsley, A. P. & Schwartz, M., *Mol. Gen. Genet.* **190**, 366 (1983).
- (41) Suit, J. L., Fan, M. L., Sabik, J. F., Labarre, R. & Luria, S. E., *Proc. Natl. Acad. USA* **80**, 579 (1983).
- (42) Riley, M. A. & Gordon, D. M., *Trends Microbiol.* **7**, 129 (1999).
- (43) Fredericq, P., *Annu. Rev. Microbiol.* **11**, 7 (1957).
- (44) Nomura, M., *Proc. Natl. Acad. USA* **54**, 1514 (1964).
- (45) James, R., Kleanthous, C. & Moore, G. R., *Microbiol.* **142**, 1569 (1996).

- (46) Lazdunski, C. J., *Mol. Microbiol.* **16**, 1059 (1995).
- (47) Lazdunski, C. J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Lloubes, R. & Benedetti, H., *J. Bacteriol.* **180**, 4993 (1998).
- (48) Parker, M. W., Postma, J. P., Pattus, F., Tucker, A. D. & Tsernoglou, D., *J. Mol. Biol.* **224**, 639 (1992).
- (49) Yajima, S., Muto, Y., Yokoyama, S., Masaki, H. & Uozumi, T., *Biochemistry* **31**, 5578 (1992).
- (50) Yajima, S., Muto, Y., Morikawa, S., Nakamura, H., Yokoyama, S., Masaki, H. & Uozumi, T., *FEBS Lett.* **333**, 257 (1993).
- (51) Chak, K. F., Safo, M. K., Ku, W. Y., Hsieh, S. Y. & Yuan, H. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6437 (1996).
- (52) Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P. & Stroud, R. M., *Nature* **385**, 461 (1997).
- (53) Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W. A. & Stauffacher, C. V., *Structure* **5**, 443 (1997).
- (54) Vetter, I. R., Parker, M. W., Tucker, A. D., Lakey, J. H., Pattus, F. & Tsernoglou, D., *Structure* **6**, 863 (1998).
- (55) Ko, T. P., Liao, C. C., Ku, W. Y., Chak, K. F. & Yuan, H. S., *Structure Fold Des.* **7**, 91 (1999).
- (56) Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J.P. & Moras, D., *Cell* **95**, 771 (1998).
- (57) Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J., *Nat. Struct. Biol.* **6**, 56 (1999).
- (58) Carr, S., Penfold, C. N., Bamford, V., James, R. & Hemmings, A. M., *Structure Fold Des.* **8**, 57 (2000).
- (59) Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C., *Nature* **405**, 914 (2000).
- (60) Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng S. L. & Fesik, S. W., *Nature* **381**, 335 (1996).
- (61) de Zamaroczy, M., Mora, L., Lecuyer, A., Geli, V. & Buckingham, R. H., *Mol. Cell* **8**, 159 (2001).
- (62) Liao, C. C., Hsiao, K. C., Liu, Y. W., Leng, P. H., Yuen, H. S. & Chak, K.F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 556 (2001).
- (63) Di Masi, D. R., White, J. C., Schnaitman, C. A. & Bradbeer, C., *J. Bacteriol.* **115**, 506 (1973).



- (64) Bowman, C. M., Dahlberg, J. E., Ikemura, T., Konisky, J. & Nomura, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 964 (1971).
- (65) Boon, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 549 (1972).
- (66) Ohno, S. & Imahori, K., *J. Biochem.* **84**, 1637 (1978).
- (67) Mock, M. & Pugsley, A. P., *J. Bacteriol.* **150**, 1069 (1982).
- (68) Lau, P. C. K (1991) accession number X63621.
- (69) Lau, P. C. & Condie, J. A., *Mol. Gen. Genet.* **217**, 269 (1989).
- (70) 大野光宏、修士論文(1995)
- (71) 郡司義哉、修士論文(1997)
- (72) Kasai, H., Ohashi, Z., Harada, F., Nishimura, S., Oppenheimer, N. J., *Biochemistry* **14**, 4198 (1975).
- (73) Nishimura, S., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **28**, 49 (1983).
- (74) Yokoyama, S., Miyazawa, T., Iitaka, Y., Yamaizumi, Z., Kasai, H. & Nishimura, S., *Nature* **282**, 107 (1979).
- (75) Okada, N., Nishimura, S., *J. Biol. Chem.* **254**, 3061 (1979).
- (76) Nakanishi, S., Ueda, T., Hori, H., Yamazaki, N., Okada, N. & Watanabe, K., *J Biol. Chem.* **269**, 32221 (1994).
- (77) Noguchi, S., Nishimura, Y., Hirota, Y. & Nishimura, S., *J. Biol. Chem.* **257**, 6544 (1982).
- (78) Sprinzl, M., Dank, N., Nock, S. & Schon, A., *Nucleic Acids Res.* **19** (Suppl.), 2127 (1991).
- (79) Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A. & Kohno, K., *Nat. Biotechnol.* **19**, 746 (2001).
- (80) Zubay, G., *Annu. Rev. Genet.* **7**, 267 (1973).
- (81) 野島高彦、博士論文(1996)
- (82) 伊藤考太郎、修士論文(2000)
- (83) Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K. & Masaki, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8278 (2000).
- (84) Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- (85) Chomczynski, P. & Sacchi, N., *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987).
- (86) Sprinzl, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. & Steinberg, S., *Nucleic Acids Res.* **26**, 148 (1998).
- (87) 大澤豊、修士論文(1999)

