

tRNA 機能構造の解析

坂本 健作

①

# tRNA機能構造の解析

坂本 健作

## 目次

略号表	
序論	1
図表	5
第1章 大腸菌 tRNA <sup>Asp</sup> のアンチコドン1字目に存在する修飾ウリジン mnm <sup>5</sup> Uのコンホメーション特性とコドン認識制御	7
1-1. 序	7
1-2. 材料と方法	8
1-2-1. tRNA <sup>Asp</sup> の精製, 転写後修飾の解析	8
1-2-2. 未同定の修飾ヌクレオチドの調製	9
1-2-3. mnm <sup>5</sup> Uの化学合成	9
1-2-4. リボース・バックリング特性の解析	10
1-2-5. mnm <sup>5</sup> Uのグリコシル結合のまわりの二面角の解析	10
1-2-6. コンピュータによるヌクレオシドのコンホメーション解析	10
1-2-7. アンチコドン1字目とコドン3字目との塩基対形成のコンピュータ・ シミュレーション	11
1-3. 結果	11
1-3-1. tRNA <sup>Asp</sup> のアンチコドン1字目の転写後修飾	11
1-3-2. ヌクレオシドN <sup>*</sup> の化学構造	12
1-3-3. mnm <sup>5</sup> Uの化学合成とヌクレオシドN <sup>*</sup> の推定構造の確認	13
1-3-4. mnm <sup>5</sup> U, pmnm <sup>5</sup> Uのリボース・バックリングの性質	13
1-3-5. pmnm <sup>5</sup> UのC3'-endo形安定化のメカニズム	14
1-3-6. mnm <sup>5</sup> U34の5位の置換基と33位のリボース間の水素結合の役割	15
1-4. 考察	16
1-4-1. アンチコドン1字目のxm <sup>5</sup> U	16
1-4-2. U34の2-チオ化	17
1-4-3. pmnm <sup>5</sup> Uのコンホメーション特性	17
1-4-4. 転写後修飾によるウリジン・ヌクレオチドのC3'-endo形の安定化 のメカニズム	18
1-4-5. mnm <sup>5</sup> U34の「強く制限された 'wobbling'」	19
1-4-6. U34からmnm <sup>5</sup> U34への転写後修飾によるコドン認識制御	20
1-4-7. 'wobbling'を制限する転写後修飾の多様さ	21
図表	23

第2章 大腸菌 tRNA <sup>Arg</sup> 遺伝子の変異による高温での増殖阻害のメカニズム	46
2-1. 序	46
2-2. 材料と方法	46
2-2-1. 菌株, ファージ, ベクター	46
2-2-2. 遺伝子操作	47
2-2-3. tRNA <sup>Arg</sup> 遺伝子を含むプラスミドの構築	47
2-2-4. アルギニル tRNA 合成酵素遺伝子を含むプラスミドの作製	47
2-2-5. tRNA <sup>Arg</sup> , 延長因子 Tu, アルギニル tRNA 合成酵素の調製	48
2-2-6. アルギニン受容活性, および EF-Tu · GTP との結合能の測定	48
2-2-7. tRNA <sup>Arg</sup> の発現量の解析	49
2-2-8. <i>in vivo</i> におけるアルギニル tRNA <sup>Arg</sup> レベルの解析	49
2-2-9. 部位特異的塩基置換の導入	50
2-3. 結果	50
2-3-1. tRNA <sup>Arg</sup> (Ts)のアルギニン受容活性, EF-Tu · GTP への結合能	50
2-3-2. 42°Cでの増殖阻害が 'leaky' ではない argU10(Ts)変異株の作製	51
2-3-3. tRNA <sup>Arg</sup> の <i>in vivo</i> のアルギニル化レベルの解析	52
2-3-4. argU10(Ts)変異株の相補性試験による解析	53
2-4. 考察	54
2-4-1. argU10(Ts)変異の tRNA 機能への影響	54
2-4-2. argU10(Ts)変異の多面的な影響	56
図表	58
第3章 大腸菌 tRNA <sup>Arg</sup> identity 決定のメカニズム	68
3-1. 序	68
3-2. 材料と方法	70
3-2-1. 大腸菌 tRNA <sup>Arg</sup> の精製	70
3-2-2. 大腸菌 tRNA <sup>Arg</sup> の末端標識	70
3-2-3. N-nitroso-N-ethylurea を用いたフットプリンティング	70
3-2-4. 遺伝子操作	71
3-2-5. tRNA <sup>Arg</sup> バリエーションの argU10(Ts)変異株相補活性の判定	71
3-2-6. tRNA <sup>Arg</sup> バリエーションの T7 転写物の調製	72
3-2-7. <i>in vitro</i> のアルギニン受容反応における反応速度定数の解析	72
3-2-8. argU 遺伝子へのランダム変異の導入とスクリーニング	73
3-3. 結果と考察	73
3-3-1. tRNA <sup>Arg</sup> のフットプリンティング	73

3-3-2. tRNA <sup>Arg</sup> のアイデンティティー決定因子	74
3-3-3. tRNA <sup>Arg</sup> のアルギニン受容活性に必要な3次構造	79
3-3-4. 大腸菌ArgRSによるtRNA <sup>Arg</sup> 認識の構造的基盤	81
3-3-5. 大腸菌ArgRSがノンコグネートなtRNA分子種を排除する メカニズム	82
図表	85
第4章 総合討論	105
4-1. 序	105
4-2. 転写後修飾の機能	105
4-3. コドン認識とtRNA identity	107
4-4. アンチコドン・ループの構造がコドン認識に果たす役割	108
4-5. 大腸菌ArgRSによるアイデンティティー決定因子の認識の メカニズム	110
4-6. 今後の展望	112
図表	115

謝辞

参考文献 (REFERENCES)

## 略号表

A	アデノシン
t <sup>a</sup> A	N- [(9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル) カルバモイル] トレオニン
C	シチジン
pC	シチジン 5'-モノリン酸
s <sup>2</sup> C	2-チオシチジン
G	グアノシン
GDP	グアノシン 5'-2リン酸
GTP	グアノシン 5'-3リン酸
I	イノシン
L	リシジン
U	ウリジン
pU	ウリジン 5'-モノリン酸
Um	2'-O-メチルウリジン
cmnm <sup>5</sup> U	5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
m <sup>5</sup> U	5-メチルウリジン
mcm <sup>5</sup> U	5-メトキシカルボニルメチルウリジン
pmcm <sup>5</sup> U	mcm <sup>5</sup> U 5'-モノリン酸
mnm <sup>5</sup> U	5-メチルアミノメチルウリジン
pmnm <sup>5</sup> U	mnm <sup>5</sup> U 5'-モノリン酸
mnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン
pmnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	mnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U 5'-モノリン酸
ps <sup>2</sup> U	2-チオウリジン 5'-モノリン酸
xm <sup>5</sup> U	5-メチルウリジン誘導体
xm <sup>5</sup> Um	5-メチル-2'-O-メチルウリジン誘導体
xm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	5-メチル-2-チオウリジン誘導体
pxm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	xm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U 5'-1リン酸
xo <sup>5</sup> U	5-ヒドロキシウリジン誘導体
T (m <sup>5</sup> U)	リボチミジン (5-メチルウリジン)
Ψ	シュウドウリジン
ARS	アミノアシルtRNA合成酵素
ArgRS	アルギニルtRNA合成酵素
GlnRS	グルタミンルtRNA合成酵素

IleRS	イソロイシルtRNA合成酵素
EF-Tu	ポリペプチド鎖延長因子Tu
NMR	核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance)
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser effect and chemical exchange spectroscopy
COSY	correlated spectroscopy
PCR	polymerase chain reaction
TLC	薄層クロマトグラフィー
HPLC	high-performance liquid chromatography
kb	kilobase pair

## 序論

近年、リボザイムの発見などにより、RNA分子が生命現象において果たす役割の大きさが認識されてきている。これまで、RNA分子の機能構造に関する知見は、tRNA分子の研究から多く得られてきた。RNA分子で、立体構造が初めて明らかにされたのも酵母tRNA<sup>Phe</sup>(Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974)であった(図1)。最近では核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance, NMR)の手法が充実したことにより水溶液中のヌクレオチドの「動的構造」が詳しく解析されるようになった。また、tRNAのアミノ酸特異性(tRNA identity)決定のメカニズムも明らかになりつつある。本研究では、このような状況を踏まえてtRNA分子の機能を分子構造レベルで明らかにすることを試みた。

tRNAの機能はおもに次の3つの要素からなる。

- ①リボソーム上でmRNA上のコドンの特異的に認識する。
- ②アミノアシルtRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS)と特異的に相互作用しアミノ酸を受容する。
- ③アミノアシル化された後にポリペプチド鎖延長因子Tu (EF-Tu)-GTPと三重複合体を形成する。

第1章では、転写後修飾によるtRNAのコドン認識制御のメカニズムについて述べる。転写後修飾は、tRNA分子の大きな特徴の1つでありtRNAの機能に重要な役割を果たしている(Nishimura, 1979; Björk et al., 1987; Muramatsu et al., 1988; Perret et al., 1990)。そして、転写後修飾の果たす役割の重要性が初めて示されたのはコドン認識においてであった。アンチコドン1字目には種々の修飾ヌクレシドが存在し、特にアンチコドン1字目のウリジン残基の転写後修飾のタイプとコドン認識パターンには相関があることが知られていた(Nishimura, 1979)。さらに、横山茂之博士らによるNMRを利用した解析によって、転写後修飾がウリジン・ヌクレオチドのコンホメーション特性に顕著な影響を与えていることが明らかにされた。2'-チオ化や2'-O-メチル化のような転写後修飾は、ウリジン・ヌクレオチドのC3'-endo形を著しく安定化している(Yokoyama et al., 1985; Kawai et al., 1992)。このような「かたい」修飾は、アンチコドン1字目(標準的な数え方でtRNAの34位)のウリジン残基(U34)の'wobbling'を制限することにより、tRNAがコドン3字目としてAを効率よく認識する一方で、Uを誤って認識することを防いでいると考えられた(Yokoyama et al., 1979)。本研究では、コドンAGA/AGGに対応する大腸菌マイナー-tRNA<sup>Arg</sup>(tRNA<sup>Arg</sup>)のアンチコドン



1字目の修飾ウリジンの化学構造を決定し、5-メチルアミノメチルウリジン (mnm<sup>5</sup>U)であることを示した。さらにコンホメーション解析により、5-メチルアミノメチル化もウリジン・ヌクレオチドのコンホメーションを「かたく」することを明らかにした。3字目がA、Gであるコドンに対応するtRNAのアンチコドン1字目に見い出される転写後修飾は、2-チオ化、2'-O-メチル化、およびウラシル環の5位の置換のみであるので、本研究により、転写後修飾がU34の 'wobbling' を制限するメカニズムの全貌が明らかになった。

第2章では、tRNA<sup>Arg</sup>遺伝子における変異が大腸菌の温度感受性を引き起こすメカニズムについて述べる。これまでにも、特定のtRNA遺伝子の変異が特定の細胞機能を障害することが報告されている(Ohki and Mitui, 1974; Sato et al., 1979; Chen et al., 1991; Lawlor et al., 1987; Leskiw et al., 1991)。そのような変異の1つである大腸菌argU10(Ts)変異は、高温でDNA合成を停止する温度感受性変異株から見い出された(Henson et al., 1979)。argU遺伝子はtRNA<sup>Arg</sup>をコードしており、argU10(Ts)変異はtRNA<sup>Arg</sup>の5'末端のグアノシン残基からアデノシンへの置換であることが報告されている(Chen et al., 1990)。本研究では、このような置換が、変異型tRNA<sup>Arg</sup> [tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)]の*in vitro*のEF-Tu・GTP結合能や、アルギニン受容活性に影響していることを示した。一方、ノーザン・ハイブリダイゼーション実験により、tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)の細胞内存在量が、30°Cでは野生型tRNA<sup>Arg</sup>の1割程度であり、43°Cではほとんど消失することが明らかにされた。EF-Tu・GTPへの結合能やアルギニン受容活性の低下が、tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)の細胞内レベルの低下に関係しているかどうかは明らかではないが、tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)レベルの低下は、argU10(Ts)変異株におけるAGAコドンの翻訳障害(Chen et al., 1990)を説明すると考えられる。さらに、相補実験により、コドンAGAの翻訳障害がargU10(Ts)変異株における機能障害の原因であるとするこれまでの主張(Spanjaard et al., 1990; Chen et al., 1990)が確認された。以上のことから、高温でtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)レベルが著しく低下することが、argU10(Ts)変異株の温度感受性のおもな原因であると考えられる。そこで、第3章では、argU10(Ts)変異株に導入したtRNA<sup>Arg</sup>の*in vivo*のアルギニン受容活性を相補実験により判定する系を用いて、大腸菌tRNA<sup>Arg</sup> identity決定のメカニズムを解析した。

1988年、横山研究室の村松知成博士(現 東京大学理学部生物化学科助手)らによって、大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>のアンチコドン1字目のヌクレオチド残基がtRNA<sup>Arg</sup>のアミノ酸特異性の決定に寄与していることが示された(Muramatsu et al., 1988)。同じ時期に、他のグループからも、ARSがtRNAの

特定の部分構造を認識することで、コグネートなtRNAをノンコグネートなtRNAから識別していることが明らかにされた (Normanly et al., 1986; McClain and Foss, 1988a; Hou and Schimmel, 1988). このような構造は 'identity determinant (アイデンティティー決定因子)' と呼ばれている. tRNAのidentityはin vivoで決定されるものであり, 他種のtRNA, ノンコグネートなARSとの競合や相互作用が存在するシステムの中で決定されている. しかし, tRNA identityをin vivoで解析する適当な系は少なく, どれも一長一短である (Schulman, 1991). 本研究では, argU10(Ts)変異株を用いたアッセイ系により, in vivoのアルギニン受容活性を解析した. ただし in vivoのアッセイにはいくつかの制約があり, これらの点はin vitroの反応速度論的解析により補った. さらに, アルキル化剤を用いたフットプリントによりtRNA<sup>Arg</sup>とアルギニルtRNA合成酵素(ArgRS)との相互作用の解析も行っている. このように, 多角的な解析を行い, 結果を突き合せて議論しているのが本研究の特長である. これまで, 大腸菌tRNA<sup>Arg</sup> identityには, Dループ内のA20, アンチコドン2字目のC35が重要な寄与をしていることが明らかにされていた (McClain and Foss, 1988b; Schulman and Pelka, 1989). 本研究では, アンチコドン・ループ内のA38がアイデンティティー決定因子であること, G34 (アンチコドン1字目) が 'negative determinant' であることを示した. 最近になって, アンチコドン3字目もtRNA<sup>Arg</sup> identityに寄与していることが報告されているので (Tamura et al., 1992), アンチコドンの全ての残基がtRNA<sup>Arg</sup>のidentityに寄与していることになる. さらに, tRNAの共通構造の内の特定の部位 (U8・A14, G18・Ψ55, G19・C56, T54・A58の4つの塩基対) がtRNA<sup>Arg</sup>のアルギニン受容活性に必須であることが示された. これらの構造は他のtRNA分子種にも共通なためにtRNAの識別には役立たない. しかし, アイデンティティー決定因子A20を取り囲むように分布しており, ArgRSがこれらの部位に結合することで, アイデンティティー決定因子 (A20) が存在する位置 (20位) を認識することが可能になっていると考えている. tRNAに共通の構造のtRNA identityへの寄与はこれまで見過ごされてきたが, 他のtRNA・ARSのシステムにおいても, アイデンティティー決定因子の「位置情報」を与えている可能性があるだろう.

以上のようなtRNAの機能を考える上で, 3つの全く性格の異なる機能が80ヌクレオチド程度の大きさの中に納められていることは銘記されなければならない. コドンの翻訳に働くという共通の機能を持つために, 全てのtRNAはよく似たL字型の立体構造をとる必要がある一方で, ARSとは特異的に相

相互作用するので、アミノ酸特異性の異なる tRNA は、お互いに異なる構造を持つことが求められる。このように、共通の機能に係わる構造と、tRNA 分子種に特異的な構造は tRNA 内でモザイク様に存在している。しかし、第 3 章で示されるように、ARS との特異的な相互作用を保障する上で共通構造は重要な役割を果たしていた。一方、アンチコドン は tRNA のコドン特異性を担うために塩基配列が多様であるが、そのために、ARS の認識の主要なターゲットでもある (Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991; Giege et al., 1993)。本研究では、第 1 章から第 3 章で、tRNA 機能を分子構造レベルで解析した後、総合討論において、tRNA の共通構造と特異的構造のそれぞれの役割や、特定の構造が複数の機能を担うことから生じる制約など、本研究によって新たに提起されたテーマについて議論する。

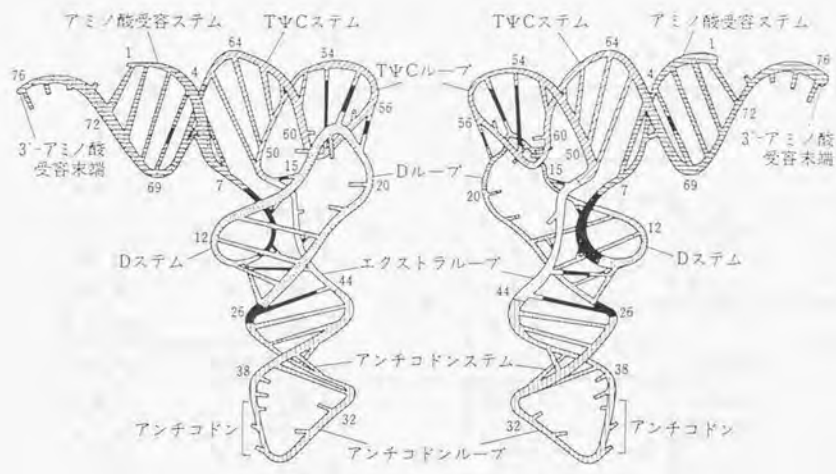


図1. 酵母tRNA<sup>Phe</sup>の3次構造  
 (Rich and RajBhandary, 1976)

表 1 . コドン表

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

第1章 大腸菌 tRNA<sup>f</sup> のアンチコドン1字目に存在する修飾ウリジン  
mnm<sup>5</sup>U のコンホメーション特性とコドン認識制御

1-1. 序

tRNA のアンチコドン1字目 (標準的な数え方で34位) のウリジン残基 (U34) は、ほとんど全てのケースで転写後修飾を受けている (Sprinzl et al., 1991). U34の転写後修飾のタイプとコドン認識のパターンには相関が見られる (Nishimura, 1979). 3字目がA, Gである2つのコドンによってコードされているアミノ酸 (グルタミン, リシン, グルタミン酸など) に特異的な tRNA の34位には5-メチル-2-チオウリジン誘導体 (xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, 図1-1A) が存在するが, 1, 2字目が共通の4つのコドンによってコードされるアミノ酸 (バリン, セリン, アラニンなど) に特異的な tRNA には5-ヒドロキシウリジン誘導体 (xo<sup>5</sup>U, 図1-1A) が存在する. tRNA<sup>val</sup>, tRNA<sup>ser</sup>, tRNA<sup>ala</sup> の34位のxo<sup>5</sup>U残基 (xo<sup>5</sup>U34) は, コドン3字目としてA, Gに加えてUをも効率良く認識することができる (Ishikura et al., 1971; Mitra et al., 1979; Samuelsson et al., 1980; Murao et al., 1982). 「wobble仮説」 (Crick, 1966) によると, U34はコドン3字目のA, Gのみと塩基対を形成するとされているので, このようなxo<sup>5</sup>U34の 'wobbling' は「拡張された 'wobbling' (extended wobbling)」である. これに対して tRNA<sup>ala</sup>, tRNA<sup>lys</sup>, tRNA<sup>arg</sup> の34位のxm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U残基 (xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34) は, コドン3字目としてAを効率良く認識するが, これに比べるとGを認識する効率は著しく小さい (Sekiya et al., 1969; Agris et al., 1973; Lustig et al., 1981). このような xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34の 'wobbling' は「強く制限された 'wobbling' (strongly-restricted wobbling)」と呼ぶことができる.

そこで, xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, xo<sup>5</sup>Uの 'wobbling' の性質の違いが何に基づくのかを明かにする目的で, 水溶液中におけるxm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, xo<sup>5</sup>Uヌクレオチドのコンホメーション特性がNMRを用いて解析された (Yokoyama et al., 1979, 1985). その結果, この2つのタイプの修飾ウリジン・ヌクレオチドのリボース・バックリング特性は対照的であることが明かになった. ウリジン 5'-モノリン酸 (pU) では, リボース・バックリングのC2'-endo形とC3'-endo形 (図1-1B) の安定性は同程度であるが, xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U 5'-モノリン酸 (pxm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) ではC3'-endo形が著しく安定化され, xo<sup>5</sup>U 5'-モノリン酸ではむしろC2'-endo形が安定であった. アンチコドン1字目のウリジン残基は, コドン3字目のAと塩基対を形成するときにはC3'-endo形とるが, Uを認識するにはC3'-endo形

からC2'-endo形に変化しなければならない (Yokoyama et al., 1985, 図1-1C)。このことを考慮して,  $xm^sU$ ,  $xo^sU$ ヌクレオチドのそれぞれのコンホメーション特性が, アンチコドン1字目における $xm^sU$ , および $xo^sU$ 残基それぞれの 'wobbling' の性質を決定しているだろうと考えられた (Yokoyama et al., 1985)。

このような, 転写後修飾により, U34のコンホメーション特性が切り替わることでコドン認識が制御されているというモデルを検証するためには, さらに転写後修飾のタイプと 'wobbling' の性質との対応関係を検討しなければならない。「拡張された 'wobbling'」を示す修飾ヌクレオシドは, 現在までに $xo^sU$ が知られているだけだが, 「強く制限された 'wobbling'」を示すと考えられるものは $xm^sU$ 以外にも5-メチル-2'-O-メチルウリジン誘導体 ( $xm^sUm$ ) や5-メチルウリジン誘導体 ( $xm^sU$ ) が存在する (Sprinzl et al., 1991)。最近の研究によって, 2'-O-メチルウリジン ( $Um$ )ヌクレオチドでもC3'-endo形が著しく安定であることが示されているが (Kawai et al., 1992),  $xm^sU$ については, ヌクレオシドの解析しか報告されておらず, その解析結果によると, Uから $xm^sU$ の修飾はバックリングに影響しないとされていた (Sierzpowska-Gracz et al., 1987)。むしろ, アンチコドン1字目の $xm^sU$ の5位の置換基は, 33位の残基のリボースの2'-水酸基と水素結合を形成することで, アンチコドン1字目のウラシル環を, コドン3字目のAと塩基対を形成する位置に固定する役割があるだろうと考えられた (Berman et al., 1978; Hillen et al., 1978b)。

本研究では,  $xm^sU$ のコンホメーション特性を明らかにし, さらに, 33位のリボースとの水素結合の役割について検討した。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. tRNA<sup>4<sup>th</sup></sup>の精製, 転写後修飾の解析

大腸菌tRNA<sup>4<sup>th</sup></sup>は, DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia) (pH 7.5), および benzoylated DEAE-Cellulose (Boehringer-Mannheim) を用いたカラムクロマトグラフィーとヒドロキシアパタイト・カラム (HA-1000, Tosoh, Tokyo) を用いたHPLC (high-performance liquid chromatography) により, 大腸菌A19株のtRNA粗分画から精製を行った。DEAE-Sephadex A50カラム (7.5 × 145cm) は, 0.365M NaCl-8mM MgCl<sub>2</sub>を含む20mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液で平衡化を行ったのち, 150,000 OD<sub>260</sub> unitsのtRNA粗分画をチャージし

て、0.375Mから0.525MまでのNaCl濃度勾配によって溶出した。tRNA<sup>4</sup>を含む画分は、0.49M NaCl-10mM MgCl<sub>2</sub>を含む酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) によって平衡化したbenzoylated DEAE-Celluloseカラム (1.5×140cm) にチャージし、0.5Mから1.25MまでのNaCl濃度勾配によって溶出した。tRNA<sup>4</sup>を含む画分は、最後にヒドロキシアパタイト・カラムを用いたHPLCによって精製された。ヒドロキシアパタイト・カラムは60mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で平衡化し、60mMから160mMまでのリン酸ナトリウム濃度勾配によって溶出した。得られたtRNA<sup>4</sup>は100μgであった。ここで得られたtRNA<sup>4</sup>は、ホルムアミド法 (Kuchino et al., 1979), およびDonis-Keller法 (Donis-Keller et al., 1977) によりヌクレオチド配列を決定し、報告された遺伝子の塩基配列 (Mullin et al., 1984) と一致することを確認した。ホルムアミド法によるヌクレオチド配列の決定の際には、薄層Avicel SF celluloseプレート (Funakoshi, Tokyo) を用いた2次元薄層クロマトグラフィー (Nishimura and Kuchino, 1983) によりヌクレオチドの分離を行った。さらに、精製されたtRNA<sup>4</sup> (10μg) をリボヌクレアーゼA (50μg, Sigma), ホスホジエステラーゼ (4μg, Sigma), ホスホモノエステラーゼ (0.8μg, Sigma) によって完全分解した後、Shim-pack CLC-ODSカラム (6.0×150mm) を装備したShimadzu LC-4Aクロマトグラフ・システムによる逆相HPLCによりヌクレオチドの分離を行った。溶出の条件は、始めの15分間は3% (v/v) メタノールを含む2.5mM 酢酸アンモニウム緩衝液, pH 5.1 (緩衝液A) により、続く60分間は、緩衝液A中のメタノール濃度の3%から60%までの直線勾配によって、最後は60%で、流速は1ml·min<sup>-1</sup>として溶出を行った。溶出したヌクレオチドのUV吸収スペクトルは、フォトダイオード・アレー (Union Giken MCPD-350PC) によって測定した。

#### 1-2-2. 未同定の修飾ヌクレオチドの調製

大腸菌A19株のtRNA粗分画(10g)を、ヌクレアーゼP<sub>1</sub> (300mg, Yamasa Shoyu) によって完全分解して得たヌクレオチド混合物を、Dowex 1カラムクロマトグラフィーによって分離し、mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U 5'-モノリン酸 (pmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) を含む分画を得た (Yokoyama et al., 1979)。この分画を、続いてDowex 50カラムクロマトグラフィーにかけて分離し、pmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>Uの精製物と共に、未同定の修飾ヌクレオチドN<sup>6</sup> (100μg) を得た。

#### 1-2-3. mnm<sup>5</sup>Uの化学合成

ウリジンはYamasa Co., Ltd.より購入した。化学合成産物は、0.1M 酢酸



ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中のアセトニトリルの直線濃度勾配によって、mBondasphereC-18カラムを装備したWaters Model A25を用いた逆相HPLCによって分離した。

#### 1-2-4. リボース・バックリング特性の解析

NMR試料は $^2\text{H}_2\text{O}$ に溶かし、pD (pHメーターの測定値をそのまま読み取った)を4.8に合わせて、Brucker AM-400によりNMRスペクトルを測定した。pmm $^5\text{U}$ については25, 35, 45, 55, 65, 75, 85°Cで、mm $^5\text{U}$ については、37, 45, 55, 65, 75°Cで測定を行った。リボース・プロトンの同定は2次元COSY (Rance et al., 1983; Shaka et al., 1983)の測定によって得られたスペクトルを解析して行った。H1', H2'プロトン間, H3', H4'プロトン間のカップリング定数をそれぞれ $J_{1,2'}$ ,  $J_{3,4'}$ とすると、 $J_{1,2'} + J_{3,4'} = 10$ と仮定することができる (Altona and Sundaralingam, 1973)。リボース・バックリングのC2'-endo形の割合 ( $[C2'\text{-endo}]$ )、C3'-endo形の割合 ( $[C3'\text{-endo}]$ )は下の計算式によって得ることができる (Altona and Sundaralingam, 1973; Yokoyama et al., 1979)。

$$[C2'\text{-endo}] = J_{1,2'} / (J_{1,2'} + J_{3,4'})$$

$$[C3'\text{-endo}] = 1 - [C2'\text{-endo}]$$

リボース・バックリングの平衡定数  $[C2'\text{-endo}] / [C3'\text{-endo}]$  を求め、平衡定数の温度依存性より、2つのコンホマーの間のエンタルピー差 ( $\Delta H$ ) およびエントロピー差 ( $\Delta S$ ) を導出した。

#### 1-2-5. mm $^5\text{U}$ のグリコシル結合のまわりの二面角の解析

mm $^5\text{U}$ は $^2\text{H}_2\text{O}$ に溶かしてpDを4.8に合わせ、Brucker AMX-500を用いてリボース・プロトンH1', H2', H3', H4', ウラシル環のH6プロトンの間のNOE (nuclear Overhauser effect)強度をそれぞれ測定した。そして、'COFLEM'プログラム (Yokoyama et al., 1981)によってこれらのNOE強度を再現するリボース部分、およびウラシル環のコンホメーションを計算した。

#### 1-2-6. コンピュータによるヌクレオシドのコンホメーション解析

'AMBER'プログラム (Pearlman et al., 1991)を使用してmm $^5\text{U}$ , pmm $^5\text{U}$ のコンホメーションを解析した。mm $^5\text{U}$ , pmm $^5\text{U}$ のそれぞれと、それらを取り囲む216個の水分子について、分子力学的計算を行った。温度は300 Kまで上げた。初期構造としては、バックリングをC2'-endo形、または

C3'-endo形とし、グリコシル結合まわりの二面角 (O1'-C1'-N1-C2,  $\alpha$ 角) はanti形 ( $-180^\circ$ ,  $-150^\circ$ ,  $-120^\circ$ ) とした. Scilicon Graphics IRIS-4D/25G コンピュータを用いて計算を行った.

#### 1-2-7. アンチコドン1字目とコドン3字目との塩基対形成のコンピュータ・シミュレーション

X線結晶解析により報告されている酵母 tRNA<sup>Phe</sup> の分子座標 (Quigley et al., 1975) を利用し、アンチコドン1字目を mnm<sup>s</sup>U に置換し、コドン3字目 (U, C, A, G) を付け加えた後、エネルギー極小化の計算を行った. コドンは A-RNA 型コンホメーションに固定した. Scilicon Graphics IRIS-4D/25G コンピュータを用いて、'AMBER' プログラム (Pearlman et al., 1991) によって計算を行った.

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. tRNA<sup>Phe</sup> のアンチコドン1字目の転写後修飾

tRNA<sup>Phe</sup> のアンチコドンは、遺伝子上では 'TCT' でコードされている (Mullin et al., 1984). ホルムアミド法により、精製された tRNA<sup>Phe</sup> のヌクレオチド配列を決定したところ、アンチコドン1字目 (34位) のウリジン残基は転写後修飾を受けていることが明らかになった (図1-2A). アンチコドン1字目の TLC では、ウリジン・ヌクレオチド (pU)、シチジン・ヌクレオチド (pC) のスポットが見られるが、これらは、それぞれ33位、35位のヌクレオチド残基の混入物である. よって、アンチコドン1字目の修飾は1種類であることが分かる. この修飾ヌクレオチド (pN\*) のスポットの位置は、pnm<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U のスポットの位置に最も近いが、違っており、天然の他のどの修飾ヌクレオチドのスポットとも異なる (Nishimura and Ruchino, 1983). 従って、pN\* は未知の修飾ヌクレオチドであると判断された. tRNA<sup>Phe</sup> のヌクレオシド組成分析においては (図1-3), 他に未知の修飾ヌクレオシドのピークがないことから判断して、7.5min に溶出されたピークがヌクレオシド N\* である. その UV 吸収スペクトルは、265nm に極大値を持ち、5-メチルウリジン (m<sup>5</sup>U) の UV 吸収スペクトル (Littlefield and Dunn, 1958) に良く似ているが、2-チオウリジン (Shaw et al., 1958) とは全く異なる. m<sup>5</sup>U のモル吸光係数 (Cline et al., 1959) を用いて計算すると、ヌクレオシド N\* は m<sup>5</sup>U や 2-チオシチジン (s<sup>2</sup>C) と等モルだけ tRNA<sup>Phe</sup> に含まれていることが分

った。m<sup>5</sup>Uやs<sup>2</sup>Cは、tRNA<sup>4</sup>に1残基存在することから、ヌクレオシドN\*の含まれる量も1残基分となる。このことは、アンチコドン1字目のウリジン残基は、部分的にはなく、完全にヌクレオシドN\*に転写後修飾されていることを示している。

### 1-3-2. ヌクレオシドN\*の化学構造

化学構造を決定するためには十分な量のヌクレオシドN\*が必要である。大腸菌tRNA混合物のヌクレアーゼP<sub>1</sub>分解物から得られた修飾ヌクレオシドN\*を、tRNA<sup>4</sup>のアンチコドン1字目のヌクレオシドN\*と比較したところ、以下の性質について一致がみられた。UV吸収スペクトル(図1-4)が一致し、2次元TLCにおけるスポットの位置が一致した(図1-2B)。さらに、tRNA<sup>4</sup>をリボヌクレアーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホモノエステラーゼにより分解したヌクレオシド混合物とヌクレオシドN\*と混合し、逆相HPLCによって分析したところ、ヌクレオシドN\*、N\*のピークは完全に重なった(図1-5)。これらの結果から、ヌクレオシドN\*、N\*は同一物であると判断され、化学構造決定に十分量(100μg)のヌクレオシドN\*を得ることができた。

図1-6にヌクレオチドpN\*の400-MHz <sup>1</sup>H NMRスペクトルを示す。リボース・プロトン・シグナルの化学シフトは、pnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>Uと等しく、リボース部分は転写後修飾を受けていないと判断される。ウラシル環のH6プロトン・シグナルがシングレットとして8.345ppmに観測されるが、H5プロトン・シグナルが存在しないことから、ウラシル環の5位が置換されていることが分かる。メチル・プロトン、メチレン・プロトンのシグナルは、pnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>Uと同じ化学シフトで観測された。さらに、500-MHz 2次元NOESY (nuclear Overhauser effect and chemical exchange spectroscopy, Jeener et al., 1979; Kumar et al., 1980; Macura & Ernst, 1980) によるスペクトル(図1-7)において、H6プロトンとメチレン・プロトンの間にNOEが見出されたことから、ウラシル環の5位にメチレン基が結合していることが分かった。以上のNMRスペクトルの解析から、ヌクレオシドN\*の化学構造は、5-メチルアミノメチルウリジン(mnm<sup>5</sup>U)であると推定される(図1-8A)。mnm<sup>5</sup>Uであると考えれば、ヌクレオシドN\*のUV吸収スペクトルや、Dowex 1カラムクロマトグラフィーにおいてpnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>UとヌクレオチドpN\*がほぼ同時に溶出された結果とも矛盾しない。そこで、mnm<sup>5</sup>Uを化学合成し、ヌクレオシドN\*と突き合わせることにした。

### 1-3-3. $mnm^5U$ の化学合成とヌクレオシド $N^*$ の推定構造の確認

$mnm^5U$  の化学合成は、東京工業大学生命理学部生命理学科の関根光雄博士の研究室において佐藤尊彦氏により行われた (図1-8B, Sekine et al., 1993). トシル酸存在下で、アセトンジメチルアセタールとウリジンを反応させることによって  $2',3'-O$ -isopropylideneuridine (化合物1) を得る. さらに、ヒドロキシメチル化によって 5-hydroxymethyl- $2',3'-O$ -iso-propylideneuridine (化合物2) を得た. これを、 $60^\circ C$ 、ジオサン中で5倍量 (モル比) の chlorotrimethylsilane で3時間処理することにより、5-クロロメチルウリジン誘導体に変換することができる (化合物3). そのままさらにジメチルホルムアミド中で2倍量 (モル比) の  $N$ -benzylmethylamine と2倍量 (モル比) の ethyldiisopropylamine と室温で25時間反応させることによって化合物4を得た. 化合物4は精製後、80%酢酸と反応させることで、化合物4から isopropylidene group を除去して 5-[( $N$ -benzyl)methylaminomethyl] uridine を得た (化合物5). この方法では、化合物1から化合物5を得る収率は60%であった. 化合物4は、 $N$ -benzylmethylamine と37%ホルマリン水溶液と反応させることで直接得ることができるが、このような反応では、夾雑物が多く混ざった化合物4が得られる. 化合物4は精製して、上記の反応により化合物5に変換したが、化合物1から化合物5を得る収率は50%であった. 化合物5を Pd/C (パラジウム活性炭) 上で水素化することで  $mnm^5U$  を得た. 化学合成された  $mnm^5U$  の 400M-Hz プロトン NMR スペクトルを図1-9に示す. この  $mnm^5U$  とヌクレオシド  $N^*$  を混合し逆相 HPLC によって分析したところ、両者は完全に1つのピークとして溶出された (図1-10). このように、ヌクレオシド  $N^*$  の化学構造が  $mnm^5U$  であることが確認された.

