

高度好熱菌のtRNA (guanosine-2') methyltransferase の  
基質認識機構の研究

堀 弘 幸

①

博士論文

高度好熱菌のtRNA(guanosine-2')methyltransferaseの  
基質認識機構の研究

指導教官 渡辺 公綱

1994年

堀 弘幸

## 目次

略号表	1
序論	4
第一部 高度好熱菌の培養とGm-メチラーゼの精製	15
1. 高度好熱菌の培養	16
2. Gm-メチラーゼの精製	18
第二部 Gm-メチラーゼの最低限必要とするtRNAの構造	34
1. Gm-メチラーゼはtRNAのどこと会合するのか	35
2. 最小基質は何か	61
第三部 Gm-メチラーゼのより効率的なメチル化に必要なtRNAの構造	128
1. D-アーム構造は必要か？	129
2. 塩基置換したT7 RNAポリメラーゼのメチル化	131
3. D-ループ鎖長改変体のメチル化	160
4. 非メチル化型転写産物による活性阻害	163
論文の総まとめ	165
謝辞	171
参考文献	172
付録：tRNA修飾酵素研究の歴史的概観	175

### 略号表

DNA	deoxynucleic acid
RNA	ribonucleic acid
tRNA	transfer RNA
rRNA	ribosomal RNA
mRNA	messenger RNA
PAGE	poly acrylamide gel electrophoresis
HPLC	high performance liquid chromatography
TLC	thin layer chromatography
SAM	S-adenosyl-L-methionine
SAH	S-adenosyl-L-homocysteine

この他、SDS、TEMED、EDTAなども略号表記したが、文章の最初に正式名称を付した。

### 塩基の表記について

A、C、G、T、Uは塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの可能性がある。特にどれであるかを指摘する必要がある場合のみ、文章中に表記した。デオキシ体とリボ体の区別は文脈上明かな場合がほとんどであったので特に明記していない。なお、rTは $m^5U$ と表記した。また、プリン塩基はPu、ピリミジン塩基はPy、任意の塩基はNと表記した。

### 塩基の略号について

修飾塩基の略号はBjorkらの総説<sup>(1)</sup>にしたがった。そのため、一般によく用いられている以下の塩基略号は各々、右のような表記になる。

T/rT	$m^5U$
Y	yW
L	$k^2C$
V	$cmo^5U$
mV	$mcmo^5U$
Z	$io^6A$

修飾塩基は同じ構造であってもtRNA上の部位が異なれば、ほとんどの場合、別の酵素による修飾と考えられている。その点を考慮して、tRNA上のポジションを併記した。

例：Gm(18)      ポジション18の2'-o-methyl-guanosine

### 修飾酵素の略号について

修飾酵素もこの表記を流用した。また、修飾部位が複数あることが明かな酵素(例：*py* synthetase I, *hisT* gene product)についてはそのつと記載した。さらにmethyltransferaseはメチ



ラーゼと略した。

修飾塩基略号表

$m^1A$	1-methyladenosine
$m^2A$	2-methyladenosine
$m^6A$	N6-methyladenosine
$i^6A$	N6- $\Delta^2$ -isopentenyl-adenosine
$ms^{2,6}A$	2-methyltio-N6- $\Delta^2$ -isopentenyl-adenosine
$t^6A$	N-[N-(9- $\beta$ -D-ribofuranosyl-purine-6-yl)carbamoyl]threonine
$ms^{2,6}io^6A$	cis-2-methylthioribosylzeatin
$ms^{2,6}t^6A$	2-methyltio-N-[N-(9- $\beta$ -D-ribofuranosyl-purine-6-yl)carbamoyl]threonine
Cm	2'-o-methylcytidine
$m^3C$	3-methylcytidine
$m^5C$	5-methylcytidine
$ac^4C$	N4-acetylcytidine
$s^2C$	2-thiocytidine
$k^2C$	lysidine=4-amino-2-(N6-lysino)-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)cytidine
D	dihydrouridine
Gm	2'-o-methylguanosine
$m^1G$	1-methylguanosine
$m^2G$	N2-methylguanosine
$m^2_2G$	N2,N2-dimethylguanosine
$m^7G$	7-methylguanosine
I	inosine
$m^1I$	1-methylinosine
Q	quevine=7-(3,4-trans-4,5-cis-dihydroxyl-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanine
manQ	$\beta$ -D-mannosylquevine
Um	2'-o-methyluridine
$s^4U$	4-thiouridine
$s^2U$	2-thiouridine
$mnms^2s^2U$	5-methylaminomethyl-2-thiouridine
$nm^5s^2U$	5-aminomethyl-2-thiouridine

$\text{cmo}^5\text{U}$	5-carboxymethoxyuridine
$\text{mcmo}^5\text{U}$	5-methylcarboxymethoxyuridine
$\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$	5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine
$\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$	5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine
$\text{mnm}^5\text{Se}^2\text{U}$	5-methylaminomethyl-2-serenouridine
$\text{m}^5\text{U}$	5-methyluridine=ribothimidine
$\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$	5-methyl-2-thiouridine
$\text{acp}^3\text{U}$	3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine
$\Psi$	pseudouridine
$\Psi\text{m}$	2'-o-methylpseudouridine
$\text{m}^1\Psi$	1-methylpseudouridine
yW	wyeosine

## 序論

生体内から何等かの物質を取りだし、その性質を調べ、生命のしくみを分子レベルで究明することは、生化学の目標のひとつであるが、この中には、タンパク質がいかんして他の生体高分子を認識し、機能するのかという問題も当然のことながら含まれる。この認識する相手方の生体高分子が核酸である場合、これを特に核酸関連タンパク質とよぶが、表1のごとくその種類は多く、転写、翻訳、複製といった生物が活動し増殖するための根源的現象から、発生、分化といった高次の調節にいたるまであらゆる生命現象にたずさわっている。

核酸のなかで、tRNAは小型でその性質や構造がもっともよく研究されている分子種のひとつであるが、分子内に塩基対からなるステム構造や一本鎖からなるループ構造があり、これらが組み合わさってL字型構造が形成され、基本的には二重らせん構造のみからなるDNAにはない、立体構造をもっている。したがって、tRNAを認識するタンパク質もDNAを認識するタンパク質とは異なった分子認識機構をもっている可能性があり、また、同じtRNAを認識するにしてもtRNAのどこを認識するかで異なったパターンを持っていることが予想される。

このように、核酸関連タンパク質のなかでも、tRNA修飾酵素は基質認識機構の研究に格好の素材なのであるが、先のtRNA修飾酵素研究の歴史的概観でも述べたように、実際に研究された例はきわめて少ない。表2は1994年3月までに基質認識について報告された修飾酵素の一覧表であるが、たった数行の記述しか存在しない論文を含めても、わずか15種類の酵素についての研究があるだけである(10,13,15,16,39,44,45,52,62,63,67,70)。表中で*in vitro*、*in vivo*は各々、試験管内および生体内のいずれで研究がなされたかを示しており、*in vitro*のp. purifiedは部分精製標品を用いた研究であることを、また、purifiedはSDS-ゲル電気泳動上で単一バンドを与える均一標品を用いた研究であることを示している。

生体内から特定物質を精製し、その性質を究明することは生化学の基本的方法であるが、実際にはtRNA修飾酵素が微量酵素であり失活しやすいため、部分精製標品を用いてなされた研究が大半となっている。とくに部分精製標品の中には、ほとんど細胞粗抽出液に近く、複数の酵素活性を同時に測定していると考えられる論文もある。



一方、*in vivo*の研究で基質認識に言及した論文はすべてマイクロインジェクションの手法を用いている。マイクロインジェクション法は基質tRNAを直接、細胞内に注入するという手法であるため、その結果は生きている細胞内で現実に起こっている現象を反映しているという長所がある。また、酵素自身が精製されておらず、その性質や基質が不明であっても分析が可能である。例えば、manQ(34)の修飾酵素は生化学的手法で酵素活性が捉えられたことがなく、マンノース供与体についても確認されていないが、その生成の様子はマイクロインジェクション法で捉えられている<sup>(70)</sup>。しかしながら、マイクロインジェクション法にも短所がある。複数の酵素が関与する修飾系（例えばmanQ(34)）では、その個々の酵素反応を解析できない。また、その酵素学的パラメーターが解析できないのでタンパク化学的知見を集積することができず、タンパク質がいかんして核酸を認識するかという命題に対してさらに検討を加え発展させていく余地が少ない。さらに、マイクロインジェクションが可能なのはアフリカツメガエル卵母細胞のような大型の細胞に限るため、他の生物種、特に遺伝学的、酵素学的知見の集積されている細菌での研究が困難である。そしてまた、濾紙あるいは薄層クロマトグラフィーを修飾塩基の分析手段として使用するため検出可能な域値が狭く、tRNA1分子中に100分の1程度までの修飾しか分析できない。そしてさらに、常に細胞内における分解にさらされるため、各注入tRNA分子種の半減期を考慮せずに定量的議論を展開することが困難であるといった技術的問題も存在する。

マイクロインジェクション法の検出限界については、*in vitro*、*in vivo*の双方から研究が進められているtRNAトランスグリコシダーゼ(Q(34)-enzyme)に一例を見ることができる。Curnow<sup>(71)</sup>や中西<sup>(72)</sup>らはQ(34)の修飾がtRNAのアンチコドンアームだけからなるミニヘリックスRNAでも起こり得ることを証明しているが、マイクロインジェクション法を採用したEdqvistら<sup>(39)</sup>はQ(34)の修飾がD-アームの塩基配列に強く影響されるといふ報告を行っており、一読すると両者の主張にはかなりのへだたりがあるように思われる。しかしながら、マイクロインジェクション法の検出限界を考慮すれば、両者の主張にはいささかの矛盾もない。中西らによるとtRNAトランスグリコシダーゼのミニヘリックスRNAに対する $K_{cat}$ はtRNA<sup>His</sup>転

写産物に対する $K_{cat}$ とさほど変わらないが、その $K_m$ は約100倍であり、従ってミニヘリックスRNAに対する塩基置換反応の初速は約100分の1である。一方、Edqvistらの研究ではD-アーム改変体の修飾頻度は数パーセントまでしか検出されておらず、マイクロインジェクション法では、tRNA全体構造に比較してスクレアーゼに対する感受性が高く、しかも塩基置換のおこりにくいミニヘリックスRNAを基質としてQ(34)の生成を検出することは困難であると推定される。つまり、マイクロインジェクション法では、Curnowや中西らの*in vitro*の研究のようにtRNA-酵素複合体形成の初発過程を省略し、より酵素反応の本質的部分を抽出しようとするような試みは不可能である。もちろん、Edqvistらの研究は理想状態の酵素反応論を意図したものではなく、生理学的には意義深い研究であり、マイクロインジェクション法は*in vitro*の生化学的研究と連携することによって、これからもtRNA修飾酵素研究の手法として用いられ続けるにちがいない。

このようにtRNA修飾酵素の基質認識に関する研究は少なく、かつ、分析手法や酵素の種類、精製純度の違いにより必ずしも今までえられた結果は一致するものではないが、「タンパク質がいかなる分子機構によって他の生体高分子を認識しているのか。」という問題は、「生体内で生じている化学現象をいかに合理的にとらえるか。」という生化学の基本命題のひとつである。

さて、tRNA修飾酵素の基質認識機構の研究はこの基本命題に属するとはいえ、DNA結合タンパク質や抗体の認識論とは一線を画する酵素反応論上の問題が付随する。すなわち、酵素はただ単に結合することによって生理機能を発揮するのではなく、何等かの化学反応を触媒せねばならない。多くの場合、酵素反応には、酵素-タンパク質の構造変化が伴う。tRNA修飾酵素の場合、基質がtRNAという高分子であるため、基質側の構造変化も起こり得る。現に本論文で取り扱う高度好熱菌のGm-メチラーゼの修飾部位G18のリボース環の2'-OHはtRNAの高次構造中、D-ループとT-ループの会合部位に属し、分子表面には露出しておらず、したがって酵素の活性中心が接近するためには基質であるtRNAの構造変化が必要である。この酵素-tRNA複合体が形成される過程において、酵素のtRNA認識部位が終始一貫して変化しないという保証はどこにもない。むしろ、最終的に安定な複合体となった時点ではtRNA分子表面には露出していなかった修飾部位を認識しているのであるか



ら、tRNAの構造変化を行なう過程と最終的な酵素-tRNA複合体ではその認識部位が異なっていると考えるほうが自然である。そしてまた、修飾を終えた酵素は、基質tRNAの構造がメチル基1個分しか変化していないにもかかわらず、親和性を減少させ、複合体を解離させねばならない。このような連続した「動き」は、結合することのみが目的の抗体や結合性タンパク質にはありえない。

この連続した「動き」を伴う酵素の動的構造解析には、中性子非弾性散乱法や時間分割ラウエ法など最新鋭の方法が考案されつつある現在でも、古典的な酵素学的パラメーターを追う分析法が基礎的情報を与える手段となりうる。すなわち、tRNAの構造変化あるいはtRNA-酵素双方の構造変化を伴い酵素-tRNA複合体がある安定した状態へ至るまでの最適誘導の過程は $K_m$ で評価され、その複合体で実際に化学反応が行なわれる様子は $K_{cat}$ もしくは $V_{max}$ で議論される。さらにまた、基質とならないRNA分子もこれが阻害物質となりうるのならば、その阻害様式を分析することによって酵素-複合体の形成過程やメチル基転移の様子を調べることができる。

しかしながら、これまでのtRNA修飾酵素の研究で酵素学的パラメーターを細かく吟味した報告はきわめて少ない。これは先に述べたように、tRNA修飾酵素の基質認識の研究において、酵素学的パラメーターが議論可能なほど精製された酵素を用いた例が少ないということも理由のひとつであるが、得られた酵素学的パラメーターの評価がきわめてむずかしいという問題点もある。

例えば、 $K_m$ が初期会合から最適誘導への過程を意味するパラメーターであるという大前提は是としても、これが何段階からなる反応であるかを推論することは困難であり、この問題に立ち入らねば、およそ分子レベルのメカニズムを解析しているとは言い難いであろう。また、tRNAは高分子であり、どこか一部を遺伝子工学的手法で改変したとしても、その効果が局所に限定されるのか、あるいは全体構造に及ぶのかといった問題が常につきまとう。つまり、tRNAのどこかに変異を導入し、その結果としてtRNAのある部分の構造が変化し、それがtRNA全体の構造に波及するとすれば、酵素-tRNA複合体が形成されにくくなり、おそらく、 $K_m$ は大きく変化するであろうが、変異導入部位が酵素の直接の認識部位である保証はない。さらに言えば、

$K_m$ が大きく異なる基質間で  $K_{cat}$  や  $V_{max}$  にも差がある場合、 $K_{cat}$  や  $V_{max}$  の評価は慎重に取り扱う必要がある。また、酵素の直接の認識部位は塩基部分のみとは限らない。tRNA の構造はその一次構造すなわち塩基配列によってすべてが決定され、したがって遺伝子工学的手法による変異はあらゆるバターの tRNA 改変体を生み出すことができるとは言え、実際には糖やリン酸の骨格部分がいかなる構造をとりうるかを完全に予想することは不可能で、これらの構造を酵素が認識していた場合には結果が難解なことが多い。事実、tRNA 修飾酵素より研究の進んでいるアミノアシル tRNA 合成酵素の分野では、大腸菌のクラス II tRNA の識別にエクストラアームの糖、リン酸骨格が強い影響力を持つことが指摘されている<sup>(73)</sup>。当然、tRNA 修飾酵素の分野でも分子認識機構の研究が進むにつれて糖、リン酸骨格を主な認識部位とする例が発見されてくるであろう。

このような問題が酵素学的パラメーターの分析にはつきまとうため、得られた結果を合理的に説明することが困難な場合もある。例えば、大腸菌の  $m^1G(37)$ -メチラーゼは酵素学的解析の進められた数少ない酵素のひとつであるが、数多くの tRNA 変異体が分析されたにも関わらず、G37 が酵素活性に必須という以上の情報は得られていない<sup>(63)</sup>。

しかしながら、それでもなお、酵素学的パラメーターを調べ、基礎的な酵素反応機構の情報を集めておく作業は必要である。X線結晶構造解析や NMR スペクトルの測定といった、現在、タンパク質の構造解析に応用されている手法も、そこから得られた情報をより合理的に理解するためには必然的に基礎的な酵素反応論を参照せねばならない。そしてまた逆に、それらの分析によって得られた結果は酵素学やタンパク質化学の分野にフィードバックし、酵素がいかにして生体高分子を認識し機能するのかという根源的命題に対する理解も深まっていくことだろう。