- (88) 井上咲良、修士論文(2001)
- (89) Ikemura, T. & Ozeki, H., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **47**, 1087 (1983).
- (90) Stover, C. K. *et al.*, *Nature* **406**, 959 (2000).
- (91) Parret, A. & De Mot, R., *Mol. Microbiol.* **35**, 472 (2000).
- (92) Milligan, J. F. & Uhlenbeck, O. C., *Methods Enzymol.* **180**, 51 (1989).
- (93) Soll, D. & RajBhandary, U. L. eds., *tRNA Structure, Biosynthesis, and Function*, ASM Press, Washington, D. C. (1995).
- (94) Sagara, JI., Shimizu, S., Kawabata, T., Nakamura, S., Ikeguchi, M., Shimizu, K., *Nucleic Acids Res.* **26**, 1974 (1998).
- (95) Donis-Keller, H., *Nucleic Acids Res.* **8**, 3133 (1980).
- (96) Jensen, K. B., Atkinson, B. L., Willis, M. C., Koch, T. H. & Gold, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12220 (1995).
- (97) 富田構造、博士論文(1998)
- (98) Auffinger, P. & Westhof, E., *J. Mol. Biol.* **292**, 467 (1999).
- (99) Curnow, A. W. & Garcia, G. A., *J. Biol. Chem.* **270**, 17264 (1995).
- (100) Quigley, G. J. & Rich, A., *Science* **194**, 796 (1976).
- (101) Moore, P. B., *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 287 (1999).
- (102) 廣海啓太郎、「化学と生物」学会出版センター **21**, 116 (1983)
- (103) Haffner, P. H. & Wang, J. H., *Biochemistry* **12**, 1608 (1973).
- (104) Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M. H., Poortmans, F., Palmer, R. & Wyns, L., *Protein Sci.* **3**, 2322 (1994).
- (105) Fontecilla-Camps, J. C., de Llorens, R., le Du, M. H. & Cuchillo, C. M., *J. Biol. Chem.* **269**, 21526 (1994).
- (106) Day, A. G., Parsonage, D., Ebel, S., Brown, T. & Fersht, A. R., *Biochemistry* **31**, 6390 (1992).
- (107) 大西正健、「生物化学実験法 21 酵素反応速度論実験入門」学会出版センター (1987)
- (108) Cornish-Bowden, A., *Principles of Enzyme Kinetics*, Butterworths, London (1976).
- (109) 小島次雄、「分析化学における推計学」共立出版 (1985)
- (110) Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R. & Saenger, W., *J. Biol. Chem.* **263**, 15358 (1988).
- (111) Sugio, S., Amisaki, T., Ohishi, H. & Tomita, K., *J. Biochem. (Tokyo)* **103**, 354 (1988).
- (112) Gohda, K., Oka, K., Tomita, K. & Hakoshima, T., *J. Biol. Chem.* **269**, 17531 (1994).