### 1-3-4. $mnm^5U$ , $pmnm^5U$ のリボース・バックリングの性質

$25^\circ C$  で  $pN^*$  ( $mnm^5U$  5'-モノリン酸,  $pmnm^5U$ ) のリボース・バックリングは  $C2'$ -endo 形が44%,  $C3'$ -endo 形が56%であった. このように、 $pmnm^5U$  では  $C3'$ -endo 形が安定であると考えられるが、さらに  $mnm^5U$ ,  $pmnm^5U$  のそれぞれについて平衡定数の温度依存性からエンタルピー差 ( $\Delta H$ ), エントロピー差 ( $\Delta S$ ) を求めた. 各温度における  $J$ ,  $\alpha$  値,  $C2'$ -endo 形,  $C3'$ -endo 形それぞれの割合, およびリボース・バックリングの平衡定数 ( $[C2'$ -endo 形] /  $[C3'$ -endo 形]) を表1-1に示す. 図1-11に示すような温度依存性から得られた  $\Delta H$  値,  $\Delta S$  値を表1-2に示す. これまでも RNA 分子中のヌクレオチド残基のコンホメーションは、 $\Delta H$  の値に基づいて議論されてきた (Yokoyama et al., 1986; Agris et al., 1991; Kawai et al., 1992). ウリジン 5'-モ

ノリン酸(pU)では、 $\Delta H$ 値は $0.09\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ であり、C2'-endo形、C3'-endo形の安定性はほぼ等しい(Yokoyama et al., 1985)。2-チオウリジン5'-モノリン酸(ps<sup>2</sup>U)では、 $\Delta H$ は $0.87\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ であり、pUの2-チオ化によりC3'-endo形の安定性は $0.78\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ だけ増加している(Yokoyama et al., 1985)。また、ウリジン・ヌクレオチドの2'-O-メチル化によって、C3'-endo形の安定性が $0.77\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 増加することが報告されている(Kawai et al., 1992)。本研究では、pUからpmm<sup>5</sup>Uへの修飾によりC3'-endo形の安定性が $0.56\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ だけ増加することが示され、2-チオ化や2'-O-メチル化だけでなく、ウラシル環の5位の置換によっても、C3'-endo形の安定性が顕著に増加することが明らかとなった。また、Uとmnm<sup>5</sup>Uの $\Delta H$ 値を比較すると、その差はわずか $0.02\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ でしかない。すなわち、5'-リン酸基が存在するときに、5-メチルアミノメチル化による顕著なC3'-endo形の安定化が起こることが示された。

#### 1-3-5. pmm<sup>5</sup>UのC3'-endo形安定化のメカニズム

ピリジンヌクレオチドでは、リボース・バックリングとグリコシル結合まわりの二面角( $\alpha$ 角、O1'-C1'-N1-C2)との間には相関がみられる(Ts'o et al., 1969)。そこで、pmm<sup>5</sup>UのC3'-endo形の安定化のメカニズムを明らかにする目的で、mnm<sup>5</sup>U、pmm<sup>5</sup>Uについて $\alpha$ 角の解析を行った。

2次元NOEスペクトルで、mnm<sup>5</sup>UのH1', H6プロトン間にはクロス・ピークが観測されるのに対して(Sierzputowska-Gracz et al., 1987)、pmm<sup>5</sup>Uでは観測されない(図1-7)。このことは、mnm<sup>5</sup>Uはグリコシル結合まわりのコンホメーションとしてsyn形をとることができるのに対して、pmm<sup>5</sup>Uではanti形に固定されていることを示している(Yokoyama and Miyazawa, 1985; 図1-12)。リボース・プロトン、H6プロトンの間のNOE強度の解析からmnm<sup>5</sup>Uの $\alpha$ 角は、表1-3のように決定された。pmm<sup>5</sup>Uでは、H2', H3'プロトンが完全に重なっているために、それぞれに対するNOEを分離することができず、 $\alpha$ 角を求めることが困難である。そこで、pmm<sup>5</sup>Uについては分子動力学的計算を行って $\alpha$ 角を求めた。これに先立って、mnm<sup>5</sup>Uについても同様の計算によって実測値と比較し、計算方法の妥当性を確かめた。

計算結果によると、mnm<sup>5</sup>Uはanti形をとっているとき、C2'-endo形に対しては $\alpha = -111^\circ$ が安定なコンホメーションであり(図1-13A)、C3'-endo形に対しては $\alpha = -154^\circ$ で安定であった(図1-13B)。いずれも実測値とほぼ一致し、5'-水酸基とウラシル環の6位の炭素原子とのファンデルワールス相互作用によって安定化していると考えられ、リーズナブルなコンホメーションで

ある。pmm<sup>s</sup>Uはanti形るとき、C 2'-endo形に対して $\alpha = -170^\circ$  (図1-14A)、C 3'-endo形では $\alpha = -160^\circ$  (図1-14B)であった。pmm<sup>s</sup>UはC 3'-endo形るとき、5'-リン酸基と5位の置換基のアミノ基の間で水素結合が形成され、さらに、5'-リン酸基とメチルアミノメチル基はファンデルワールス相互作用を行って、分子全体としてコンパクトな形をとっている。C 2'-endo形でもリン酸基と5位の置換基のアミノ基の間で水素結合が形成されているが、このため $\alpha$ 角が小さく ( $-170^\circ$ ) になっており、ウラシル環の2-カルボニル基とリボース環の2'-水酸基位の間で立体障害を生じるので、C 2'-endo形と比較してC 3'-endo形の方がより安定である。

このように、mnm<sup>s</sup>Uでは、C 2'-endo形で生じる2-カルボニル基と2'-水酸基の間の立体障害は、 $\alpha$ 角を大きくとることで避けることができるのに対して、pmm<sup>s</sup>Uではリン酸基と5位の置換基間の水素結合によって $\alpha$ 角が $-180^\circ$ 近くに保たれているので避けることができない。このことが、pmm<sup>s</sup>UにおいてC 3'-endo形が優勢になる原因であると考えられる。

#### 1-3-6. mnm<sup>s</sup>U 34の5位の置換基と33位のリボース間の水素結合の役割

コドンと塩基対を形成するときのアンチコドン1字目の立体構造をコンピュータ・シミュレーションによって調べた。アンチコドン1字目のmnm<sup>s</sup>U残基(mnm<sup>s</sup>U 34)がコドン3字目のA、Gと塩基対を形成するときは、リボース部分のバックリングはC 3'-endo形である(図1-15, 16)。これに対して、Uと塩基対を形成するためには、バックリングがC 3'-endo形からC 2'-endo形に変化する必要がある(図1-17)。ところが、5'-リン酸基と5位の置換基との残基内水素結合によってmnm<sup>s</sup>U 34の $\alpha$ 角が $-180^\circ$ 近くに保たれているために、既に議論したようにC 2'-endo形をとることが困難である。よって、mnm<sup>s</sup>U 34はコドン3字目としてUを認識することができないと考えられる。また、コドン3字目のCと塩基対を形成しようとするとき、mnm<sup>s</sup>U 34のウラシル環が35位の残基のリボース部分と衝突するので、Cと塩基対を形成することもできない。

これまで、tRNA分子中で、34位のmnm<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U残基の5位の置換基が、33位のリボースと水素結合を形成するとされてきた(Hillen et al., 1987b)。本研究の計算結果によると、このような残基間水素結合は、mnm<sup>s</sup>U 34がAを認識するときのみ形成され、mnm<sup>s</sup>U 34のウラシル環を、G、Uと塩基対を形成するような位置に置いたときには形成されないことが示された(図1-15, 16, 17)。このことから、33位との残基間水素結合は、mnm<sup>s</sup>U 34の塩基部分がスタンダードなワトソン・クリック型塩基対を形成する位置に固定し、'wobbling'を妨げる働きをしていると考えられる。

原核生物やミトコンドリアとは異なり、真核生物の細胞質 tRNA の34位に存在する  $xm^5s^2U$ ,  $xm^5Um$  の5位の置換基は、全て5-メトキシカルボニルメチル基である (Sprinzl et al., 1991). tRNA 分子の34位の5-カルバモイルメチルウリジンの5位の置換基のカルボニル基が、33位のリボースの2'-水酸基と水素結合を形成するだろうと提案された (Berman et al., 1978). これに対して、34位の5-メトキシカルボニルメチルウリジン残基 ( $mcm^5U34$ ) では、5位の置換基とリン酸骨格との間で立体障害が生じるために、33位のリボースとの水素結合は形成できないだろうとの議論があった (Hillen et al., 1987a). そこで、本研究では、tRNA 分子中の  $mcm^5U34$  の安定なコンホメーションを計算によって求めたが、図1-18のように  $mcm^5U34$  の5位の置換基のカルボニル基と33位のリボースの2'-水酸基との間に、強くはないが水素結合が形成され得ることが示された.

#### 1-4. 考察

##### 1-4-1. アンチコドン1字目の $xm^5U$

5-メチルアミノメチルウラシルの化学合成が既に報告されており (Carbon et al., 1968), また、大腸菌の2-チオ化酵素欠損株では  $mnm^5s^2U$  の代わりに  $mnm^5U$  が tRNA<sup>Glu</sup> のアンチコドン1字目の存在するのではないかと推測されていたので (Sullivan et al., 1985),  $mnm^5U$  は全く新規の修飾ヌクレオシドとは言えないが、今回、野生型 tRNA には初めて見出された. これまでに、5-メチルウリジン誘導体 ( $xm^5U$ ) としては5-メトキシカルボニルメチルウリジン ( $mcm^5U$ ), および5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン ( $cmnm^5U$ ) の2種類の修飾ウリジンが tRNA のアンチコドン1字目に見出されている (Sprinzl et al., 1991; Tanaka et al., 1991).  $mcm^5U$  は酵母の tRNA<sup>Arg</sup> に存在し、コドン AGA を効率良く認識するが、コドン AGG はほとんど認識しない (Weissenbach and Dirheimer, 1978).  $cmnm^5U$  は3字目が A, G であるコドンに対応するマイコプラズマ tRNA やミトコンドリアの tRNA に存在している (Andachi et al., 1989; Martin et al., 1990; Tanaka et al., 1991). すなわち、コドン AGA, AGG に対応する大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> の34位に  $mnm^5U$  が存在することは、これらの  $xm^5U$  誘導体のコドン認識から考えてリーゾナブルである. また、原核生物 tRNA やミトコンドリア tRNA に存在する  $xm^5s^2U$ ,  $xm^5Um$ ,  $xm^5U$  のウラシル環の5位がメチルアミノメチル基に置換されているのに対して、真核生物の細胞質 tRNA に存在

する $xm^s s^2U$ ,  $xm^sU$ のウラシル環の5位はメトキシカルボニルメチル基で置換されている (Sprinzl et al., 1991).  $mnm^sU$ の5位の置換基は, このようなルールとも合致している.

#### 1-4-2. U34の2-チオ化

大腸菌  $tRNA^{Ser}$ ,  $tRNA^{Lys}$ ,  $tRNA^{Ala}$ のU34は $mnm^s s^2U$ に修飾されているが (Sprinzl et al., 1991),  $tRNA^{Arg}$ では $mnm^sU$ に修飾されていることから, 2-チオ化酵素 (asuE遺伝子産物 [Sullivan et al., 1985]) はアンチコドン2字目のUを認識していると考えられる ( $tRNA^{Arg}$ ではアンチコドン2字目はCである). このような2-チオ化のパターンは, 枯草菌や酵母でも同様であるが, 高等動物では $tRNA^{Arg}$ も2-チオ化されている (Sprinzl et al., 1991). このことから, 2-チオ化酵素は進化の過程でアンチコドン2字目がU, Cのいずれの $tRNA$ も基質として認識できるようになったと想像される.

#### 1-4-3. $pmnm^sU$ のコンホメーション特性

これまでに種々のモノヌクレオチド, モノヌクレオシドについて,  $\Delta H$ 値,  $\Delta S$ 値が求められてきた (Watanabe et al., 1979; Yokoyama et al., 1985; Agris et al., 1991; Kawai et al., 1992). そして $tRNA$ 分子中におけるヌクレオチド残基のコンホメーション特性については,  $\Delta S$ 値や $\Delta G$ 値ではなく $\Delta H$ 値に基づいて議論されてきた. なぜなら,  $\Delta S$ 値は,  $C3'-O3'$ ,  $C4'-C5'$ ,  $C5'-O5'$ 結合などの'exocyclic chemical-bond'のまわりの回転運動を反映しているが,  $tRNA$ 中ではこのような運動は抑えられている理由によって,  $tRNA$ 中のコンホメーションを議論するときには $\Delta S$ 値は考慮しなくて良い (Kawai et al., 1992). さらに,  $tRNA$ 分子中のヌクレオチド残基の挙動を議論する際には, ヌクレオシドよりも,  $3'$ -リン酸基, または $5'$ -リン酸基を持つヌクレオシドのコンホメーション特性に基づく方がリーゾナブルである. 実際, リン酸基が $xo^sU$ や $Um$ のコンホメーション特性に重要な寄与をしていることが分かっている (Yokoyama et al., 1985; Kawai et al., 1992). そこで, 本研究では $pmnm^sU$ について $\Delta H$ 値を求め,  $mnm^sU$ とも比較した. その結果,  $pU$ の5-メチルアミノメチル化は $C3'-endo$ 形を顕著に安定化すること, および,  $C3'-endo$ 形の安定化には $5'$ -リン酸の存在が必須であることが示された.  $pU$ から $pmnm^sU$ への修飾による $C3'-endo$ 形の安定化の効果 ( $0.56kcal \cdot mol^{-1}$ ) は,  $pU$ から $pmnm^s s^2U$ への修飾による効果 ( $1.01kcal \cdot mol^{-1}$ ) と比べて小さい. しかし,  $tRNA$ 分子中では,  $mnm^s s^2U$ 残基の隣はア



ンチコドン2字目(35位)の残基はUであるのでスタッキングによる安定化は期待できないのに対して、tRNA<sup>4\*</sup>中のmnm<sup>5</sup>U残基のC3'-endo形はC35とのスタッキングによって安定化される。このように、mnm<sup>5</sup>U34においてC3'-endo形を安定化する'intrinsic'な効果は、隣接する残基とのスタッキングによって強められていると考えられる。

xm<sup>5</sup>U誘導体のコンホメーション特性については、ヌクレオシドのコンホメーションの解析結果に基づいて、ウラシル環の5位の置換はバックリングの特性にほとんど影響を与えないとされたが(Agris et al., 1991)、pmnm<sup>5</sup>Uのコンホメーション特性に5'-リン酸が本質的な役割をしていることを考慮すると、5'-ヌクレオチドの解析が必要だろうと考えられる。常温でのC2'-endo形とC3'-endo形の存在比に基づいて、既にジヌクレオシド・モノリン酸中のxm<sup>5</sup>Uのコンホメーション特性が未修飾のウリジンとほとんど違わないと報告されている(Agis, 1991)。しかし、本研究においても、常温におけるpmnm<sup>5</sup>UのC2'-endo形とC3'-endo形の存在の割合の差は小さく、 $\Delta H$ 値を得て初めてコンホメーション特性が議論できたという経緯があった。その上、それぞれの温度におけるC2'-endo形とC3'-endo形の存在比は、 $\Delta H$ と $\Delta S$ の両方を反映している。このように、本研究から、ジヌクレオシド・モノリン酸のコンホメーション特性を論じるときにも、 $\Delta H$ 値に基づく議論の必要性が提起される。

#### 1-4-4. 転写後修飾によるウリジン・ヌクレオチドの C3'-endo形の安定化のメカニズム

NMRスペクトルの解析とコンピュータによるコンホメーションの解析によって、pmnm<sup>5</sup>UのC3'-endo形が安定化されるメカニズムが明かにされた。それは、グリコシル結合まわりの $\alpha$ 角が $-180^\circ$ 近くに保たれるために、C2'-endo形では2-カルボニル基と2'-水酸基の間で立体障害が生じるからであった。2-チオ化によるC3'-endo形が安定化されるメカニズムは、C2'-endo形では「嵩だかい」2-チオカルボニル基が2'-水酸基と衝突する為であることが示されている(Yamamoto et al., 1983)。また、2'-O-メチル化については、「嵩だかい」2'-O-メチル基と2-カルボニル基との間の立体障害によることが明かにされている(Kawai et al., 1992)。このように、2-チオ化、2'-O-メチル、5-メチルアミノメチル化は、お互いに全く化学的な性質の異なる置換であるにもかかわらず、C2'-endo形における2位、2'位間の立体障害のためにC3'-endo形が優勢になるという共通のメカニズムを持つことが明かになった(図1-19)。ただし、pmnm<sup>5</sup>UがC3'-endo形をとるときに、5-

メチルアミノメチル基と5'-リン酸基と間でファンデルワールス力が働き、全体としてコンパクトなコンホメーションになることができる(図1-14B)。このこともC3'-endo形の安定化には寄与しているだろう。

コドン3字目のA, Gに対応する修飾ウリジンに見られる置換基としては、他に5-カルボキシメチルアミノメチル化と5-メトキシカルボニルメチル化がある。cmm<sup>o</sup>Uヌクレオチドや, mcm<sup>o</sup>Uヌクレオチドのコンホメーション特性は明かではないが、5-カルボキシメチルアミノメチル化は5-メチルアミノメチル化と同様のメカニズムによってC3'-endo形を安定化するだろうと考えられる。そこで、残るmcm<sup>o</sup>U 5'-モノリン酸(pmc<sup>o</sup>U)のコンホメーション特性を明らかにすることは、今後の重要な研究課題になるだろう。

5-メチルアミノメチル化によるC3'-endo形の安定化の効果が0.56kcal・mol<sup>-1</sup>であるのに対して、2-チオ化の効果は0.78kcal・mol<sup>-1</sup>である(Yokoyama et al., 1985)。ところが、pUからpmm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>Uへの修飾による効果は1.01kcal・mol<sup>-1</sup>でしかなく、5位の置換と2-チオ化の効果は加算にならない。このことは、5-メチルアミノメチル化と2-チオ化が共通のメカニズムによってC3'-endo形を安定化しているからだろう。それでも、ps<sup>2</sup>Uとpmm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>U, s<sup>2</sup>Uとmnm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>UのΔH値をそれぞれ比較すると、5-メチルアミノメチル化は2-チオ化に加えて0.2kcal・mol<sup>-1</sup>だけC3'-endo形を安定化することが分かる(Yokoyama et al., 1985)。しかも、この効果は5'-リン酸基を必要としない。C2'-endo形よりもC3'-endo形をとるときの方が5'-水酸基と5-メチルアミノ基とが近づくので、分子全体としてコンパクトになってより安定になるだろう(図1-20)。pmm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>Uやmnm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>Uでは、5位の置換はこのような効果によってC3'-endo形の安定化に寄与しているのかも知れない。また、tRNAの機能にとっては、2-チオ化に障害のある大腸菌変異株においてtRNAのアンチコドン1字目がmnm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>Uからmnm<sup>o</sup>Uに変わっても、'intrinsic'なコンホメーション特性が大きくは変わらないことは、正確なコドン認識を保障する上で重要だろう。

#### 1-4-5. mnm<sup>o</sup>U34の「強く制限された'wobbling'」

アンチコドン1字目にmnm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>Uを持つ大腸菌tRNA<sup>ala</sup>はコドン3字目として効率良くAを認識するが、Gを認識する効率は低い(Agris et al., 1973; Lustig et al., 1981)。すなわち、mnm<sup>o</sup>s<sup>2</sup>U34の'wobbling'は強く制限されている。ところが、U34の2-チオ化に障害のある大腸菌変異株においては、tRNA<sup>ala</sup>はコドン3字目としてAに加えてGをも効率良く認識できるようになる(Agris et al., 1973)。この結果から、U34の5位の置換よりも

2-チオ化が「強く制限された 'wobbling'」に重要であると考えられた (Agris et al., 1973). しかし, 大腸菌 tRNA<sup>f</sup> は *in vivo* でコドン AGA をおもに認識するが, コドン AGG はほとんど認識しないことが報告されている (Spanjaard et al., 1990). このことから, mnm<sup>s</sup>U34 の 'wobbling' も強く制限されることが分かる. 酵母 tRNA<sup>f</sup> の mcm<sup>s</sup>U34 も「強く制限された 'wobbling'」を示すので (Weissenbach and Dirheimer, 1978), 「強く制限された 'wobbling'」は xm<sup>s</sup>U34 の一般的な性質であるように思える. この点を明かにするためには, さらに多くの xm<sup>s</sup>U34 について 'wobbling' の性質が調べられなければならないだろう.

#### 1-4-6. U34 から mnm<sup>s</sup>U34 への転写後修飾によるコドン認識制御

tRNA<sup>f</sup> の 34 位の mnm<sup>s</sup>U 残基の「強く制限された 'wobbling'」は, リボース・バックリング特性と, 33 位との残基間水素結合によって説明することができる. 構造計算の結果から, mnm<sup>s</sup>U34 が, コドン 3 字目の U, A, G と塩基対を形成するとき, どのようなコンホメーションをとらなければならないかが明かにされた. 即ち, mnm<sup>s</sup>U34 は, A, G を認識するときには C 3'-endo 形をとるが, U と塩基対を形成するためには C 3'-endo 形から C 2'-endo 形に変化しなければならない. よって, mnm<sup>s</sup>U34 のリボースの C 3'-endo 形が著しく安定であることは, mnm<sup>s</sup>U34 が, セリン・コドンの 3 字目である U と塩基対を形成することを防ぐと同時に, アルギニン・コドンの 3 字目である A, G を効率よく認識することに寄与していると考えられる. 一方, mnm<sup>s</sup>U34 の 5 位の置換基中のアミノ基と 33 位のリボースの 2'-水酸基の間の水素結合は, mnm<sup>s</sup>U34 のウラシル環をコドン 3 字目の A と塩基対形成する位置に固定する働きをしている (図 1-15). 既に, このような 33 位のリボースとの水素結合が, mnm<sup>s</sup>U34 によるコドン 3 字目の G の認識を妨げるだろうと提案されていたが (Hillen et al., 1978b), 本研究によって, G だけでなく U との塩基対形成をも阻害する働きをしていることが示された.

以上のことを総合して考えると, コドン 3 字目としてノンコグネートな U を認識することは, mnm<sup>s</sup>U34 のリボース・バックリングの特性, および, 5 位の置換基と 33 位の残基との水素結合形成によって二重に妨げられている. また, コグネートな G の認識は, 水素結合によって A の認識と効率において差がつけられていると考えられるが, むしろ, U の認識を妨げるためのメカニズムが結果として G の認識効率を低下させてしまっていると考えても良いのかもしれない. 34 位の xm<sup>s</sup>U 残基, xm<sup>s</sup>Um 残基, 2'-O-メチルウリジン (Um) 残基のコドン認識についても, これらの残基における C 3'-endo 形の著しい安定性に

基づいて説明されてきた(Yokoyama et al., 1979, 1985; Agris et al., 1991; Kawai et al., 1992). これらの修飾ウリジンの5位の置換基は, 原核生物やミトコンドリアでは5-メチルアミノメチル基であるので (Sprinzl et al., 1991), 5位の置換基と33位のリボースとの水素結合の機能について,  $mnm^sU34$ のケース同様の議論が成り立つだろう.

一方, 真核生物の細胞質tRNAにおいては,  $xm^sU34$ ,  $xm^sU34$ の5位の置換基は5-メトキシカルボニルメチル基( $mcm^s$ 基)であり, 酵母tRNA<sup>Asp</sup>の $mcm^sU34$ が「強く制限された‘wobbling’」を示すことが報告されている (Weissenbach and Dirheimer, 1978).  $mcm^sU34$ は, 33位のリボースと強くはないが水素結合を形成することが可能である(図1-18). この水素結合は,  $xm^sU34$ ,  $xm^sU34$ のコドン認識において,  $mnm^sU34$ の5位の置換基の残基間水素結合と同様の働きをしているかも知れない. 一方,  $mcm^s$ 基の, コンホメーション特性への‘intrinsic’な効果については,  $mcm^sU$ の解析から否定的な報告がされていたが (Sierzputowska-Gracz et al., 1987),  $pmcm^sU$ のコンホメーション特性を解析することが必要だろう.

#### 1-4-7. ‘wobbling’を制限する転写後修飾の多様さ

ほんの2, 3年前迄は, コンホメーション特性の制御によって‘wobbling’を制限する転写後としては, 2-チオ化が知られているだけであった. 最近になり, 2'-O-メチル化も同様の効果を持つことが報告され (Kawai et al., 1992), 本研究によつては5-メチルアミノメチル化のような5位の置換によつてもC3'-endo形の安定化が達成されることが示された. 「拡大された‘wobbling’」を示す修飾ウリジンは $xo^sU$ のみであるのに対して, ‘wobbling’を制限する転写後修飾の多様さは目を引く. この多様性を考えるうえで留意しなければならないのは, C3'-endo形の安定性の違いである. 例えば,  $pmnm^sU$ の $\Delta H$ 値 ( $1.01\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )は,  $pmnm^sU$  ( $0.56\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )と比べて大きい. 大腸菌では,  $mnm^sU$ はtRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>に存在するので, 大きな $\Delta H$ 値は, U35がほとんどスタッキングしないことを補っているように見える. そこで, 転写後修飾は個々のケースの必要に応じて多様化したと考えることも可能である. しかし, このような立場に立つ時, マイコプラズマではtRNA<sup>Asp</sup>も, tRNA<sup>Glu</sup>なども $xm^sU34$ を持つこと, しばしば $xm^sU34$ を持つtRNA<sup>Asp</sup>では34位, 35位のスタッキングは強いことなどの説明が困難である. ただし, 1つの生物種で, tRNA分子種の構成, アンチコドンの1字目の修飾が全て明らかになっている例はごく少数であるので, この仮説の検証のためには, さらに多くの生物種でU34の修飾のパターン

が明らかにされる必要があるだろう。

多様性の別の解釈は、進化の過程における転写後修飾の変遷を想定することである。5位の置換と、それ以外の修飾(2-チオ化と2'-O-メチル化)とは少し性格が異なるように思われる。1つは、ミトコンドリアtRNAも含め、少数の例外を除くと、これまで知られているほとんどのケースで、コドンNNA/NGGに対応するtRNAのU34は5位に置換基(cmm<sup>s</sup>, mnm<sup>s</sup>, mem<sup>s</sup>のいずれか)を持つ。そして、2-チオ基も2'-O-メチル基も持っていないタイプの修飾ウリジン(xm<sup>s</sup>U)であることも少なくない(Sprinzi et al., 1991)。つまり、2-チオ化や2'-O-メチル化と比べて、5位の置換が最も基本的な修飾であるように見える。さらに、cmm<sup>s</sup>, mnm<sup>s</sup>, mem<sup>s</sup>の置換基はU34に特異的であるのに対して、2-チオ化や2'-O-メチル化は34位以外の様々な残基に見出される。これらの状況から、もともとxm<sup>s</sup>U34のみであり、2-チオ化や2'-O-メチル化は他の部位に起こっていたのが、特異性の変化した修飾酵素がU34をも2-チオ化や2'-O-メチル化するようになったと想像できる。どのtRNA分子種のU34が2-チオ化(または2'-O-メチル化)されるかは、修飾酵素の特異性の問題であって、特に必然性はないのかもしれない。ただし、xm<sup>s</sup>U34が2-チオ化、または2'-O-メチル化されることは、xm<sup>s</sup>U34の2位、2'位間の立体障害を強めることでC3'-endo形をさらに安定化するので、タンパク質合成系にとって有益であったと考えられる。この仮説は、修飾酵素がtRNAの特定の部位をどのように特異的に認識しているか、その特異性はどのようにして変化し得るかという問題と関係している。現在のところ、tRNA修飾酵素については十分な知見が蓄積しているとは言い難く、修飾酵素の特異性の変遷について論じられる状況ではないが、上の仮説は、修飾酵素の研究に対する1つの問題提起になるだろう。

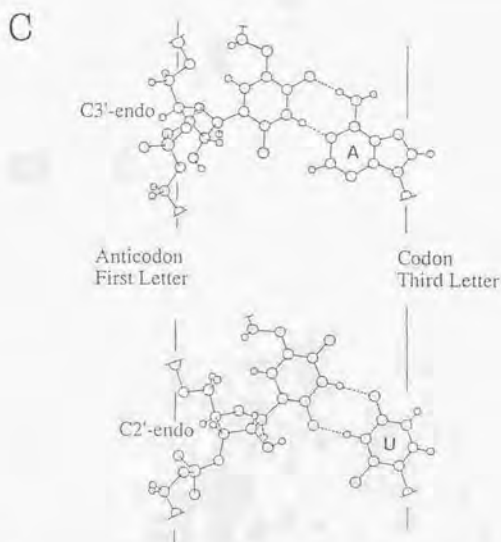
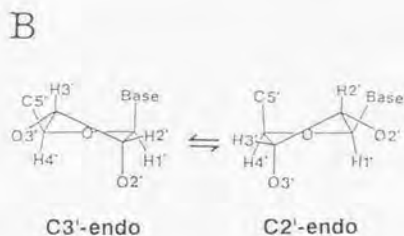
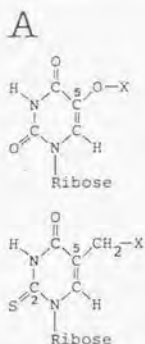


図 1-1.

- A) 5-ヒドロキシウリジン誘導体 ( $xo^5U$ ) の化学構造(上)  
 5-メチル-2-チオウリジン誘導体 ( $xm^5s^2U$ ) の化学構造(下)
- B) リボース・バックリングについてのC3'-endo形とC2'-endo形の2つのコンホマーの立体構造
- C) アンチコドン1字目のウリジン残基(U34)とコドン3字目のA, Uとの塩基対形成. U34はAを認識するときはC3'-endo形をとるが(上), Uを認識するときにはC3'-endo形からC2'-endo形へバックリングが変化する(下).  
 (Yokoyama et al., 1985)

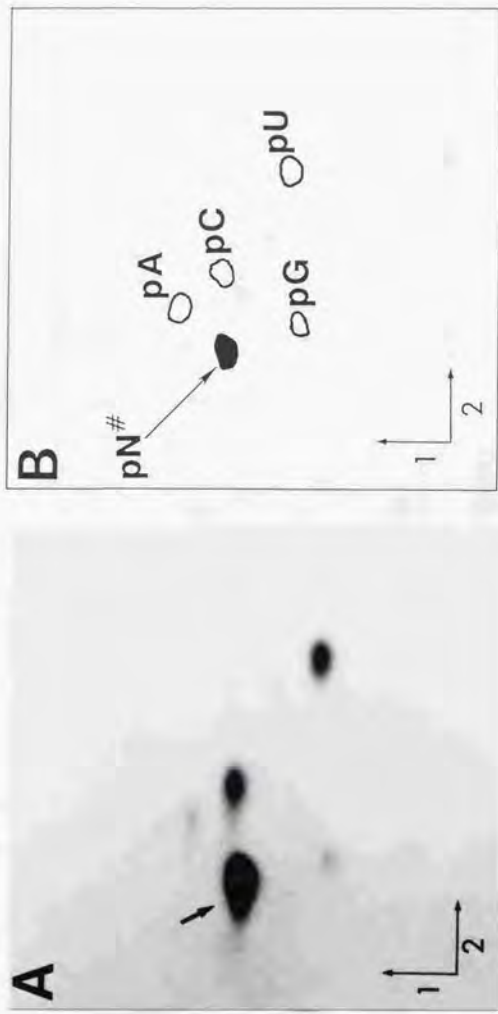


図1-2.  
 A) tRNA<sup>Asp</sup>のアンチコドン1字目の薄層クロマトグラフィー、  
 未特定の修飾ウリジン (pN<sup>\*</sup>) のスポットを矢印で示す。  
 B) 大腸菌 tRNA 分画から得た未特定修飾ウリジン (pN<sup>\*</sup>) の薄層クロマト  
 グラフィー。4つのスタンダードな 5'-ヌクレオチド (pA, pC, pG, pU)  
 も一緒に展開した。

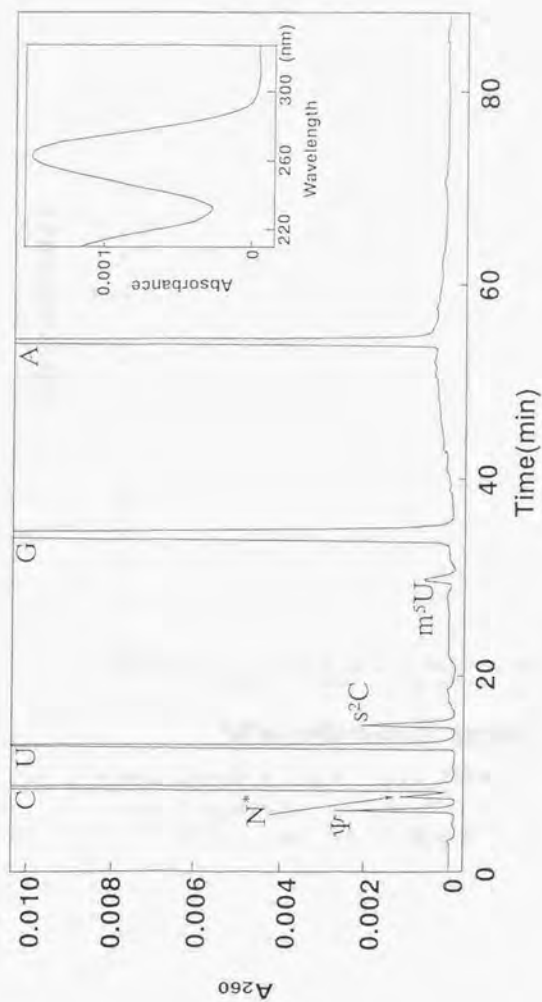


図1-3. tRNA<sup>Phe</sup>の逆相HPLCによるヌクレオシド組成分析

[Ψ; シュウドウリジン, s<sup>2</sup>C; 2-チオウリジン, m<sup>5</sup>U; 5-メチルウリジン. 図内にN\*のUV吸収スペクトルを示す.]



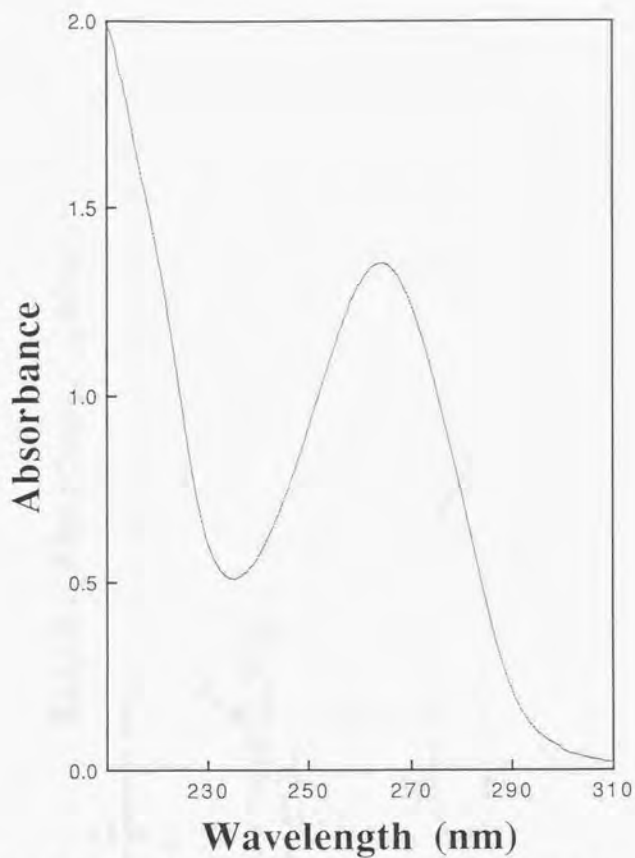


図1-4. 大腸菌tRNA分画から得た未同定修飾ウリジンpN\*のUV吸収スペクトル(pH7.0)  
島津製作所UV-260を用いて測定を行った。

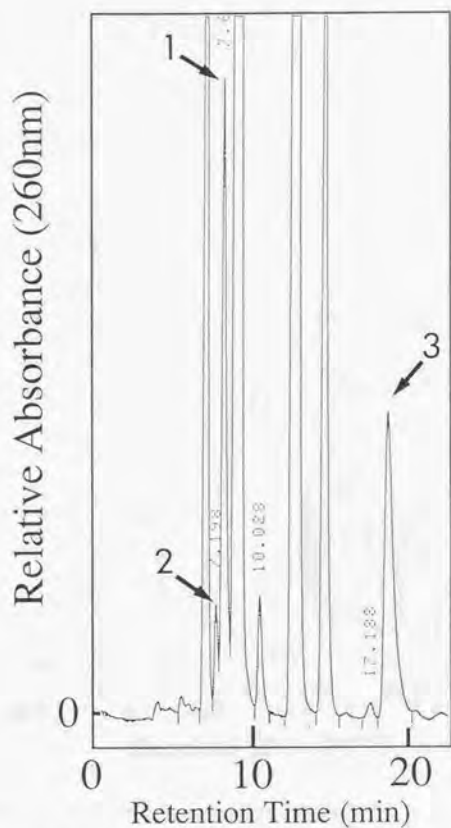


図1-5. tRNA<sup>4</sup>の修飾ウリジンN\*と大腸菌tRNA分画から得た未同定修飾ウリジンN\*との逆相HPLCによる突き合せ. N\*とN\*は1つのピーク(矢印1)になって溶出されている. 5-カルボキシルメチルアミノメチルウリジン(矢印2), 5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン(矢印3)も混合して溶出位置を比較した.