## 表1 核酸関連タンパク質

### 酵素

ヌクレアーゼ  
ポリメラーゼ  
キナーゼ  
リガーゼ  
トランスフェラーゼ  
デヒドロゲナーゼ  
トポイソメラーゼ  
ヘリカーゼ

### DNA結合タンパク質

ヒストン  
転写調節因子  
複製制御因子

### RNA結合タンパク質

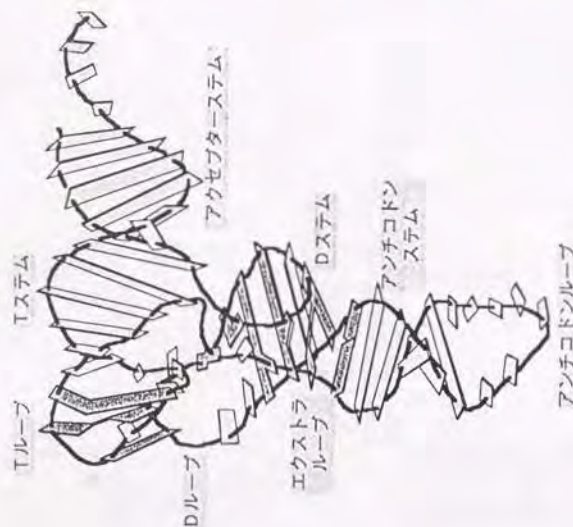
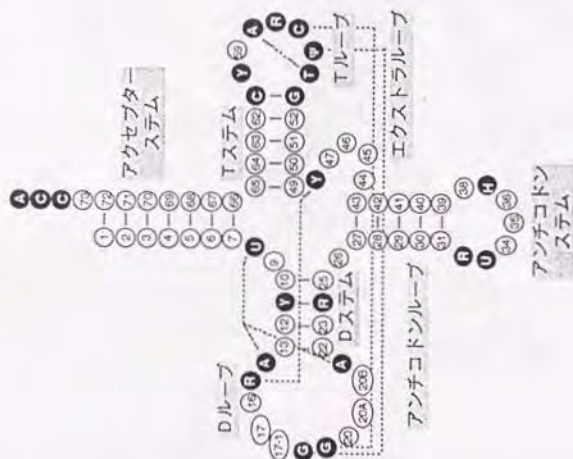
リボソームタンパク質  
スプライソソームタンパク質  
翻訳制御因子

表2 tRNA修飾酵素の基質認識に関する報告

modification	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
m2G (6)		microinjection
Gm(18)	purified	
m2G(26)	p. purified	microinjection
m22G(26)	p. purified	microinjection
Q(34)	purified	microinjection
manQ(34)		microinjection
Gm(34)		microinjection
Ψ(35)	p. purified	microinjection
m1G(37)	p. purified	
t6A (37)		microinjection
Ψ(38-40)		microinjection
m5C(48)	p. purified	microinjection
m5C(49)		microinjection
m5U(54)	purified	microinjection
m1A(58)	purified / p. purified	

## クローバーリーフ型2次構造

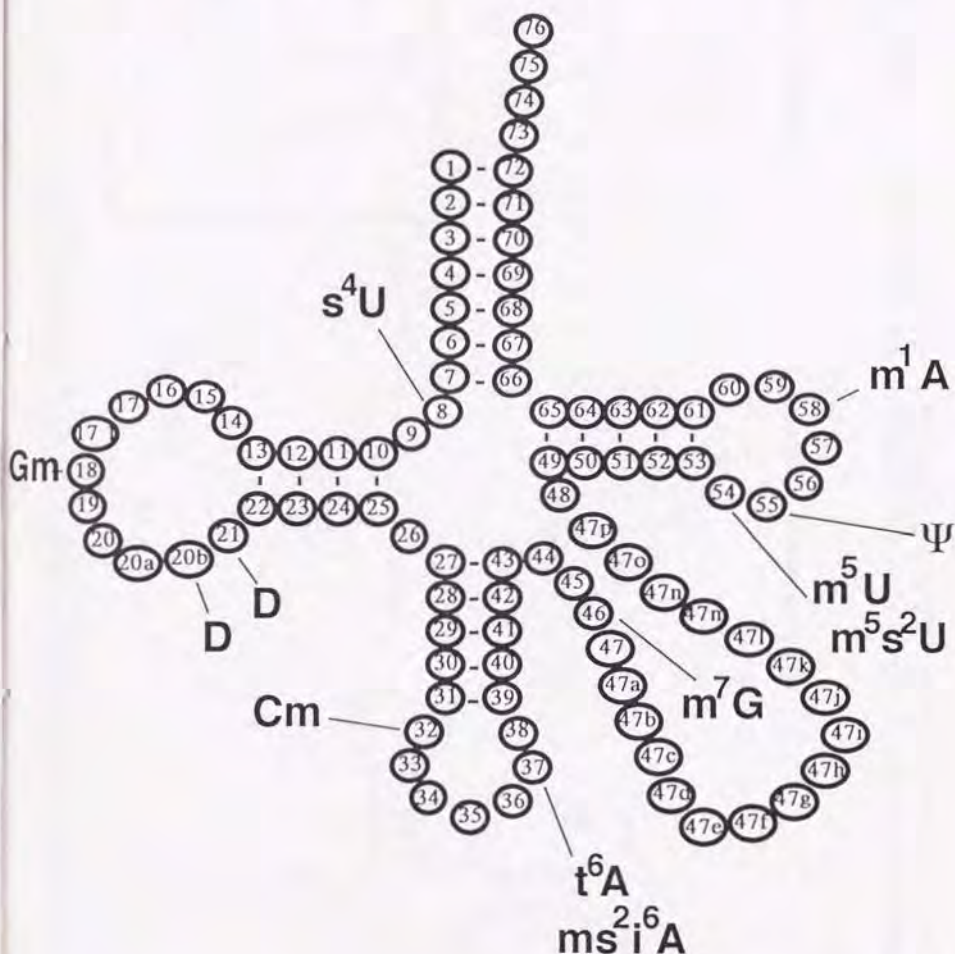
## L型3次構造



一般的なtRNAの2次構造はクローバーの葉のような形をとる。この構造はさらに折れ置まれL字型の3次構造を形成する。Gm-メチラーゼはG18が未修飾であれば、ほとんどすべての一般的なtRNAをメチル化することができる。つまり、Gm-メチラーゼの認識部位はこの構造のどこかに潜んでいるはずである。また、メチル基の直接的なアクセプターであるG18のリボースの2-OH基はtRNAの表面には露出していない。このため、Gm-メチラーゼの活性中心が接近するためには何らかのtRNAの構造変化が必要である。



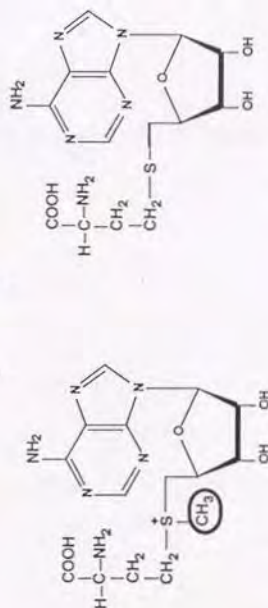
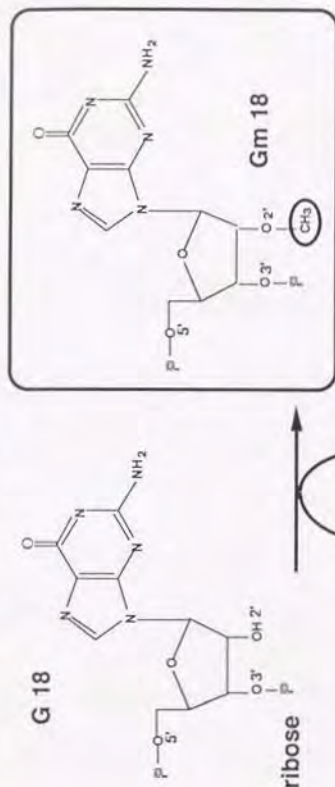
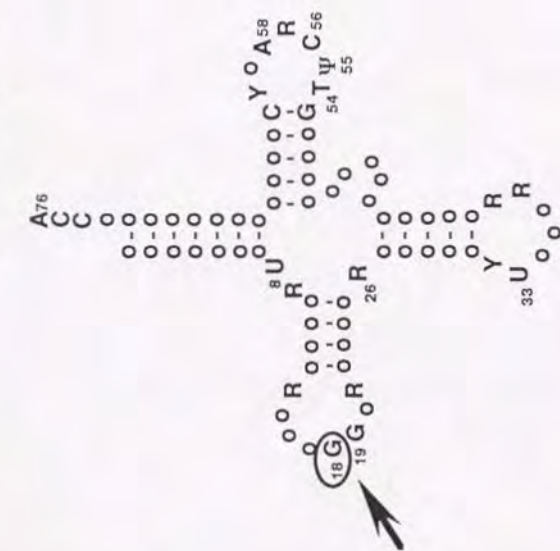
# 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の tRNA修飾とポジション番号



高度好熱菌 *T. thermophilus* tRNAに存在することが確認された修飾塩基をひとつのクローバーリーフ構造にまとめた。高度好熱菌tRNAは大半が塩基配列未決定なため、修飾塩基の種類はさらに増えると思われる。塩基、ポジション番号の表記はBjorkらの総説に従った。



# Gm-メチラーゼのメチル化反応



S-adenosyl-L-methionine (SAM)  
S-adenosyl-L-homocysteine (SAH)

高度好熱菌のGm(18)-メチラーゼはtRNAの保存配列G18のリボース環の2'-OHにメチル基供与体 S-adenosyl-L-methionineからメチル基転移する酵素活性をもっている。

# 第1部 高度好熱菌の培養とG m-メチラーゼの精製

## 1. 高度好熱菌の培養

### (方法)

培養条件は基本的には半合成培地<sup>(4)</sup>を用いた。

#### 1.1. 培地

高度好熱菌の培養は合成培地<sup>(5,6)</sup>もしくは半合成培地を用いた。特別な用途で培養するのでなければ半合成培地のほうが菌の成育もよく作製も簡便である。

合成培地の場合は Table 1.1-1 の組成を 水 80 l に溶解して使用する。

半合成培地の場合は Table 1.1-2 の組成を 水 80 l に溶解して使用する。

いずれの場合も NaOH で室温下 pH 7.5 に調整する。この培地を 70℃ に加熱すると pH は 7.0-7.1 になるが菌の成育には支障ない。また、菌を定常期まで培養した場合には生産する老廃物のため pH は酸性に傾くが、通常は後期対数増殖期までに集菌するので実際的に問題になったことはなかった。定常期まで培養する場合には初発 pH は 8.0 位が妥当であるかもしれない。

金属塩類やビタミンは 水もしくは 0.01 N 硫酸（硫酸鉄の場合）に溶かし濾過滅菌したものを用いる。プレートを作製する場合は寒天の濃度を 5% 程度にしたものを用いる。

#### 1.2. 前培養

ジャーファーマンターによる本培養に先立ち、8 l 培地（5 l エーレンマイヤープラスコに培地 2 l を入れたもの 4 本）による前培養を行なうのが通常の方法であるが、合成培地を使用した場合などで菌の成育が不良であろうと予想された時には、

ジャーの中に前回培養の培養液10 l程度を残し、そのまま前培養液とすることも行なった。

### 1.3. 本培養

特別な目的の培養をのぞいては、培養温度は74度を標準とした。集菌は対数増殖期の中期から後期で行なった。クレット値は250から300程度である。

### 1.4. ポリアミン分析

好熱菌の場合、培養温度が高温のため65℃以上で培養しているかぎり、ほかのバクテリアが混入することはまずないが、好熱菌の菌株を判定する上でポリアミン分析は有力な手段である。例えば、HB8株とHB27株を区別する方法はポリアミン分析<sup>(8)</sup>の他にはプラスミドの有無を調べる(HB8にはプラスミドが存在する<sup>(4)</sup>)か、Gm-メチラーゼを精製し温度依存性を調べる<sup>(9,10)</sup>かしかない。

菌体1 gを試験管にとり5 mlの5% TCA溶液で懸濁抽出する。15分間、室温で放置した後、2000 rpm、10分間、室温下で遠心し上清を採取する。この上清を適宜、5から20倍に希釈し、HPLCによって分析する。HPLCは逆相カラムC K-10 Sを用い、流速30 ml/時で50 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)溶液で溶出させる。



## 2. Gm-メチラーゼの精製

### (方法)

基本的には熊谷らの方法<sup>(1,3)</sup>を踏襲した。

### 2.1. tRNAメチラーゼの活性測定法

Table 2.1-1の組成の反応液を作製し、これに試料溶液を加えて反応を開始する。65度で1時間反応させた後、Whatman 3MM濾紙に吸収させ、5% TCA溶液で3回、冷エタノール/エーテル混合液で1回、冷エーテルで1回洗浄後、十分乾燥させ、トルエンシンチレーター中で液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定する。なお、本論文の中では1unitは1時間あたり1nmoleのメチル基を反応温度65°Cで酵母tRNA<sup>Phe</sup>に転移する酵素量と定める。基質が特殊な場合には反応温度は目的にあわせて適宜変更した。

### 2.2. S-100画分の調製

湿菌体重量の2倍程度の酸化アルミニウム（細胞磨砕用）を加え、石川式らい壊機により菌体を磨砕する。初発菌体1gあたり2.5mlの標準緩衝液（50mM TrisHCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 6mM β-メルカプトエタノール、50mM KCl）を加えて懸濁し、低速遠心して菌体残渣とアルミナを除去する。この時、DNase Iを1mg/lの割合で加えて粘度を落としてもよい。ついで超遠心機で100kgを3.5時間以上かけ、リボソーム画分を除去してS-100画分を得た。

### 2.3. DE52 カラムクロマトグラフィーと

#### CMセファデックスC-50カラムクロマトグラフィー

S-100画分は硫安分画(30-60%飽和)の後、十分な標準緩衝液に対して透析しDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにかけた。Gm-メチラーゼはこのカラムには吸着されず、素通りの画分に溶出される。この画分を集め、KCl濃度を100mMに高めた後、CM-セファデックスC-50カラムクロマトグラフィーにかけた。Gm-メチラーゼ活性は250-300mM KCl領域に溶出される。なお、大腸菌未分画tRNAを基質として活性測定が可能な他のtRNA修飾酵素の1つである

tRNA(adenine-1-)methyltransferase(以下、 $m^1A$ -メチラーゼと略する)

(14,15,16,18)は Gm-メチラーゼよりやや低塩濃度側に溶出される。

### 2.4. アフィニティカラムクロマトグラフィー

S-アデノシルホモシステイン(SAH)-セファロース4BはIzzoの方法<sup>(2)</sup>によって作製した。この方法はPharmacia社のカタログ中に記載された方法と同じである。CM-セファデックスC-50カラムから溶出された活性画分をこのアフィニティカラムにかけ、熊谷らの方法<sup>(1)</sup>で溶出した。2.2.の各クロマトグラフィーを含めて酵素標品の純度は常にSDS-PAGEによってモニターした。

### 2.5. 2次元薄層クロマトグラフィーによる修飾塩基の検出

Gmを含めメチル化酵素の活性の同定は2次元薄層クロマトグラムに出現したスポットを解析することによって行なった。基質となるtRNA(Gm-メチラーゼの場合、大腸菌未分画tRNAで可)  $1 A_{260}$  unitをGm-メチラーゼ2 unit,  $^{14}C$ -SAMを

用いて標準緩衝液中で65度、1時間処理し、フェノール/クロロホルム処理を行なった後、エタノール沈殿し、 $^{14}\text{C}$ で標識したtRNAを得た。このtRNAをスクレアーゼP1でスクレオチドに完全分解し薄層クロマトグラフィーにかけた。薄層の展開溶媒系は1次元目がイソ酪酸：濃アンモニア水：水（66：1：33）、2次元目がイソプロピルアルコール：濃塩酸：水（70：15：15）を主に使用した。この溶媒系ではpGmのスポットはpCのスポットと隣接する位置に移動するので5'-末端を $^{32}\text{P}$ 標識したスクレオチドを分析する場合には2次元目を100mMリン酸ナトリウム（pH6.8）：硫酸：n-プロパノール（100：60：2 / v：w：v）で展開することも行なった。薄層プレートは初期にはアビセル薄層プレートを、最近ではフナセル薄層プレート（いずれもフナコシ社製）を使用した。展開を終えた薄層プレートはフルオログラムをとるか、イメージアナライザーにかけるかして分析した。



## (結果および考察)

## 1. 高度好熱菌の培養

本培養の結果、80 l の培地あたり最高720 g の湿菌体を得た。クレット値は380であった。通常の条件下で培養し、クレット値300以下で集菌すると400 g 程度の湿菌体をえることができた。イーストエクストラクトやバクトトリプトンはDifco社製のものをもちいた場合、他社のものに比べて菌の成長が幾分はやかった。ポリアミン分析は他のバクテリアの混入のチェックや菌株の判定に用いた。現在までに知られている生物種のなかで高度好熱菌に特有と考えられているサーミン、サーモスペルミンあるいは原核生物では高度好熱菌にのみ存在が知られているカルジンなどのポリアミンが確認できた<sup>(8)</sup>。また、HB27株ではHB8株に比較してサーミンの相対的含量が少ないことも確認できた<sup>(7)</sup>。