- (113) Gohda, K., Itoh, T., Hiramatsu, Y., Tomita, K., Nishikawa, S., Uesugi, S., Morioka, H., Ohtsuka, E., Ikehara, M. & Hakoshima, T., *J. Biochem.* (Tokyo) **114**, 842 (1993).
- (114) Zabinski, M. & Walz, F. G., Jr., *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 558 (1976).
- (115) 箱嶋敏雄、「蛋白質核酸酵素」 共立出版 **40**, 1627 (1995)
- (116) Giraldo, J., Wodak, S. J. & van Belle, D., *J. Mol. Biol.* **283**, 863 (1998).
- (117) Brinkmann, U. & Pastan, I., *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 27 (1994).
- (118) Schon, E. A., Bonilla, E. & DiMauro, S., *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 131 (1997).
- (119) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. & Watanabe, K., *EMBO J.* **20**, 4794 (2001).
- (120) Higashio, H., Kimata, Y., Kiriya, T., Hirata, A. & Kohno, K., *J. Biol. Chem.* **275**, 17900 (2000).
- (121) Sikorski, R. S. & Hieter, P., *Genetics* **122**, 19 (1989).
- (122) Mountain, H. A., Bystrom, A. S., Larsen, J. T. & Korch, C., *Yeast* **7**, 781 (1991).
- (123) Iha, H. & Tsurugi, K., *Biotechniques* **25**, 936 (1998).
- (124) *Nature* **387**(6632 Suppl.), (1997).
- (125) Timmis, K., *J. Bacteriol.* **109**, 12 (1972).
- (126) Timmis, K. & Hedges, A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **262**, 200 (1972).
- (127) 石田亘、修士論文(2002)
- (128) 中西孝太郎、修士論文(2003)
- (129) Wittenberg, W. L. & Uhlenbeck, O. C., *Biochemistry* **24**, 2705 (1985).
- (130) Ashraf, S. S., Ansari, G., Guenther, R., Sochacka, E., Malkiewicz, A. & Agris, P.F., *RNA* **5**, 503 (1999).
- (131) Yajima, S., Ogawa, T., Nonaka, T., Mitsui, Y., Masaki, H. & Osawa, K., paper in preparation.
- (132) Parret, A. H. & De Mot, R., *Trends Microbiol.* **10**, 107 (2002).
- (133) 高萩哲郎、卒業論文(2000)
- (134) Pines, O., Yoon, H. J. & Inouye, M., *J. Bacteriol.* **170**, 2989 (1988).
- (135) Saxena, S.K., Sirdeshmukh, R., Ardelt, W., Mikulski, S. M., Shogen, K. & Youle, R. J., *J. Biol. Chem.* **277**, 15142 (2002).
- (136) 山城聡美、修士論文(2001)
- (137) Hayashi, T. *et al.*, *DNA Res.* **8**, 11 (2001).
- (138) Kaufmann, G., *Trends Biochem. Sci.* **25**, 70 (2000).
- (139) Mak, J. & Kleiman, L., *J. Virol.* **71**, 8087 (1997).

(140) Storz, G., *Science* **296**, 1260 (2002).

(141) Masaki, H. & Ogawa, T., *Biochimie* **84**, 433 (2002).

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、このような研究の機会を与えていただき、また終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科分子育種学研究室教授正木春彦先生に心より感謝を申し上げます。有意義な御助言をいただき、かつ、研究以外の面でも多岐にわたり御支援いただきました、同研究室助教授日高真誠先生に心より御礼申し上げます。たくさんの御配慮、激励をいただきました東京大学名誉教授魚住武司先生、筑波大学助教授中村顕先生に厚く御礼申し上げます。結晶構造解析に関しまして、東京農業大学助教授矢嶋俊介先生に大変有益な情報をいただきました。心より御礼申し上げます。日々の生活の中で、励まして下さった分子育種学研究室卒業生、学生の方々に深く感謝いたします。

学生の頃より御指導をいただきました、東京大学大学院新領域創成科学研究科渡辺公綱先生、上田卓也先生、鈴木勉先生に心より御礼申し上げます。また、同研究科富田構造博士には、細かい技術指導、並びに日ごろより大変有意義な御討論をいただきました。心から感謝いたします。理化学研究所平尾一郎先生、原田洋子博士には、RNA を合成していただき、また細部にわたって御指導いただきました。心より御礼申し上げます。動物細胞の培養実験に関しまして、御指導いただきました奈良先端科学技術大学院大学河野憲二先生、岩脇隆夫博士に深く御礼申し上げます。

生化学若い研究者の会、農芸化学若手シンポジウムの皆さんには、互いに励まし合い、切磋琢磨していく中で、本当に充実した時間を過ごさせてもらおうと供に、研究者としての指針を教えてくださいました。深く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたり、様々な面で支えてくれた両親と、暖かく励ましてくれた江口智子さんに心から感謝いたします。

2003 年 1 月

小川 哲弘