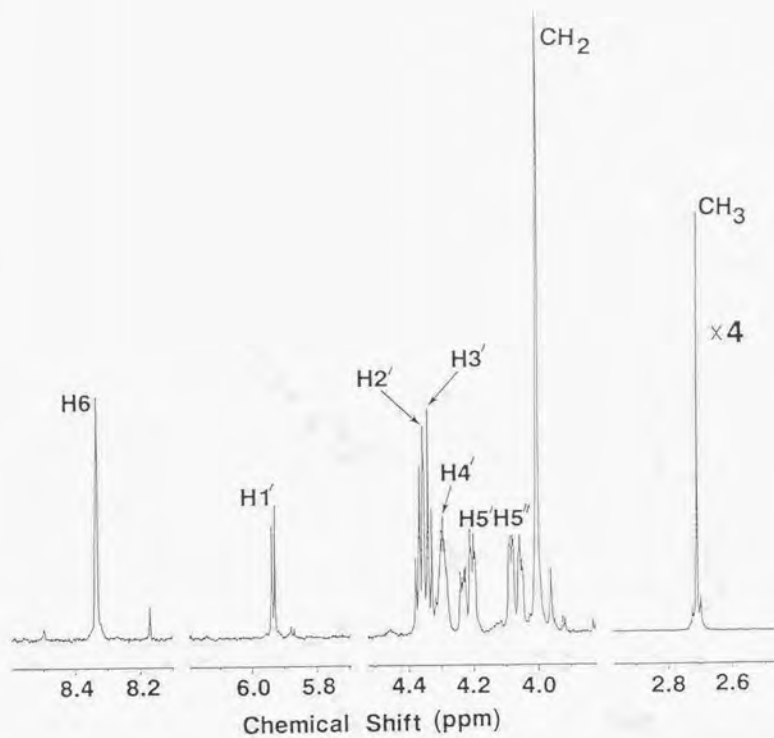


図 1-6.  $\text{pN}^*$  ( $\text{pmmn}^5\text{U}$ ) の 400-MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

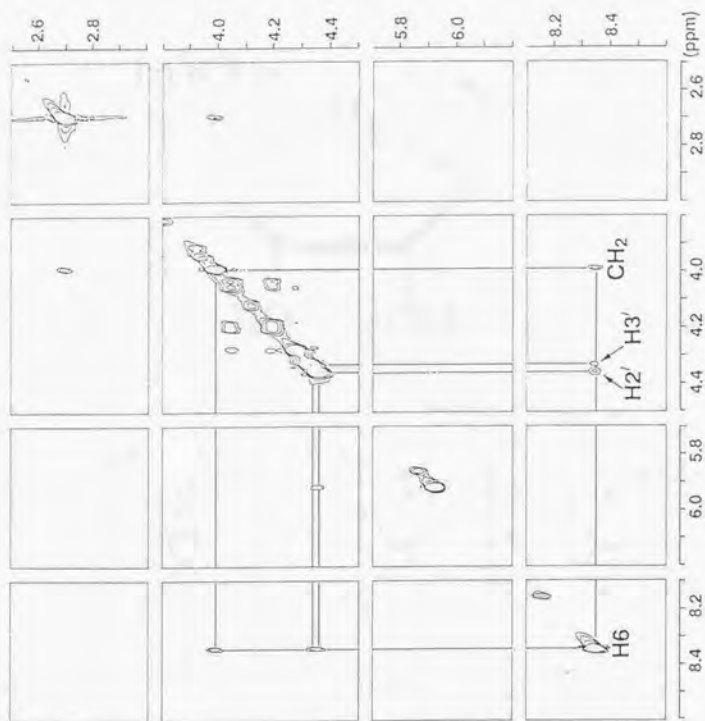


図 1-7. pN\* (ppm<sup>5</sup>U) の 500-MHz NOESY スペクトル

A .

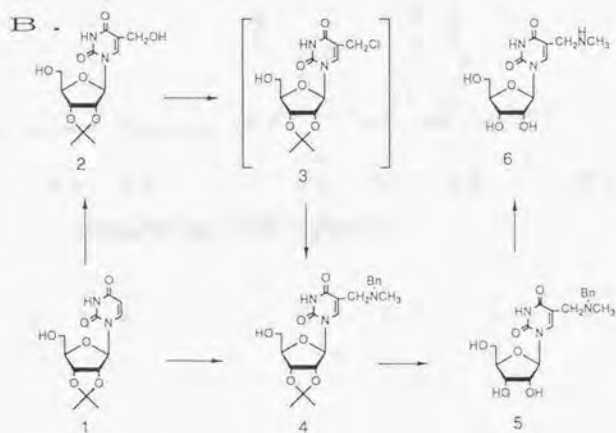
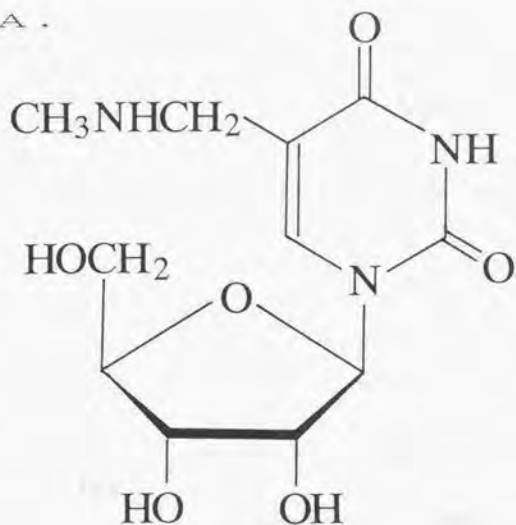


図 1-8. A) 5-メチルアミノメチルウリジン (mn<sup>5</sup>U) の化学構造  
 B) mn<sup>5</sup>U の化学合成のスキーム

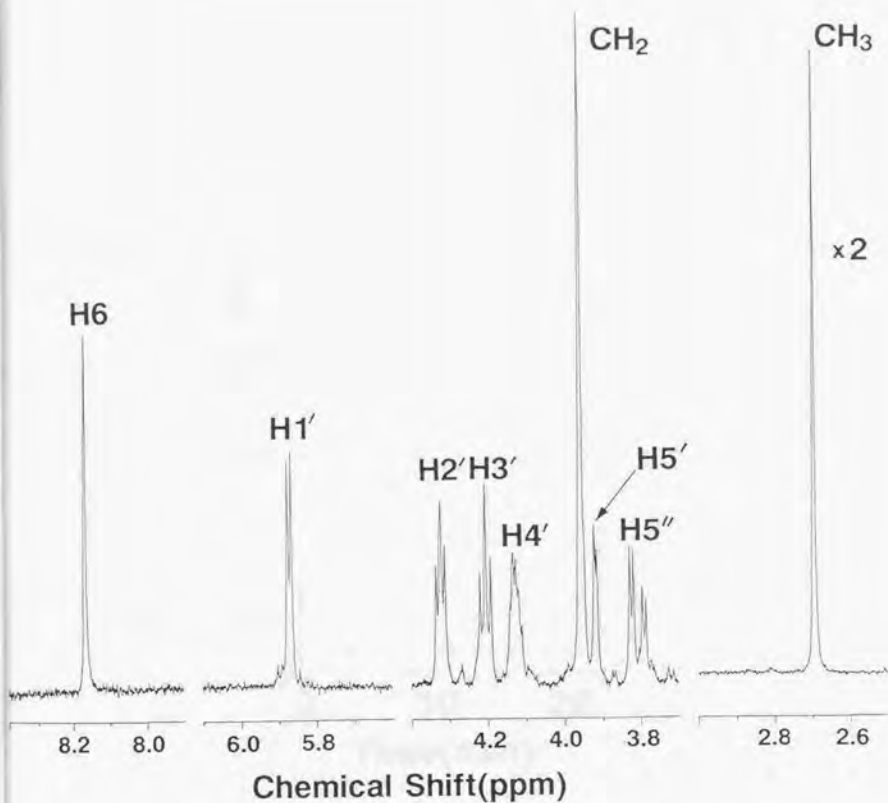


図 1-9.  $\text{mnm}^3\text{U}$  の 400-MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

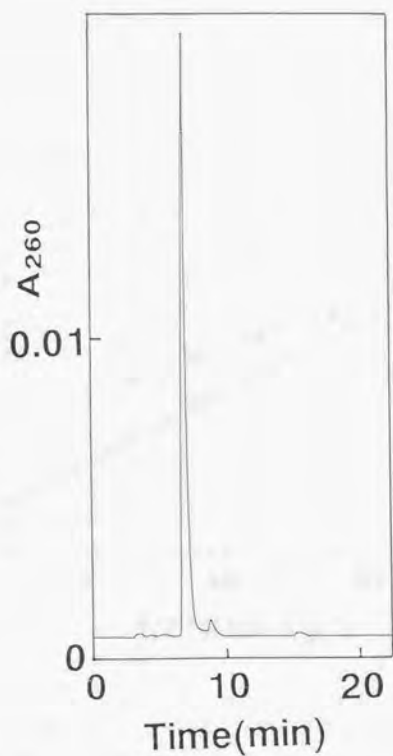


図 1-10. tRNA<sup>4\*</sup>の修飾ウリジン<sup>N\*</sup>と化学合成したmm<sup>5</sup>Uとの  
逆相HPLCによる突き合せ

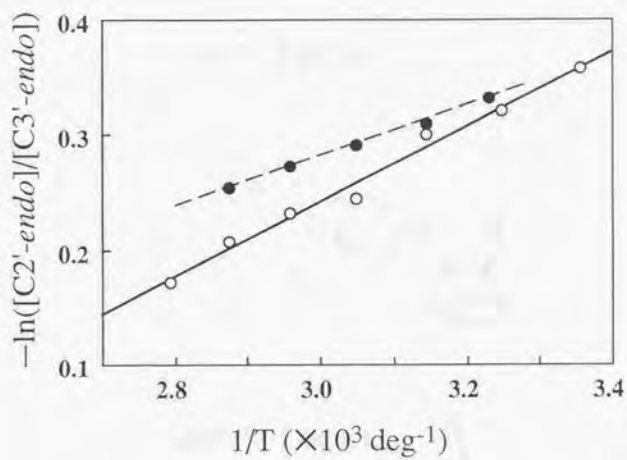
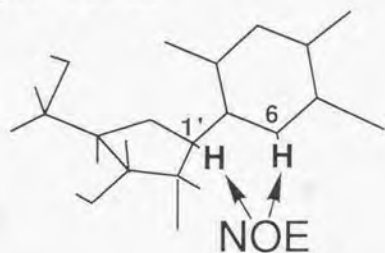


図 1-11. pmm<sup>5</sup>U (○), mnm<sup>5</sup>U (●) のリボース・バックリングの平衡定数 [C2'-endo] / [C3'-endo] の温度依存性



*syn* form



*anti* form

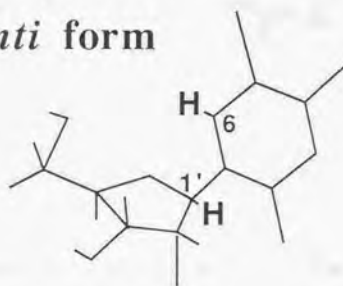
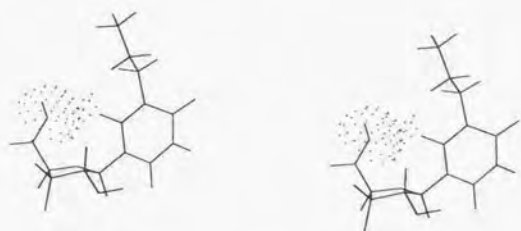


図 1-12. pmm<sup>5</sup>U のグリコシル結合まわりのコンホメーション。  
*syn*形では H 1' と H 6 の間で NOE のクロスピークが観測される。

A .



B .

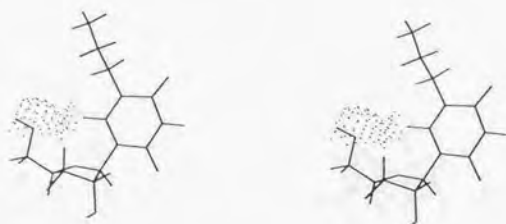
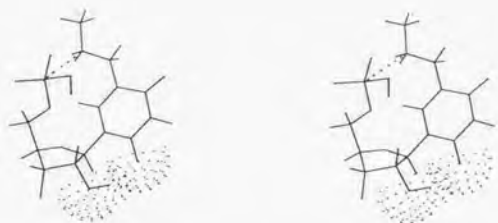


図 1-13 . A)  $mnm^5U$  のコンホメーション (C2'-endo形)  
B)  $mnm^5U$  のコンホメーション (C3'-endo形)  
点描でファンデルワールス半径を示す。

A .



B .

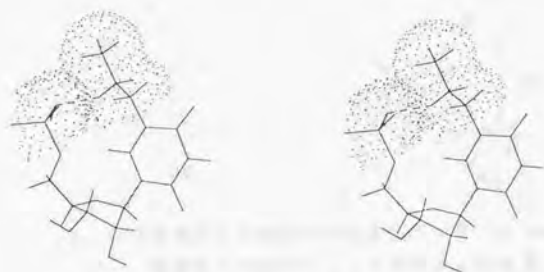


図 1-14. A)  $pmnm^5U$  のコンホメーション (C2'-endo形)  
B)  $pmnm^5U$  のコンホメーション (C3'-endo形)  
点描でファンデルワールス半径を, 破線で水素結合を示す.

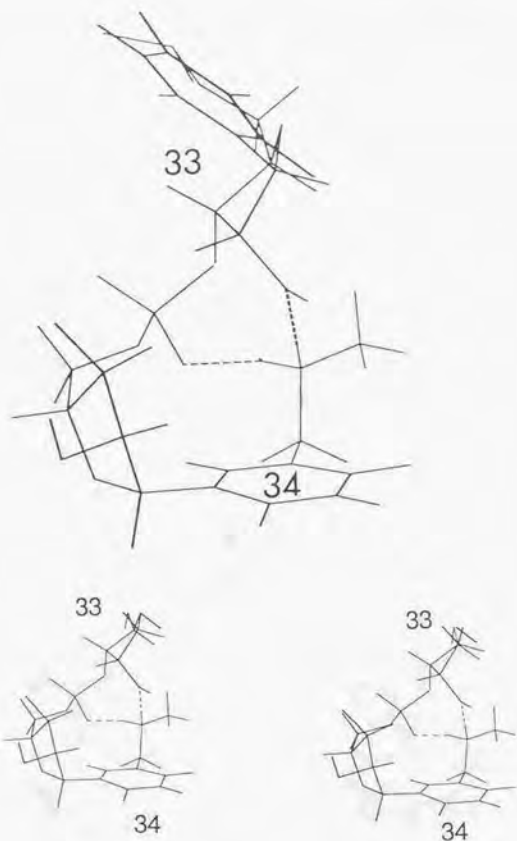


図 1-15. コドン 3 字目の A と塩基対を形成しているときの  $mnm^8U$  残基 (34 位) と隣接する 33 位のウリジン残基の立体構造, 破線は水素結合を示す. 下段は立体視図.

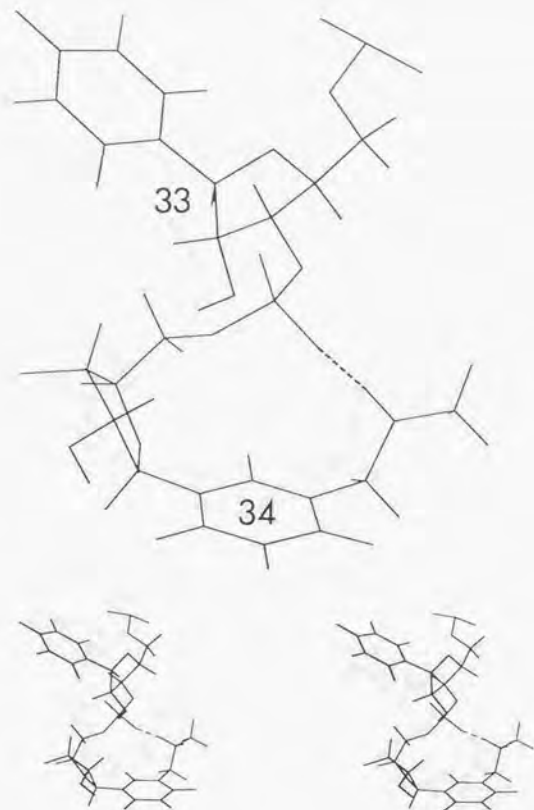


図1-16, コドン3字目のGと塩基対を形成しているときの $mnm^s$ U残基  
(34位)と隣接する33位のウリジン残基の立体構造,  
破線は水素結合を示す, 下段は立体視図.

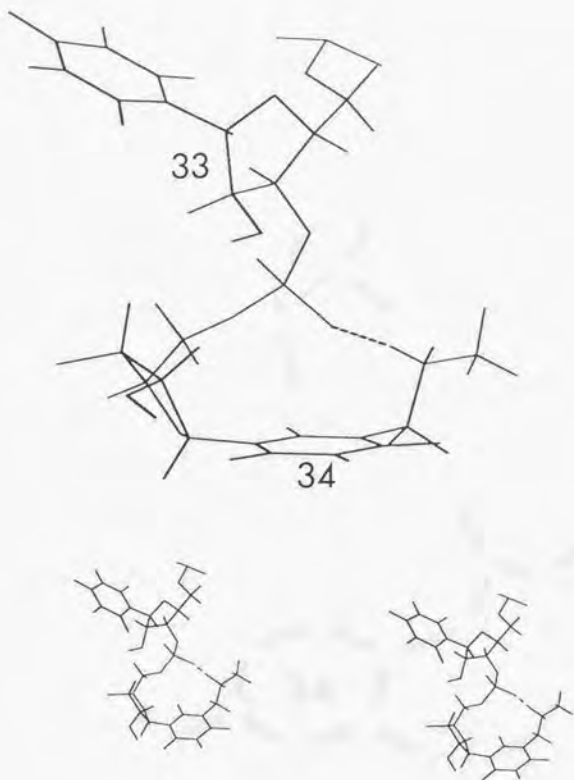


図 1-17. コドン 3 字目の U と塩基対を形成しているときの  $mnm^o$  U 残基 (34 位) と隣接する 33 位のウリジン残基の立体構造. 破線は水素結合を示す. 下段は立体視図.

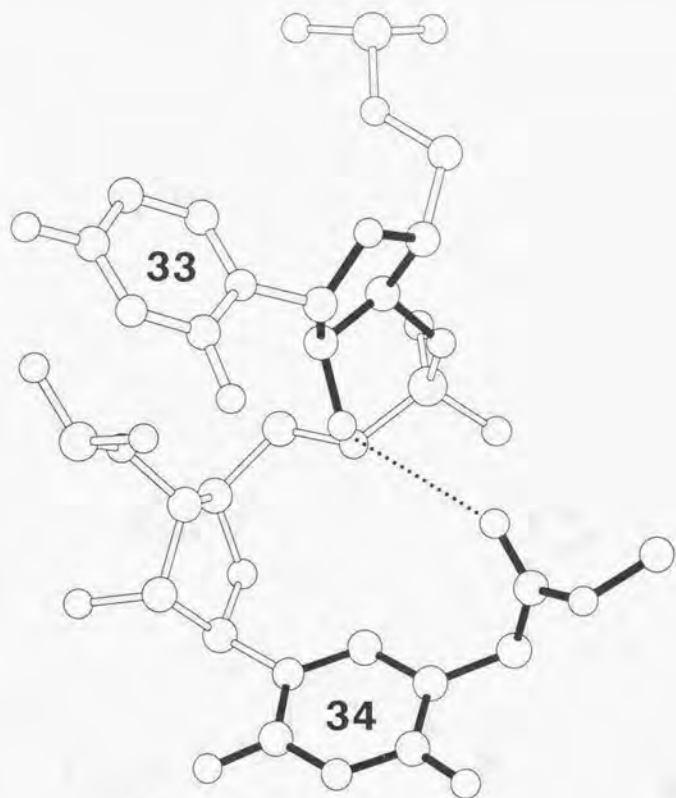
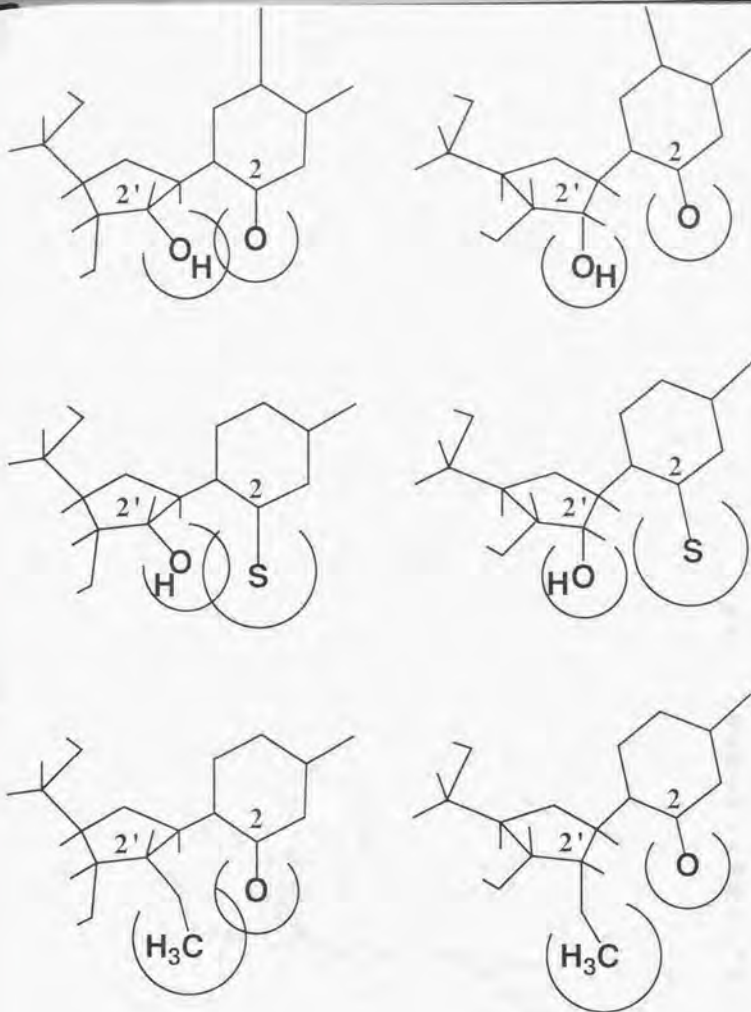


図1-18. 34位のmcm<sup>5</sup>U残基と33位のリボースとの水素結合形成

アンチコドン1字目のmcm<sup>5</sup>U残基はC3'-endo形で安定なコンホメーションをとっている。このとき、mcm<sup>5</sup>U34の5位の置換基中のカルボニルの酸素原子(O51)とU33のO2'の間の距離は3.16Åであり、O2'-H(O51)-O51のなす角度は135°である。O51とU33のO2'の間で、弱いかもしれないが水素結合が形成されている可能性がある。構造計算は、酵母の7RNA<sup>P<sup>abc</sup></sup>の座標(Quigley et al., 1975)を利用して、'NMRgraf'プログラム(Bio-Design)によりSilicon Graphics IRIS-4D/25Gを用いて行った。



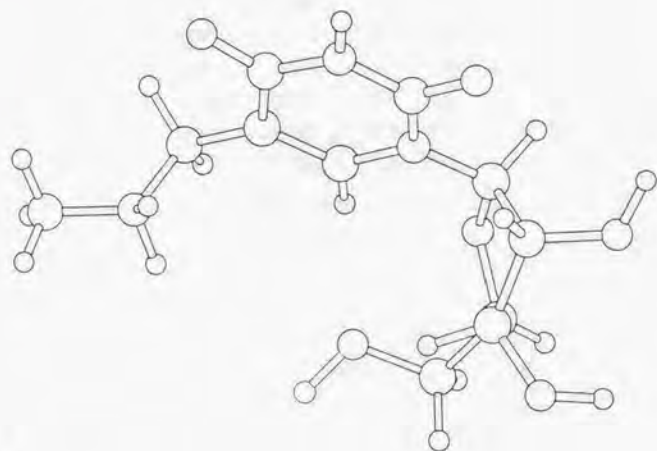
*C2'-endo*

*C3'-endo*

図1-19. 3字目がA, Gであるゴドンの対応するtRNAのU34見出しされる3つのタイプの転写後修飾(5-メチルアミノメチル化[上], 2-チオ化[中], 2'-O-メチル化[下])は、いずれもウラシル環の2位, リボースの2'位の間立に立体障害を生じさせることによって, C2'-endo形を不安定にし、一方のC3'-endo形を優勢にする。



A



B

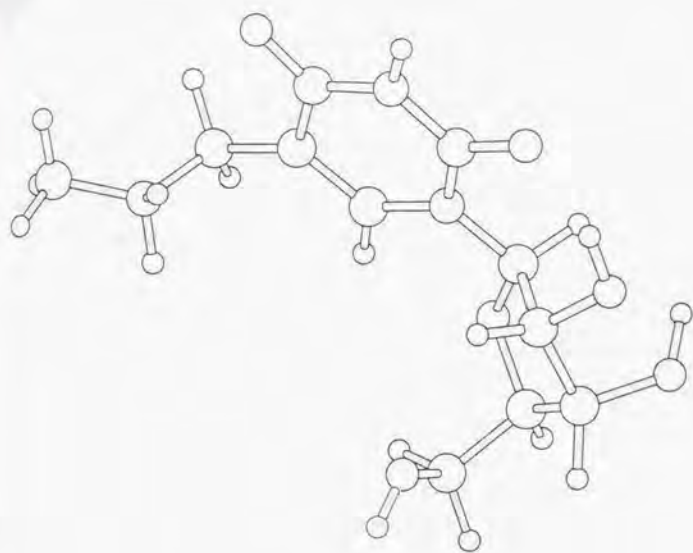


図1-20.  $mnm^a$  Uの5'-水酸基と5位の置換基との位置関係とリボース・  
 パッカリングとの相関を示すモデル・ヒルディング(B)特に構造計算

は行っていない。

C 3'-endo形 [A] のときはC 2'-endo形 [B] のときと比べて  
 5位の置換基は5'-水酸基により近い位置を占めている。

表 1-1. 各温度における  $mnm^{\circ}U$ ,  $pmnm^{\circ}U$  の  $J_{1,2}$ ,  $J_{3,4}$  および  
 $C2'$ -endo形と  $C3'$ -endo形の存在比.

$mnm^{\circ}U$

	$J_{1,2}$	$J_{3,4}$	[ $C2'$ -endo形]	[ $C3'$ -endo形]
37°C	4.180	5.820	41.8%	58.2%
45°C	4.232	5.778	42.3%	57.7%
55°C	4.277	5.723	42.8%	57.2%
65°C	4.323	5.677	43.2%	56.8%
75°C	4.388	5.632	43.7%	56.3%

$pmnm^{\circ}U$

	$J_{1,2}$	$J_{3,4}$	[ $C2'$ -endo形]	[ $C3'$ -endo形]
25°C	4.118	5.882	41.2%	58.8%
35°C	4.210	5.790	42.1%	57.9%
45°C	4.240	5.760	42.4%	57.6%
55°C	4.392	5.608	43.9%	56.1%
65°C	4.423	5.577	44.2%	55.8%
75°C	4.484	5.516	44.8%	55.2%
85°C	4.575	5.425	45.8%	54.2%

表 1-2.  $mnm^{\circ}U$ ,  $pmnm^{\circ}U$  の  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  値

	$\Delta H$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal·deg <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
$pmnm^{\circ}U$	0.64(0.04)	1.46(0.13)
$mnm^{\circ}U$	0.39(0.06)	0.61(0.20)
pU	0.09*	
U	0.37*	

( ) 内は標準偏差値

\*Yokoyama et al., 1985

表 1-3. NMR の測定によって求めた  $\text{mm}^5\text{U}$  のグリコシル結合の  
まわりの二面角 ( $\alpha$  角) の大きさ

バックリング	$\alpha$ 角
C 2'-endo	80° (syn)
C 2'-exo	-114° (anti)
C 3'-endo	77° (syn)
C 3'-exo	-151° (anti)

## 第2章 大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> 遺伝子の変異による高温での増殖阻害のメカニズム

### 2-1. 序

大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> は argU 遺伝子 (始めは dnaY 遺伝子と呼ばれていた) によってコードされている (Garcia et al., 1986). argU 遺伝子内に変異を持つ argU10(Ts) 変異株は高温で増殖を停止するが, タンパク質合成や RNA 合成よりも先に DNA 複製が停止することが報告されていた (Henson et al., 1979). tRNA<sup>Arg</sup> がコドン AGA を認識するので, argU10(Ts) 変異株においては, コドン AGA を含む DNA 複製関連の遺伝子の翻訳が高温において阻害されるのではないかと考えられた (Garcia et al., 1986). 数個の AGA コドンを含むレポーター遺伝子の翻訳が調べられた結果, argU10(Ts) 変異株では 30°C においてもコドン AGA の翻訳阻害が見られ, 43°C で阻害は一層顕著であることが報告されている (Chen et al., 1990). argU10(Ts) 変異が, tRNA<sup>Arg</sup> の 5' 末端のグアノシン残基がアデノシンに置換したものであることが明らかになっていた (Chen et al., 1990). この変異が tRNA<sup>Arg</sup> のタンパク質合成にかかわる機能に実際に影響しているかどうか, 影響しているならばどのような機能であるか等は分かっていなかった. 本研究では, tRNA<sup>Arg</sup> 遺伝子における変異が, 大腸菌において温度感受性を引き起こすメカニズムを明らかにすることを試みた.

### 2-2. 材料と方法

#### 2-2-1. 菌株, ファージ, ベクター

argU10 変異株である GM10 株 (Henson et al., 1979) は, テキサス大学の J. Walker 教授から頂いた. YT319, YT341 株 (Murakami et al., 1987) は京都大学ウイルス研究所の村上洋太先生より頂いた. KN250 株 (Horiuchi and Nagata, 1973), KN1044, KN1453 株 (Nagata et al., 1988) は京都大学ウイルス研究所の永田俊夫先生によって作製され発表されている. 形質導入は P1vir ファージを用いて行った (Ikeda and Tomizawa, 1965). ベクター pBR322, pUC119 は 宝酒造 (Kyoto) から購入した. 大腸菌 W3110 株, プラスミド pACYC184 (Chang and Cohen, 1978), および大腸菌染色体の全域をカバーするラムダ・ファージ・ライブラリー (小原ライブラリー, Kohara

et al., 1987) は電気通信大学の溝淵潔教授より分与して頂いた。

### 2-2-2. 遺伝子操作

プラスミドDNA, エファージDNAの精製, 制限酵素による切断, DNAのライゲーション, ゲル電気泳動の基本的な遺伝子操作の実験は 'Molecular cloning, 2nd edition' (Sambrook et al., 1989) に従った。DNA塩基配列の決定は, AmpliTaqシーケンス・キット (Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto) を用いて行った。また, 大腸菌のプラスミドによる形質転換は, エレクトロポレーション装置Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) によって行った。

### 2-2-3. tRNA<sup>Arg</sup>遺伝子を含むプラスミドの構築

tRNA<sup>Arg</sup>遺伝子 (argU遺伝子) を含む4.5キロベース (kb) の大腸菌染色体DNAをpBR322につないだプラスミドpDM1 (Mullin et al., 1984) はテキサス大学のJ. Walker教授から頂いた。argU10(Ts)遺伝子を含む4.5kbの大腸菌染色体DNA (Chen et al., 1990) をpBR322のHind III部位につないだプラスミドpKC1もJ. Walker教授から頂いた。プラスミドColIb-P9のEcoRI-XbaI部位にアンピシリン耐性遺伝子を挿入したベクターpAp102 (A. Kato & K. Mizobuchi, unpublished results) は電通大学溝淵潔教授より頂いた。ベクターpCL1は, lacZ遺伝子を含むpUC119のNaeI-VspI断片をpAp102のEcoRI部位に挿入して作製した。プラスミドpCL2は, argU遺伝子を含むpDM1の0.6kbのClaI-SphI断片をpCL1のAccI-SphI部位に挿入して作製した。同様にして, argU10(Ts)遺伝子を含むpKC1のClaI-SphI断片をpCL1に挿入してpCL3を作製した (表2-1)。

### 2-2-4. アルギニルtRNA合成酵素遺伝子を含むプラスミドの作製

アルギニルtRNA合成酵素遺伝子 (argS遺伝子) は, すでに大腸菌染色体上にマップされ (Cooper et al., 1969), さらにクローニングも報告されていた (Eriani et al., 1989)。これらの情報から, argS遺伝子が小原ライブラリー (Kohara et al., 1987) の12C7 エファージ・クローンのAvaI-Hind III断片 (2.8kb) 上に存在することを見出した。このAvaI-Hind III断片は, ベクターpUC119のSalI-Hind III部位に挿入し, プラスミドpUA1を作製した。pUA1はさらにBamH-Hind IIIで切断し, argS遺伝子を含む断片をプラスミドpACYC184のBamH-Hind III部位に挿入しpYA1を作製した (表2-1)。

#### 2-2-5. tRNA<sup>Arg</sup>, 延長因子Tu, アルギニルtRNA合成酵素の調製

argU10(Ts)変異を持つtRNA<sup>Arg</sup> [tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)]を得るために、プラスミドpKC1で形質転換したGM10株を30°Cで培養し、対数増殖後期で集菌した。Zubayの方法(Zubay, 1962)に従ってtRNAを抽出し、このtRNA画分をヒドロキシアパタイト・カラム(HA-1000, Tosoh, Tokyo)を用いたHPLC(Sakamoto et al., 1993)によって分画した。さらに、tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)を含むフラクションをポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離を行って、精製されたtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)を5μg得ることができた。さらに、野生型tRNA<sup>Arg</sup> [tRNA<sup>Arg</sup>(WT)]についても同様にして、pDM1で形質転換したW3110株を37°Cで培養して得られたtRNA分画より精製した(10μgを得た)。延長因子Tu(EF-Tu)を得るために、W3110株を37°Cで培養し対数増殖後期で集菌した。ホモジナイザーにより破碎した菌体から得られた上清をDEAE-Sephadex A50(pH 7.5)カラムクロマトグラフィー(Arai et al., 1972)により分画しておもにEF-Tuを含むフラクションを得た。さらに硫酸沈殿によって濃縮して、10μM GTPを含むTMM緩衝液[50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 5mM β-mercaptoethanol]に溶かして-20°Cで保管した。アルギニルtRNA合成酵素(ArgRS)は、pUA1によって形質転換したW3110株から、河野俊之博士(現 三菱化成生命研究所研究員)により精製された(Nureki et al., 1993)。

#### 2-2-6. アルギニン受容活性, およびEF-Tu・GTPとの結合能の測定

アルギニン受容活性の測定は、4nM ArgRS, 1μM tRNA<sup>Arg</sup>(WT)またはtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)を含む緩衝液A(100mM Tris-HCl, pH 7.5, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP, 60μM [<sup>14</sup>C]-arginine [332.1 pCi/pmol, Dupon / New England Nuclear]) 18μl中で、30°C, 43°Cで行った。反応開始はATPの添加によるものとし、20秒, 40秒, 60秒, 90秒後にそれぞれ4μlを採取し、直ちに10μlの5%トリクロロ酢酸水溶液(0°C)に加えて反応を止めた後、Whatman 3MM フィルター・ディスクにスポットする。ディスクは5%トリクロロ酢酸水溶液(0°C)で3回洗った後に乾燥させ、液体シンチレーション・カウンターLS-700(Aloka, Tokyo)(Alo-ka)によって放射活性を測定した。

EF-Tu・GTPへの結合能測定のために、それぞれ0.23μgのtRNA<sup>Arg</sup>(WT), tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)を1μM ArgRSを含む緩衝液A中で、37°C, 10分間それぞれアルギニル化した。フェノール・クロロホルムによって抽出した後、エタノールで沈殿させて回収し、EF-Tu(4 pmol, 30°C, または 10 pmol, 43°C)を含む、または含まない緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM magnesium aceta

te, 150mM NH<sub>4</sub>Cl, 50mM β-mercapto- ethanol, 0.8mM phosphoenolpyruvate [Sigma], 2units pyruvate kinase [Sigma]) に加えた。反応液は全量 60 μl とし、30°C, 43°C でデアシレーション速度を測定した。30°C では反応開始後 0 分、10 分、20 分、30 分、40 分後に 11.5 μl ずつを採取し、Whatman 3MM フィルター・ディスクにスポットする。43°C では、0 分、4 分、8 分、20 分後に採取した。ディスクは 5% トリクロロ酢酸水溶液 (0°C) で 3 回洗った後に乾燥させ、液体シンチレーション・カウンター LSC-700 (Aloka, Tokyo) によって放射活性を測定した。

#### 2-2-7. tRNA<sup>Asp</sup> の発現量の解析

G M10 株, S F151 株は、0.1% グルコース、50 μg/ml チミンを含む LB 培地で、30°C で一晩培養した。フェノール・クロロホルムにより tRNA を抽出した。得られた tRNA 分画は、分光光度計で濃度を測定し、濃度を揃えた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりトータルの tRNA 量が等しくなっていることを確認した。それぞれ 5 μg を、7 M 尿素を含む 10% ポリアクリルアミド・ゲルで分離した後、エレクトロブロット装置 NA-1512 (Nihon Eido Co., Ltd., Tokyo) を用いてナイロン・メンブレン Hybond-N (Amersham) に転写した。[γ-<sup>32</sup>P] ATP で標識した、tRNA<sup>Asp</sup> の 39 位から 57 位までに相補的なデオキシリボヌクレオチド・オリゴマーを用いてノーザン・ハイブリダイゼーションを行って tRNA<sup>Asp</sup> を検出した。ハイブリダイゼーションを行ったメンブレンは、Fujix Bio-Imaging Analyzer BAS-2000 (Fuji Photo Film, Co., Ltd., Tokyo) によって解析した。