## 2. Gm-メチラーゼの精製

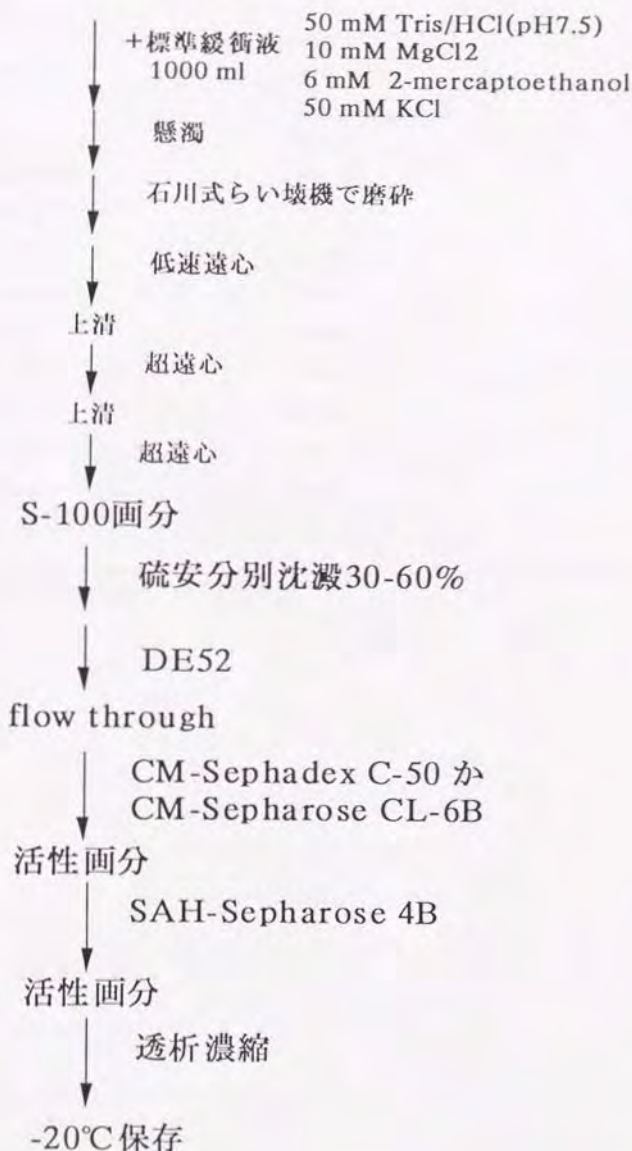
各カラムクロマトグラフィーの結果は別表に示した。CM-セファデックスC-50のカラムクロマトの後、Gm-メチラーゼとm1A-メチラーゼの分離が良くないと判断した場合は再度、CM-セファデックスC-50による分離を行なった。アフィニティカラムによる分離を尿素濃度勾配による溶出にかえる等の試みはあまり良好な結果を得ることができなかった。初発菌体400 g から100 $\mu$ g前後のGm-メチラーゼを普通、精製することができた。えられたtRNAメチラーゼがGm-メチラーゼであることの確認はSDS-PAGEによる分子量の確認の他に薄層クロマトグラフィーを用いたが、日常的なチェックには基質として酵母tRNA<sup>Phe</sup>を使用すれば他のメチラーゼの活性を拾うことがなく、十分目的を達成することができた。図2.5.1は



酵母tRNA<sup>Phe</sup>遺伝子を鋳型としたT7 RNA polymeraseによるRNA転写産物を基質として、<sup>14</sup>C-メチル化塩基（5'-モノヌクレオチド）を分析した結果である。このようにタンパク質としても単一で酵素活性としても他のtRNAメチル化酵素の混入のない試料を得ることができた。

# Gm-メチラーゼの精製

湿菌体 400g



---

sucrose	1.6 kg
sodium glutamate	1.6 kg
$K_2HPO_4$	45 g
$KH_2PO_4$	15 g
NaCl	160 g
$(NH_4)_2SO_4$	40 g
biotin	10 mg
thiamine	100 mg
$NaMoO_2 \cdot 2H_2O$	96 mg
$VO_2SO_4 \cdot xH_2O$	10 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.2 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.3 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	64 mg
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	48 mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.5 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	500 mg

---

Table 1.1-1 完全合成培地 80 l 用の組成

---

yeast extract	2.4 kg
polypeptone	4.0 kg
glucose	0.8 kg
NaCl	1.6 kg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	48 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500 mg
biotin	10 mg
thiamine	100 mg

---

Table 1.1-2 半合成培地 80 l 用の組成



---

50 mM Tris-HCl (pH7.5)  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
6 mM  $\beta$ -mercaptoethanol  
50 mM KCl  
5  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -S-adenosyl-methionine

---

Table 2.1-1 メチラーゼ活性測定反応液の組成  
上記組成全量50 $\mu\text{l}$ に基質tRNA0.1OD260unitを加えて用いる。

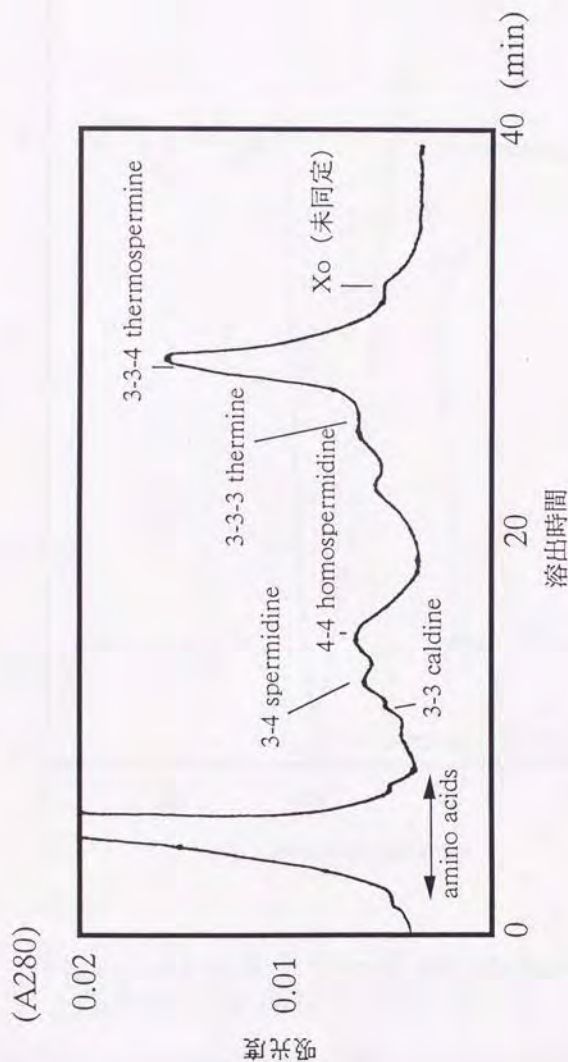


Fig 2.2 ポリアミン分析

*T. thermophilus* HB27の5%TCA抽出液を10倍希釈し、逆相カラムCK10Sを接続したHPLCをもちい、酢酸ナトリウム(pH5.0)溶液で流速30ml/hourで溶出させた。

A280

cpm

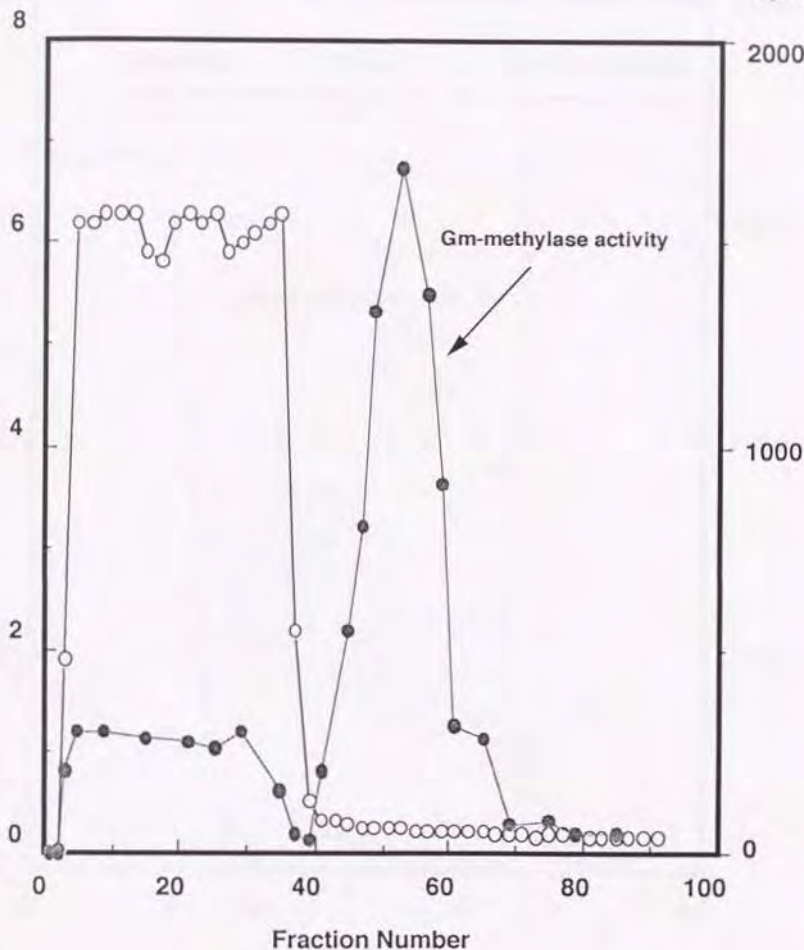


Fig2.3 Gm-メチラーゼのCM-Sephadex C-50による溶出パターン

カラム内径15mm、長さ450mm、CM-Sephadex C-50 容積80mlのカラムを用い、DE52 flow through画分(6.2A280units/ml x 462ml)をKCl濃度を100mMに高めてから吸着させた。溶出は100-500mM (500-500ml) KCl直線濃度勾配により流速0.4ml/minで行ない、1フラクションは15mlずつ分取した。



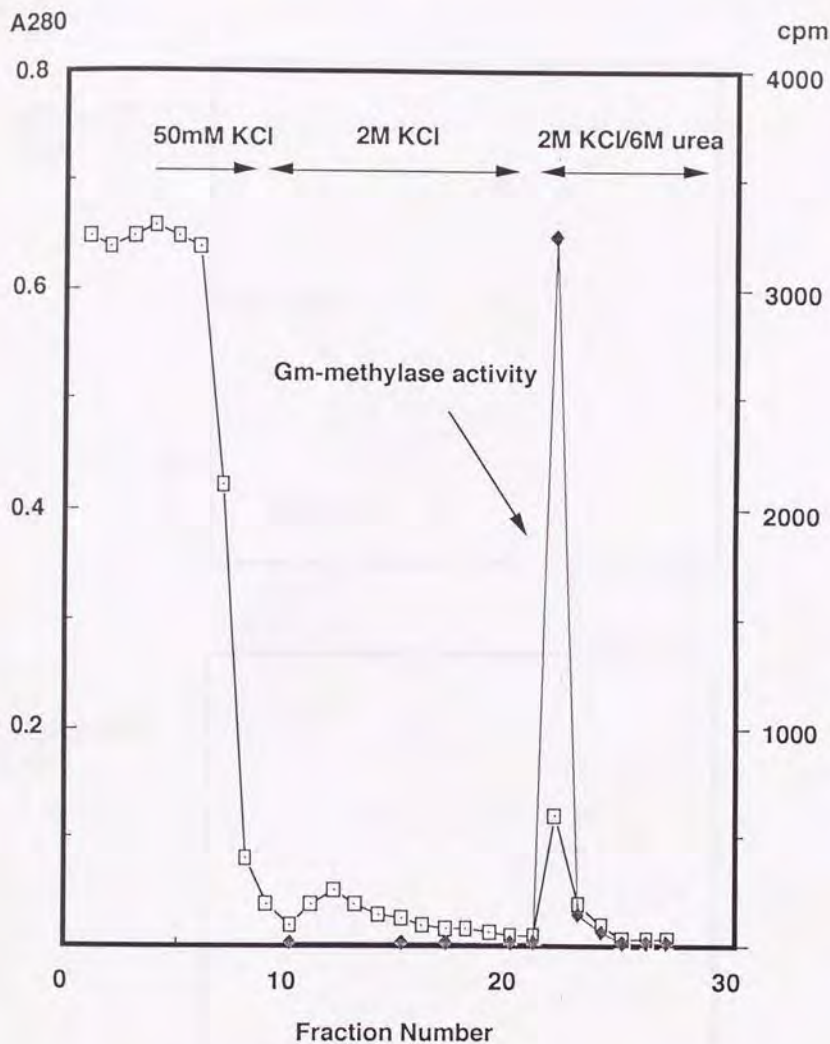
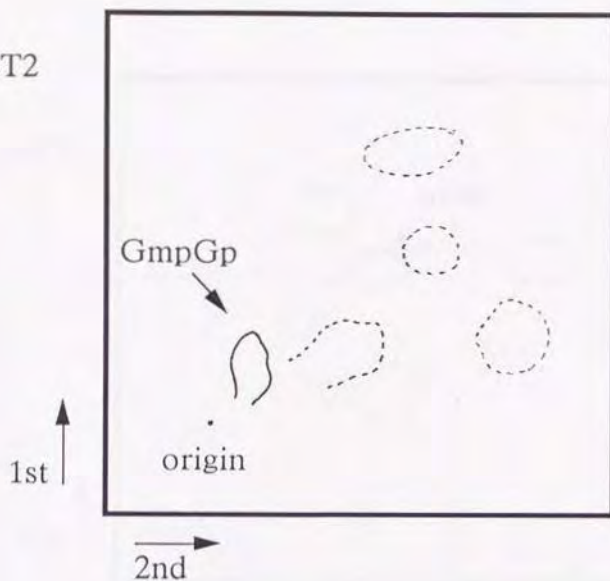


Fig 2.4 Gm-メチラーゼの  
SAH-Sepharose 4Bによる溶出パターン

カラム内径5mm、長さ250mm、SAH-Sepharose 4B容積18mlのカラムにCM-Sephadex C-50溶出活性画分(0.64A280/ml x 240ml)をKCl濃度はそのまま吸着させ、20mlの50mM KCl /St. buffer、60mlの2M KCl/St. bufferで順次洗った後、2M KCl/6M urea/St. bufferで溶出させた。溶出時の流速は1.5ml/min、1フラクションは4mlずつ分取した。

RNaseT2  
分解



NucleaseP1  
分解

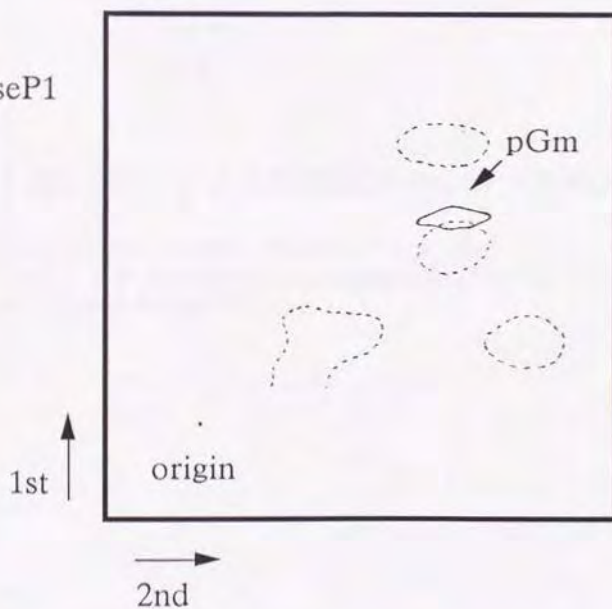


Fig2.5 2次元TLCによる修飾塩基の分析

NucleaseP1  
分解

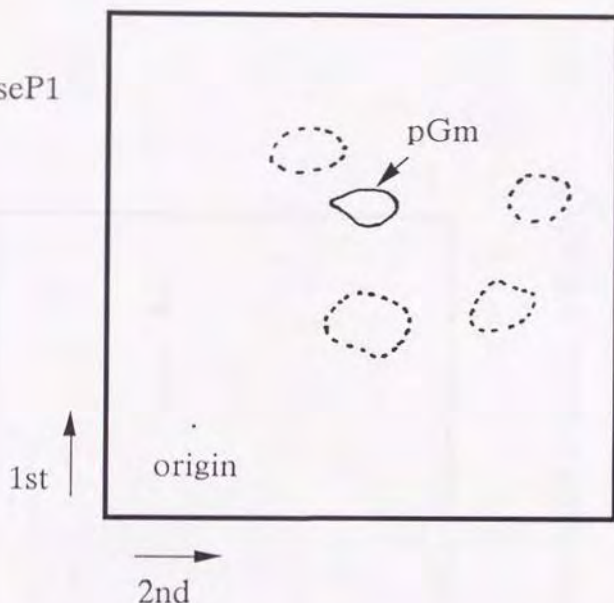


Fig2.5 2次元TLCによる修飾塩基の分析 (その2)

展開溶媒系を1次元目はイソ酪酸：アンモニア：水 (66 : 1 : 33) 、2次元目は100mM リン酸ナトリウム(pH6.8)100ml+硫酸60g+n-プロパノール2mlにかえた。pCとpGmのスポットが分離する。



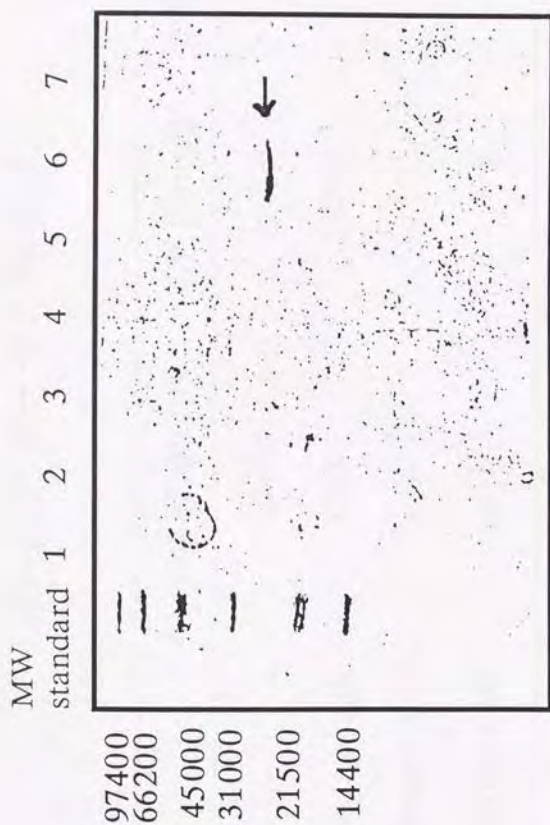


Fig 2.6 Gm-メチラーゼの15%SDS-PAGEによる分析

SAH-アフィニティカラムから溶出させた試料をそのまま、15%SDS-PAGEによって分析した。レーン1-7は各々、Fig 2.4の分画番号17-23に対応する。レーン6 (Fig 2.4のフラクション22) にほぼ均一標品に精製されたGm-メチラーゼが確認できる。

# Gm-メチラーゼの精製表

画分	タンパク質量(mg)	活性(units)	比活性(units/mg)
S-100	51255	18500 *	0.36 *
DE52 flow through	12096	10500 *	0.87 *
CM-Sepharose CL-6B	31	192	6.19
SAH-Sepharose 4B	0.121	128	1057