#### 2-2-8. *in vivo* におけるアルギニル tRNA<sup>Arg</sup> レベルの解析

0.1% グルコース、50 μg/ml チミンを含む LB 培地 200ml に、Y T319, S F151 の一晩培養液 4 ml をそれぞれ加え 30°C で培養した。対数増殖期 (OD<sub>600</sub> = 0.2) で 100ml ずつに分割し、30°C, 56°C の培地をそれぞれ加えた後、それぞれ 30°C, 43°C で培養を続けた。分割直後、および 60 分後に 10ml ずつの培養液を採取した。酸性条件下での tRNA の抽出は文献に従って行った (Varshney et al., 1991)。抽出した tRNA 分画は、一部を採って分光光度計で濃度を測定して濃度を揃えた後、ポリアクリルアミド電気泳動を行い、確かにトータルの tRNA 量が等しくなっていることを確認した。残りは -70°C で保存した。Y T319 の tRNA 分画 (2.5 μg), S F151 の tRNA 分画 (5.0 μg) を 8 M 尿素を含む 7.7% 酸性ポリアクリルアミド・ゲル (20×40cm, 0.5mm 厚) で分離した。電気泳動は氷室で 18-20 時間かけて行い、色素の BPB がゲルの下端付



近まで達したところで終了させた。キシレンシアノール・マーカの下2cmから10cmまでを切り取ってナイロン・メンブレンに転写した。ノーザン・ハイブリダイゼーションによってtRNA<sup>Arg</sup>を検出した。ハイブリダイゼーションを行ったメンブレンは、Fujix Bio-Imaging Analyzer BAS-2000 (Fujifilm Photo Film, Co., Ltd., Tokyo) によって解析した。マーカとしてアルギニル化されたtRNA<sup>Arg</sup>と、アミノ酸を結合していないtRNA<sup>Arg</sup>を以下のようにして用意した。pDM1, またはpKC1によって形質転換したW3110株から抽出したtRNA分画から一部を採って、10mM Tris-HClバッファー (pH 8.0) 中で37°C, 30分間保温してアミノ酸を外した。さらに一部を採って、1μM ArgRS, 2mM アルギニン, 15mM MgCl<sub>2</sub>を含む100mM Tris-HClバッファー (pH7.5) 中でアルギニル化の反応を行った。

## 2-2-9. 部位特異的塩基置換の導入

オリゴデオキシヌクレオチドは、Cyclone Plus DNA/RNA synthesizer (MilliGen/Biosearch) を使用して合成した。合成したオリゴマーA (5'-CAC-ACAGGAAACAGCTATGAC-3'), オリゴマーB (5'-CGACGTTGTAACGACGGCCAG-3') は、ベクターpUC119のlacZ遺伝子内のマルチプル・クローニング領域を増幅するためのPCR (polymerase chain reaction) プライマーとしてデザインされている。argU遺伝子の部位特異的塩基置換は、以下に述べる2段階のPCRによって行われた (図2-1)。PCR反応は、AmpliQ DNA polymerase (Perkin-Elmer Co., Ltd.) を用いてDNA Thermal Cycler PJ2000 (Perkin-Elmer Co., Ltd.) により行った。第1段のPCRは、プラスミドpCL2を反応の鋳型として、塩基置換導入用のプライマーとプライマーAを用いて行う。増幅されたDNA断片は、0.8%アガロースによりプライマーと分離し、GeneClean II キット (Bio 101 Inc.) を用いて抽出した。第2段のPCRは、再びpCL2を鋳型に、第1段で増幅したDNA断片とプライマーBをPCRプライマーとして行った。最終的に増幅したDNA断片は、EcoRIとHind IIIで処理し、pBR322, またはpCL1のEcoRI-Hind III部位に挿入した。argU遺伝子への塩基置換の導入は、argU遺伝子をプライマーA, Bを用いたPCRによって増幅し、DNA塩基配列を決定して確認した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)のアルギニン受容活性, EF-Tu-GTPへの結合能

アルギニン受容反応における野生型tRNA<sup>Arg</sup>のK<sub>m</sub>値は、0.5-2.5μMであ

ることが報告されている (Lin et al., 1988; Schulman et al., 1988; Tamura et al., 1992). 野生型  $tRNA^{Ala}$  [  $tRNA^{Ala}(WT)$  ] と  $argU10(Ts)$  変異を持つ  $tRNA^{Ala}$  [  $tRNA^{Ala}(Ts)$  ] のアルギニン受容活性を比較するために  $K_m$  値に近い  $tRNA$  温度で反応を行った.  $1 \mu M$  の濃度で比較したとき,  $30^\circ C, 43^\circ C$  の両方で  $tRNA^{Ala}(Ts)$  の反応の初速度は,  $tRNA^{Ala}(WT)$  の 65% であった (図 2-2).  $tRNA$  のアイデンティティー決定因子の置換は, 10倍から  $10^7$  倍の活性の低下を引き起こす (Schulman, 1991; Giegé et al., 1993). これを考慮すると,  $tRNA^{Ala}(Ts)$  のアルギニン受容能の低下は小さいと言える. 一方, アミノアシル  $tRNA \cdot EF-Tu \cdot GTP$  の三重複合体の形成は, アミノアシル  $tRNA$  の加水分解が,  $EF-Tu \cdot GTP$  によって抑えられることを利用して解析されてきた (Pingoud et al., 1977; Wagner and Sprinzl, 1980; Louie et al., 1984).  $EF-Tu \cdot GTP$  が存在しないとき, アルギニル  $tRNA^{Ala}(WT)$  とアルギニル  $tRNA^{Ala}(Ts)$  のデアシレーションの速度は等しい (図 2-3). ただしデアシレーション速度は  $43^\circ C$  では  $30^\circ C$  のほぼ 2 倍である.  $EF-Tu \cdot GTP$  によってアルギニル  $tRNA^{Ala}(WT)$  の加水分解は効果的に抑えられるが, そのためには  $43^\circ C$  で,  $30^\circ C$  の 2.5 倍濃度の  $EF-Tu \cdot GTP$  が必要であった. また,  $EF-Tu \cdot GTP$  はアルギニル  $tRNA^{Ala}(Ts)$  についても加水分解の速度を低下させることができるが,  $tRNA^{Ala}(WT)$  の場合に比べると十分に効果的ではない (図 2-3). また, アルギニル  $tRNA^{Ala}(WT)$  の加水分解を十分に抑えられる程度に  $EF-Tu \cdot GTP$  が存在していても,  $tRNA^{Ala}(Ts)$  は  $43^\circ C$  で,  $30^\circ C$  よりも速くデアシレートされる.

### 2-3-2. $42^\circ C$ での増殖阻害が 'leaky' ではない $argU10(Ts)$ 変異株の作製

G M10株の温度感受性は  $42^\circ C$  で 'leaky' であることが報告されている (Henson et al., 1979).  $42^\circ C$  では全く増殖しない  $argU10(Ts)$  変異株を得るために  $argU10(Ts)$  変異を数種類の株に導入して温度感受性を調べた. この実験は, 京都大学ウイルス研究所永田俊夫博士の研究室, および東京大学理学部生物化学科西郷薫博士の研究室で, 共同研究者である石丸聡氏によって行われた. K N 1599 ( $purE::Tn10$ ) はトランスポゾン  $Tn10$  を G M10株に導入して作製した.  $argU10(Ts)$  変異は,  $purE$  欠損をマーカーとして, P 1  $\nu ir$  ファージによる形質転換によって K N 1599 から, K N 250, K N 1044, K N 1453, Y T 341, Y T 319 にそれぞれ導入され, S F 1, S F 5, S F 7, S F 9, S F 131 がそれぞれ得られた. さらに,  $purE^+$  を K N 250 から S F 131 へ形質導入することで S F 151 を得た. S F 1, S F 9 は  $42^\circ C$ , L B 寒天培地で一晚培養後, 少しは増殖が見られたが, S F 5, S F 7, S F 131, S F 151 は全く増殖しなかった. 表 2-2

より、SF151等の‘strict’な温度感受性には $rnh$ 遺伝子(リボヌクレアーゼHをコードしている[Horiuchi et al., 1981])の変異が関係しているように見える。GM10株とSF151株における $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ の存在量を、ノーザン・ハイブリダイゼーションによって比較したところ、SF151では存在量はGM10株の3分の1であった(図2-4, バンドa)。ここでマイナーなバンド(バンドb)が検出されているが、バンドbは、(1)メジャーな $tRNA_{4}^{Phe}$ とは異なる転写後修飾を受けた $tRNA_{4}^{Phe}$ であるか、(2)既に提案されているような2次構造が組変わった $tRNA_{4}^{Phe}$ (Garcia et al., 1986)であるか、(3)ヌクレアーゼによって除去されやすい3'末端の単鎖部分が失われた $tRNA_{4}^{Phe}$ であるなどの可能性が考えられる。ただし、マイナーバンドのメジャーバンドに対する割合はGM10株とSF151株で差がなく、温度感受性の違いとは関係がないようだ。GM10株とSF151株との温度感受性の差が $rnh$ 遺伝子や $tRNA_{4}^{Phe}$ の細胞内存在量の違いとどのように関係しているかについては、さらに解析が必要であるが、ここでは温度感受性が‘strict’であり解析が容易であるという理由から、SF151をこれからの実験に使用する。

### 2-3-3. $tRNA_{4}^{Phe}$ のin vivoのアルギニル化レベルの解析

in vitroの実験で見出されたような、 $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ のEF-Tuへの結合能の低下やアルギニン受容活性の低下が、アルギニル化された $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ の細胞内存在量にどのような影響を与えているかを調べるために、 $tRNA_{4}^{Phe}(WT)$ 、 $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ のそれぞれのin vivoでのアルギニル化レベルをノーザン・ハイブリダイゼーションによって解析した(図2-6)。 $tRNA_{4}^{Phe}(WT)$ は30°Cと43°Cにおいて、100%がアルギニル化されている(図2-5A)。これに対して $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ は、30°Cで36%がデアシレートしており、SF151株の $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ の全量は、YT319での $tRNA_{4}^{Phe}(WT)$ の量の10分の1でしかない(図2-5B)。すなわち、30°Cにおいてアルギニル $tRNA_{4}^{Phe}$ のレベルは、SF151ではYT319の16分の1にまで低下している。さらに43°Cにシフト後60分間で、 $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ はほとんど検出されないレベルまで落ちている。SF151株(図2-6)やGM10株(Chen et al., 1990)は、43°Cにシフト後60-90分間で増殖を停止する。 $tRNA_{4}^{Phe}(Ts)$ のレベルが43°Cで異常に低下していることが、 $argU10(Ts)$ 変異株の高温での増殖停止の原因であるように見える。

### 2-3-4. $argU10(Ts)$ 変異株の相補性試験による解析

$argU10(Ts)$ 変異株は野生型 $tRNA_{4}^{Phe}$ 遺伝子( $argU$ 遺伝子)によって相補

される (Mullin et al., 1984) . そこで, *argU10*(Ts)変異株のどのような機能が相補されているのかを調べるために, *argU*遺伝子の特定の機能に影響を与えるような塩基置換を導入して相補実験を行った. *tRNA*<sup>Arg</sup>はアンチコドン *mn<sup>o</sup>U-C-U*を持ち, *in vivo* でおもにコドン *AGA* を認識している (Spanjaard et al., 1990) . また, 大腸菌では *tRNA*<sup>Arg</sup>がコドン *AGA* に対応する唯一の *tRNA* 分子種である (Komine et al., 1990) . そこで, アンチコドン 1 字目を *C* に変えると, 他の *tRNA*<sup>Arg</sup> 分子種 (*tRNA*<sup>Arg</sup> [Kiesewetter et al., 1987; Komine et al., 1990] ) と同じアンチコドンを持つことになり, *AGG* コドン を認識するようになるだろう. このような *tRNA*<sup>Arg</sup> (CCU) は, *GM10* 株を相補しないことが報告されていたが (Spanjaard et al., 1990) , 本研究でも *SF151* を相補しないことが示された (図2-7) . 一方, アルギニン受容活性を低下させる目的で, アイデンティティー決定因子である *A20* (McClain and Foss, 1988b; Schulman and Pelka, 1989; McClain et al., 1990; Tamura et al., 1992) を置換したところ, *A20*置換型 *tRNA*<sup>Arg</sup> は *SF151* 株を相補しなかった (図2-8A) . しかし, *ArgRS* の遺伝子 *argS* をマルチコピー・ベクターにより *SF151* に導入した場合には *A20*置換型 *tRNA*<sup>Arg</sup> でも相補活性を示す (図2-8B) . これは, アルギニル *tRNA* 合成酵素の大量発現が, *A20*置換型 *tRNA*<sup>Arg</sup> の低いアルギニン受容活性を補った結果と考えられ, *A20* の置換が実際にアルギニン受容活性にのみ影響を与えていたことが確かめられた. 以上のように, *tRNA*<sup>Arg</sup> のコドン認識やアルギニン受容活性を変えると, *argU10*(Ts)変異株を相補しなくなることから, *argU10*(Ts)変異株は, コドン *AGA* の翻訳に欠陥があると推定される.

*argU10*(Ts)遺伝子を, マルチコピー・ベクター (*pACYC184*) に挿入し, *GM10* 株に導入すると相補活性を示すことが報告されている (Spanjaard et al., 1990) . 同様に, *pBR322* に挿入された *argU10*(Ts)遺伝子は *SF151* 株を相補する (data not shown) . しかし, *pCL1* に挿入された *argU10*(Ts)遺伝子は相補活性を示さなかった (図2-8A) . これまでに, *tRNA*<sup>Arg</sup>(Ts)が他のアミノ酸をミスチャージする可能性や, フレームシフトを誘起する可能性が指摘されており, これらの性質がタンパク質合成を障害するのではないかも考えられた (Chen et al., 1990) . しかし, *tRNA*<sup>Arg</sup>(Ts)を大量発現させると相補活性を示すので, *tRNA*<sup>Arg</sup>(Ts)が細胞機能を積極的に障害しているのではないことが明らかである.

また, *argU10*(Ts)遺伝子は, *ArgRS* を大量発現させても相補活性を示さない (図2-8B) . もし, *argU10*(Ts)変異が *tRNA*<sup>Arg</sup>(Ts)のアルギニン受容活性のみに影響を与えていたとすると, *A20*を置換した *tRNA*<sup>Arg</sup>と同様, *ArgRS*

の大量発現で相補活性を回復しただろう。よって、この相補実験の結果は、 $tRNA^{Arg}(Ts)$ のアルギニン受容能の低下が小さいことを示した *in vitro* の解析結果と矛盾しない。また、この程度 of アルギニン受容能の低下は、 $argU10(Ts)$  変異株の温度感受性の主な原因ではないことを示している。

## 2-4. 考察

### 2-4-1. $argU10(Ts)$ 変異の $tRNA$ 機能への影響

いくつかの  $tRNA$  分子種について、アクセプター・ステム末端の残基（1位と72位の残基）がアイデンティティー決定因子であることが報告されていた（Normanly et al., 1986; Seong et al., 1989; McClain et al., 1991; Pak et al., 1992; Xue et al., 1993）。大腸菌 ArgRS に特異的に認識される5種類の  $tRNA^{Arg}$  には、1位のグアノシン残基（G1）が共通して存在することから（Sprinzl et al., 1991）、G1がアイデンティティー決定因子の1つではないかと考えられたが、*in vitro* アッセイの結果から、G1は  $tRNA^{Arg}$  のアルギニン受容活性への寄与は小さいことが示された。一方、G1からA1への変異（ $argU10$  変異）は、EF-Tu・GTPとの結合能を低下させることが明らかになった。G1→A1の変異によって  $tRNA^{Arg}(Ts)$  のアクセプター・ステム末端に A1・C72 のミスマッチが生じて塩基対が形成されなくなるが、本研究の結果は、アクセプター・ステム末端の塩基対形成が EF-Tu・GTP との結合に寄与するという報告（Schulman et al., 1974; Fischer et al., 1985; Seong and RajBhandary, 1987）と合致している。*in vivo* では、 $tRNA^{Arg}(Ts)$  の細胞内存在量が低下していることが示されたが、アルギニン受容活性や EF-Tu・GTP との結合能の低下は、30°C においてデアシレートした  $tRNA^{Arg}(Ts)$  を蓄積させ、タンパク質合成に動員できる  $tRNA^{Arg}(Ts)$  量を一層減少させていると考えられる。

30°C と 43°C において、 $tRNA^{Arg}(Ts)$  の細胞内存在量を低下させている原因は何だろうか？  $argU$  遺伝子の1-20番目の残基までは、 $argU$  遺伝子の発現制御に関与しているとされているので（Saxena and Walker, 1992）、G1→A1の変異が、 $tRNA^{Arg}$  の細胞内存在量に影響する可能性はあるかもしれない。 $argU$  遺伝子転写物の22番目から43番目まで残基（ $tRNA^{Arg}$  の1位の残基を含む）が形成する2次構造は、 $argU$  遺伝子の発現に抑制的に働くときれている（Saxena and Walker, 1992）。G1→A1の変異はこの構造を不安定にし、転写量を減少させるというよりは増加させると考えられるので  $tRNA^{Arg}(Ts)$

の細胞内レベルの低下の説明にはならない。

これまで、サブレッサー活性を失った変異型サブレッサー-tRNA<sup>Arg</sup>が見出されており、それらは、アクセプター・ステム、Dステム、または、アンチコドン・ステムに塩基置換を持つことが報告されている (Abelson et al., 1970; Smith et al., 1970; Anderson and Smith, 1972)。これらの変異型サブレッサー-tRNA<sup>Arg</sup>は細胞内存在量が著しく少なく、これがサブレッサーの活性に影響していると考えられている。細胞内存在量の少ない理由としてはプロセッシングが正常に行われていない可能性と、tRNAとして成熟しても速やかに分解されている可能性が指摘された。温度感受性変異型のサブレッサー-tRNA<sup>Arg</sup>の細胞内存在量を、培養温度を上昇させる前後で調べた研究によると、この変異型サブレッサー-tRNA<sup>Arg</sup>は、32°Cで既に細胞内レベルが野生型に比べて顕著に少ない。そして、42°Cに温度を上昇させた後60分間でほぼ消失することが示された (Nomura, 1974)。このことから、異常な構造のtRNAを分解する 'scavenger' 分子が細胞内に存在するのではないかと提案された。その後の研究から、大腸菌には15種類以上のリボヌクレアーゼが存在することが示され (Deutscher, 1985)、いくつかのリボヌクレアーゼは損傷したRNA分子や、用済みのRNA分子を分解して、RNA合成のためのリボヌクレオチドを供給していると考えられている (Deutscher, 1993)。

ここで、argU10(Ts)変異株におけるtRNA<sup>Arg</sup>レベルの低下の説明として、アクセプター・ステム末端にミスマッチ塩基対を持つtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)は細胞内で不安定であり、速やかにリボヌクレアーゼによって分解されると考えることもできるだろう。リボヌクレアーゼDは、CCA末端の欠けたtRNA分子を分解することが報告されている (Ghosh and Deutscher, 1978; Zhang and Deutscher, 1988)。EF-Tu・GTPはtRNAのアクセプター・ステムとTステムに結合し、これらの領域とCCA末端をリボヌクレアーゼによる分解から防ぐので (Bourtin et al., 1981; Wikman et al., 1982)、EF-Tu・GTPに対する結合能が低下したtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)が、リボヌクレアーゼによる消化を受けやすいということは十分あり得るだろう。tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)は43°Cで、30°Cよりもデアシレーション速度が速いので、より多くデアシレートしたtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)を蓄積すると考えられる。このことが、高温でのtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)の存在量を一層低下させる理由であるかも知れない。

プロセッシングの異常がtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)レベルの低下の原因である可能性も残っており、何がin vivoでtRNAの消失を実際に引き起こしているかについてはさらに研究が必要である。

#### 2-4-2. *argU10*(Ts)変異の多面的な影響

AGA/AGGコドンに対応するT4ファージtRNA<sup>Arg</sup>遺伝子が*argU10*(Ts)変異を相補することが報告され、*argU10*(Ts)変異株の温度感受性がtRNA<sup>Arg</sup>に特異的な未知の機能の障害によるものではなく、AGAコドンの翻訳のレベルにあると提案されていた (Spanjaard et al., 1990)。本研究の相補実験の結果は、このことを裏づけている。実際に、*argU10*(Ts)変異株に導入したAGAコドンを含むレポーター遺伝子の翻訳は、30°Cと43°Cのいずれでも阻害されるが、阻害は高温で著しいことが報告されている (Chen et al., 1990)。このようなAGAコドンの翻訳障害は、アルギニルtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)量が30°Cで既に著しく少なく、43°Cではさらに僅少であるという本研究の結果から説明できるだろう。テアシレートしたtRNA<sup>Arg</sup>(Ts)が30°Cにおいて蓄積していることには、EF-Tu・GTP結合能やアルギニン受容能の低下が寄与していると考えられるが、tRNA<sup>Arg</sup>(Ts)の存在量の低下の原因は、既に議論したような複数の要因が関与している可能性が考えられる。

*argU10*(Ts)変異の効果は「多面的 (pleiotropic)」であることが知られている。*argU10*(Ts)変異株は30°Cで 'Pin phenotype' を示す (Chen et al., 1990)。「Pin phenotype」とは、P2バクテリオファージを溶原化した大腸菌が、*argU10*の感染に対する抵抗性を失うことであり、*oid*遺伝子の欠陥によるものとされる (Ghisotti et al., 1983)。また、*argU10*(Ts)変異株は高温で、DNA複製がタンパク質合成やRNA合成に先立って停止する (Henson et al., 1979)。さらに、*argU10*(Ts)変異株に感染した*argU10*の増殖は高温で顕著に抑えられることが報告されている (Henson et al., 1979)。P2ファージの*oid*遺伝子は、5個のコドンAGAを含んでおり (Haggard et al., 1989)、*argU10*の複数の遺伝子は数個以上のAGAコドンを含む (Sanger et al., 1982)。大腸菌の遺伝子については、認識するtRNA<sup>Arg</sup>の細胞内存在量が少ないことに対応して、AGAコドンの使用頻度は著しく低い。そして、発現量の大きい遺伝子はAGAコドンの使用を避ける強い傾向があるが、DNA複製遺伝子等を含む発現レベルの低い遺伝子では特に避けられていない (Ikemura, 1981; Grosjean and Fiers, 1982; Guoy and Gautier, 1982; Sharp and Li, 1986; Aota et al., 1988; Zhang et al., 1991)。このように、*argU10*(Ts)変異の「他面的な」効果は、AGAコドンの翻訳障害によって説明できるようだ (Spanjaard et al., 1990; Chen et al., 1990)。ただし、DNA複製遺伝子等のAGAコドンを含む大腸菌の遺伝子は、1~2個のAGAコドンを含むものが多く、数個のAGAコドンを含むものはほとんどない。具体的にどのような遺伝子の翻訳が阻害されて高温致死になるのかにつ

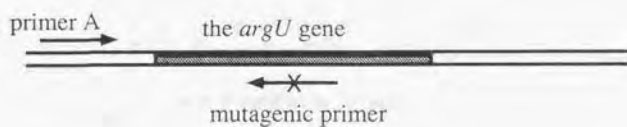
いては、さらに解析が必要である。特に、遺伝子の含むAGAコドンの総数が翻訳阻害に関係するのか、または、AGAコドンを2個連続して含むときに阻害されやすいのだろうかということも問題である。AGAコドンが連続するとその個所で+1のフレームシフトが起きやすいことが報告されている (Spanjaard et al., 1990)。

argU10(Ts)変異とDNA複製との関わりについては、本研究で作成したargU10-rnh<sup>-</sup>株が興味深い課題を提起している。SF151株はdnaA<sup>-</sup>株であり、通常のDnaAタンパク質に依存したDNA複製を行っていない。ところが石丸らによって、SF151株に30°CでoriC欠損が導入できないことが示され、rnh<sup>-</sup>株に特徴的なoriK (Kogoma et al., 1985) からのDNA複製開始がargU10(Ts)変異によって阻害された考えられる (石丸聡, 村上洋太, 永田俊夫, 第10回日本分子生物学会年会講演, 1987)。すなわち、SF151株は30°Cで、dnaA非依存、oriC依存のDNA複製を行なっていること、argU遺伝子がoriKからの複製開始に関与していることを示唆する。SF151においてoriKからのDNA合成が阻害されていることは、さらに検討されなければならないが、oriKからの複製開始に必要な因子の同定につながるかもしれない。また、これまでの実験結果はその因子がargU遺伝子産物自体であることを否定していない。

argU10(Ts)変異以外にも、tRNA遺伝子における変異が、細胞の特定の機能を阻害する現象がいくつか報告されている。大腸菌divE温度感受性(Ts)変異株では、細胞分裂前の特定の時期に発現する数種類のタンパク質の合成が阻害されるが (Ohki and Mitsui, 1974; Sato et al., 1979), divE遺伝子は、コドンUCU, UCA, UCGを認識するセリンtRNA (tRNA<sup>ser</sup>) をコードしている (Tamura et al., 1984) また、大腸菌の細胞周期を制御するタンパク質の発現と、コドンCUA, CUGに対応するtRNA<sup>leu</sup>との関連を示唆する報告もある (Chen et al., 1991)。Streptomyces coelicolor (放線菌の1種) では、コドンUUAを認識するtRNA<sup>leu</sup>をコードしているbldA遺伝子における変異は、胞子形成や抗生物質の生産を阻害する (Lawlor et al., 1987; Leskiw et al., 1991)。これらの現象は、特定のコドンの翻訳の阻害によって説明されるとの主張もあるが (Chen et al., 1990)、これらの変異がtRNAの機能にどれだけ、またどのように影響しているかは、まだ十分に調べられていない。本研究における成果は、特定のtRNA遺伝子における変異が細胞の機能に影響を与えるメカニズムを理解する上で役立つだろう。



## 1st PCR



## 2nd PCR

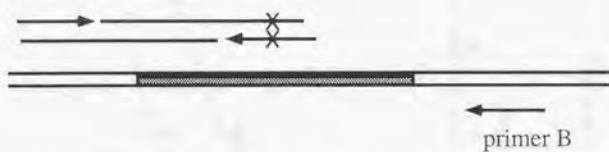


図2-1. PCRによる部位特異的塩基置換導入のスキーム.

第1段のPCR(上)において, mutagenic primerによって塩基置換の導入を行なう. これを得られたDNA断片は, 第2段のPCR(下)のプライマーとして用いて, ベクターにクローニングされた*argU*領域(影の部分)の全体を含むDNA断片を得る.

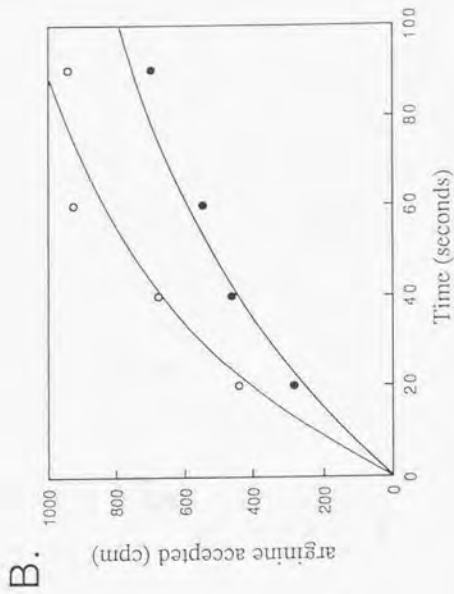
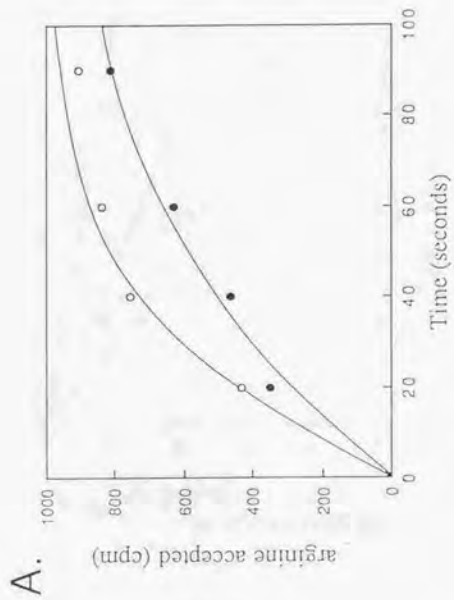


図 2-2. tRNA<sup>Arg</sup>(WT) (○) と tRNA<sup>Arg</sup>(Ts) (●) のアルギニン受容  
のタイム・コース (30°C, A; 43°C, B)

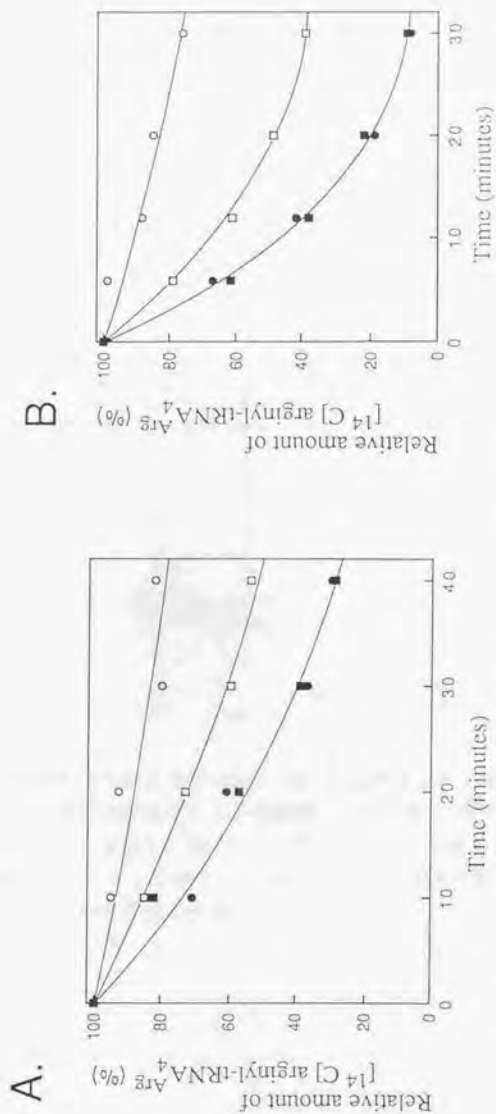


図2-3.  $[^{14}\text{C}]$  アルギニンを結合した tRNA<sub>4</sub>Arg のデアシレーションのタイム・コース. 時間 0 min において tRNA<sub>4</sub>Arg に結合している  $[^{14}\text{C}]$  アルギニンの放射活性を 100 として, 30°C (A), 43°C (B) で保温したときに, tRNA<sub>4</sub>Arg に結合している  $[^{14}\text{C}]$  アルギニンの放射活性の減少を示している. アッセイは, EF-Tu-GTP の存在下 (○, □) と非存在下 (●, ■) で, tRNA<sub>4</sub>Arg (WT) (○, ●) と tRNA<sub>4</sub>Arg (Ts) (□, ■) について行った.

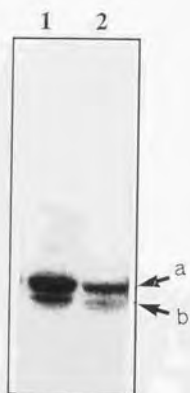


図2-4. GM10株(1)とSF151株(2)におけるtRNA<sup>Asp</sup>量の比較.  
 それぞれの株から得たtRNA分画は、7M尿素-10%ポリアクリルアミドゲルによって分離した後、ナイロンメンブレンに転写してtRNA<sup>Asp</sup>特異的プローブにより検出した。バンドaがtRNA<sup>Asp</sup>(Ts)である。バンドbについては本文参照。

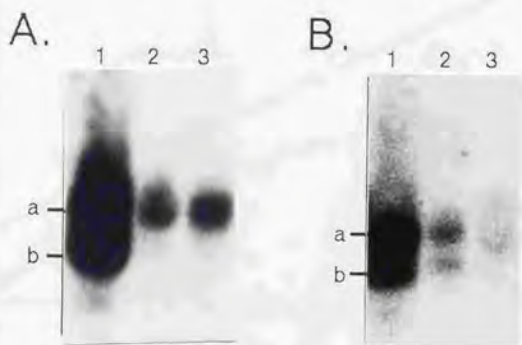


図2-5. tRNA<sup>Arg</sup>(WT) [A] と tRNA<sup>Arg</sup>(Ts) [B] の *in vivo* のアルギニル化のレベル.

(lane 1ではアルギニルtRNA<sup>Arg</sup>[a]とデアシレートされたtRNA<sup>Arg</sup>[b]のマーカ―を泳動した. Lane 2では, 30℃で培養した大腸菌から得たtRNA分画を泳動した. Lane 3では, 30℃から43℃へ培養温度を瞬時に上げて, 60分後に得たtRNA分画を泳動した. 泳動後はノーザン・ハイブリダイゼーションによってtRNA<sup>Arg</sup>を検出した.)

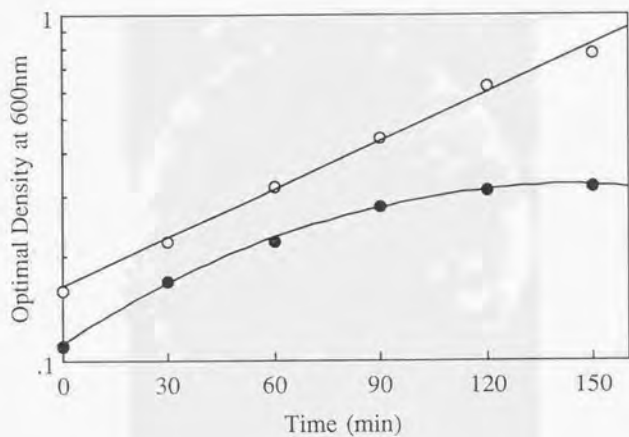


図2-6. YT319株 (○), SF151 (●) を30℃で培養した後, 培養温度を瞬時に (0minにおいて) 43℃へ上げた後の増殖曲線. 60-90minでSF151株の増殖は停止する.

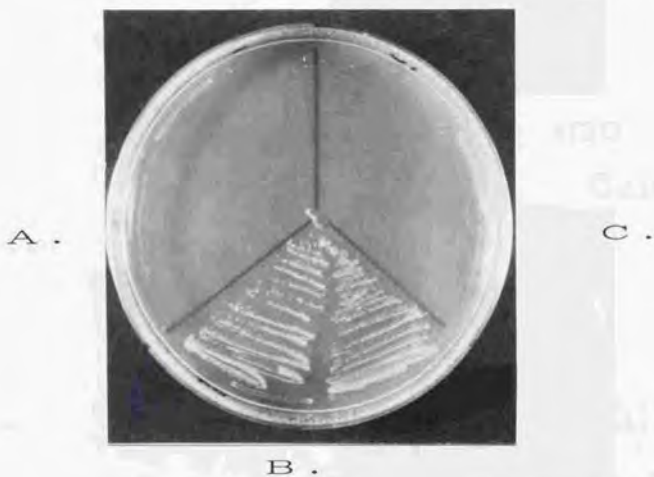


図2-7. アンチコドンCCUを持つtRNA<sup>Arg</sup>の相補活性.

アンチコドンCCUを持つtRNA<sup>Arg</sup>の遺伝子は、pBR322に挿入してSF151株に導入した後、アンピシリン(50 $\mu$ g/ml)、チミン(25 $\mu$ g/ml)を含むLBアガー上で42 $^{\circ}$ C、24時間培養を行なった(C)。同様にpBR322(A)、argU遺伝子をpBR322に挿入したpDM1(B)をSF151に導入し、培養して比較した。

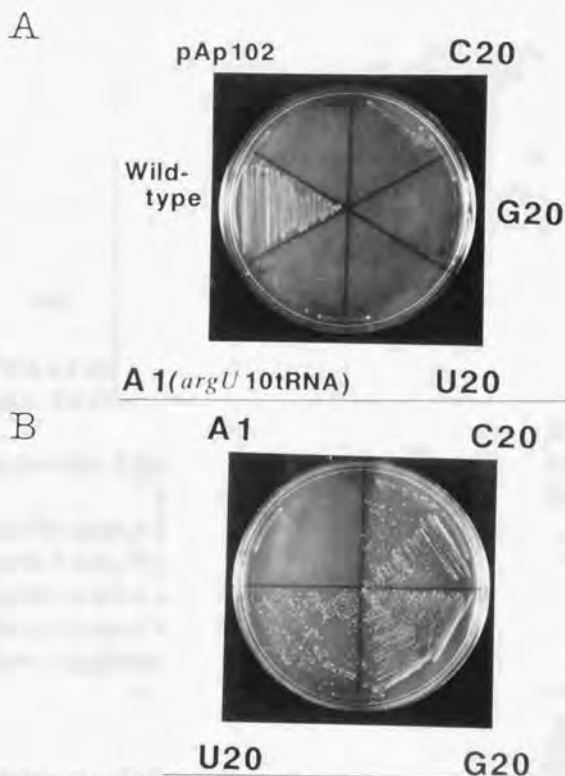


図2-8. A20を置換したtRNA<sup>A</sup>の相補活性.

A) A20をU, G, Cに置換したtRNA<sup>A</sup>遺伝子をpCL1に挿入してSF151に導入した後、アンピシリン(20 $\mu$ g/ml), チミン(25 $\mu$ g/ml)を含むLBアガー上で42 $^{\circ}$ C, 24時間培養を行なった. 同様に野生型*argU*遺伝子(WT), *argU*10(Ts)遺伝子(A1)をpCL1に挿入してSF151に導入し培養を行なった.

B) A20をU, G, Cに置換したtRNA<sup>A</sup>遺伝子をpCL1に挿入して, *argS*遺伝子を含むpYAプラスミドと共にSF151に導入した後, アンピシリン(20 $\mu$ g/ml), クロラムフェニコール(25 $\mu$ g/ml), チミン(25 $\mu$ g/ml)を含むLBアガー上で42 $^{\circ}$ C, 24時間培養を行なった.



表 2-1. 作製したプラスミドのリスト

プラスミド	構成	文献, 出所
p A p 102	Amp <sup>r</sup> 遺伝子を mini-ColIb-P9 に挿入	溝淵潔(電通大)
p D M 1	argU 遺伝子を pBR322 に挿入	J. Walker(Texas大) (Mullin et al., 1984)
p K C 1	argU10(Ts) 遺伝子を pBR322 に挿入	J. Walker(Texas大) (Chen et al., 1990)
p C L 1	pUC119 の lacZ 遺伝子を pAp102 に挿入	本研究
p C L 2	argU 遺伝子を pCL1 に挿入	本研究
p C L 3	argU10(Ts) 遺伝子を pCL1 に挿入	本研究
p U A 1	argS 遺伝子を pUC119 に挿入	本研究
p Y A 1	argS 遺伝子を pACYC184 に挿入	本研究

表 2-2. *argU10*(Ts)変異を持つ大腸菌の温度感受性

Strain	Genotype	Growth at 42°C on LB medium
SF1	KN250 <i>purE79::Tn10 argU10</i> (Ts)	leaky growth
SF5	KN250 <i>rnh-1::Tn3 purE79::Tn10 argU10</i> (Ts)	no growth
SF7	KN1453 [ <i>dnaA5</i> (Ts) <i>rnh-1::Tn3</i> <i>purE79::Tn10 argU10</i> (Ts)]	no growth
SF9	YT341 [ <i>dna17</i> (Am) <i>supF6</i> (Ts)] <i>purE79::Tn10 argU10</i> (Ts)	leaky growth
SF131	YT319 [ <i>dnaA17</i> (Am) <i>rnh-199</i> (Am)] <i>purE79::Tn10 argU10</i> (Ts)	no growth
SF151	YT319 [ <i>dnaA17</i> (Am) <i>rnh-199</i> (Am)] <i>argU10</i> (Ts)	no growth

3-1. 序

tRNAのアミノ酸特異性(tRNA identity)は、tRNAとコグネートなアミノアシルtRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS)との *in vivo*の特異的な相互作用により決定される。近年になり、ARSがtRNAの特定の部分構造(アイデンティティー決定因子)を認識することにより、コグネートなtRNAをノンコグネートなtRNAから識別していることが明らかにされた(Normanly et al., 1986; McClain and Foss, 1988a; Hou and Schimmel, 1988; Muramatsu et al., 1988)。その後、各種のtRNAについて'identity'決定のメカニズムが研究され、多くのtRNAについてアイデンティティー決定因子が同定されている(Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991; Giegé et al., 1993)。tRNA identityを解析するための戦略としては、第一にこれまでに明かにされているtRNAのヌクレオチド配列を比較することである(McClain and Nicholas Jr, 1987)。アミノ酸特異性の異なるtRNA種には存在しないが、同じアミノ酸特異性のtRNAでは共有されているヌクレオチド配列がアイデンティティー決定因子の候補になる。また、フットプリントによる解析によって、ARSと直接相互作用するtRNA分子内の領域を特定することも行われている(Romby et al., 1985; Theobald et al., 1988; Dietrich et al., 1990)。次に、部位特異的に塩基置換を導入したtRNAバリエーションのアミノ酸受容能を解析することでアイデンティティー決定因子を同定する。このときに、T7ファージRNAポリメラーゼによる転写物を用いて*in vitro*でアミノ酸受容活性を解析するか(Sampson and Uhlenbeck, 1988)、終止コドンのサブプレッションを利用した*in vivo*の解析(Shimura et al., 1972; Normanly et al., 1986; McClain and Foss, 1988a; Hou and Schimmel, 1988)がしばしば行われている。すでに、大腸菌のグルタミン(Rould et al., 1989)の系、酵母のアスパラギン酸の系(Ruff et al., 1991)でtRNAとARSの共結晶の解析が報告されており、アイデンティティー決定因子がtRNA・ARS相互作用にどのように寄与しているか、ARSとの複合体でtRNAにどのようなコンホメーション変化が起こるかについてリアルなイメージが得られている。

tRNA・ARS相互作用の分子構造的基盤を考えるとときに、tRNAのidentityは*in vivo*で決められる性質のものであることを考慮しなければならぬ。*in vivo*ではtRNAどうしの競合、ARSどうしの競合が行われる中

で、アミノアシルtRNAを生成する‘productive’で特異的な相互作用が起こる (Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991)。このとき、‘negative’なアイデンティティー決定因子は、ノンコグネートなARSによって認識されることを防ぐ働きをする (Perret et al., 1990; Schulman, 1991)。このようなtRNA identity決定のメカニズムの‘dynamics’はin vivoで解析されなければならない。in vivoの解析手段としては、サブプレッサーtRNAを用いる解析以外には、イニシエーターtRNAの利用や (Pak et al., 1992)、ノーザン・ハイブリダゼーションによるアミノアシルtRNAの検出 (Varshney et al., 1992) などの手法があるが、in vivoの解析法はそれぞれに制約があるので、異なる原理に基づいた多くの手法によって解析されることが望ましい。

本研究では、大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>の‘identity’決定のメカニズムの解析を行った。大腸菌アルギニルtRNA合成酵素 (ArgRS) によって認識される5種類のtRNA<sup>Arg</sup>は共通して20位にアデノシン残基 (A20) を持つが (表3-1, 図3-1)、A20は他の大腸菌tRNA分子種には存在しないので、tRNA<sup>Arg</sup>のアイデンティティー決定因子の有力候補であったが (McClain and Foss, 1988b)、実際にサブプレッサーtRNAを用いたin vivo解析 (McClain and Foss, 1988b)、T7転写物のin vitroの反応速度論的解析 (Schulman and Pelka, 1989; Tamura et al., 1992) により、A20がアルギニン受容活性に必須であることが明らかにされている。アンチコドン2字目のシチジン残基 (C35) もtRNA<sup>Arg</sup>に共通の構造であり (表3-1, 図3-1)、in vivo (McClain and Foss, 1988b; McClain et al., 1990) やin vitro (Tamura et al., 1992) の解析によりtRNA<sup>Arg</sup>の主要なアイデンティティー決定因子の1つであることが示されている。本論文第2章で示されたように、argU10(Ts)変異株は高温でコドンAGAに対応するtRNA<sup>Arg</sup>がほとんど消失し、これが高温での増殖阻害の原因であった。このため、外部から導入したコドンAGAに対応するtRNAのin vivoのアルギニン受容活性を相補実験によって判定することができる。特に、tRNA<sup>Arg</sup>のバリエーションを、シングルコピー・ベクターによって、argU遺伝子の発現制御配列とともに導入する場合は、tRNA<sup>Arg</sup>の本来の細胞内存在量に近い発現レベルで、本来認識するコドンを認識するというメリットがある。この点は、サブプレッサーtRNAに終止コドン認識させるシステム (McClain and Foss, 1988b; McClain et al., 1990) に比べて有利である。また、ArgRSの大量発現によって相補活性が回復することを指標にすればアルギニン受容能にのみ影響している塩基置換を特定することが可能である。そこで、この第3章ではargU10(Ts)変異株のシステムを用いてアルギニン受容

活性に必要なヌクレオチド残基の解析を行った。in vivoの解析にはいろいろな制約があるが、これはin vitroアッセイにより補った。

### 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. 大腸菌 tRNA<sup>Met</sup>の精製

大腸菌の tRNA<sup>Met</sup>は、横山研究室において春木満博士（現 蛋白質工学研究所研究員）によって大腸菌 A19 株の tRNA 分画から、DEAE-Sephdex A50 (pH 7.5, Pharmacia), benzoylated DEAE-cellulose (Boehringer-Mannheim), DEAE-Toyoppearl 650S (Tosoh) を用いて精製された (Haruki et al., 1990)。

#### 3-2-2. 大腸菌 tRNA<sup>Met</sup>の末端標識

tRNA<sup>Met</sup>の放射能による末端標識は、5' 末端については、bacterial alkaline phosphatase (Toyobo Co., Ltd., Tokyo) によって末端のリン酸基を除いた後、polynucleotide kinase (Toyobo) を用いて [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Amersham) によって標識を行った。3' 末端については、CCA 配列を snake venom phosphodiesterase (Sigma) で除去した後、tRNA-nucleotidyl-transferase (ストラスブール大 Giegé 博士より頂いた) により、CTP と [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP で修復することで標識を行った。標識した tRNA は、8M 尿素-10% ポリアクリルアミド・ゲルによって精製した。放射活性の測定は、liquid scintillation system LSC-700 (Aloka, Tokyo) でチェレンコフ光のカウントにより行った。

#### 3-2-3. N-nitroso-N-ethylurea を用いたフットプリンティング

native condition の反応は、ラベルした tRNA<sup>Met</sup> (100,000cpm) に非放射性 tRNA<sup>Met</sup> 2  $\mu$ g を加えて、2mM EDTA, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl を含む 300mM カコジル酸緩衝液 (pH 8.0) 20  $\mu$ l に溶かし、5  $\mu$ l の N-nitroso-N-ethylurea (Sigma) のエタノール飽和液を加えて 20°C、3 時間行った。complexed condition の反応は、ラベルした tRNA<sup>Met</sup> (200,000cpm) に非放射性 tRNA<sup>Met</sup> 2  $\mu$ g を加えて、20  $\mu$ M ArgRS, 0.3mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub> を含む 150mM カコジル酸緩衝液 (pH 8.0) 22.5  $\mu$ l に溶かし、tRNA<sup>Met</sup>・ARS 複合体を形成させるために 20°C、10 分間保温した後、N-nitroso-N-ethylurea のエタノール飽和液 2.5  $\mu$ l を加えて 20°C、3 時間行った。denaturing condition の反応は、ラベルした tRNA<sup>Met</sup> (100,000cpm) に非放射性 tRNA<sup>Met</sup>

2  $\mu$ gを加えて、2mM EDTAを含む300mM カコジル酸緩衝液 (pH 8.0) 20  $\mu$ lに溶かして、5  $\mu$ lのN-nitroso-N-ethylureaのエタノール飽和液を加えて80°C、2分間行った。コントロール反応では、N-nitroso-N-ethylureaのエタノール飽和液の代わりにエタノールを加えた。反応後はエタノール沈殿を行い、10  $\mu$ l 0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 9.0) に溶かして、50°C、5分間加水分解を行う。これをポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、imaging analyzer BAS-2000 (Fuji film Co., Ltd., Tokyo) によって解析した。

#### 3-2-4. 遺伝子操作

プラスミドDNA、 $\lambda$ ファージDNAの精製、制限酵素による切断、DNAのライゲーション、ゲル電気泳動の基本的な遺伝子操作の実験は'Molecular cloning, 2nd edition' (Sambrook et al., 1989) に従った。DNA塩基配列の決定は、AmpliQaqシーケンス・キット (Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto) を用いて行った。また、大腸菌のプラスミドによる形質転換は、エレクトロポレーション装置Gene Pulse (Bio-Rad Laboratories) によって行った。

#### 3-2-5. $\lambda$ RNA<sup>4</sup>バリエントのargU10(Ts)変異株相補活性の判定

塩基置換の導入に用いたプライマーは、Cyclone Plus DNA/RNA synthesizer (MilliGen/Biosearch) を使用して合成した。argU遺伝子の部位特異的塩基置換は本論文2-2-9. で示した方法によって行った。塩基置換を導入したargU遺伝子は全てpCL1のEcoRI-Hind III部位に挿入した(図3-2)。塩基置換はDNA塩基配列を決定して確認した。このようにしてpCL1にサブクローニングされたargU遺伝子は上流は370残基までを含む。この領域は、argU遺伝子発現の制御関与していると考えられている塩基配列を全て含んでいる(Muramatsu and Mizuno, 1990; Saxena and Walker, 1992)。また、下流は110残基を含んでおり、 $\rho$ 因子依存性転写終結配列を含む(Garcia et al., 1986)。pCL1はC o l Ib-P9から作製されたプラスミドだが(本論文2-2-3)、C o l Ib-P9の大腸菌内のコピー数は1程度とされているが(Clewell and Heminski, 1970)、最近の測定によると1.5-1.7とされている(A. Kato and K. Mizobuchi, personal communication)。置換型のargU遺伝子が挿入されたpCL1単独か、またはargS遺伝子を含むpYA1 (本論文2-2-4) と共にSF151株(本論文2-3-2) に導入した。形質転換は30°Cでおこない、生じたコロニーは白金耳を用いてLBアガー培地に広げて、24時間、42°Cで保温した後に相補活性を判定した。LB培地はチミン(50  $\mu$ g/ml) とアンブシリン(20  $\mu$ g/ml) を含んでおりpYA1を導入した場合は、加えてクロラムフェニコール(25  $\mu$ g/ml) をも含

む。

### 3-2-6. tRNA<sup>Arg</sup> バリエントの T7 転写物の調製

T7 ファージ RNA ポリメラーゼによる転写反応の鑄型にするために、小原スファージライブラリー (Kohara et al., 1987) から tRNA<sup>Arg</sup> 遺伝子 (Komine et al., 1990) を pUC119 にサブクローニングした。さらに、PCR によって tRNA<sup>Arg</sup> のコーディング配列の 5' 側に T7 RNA ポリメラーゼの転写プロモーターを導入し、同時に 3' 末端に制限酵素 Mva I の認識配列を導入した後、pUC119 の EcoRI-Hind III 部位に挿入した (図 3-3)。部位特異的塩基置換の導入は、argU 遺伝子のケースと同様に、プライマー A、B [本論文 2-2-9] を用いて PCR によって行った。塩基置換は DNA 塩基配列の決定により確認した。T7 転写反应用的鑄型 DNA は、置換型 tRNA<sup>Arg</sup> をプライマー A、B によって増幅した後、Mva I (Toyobo, Tokyo) で切断し、鑄型となる DNA 鎖の 5' が TGG で始まるようにした。T7 RNA ポリメラーゼは、横山研究室の新美達也氏、瀧木理博士によって調製されたものを用いた (Nureki et al., 1994)。鑄型 DNA を、4mM KCl, 16mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM spermidine, 20mM DTT, 4mM ATP, 4mM GTP, 4mM UTP, 4mM CTP, 20mM GMP, 20 units/ml RNasin (Toyobo), 200 μg/ml BSA (Takara Shuzo) を含む 80mM Hepes 緩衝液 (pH 7.5) に溶かして、140 μg/ml T7 RNA ポリメラーゼを加えて 37°C、2 時間反応させた。生成物は、8M 尿素-20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、電気泳動コンセントレーター Model 1750 (Isco Co., Ltd.) によりゲルから抽出した。さらにエタノール沈殿を行ってゲル屑を除いた。

### 3-2-7. *in vitro* のアルギニン受容反応における反応速度定数の解析

1-16 μM tRNA<sup>Arg</sup>, 1-1000 nM ArgRS, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP, 60 μM [<sup>14</sup>C]-arginine (332.1 pCi/pmol, New England Nuclear) を含む 100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 28 μl 中で、37°C において反応を行った。反応開始後、15, 30, 50 秒 (特に活性の低い tRNA バリエントでは、30, 60, 90 秒) で 8 μl のサンプルを採って直ちに氷冷した 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 10 μl に加えて反応を停止させる。この内の 15 μl を Whatman 3MM filter disc にスポットした後、ディスクを氷冷した 5% TCA で 3 回に洗って未反応のアルギニンを除く。乾燥させて liquid scintillation system LCS-700 (Aloka) を使用して放射活性を測定した。

### 3-2-8. *argU* 遺伝子へのランダム変異の導入とスクリーニング

tRNA<sup>Arg</sup>のコーディング配列(77残基)と両側の配列20残基ずつを含む領域をCyclone Plus DNA/RNA synthesizer (MilliGen/Bioscience)を用いて化学合成した。この合成の際に、オリゴマーの延長の各ステップで他の3種の塩基が1/77の割合で混合されるようにした。このようにして合成したオリゴマーとプライマーAをPCRのプライマーとし、pCL2(本論文2-2-3)を鋳型に用いてPCRを行った。得られたDNA断片とプライマーBをPCRプライマーとし、再びpCL2を鋳型に用いてPCRを行った。このようにして、tRNA<sup>Arg</sup>のコーディング配列内に1個程度の塩基置換がランダムに含まれた*argU*遺伝子を作製し、pCL1に挿入した(コーディング配列の前後20残基にも1/77の割合で塩基置換が含まれる)。これを、*argUS*遺伝子を持つpYA1プラスミドと共に30°CでSF151に導入した。このときチミン(50 µg/ml)、アンピシリン(20 µg/ml)、クロラムフェニコール(25 µg/ml)を含むLBアガー・プレート1枚に1000個以上のコロニーが得られる効率で形質転換を行った。得られたコロニーは全てLB培地に懸濁してからプレートに広げて42°Cで培養した。一晚培養後生じたコロニーをまとめて掻き取ってプラスミドDNAの抽出を行った。*argU*遺伝子だけを取り出すために抽出したDNAを鋳型にプライマーA, Bを用いてPCRを行い、このようにして得られた0.6kbの断片を再びpCL1にサブクローニングして相補活性を指標にスクリーニングを行った。

## 3-3. 結果と考察

### 3-3-1. tRNA<sup>Arg</sup>のフットプリンティング

EF-Tu・GTPやARSとの相互作用するtRNA分子内の領域は、リボヌクレアーゼやアルキル化剤を用いたフットプリンティングによって同定されてきた(Bourtin et al., 1981; Wikman et al., 1982; Gangloff et al., 1983; Romby et al., 1985; Dietrich et al., 1990; Theobald et al., 1988)。N-nitroso-N-ethylureaは小さな分子であるので立体障害による制約が少なく、tRNA・ARS相互作用だけでなく、tRNA自体の構造を解析する目的でも使用されている(Dietrich et al., 1990; Theobald et al., 1988)。ArgRSを加えないnative conditionの反応でも、アルキル化から保護されるリン酸基が見い出される(図3-4, 3-5A)。このことは、G18, G19残基付近でDループとTループが会合して稠密な構造をとっていることを示している。complexed



conditionの反応からは、アクセプター・ステム、Dアーム、アンチコドン・アームを含む広い範囲にわたって、tRNA<sup>Arg</sup>はArgRSと相互作用していることが示された(図3-4, 3-5B)。55位のシュウドウリジン(Ψ)の3'側のリン酸基も、ArgRSによってアルキル化から保護される。G18, G19付近はArgRSの非存在下で既にアルキル化を受けにくいので、この近くの領域とArgRSとの相互作用についての情報は得られない。しかし、ArgRSが、G18, G19, Ψ55を含むtRNA<sup>Arg</sup>の「コア」構造と相互作用している可能性はあるだろう。tRNA<sup>Arg</sup>はArgRS存在下のコントロール反応で、A20U20a, およびU33I34の間で切断されるが、このような自己切断はフットプリンティングではしばしば観察されており、切断箇所の周辺でtRNAの立体構造に変化が起きていることの指標になるとされている(Giegé et al., 1993)。tRNA<sup>Arg</sup>において、このような切断が起きている箇所はいずれもアイデンティティー決定因子A20, C35の近傍であることから、ArgRSによってこれらの残基が認識され、その周辺でコンホメーション変化が起きている可能性も考えられる。フットプリントの結果を、酵母tRNA<sup>Arg</sup>の3次構造(Rich and RajBhandary, 1976)に重ね合わせて示すと(図3-6)、ArgRSが、バリアブル領域とは反対の側からtRNA<sup>Arg</sup>と相互作用している様子が分かる。

### 3-3-2. tRNA<sup>Arg</sup>のアイデンティティー決定因子

フットプリントによりArgRSと相互作用していることが示されたtRNA<sup>Arg</sup>上の領域内のどのような構造がアルギニン受容活性に必須であるかを、部位特異的に塩基置換を導入したtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションによるargU10(Ts)変異株の相補性試験、およびtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションのin vitroのアルギニン受容活性測定に基づいて解析を行った。

a. A20; A20, C35はtRNA<sup>Arg</sup>の主要なアイデンティティー決定因子であることが示されているが、C35の置換の影響についてはargU10(Ts)変異株の相補実験によって検討することができない。A20の置換については、第2章で示したようにいずれも相補活性を失わせるが、ArgRSの大量発現により相補活性は回復する。表3-2にA20からG20への置換(A20G)を持つtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションのin vitroの反応速度定数を示すが、野生型に比べて活性の低下は1/660であり、おもにk<sub>cat</sub>値の低下によるものである。さらに、A20の削除(ΔA20)が、A20の置換と同程度の活性低下を引き起こすことが報告されているが(Tamura et al., 1992)、argU10(Ts)変異株の相補実験においてもΔA20はA20の置換と同じ挙動を示しており(表3-2)、相補性試験の結果とin vitroアッセイの結果はよく対応している。また、A20を含む「variable

pocket' (Ladner et al., 1975) の構造がアルギニン受容活性で重要であると主張されていた (McClain and Foss, 1988b), tRNA の保存構造 (14A, 18G, 19G, 21A, 58A) に挟まれて, 16, 17, 20, 59, 60位の残基によって構成される 'variable pocket' は, tRNA 分子種によって塩基構成, 残基数が異なっている. これまでに, 'variable pocket' を構成する塩基が異なったいくつかの tRNA 分子種に A20 が導入されたが, これらの tRNA はアルギニン受容活性を示すことが報告されている (McClain and Foss, 1988b; Schulman and Pelka, 1989; McClain et al., 1990; Tamura et al., 1992). 本研究では, 20aU と 21A の間に 1 残基の挿入を行うことで 'variable pocket' を構成する残基数を増やしたが, 相補活性に影響は見られなかった (表3-2). これらのことから, A20 以外の 'variable pocket' の構造がアルギニン受容活性に必須であるとは考えにくい. しかし, フットプリントの結果によると, tRNA<sup>Arg</sup> の 16位, 17位付近に ArgRS が結合していると考えられるので, A20 以外の 'variable pocket' 内の残基は, ArgRS の tRNA<sup>Arg</sup> への結合に影響を与える程度の寄与はしているかも知れない.

b. A38; フットプリントで, 38位の3'側のリン酸基における 'protection' は非常に強い. しかも, A38は大腸菌 ArgRS の基質となる5種類の tRNA<sup>Arg</sup> に共通している (表3-1). A38を置換した tRNA<sup>Arg</sup> バリエーションの *in vivo*, *in vitro* アッセイの結果を表3-2に示す. A38U, A38Gの置換はいずれも相補活性を失わせるが, ArgRSの大量発現によって活性が回復しないので, 相補活性への影響がアルギニン受容能の低下によるものか否かの判断ができない. *in vitro* のアッセイによって, A38U, A38Gの置換はアルギニン受容活性をそれぞれ1/220, 1/1730に低下させることが示された (表3-2).  $K_m$  値も上昇するが,  $K_{cat}$  値の低下が顕著である. A38Cに置換した tRNA<sup>Arg</sup> は *argU10* (Ts) 変異株を相補するが, *in vitro* のアルギニン受容活性は1/50に低下している. このように低いアルギニン受容活性の tRNA<sup>Arg</sup> バリエーションが相補活性を示す理由としては, 大腸菌の増殖を維持するために最小限必要なアルギニル tRNA<sup>Arg</sup> 量はかなり低いということがあるだろう. 30°Cで, *argU10* (Ts) 変異株におけるアルギニル tRNA<sup>Arg</sup> の細胞内存在量は, 野生型株の1/16であった (本論文2-3-3). ただし, *argU10* (Ts) 変異株の30°Cでの増殖速度は, 野生型株に比べてわずかに低いと報告されている (Chen et al., 1990). また, tRNA<sup>Arg</sup> バリエーションの導入に利用しているベクター pAp102のコピー数は1よりは大きく1.5-1.7である. 38位の残基が tRNA identity に寄与している例に, 大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> (Jahn et al., 1991), tRNA<sup>Arg</sup> (Nureki et al., 1994) があるが, 38位の残基の置換による活性の低下は1/15-1/70程度

であり、これらに比べてA38のアルギニン受容活性への寄与は顕著に大きい。A38はtRNA<sup>Arg</sup>のアイデンティティ決定因子と結論される。A38は大腸菌以外の生物種のtRNA<sup>Arg</sup>でも保存されており、数例の例外ではC38である (Sprinzl et al., 1991)。また、ArgRSの大量発現がA38UやA38G置換のtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションの相補活性を回復させなかったことから、これらの置換がアルギニン受容活性以外のtRNA機能に影響していたと考えられる。38位の残基がコドンの読み取りの効率に寄与している例が報告されているので (Björk et al., 1987)、38位の置換がコドン認識へ影響した可能性がある。

c. アンチコドン; 大部分のtRNA種で、アンチコドンはアミノ酸受容活性に必須である (Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991; Giegé et al., 1993)。大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>では、C35がアルギニン受容活性に大きく寄与している (表3-2, Schulman and Pelka, 1989; McClain et al., 1990; Tamura et al., 1992)。アルギニンのコドンは6種類もあるので、アンチコドン2字目以外には種々の塩基が存在している。アンチコドン3字目(36位)にはG, Uが存在するが、36位をA, Cに置換するとそれぞれ1/4, 1/380の活性低下を引き起こすことが報告されている (Tamura et al., 1992)。アンチコドン1字目には、イノシン(I), C, mnm<sup>5</sup>Uが存在するが、修飾ヌクレオシドを含まないT7転写物における活性の低下は小さいので (表3-2), A34, U34も許容されることが分かる。このようにしてみると、34位にはGのみが存在しない。本研究では、A34Gの置換が*in vitro*のアルギニン受容活性を1/27に低下させることを明かにした (表3-2)。後で再び論じるように (本論文3-3-4), G34はArgRSに対する 'negative determinant' として働いていると考えられる。以上のように、寄与の大きさの違いはあるが、アンチコドンの3残基は全てアルギニン受容活性に寄与していることが明かにされた。

d. アンチコドン, 38位以外のアンチコドン・ループ内の残基

d-1.32位; アンチコドン・ループ内の他の残基についても検討した。大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>とグルタミンル tRNA合成酵素(GlnRS)の複合体では、32位, 38位の残基間で塩基対が形成されており、32位の残基はグルタミン受容活性に寄与している (Rould et al., 1991)。また、大腸菌, T4バクテリオファージの5種類のtRNA<sup>Arg</sup>アイソアクセプターの32位は、いずれもCであるか2-チオシチジン(s<sup>2</sup>C)である (表3-1)。ところが、C32Gの置換はtRNA<sup>Arg</sup>の相補活性に影響しないので (表3-2)、32位のC (またはs<sup>2</sup>C) はtRNA<sup>Arg</sup> identity に重要ではないと考えられる。32位の残基がコドン特異性に影響すること (Lustig et al., 1993) を考えると、tRNA<sup>Arg</sup> にs<sup>2</sup>C32が共通しているのは、コドン認識に関係があるのかもしれない。

d-2. 33位; 33位は、ほとんど全てのtRNAでUである (Sprinzl et al., 1991). U33は、大腸菌tRNA<sup>Arg</sup> (Nureki et al., 1994) ではアミノ酸受容能に寄与していることが報告されている。しかし、U33A、U33Cの置換はtRNA<sup>Arg</sup>の相補活性には影響しない (表3-2)。U33Gの置換は相補活性を失わせるが、ArgRSの大量発現によっても回復しないので、アルギニン受容能以外機能に影響していると考えられる。実際に、U33GのtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションの*in vitro*のアルギニン受容能は全く低下していない (表3-2)。U33の機能は明かではないが、U33G置換のtRNAはタンパク質合成の、アミノ酸の受容以後の段階で (おそらくリボソーム上で) 正常に機能できないと考えられる。ただし、T4バクテリオファージの 'anticodon nuclease' のように33位の3'側でtRNAを切断するリボヌクレアーゼも存在するので (Amitsur et al., 1987), G33を認識してtRNAを分解する大腸菌リボヌクレアーゼが存在する可能性も否定はできない。

d-3. 37位; tRNAの37位は、アンチコドン1字目に次いで転写後修飾の種類の豊富な部位である (Nishimura, 1979)。37位の転写後修飾がtRNAのidentityに寄与していると考えられているケースがある (Perret, et al., 1990; Nureki et al., 1994)。大腸菌のtRNA<sup>Arg</sup>の37位にはN-[9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル]トレオニン (t<sup>6</sup>A), 1-メチルグアノシン, 2-メチルアデノシンが存在する (表3-1)。さらに、tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>のT7転写物の活性はほとんど低下していないので (表3-2), 37位の転写後修飾は重要ではないと考えられた。tRNAの37位は必ずプリン残基であるので、ピリミジンに置換して活性への影響を検討した。37位はコドン認識で重要な機能を果たす部位である (Nishimura, 1979; Bjork et al., 1987) ことを考慮して、tRNA<sup>Arg</sup>バリエーションによる*in vivo*アッセイの代わりに、A37U置換のtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションを作製して、*in vitro*のアッセイを行ったが、アルギニン受容能は全く低下しなかった (表3-2)。

e. アンチコドン・ステム; アンチコドン・ステム内の残基である39-41位の残基の3'-リン酸基は、フットプリントにおいて強く 'protection' を受けている (図3-5B)。ところが、アンチコドン・ステム内には大腸菌、T4ファージtRNA<sup>Arg</sup>に共通のヌクレオチド残基は1つも無い (表3-1)。また、アンチコドン・ステム内のヌクレオチド配列の異なる種々のtRNAにアルギニン受容能が導入されているので (McClain and Foss, 1988b; Schulman and Pelka, 1989; McClain et al., 1990; Tamura et al., 1992), ArgRSはアンチコドン・ステムと塩基特異的な相互作用をしていないと考えられる。ただし

強い 'protection' が起きている付近の31・39位の塩基対が、大腸菌、T4ファージのtRNA<sup>Arg</sup>でG・C、またはC・Gであることを考慮して。この近傍のステム構造の安定性を減少させるような塩基置換をtRNA<sup>Arg</sup>に導入した。ところが、A30Ψ40→U30Ψ40、C31G39→U31G39、C31G39→U31A39のいずれの置換も相補活性に影響しなかった(表3-2)。よって、ArgRSはアンチコドン・ステムの片側の鎖の39-41位付近のリン酸骨格に結合しているのではないかと考えられる。

f. Dステム; フットプリントの結果は、ArgRSがtRNA<sup>Arg</sup>のDステムの3'側の鎖(22位-25位)に強く結合していることを示していた(図3-5B)。しかし、大腸菌、T4ファージtRNA<sup>Arg</sup>で保存されている残基はDステム内ではG10のみである。U12A23は、大腸菌の4種類のtRNA<sup>Arg</sup>で保存されている(表3-1)。Dステム内の残基の多くは3次元相互作用に関与しており、塩基置換がtRNAの全体の構造に影響を与える可能性もある。大腸菌tRNA<sup>Arg</sup> identityは、サブレッサーtRNAを用いてin vivoで解析されているが、Dステム内の塩基置換の解析は成功していない(McClain and Foss, 1988c)。このことを考慮してtRNA<sup>Arg</sup>バリエーションのin vitroアッセイを行った。その結果、G10A、U12A23→A12U23の置換はアルギニン受容能にはほとんど影響しないことが示された(表3-2)。このことから、大腸菌ArgRSは、tRNA<sup>Arg</sup>のDステムと塩基特異的な相互作用をしているのではなく、むしろリン酸骨格に結合しているのではないかと考えられる。

g. Ψ55; フットプリントでは、Ψ55の3'-リン酸基が強い 'protection' を受けているが、このことの意味については本論文3-3-3.で論じる。

h. アクセプター・ステム; アクセプター・ステムは、種々のtRNAで重要なアイデンティティ決定因子を含んでいる(Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991; Giegé et al., 1993)。ところが、大腸菌、T4ファージのtRNA<sup>Arg</sup>ではアクセプター・ステム内で保存された残基は少なく、G1、G68のみである。G1については第2章でも論じたように、アルギニン受容能には重要な寄与をしていない。G68Aの置換は、tRNA<sup>Arg</sup>のin vivoのアルギニン受容活性を低下させるが、C5A68のミスマッチを生じているので、同時にC5Uの置換を導入したところ相補活性は回復した(表3-2)。フットプリントの結果によると、ArgRSとtRNA<sup>Arg</sup>のアクセプター・ステムへの結合はそれほど強くはない。また、アクセプター・ステム内の塩基配列の異なる種々のtRNA分子種にアルギニン受容能の導入が行われており(McClain and Foss, 1988b; Schulman and Pelka, 1989; McClain et al., 1990; Tamura et al., 1992)、アクセプター・ステム内の塩基配列は、tRNA<sup>Arg</sup>のiden-

tityに重要ではないと考えられる。G68Aの置換で示されたように、アクセプター・システムが正常のA型二重らせん構造をとっていることが重要であるようだ。

### 3-3-3. tRNA<sup>Arg</sup>のアルギニン受容活性に必須な3次構造

3-3-3a. ランダム変異体のスクリーニング; フットプリント, 部位特異的に塩基置換を導入したtRNA<sup>Arg</sup>の解析と平行して, tRNA<sup>Arg</sup>の全体にわたりランダムに1個程度の塩基置換を導入したバリエーションを作製し, argU10(Ts)変異株を用いたスクリーニングによって, *in vivo*のアルギニン受容活性に必須な残基の同定を試みた。A20以外のアイデンティティー決定因子を検索することを目的としたので, ランダムな塩基置換は20位以外の部位に導入した。最初に, ArgRSの大量発現下でスクリーニングすることで, アルギニン受容活性以外のtRNA機能にダメージを与えている塩基置換を排除した。このとき, アルギニン受容能と同時に別のtRNA機能に影響する塩基置換(35位, 38位などの置換)も同時に排除されてしまうだろう。こうして得られた, 塩基置換を含むargU遺伝子は, PCRによって増幅され, 再びColl<sub>1</sub>由来のベクターにクローニングされて, ArgRSが大量発現していないargU10(Ts)変異株に導入された。こうして得られた400個のクローンの内, 42°Cで増殖できないクローンが11個得られた。この内, 6個はargU遺伝子が挿入されていないプラスミドを含んでいた。1個のプラスミドはA20Uの置換を含んでいた。これは, 大腸菌内での突然変異か, PCRのときに誤って取り込まれたか, DNA合成の際の混入によるものだと考えられるが, いずれにせよ, このスクリーニングの系が期待したように機能していることを示している。さらに, 2個のプラスミドはG18Uの置換を, 1個はG18Aを, さらに1個はA14Gの置換を含んでいた(図3-7)。

3-3-3b. tRNAの3次構造に寄与するヌクレオチド残基への塩基置換の導入; G18, A14はいずれも保存塩基であり, tRNAの3次構造の形成に寄与している。そこで, 3次構造に寄与する他のヌクレオチド残基にも塩基置換を部位特異的に導入し, アルギニン受容活性への影響を検討した。ただし, このようなヌクレオチド残基の中には, T54Ψ55C56の配列のようにリボソームと相互作用するとされている(Helk and Sprinzl, 1985)残基があり, *in vivo*のアッセイには制約があるので, いくつかの残基については*in vitro*のアッセイによって検討を行った(表3-3)。なお, tRNA<sup>Arg</sup>とtRNA<sup>Arg</sup>において形成される3次元塩基対, および塩基対に関与する部位は異ならないと考えている(図3-8)。また, 塩基置換は, 必ずしも塩基対を壊すとは限らず,

形成される水素結合の数が減るだけであるケースもある。そこで、塩基置換の塩基対形成についての報告 (Sampson et al., 1990) に基づいて、実際に導入した塩基置換が、塩基間に形成される水素結合の数にどのように影響するかを検討した (表3-4)。この結果、水素結合が全く形成されないか、同じように水素結合の数が減っているケースでも、アルギニン受容活性に影響するものではないものの違いがあることが分かる (図3-9)。アルギニン受容活性に必須な残基はU8, A14, G18, G19, C56, A58であり、これらは、4つの3次元塩基対 (U8・14A, G18・Ψ55, G19・C56, T54・A58) に関与している (図3-10A)。この結果とフットプリントの結果 (図3-5B) と比較すると、G18G19, T54Ψ55C56のDループ・Tループ会合領域、および、A14付近にArgRSが結合していると考えられる。一方、壊してもアルギニン受容能に影響しない3次元塩基対はいずれもtRNAのバリアブル領域の側に存在している (図3-10B)。このことは、ArgRSがバリアブル領域とは反対の側でtRNA<sup>Arg</sup>と相互作用しているというフットプリントの結果 (図3-6) と合致している。