\* 他のtRNAメチラーゼ活性を含む

## 第二部 Gm-メチラーゼの最低限必要とするtRNAの構造



1. G m-メチラーゼはtRNAのどこと会合するのか

### (目的)

G m-メチラーゼは基質としてtRNAの全構造を必要としない、tRNAの一部のみでも基質としうることはこの研究を開始した時点ですでに松本らによって報告されていた<sup>(10,17)</sup>。この事実はすなわち、G m-メチラーゼの本質的基質がtRNAのごく限られた領域のみであることを示唆している。tRNA-メチラーゼの基質認識に関する議論には歴史的に2つの考え方があった。1つはソ連のBeyevらによって提唱された仮説<sup>(11)</sup>でtRNA-メチラーゼは基質としてtRNAの全構造を必要としており、その部分構造のみではもはや基質とはなりえないというものである。一方、西村らはtRNA-メチラーゼの基質認識にはtRNAの全構造が必要かもしれないが、メチル化反応自身はその部分構造でもおこりえるという説<sup>(12)</sup>を主張していた。松本らの研究はこの相反する2つの仮説のうち、前者を完全に否定するものであり後者を修正するものであった。現在では大腸菌 $m^5U(54)$ -methyltransferase<sup>(13)</sup>や高度好熱菌 $m^1A(58)$ -methyltransferase<sup>(14,15,16)</sup>でもG m-メチラーゼ同様の現象が報告されており、tRNA-メチル化酵素が基質としてtRNAの全構造を必要としないという性質は一般に認知されつつある。

それではG m-メチラーゼが本質的に必要とするtRNAの一部分とはいったい、どこなのであろうか。本章では、フットプリンティングの手法を用い、まず、おおまかなG m-メチラーゼのtRNAとの会合部位を示したのち、T7 RNA polymerase による転写産物の解析などを通して必要最小限なRNAフラグメントを特定する作業をおこなった。

# Gm-メチラーゼのメチル化できる基質とできない基質

34

## Gm-メチラーゼがメチル化できる

共通配列 G18G19 をもつほとんどすべての tRNA

原核生物	{	大腸菌 tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub>	枯草菌 tRNA <sup>Val</sup>	**
		大腸菌 tRNA <sup>Ile</sup>	枯草菌 tRNA <sup>Thr</sup>	**
		大腸菌 tRNA <sup>Glu</sup> <sub>2</sub>	枯草菌 tRNA <sup>Lys</sup>	**
		大腸菌 tRNA <sup>Lys</sup>	枯草菌 tRNA <sup>Gly</sup>	
古細菌	——	<i>Hallobacterium</i>	tRNA <sup>Met</sup> <sub>i</sub>	
真核生物	——	酵母 tRNA <sup>Phe</sup>		*

Dアーム構造をもつ tRNA フラグメント

大腸菌 tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub>	5'-半分子	***
酵母 tRNA <sup>Phe</sup>	5'-半分子	***
大腸菌 tRNA <sup>Ile</sup>	5'-半分子	



## Gm-メチラーゼがメチル化できない

共通配列 G18G19 がすでにメチル化されている tRNA

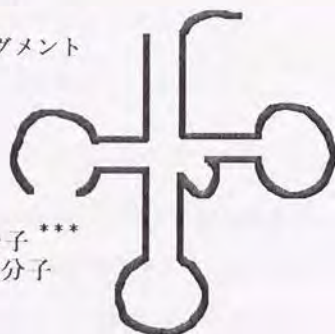
高度好熱菌 tRNA <sup>*</sup>	
大腸菌 tRNA <sup>Tyr</sup>	****

Dアーム構造が形成されない tRNA フラグメント

1/4 分子 \*\*\*



1/4 分子 \*\*\*  
+ 3/4 分子



\*\*\* { GG  
poly(G)  
GG 配列を含むペンタマー以下の RNA フラグメント

無印はこの論文ではじめて発表したデータである。

\*印つきは下記の論文を引用した。

\* 文献(3)    \*\* 文献(17)    \*\*\* 文献(61)    \*\*\*\* 文献(10)

## 1.1 フットプリンティング

## (材料)

大腸菌tRNA<sup>Met</sup>は小山淳氏より画分をいただき、BD-cellulose, RPC-5カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7M urea)により精製した。トルラ酵母5S rRNAは西川一八博士よりいただいた。Bacterial alkaline phosphatase (BAP)A19とT4 polynucleotide kinase(PNK)A19は宝酒造より購入した。 $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP(3000Ci/mmol)はアマシャム社より購入した。

## (方法)

5'-末端標識tRNAを作製し、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7M urea)によって精製した。これらの方法は下記のように別途記載する。ただし、ゲルから抽出したtRNAをエタノール沈殿する際には、トルラ酵母5S rRNAをキャリアーとしてtRNA 0.8pmole に対して22pmoleの割合で加えた。これはGm-メチラーゼをキャリアーtRNAに奪われないようにするための処置である。

こうして得た5'-標識大腸菌tRNA<sup>Met</sup> 0.8pmoleに対してGm-メチラーゼを3.5pmoleの割合で加え、10mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2.5mM KCl 緩衝液20 $\mu$ l中で37°C、30分間反応させ、tRNA<sup>Met</sup>とGm-メチラーゼ複合体を形成させた。RNaseT1による部分分解は上記複合体を含む溶液に対して、RNaseT1を0.3もしくは3units, 0°C、30分間作用させることによって行なった。反応はフェノール処理によって停止させ、20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動(7M urea)によって分析した。ただし、ここでは泳動中の発熱に



よりバンドが曲るのをふせぐため、ゲルおよび泳動緩衝液は0.5xTBE緩衝液をもちいた。ゲルはオートラジオグラフィーをとった後、各バンドを切り出し、チエレンコフ法によって放射活性を測定した。

# tRNAの5'-末端標識-----

- (1) tRNA 0.1A260unitを滅菌水10 $\mu$ lに溶解する。
- (2) (1)の試料に 10xBAP 緩衝液\* 1.2 $\mu$ lを加える。
- (3) E. coli strain A19 bacterial alkaline phosphataseを0.02unit加える。(宝酒造で市販されている酵素は0.2unit/ $\mu$ lなので使用直前に滅菌水で希釈する。)
- (4) 37°C、30分間 インキュベートする。
- (5) 滅菌水 40 $\mu$ lを加える。
- (6) 常法にしたがい、フェノール-クロロホルム処理、クロロホルム-イソアミルアルコール処理の後、3M 酢酸ナトリウムを5 $\mu$ l加えエタノール沈澱する。
- (7) 沈澱を風乾する。
- (8) 沈澱に滅菌水8 $\mu$ lをくわえてとかす。
- (9) 10xPNK 緩衝液\*\* 1 $\mu$ lを加える。
- (10)  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP(3000Ci/mmol)1 $\mu$ lとT4 polynucleotide kinase (6unit/ $\mu$ l)を1 $\mu$ lを加える。
- (11) 37°C、40分間インキュベートする。
- (12) 反応停止はローディング色素液\*\*\*を加えることにより行ない、5'-末端を標識したRNAは15%ポリアクリルアミドゲル(7M 尿素)で分離精製する。

\* 10xBAP 緩衝液

100 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>

## \*\* 10xPNK 緩衝液

500 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 2-mercaptoethanol

## \*\*\* ローディング色素液

2xTBE 緩衝液\*\*\*\*、0.02% トリジンブルーO、0.02% プロムフェ  
ノールブルー、8M 尿素

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7M 尿素) -----

### (1) 40% アクリルアミド溶液の調製

アクリルアミドモノマー 380g とビスアクリルアミド 20g を脱イオン水 1l に溶解し  
45 $\mu$ m のフィルターを通過する。4°C に保存する。

### (2) 泳動用緩衝液の調製

泳動用緩衝液は 1xTBE 緩衝液\*\*\*\* をもちいた。

### (3) ゲル保存溶液の作成

40% アクリルアミド溶液を使用濃度になるように 1xTBE 緩衝液、7M 尿素で希釈す  
る。(今回は終濃度 15% である。) 4°C に保存する。

### (4) ゲルの固め方

ゲル保存溶液 10ml にたいして 20% 過硫酸アンモニウム 10 $\mu$ l と N,N,N',N'-テトラメ  
チルエチレンジアミン 10 $\mu$ l を加え固まらないうちに泳動用ガラス板に注ぎこみ、放  
置して固める。

## \*\*\*\* 1xTBE 緩衝液

45 mM Tris base

45 mM boric acid

1 mM EDTA

上記組成を混ぜると通常pH8.3になるのでそのまま使用する。

### (結果)

オートラジオグラフィーの結果はFig1-1にまとめた。また、参考として松本氏のデータ(17:共著の論文より転載)もあわせて載せた。図中、丸でかこった塩基が酵素が結合することによってRNaseT1の分解を受けにくくなった箇所、逆に四角でかこった塩基は分解を受けやすくなった箇所である。RNaseT1による分解を受けにくいと言うことはその塩基の近傍に酵素が存在し立体障害となっていることを示している。また、分解を受けやすくなった箇所は酵素が結合することによってtRNAの高次構造がほどけ塩基が露出していると解釈できる。なお、このような解釈はイソロイシルtRNA合成酵素とtRNA<sup>Ile</sup>の複合体でも示されており、tRNA結合酵素がtRNAと複合体を形成することによってtRNAの一部がほどけるのは散見される現象である。

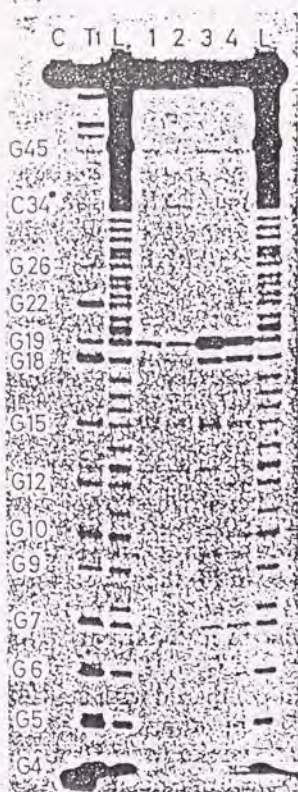
より定量的な議論を可能とするため、切り取ったゲルの放射活性のデータはFig1-2に示した。図は酵素を加えなかった場合のRNaseT1感受性を1とし、より分解を受けやすくなった場合には上方向に、逆に分解を受けにくくなった場合には下方向にカウントの相対比で示してある。実際のtRNAはL字型の高次構造をとっている。Fig 1-3はL字型構造上で分解を受けにくくなった部分と受けやすくなった部分を示している。



G m-メチラーゼの結合によって、分解を受けにくくなる部分は、D-ループ周辺、すなわち、酵素が直接基質として認識するべき、ごく限られた領域のみであることがわかった。

逆に分解を受けやすくなる領域はtRNA全体にかなり広範に分布している。なかでもアミノアシルシステムの5'-末端寄りにはtRNAの種類を変えても最もよく分解を受ける。この事実は、G m-メチラーゼが結合するとアミノアシルシステムがほどけてしまうことを意味している可能性が強い。たとえ水素結合が切断されていなくてもシステム全体の構造はかなりゆるんでしまっていることはまちがいない。また、エクストラループやTステムのG塩基もよく切断されるようになる。このことはG m-メチラーゼがtRNAと結合するとtRNAが本来形成しているDループとTループの会合やDループとエクストラループの会合は切断されてしまうことを意味している。さらに大腸菌のtRNA<sup>Met</sup>を基質として使用した場合にはアンチコドン1文字目のCでの切断が観察された。このCは普通、RNaseT1では全く切断されない箇所である。どのようなメカニズムで分解を受けやすくなっているのかはわからないがtRNA全体の構造のゆがみの影響がアンチコドンループにまで及んでいるのは確かである。

(a)



(b)

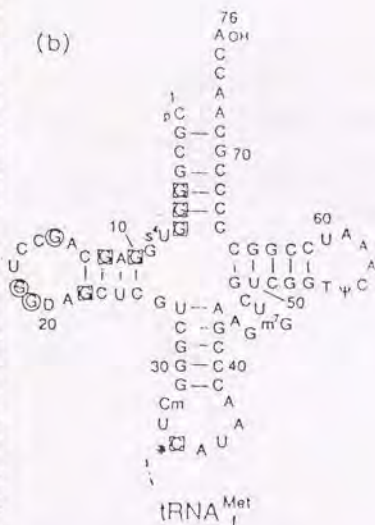
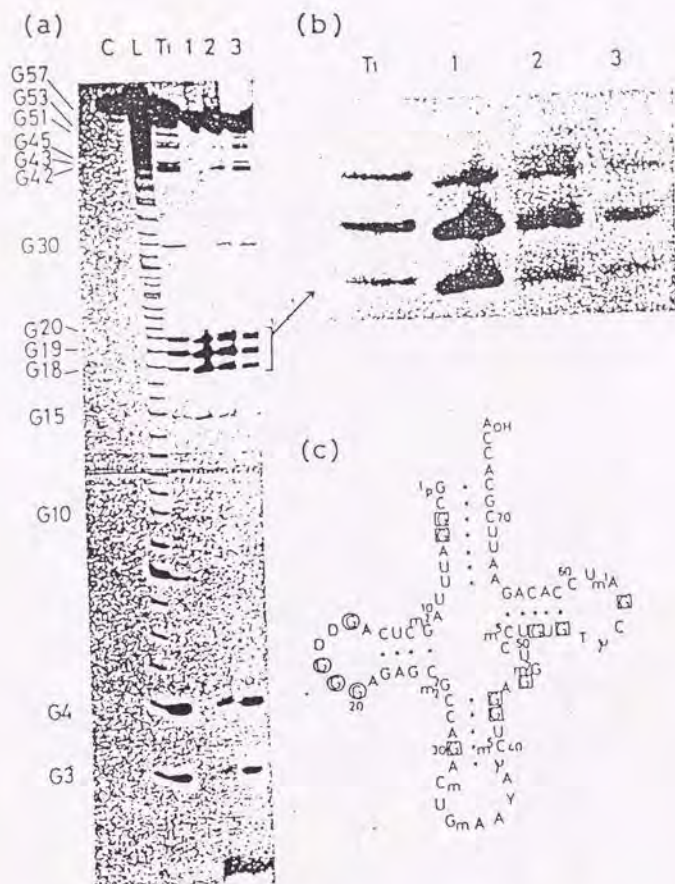


Fig1-1 大腸菌メチオニンtRNAを使用したフットプリンティングの結果

各レーンは(C) control. enzyme-, (T1) RNaseT1によるGラダー、(L) アルカリラダー、(1) RNaseT1 0.3units、(2) RNaseT1 0.3units+Gm-methylase、(3) RNaseT1 3units、(4) RNaseT1 3units+Gm-methylase

クローバーリーフ構造で○で囲った塩基はRNaseT1分解からプロテクトされた塩基、□で囲った塩基は逆に分解が促進された塩基をしめす。



(参考)

酵母フェニルアラニンtRNAを使用したフットプリンティング

松本 隆博士との共著論文(17)より転載した。

各レーンは(C) control enzyme-, (L) アルカリラダー、(T1) RNaseT1によるGラダー、(1) RNaseT1 0.3units, (2) RNaseT1

0.3units+Gm-methylase 100pmole, (3) RNaseT1

0.3units+Gm-methylase 200pmole

○で囲った塩基はプロテクト部位、□で囲った塩基はRNaseT1による分解を受けやすくなった部位である。



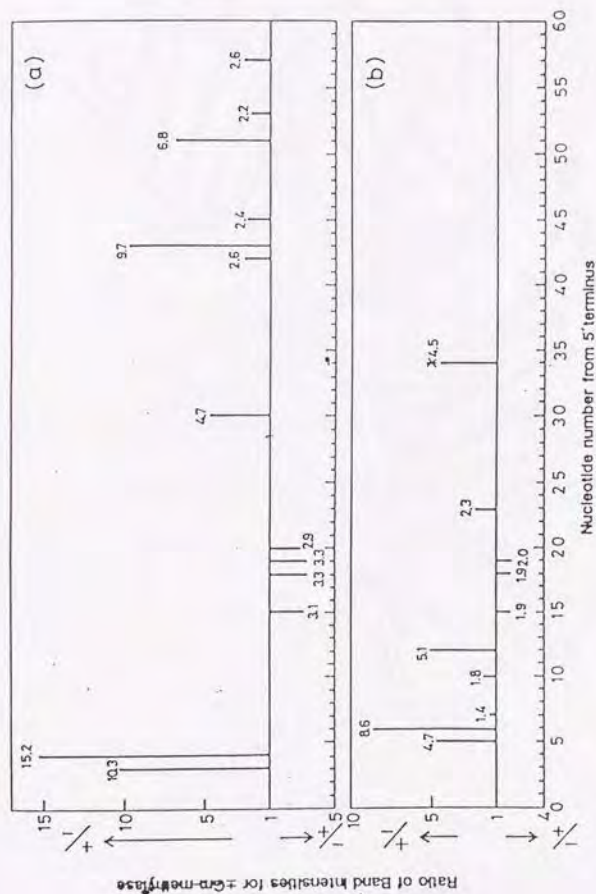


Fig 1-2 フットプリンティングの結果を定量化した図  
 オートラジオグラムをとったゲルは各バンドを切り取り、チエレンコフ法で放射活性を測定し  
 た。Gm-methylaseを加えなかった時の放射活性を1として、加えた場合の相対比を算出した。  
 上段は酵母フェニルアラニンtRNAの結果で、下段は大腸菌メチオニンtRNAの結果である。

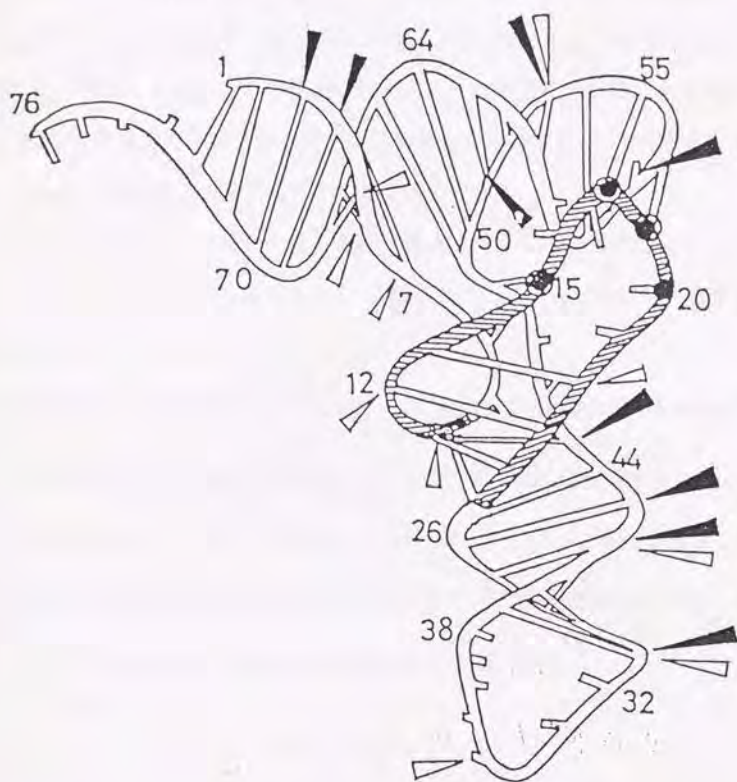


Fig1-3. フットプリンティングの結果をL字型構造上にプロットした図  
 L字型tRNAは酵母フェニルアラニンtRNAをもとにしており、ポジション  
 番号もそれに従った。図で黒△は酵母フェニルアラニンtRNAのRNaseT1分  
 解エンハンス部位、白△は大腸菌メチオニンtRNAのRNaseT1分解エンハ  
 ンス部位である。プロテクトされた塩基は黒○でしめした。両者のプロテクシ  
 ョン部位は斜線で陰をかけた。

## 1.2. 4-チオウリジン残基の化学修飾と分子内架橋

### (目的)

Gm-メチラーゼはtRNAの限定分解フラグメント (5'-半分子) をも基質とすることができる。半分子フラグメントはtRNA全体が存在する時に構成されるL字型構造をもはや形成しえない。この事実はGm-メチラーゼの基質認識で必要不可欠な要素にはL字型構造が含まれておらず、塩基配列自身やステム-ループ構造などのより低次の構造が本質的に必要であることを意味している。

そこで、半分子フラグメントに含まれる構造のうち、一次構造で、かつ今まで確認されたGm-メチラーゼの基質すべてに共通なU8を修飾してその効果を検討することにした。

半保存配列U8は大腸菌tRNA<sup>Met</sup><sub>f</sub>など一部のtRNAではs<sup>4</sup>U8に修飾されている。

s<sup>4</sup>Uは反応性が高く選択的に化学修飾を行なったり、分子内架橋を形成させることが可能である。ここではS-benzylthioisothioureaをもちいて化学修飾を行なうか、紫外線照射により分子内架橋を形成させるかして、s<sup>4</sup>U8を選択的に修飾し、Gm-メチラーゼの基質認識における半保存配列U8の意義を検討した。

### (材料)

S-benzylthioisothioureaは実吉博士よりいただいた。大腸菌tRNA<sup>Met</sup><sub>f</sub>は1.1章に記述した方法で精製した。



47  
(方法)

4-チオウリジンの特異的な化学修飾試薬S-benzylthioisothiourea (sBTIUと略す)はFig1.3-1に示す反応により可逆的に4-チオウリジン残基を修飾する。大腸菌tRNA<sup>Met</sup><sub>f</sub> 50 A260unitsを100 mMリン酸緩衝液 (pH 7.3) 500μlに溶解し、これにエタノール250 μlに溶解させたsBTIU 2.5 mgを室温下で激しく攪拌しながら5分間反応させた。ついでエタノール沈殿を3回繰り返してなるだけ未反応の試薬をのぞき、BD-セルロースカラムクロマトグラフィーによって修飾されたtRNAを精製した。この化学修飾反応は可逆反応であり、β-メルカプトエタノールによって容易に化学修飾試薬は除去される。そこで、β-メルカプトエタノールを終濃度100 mMになるように標準緩衝液に溶解させた化学修飾tRNAに加え室温下で2時間反応させた後エタノール沈殿して回収し、還元してもとどおりになったtRNAも作製した。

4-チオウリジンの架橋反応はマナスライトを使用し365nmの紫外線を照射することによって行なった。50mM Tris/HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM KCl 緩衝液1mlに大腸菌tRNA<sup>Met</sup><sub>f</sub> 10.1A260unitを溶解させ、これを経時的に分取してあとでCD-スペクトルを測定することによって架橋反応の進行状況を調べた。

半分子tRNAの作製方法は2.1.章の方法に準じた。ただし、使用したリボヌクレアーゼは、RNaseU2を用いた。

Gm-メチラーゼの酵素活性の測定はβ-メルカプトエタノールをのぞいた標準緩衝液を使用した。原則的には従来の方法と全く同じである。

m<sup>1</sup>A-メチラーゼの精製法および部分精製したアミノアシルtRNAシンセターゼ(S-100画分)の調製は文献に従った。

(結果)

BD-セルロースカラムによる修飾tRNAの溶出パターンはFig1.3-2に図示した。

修飾tRNAはsBTIUが結合することによって疎水性が高くなり、大腸菌tRNA<sup>Met</sup><sub>t</sub>が本来溶出されることのないエタノール領域に溶出される。未反応のtRNAはエタノールを含まない領域に溶出される。

この修飾tRNAがメチオニンtRNAであることはアミノ酸受容活性を測定することによって確認した。化学修飾tRNAのアミノ酸受容能は文献どおり未修飾tRNAのそれと変わらないことも確認した。この化学修飾反応は可逆反応であり、β-メルカプトエタノールによる還元反応によって容易に修飾試薬が除去される。除去後のアミノ酸受容活性も変化しないことを確認した。

4-チオウリジン残基の分子内架橋はCD-スペクトルの分子楕円率のシフトする様子でモニターしたが、3時間の照射ではほぼすべての4-チオウリジン残基が反応を終えることがわかった。このようすはFig1.3-3に示した。

sBTIU修飾tRNA、β-メルカプトエタノール還元tRNAおよび4-チオウリジン架橋tRNAを基質としたGm-メチラーゼおよびm<sup>1</sup>Aメチラーゼのメチル化反応の初速はTable1.3-1にまとめた。Gm-メチラーゼは温度感受性の異なるHB8型とHB27型の両方を測定した。いずれのGm-メチラーゼもsBTIU修飾tRNAに対してはその初速を60%前後減少させることがわかった。一方、m<sup>1</sup>Aメチラーゼはその活性がわずかではあるが上昇する傾向にあり、メチル化反応自身は阻害を受けなかった。アミノ酸受容活性自身は先に述べたようにほとんど変化がない。β-メルカプトエタノール還元tRNAのメチル化酵素の基質としての特性は化学修飾を加える前のtRNAとまったく変わらない。4-チオウリジン架橋tRNAはGm-メチラーゼの基質としてsBTIU修飾tRNAよりさらに劣悪であり、そのメチル化活性の初速は70%前後減少する。なお、このtRNAもアミノアシル化活性は変化がない。

これら4-チオウリジン修飾tRNAの半分子フラグメントの10%ポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動(7Murea)での電気泳動パターンはFig1.3-4に示した。化学修飾

tRNA<sup>Met</sup>の5'-半分子は0.24OD, 4-チオウリジン架橋tRNA<sup>Met</sup>の5'-半分子は

0.16A260unitを初発tRNA1.0A260unitから得ることができた。なお、この半分子フラグメントの作製は数次に渡って繰り返した行なったが、収量はほぼ上述の値と変わらなかった。

H B 27 G m-メチラーゼの酵素学的パラメーターを測定した結果はTable1.3-2にまとめた。この結果、sBTIU修飾tRNAでは何の処理もほどこさなかったtRNAと比較してKm値が大きく上昇しており、これが初速に対して大きな影響を与えていることがわかった。一方、4-チオウリジン架橋tRNAではKm値は架橋反応を行なう前のtRNAとほとんど変わらないがVmax値が大きく減少しており、これが結果的に初速に反映されることがわかった。また、半分子フラグメントでは各フラグメント間のKm値、Vmax値の差はそれほどなくなり4-チオウリジン残基を修飾した効果はtRNAの全構造が存在した時に最も発揮されることがわかった。

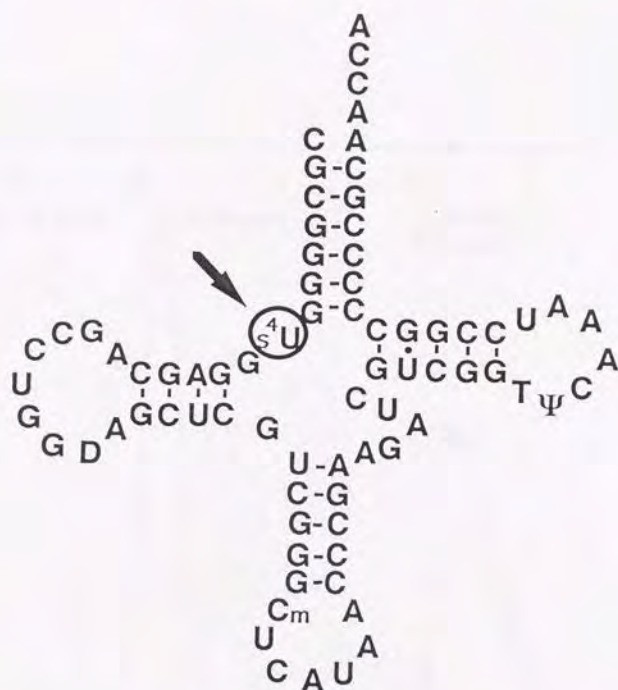


## (考察)

ここでは二通りの方法で4-チオウリジンを修飾し、それがメチル化活性にどのような影響を及ぼすかを調べた。初速の測定ではsBTIU化tRNAも4-チオウリジン架橋tRNAも天然のtRNAに比較してメチル化されにくくなっていることが示されたが、その酵素学的パラメーターを測定すると両者の基質としての特性はまったく異なることがわかる。すなわち、sBTIU化tRNAは $K_m$ 値が大きくなっており酵素とtRNAとの親和性が低下することによってメチル化されにくくなっているし、一方、4-チオウリジン架橋tRNAは $V_{max}$ 値が減少しておりそれが直接メチル化活性の低下に反映されていた。この実験結果は酵素反応が少なくとも二つのステップにより構成されていると考えれば合理的に説明することができる。まず、第一のステップは酵素が基質であるtRNAを認識し結合する段階である。ここで認識される構造は天然のtRNAが通常とっているL字型構造が最適である。sBTIU化されたtRNAは4-チオウリジンとDループとの水素結合が切断されており、当然、そのL字型構造は本来の形とは異なったものになってしまっているにちがいない。それ故、 $G_m$ -メチラーゼとsBTIU化tRNAの親和力が低下しているのだろう。4-チオウリジン架橋tRNAはこの水素結合によって形成されるべきDループの構造が共有結合によって固定されており、その親和性自身には影響が現われていないのであろう。第二のステップは酵素がtRNAの構造をときほぐし活性中心を基質にすりあわせ、実際にメチル基転移を行なう段階である。この段階までくるとsBTIU化tRNAは天然のtRNAにかなり近い基質として処理される。 $V_{max}$ 値は4-チオウリジン架橋tRNAほどは減少せず、もはや、4-チオウリジン残基とDループ間に水素結合が存在したかどうかは問題にならなくなっている。つまり、天然のtRNAにおいてもこの段階では4-チオウリジン残基とDループの会合は断たれていることをこの結果は示している。sBTIU化tRNAの $V_{max}$ 値の減少は化学修飾試薬による立体障害の影響があらわれているもの

と考えるのが妥当であろう。松本らのCD-スペクトル解析<sup>(10)</sup>によると、酵素-tRNA複合体において4-チオウリジン残基は運動性の自由度が極めて制限された狭い空間に閉じ込められている。ここにさらに余計な構造が割り込むのであるから、酵素が直接4-チオウリジン残基と結合しているかどうかは別として、何らかの形で立体障害の影響が生じていても不思議ではない。一方、4-チオウリジン架橋tRNAにはこの段階で初めて問題が生じてくる。酵素とtRNAとの一次的な会合にはなんら支障とはならなかった4-チオウリジンとC13との間の結合であるが、活性中心をDループの的確な部位にすりあわせるのには足枷となっているのであろう。結果としてVmax値の減少として現われる。

この様子は5'-半分子フラグメントの酵素学的パラメーターの測定によってさらに浮き彫りにされてくる。sBTIU化tRNAはtRNA全分子の状態では酵素との親和性が減少していたのが、5'-半分子フラグメントではそのKm値がほとんど未修飾分子と変わらず親和性に影響が出ていないことがわかる。これはすなわち、5'-半分子フラグメントの状態では4-チオウリジン残基とDループ間の水素結合は存在しないことを示している。さらにGm-メチラーゼが第一義的に認識しているtRNAの高次構造、つまりL字型構造中のDアーム部分の構造には共通配列U8の存在が重大な影響を与えていると換言することも可能であろう。また、4-チオウリジン架橋tRNAの5'-半分子フラグメントのKm値が天然のtRNAよりさらに小さいのは、この架橋の影響が本来tRNA全分子中でDアームが形成する構造を固定する方向に働きプラスの効果として現われるからであろう。



*E. coli* tRNA<sup>Met</sup><sub>f</sub>

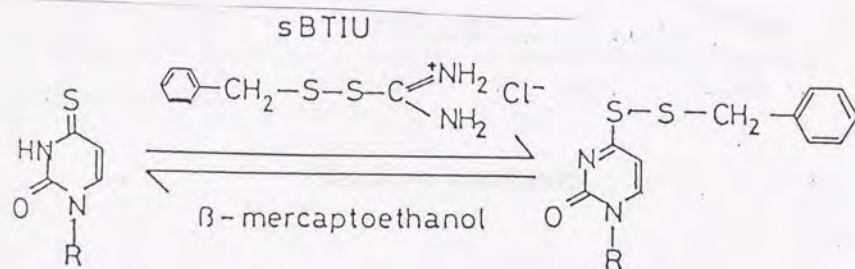


Fig1.2-1 sBTIUによるs4Uの反応  
 sBTIUは大腸菌メチオニンtRNAに1箇所（ポジション8）存在するs4Uと可逆的に反応する化学修飾試薬である。



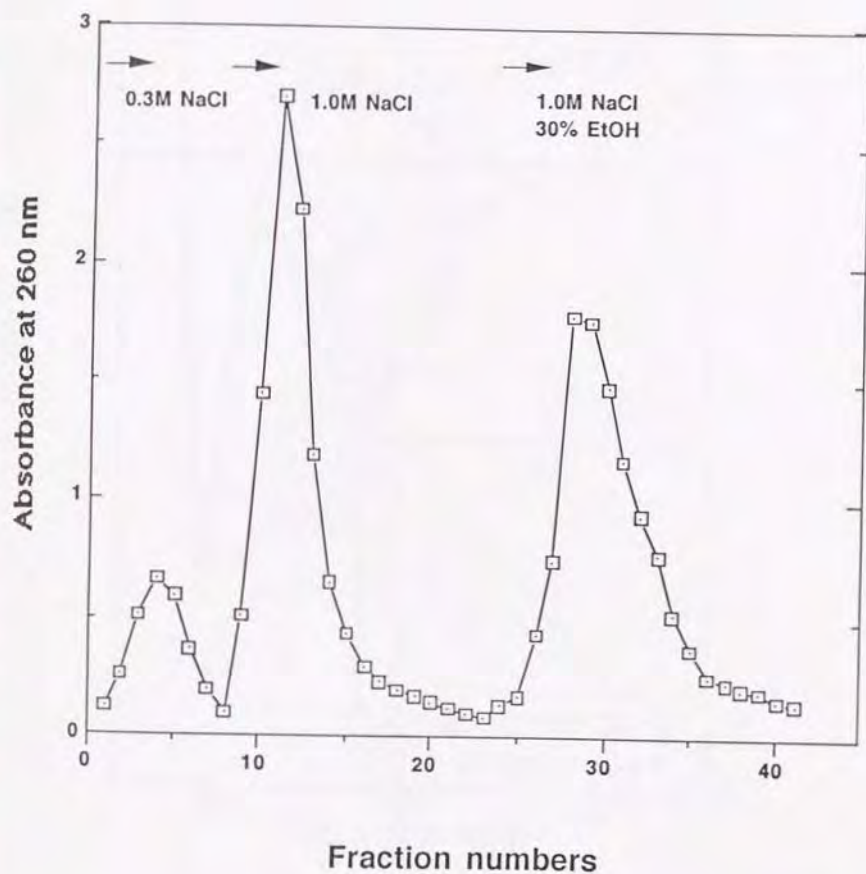


Fig 1.2-2 sBTIU-大腸菌メチオニンtRNAのBD-セルロースカラムによる溶出パターン

sBTIU化されたtRNAは疎水性が増加するため、BD-セルロースに強く吸着し、エタノール領域に溶出される。未反応の大腸菌メチオニンtRNAは1.0M NaClによって先に溶出され、除くことができる。