3-3-3c. 活性に寄与する構造; 3次元塩基対に関与している残基がアミノ酸受容活性に寄与しているときには、塩基対形成が重要であるのか、塩基自体の構造が重要であるのかの問題がある。tRNAの3次構造上で、塩基対形成に影響を与えずに塩基置換を導入することは容易ではないが、G19・C56間のワトソン・クリック型塩基対については、C19・G56に置換しても塩基対形成が起こるとされている (Sampson et al., 1990)。酵母tRNA<sup>Arg</sup>では、G19, C56のそれぞれの置換は、フェニルアラニンの受容活性を1/5に低下させるが、G19C56→C19G56の置換は活性を低下させないことが報告されている (Sampson et al., 1990)。tRNA<sup>Arg</sup>のG19C, C56Gの置換はそれぞれ1/1170, 1/210の活性低下を引き起こすが、G19C56→C19G56の置換はほとんど活性を低下させない (表3-3)。このことは、19位と56位の間塩基対形成がアルギニン受容活性に必須であることを示している。ところが、U8・A14の塩基対については事情が異なる。U8A14→A8A14の置換によっても塩基対は形成されるとされているが (図3-11, Sampson et al., 1990)、アルギニン受容活性は影響を受けている (表3-4)。さらに、8位の置換、14位の置換のいずれも活性に影響することから、ArgRSがU8A14という構造を特異的に認識していることが示唆される。T54・A58については、A58Uの置換によっても塩基対形成が起こっている可能性あり (図3-12)、この塩基対についても構造が特異的に認識されている可能性があるだろう。

### 3-3-4. 大腸菌ArgRSによるtRNA<sup>Arg</sup>認識の構造的基盤

大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>・ArgRS間の相互作用の特徴の1つは、アクセプター・ステムの寄与が小さいことである。これまでに解析されたほとんどのtRNA分子種で、73位の'discriminator base'またはアクセプター・ステムの寄与は重要であった(Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991; Giegé et al., 1993)。ところが、'discriminator base'のアルギニン受容活性への寄与は小さい(Tamura et al., 1992)。また、フットプリントで、ArgRSとアクセプター・ステムの間に中程度の相互作用は検出されたが、アクセプター・ステム内にアイデンティティー決定因子は存在しなかった。アルギニン受容活性に重要な領域は2つの領域に集中しており、1つはA20を含むDループを中心とした領域で、もう1つはアンチコドンとその3'側に隣接する領域である。

アンチコドンを含む領域内ではC35が最も重要なアイデンティティー決定因子であるが、本研究で初めて明かにされたように、アンチコドンの3残基はいずれもアルギニン受容能に寄与している。さらに、32位、33位、37位が重要でなく、38位にアイデンティティー決定因子が存在する。共結晶の解析から示されたように、大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>では、アンチコドン・ループの全体がGlnRSとの相互作用に寄与していた(Rould et al., 1991; Jahn et al., 1991)。大腸菌tRNA<sup>Arg</sup>でも、32位、37位を含めて、アンチコドン・ループのほとんど全てが活性に寄与している(Nureki et al., 1994)。ところが、ArgRSでは、アンチコドン・ループの'U'ターンより3'側のみでtRNA<sup>Arg</sup>と相互作用していると考えられる。tRNA<sup>Arg</sup>の38位の塩基置換は、どれもK<sub>38</sub>を有意に上昇させることから、A38はArgRSのアンチコドン・ループへの結合に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。これまでにヌクレオチド配列が報告されている、ほとんどの生物種のtRNA<sup>Arg</sup>でA38は保存されており(Sprinzi et al., 1991)、他の生物種のアルギニンの系でも、大腸菌と同様なメカニズムで、ArgRSとアンチコドン・ループとの相互作用が起きているかもしれない。

A20を含む'variable pocket'が、ArgRSとtRNA<sup>Arg</sup>の相互作用において重要な役割を果たしているのではないかと考えられたのは、'variable pocket'内の塩基構成、残基数がtRNA分子種によって大きく異なり、tRNA分子種に特異的な構造を形成できると考えられたからである(McClain and Foss, 1988b)。ところが、U8・A14、G18・Ψ55、G19・C56、T54・A58のような、細胞質tRNAのほとんど全てにおいて保存されている塩基対がアルギニン受容活性に必須であるという意外な結果が得られた。これらは、アイデンティティー決定因子A20を取り囲むようにして存在しており(図3-



10A), ArgRSがA20を認識するために必要な構造を形成しているのではないかと考えられる。しかも, A20に近いG15・C48やA21の置換は活性に影響しないので, 共通構造の全てが重要という訳ではない。A21が活性に重要ではないという結果は, A20とA21の間に1残基挿入しても活性に影響しないという結果と合致していると考えられる。

ATP結合モチーフの塩基配列に基づいてARSを2つのグループに分けることができる(Eriani et al., 1990, 表3-5)。ArgRSは, IleRS, GlnRSと同じクラスIに分類されている。ArgRSは, バリアブル領域とは反対側のtRNA側面と相互作用していることが示されたが, このことはIleRS(Nureki et al., 1994), GlnRS(Rould et al., 1989)と共通している。しかし, アンチコドン・ループとの相互作用については, これら2つのARSとは異なっている。現在のARSのクラス分けが, 果たしてもRNAの認識メカニズムにまで及ぶのか, tRNAとの相互作用のあり方から別のクラス分けが可能であるのか, これからの重要な課題の1つだろう。

ここまでの研究でもRNA<sup>Arg</sup>とコグネートなArgRSとの特異的相互作用の分子構造的基盤のほぼ全貌が明かにされた。実験結果は, tRNA<sup>Arg</sup>とtRNA<sup>Ile</sup>に股がっているが, これらのT7転写物の反応速度定数はほとんど同じであり(表3-2), 残基間の3次元相互作用も同様であると考えられる(図3-8)。tRNA<sup>Arg</sup>とtRNA<sup>Ile</sup>のそれぞれのヌクレチド配列に基づいたサブプレッサーtRNAのサブプレッションの効率が異なると報告されているが(McClain et al., 1990), これは必ずしもアルギニン受容活性の違いを意味しないだろう。また, tRNA<sup>Ile</sup>のランダム変異体のスクリーニングによって, tRNA<sup>Ile</sup>の全ての残基の活性への寄与をチェックできるはずであった。ところが, 実験手法の制約からA38のようなアイデンティティ決定因子を拾えなかったのは当然だが, B位, 58位, 68位の置換を拾うことができなかつた。さらに多くのクローンのスクリーニングが必要であったと考えられる。しかし, フットプリントによる解析や, アルギニンを受容を示すことが報告されている種々のtRNAの塩基配列の比較を行い, これらに基づいて部位特異的な塩基置換を導入した。このようにして, tRNA<sup>Arg</sup>のほとんどの領域についてアルギニン受容活性への寄与を検討することができたと考えている。

### 3-3-5. 大腸菌ArgRSがノンコグネートなtRNA分子種を排除するメカニズム

tRNA identityは, ARSとコグネートなtRNAとの'productive'な相互作用だけでなく, ノンコグネートなtRNAとは'productive'な相互作用を行わないことによっても保障されている。A20を置換したtRNA<sup>Arg</sup>

は、*in vitro*で野生型の1/120-1/500程度に低下した活性を示すが（表3-2, Schulman and Pelka, 1989; Tamura et al., 1992）, マルチコピー・ベクター-pBR322によってargU10(Ts)変異株に導入すると相補活性を示す(図3-13). 野生型tRNA<sup>Arg</sup>をpBR322によってMV1184株で発現させた場合には、40-50倍の活性の増加がみられるので(図3-14), A20置換型tRNA<sup>Arg</sup>の活性の低下は40-50倍の大量発現によって補われたと推測される. ここで、大腸菌の増殖に必要な最小限のアルギニルtRNA<sup>Arg</sup>レベルが通常量の1/10以下であること(本論文2-3-3)は考慮されなければならない. 野生型tRNA<sup>Arg</sup>との競合などによって、A20置換型tRNA<sup>Arg</sup>の活性の低下は、*in vitro*のときよりも*in vivo*で一層顕著に現れるという推測もあり得るが、この相補実験の結果は、A20置換型tRNA<sup>Arg</sup>の*in vitro*の活性低下はそのまま*in vivo*で反映されることを示している. このように、A20置換型tRNA<sup>Arg</sup>が、*in vivo*で有意なアルギニン受容能を示すことから、次のような問題点が浮かび上がってくる. A20はtRNA<sup>Arg</sup>にのみ存在するので、ArgRSがtRNA<sup>Arg</sup>を他のtRNA分子種から識別する必要十分の標識であった.ところが、相補実験結果は、A20が置換されたtRNA<sup>Arg</sup>であってもArgRSによって、低い効率ながら特異的に認識されていることを示していた. それでは、ArgRSはA20を持っていないtRNA<sup>Arg</sup>と他のノンコグネートなtRNAをどのように識別しているのだろうか?

他に目印となり得るものはC35だろう. A20, C35の両方が置換されたtRNA<sup>Arg</sup>は*in vivo*でアルギニン受容能を全く示さない(McClain and Foss, 1988b; McClain et al., 1990). しかし、全ての大腸菌tRNA分子種の中でtRNA<sup>Arg</sup>以外にも、tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>はC35を持つ(Komine et al., 1990). そこで、A20やC35以外のアイデンティティー決定因子について、これらのtRNAとtRNA<sup>Arg</sup>との間でヌクレオチド配列を比較した(表3-6). A38が、tRNA<sup>Arg</sup>と他のtRNAとの識別に全く役に立っていないが、34位、36位、73位の中程度以下の「強さ」のアイデンティティー決定因子が識別に寄与していることが分かる. これらの寄与によってtRNA<sup>Arg</sup>と他のtRNAとの間に、A20による差(120-500倍程度)に加えて最低で20-27倍のアルギニン受容活性の差を生むと考えられる. ただし、離れた部位の塩基置換が活性の低下において'co-operativity'を示すとの報告もあり(Putz et al., 1993), 34位と73位、36位と73位における残基の違い(特にtRNA<sup>Ala</sup>との違い)による活性の差はさらに大きい可能性がある.

以上のように、G34, A/C36, U73はArgRSに対するネガティブなアイデン

ティティ決定因子(negative determinant) (Perret et al., 1990; Schulman, 1991) として機能している。また、これらのような中程度以下の「強さ」のアイデンティティ決定因子がtRNAの識別に果たす役割は大きいと言えるだろう。tRNA identityの決定において、コグネートな分子との相互作用の効率を上げるだけでなく、ノンコグネートな分子との‘productive’な相互作用は例え低い効率であっても排除するメカニズムが必要である。特に、多くのtRNA identityでアンチコドンが重要な寄与をしているが、アンチコドンのヌクレオチド配列はコドン認識による制約を受ける。例えばtRNA<sup>Asp</sup>とtRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>にC35が共通であるのはコドン認識の必要上避け難い。このようなケースで、ノンコグネート分子のミスチャージングを防ぐためにメカニズムが存在し、そのメカニズムにおいて中程度以下の「強さ」のアイデンティティ決定因子は重要な働きをしているようだ。

コドンの正確な翻訳を実現するために、ノンコグネートな分子との相互作用を防ぐことの重要性は、tRNAのアミノアシル化反応だけでなく、コドン認識においても重要である。第1章で論じたように、tRNAのアンチコドン1字目のウリジン残基のmnm<sup>5</sup>U, xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>Uなどへの転写後修飾は、3字目がAのコグネートなコドンを認識する効率を上げるだけでなく、3字目がUのノンコグネートなコドンを例え低い効率であっても認識しないようにしている。このように、タンパク質合成の様々な段階で、翻訳の忠実度を高めるメカニズムが働いているだろう。

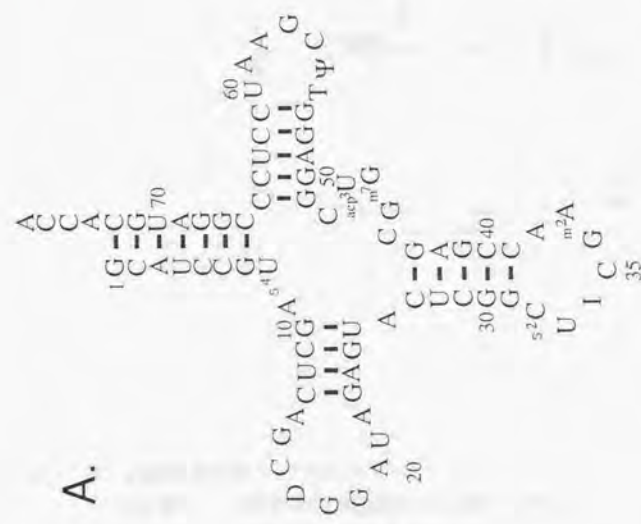
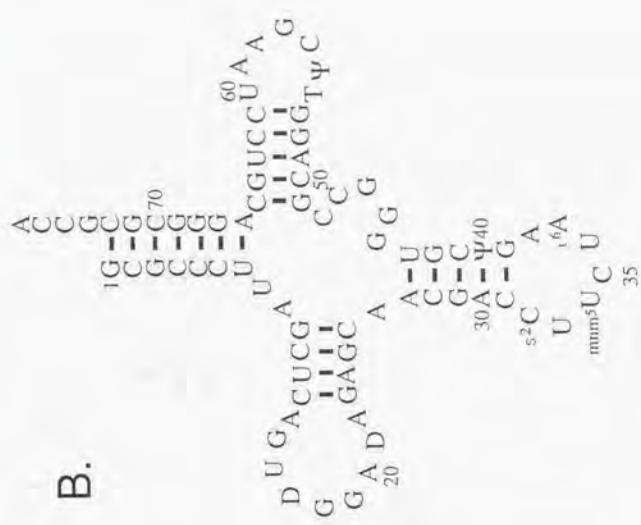


図3-1. tRNA<sup>Asp</sup> (A), tRNA<sup>Phe</sup> (B) のヌクレオチド配列

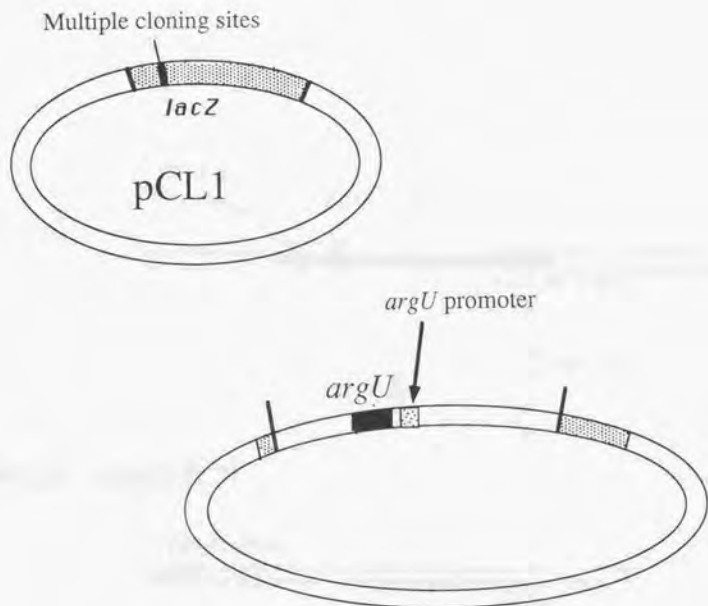


図3-2. *argU*遺伝子導入ベクター

(*argU*遺伝子は前後の塩基配列と共に全0.6kbがpCL1のマルチプル・クローニング領域に挿入された。)

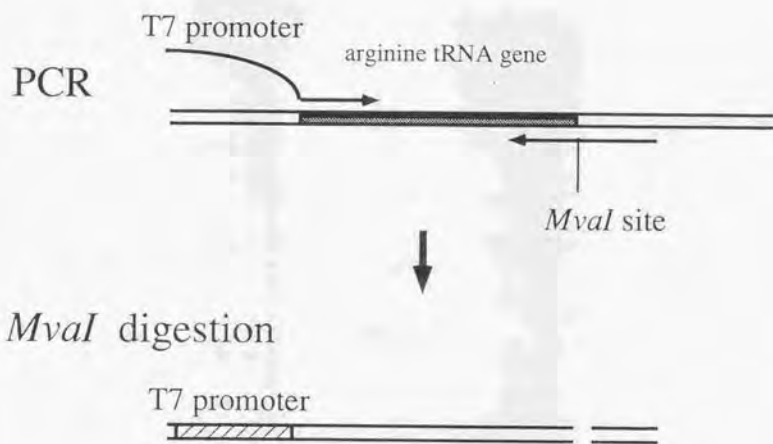


図3-3.  $tRNA^{arg}$  の T7 RNA ポリメラーゼ転写用鋳型 DNA の作製.  
 PCR によって,  $tRNA^{arg}$  のコーディング配列の 5' 側は T7 プロモーターに置き換えられ, 3' 末端は制限酵素  $MvaI$  部位に改変される. PCR で増幅した DNA 断片は  $MvaI$  で切断した後, T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応の鋳型として用いた.

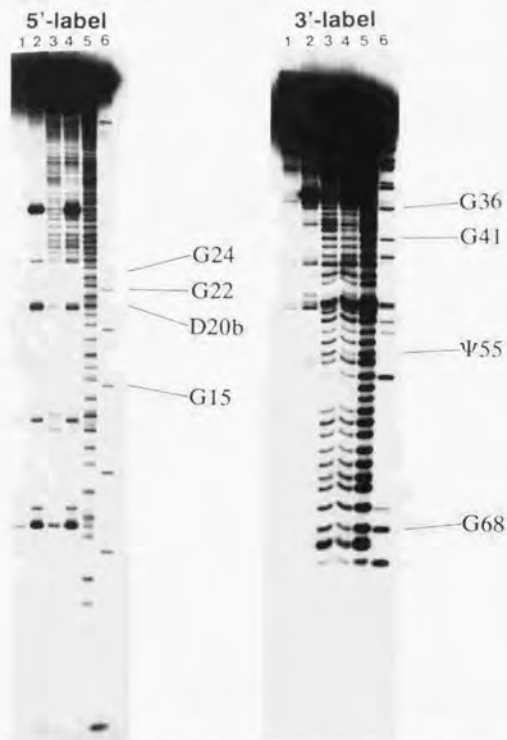


図3-4. フットプリントによるtRNA<sup>Arg</sup>とArgRSの相互作用の解析。  
 Lane 1は、ArgRS, アルキル化剤を加えないコントロール反応, Lane 2  
 はArgRSを加えてアルキル化剤を加えないコントロール反応, Lane 3,  
 4, 5はそれぞれnative condition, complexed condition, denaturing  
 conditionの反応, Lane 6はリボヌクレアーゼT<sub>1</sub>による反応を示す。

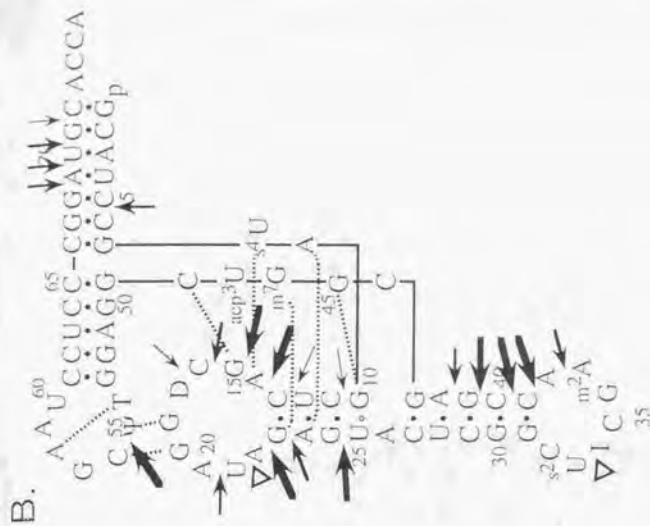
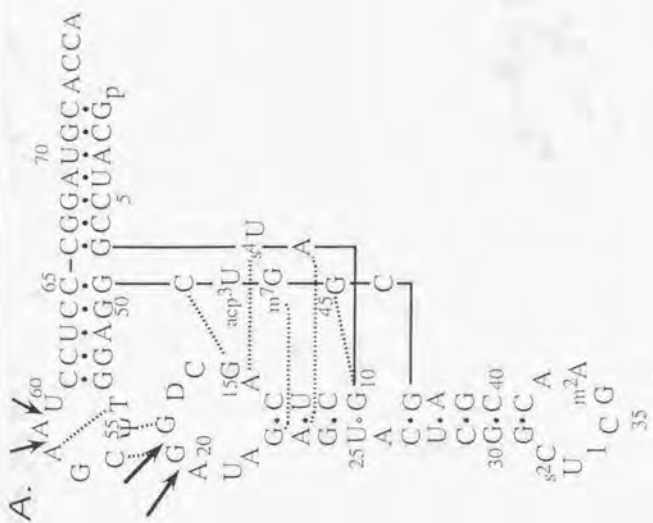


図3-5.

A) とRNAase<sub>3</sub>、単独でアルキル化反応から保護されるリン酸残基 (矢印で示す)。

B) ArgRSとの複合体形成によりアルキル化反応から保護されるリン酸残基、矢印の太さで 'protection' の強さを表す。'protection' の強度は、図3-4で、native condition反応のバンド強度に比べ、complexed condition反応のバンド強度がどれだけ低下したかで示す。細い矢印は、20%以下、中程度の太さの矢印は20~50%、太い矢印は50%以上の 'protection' を意味している。▽の印は、ArgRSの存在下で切断されやすくなるリン酸残基を示す。



図 3-6. ArgRS との複合体形成によりアルキル化反応から保護される部位 (●) と切断されやすくなる tRNA<sup>Arg</sup> 上の部位 (▽) を, 酵母 tRNA<sup>Phe</sup> (Rich and RajBhandary, 1976) の 3 次構造に重ね合わせて示す.

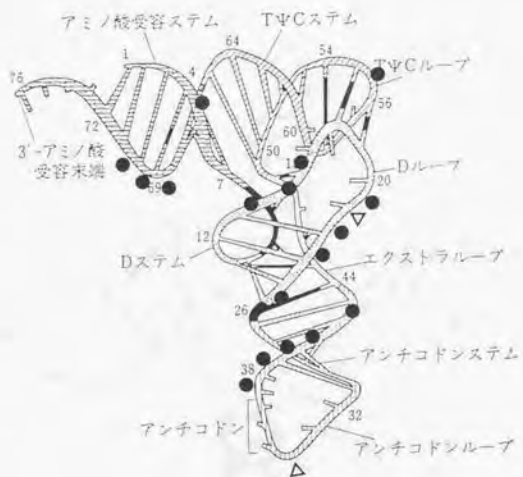
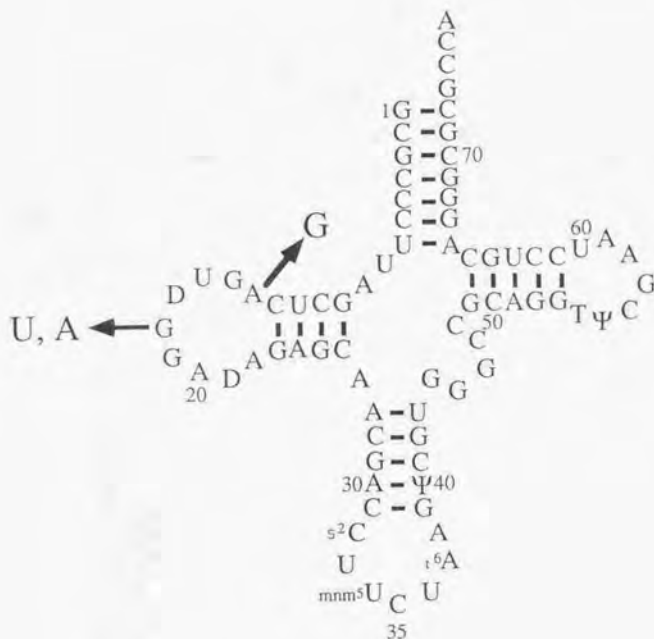


図3-7. ランダムに塩基置換を導入した tRNA<sup>Arg</sup>の中から, *in vivo*でアルギニン受容活性が低下している置換型 tRNA<sup>Arg</sup>のスクリーニングを行った結果, 見出された塩基置換を示す.



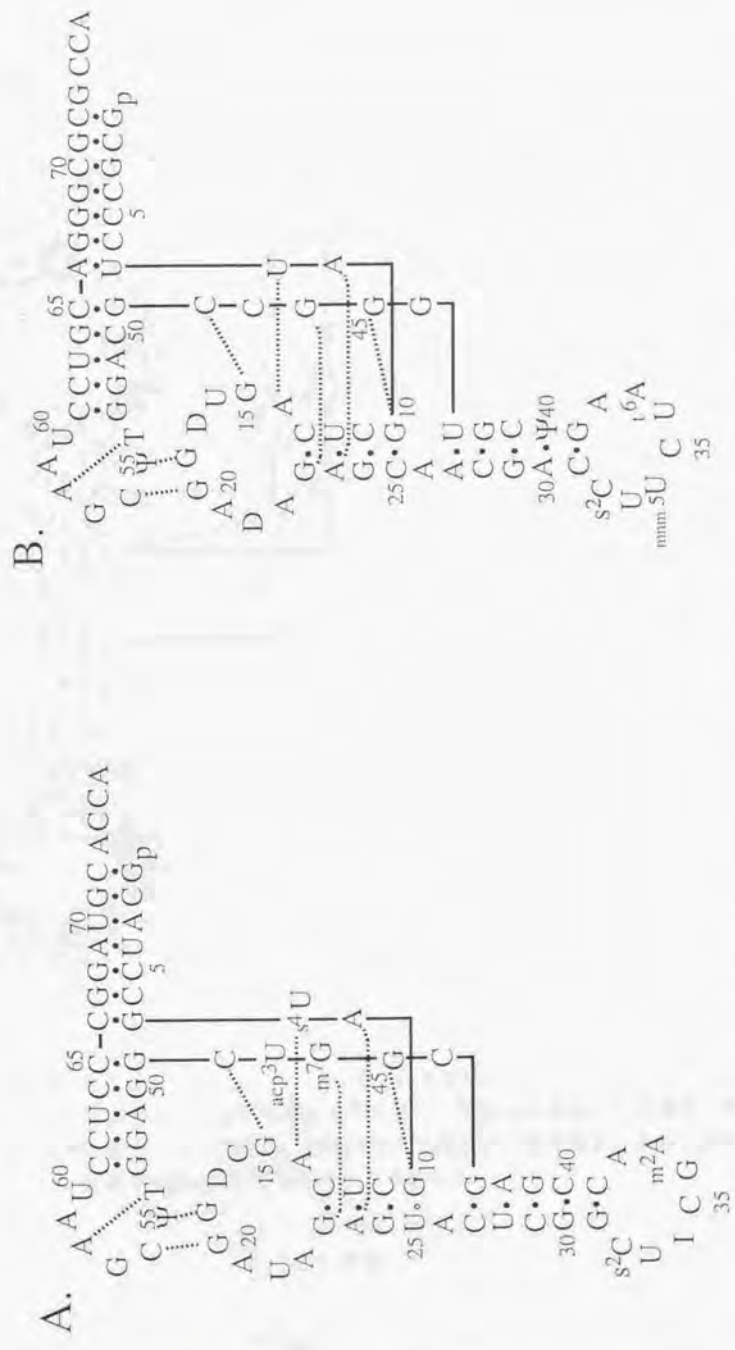


図3-8、tRNA<sup>Asp</sup> (A)、tRNA<sup>Arg</sup> (B)において形成されていると考えられる3次元塩基対を点線以示す。

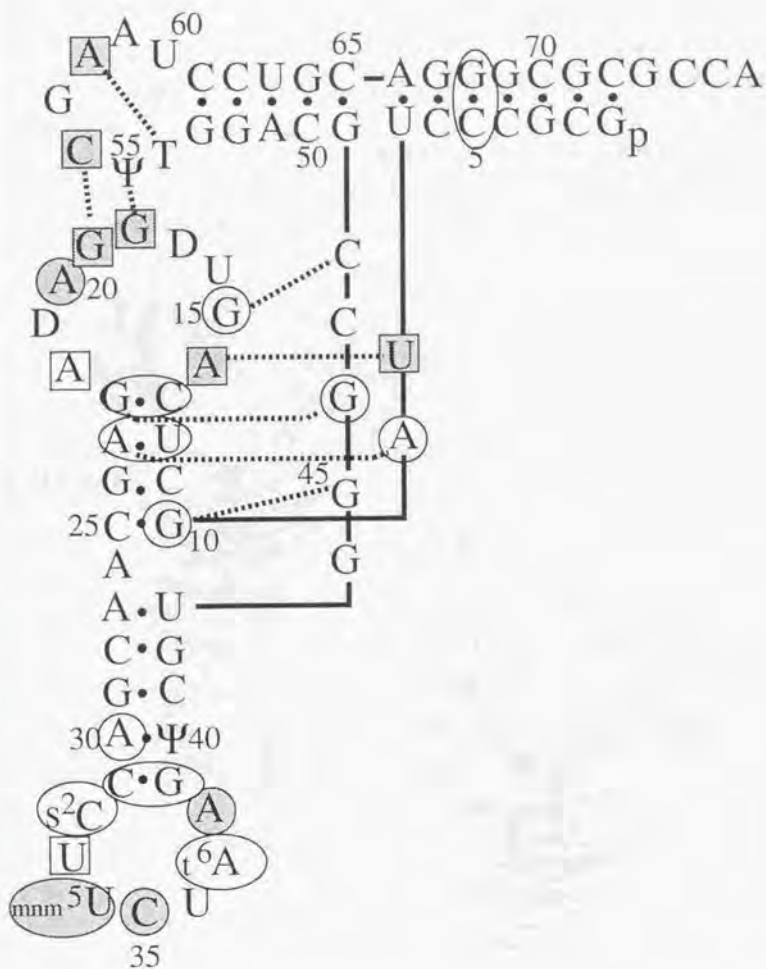


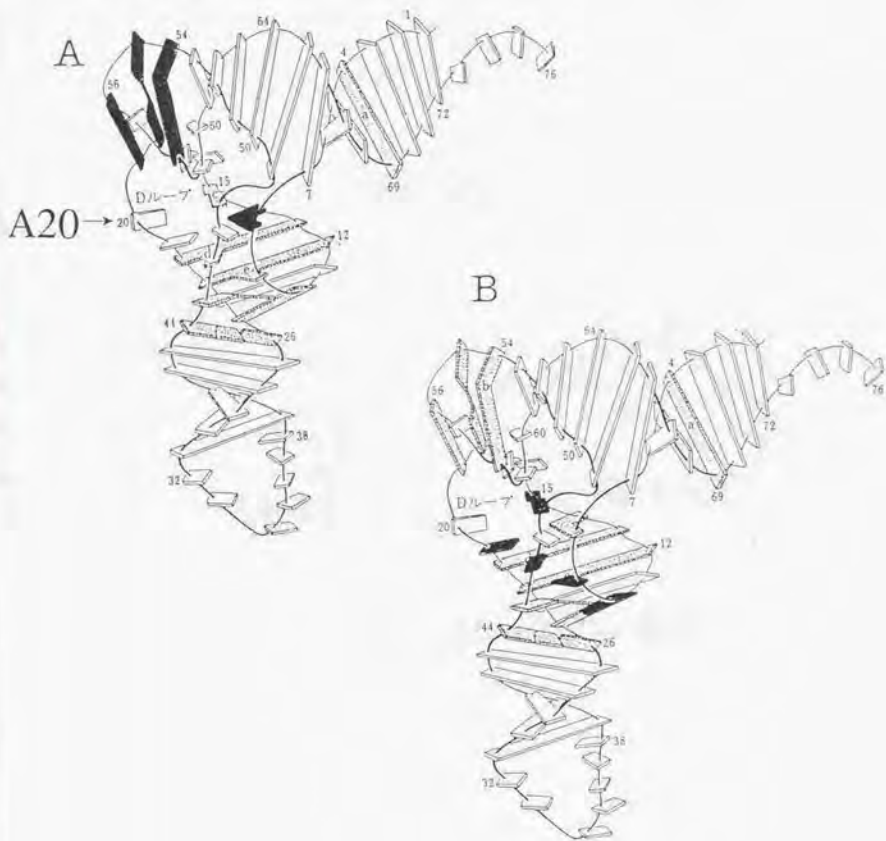
図3-9. tRNA<sup>Arg</sup>のアイデンティティー決定因子。

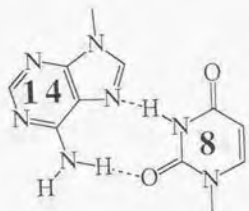
本研究で塩基置換を導入しアルギニン受容活性を調べた残基は、四角、または丸で囲んだ。四角で囲んだ残基は、保存残基である。活性に重要な残基にはシャドウイングを施した。

図3-10.

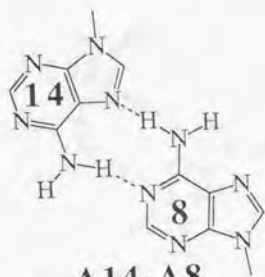
A) tRNA<sup>Arg</sup>のアルギニン受容活性に必要な共通構造を酵母tRNA<sup>Arg</sup>の3次構造 (Rich and RajBhandary, 1976) に重ね合わせて示す (黒塗りの部分)。

B) tRNA<sup>Arg</sup>のアルギニン受容活性に必須ではない共通構造を酵母tRNA<sup>Arg</sup>の3次構造 (Rich and RajBhandary, 1976) に重ね合わせて示す (黒塗りの部分)。

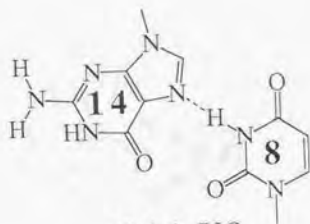




A14-U8

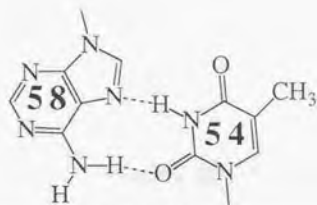


A14-A8

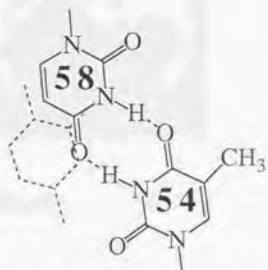


G14-U8

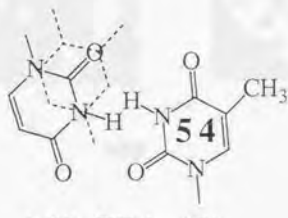
図3-11 8位と14位の間の塩基対



A58-T54



U58-T54(1)



A58-T54 (2)

図3-12 54位と58位間の塩基対

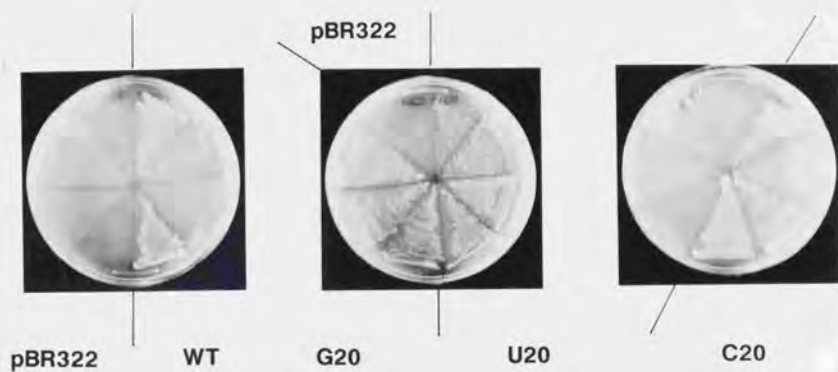


図3-13. A20をU, C, Gに置換したtRNA<sup>Arg</sup>の遺伝子はpBR322に挿入してSF151に導入した後, アンピシリン (50  $\mu$ g/ml), チミン (50  $\mu$ g/ml) を含むLBアガー上で, 42°Cで24時間培養した. 同様にpBR322, 野生型argU遺伝子を含むpDM1 (WT) をSF151に導入し培養した.