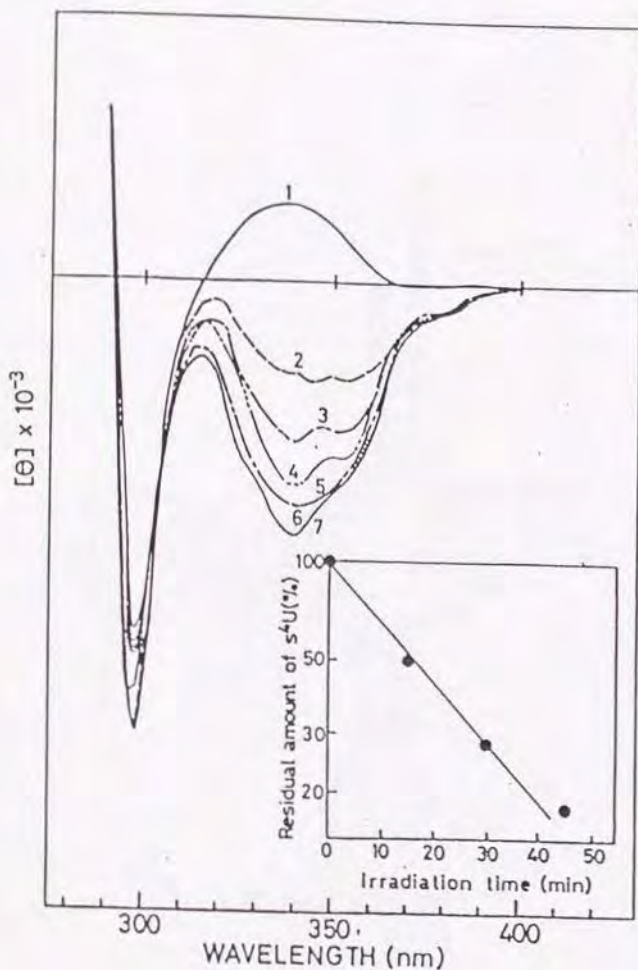


Fig 1.2-3 紫外線による大腸菌メチオニンtRNAの分子内架橋

大腸菌メチオニンtRNAに対して365nmの紫外線を照射し、s4U(8)-C(13)の分子内架橋の経時的進行状況をCD-スペクトルを測定することによってモニターした。各番号は照射開始後、1: 0分、2: 15分、3: 30分、4: 45分、5: 90分、6: 180分、7: 22時間経過した時のスペクトルを示す。  
180分経過後はスペクトル変化がなく、180分ではほぼすべての大腸菌メチオニンtRNAの分子内架橋が完了した。

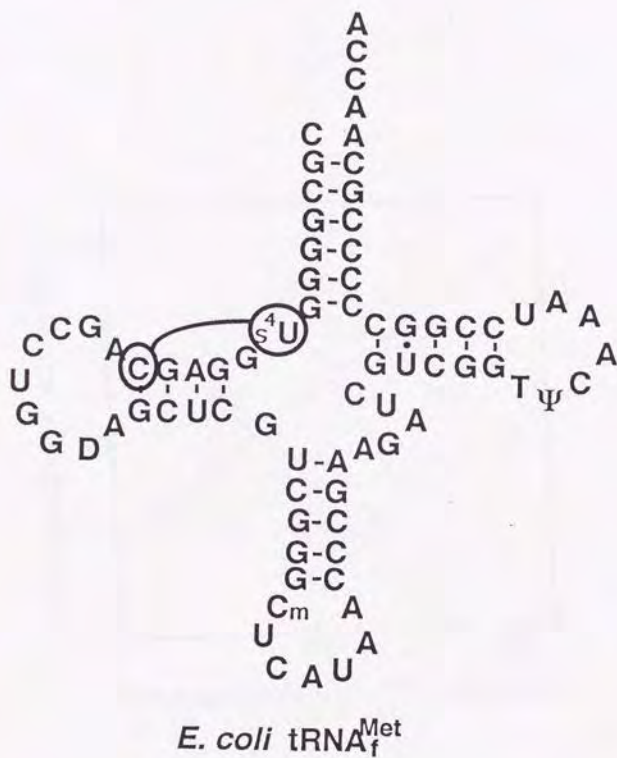


Fig 1.2-4 大腸菌メチオニンtRNAの分子内架橋  
図のs4U(8)-C(13)の間が架橋される。



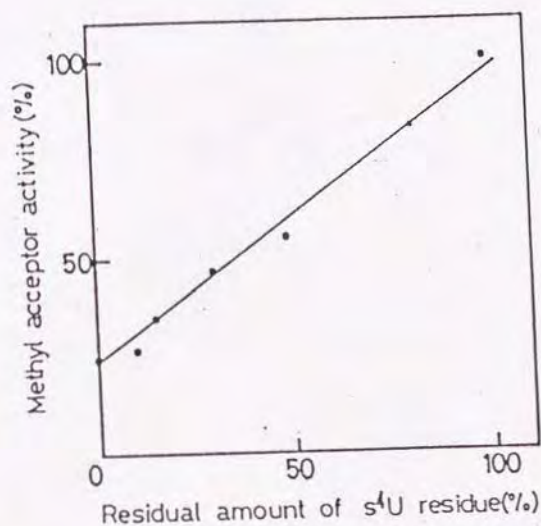


Fig1.2-5 s<sup>4</sup>U(8)-C(13)分子内架橋とGm-メチラーゼ活性の相関  
 340nmの分子楕円率より算出したs<sup>4</sup>U量とGm-メチラーゼの初速は1次的な相関をしめす。しかしながら、ほぼ100パーセントのs<sup>4</sup>Uが架橋されていても活性は0にはならない。

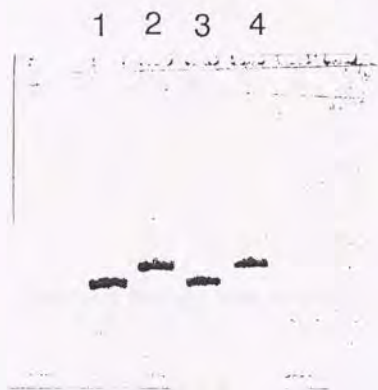


Fig1.2-6 s4U修飾大腸菌メチオニンtRNAから得られた半分子フラグメントの10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

各レーンは1: sBTIU-tRNA 5'-半分子フラグメント0.03A260units、2: sBTIU-tRNA 3'-半分子フラグメント0.03A260units、3: 分子内架橋-tRNA 5'-半分子フラグメント0.03A260units、4: 分子内架橋-tRNA 3'-半分子フラグメント0.03A260unitsを泳動した後、CBB(クーマシーブリリアントブルー)で染色した。

半分子フラグメントの作成方法は2.1章に後述する。分子内架橋された半分子フラグメントも化学修飾された半分子フラグメントもその移動度はほとんど変わらない。

1 2 3 4 5 6 7

.....

.....

.....

Fig1.2-7 s4U(8)-C(13)分子内架橋tRNAの10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

レーン1：紫外線未照射tRNA、2：15分照射、3：30分照射、4：45分照射、5：90分照射、6：180分照射、7：22時間照射

紫外線照射によってtRNAの切断は起きておらず、その移動度は変化しない。



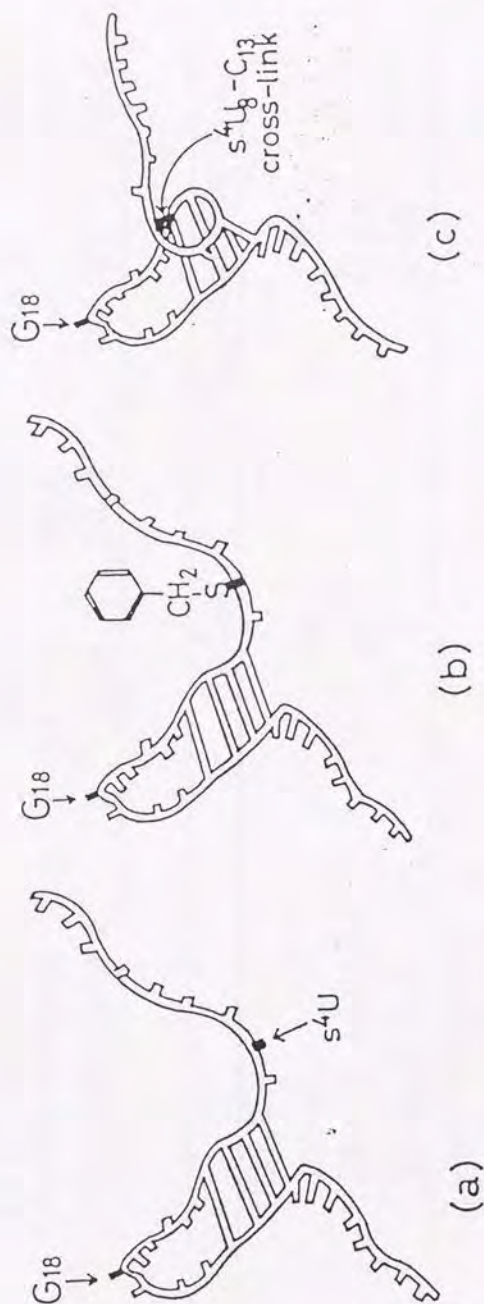


Fig1.2-8 3種類の5'-半分子フラグメントの模式図

(a) intact 5'-半分子フラグメント、(b) sBTIU-5'-半分子フラグメント、(c) 分子内架橋5'-半分子フラグメント

tRNA <sup>Met</sup>	Enzymes	Gm-methylase		m <sup>1</sup> A-methylase HB 27	S-100 HB 27
		HB 27	HB 8		
Native tRNA <sup>Met</sup>		100	100	100	100
sBTIU-modified		39.3	44.2	111.2	90.0
$\beta$ -ME-reduced		87.7	96.6	—	86.7
s <sup>4</sup> U-cross-linked		25.6	34.0	101.3	101.0

tRNA <sup>Met</sup>		K <sub>m</sub> (nM)	V <sub>max</sub> (nmol/mg·min)
Intact		<5	1.31
sBTIU-modified		42	0.85
Cross-linked		6	0.42
5'-half fragment			
Intact tRNA <sup>Met</sup>		40	1.15
sBTIU-modified		44	1.05
Cross-linked		29	0.71

## 2. 最小基質は何か

### 2.1. 酵母フェニルアラニンtRNAと大腸菌メチオニンtRNAの半分子のメチル化

酵母フェニルアラニンtRNAと大腸菌メチオニンtRNAの半分子は短鎖RNAの酵素活性を測定する上で標準基質として常に使用した。また、Gm-メチラーゼのロット検定を行なううえでも標準基質として使用した。

#### (材料)

酵母フェニルアラニンtRNAはベーリンガー社製の標品をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製してもらった。大腸菌メチオニンtRNAは小山淳氏よりいただいた画分をBD-セルロースおよびRPC-5カラムクロマトグラフィーにより精製した。RNaseAおよびRNaseU2はファルマシア社より購入した。

#### (方法)

##### 半分子フラグメントの作製

5'-半分子フラグメントの作製方法は原則的に西川、松本の方法<sup>(10,65)</sup>を参考にした。予備実験として松本の方法に従い、大腸菌メチオニンtRNA 10.0 A260unitに対してRNaseA 20μgを50mM トリス-塩酸(pH7.5), 20mM 塩化マグネシウム緩衝液 100 μl中で 0°C, 30分間 反応させてみたところ、tRNAがほとんど消化されてしまい、目的とする半分子フラグメントが得られないことがわかった(おそらく、RNaseのロット差によると思われる)。そこで、RNaseの最適使用量を検定することにした。

まず、大腸菌メチオニンtRNA 10.0 A260unitを50mM トリス-塩酸(pH7.5), 20mM 塩化マグネシウム緩衝液 100 μlに溶解させた試料を3本用意した。各々をエ



ッペンドルフ型遠心管に分注しアルミブロック上で70℃、5分間保温した後、電源を切り40℃以下まで自然冷却させアニーリング操作をおこなった。ついで、この試料を氷冷したのち、各々にRNaseA 100ng, 300ng, 1μgを加え40分間インキュベートし続けた。反応停止はフェノール-クロロホルム処理により、常法にしたがってエタノール沈澱でRNA画分を集めた。部分分解したRNAはその一部を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析しRNaseの最適使用量を検定した。分析を終えた後、試料すべてを分取用10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、F254蛍光板上で波長260nmの紫外線を照射し核酸の吸収をモニターしつつ対応するバンドを切り出した。切り出したゲル切片をゲル溶出緩衝液200μlに浸し37℃で終夜、抽出操作を行なった。抽出したRNAはエタノール沈澱によって回収した後、滅菌水で10.0 A260unit/mlの濃度に希釈した。

酵母フェニルアラニンtRNAの半分子フラグメントの作製方法も原則的に上記同様であるが、RNaseAの代りにRNaseU2を用いた。RNaseU2は酸性条件下で活性を示すので、アニーリング操作をおこなった後、終濃度100 mMになるように酢酸アンモニウム (pH5.7) を加えpHを整えた。RNaseU2はファルマシア社製のものを使用した。同社製品は独自の酵素活性ユニットを使用しているので活性を定量してから実験に用いた。

#### RNAの塩基配列決定法

RNAの塩基配列決定法はDonis-Keller法の西川による変法<sup>(23)</sup>を用いた。

## (1) 試料RNAの準備

塩基配列を決定するRNAは5'-末端か3'-末端を $P^{32}$ で標識する必要がある。ここでは5'-末端を標識した。bacterial alkaline phosphatase(BAP)による脱リン酸化とT4 polynucleotide kinase(PNK)によるリン酸化は1.1章に記述した。また、リン酸化フラグメントのポリアクリルアミドゲル電気泳動についても1.1章の方法に従った。

ゲルから溶出した標識RNAはチエレンコフ法で比活性を測定した後、1Mcpm/A260unitとなるようにコールドのRNAをキャリアーとして加え、エタノール沈澱で回収し20Kcpm/ $\mu$ lになるように滅菌水に溶解し-20℃で保存した。以降、この溶液をラベル溶液と称する。

## (2) 酵素反応とアルカリ分解反応

2-1. RNaseT1, U2, PhyM用にUrea-カクテル\*を500 $\mu$ l, RNaseCL3用にTris-Urea-カクテル\*\*を100 $\mu$ l作る。

2-2. ラベル溶液2 $\mu$ l,  $Na_2CO_3$ (pH9.0)8 $\mu$ lをよく混和し、90℃、90秒加熱して急冷する。これにUrea-カクテル10mlを加え、アルカリラダー液とする。

2-3. ラベル溶液5 $\mu$ lにUrea-カクテル45 $\mu$ lを加える。

2-4. 2-3.液を10 $\mu$ lずつ5等分する。

2-5. 2-4.液、各々を90℃、3分間、加熱し、急冷して高次構造をほぐす。

2-6. 2-5.液、各々に別々の酵素(RNaseT1\*\*\*\*, U2\*\*\*\*, PhyM\*\*\*\*\*)を加える。

あまった2本はコントロール(酵素マイナス)と予備とする。

2-7. 2-6.液、各々を55℃、20分間、酵素反応させる。

- 2-8. 2-7.液を急冷し、氷中に保存する。
- 2-9. ラベル溶液1μlにTris-Urea-カクテル5μlを加える。
- 2-10. 2-9.液にRNaseCL3\*\*\*\*\*を1μl加える。
- 2-11. 2-10.液を55℃、20分間、酵素反応させる。
- 2-12. 2-11.液を急冷し、氷中に保存する。

\* Urea-カクテル

1M Na-citrate (pH4.5), 0.1M EDTA, 1%BPB-1%XC, 9M urea

\*\* Tris-Urea-カクテル

1M Tris-HCl (pH7.6), 1%BPB-1%XC, 9M urea

\*\*\* RNaseT1

0.1unit/μl 100mM Na-citrate(pH4.5), 1mM EDTA

\*\*\*\* RNaseU2

1unit/μl 100mM Na-citrate(pH4.5), 1mM EDTA

\*\*\*\*\* RNasePhyM

1unit/μl 100mM Na-citrate(pH4.5), 1mM EDTA

\*\*\*\*\* RNaseCL3

1unit/μl 50mM Tris-HCl (pH7.6)

(3) 電気泳動

- (2) で作成したコントロール (酵素マイナス)、アルカリラダー液、2-8.液、2-12.液を15%もしくは20%ポリアクリルアミドゲルで同時に電気泳動し分析する。

この章では塩基配列を分析するRNAの鎖長が短いので15%ゲルを用いている。

Gm-メチラーゼによるメチル化活性の測定

反応温度を50℃とする他は前述の方法に従った。



(結果)

### 半分子フラグメントの作製

大腸菌メチオニンtRNAの半分子化ではtRNA10.0 A260unitに対してRNaseA 1 $\mu$ gを作用させるのが最適であった。Fig2.1-1に大腸菌メチオニンtRNAをRNaseAで部分分解し、その最適使用量を検定した10% PAGE(7Murea)の泳動パターンを示しておく。また、Fig2.1-2にポリアクリルアミドゲルによって精製した半分子フラグメントの泳動パターンを示しておく。大腸菌メチオニンtRNA10.0 A260unitを初発材料として5'-半分子フラグメントは1.19A260unit、3'-半分子フラグメントは1.78A260unit調製することができた。

酵母フェニルアラニンtRNAをRNaseU2で部分分解して作製した5'-半分子フラグメントも同様の方法で作製し精製した。RNaseU2の使用量はtRNA10.0 A260unitに対して27unitが最適であった。酵母フェニルアラニンtRNAの5'-半分子フラグメントはtRNA10.0 A260unitより2.38A260unit調製することができた。なお、ファルマシア社のユニット定義は一般の定義の1000倍であると思われる。

### RNAの塩基配列決定

酵母フェニルアラニンtRNAのRNaseU2による切断部位は緩衝液のpHによって異なることが西川によって報告されているが、10mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM MgCl<sub>2</sub>緩衝液中でアニールさせ、これに終濃度100 mMになるように酢酸アンモニウム(pH5.7)を加えた反応系ではほとんどの分子がアンチコドン3文字目のA36の3'側で切断されていることを塩基配列の上で確認した。Fig2.1-3にそのオートラジオグラムを掲げておく。このオートラジオグラムではA35の3'側で切断された分子の存在も確認されたのでゲルからバンドを切り取りチエレンコフ法によってその放射活性を測定し、両者の比をもとめた。その結果、A36の3'側で切断された分子が94%

を占めていることが確認された。

### G m-メチラーゼによるメチル化活性の測定

G m-メチラーゼの5'-半分子フラグメントに対する動力学的パラメーターはTable 2.1-1にまとめておいた。

#### (考察)

5'-半分子フラグメントがG m-メチラーゼの基質となりうることを最初に発見したのは松本隆氏である<sup>(10,17)</sup>。したがってここでの議論はすでに松本氏が議論した内容を含んでしまうのでその部分は必要最小限にとどめたい。

tRNA修飾酵素の基質認識にtRNAのどの部分が必要かという問題はtRNAに修飾塩基が発見されて以来ずっと議論されてきたtRNA修飾酵素研究の命題のひとつである。

初期の研究はtRNAの構造を決定することが修飾酵素の研究でもあった。どういうtRNAにはいかなる修飾塩基がどのように存在しているのか、そのこと自体が未知であった。やがてある程度、塩基配列の情報が蓄積してくると比較生化学の研究が行なわれるようになった。酵素自身は不明であってもその活性の痕跡は修飾塩基としてのこる。ほとんどすべての修飾に関して調査されてきたが、そのなかでももっとも注意をひいたのは様々なポジションに修飾の起こる $\Psi$ と

$m^1A$ であろう。 $\Psi$ も $m^1A$ もポジションが異なれば酵素が異なるらしいということが少しづつ明かになっていった<sup>(25,26)</sup>し、 $\Psi$ にいたってはポジション38,39,40の酵素は同じらしい<sup>(43)</sup>という逆に珍しい現象も明らかになった。比較生化学的研究の



なかで、特に $m^1A(58)$ についてはGinsbergらが酵母とラット肝では酵素の基質認識が異なっているであろうという興味深い予想も行なっている<sup>(27)</sup>。

こういう下地があって、1970年代からは修飾酵素自身をとらえてその活性を調べる直接的手法がとられるようになった。そのなかでかなり大きな問題となったのは修飾酵素が認識しているのはtRNAの全体構造なのか、局所構造なのかという問題である。

口野、西村らはラット肝の $m^2G$ -メチラーゼがtRNAの半分子をメチル化可能であると報告した<sup>(12)</sup>。一方、Bayevらはラット肝の $m^2G$ -メチラーゼの基質認識について構造のよく似たtRNA同志を比較してその阻害効果を調べ、 $m^2G$ -メチラーゼのtRNA認識部位はtRNA上に散在しており、従ってtRNAの全構造がメチル化には必須であると結論づけた<sup>(11)</sup>。

両者の実験に用いた酵素はまったく同じ酵素であり、両者の見解は全く対立する形となった。口野らの報告は直接的に酵素活性を測定したのであるから結論は明白であるのだが、ヨーロッパを中心とする学会ではBayevらの考え方が広く受け入れられたため、ある修飾酵素が存在するとすればその酵素はtRNAの部分構造を修飾するかどうかは長く議論されつづけ<sup>(44)</sup>。今でもなお、修飾酵素研究の基本事項のひとつとなっている<sup>(13,14,15,45)</sup>。

実際にtRNAの短鎖フラグメントを用いて実験を行なうと、そのメチル化活性はtRNA全体構造がある時に比べると概して低く、酵素と基質との親和性が低下している<sup>(13,14,15,16)</sup>。今まで報告された酵素のなかで、もっとも短鎖フラグメント



に対する活性の強いと考えられる大腸菌  $m^5U(54)$ -メチラーゼですら、 $K_m$ 値が5倍に上昇する<sup>(13)</sup>。

おそらく大部分の修飾酵素の第一義的会合にはtRNAの全体構造があったほうがより効率的なのであろうが、複合体が形成されtRNAと酵素の最適なフィティングが行なわれる段階では全構造は必要なく、その後直接メチル基転移が行なわれる時点では部分構造で十分なのであろう。

この考え方ならば、最初の会合で阻害活性を調べるBeyevの実験方法の結果をうまく解釈することが可能である。また、同様の方法で実験を行なうとG m-メチラーゼでも強力な阻害がかかるので、もちろん、G m-メチラーゼにもこの考え方は適用可能である。

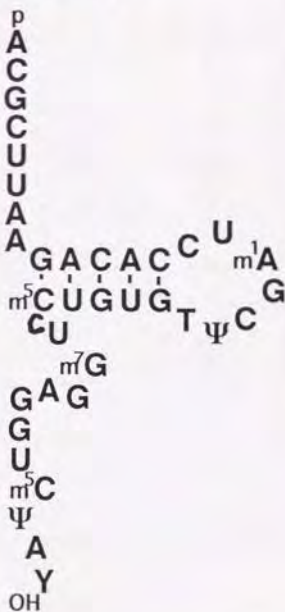
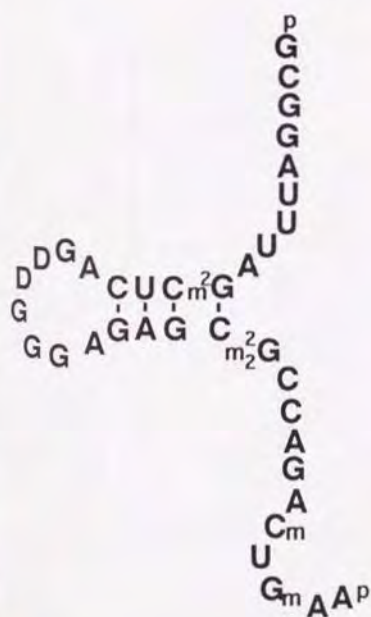
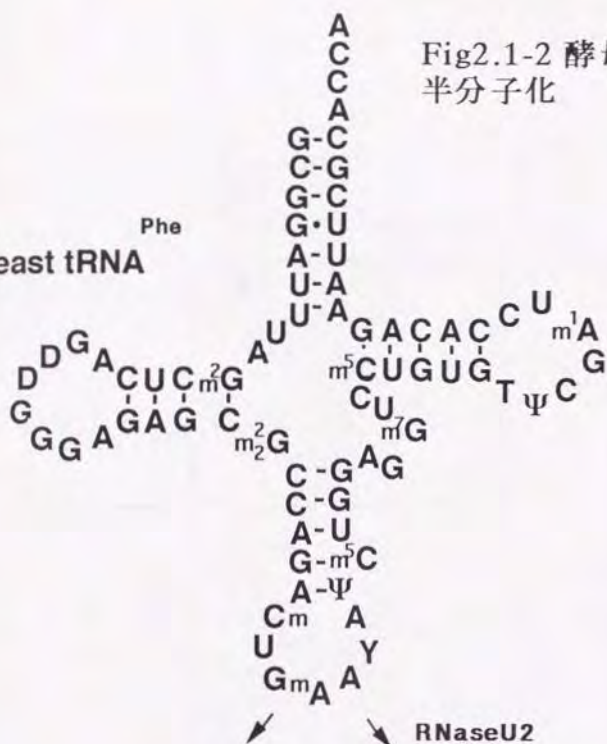
しかしながら、修飾酵素のなかには短鎖フラグメントでは活性を検出不可能なものも存在する<sup>(44,45)</sup>。このような酵素 ( $m^5C(48)$ -メチラーゼや $\Psi(38,39,40)$ -合成酵素)の基質認識は、その酵素が認識している領域がtRNAのあちこちに点在しており、しかもそれらが空間的に適切に配置されてなければならないと考えるべきであらう。tRNAの全構造を必須とするような厳密性はその酵素が基質としない他のRNA分子種と不必要な複合体を形成しないようにする上でおいに役に立つだろう。

しかるに、G m-メチラーゼはtRNAの全構造を必要としない。この酵素の場合、基質として認識するポイントがDアーム領域近傍に密集しているのだらうが、いったいどこまで細分化したRNAを基質とすることができるのであろうか。そして、そのような基質認識機構で本来、G m-メチラーゼがメチル化すべきtRNAと他のRNA分子種を判別することができるのであろうか。

松本氏の研究はこれらの疑問に対するいくつかの手がかりを与えてくれている。

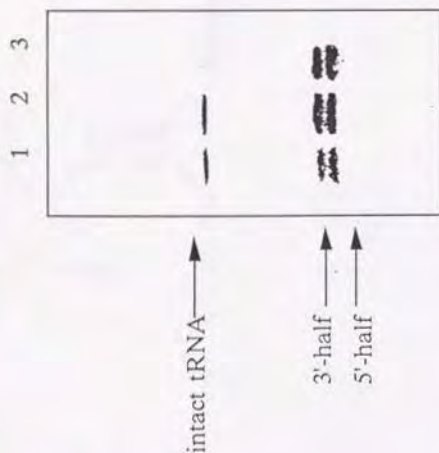
要点をまとめておくと

- (1) G m-メチラーゼが最終的に基質とするのは共通配列G18G19のG18のリボース環の2'-OH基であるが、G m-メチラーゼ自身はGG, poly(G), GGを含むペンタマー以下のオリゴマーを基質とすることができない。
- (2) G m-メチラーゼは5'-半分子フラグメントを基質とすることができるが、それは最良の基質ではなく、tRNA全構造のほうがはるかに良い基質となる。つまり、tRNA全構造の形成する高次構造はG m-メチラーゼの基質認識にとって必要条件ではないが、重大な役割をはたしている。
- (3) D-ステム&ループ構造を崩壊させたtRNAはたとえすべての塩基がそろっていても、もはや、基質とはなりえない。つまり、(2) で言うところのtRNA全構造のなかでもD-ステム&ループ構造が本質的に重要である。D-ステム&ループ構造は5'-半分子フラグメント中にも包括されていることは言うまでもない。





(a)



(b)



Fig2.1-3 大腸菌メチオニンtRNAのRNaseAによる半分子化

(a) 1 : tRNA10A260unitsに対しRNaseA1 $\mu$ g, 2 : tRNA10A260unitsに対しRNaseA300ng, 3 : tRNA10A260unitsに対しRNaseA100ngを0°C、40分間反応させ、その30分の1を10%PAGEした。  
 (b) 1 : intact tRNA 0.03A260units, 2 : (a)のレーン2の試料, 3 : 5'-半分子フラグメント 0.04A260units, 4 : 3'-半分子フラグメント 0.04A260unitsを各々10%PAGEにかけた。

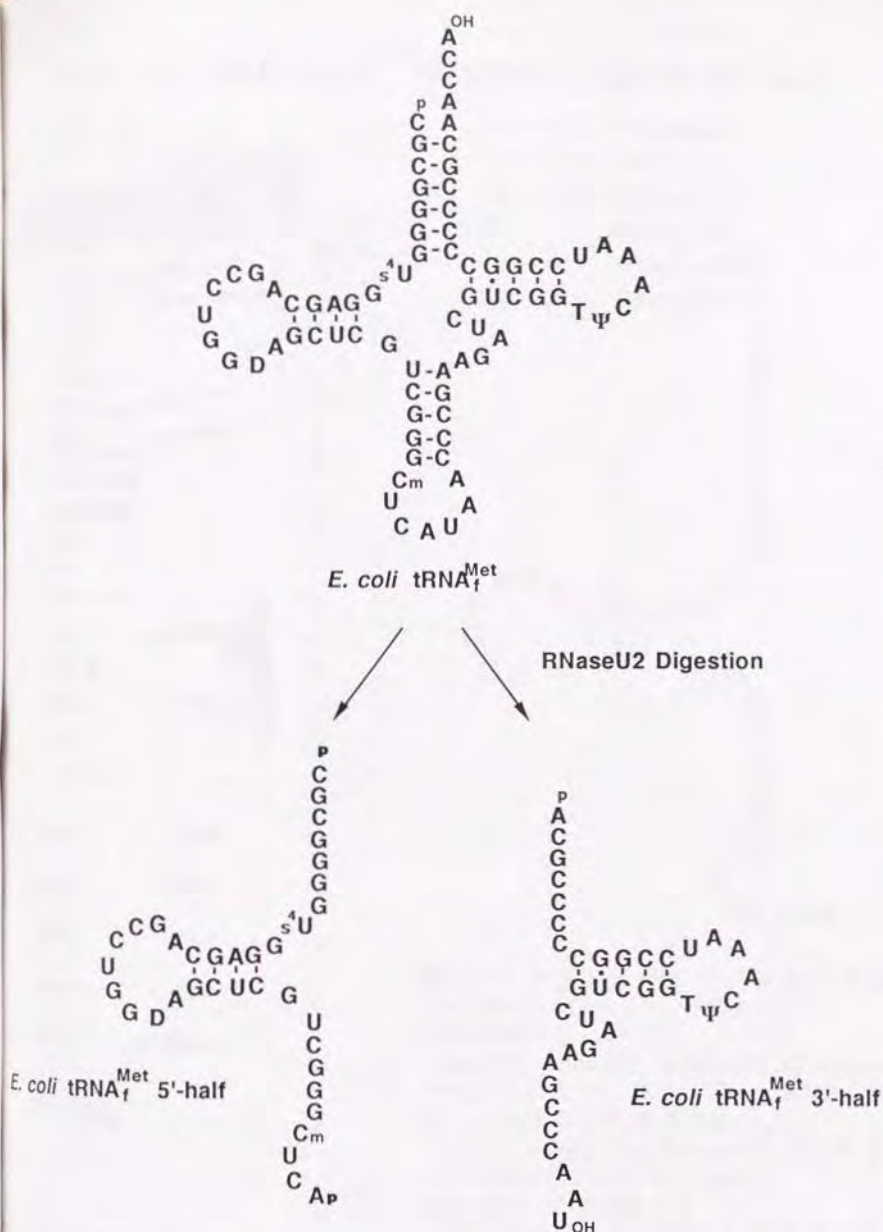
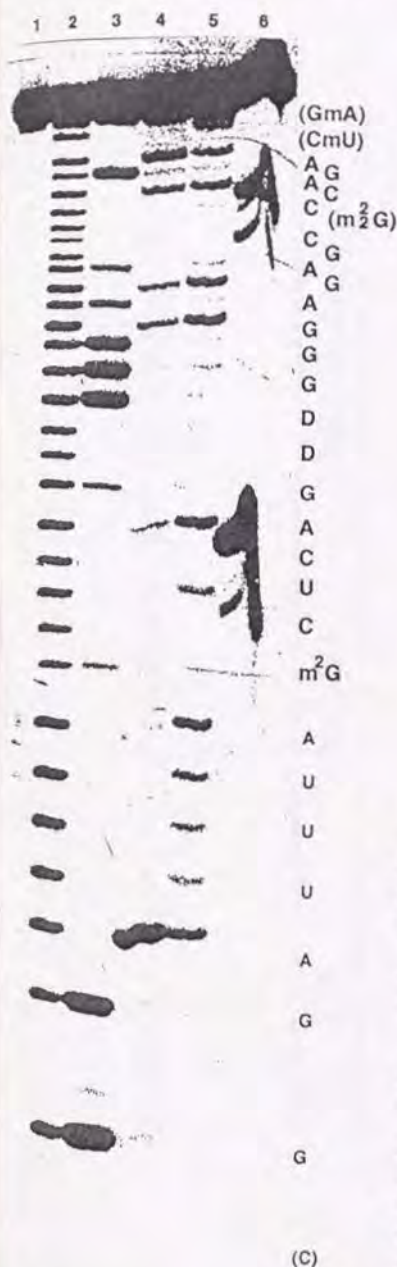


Fig2.1 大腸菌 tRNA<sup>Met</sup>のRNaseU2による限定分解

Fig2.1-4 酵母tRNA<sup>Phe</sup> 5'-半分子の塩基配列の決定



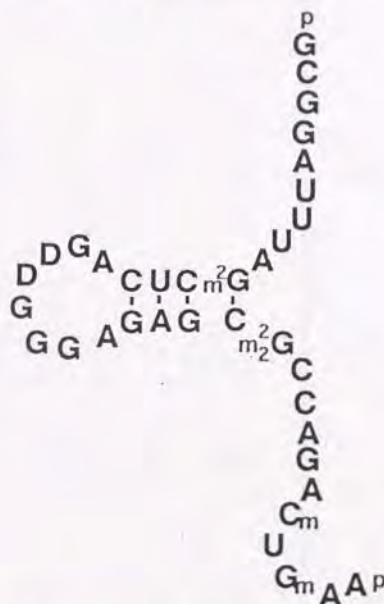
✓-✓1 : no enzyme

レーン2: OHラダー

レ-ン3 : RNaseT1

レーン4 : RNaseU2

レーン5: RNasePhyM

$$\vee-\vee 6: \text{RNaseCL3}$$


図のオートラジオグラフィ-では5'-末端から3番目のGから3'-末端までがほぼ確認できる。

Gm(34), Cm(32), m22G(26)はRNaseで切断されない。また、Gm(34), Cm(32)はアルカリでも分解されない。

一方、m2G(10)はRNaseT1で切断され、D(16),D(17)はUよりも弱くRNasePhyMで分解されている。

アンチコドンループは2'-O-メチル体が2箇所あるため、配列自身は確認できないが、そのバンドの間隔からGm(34), Cm(32)の存在と位置が確認できGmAの上にバンドが存在するので、このフラグメントはA(36)までを含むことがわかる。