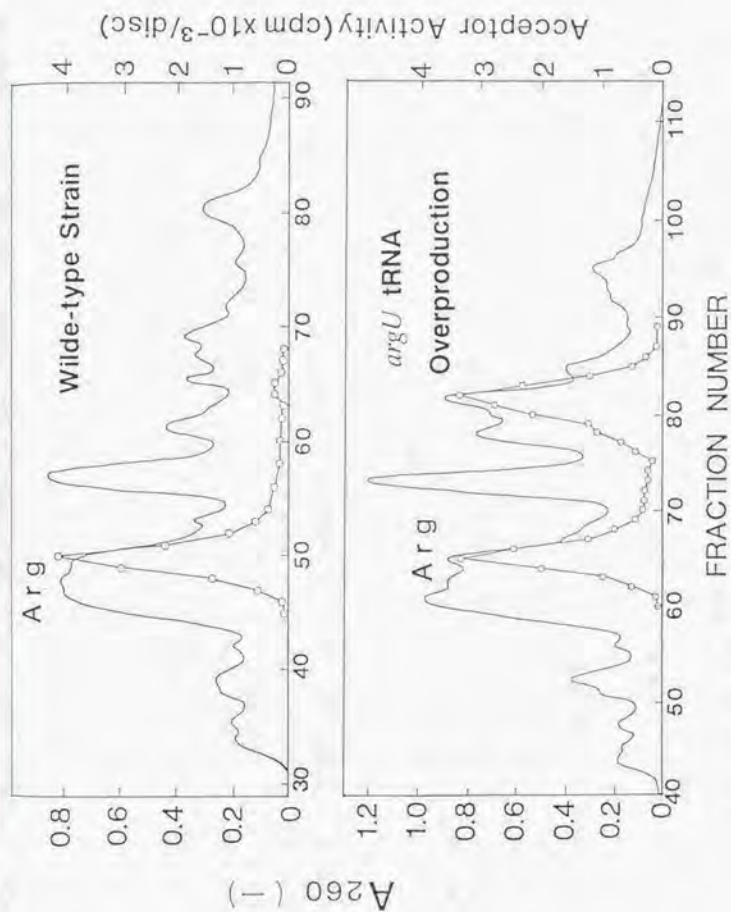


図3-14. tRNA<sup>Arg</sup>(WT)の大量発現。

PBR322 (上), またはPDM1 (下) によって形質転換したMV1184株をアンピシリン (50  $\mu$ g/ml) を含むLB培地で一晚培養した後, tRNAを抽出してハイドロキシアパタイト・カラム (HA-1000) を用いたHPLCによって分離した, 各フラクションのアルギニン受容能を測定した。

	1	10	20	20a	25	30	35
tRNA <sup>Met</sup> <sub>or</sub>	GCAUCCG	s <sup>11</sup> U A GCUCAGCDGGA	U	AGAGUAUCUCGG	s <sup>2</sup> C UICG	m <sup>2</sup> A	
tRNA <sup>Leu</sup>	GCGCCCG	U A GCUCAGCDGGA	D	AGAGCGCUGCC	s <sup>2</sup> C UCCG	m <sup>2</sup> G	
tRNA <sup>Arg</sup>	GCGCCCU	U A GCUCAGUDGGA	D	AGAGCAACGAC	s <sup>2</sup> C UH <sup>*</sup> CU	t <sup>1</sup> A	
tRNA <sup>Pro</sup>	GCUCUCU	U A GUUAAA	GmGA	D AUAACGAGCCC	s <sup>2</sup> C UCCU	t <sup>1</sup> A	
T4 tRNA <sup>Arg</sup>	GUCCCGC	U G GUGUAAU	GmGA	D AGCAUACGAUC	C	UNCU	A

	38	40	50	55	60	70	75
tRNA <sup>Met</sup> <sub>or</sub>	ACCGAGCG	m <sup>2</sup> G acp <sup>21</sup>	CGGAGGT	ψCGAAU	CCUCCCGGAUG	GCACCA	
tRNA <sup>Leu</sup>	AGGCAGAG	m <sup>2</sup> G U	CUCAGGT	ψCGAAU	CCUGUCGGCGCGCCA		
tRNA <sup>Arg</sup>	AGψCGUGG	G C	CGCAGGT	ψCGAAU	CCUGCAGGGCGCGCCA		
tRNA <sup>Pro</sup>	AGGGCUAA	U	UGCAGGT	ψCGAAU	CCUGCAGGGGACACCA		
T4 tRNA <sup>Arg</sup>	AGψUUGCG	G	UCCUGGT	ψCGAUCC	CCAGGGGGGAUACCA		

表3-1. 大腸菌, T4バクテリオファージのtRNA<sup>Arg</sup>のヌクレオチド配列 (Sprinzl et al., 1981). tRNA<sup>Arg</sup>のU\*<sub>34</sub>はmnn<sup>5</sup>U, T4 tRNA<sup>Arg</sup>のN<sub>34</sub>は未特定の修飾ウリジンである, 同じ種類の下線で示された部分はステム構造を形成している残基を示す.

表3-2. tRNA<sup>arg</sup>バリエントのin vivo, in vitroのアルギニン受容活性

	argU only	argU & argS	$k_{cat}(s^{-1})$	$K_m(\mu M)$	Loss of activity (x-fold)
mature			1.9	0.73	0.13
WT	+		1.0	2.9	1
			1.4*	2.7*	0.66
D loop					
A20U	-	+			
A20C	-	+			
A20G	-	+	$1.4 \times 10^{-3}$	2.7	680
$\Delta$ 20A	-	+			
20aUC	+				
D stem					
G10A			1.2	2.9	0.84
U12A23					
→12A23U			1.2	3.3	0.95
Anticodon loop					
C32G	+				
U33C	+				
U33A	+				
U33G	-	-	1.4*	1.3*	0.48
A34G			$4.9 \times 10^{-2}$	3.7	27
C35A			$9.3 \times 10^{-5}$	6.8	25000
A37U			1.2	1.2	0.35
A38U	-	-	$7.9 \times 10^{-3}$	5.0	220
A38C	+		$7.4 \times 10^{-2}$	10.8	50
A38G	-	-	$1.3 \times 10^{-3}$	6.5	1730
Anticodon stem					
A30U	+				
C31U	+				
C31G39					
→U31A39	+				
Acceptor stem					
G1A	-	-			
C5U	+				
G68A	-	+			
C5G68					
→U5A68	+				

\*印の反応速度定数はtRNA<sup>arg</sup>のT7転写物によりアッセイを行って得られたものである。T7転写物の調製は本論文3-3-6と同様である。PCR反応の鋳型にはpCL1に挿入されたargU遺伝子を用いた。

表3-3. 保存塩基を置換したtRNA<sup>Arg</sup>バリエントのin vivo, in vitroのアルギニン受容活性

	<u>argU</u> only	<u>argU</u> & <u>argS</u>	$k_{cat}(s^{-1})$	$K_m(\mu M)$	Loss of activity (x-fold)
WT	+		1.0	2.9	1
U8A	-	+			
A9G			1.2	3.0	0.86
D & T					
loop					
A14U	-	+			
A14C	-	+			
A14G	-	+			
G15A	+				
G18U	-	+			
G18A	-	+			
G19C			$1.0 \times 10^{-3}$	3.4	1170
C56G			$1.8 \times 10^{-3}$	1.1	210
G19C56					
→C19G56			0.22	1.1	1.7
A21U	+				
A21G	+				
A58U	-	+			
D stem					
G10A			1.2	2.9	0.84
U12A23					
→12A23U			1.2	3.3	0.95
C13G22					
→G13C22	+				
Variable region					
G46A	+	+			

表3-4. 保存塩基置換が3次元塩基対に与えられられる影響

塩基置換	3次元水素結合の数
U 8 A 14 → A 8 A 14	2 → 2 (図J-11)
U 8 G 14	2 → 1
A 9 - U 12 A 23 → G 9 - U 12 A 23	2 → 1
A 9 - A 12 U 23	2 → 1
G 46 - C 13 G 22 → A 46 - C 13 G 22	2 → 1
G 46 - G 13 C 22	2 → 0
G 45 - G 10 U 25 → G 45 - A 10 U 25	1 → 0
G 18 Ψ 55 → A 18 Ψ 55	1 → 0
T 54 A 58 → T 54 U 58	2 → 0 か 2 (図J-11)
G 15 C 48 → A 15 C 48	2 → 1 か 2

(参考図)

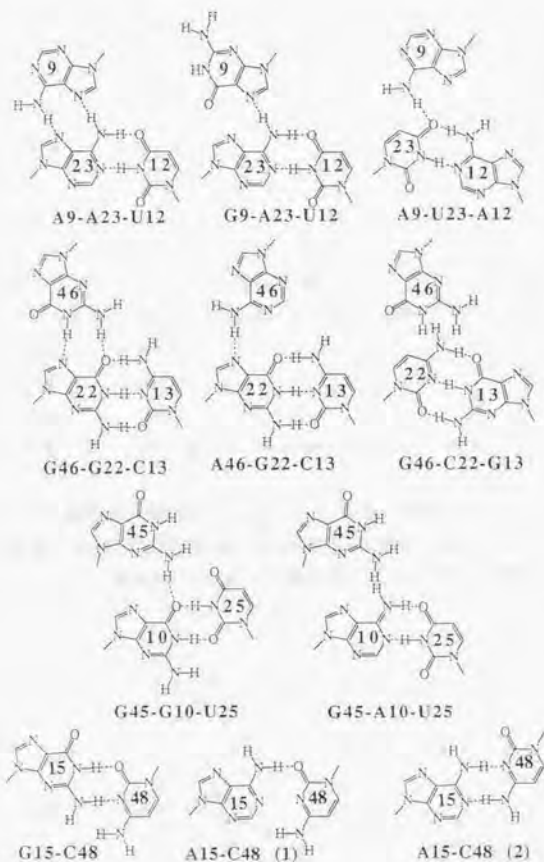


表3-5. ATP結合モチーフに基づいたアミノアシルtRNA合成酵素  
のクラス分け

クラスI

- グルタミン酸 ( $\alpha$ , V)
- グルタミン ( $\alpha$ , D [Rould et al., 1989])
- アルギニン ( $\alpha$ , D)
- バリン ( $\alpha$ , V [Vlassov et al., 1983] for yeast)
- イソロイシン ( $\alpha$ , D [Nreki et al., in press])
- ロイシン ( $\alpha$ , D [Dietrich et al., 1990])
- メチオニン ( $\alpha_2$ )
- チロシン ( $\alpha_2$ )
- トリプトファン ( $\alpha_2$ , V [Garret et al., 1984] for bovine liver)

クラスII

- グリシン ( $\alpha_2\beta_2$ )
- アラニン ( $\alpha_4$ )
- プロリン ( $\alpha_2$ )
- セリン ( $\alpha_2$ )
- トレオニン ( $\alpha_2$ , V [Theobald et al., 1988])
- アスパラギン酸 ( $\alpha_2$ , V [Romby et al., 1985] for yeast)
- アスパラギン ( $\alpha_2$ )
- ヒスチジン ( $\alpha_2$ )
- リシン ( $\alpha_2$ )
- フェニルアラニン ( $\alpha_2\beta_2$ , V [Vlassov et al., 1983])

○括弧内は、ARSの構成と、tRNAとの結合様式を示す。

$\alpha$ は単量体、 $\alpha_2$ はホモ二量体、 $\alpha_4$ はホモ四量体、 $\alpha_2\beta_2$ はヘテロ四量体である。VはtRNAのバリアブル領域側、DはDアーム側からの結合を示す。

表3-6. 大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> と tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Gly</sup> のヌクレオチド配列の比較

残基の位置	20	34	35	36	38	73
tRNA <sup>Arg</sup>	A	I, A, C, U	C	U	A	A, G
tRNA <sup>Cys</sup>	-	G	C	A	A	U
tRNA <sup>Trp</sup>	-	C	C	A	A	G
tRNA <sup>Ser</sup>	C	G	C	U	A	G
tRNA <sup>Gly</sup> (GCC)	-	G	C	C	A	U
tRNA <sup>Gly</sup> (CCC)	-	C	C	C	A	U
tRNA <sup>Gly</sup> (UCC)	C	U	C	C	A	U
tRNA <sup>Gly</sup>	-	U	C	C	A	U
Loss of arginine specificity*(x-fold)						4.3 × 10 <sup>4</sup>

\*ここで示す値は、A20の置換の効果は含めていない。G34, A36, C36, U73への置換によるアルギニン受容活性の低下はそれぞれ27倍(本研究), 385倍, 4.4倍, 4.2倍(Tamura et al., 1992)である。

tRNA<sup>Gly</sup>の後の( )内はアンチコドンを示す。

## 第4章 総合討論

### 4-1. 序

tRNA分子は、生体分子の中で最もありふれた分子の一つである。細胞を破碎してRNAを調製すると、大部分はリボソームRNAとtRNAである。そして、機能を発揮するために相互作用する分子種の多さもtRNAの特徴と言えるだろう。mRNA上のコドン、EF-Tu・GTP、ARSだけでなく、リボソーム、種々の修飾酵素、tRNAに特異的なリボヌクレアーゼ、3'末端の成熟に必要なプロセッシング酵素、CCA末端の修復酵素など、実に多彩である。tRNAが良く知られた「古典的」な分子であるにもかかわらず、最近になって、ようやくその機能構造の全貌が明かになりつつあるという状況には、tRNAの数多くの異なる生体分子と相互作用するという性格が関係しているだろう。それ以外にも、tRNAは、その機能に必須な種々の修飾ヌクレオシドを含んでいるために、遺伝子の塩基配列が決定しただけでは全構造が決定されたことにならず、転写後修飾を受けているヌクレオシド残基の特定と転写後修飾の化学構造の決定が必要とされるという事情もあった。tRNAは、アミノ酸特異性が異なっても、お互いに良く似た3次構造をとっていると考えられ (Ebel et al., 1973; Giegé et al., 1993), tRNAに共通の保存塩基は全体の26%を占める。転写後修飾はtRNAに構造上のバラエティーを与えていると言えるだろう。本研究(第3章)の結果から、tRNAの共通構造の役割について新しい視点が得られた。そこで、本章では、tRNAの共通構造と、tRNA分子種に特異的な構造のそれぞれの役割について考察する。また、tRNAの主要な機能であるコドン認識とアミノ酸受容活性のいずれも扱っているのが、本研究の特長である。これまで、これら2つの機能相互の関係について考察するための材料が乏しく、tRNAの機能を考える上で重要なテーマであるにもかかわらず、あまり議論されていない。本研究の結果は、このテーマについて重要な知見を含んでいると考えられるので、本章で考察を試みたい。

### 4-2. 転写後修飾の機能

転写後修飾は、お互いに良く似た3次構造を持つとされるtRNAに、特異的な構造を与えるという意味で、tRNA機能に重要な役割を果たしていると思像される。しかし、転写後修飾の役割が理解されてきたのは、漸く最近になってからである (Nishimura, 1979; Björk et al., 1987; Muramatsu et al., 1988; Perret et al., 1990)。転写後修飾の機能の1つは、第1章で詳細に



議論したように、コドン特異性の切り替えである、アンチコドン1字目のウリジン残基(U34)が $xo^sU34$ か、または $xm^s s^2U34$ ,  $xm^sUm34$ ,  $xm^sU34$ に転写後修飾されるかで、tRNAのコドン認識のパターンは切り替えられる。このことはミトコンドリアのtRNAのケースについて明瞭に見て取れるだろう、1, 2字目が共通の4つのコドンに対応するtRNAのU34は未修飾のままであるが、U34が $cmnm^sU34$ に転写後修飾されたtRNAは3字目がA, Gのコドンのみに対応する(Heckman et al., 1980; Sibling et al., 1986; Martin et al., 1990)(表4-1)。即ち、U34を $cmnm^sU34$ に修飾することで、U34の'wobbling'を制限し、1つのコドン・ボックスを2種類のアミノ酸に分割するというパターンを作りだしている。ここで、 $cmnm^sU34$ の「制限された'wobbling'」の性質は、第1章で論じたように $cmnm^sU$ 残基の'intrinsic'なコンホメーション特性に基づくと考えられる。

このようなコドン特異性の切り替えはウリジンの修飾に限らない。大腸菌において、CGU, CGC, CGAの3つのアルギニン・コドンはtRNA $^{Arg}$ によって認識されるが、tRNA $^{Arg}$ のアンチコドン1字目のAはイノシン(I)に転写後修飾されている(Murao et al., 1972)。I34がコドン3字目としてU, C, Aを認識するメカニズムは十分に解明されていないが、図4-1のようにアデノシンの6位のアミノ基がカルボニル基に置換されることが必要がある。すなわち、A34からI34の転写後修飾によって初めてtRNA $^{Arg}$ は、コドン3字目としてU, C, Aの3つを認識できるようになる。また、大腸菌tRNA $^{Leu}$ のアンチコドン1字目のCはリシジン(L)に転写後修飾されることでコドン3字目としてAを認識できるようになるが、C34からL34への転写後修飾は同時にtRNA $^{Leu}$ のアミノ酸特異性をメチオニンからイソロイシンへ変換する(Muramatsu et al., 1988)。すなわち、C34からL34への転写後修飾は、認識するコドンをAUGからAUAに変えるだけでなく、アミノ酸特異性をも切り替えている。

tRNA $^{Leu}$ の例に留まらず、転写後修飾は、アイデンティティー決定因子を作り出したり、'negative'なアイデンティティー決定因子(negative determinant)を形成したりすることで、tRNAのアミノ酸特異性に寄与していることが明らかになって来た。大腸菌tRNA $^{Ile}$ の37位のAからt $^sA$ への転写後修飾はイソロイシン受容活性に大きく寄与している(Nureki et al., 1994)。また、大腸菌tRNA $^{Gln}$ (Sylvers et al., 1993)やtRNA $^{Lys}$ (Tamura et al., 1992)でも転写後修飾(おそらくアンチコドン1字目の $mnm^sU$ )がアミノ酸の受容能に寄与している。また、酵母のtRNA $^{Arg}$ の転写後修飾はアルギニンのミスチャージを防ぐために必須である(Perret et

al., 1990). これら34位, 37位の転写後修飾は, 同時にコドン特異性の決定にも重要な役割を果たしている (Nishimura, 1979).

以上のように, 転写後修飾はtRNA分子種に特異的な構造を与えることでtRNAの特異性に寄与しているという図式は一般的に成り立つようだ. さらに, 上述のように, 1つの転写後修飾がコドン認識とアミノ酸特異性の両方に寄与していることがあり, tRNAの異なる2つの機能が同一の構造的基盤を持つケースのあることを示している.

#### 4-3. コドン認識とtRNA identity

tRNAの異なる2つの機能が同一の構造的基盤を持つことによって, 何らかの機能的, 構造的な制約が生じるだろうか? ARSの主要な認識部位であるアンチコドンの構造は, 同時にコドン認識に基づく制約を受ける. このために, tRNA<sup>Arg</sup>のケースのように, 主要なアイデンティティ決定因子が他のtRNA分子種にも存在する. そのための, ミスチャージ防止のメカニズムについては, 既に本論文3-3-4でも議論した, ここでは, 逆に, tRNA<sup>Arg</sup>のコドン認識が, identity決定のメカニズムによって制約されている可能性について論じる.

アルギニンは6つのコドンを持つ. コドンAGA, AGGは, セリンのコドンAGU, AGCと1つの「コドン・ボックス (1, 2字目が共通の4つのコドンをもとめたもの)」を共有している. よって, アンチコドン1字目に「強く制限された 'wobbling'」を示す修飾ウリジンを持つtRNA(tRNA<sup>Arg</sup>)がコドンAGA, AGGに対応する以外のコドン認識のパターンは考えられない. コドンAGGを効率良く認識するために, C34を持つtRNA<sup>Arg</sup>が加わるので, グルタミン酸のコドンの読み取りと同じパターンである (図4-2). これに対して, コドンCGU, CGC, CGA, CGGを含むコドン・ボックスにおけるコドン認識のパターンはいくつか考えられる. パターン1は実際の大腸菌のケースのように, アンチコドン1字目のイノシン (I) が, コドン3字目のU, C, Aを認識し, C34がGを認識するパターン (図4-3A). このようなコドン認識は, 大腸菌ではアルギニンの系のみである. パターン2は, 「拡張された 'wobbling'」を示すxo<sup>5</sup>U34がU, A, Gを認識し, G34がCを認識するパターン (図4-3B). これは, アラニン・コドンなどの認識パターンである. パターン3は, G34がコドン3字目のU, Cを認識し, 「強く制限された 'wobbling'」を示す修飾ウリジンがAを認識し, C34がGを認識するパターンである (図4-3C). 枯草菌tRNA<sup>Arg</sup>の1つは, アンチコドン1字目にcmm<sup>5</sup>Uを持つ (Sprinzl et al., 1991) ので, グリシン・コドンの読み取

りられ方はこのパターンだろうと考えられる。*Halobacterium volcanii*では、 $tRNA^{Arg}$ アイソアクセプターのアンチコドンの構成 (Gupta, 1984) から考えて、実際にパターン3によってCGN (NはU, C, A, G) の4つのアルギニン・コドンは認識されていると考えられる。

大腸菌で、アルギニン・コドンがパターン1によって読み取られていることには何か理由があるのだろうか? 本論文3-3-5で論じたように、G34は 大腸菌 ArgRS に対する 'negative determinant' である、パターン2, 3のいずれにもG34を持つ  $tRNA^{Arg}$  が登場するので、パターン1に落ち着いたと見ることができる。すなわち、 $tRNA^{Arg}$  identity がアンチコドンの構造にも依存しているために、コドン認識に制約をあたえるが、転写後修飾によってこの制約が解消されているという構図が浮かび上がってくる。原核生物ではI34はアルギニンの系にのみ現れるが、真核生物では  $tRNA^{Arg}$ ,  $tRNA^{Val}$  などにも見出されるようになる (Sprinzl et al., 1991) ので、I34への転写後修飾は、アルギニンの系から始まって他の系にも広がったと想像することもできる。このアルギニンのケースからは、進化の過程で、 $tRNA$  identity とコドン認識が相互に関係してきたことが示唆され、このような観点はARSや修飾酵素の起源や進化を考える上で、今後重要になるだろう。

#### 4-4. アンチコドン・ループの構造がコドン認識に果たす役割

ほとんどの細胞質  $tRNA$  に共通の保存塩基は、 $tRNA$  を構成する80ヌクレオチドの内の26%をも占めているが、このような共通構造の機能が解明されている例は少ない。T54 $\Psi$ 55C56配列や、3'末端のCCA配列はリボソームRNAとの相互作用に係わっているとされている (Helk and Sprinzl, 1985; Maozed and Noller, 1991)。また、T54 $\Psi$ 55C56配列を含めて多くの保存塩基は  $tRNA$  の3次構造を維持することに関与しているが (Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974)、本研究では、保存塩基であるU8, A14, G18, A21, A58のそれぞれの置換が、 $tRNA$  のアミノアシル化反応後のタンパク質合成における機能を直ちには阻害しないことを示した。また、U33からA33, C33への置換は  $tRNA^{Arg}$  の機能を障害しなかったが、興味深いことにU33Gの置換だけは、アミノアシル化後のタンパク質合成に影響を与えていると考えられる。このようなリボソームと  $tRNA$  の相互作用に係わる保存塩基の機能についての解明はこれからの課題だろう。一方、この項、および次項で議論するように、 $tRNA$  の共通構造は、 $tRNA$  分子種によらない共通の機能に関与しているだけでなく、 $tRNA$  の特異性 (コドン認識やアミノ酸受容活性) にも寄与している。

tRNAのコドン認識においては、tRNAのアンチコドン部分がコドンと直接相互作用するので、アンチコドン部分の構造がコドンに対して特異性を持つと考えられる。これまでに、大腸菌 (Komine et al., 1990)、マイコプラズマ (Andachi et al., 1989; Tanaka et al., 1991) では全tRNA分子種が明らかにされているので、tRNAとコドンの対応関係もほぼ確実に推測された。そこでは、従来から想定されてきたように、アンチコドン2、3字目とコドン1、2字目との特異的な対応は、完全にワトソン・クリック型塩基対に基づいている。これに対して、アンチコドン1字目とコドン3字目は「非ワトソン・クリック塩基対」( 'wobble' 塩基対) を形成するケースがあるので、このような塩基対形成が分子的構造レベルで説明される必要があった。このメカニズムについては、特に重要なアンチコドン1字目のウリジンのケースについて第1章で詳細に議論したが、再びコドン・アンチコドン相互作用の分子構造的基盤について考察したい。

アンチコドン1字目の 'wobbling' がtRNAの顕著な性質であるにしてもコドン・アンチコドン相互作用の大部分のケースで、1字目から3字目まで全てワトソン・クリック型塩基対が形成されている。そして、コドン・アンチコドンは1つのスタンダードなA-RNA型二重らせんを形成する。このようなコドン・アンチコドン二重らせんの安定性は、リボソームの 'decoding center' においてリボソームRNAと相互作用することでチェックされると考えられている (Dahlberg, 1989)。mRNA上のコドンの3残基全てが、リボソーム上でスタンダードなA-RNA型コンホメーションをとっていることは未だ実証されていないが、tRNAでは、アンチコドンからアンチコドン・ステムまで塩基間のスタッキングが連続し、アンチコドン部分はA-RNA型らせん構造をとっていることが結晶構造の解析により示されている (図4-4, Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974)。アンチコドン・ループは33位とアンチコドン1字目 (34位) との間で「Uターン」しているので、34位の残基は5'側の残基とはスタッキングせず5'側の空間は空いている (図4-4)。このために34位の残基のA-RNA型コンホメーションは十分に安定ではなく、34位の残基の 'wobbling' を可能にしている。xm<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U34, xm<sup>s</sup>Um34, xm<sup>s</sup>U34などの転写後修飾は、34位のウリジン残基のA-RNAコンホメーションを安定化し、アンチコドン部分のA型らせん構造の安定化に寄与していると考えられる (Yokoyama et al., 1979; Agris, 1991; Kawai et al., 1992)。河合剛太博士 (現 東京大学工学部工業化学科助手) らにより、水溶液中のtRNA分子のxm<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U34, xm<sup>s</sup>U34のコンホメーションが解析され、実際にこれらの残基がtRNA分子中で安定にA-RNA型コンホメーションをとっていることが明らかにな

っている(Kawai, 1989). 一方, U34はC2'-endo形をとることによって, 隣接する2つのコドン・アンチコドン塩基対に干渉することなく, コドン3字目のUと安定な塩基対を形成できることが示された(Yokoyama et al., 1985). 隣接する35位の残基とのスタッキングにより, U34においてはC3'-endo形が優勢だが, U34から $xo^5U34$ への転写後修飾はC2'-endoコンマホマーの割合を増やすので, そのために $xo^5U34$ はC3'-endo形に加えてC2'-endo形もとることができる. 実際にこのことはtRNA分子中の $xo^5U34$ のコンホメーションの解析によって確かめられている(Kawai, 1989).

以上のように, 33位の3'側で'U'ターンして34位からはスタンダードなA-RNA型らせん構造をとるというアンチコドン・ループの基本構造は, コドン・アンチコドン相互作用に必須である. この意味で, tRNAのコドン認識は, アンチコドン・ループとコドンと相互作用であるとも考えられる. 実際, 37位, 38位の転写後修飾(Bjork et al., 1987), 32位の残基(Lustig et al., 1993)はtRNAのコドン特異性に重要な寄与をしている. また, 33位直後の'U'ターン構造はアンチコドン1字目の位置を決めているとも考えられ, 'wobbling'の性質にも決定的に重要である. ミトコンドリアtRNAを含めてほとんど全てのtRNAの33位には, スタッキングの弱いウリジンが存在することは, このような'U'ターン構造の形成を保障しているのかも知れない. また, 33位のリボースと $xm^5U34$ の5位の置換基との間の水素結合は'U'ターン構造を安定化する役割を果たしていると考えられる(Berman et al., 1978).

大腸菌ArgRSは, GlnRSなどとは異なり, アンチコドン・ループの'U'ターンより3'側の部分のみを認識していることから(本論文3-3-4), tRNA<sup>Arg</sup>とArgRSとの特異的相互作用にも'U'ターン構造が重要であることが示唆される.

東京工業大学生命理工学部生命理学科の関根光雄博士のグループでは, ジヌクレオシド・モノリン酸で, 5'側の残基のリボースの2'位と3'側残基のウラシル環を共有結合により架橋することに成功している. このような, 'U'ターン・ユニットをRNAを導入し, RNAの機能構造を解析することが可能になりつつある.

#### 4-5. 大腸菌ArgRSによるアイデンティティー決定因子の認識のメカニズム

保存塩基はtRNA分子種を識別するための目印にならないので, アイデンティティー決定因子の同定を行った研究では, 少数例(酵母tRNA<sup>Phe</sup>, 大

腸菌 tRNA<sup>110</sup>) を除くと、保存塩基に塩基置換を導入したときの影響についてはほとんど調べられていない。酵母 tRNA<sup>Phe</sup> では、保存塩基を置換しても3次元塩基対が形成される場合には活性への影響はわずかであり、フェニルアラニル tRNA 合成酵素がこれらの保存塩基と直接には相互作用していないと結論されている (Sampson et al., 1990)。一方、大腸菌 tRNA<sup>110</sup> では興味深いことに、活性に寄与する塩基対と寄与しない塩基対が区別されている (Nureki et al., 1994)。IleRS と複合体を形成したときに、tRNA<sup>110</sup> に全体的な構造変化が生じるが、活性に必要な塩基対は変化した tRNA<sup>110</sup> の構造を保つために必要であるらしい (Nureki et al., 1994)。しかし、必ずしも IleRS がこれらの構造に結合していることを意味しない。これに対して大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> で特徴的なことは、ArgRS が特定の共通構造に結合していると考えられることと、そのことが ArgRS によるアイデンティティー決定因子の認識に係わっていると推測されることである。

大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> は 'variable pocket' 内にアイデンティティー決定因子 A20 を持つ。tRNA の20位は、Dループ内の保存塩基 G19、A21 に挟まれた領域に存在し、この領域の塩基構成、残基数は tRNA 分子種により様々である (Sprinzl et al., 1991)。これに対して、多くのアイデンティティー決定因子は、tRNA のL字構造の内側に分布している (Rich and Schimmel, 1977; Normanly and Abelson, 1989; Schulman, 1991; Giegé et al., 1993)。tRNA のL字の内側を構成しているアクセプター、アンチコドン・アームはどの細胞質 tRNA でも基本的に同じ構造をとっているため、多くのアイデンティティー決定因子は、このような共通構造の中に位置を占めていることになる。このことにより、ARS がアイデンティティー決定因子の位置を正しく認識することが可能になっていると考えられる。それでは、tRNA<sup>Arg</sup> の A20 のように、tRNA のL字型構造の側面の可変領域に存在するアイデンティティー決定因子の位置はどのようにして認識されているのだろうか? 第3章で、U8・A14、G18・Ψ55、G19・C56、T54・A58 の4つの塩基対がアルギニン受容活性に必須であることを示した。G18・Ψ55、G19・C56、T54・A58 の3つの塩基対はお互いにスタッキングして、tRNA の「コア」領域を形成しているが、A20 は、このような「コア」領域の直下に存在している。そして、U8・A14 は、A20 と正対する位置を占めている (図3-10A)。このような分布から考えて、ArgRS が「コア」領域、および U8・A14 塩基対の近傍に結合することによって、A20 の位置を認識しているというモデルが考えられる。このようなモデルは、ARS・tRNA 相互作用としては全く新しいタイプのものである。

大腸菌および酵母 tRNA<sup>Phe</sup> (Peterson and Uhlenbeck, 1992; Sampson et al., 1992) も 20 位にアイデンティティー決定因子を持つ。酵母 tRNA<sup>Phe</sup> において保存塩基の置換が活性に与える影響を調べた報告 (Sampson et al., 1990) を検討してみると、活性を 1/5 以下に低下させる塩基置換は G18, G19, A14, T54 の置換であることが分かった。これらの保存塩基が酵母 tRNA<sup>Phe</sup> においても、20 位のアイデンティティー決定因子の認識に寄与している可能性が考えられる。このように、大腸菌 tRNA<sup>Arg</sup> 以外の系でも、tRNA の特定の共通構造が特定のアイデンティティー決定因子の位置を示す「座標」として機能しているというモデルが有効である可能性が出てきた。

A20 は、今までのところ酵母をのぞく全ての生物種の細胞質 tRNA<sup>Arg</sup> に共通しており (McClain and Foss, 1988b)、真核生物でも tRNA<sup>Arg</sup> のアイデンティティー決定因子である可能性がある。しかし、多くの真核生物のイニシエーター tRNA (tRNA<sup>Met</sup>) も A20 を持つ (Sprinzl et al., 1991)。ところが、tRNA<sup>Met</sup> では、T54Ψ55 ではなく A54U55 の配列を持つことが特徴であり、最近の結晶構造解析で示されたように、「コア」領域の構造が通常の tRNA とは少し異なっている (Basavappa and Sigler, 1991)。特に、A20 が T ループに頭を突っこんだようになって、57 位、59 位、60 位の塩基と水素結合を形成している (図 4-5)。大腸菌では 59 位の置換はアルギニン受容能に影響しない (McClain and Foss, 1988b) ので、tRNA<sup>Arg</sup> の A20 は、むしろ酵母 tRNA<sup>Phe</sup> の G20 と同様に、まわりの残基とは相互作用していないように考えられる。よって、ArgRS が、tRNA<sup>Met</sup> の特徴的な T・D ループ会合領域の構造と tRNA<sup>Arg</sup> の通常の構造とを識別している可能性が考えられる。これが実証されれば、tRNA の共通構造が tRNA 分子種の識別に寄与し得るという例になるだろう。

#### 4-6. 今後の展望

tRNA 分子は、それ自身が触媒機能を持つ訳ではなく、コドン特異性、アミノ酸特異性によってアダプター分子としての役割を果たしている。このために、生体分子の特異性について考える上で良い対象である。分子の特異性は、古典的には鍵と鍵穴に例えられるが、本研究によっても明らかのように、そのような古典的なイメージでは分子の特異性を十分に説明することはできない。その理由の 1 つは、分子の「動的構造」だが、もう 1 つは、特異性がシステムによって保障されているからだと考えている。このことは、tRNA と ARS の特異的相互作用の考察を通じて明瞭になってきた。tRNA・ARS 相互作用においては、'positive' で 'productive' な相互作用だけでなく、'nega-

tive'で'nonproductive'な相互作用も重要であった。即ち、'negative determinant'のように積極的にミスチャージを抑えるメカニズムが存在している。このことは、本研究のアルギニンの系で明瞭に理解できるだろう。本研究では、'negative'な相互作用も含めて、全体像がほぼ想像できるところまで tRNA<sup>Arg</sup> identity 決定のメカニズムが解明できたと考えている。このことは、ArgRSや、tRNA<sup>Arg</sup>の特異性がin vivoで改変できるかという次の課題に導く。既に存在する20種のARS-tRNA相互作用に、21番目のARS-tRNA相互作用を付け加えることは可能だろうか？tRNAに塩基置換を導入すると、1種類以上のノンコグネートなARSによってミスチャージされる可能性が生じるし、ARSを改変したときには、1種類以上のノンコグネートなtRNA分子種を認識するようになる可能性があるだろう。要するに認識が「甘く」なる可能性が大きく、そのような「緩んだ」特異性のARSやtRNAは、既にいくつか報告されている(Shimura et al., 1972; Miller et al., 1991; Schmitt et al., 1993)。生体内では、「クロスする」相互作用が排除されることで、分子間の特異性が保障されている。このような特異性が始めから存在していたとは考えにくく、分子の特異性は生物の進化の産物であるという視点が必要になるだろう。最近になり、「分子進化工学」という用語も使われるが、そのような手法によって、分子の特異性が改変されるだけでなく、分子の特異性についての理解も深まると期待される。

tRNAのコドン認識については、リボソームの'decoding center'で何が起きているかという問題に取り組むべき時期が来ているようだ。tRNAのアンチコドン・ループはmRNAとコドン・アンチコドン相互作用をするだけでなく、16S RNAの形成する'decoding center'とも相互作用する(Dahlberg, 1989)。そして、コドンと塩基対を形成したアンチコドン・ループと'decoding center'との相互作用は、グループI・イントロンにおけるスプライス部位とコア構造との相互作用と類似していることが指摘されている(Davies et al., 1993; Ahsen and Noller, 1993)。即ち、不安定な二重鎖RNAを排除して、安定な二重鎖のみ認識するメカニズムが、'decoding center'とグループIイントロン・コアとの間で共通ではないかと想像されている。このような識別の厳しさ、または緩さは、コドン3字目とアンチコドン1字目の'wobble'塩基対がどの程度排除され、または認識されるかに係わっている。このように、コドン認識の現場は、tRNA・mRNA・'decoding center'の複合体の上であり、これら分子間の相互作用は、生体にとって都合の良い効率と正確さでタンパク質合成が進行するようにチューニングされていると考えられる。もし、チューニングが厳し過ぎたならば、'wobble'塩基対が形成され



る余地がなかったかも知れず、逆に緩すぎれば 'two-out-of-three' で全ての  
コドンが認識されていたかも知れない。

修飾酵素とARSとの関係も、本研究で提起された問題の1つである。本論  
文4-3.で考察したように、tRNA<sup>Arg</sup> identityと転写後修飾(I34)による  
コドン認識制御は相互に関係している。このために、ArgRSとI34の修飾酵素  
は、直接的ではないにしても進化の過程で相手に影響を与えた可能性がある。  
即ち、G34がArgRSの 'negative determinant' であることと、A34がI34に  
転写後修飾されることは、現在のシステムのように両方存在すると合目的だ  
が、進化の過程でも同時に登場したのだろうか？ また、ARSと修飾酵素が  
tRNAの同じ部位を認識していることがあるので、両者の間に共通の認識の  
メカニズムがあるかどうかは興味深い。このことは、最終的にはRNAとタン  
パク質との相互作用において少数の基本的なモチーフが存在するのかわという問  
題に行き着くが、とりあえずはtRNAと修飾酵素、ARSとの相互作用は今  
や詳細に解析することが可能になりつつある。基本的なモチーフを探究するこ  
とで、ARSと修飾酵素の起源がどの程度重なっているのかについても明らか  
になっていくだろう。

Anticodon  
1st Letter

Codon  
3rd Letter

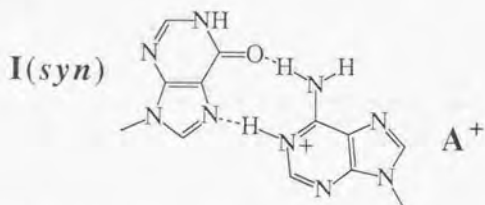
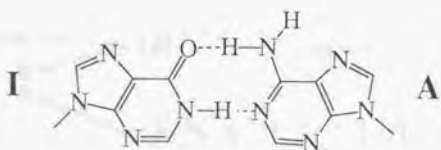
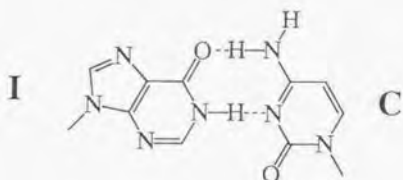
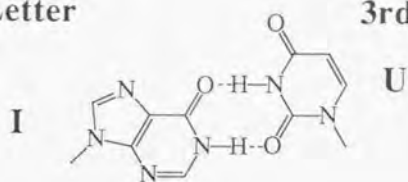


図4-1. アンチコドン1字目のイノシン残基とコドン3字目との塩基対。  
コドン3字目のAの認識については2通り考えられる。

Serine  
Codons

AGU
AGC
AGA
AGG

Arginine  
Codons

tRNA<sub>4</sub><sup>Arg</sup> (mmm<sup>5</sup>U-C-U)  
tRNA<sub>5</sub><sup>Arg</sup> (C-C-U)

図4-2. アルギニンとセリンのコドン・ボックスAGNの読み分け

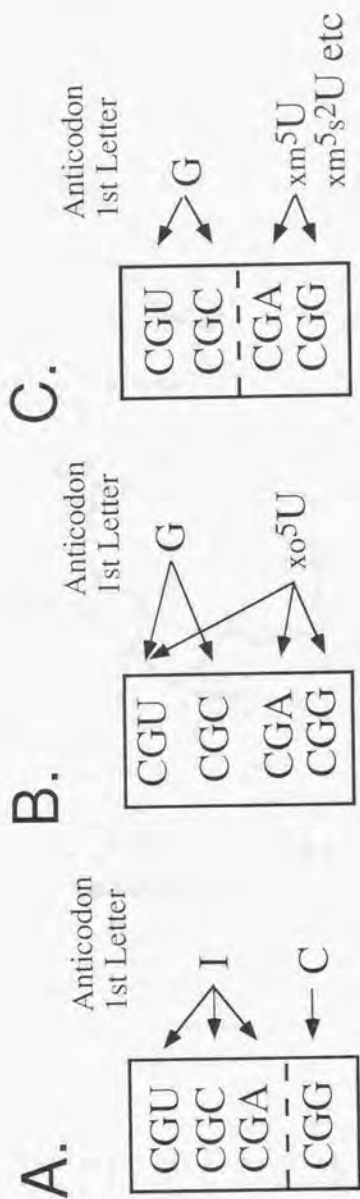


図4-3. アルギニンのコドン・ボックスCGNの読み分け

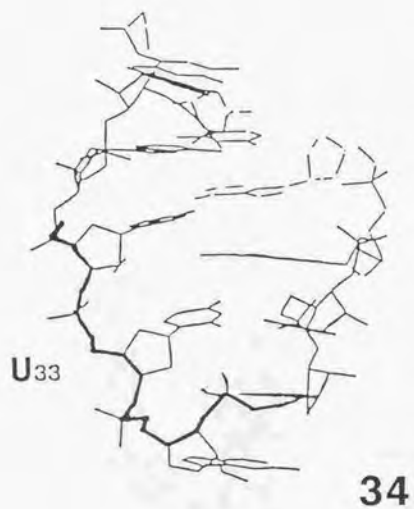


図 4-4. アンチコドン・ループの構造  
(座標はQuigleyら [1975] より)

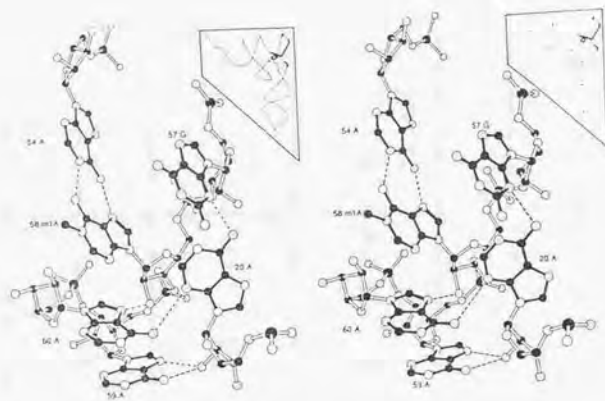


図4-5. 酵母イニシエーターtRNAのA20付近の構造  
(Basavappa and Sigler, 1991)

表4-1. ミトコンドリアtRNAのアンチコドン1字目のウリジンの  
転写後修飾 (Heckman et al., 1980; Sibley et al., 1986; Martin  
et al., 1990) .

Phe	U	Ser	Tyr	Cys
cmnm <sup>s</sup> U Leu			Stop	cmnm <sup>s</sup> U Trp
Leu	U	Pro	His	Arg
			Gln	
Ile	U	Thr	Asn	Ser
Met			cmnm <sup>s</sup> U Lys	cmnm <sup>s</sup> U Arg
Val		Ala	Asp	U
			Glu	

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、終始適切な御指導とあたたかい励ましを頂きました指導教官の横山茂之先生に深く感謝致します。本研究は、東京大学名誉教授 宮澤辰雄先生の御指導の下、学部卒業研究として始めました。宮澤先生からは、その後も貴重なご助言とご支援を頂きましたが、借しくも先生は昨春（平成5年4月）逝去されました。謹んで御冥福をお祈り致します。

横山研究室助手 武藤裕先生には、NMRによる解析、および実験全般にわたって大変にお世話になり、ありがとうございました。東京大学工学部工業化学科助手 河合剛太先生、同教授 渡辺公綱先生には、NMRによるコンホメーション解析や分子構造計算で適切な指導を下さり大変にお世話になりました。深く感謝致します。

5-メチルアミノメチルウリジンの合成や、構造解析における有意義なディスカッションをして頂きました東京工業大学 生命理工学部生命理学科 関根光雄先生に深く感謝致します。

argU10(Ts)変異株の解析では東京大学理学部助手 石丸聡先生、同助手 三瓶巖一先生、同教授 西郷薫先生、京都大学ウイルス研究所 永田俊夫先生、および電気通信大学教授 溝淵潔先生に貴重な御助言、御支援を頂きました。深く感謝致します。

宮澤研究室ならびに横山研究室の皆様、特に春木満博士（現 蛋白工学研究所研究員）、河野俊之博士（現 三菱化成生命研究所）、瀧木理博士、高井和幸氏、新美達也氏、渡部 曉氏には研究面での御指導、御支援、励ましを頂き、ありがとうございました。また、篠崎喜里子さんには研究生活全般にわたってお世話になり、ありがとうございました。

最後に、本研究をまとめる機会を与えて下さいました東京工業大学 生命理工学部生体機構学科教授 岡田典弘先生に深く感謝致します。



REFERENCES

- Aota, S. -I., Gojobori, T., Ishibashi, F., Maruyama, T. & Ikemura, T. (1988) Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data, *Nucleic Acids Res.* 16 (Suppl.), r315-r402.
- Agris, P. F. (1991) Wobble position modified nucleosides evolved to select transfer RNA codon recognition: a modified-wobble hypothesis, *Biochimie* 73, 1345-1349.
- Agris, P. F., Söll, D. & Seno, T. (1973) Biological function of 2-thiouridine in *Escherichia coli* glutamic acid transfer ribonucleic acid, *Biochemistry* 12, 4331-4337.
- Agris, P. F., Sierzputowska-Gracz, H., Smith, W., Malkierwicz, A., Sochacka, E & Nawrot, B. (1992) Thiolation of uridine carbon-2 restricts the motional dynamics of the transfer RNA wobble position nucleoside, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2652-2656.
- Altona, C. & Sundaralingam, M. (1973) Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 2333-2344.
- Amitsur, M., Levitz, R. & Kaufmann, G. (1987) Bacteriophage T4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA, *EMBO J.* 6, 2499-2503.
- Andachi, Y., Yamao, F., Muto, A. & Osawa, S. (1989) Codon recognition pattern as deduced from sequences of the complete set of transfer RNA species in *Mycoplasma capricolum*, *J. Mol. Biol.* 209, 37-54.
- Anderson, K. W. & Smith, J. D. (1972) Still more mutant

- transfer ribonucleic acids, *J. Mol. Biol.* 69, 349-356.
- Arai, K., Kawakami, M. & Kaziro, Y. (1972) Studies on polypeptide elongation factors from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 247, 7029-7034.
- Basavappa, R. & Sigler, P. (1991) The 3 Å crystal structure of yeast initiator tRNA: functional implications in initiator/elongator discrimination, *EMBO J.* 10, 3105-3111.
- Berman, H. M., Marcu, D., Narayanan, P., Fissekis, J. D., & Lipnick, R. L. (1978) Modified bases in tRNA: the structures of 5-carbamoylmethyl- and 5-carboxymethyl uridine, *Nucleic Acids Res.* 5, 893-903.
- Björk, G. R., Ericson, J. U., Gustafsson, C. E. D., Hargervall, T. G., Jönsson, Y. H. & Wikström, P. M. (1987) Transfer RNA modification, *Ann. Rev. Biochem.* 56, 263-287.
- Boutorin, A. S., Clarl, B. F. C., Ebel, J. -P. Kruse, T. A., Petersen, H. U., Remy, P. & Vassilenko, S. (1981) A study of the interaction of *Escherichia coli* elongation factor-Tu with aminoacyl-tRNAs by partial digestion with cobra venom ribonuclease, *J. Mol. Biol.* 152, 593-608.
- Carbon, J., David, H. & Studier, M. H. (1968) Thiobases in *Escherichia coli* transfer RNA: 2-thiocytosine and 5-methylaminomethyl-2-thiouracil, *Science* 161, 1146-1147.
- Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid, *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- Chen, K. -S., Peters, T. C. & Walker, J. R. (1990) A minor

- arginine tRNA mutant limits translation preferentially of a protein dependent on the cognate codon, *J. Bacteriol.* 172, 2504-2510.
- Chen, M. X., Bouquin, N., Norris, V., Casaregola, S., Seror, S. J. & Holland, I. B. (1991) A single base change in the acceptor stem of tRNA<sub>3</sub><sup>Leu</sup> confers resistance upon *Escherichia coli* to the calmodulin inhibitor, 48/80, *EMBO J.* 10, 3113-3122.
- Clewell, D. B. & Helinski, D. R. (1970) Existence of the colicinogenic factor-sex factor ColI<sub>b</sub>-P9 as a supercoiled circular DNA-protein relaxation complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 150-156.
- Cline, R. E., Fink, R. M. & Fink, K. (1959) Synthesis of 5-substituted pyrimidines via formaldehyde addition, *J. Am. Chem. Soc.* 81, 2521-2527.
- Crick, F. H. C. (1966) Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis, *J. Mol. Biol.* 19, 1548-1555.
- Dahlberg, A. E. (1989) The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis, *Cell* 57, 525-529.
- Davies, J., von Ahsen, U. & Schroeder, R. (1993) Antibiotics and the RNA world: a role for low-molecular-weight effectors in biochemical evolution?, in *The RNA World*, pp. 185-204, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Deutscher, M. P. (1985) *E. coli* RNases: making sense of alphabet soup, *Cell* 40, 731-732.
- Deutscher, M. P. (1993) Promiscuous exoribonucleases of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 175, 4577-4583.
- Dietrich, A., Romby, P., Marechal-Drouard, L. Gillemaut,

- P. & Giegé, R. (1990) Solution conformation of several free tRNA<sup>Leu</sup> species from bean, yeast and *Escherichia coli* and interaction of these tRNAs with bean cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase: a phosphate alkylation study with ethylnitrosourea, *Nucleic Acids Res.* 18, 2589-2597.
- Ebel, J. -P., Giegé, R., Bonnet, J., Kern, D., Befort, N., Bollack, C., Fasiolo, F., Gangloff, J. & Dirheimer, G. (1973) Factors determining the specificity of the tRNA aminoacylation reaction: non-absolute specificity of tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase recognition and particular importance of the maximal velocity, *Biochimie* 55, 547-557.
- Eriani, G., Dirheimer, G. & Gangloff, J. (1989) Isolation and characterization of the gene coding for *Escherichia coli* arginyl-tRNA synthetase, *Nucleic Acids Res.* 17, 5725-5736.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs, *Nature* 347, 203-206.
- Fischer, W., Doi, T., Ikehara, M., Ohtsuka, E. & Sprinzl, M. (1985) Interaction of methionine-specific tRNAs from *Escherichia coli* with immobilized elongation factor Tu, *FEBS Lett.* 192, 151-154.
- Gangloff, J., Joazara, R. & Dirheimer, G. (1983) Study of the interaction of yeast arginyl-tRNA synthetase with yeast tRNA<sub>2</sub><sup>Arg</sup> and tRNA<sub>3</sub><sup>Arg</sup> by partial digestions with cobra venom ribonuclease, *Eur. J. Biochem.* 132, 629-637.

- Garcia, G. M., Mar, P. K., Mullin, D. A., Walker, J. R. & Prather, N. E. (1986) The *E. coli dnaY* gene encodes an arginine transfer RNA, *Cell* 45, 453-459.
- Ghisotti, D., Zangrossi, S. & Sironi, G. (1983) An *Escherichia coli* gene required for bacteriophage P2- $\lambda$  interference, *J. Virol.* 48, 616-626.
- Ghosh, R. K. & Deutscher, M. P. (1978) Identification of an *E. coli* nuclease acting on structurally altered transfer RNA molecules, *J. Biol. Chem.* 253, 997-1000.
- Giegè, R., Puglisi, J. D. & Florentz, C. (1993) tRNA structure and aminoacylation efficiency, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45, 129-206.
- Grosjean, H. & Fiers, W. (1982). Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes, *Gene* 18, 199-209.
- Guoy, M. & Gautier, C. (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity, *Nucleic Acids Res.* 10, 7055-7074.
- Gupta, R. (1984) *Halobacterium volcanii* tRNAs; identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs, *J. Biol. Chem.* 259, 9461-9471.
- Haggård-Ljunquist, E., Barreiro, V., Calendar, R., Kurnit, D. M. & Cheng, H. (1989) The P2 *old* gene: sequence, transcription and translational control, *Gene* 85, 25-33.
- Haruki, M., Matsumoto, R., Hara-Yokoyama, M., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1990) Conformational changes of aminoacyl-tRNA and uncharged tRNA upon complex formation

- with polypeptide chain elongation factor Tu, *FEBS Lett.* 263, 361-364.
- Heckman, J. E., Sarnoff, J., Alzner-DeWeerd, B., Yin, S. & RajBhandary, U. (1980) Novel feature in the genetic code and codon reading patterns in *Neurospora crassa* mitochondria based on sequences of six mitochondrial tRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3159-3163.
- Helk, B. & Sprinzl, M. (1985) Interaction of unfolded tRNA with the 3'-terminal region of *E. coli* 16S ribosomal RNA, *Nucleic Acids Res.* 13, 6283-6298.
- Henson, J. M., Chu, H., Irwin, C. A. & Walker, J. R. (1979) Isolation and characterization of *dnaX* and *dnaY* temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli*, *Genetics* 92, 1041-1059.
- Hillen, W., Egert, E., Lindner, H. J. & Gassen, H. G. (1978a) Crystal and molecular structure of 2-thio-5-carboxymethyluridine and its methyl ester: helix terminator nucleosides in the first position of some anticodons, *Biochemistry* 17, 5314-5320.
- Hillen, W., Egert, E., Lindner, H. J. & Gassen, H. G. (1978b) Restriction or amplification of wobble recognition; the structure of 2-thio-5-methylaminomethyluridine and the interaction of odd uridines with the anticodon loop backbone, *FEBS Lett.* 94, 361-364.
- Horiuchi, T. & Nagata, T. (1973) Mutations affecting growth of the *Escherichia coli* cell under a condition of DNA polymerase I-deficiency, *Molec. Gen. Genet.* 123, 89-110.

- Horiuchi, T., Maki, H., Maruyama, M. & Sekiguchi, M. (1981) Identification of the *dnaQ* gene product and location of the structural gene for RNase H of *Escherichia coli* by cloning of the genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3770-3774.
- Hou, Y. -H. & Schimmel, P. (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA, *Nature* 333, 140-145.
- Ikeda, H. & Tomizawa, J. (1965) Transducing fragments in generalized transduction by phage P1; I. Molecular origin of the fragments, *J. Mol. Biol.* 14, 85-109.
- Ikemura, T. (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes, *J. Mol. Biol.* 146, 1-21.
- Ishikura, H., Yamada, Y. & Nishimura, S. (1971) Structure of serine tRNA from *Escherichia coli* *Biochim. Biophys. Acta* 228, 471-481.
- Jahn, M., Rogers, M. J. & Söll, D. (1991) Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA<sup>Gln</sup> are major recognition elements for *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase, *Nature* 352, 258-260.
- Jeener, J., Meier, E. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4553.
- Kawai, G. (1989) Proton nuclear magnetic resonance studied on dynamic structures and functions of modified nucleosides in transfer RNA, *Thesis*, University of Tokyo, Japan.

- Kawai, G., Yamamoto, Y., Kamimura, T., Masegi, T., Sekine, M., Hata, T., Iimori, T., Watanabe, T., Miyazawa, T., & Yokoyama, S. (1992) Conformational rigidity of specific pyrimidine residues in tRNA arises from posttranscriptional modifications that enhance steric interaction between the base and the 2'-hydroxyl group, *Biochemistry* 31, 1040-1046.
- Kiesewetter, S., Fischer, W. & Sprinzl, M. (1987) Sequences of three minor tRNA<sup>Arg</sup> from *E. coli*, *Nucleic Acids Res.* 15, 3184.
- Kim, S. H., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, A., Sussman, J. L., Wang, A. H. j., Seemna, N. C. & Rich, A. (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA, *Science* 185, 435-439.
- Kogoma, T., Bialy, H., Subia, N. L., Torrey, T. A., Pickett, G. G. & von Meyenburg, K. (1985) The role of RNase H in initiation of DNA replication in *E. coli*, in *The Molecular Biology of Bacterial Growth* (Schaechter, M., Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Kjeldgaard, N. O., eds) pp. 311-324, Jones & Bartlett Publishers, Inc., Portola Valley, California.
- Kohara, Y., Akiyama, K. & Isono, K. (1987) The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library, *Cell* 50, 495-508.
- Komine, Y., Adachi, T., Inokuchi, H. & Ozeki, H. (1991) Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12, *J. Mol. Biol.* 212, 579-598.



- Kuchino, Y., Kato, M., Sugisaki, H. & Nishimura, S. (1979) Nucleotide sequence of starfish initiator tRNA, *Nucleic Acids Res.* 6, 3459-3469.
- Kumar, A., Ernst, R. R. & Wlthrich, K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1-6.
- Lawlor, E. J., Baylis, H. A. & Chater, K. F. (1987) Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Genes Dev.* 1, 1305-1310.
- Leskiw, B. K., Lawlor, E. J., Fernandez-Abalos, J. M. & Chater, K. F. (1991) TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2461-2465.
- Lin, S. X., Shi, J. P., Cheng, X. D. & Wang, Y. L. (1988) Arginyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*, purification by affinity chromatography, properties, and steady-state kinetics, *Biochemistry* 27, 6443-6348.
- Littlefield, J. W. & Dunn, D. B. (1958) The occurrence and distribution of thymine and three methylated adenine base in ribonucleic acids from several sources, *Biochem. J.* 70, 642-651.
- Louie, A., Ribeiro, S., Reid, B. R. & Journak, F. (1984) Relative affinities of all *Escherichia coli* aminoacyl-tRNAs for elongation factor Tu-GTP, *J. Biol. Chem.* 259,

- Lustig, F., Elias, P., Axberg, T., Samuelsson, T.,  
Tittawella, I. & Lagerkvist, U. (1981) Codon reading and  
translational error, *J. Biol. Chem.* 256, 2635-2643.
- Lustig, F., Boren, T., Classen, C., Simonsson, C.,  
Barciszewska, M. & Lagerkvist, U. (1993) The nucleotide  
in position 32 of the tRNA anticodon loop determines  
ability of anticodon UCC to discriminate among glycine  
codons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3343-3347.
- Macura, S. & Ernst, R. R. (1980) Elucidation of cross re-  
laxation in liquids by two-dimensional N.M.R. spectro-  
scopy, *Mol. Phys.* 41, 95-117.
- Martin, R. P., Sibley, A. P., Gehrke, C. W., Kuo, K.,  
Edmonds, C. G., McCloskey, J. A. & Dirheimer, G. (1990)  
5-[[[(Carboxymethyl)amino]methyl]uridine is found in the  
anticodon of yeast mitochondrial tRNAs recognizing two-  
codon families ending in a purine, *Biochemistry* 29, 956-  
959.
- McClain, W. H. & Nicolas Jr, H. B. (1987) Differences  
between transfer RNA molecules, *J. Mol. Biol.* 194, 635-  
642.
- McClain, W. H., and K. Foss (1988a) Changing the identity  
of a tRNA by introducing a G-U wobble pair near the 3'  
acceptor end, *Science* 240, 793-796.
- McClain, W. H., and K. Foss (1988b) Changing the acceptor  
identity of a transfer RNA by altering nucleotides in a  
"variable pocket", *Science* 241, 1804-1807.
- McClain, W., H., K. Foss, R. A. Jenkins, & J. Schneider  
(1990) Nucleotides that determine *Escherichia coli*

- tRNA<sup>Arg</sup> and tRNA<sup>Lys</sup> acceptor identities revealed by analyses of mutant opal and amber suppresser tRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9260-9264.
- McClain, W., K. Foss, R. A. Jenkins, and J. Schneider (1991) Rapid determination of nucleotides that define tRNA<sup>Gly</sup> acceptor identity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6147-6151.
- Miller, W. T., Hou, Y. -M. & Schimmel, P. (1991) Mutant aminoacyl-tRNA synthetase that compensates for a mutation in the major identity determinant of its tRNA, *Biochemistry* 30, 2653-2641.
- Mitra, S. K., Lustig, F., Ökesson, B., Axberg, T., Elias, P. & Lagerkvist, U. (1979) Relative efficiency of anticodons in reading the valine codons during protein synthesis *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 254, 6379-6401.
- Moazed, D. & Noller, H. F. (1991) Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3725-3728.
- Mullin, D. A., Garcia, G. M. & Walker, J. R. (1984) An *E. coli* DNA fragment 118 base pairs in length provides *dnaY*<sup>+</sup> complementing activity, *Cell* 37, 669-674.
- Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T. & Yokoyama, S (1988) Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification, *Nature* 336, 179-181.
- Murakami, Y., Ohmori, H, Yura, T. & Nagata, T. (1987) Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene function for *ori-2*-dependent mini-F plasmid replication, *J.*

- Bacteriol.* 169, 1724-1730.
- Murao, K., Hasegawa, T. & Ishikura, H. (1982) Nucleotide sequence of valine tRNA<sub>mo</sub><sup>5</sup>UAC from *Bacillus subtilis*, *Nucleic Acids Res.* 10, 715-718.
- Nagata, T., Murakami, Y. & Imai, M. (1988) Requirement of the *Escherichia coli* dnaA gene function for integrative suppression of dnaA mutations by plasmid R100-1, *Mol. Gen. Genet.* 213, 163-165.
- Nishimura, S. (1979) Modified nucleosides in tRNA, in *Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition* (Schimmel, P. R., Söll, D. & Abelson, J. N., eds) pp. 59-79, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Nishimura, S., & Kuchino, Y. (1983) Characterization of modified nucleosides in tRNA, in *Methods of DNA and RNA Sequencing* (Weissman, S. M., Ed.) pp 235-260, Praeger, New York.
- Normanly, J., Ogden, R. C., Horvath, S. J. & Abelson, J. (1986) Changing the identity of a transfer RNA, *Nature* 321, 213-219.
- Normanly, J. & Abelson, J. (1989) tRNA identity, *Annu. Rev. Biochem.* 58, 1029-1049.
- Nureki, O., Kohno, T., Sakamoto, K., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1993) Chemical modification and mutagenesis studies on zinc binding of aminoacyl-tRNA synthetases, *J. Biol. Chem.* 268, 15368-15737.
- Nureki, O., Niimi, T., Muramatsu, T., Kanno, H., Kohno, T., Florentz, K., Giege, R. & Yokoyama, S. (1994) Molecular recognition of the identity-determinant set of

- isoleucines transfer RNA from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 235.
- Ohki, M. & Mitsui, M. (1974) Defective membrane synthesis in an *E. coli* mutant, *Nature* 252, 64-66.
- Pak, M., L. Pallack, and L. Schulman (1992) Conversion of a methionine initiator tRNA into a tryptophan-inserting elongator tRNA *in vivo*, *Biochemistry* 31, 3303-3308.
- Pearlman, P. A., Case, D. A., Caldwell, J. C., Seibel, G. L., Singh, U. C. & Weiner, P. (1991) University of California, San Fransisco.
- Perret, V., Garcia, A., Grosjean, H., Ebel, J. -P., Florentz, C. & Giegé, R. (1990) Relaxation of a transfer RNA specificity by removal of modified nucleotides, *Nature* 344, 787-789.
- Pingoud, A., Urbanke, C., Krauss, G., Peters, F. & Maas, G. (1977) Ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP, and aminoacyl-tRNA: an equilibrium study, *Eur. J. Biochem.* 78, 403-409.
- Pütz, J., Puglisi, J. D., Florentz, C. & Giegé, R. (1993) Additive, cooperative and anti-cooperative effects between identity nucleotides of a tRNA, *EMBO J.* 12, 2949-2957.
- Quigley, C. G., Seeman, N. C., Wang, A. H., Suddath, F. L. & Rich, A. (1975) Yeast phenylalanine transfer RNA: atomic coordinates and torsion angles, *Nucleic Acids Res.* 2, 2329-2341.
- Rance, M., Sörensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. (1983) Improved special resolution in COSY  $^1\text{H}$  NMR spectra of proteins via double

- quantum filtering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 479-485.
- Rich, A. & RajBhandary, U. L. (1976) Transfer RNA: structure, sequence, and properties, *Annu. Rev. Biochem.* 45, 805-860.
- Rich, A. & Schimmel, P. (1977) Structural organization of complexes of transfer RNAs with aminoacyl transfer RNA synthetases, *Nucleic Acids Res.* 4, 1649-1665.
- Roberts, J. W. & Carbon, J. (1975) Nucleotide sequence studies of normal and genetically altered glycine transfer ribonucleic acids from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 250, 5530-5541.
- Robertus, J. D., Lander, J. E., Finch, J. T., Rhodes, D., Brown, R. S., Clark, B. F. C. & Klug, A. (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution, *Nature* 250, 546-551.
- Romby, P., Moras, D., Bergdoll, M., Domas, P., Vlassov, V. V., Westhof, E., Ebel, J. -P. & Giegè, R. (1985) Yeast tRNA<sup>ASP</sup> tertiary structure in solution and areas of interaction of the tRNA with aspartyl-tRNA synthetase, *J. Mol. Biol.* 184, 455-471.
- Rould, M. A., Perona, J. J., Söll, D. & Steitz, T. A. (1989) Structure of *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Gln</sup> and ATP at 2.8 Å resolution, *Science* 246, 1135-1142.
- Rould, M. A., Perona, J. J. & Steitz, T. A. (1991) Structural basis of anticodon loop recognition by glutaminyl-tRNA synthetase, *Nature* 352, 213-218.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A.,

- Mitschuler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J. C. & Moras, D. (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetase: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Asp</sup>, *Science* 252, 1682-1689.
- Sakamoto, K., Kawai, G., Niimi, T., Satoh, T., Sekine, M., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1993) A modified uridine in the first position of the anticodon of a minor species of arginine tRNA, the *argU* gene product, from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 216, 369-375.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sampson, J. R. & Uhlenbeck, O. C. (1989) Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1033-1037.
- Sampson, J. R., DiRenzo, A. B., Behlen, L. S. & Uhlenbeck, O. C. (1990) Role of the tertiary nucleotides in the interaction of yeast phenylalanine tRNA with its cognate synthetase, *Biochemistry* 29, 2523-2532
- Sampson, J. R., Behlen, L. S., DiRenzo, A. B. & Uhlenbeck, O. C. (1992) Recognition of yeast tRNA<sup>Phe</sup> by its cognate yeast phenylalanyl-tRNA synthetase: an analysis of specificity, *Biochemistry* 31, 4146-4167.
- Samuelsson, T., Elias, P., Lustig, F. Axberg, T., Fölsch, G., Åkesson, B. & Lagerkvist, U. (1980) Aberrations of the classic reading scheme during protein synthesis in

- vitro, *J. Biol. Chem.* 255, 4583-4588.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F. & Petersen, G. B. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA, *J. Mol. Biol.* 162, 729-773.
- Sato, T., Ohki, M., Yura, T. & Ito, K. (1979) Genetic studies of an *Escherichia coli* K-12 temperature-sensitive mutant defective in membrane protein synthesis, *J. Bacteriol.* 138, 305-313.
- Saxena, P. & Walker, J. R. (1992) Expression of *argU*, the *Escherichia coli* gene coding for a rare arginine tRNA, *J. Bacteriol.* 174, 1956-1964.
- Schmitt, E., Meinel, T., Panvert, M., Mechulam, Y & Blanquet, S. (1993) Two acidid residues of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase act as negative discriminants towards the binding of non-cogntae tRNA anticodons, *J. Mol. Biol.* 233, 615-628.
- Schulman, L. H. (1991) Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 41, 23-87.
- Schulman, L. H. & Pelka, H. (1988) The anticodon contains a major element of the identity of arginine transfer RNA, *Science* 246, 1595-1597.
- Schulman, L. H., Pelka, H. & Sundari, R. M. (1974) Structural requirements for recognition of *Escherichia coli* initiator and non-initiator transfer ribonucleic acids by bacterial T factor, *J. Biol. Chem.* 249, 7102-



- Sekine, M., Seio, K., Satoh, T., Sakamoto, K. & Yokoyama (1993) Synthesis of uridylyl (3'-5') uridine derivatives containing 5-(methylaminomethyl)uridine as a modified nucleoside found from *E. coli* minor tRNA<sup>Arg</sup>, *Nucleosides Nucleotides* 12, 305-321.
- Sekiya, T., Takeishi, K. & Ukita, T. (1969) Specificity of yeast glutamic acid transfer RNA for codon recognition, *Biochim. Biophys. Acta* 182, 411-426.
- Seong, B. L. & RajBhandary. U. L. (1987) Mutants of *Escherichia coli* formylmethionine tRNA: A single base change enables initiator tRNA to act as an elongator *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8859-8863.
- Seong, B. L., Lee, C. P. & RajBhandary. U. L. (1989) Suppression of amber codon *in vivo* as evidence that mutants derived from *Escherichia coli* initiator tRNA can act as at the step of elongation in protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 264, 6504-6508.
- Shaka, A. J., Barker, P. B. & Freeman, R. (1983) Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation, *J. Magn. Reson.* 64, 547-552.
- Sharp, P. & Li, W. -H. (1986) Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for 'rare' codons, *Nucleic Acids Res.* 14, 7737-7749.
- Shaw, G., Warrenner, R. N., Maguire, M. H. & Ralph, R. K. (1958) Syntheses of uridine, 2-thiouridine, and some related compounds, *J. Chem. Soc.* 1958, 2294-2299.
- Shimura, Y., Aono, A., Ozeki, H., Sarabhai, A., Lamfrom, H. & Abelson, J. (1972) Mutant tyrosine tRNA of altered

- amino acid specificity, *FEBS Lett.* **22**, 144-148.
- Sibler, A. P., Dirheimer, G. & Martin, R. P. (1986) Codon reading patterns in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria based on sequences of mitochondrial tRNAs, *FEBS Lett.* **194**, 131-138.
- Sierzputowska-Gracz, H., Sochacka, E., Malkiewicz, A., Kuto, K., Gehrke, C. W. & Agris, P. F. (1987) Chemistry and structure of modified uridines in the anticodon, wobble position of transfer RNA are determined by thiolation, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7171-7177.
- Smith, J. D., Barnett, L., Brenner, S. & Russel, R. L. (1970) More mutant tyrosine transfer ribonucleic acids, *J. Mol. Biol.* **54**, 1-14.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R. & Seeburg, P. H. (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels, *Cell* **67**, 11-19.
- Spanjaard, R. A., Chen, K., Walker, J. R. & van Duin, J. (1990) Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to *argU* tRNA and T4 tRNA<sup>Arg</sup> *Nucleic Acids Res.* **18**, 5031-5035.
- Sprinzi, M., Dank, N., Nock, S. & Schön, A. (1991) Compilation of tRNA and tRNA gene sequences, 1991 edition, Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth.
- Sullivan, M. A., Cannon, J. F., Webb, F. H. & Bock, R. M. (1985) Antisuppressor mutation in *Escherichia coli* defective in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine, *J. Bacteriol.* **161**, 368-376.
- Sylvers, L. A., Rogers, K. C., Shimizu, M., Ohtsuka, E. &

- Söll, D. (1993) A 2-thiouridine derivative in tRNA<sup>Glu</sup> is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase, *Biochemistry* 32, 3836-3841.
- Tamura, F., Nishimura, S. & Ohki, M. (1984) The *Escherichia coli* *divE* mutation, which differentially inhibits synthesis of certain proteins, is in tRNA<sub>1</sub><sup>Ser</sup>, *EMBO J.* 3, 1103-1107.
- Tamura, K., Asahara, H., Himeno, H., Hasegawa, T. & Shimizu, M. (1991) Identity elements of *Escherichia coli* tRNA<sup>Ala</sup>, *J. Mol. Rec.* 4, 129-132.
- Tamura, K., Himeno, H., Asahara, H., Hasegawa, T. & Shimizu, M. (1992) *In vitro* study of *E. coli* tRNA<sup>Arg</sup> and tRNA<sup>Lys</sup> identity elements, *Nucleic Acids Res.* 20, 2335-2339.
- Tanaka, R., Andachi, Y. & Muto, A. (1991) Evolution of tRNAs and tRNA genes in *Acholeplasma laidlawii*, *Nucleic Acids Res.* 19, 6787-6792.
- Theobald, A., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. -P. & Giegé, R. (1988) Tertiary structure of *Escherichia coli* tRNA<sub>3</sub><sup>Thr</sup> in solution and interaction of this tRNA with the cognate threonyl-tRNA synthetase, *Eur. J. Biochem.* 175, 511-524.
- Ts'o, P. O. P., Kondo, N. S., Schweizer, M. P. & Hollis, D. P. (1969) Studies of the conformation and interaction in dinucleoside mono- and diphosphates by proton magnetic resonance, *Biochemistry* 8, 997-1029.
- Varshney, U., Lee, C. -P. & RajBhandary, U. L. (1991) Direct analysis of aminoacylation levels of tRNAs in

- vivo*, *J. Biol. Chem.* 266, 24712-24718.
- Vlassov, V. V., Kern, D., Giegé, R & Ebel, J. P. (1981) Protection of phosphodiester bonds in yeast tRNA<sup>Val</sup> by its cognate aminoacyl-tRNA synthetase against alkylation by ethylnitrosourea, *FEBS Lett.* 123, 277-281.
- von Ahsen, U. & Noller, H. F. (1993) Footprinting the sites of interaction of antibiotics with catalytic group I intron RNA, *Science* 260, 1500-1503.
- Wagner, T. & Sprinzl, M. (1980) The complex formation between *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA, elongation factor Tu and GTP, *Eur. J. Biochem.* 108, 213-221.
- Watanabe, K., Yokoyama, S., Hansske, F., Kasai, H. & Miyazawa, T. (1979) CD and NMR studies on the conformational thermostability of 2-thioribothymidine found in the TFC loop of thermophile tRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 671-677.
- Weissenbach, J. & Dirheimer, G. (1978) Pairing properties of the methylester of 5-carboxymethyl uridine in the wobble position of yeast tRNA<sub>3</sub><sup>Arg</sup>, *Biochim. Biophys. Acta* 518, 530-534.
- Wikman, F. P., Siboska, G. E., Petersen, H. U. & Clark, B. F. C. (1982) The site of interaction of aminoacyl-tRNA with elongation factor Tu, *EMBO J.* 9, 1095-1100.
- Xue, H., Shen, W., Giegé, R. & Wong, J. T. -F. (1993) Identity elements of tRNA<sup>Trp</sup>, *J. Biol. Chem.* 268, 9316-9322.
- Yamamoto, Y., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Watanabe, K. & Higuchi, S. (1983) NMR analyses on the molecular mechanism of the conformational rigidity of 2-

- thioribothymidine, a modified nucleoside in extreme thermophile tRNAs, *FEBS Lett.* 157, 95-99.
- Yokoyama, S. & Miyazawa, T. (1985) Molecular conformations and codon recognition of transfer ribonucleic acids as analyzed by nuclear magnetic resonance, *J. Mol. Struct.* 126, 563-572.
- Yokoyama, S., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1979)  $^1\text{H}$  NMR studies on the conformational characteristics of 2-thiopyrimidine nucleotides found in transfer RNAs, *Nucleic Acids Res.* 6, 2611-2626.
- Yokoyama, S., Inagaki, F. & Miyazawa, T. (1981) Advanced nuclear magnetic resonance lanthanide probe analyses of short-range conformational interrelations controlling ribonucleic acid structures, *Biochemistry* 20, 2981-2988.
- Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1985) Molecular mechanism for codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4905-4909.
- Zhang, J. & Deutscher, M. P. (1988) Transfer RNA is a substrate for RNase D *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 263, 18228-18233.
- Zubay, G. (1962) The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid, *J. Mol. Biol.* 4, 347-356.



inches  
1 2 3 4 5 6 7 8  
cm  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