Table 2.1-1 Gm-メチラーゼの各種基質に対する酵素学的パラメーター

基質	$K_m(\text{nM})$	$V_{\max}(\text{nmole/mg.min})$
yeast tRNA <sup>Phe</sup>	<5	1.49
<i>E. coli</i> tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub>	<5	1.31
yeast tRNA <sup>Phe</sup> 5'-half	35	1.25
<i>E. coli</i> tRNA <sup>Met</sup> <sub>f</sub> 5'-half	40	1.15

## (目的)

2.1では、比較的塩基特異性の高いリボヌクレアーゼ群を使用して5'-半分子フラグメントを作製しその基質としての特性を調べた。このリボヌクレアーゼの代わりにヌクレアーゼS1を利用すれば、アンチコドンループ部分を完全に欠失させた半分子を作製することが原理上、可能である。(注:種々のtRNAを用いてこの実験を行なったが、アンチコドンループ部分を完全に欠失させた半分子を作製することができたのは大腸菌イソロイシンtRNAのみである。この理由については考察の欄で議論する。)このヌクレアーゼS1半分子を基質としてメチル化活性を測定すれば、Gm-メチラーゼの基質認識にアンチコドンループの一部が必要かどうかかわかる。

## (材料)

大腸菌イソロイシンtRNAは北村昌也博士よりいただいた。ヌクレアーゼS1はファルマシア社より購入した。

## (方法)

大腸菌イソロイシンtRNA 5 A260unitを1mM  $\text{ZnCl}_2$ , 5mM NaOAc(pH4.4) 緩衝液に溶かした試料を4本用意し、ヌクレアーゼS1を各々に50,250,1000,2500 units 加え、37°Cで30分間反応させた。反応の停止はフェノール処理によって行ない、常法にしたがってエタノール沈殿後、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。回収したヌクレアーゼS1処理フラグメントはリボヌクレアーゼ処理フラグメントと同様の方法でメチル化活性を測定した。

## (結果)

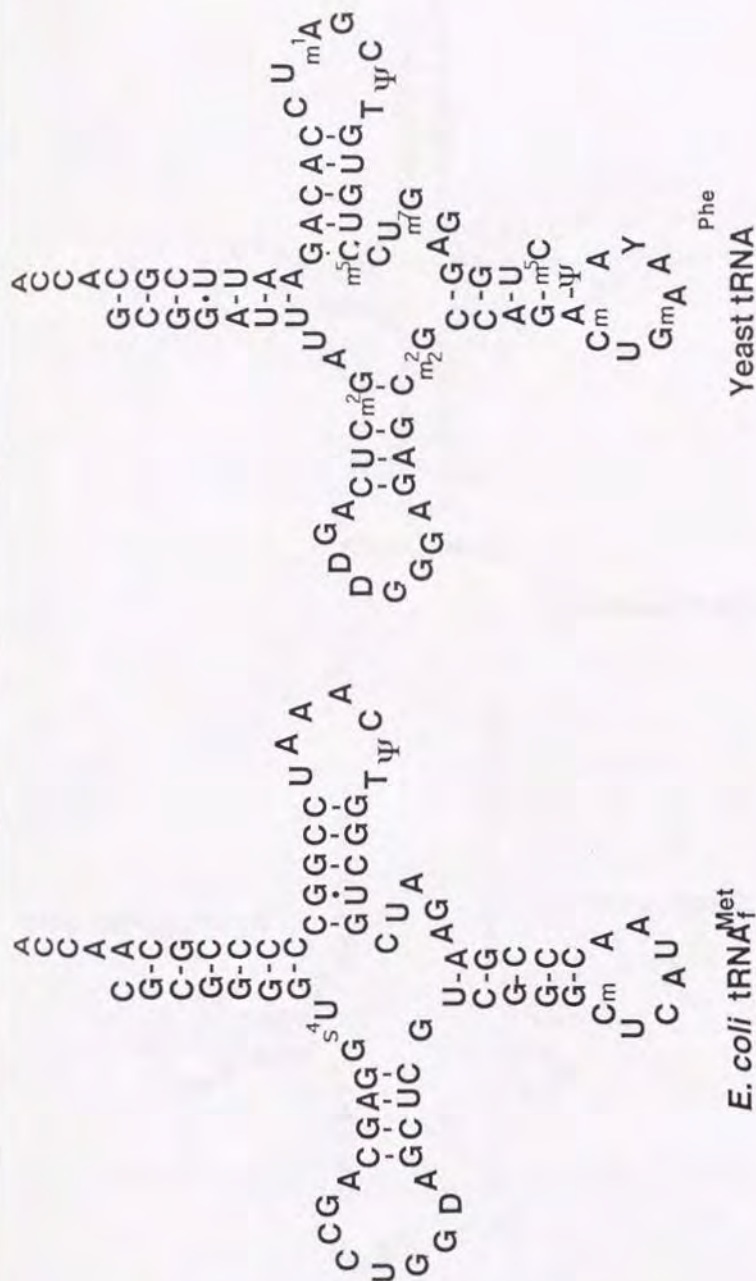
ヌクレアーゼ S 1 による限定分解の様子を調べた 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7Murea) の泳動パターンは Fig2.2-1 に図示した。また、電気泳動で精製した後の 5'-フラグメントの泳動パターンは Fig2.2-2 に示した。Fig2-1 の試料中第 3 レーンの 5'-フラグメントは回収に失敗したので Fig2.2-2 のゲルに泳動パターンを示すことができなかった。Fig2.2-2 のもっとも長いフラグメントの第 1 試料ともっとも短いフラグメントの第 4 試料を各々 3'-末端分析した結果、第 1 試料はアンチコドン 3 文字目の U36、第 4 試料はアンチコドンステムの付け根の C31 であるとわかった。この二つのフラグメントに対する G m-メチラーゼのメチル化活性を測定しその熱力学的パラメーターの測定値を Table2.2-1 にまとめておいた。

## (考察)

ヌクレアーゼ S 1 による限定分解の試みは大腸菌メチオニン tRNA や酵母フェニルアラニン tRNA に対しても行なったが、これらの tRNA では目的とするフラグメントを得ることができなかった。これらの tRNA は C32 が Cm32 にメチル化されており、限定分解の最適条件を発見するのが困難であった。それに対して大腸菌イソロイシン tRNA はアンチコドンループの 5' 末端側にヌクレアーゼ S 1 が切断しにくい修飾塩基が存在せず、分解反応が定量的に進行してくれた。

こうして得た二つのフラグメントの基質としての特性は Table2-1 にあるように本質的には変わらない。つまり、G m-メチラーゼの基質認識にとってアンチコドンループに属する塩基は必要ではないことがわかった。





これら2種類のtRNAはボジヨン31が2'-O-メチル体となっているため、Nuclease S1による半分子化は成功しなかった。

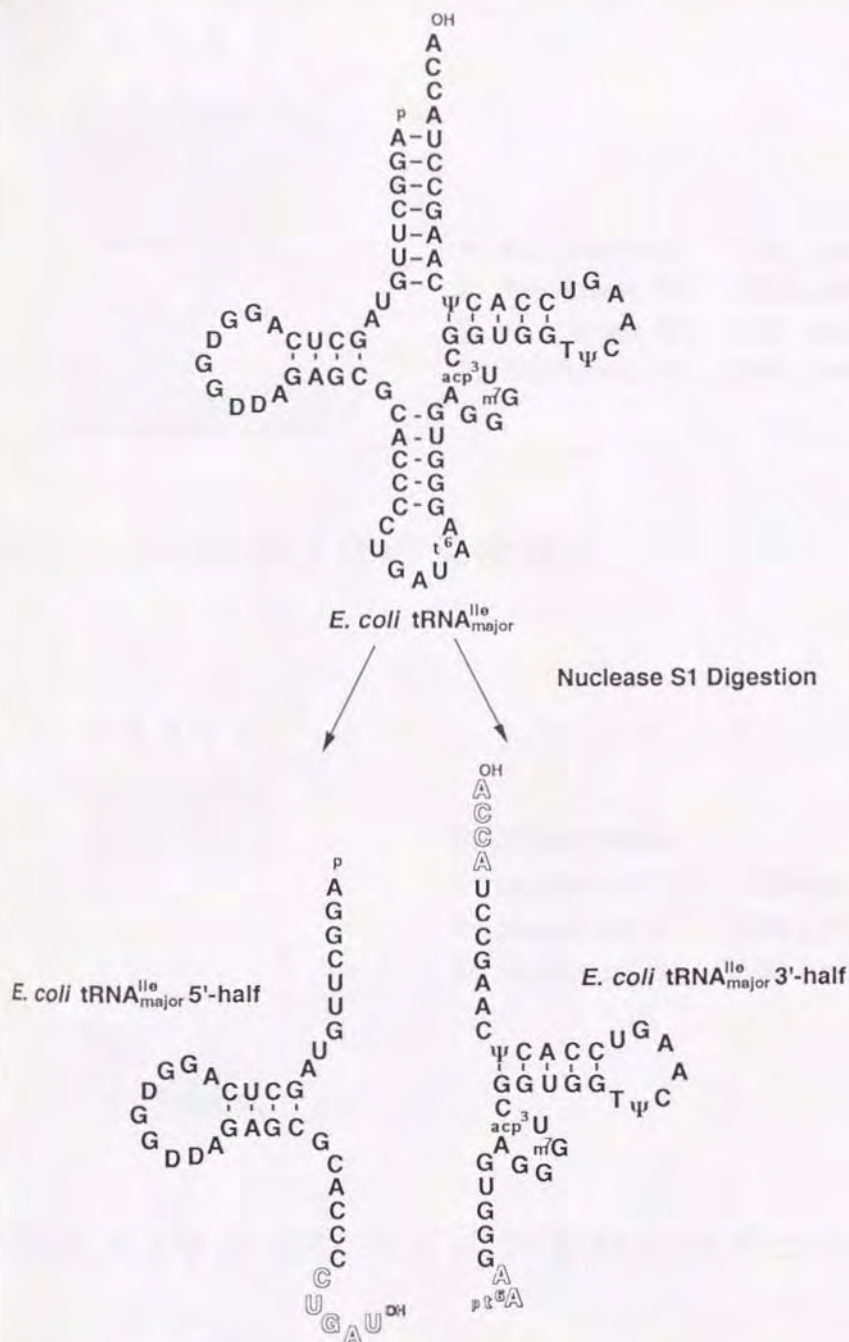


Fig2.2-0 ムクレアーゼS1によるtRNA<sup>Ile</sup><sub>major</sub> の半分子化  
図で白抜きした塩基を末端より削りこんだ。

4 3 2 1



- 1: Nuclease S1 50 unit
- 2: Nuclease S1 250 unit
- 3: Nuclease S1 1000 unit
- 4: Nuclease S1 2500 unit

Fig2.2-1 半分子化の条件検討

0 4 2 1 0



- 0: intact tRNA
- 1: Nuclease S1 50 unit
- 2: Nuclease S1 250 unit
- 4: Nuclease S1 2500 unit

Fig2.2-2 半分子フラグメントの回収チェック



Table 2.2-1 Gm-メチラーゼの大腸菌tRNA<sup>Ile</sup><sub>major</sub> とその半分子に対する  
酵素学的パラメーター

基質	K <sub>m</sub> (nM)	V <sub>max</sub> (nmole/mg.min)
<i>E. coli</i> tRNA <sup>Ile</sup> <sub>major</sub>	6	1.20
<i>E. coli</i> tRNA <sup>Ile</sup> <sub>major</sub> 5'-half (U36)	52	1.10
<i>E. coli</i> tRNA <sup>Ile</sup> <sub>major</sub> 5'-half (C31)	58	1.14

### 2.3. T7 RNA ポリメラーゼ 転写産物による解析

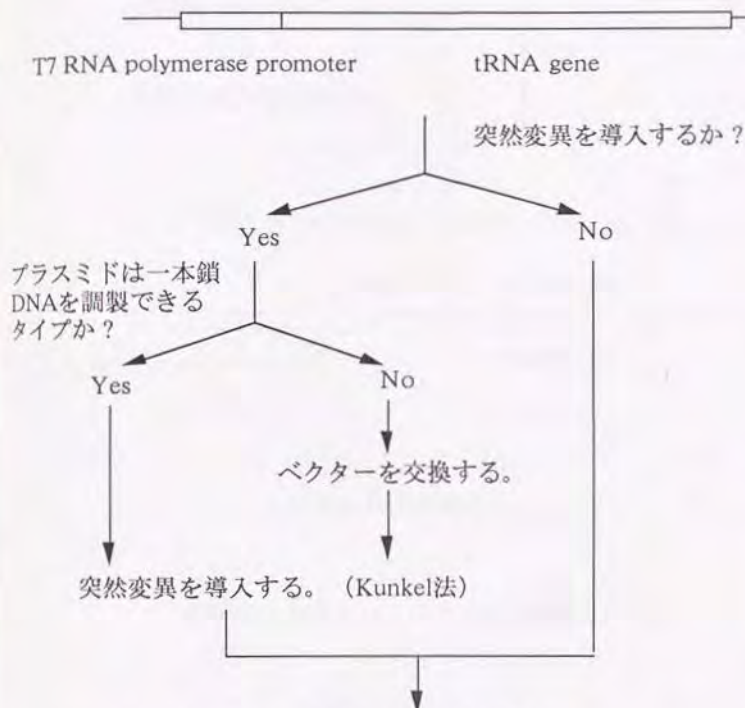
天然のtRNAを何らかの核酸分解酵素で限定分解しそのフラグメントを精製してメチル化活性を測定する手法には限界がある。いかにすぐれた特異性を持った酵素を使用しても天然のtRNAを自由自在に限定分解することはできないし、たとえそれが可能になったとしても煩雑な手順を経なければ目的のRNAフラグメントを得ることができない。

その点、近年さかんになったRNAポリメラーゼを利用する方法(39,57,58,59,60,62,63)は、RNAポリメラーゼの特性のゆるす範囲では、自分のデザインしたフラグメントを思い通りに作製することができる。なかでもT7 RNA ポリメラーゼは特異性の高いプロモーター配列を持ち、酵素自身の大量発現系が確立されている等の利点がある(41,42)。

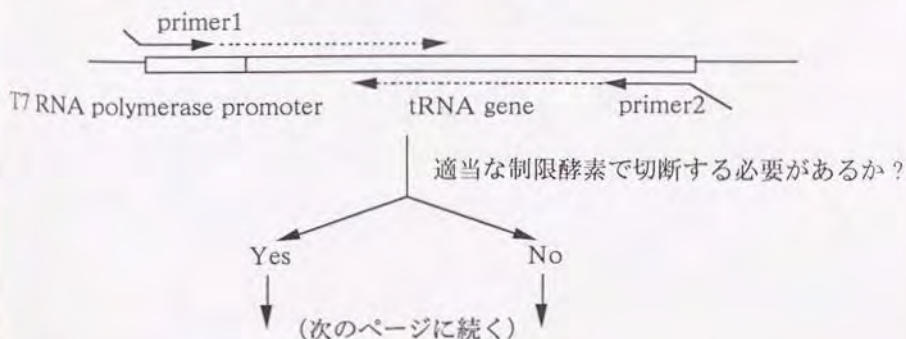
そこでG m-メチラーゼの基質特異性や最小基質分析の目的にT7 RNAポリメラーゼの転写系を利用することにした。

# T7 RNA ポリメラーゼ 転写産物を利用する実験系の流れ

1: T7プロモーターの下流にtRNA遺伝子を接続したプラスミドを構築する。



2: PCR法により鋳型DNAを増幅する。





(つづき)

適当な制限酵素で切断する必要があるか？

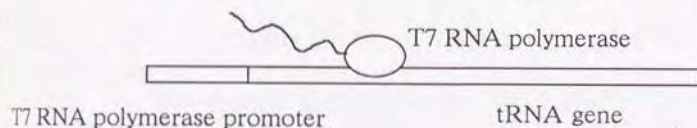
Yes

No

制限酵素で分解する。

目的の断片を精製する。

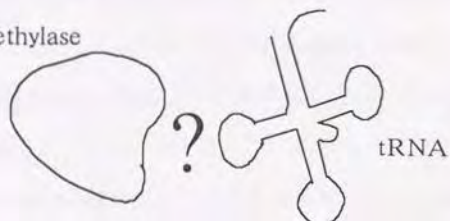
3 : T7 RNA polymeraseによる転写反応をおこなう。



転写産物を精製する。

4 : 転写産物をもちいてメチル化活性を調べる。

Gm-methylase



### 2.3.1. 鋳型プラスミドの作製

#### (目的)

T7 RNA ポリメラーゼがRNAを転写するためにはT7プロモーターの下流に鋳型となるDNA配列が必要である。このため鋳型となるべきプラスミドを作製した。

#### (材料)

pUC19は関誠氏よりいただいた。pUC118,119<sup>(19)</sup>は有岡学博士よりいただいた。プラスミド構築のためのDNAはアブライドバイオシステム社のDNA合成機モデル381Aで合成した。制限酵素およびDNA修飾酵素は宝酒造もしくはトーヨーボーより購入した。部位指定変異誘発の方法はKunkelの方法<sup>(21,22)</sup>に従い、バイオラボ社製のキット(Muta-Gene Phagemid In Vitro Mutagenesis Version 2)を使用した。本法で使用する大腸菌CJ236, MV1190, ヘルパーファージM13KO7はこのキットにあわせてバイオラボ社より購入した。塩基配列決定に使用したシークエナーゼ ver.2.0はトーヨーボーより購入した。

#### (方法)

pUC19,118(Fig2.3.1-0に構造を示す)もしくは119 (pUC118とマルチクローニングリンカーが逆向きになっているが、基本骨格は同じ) のマルチクローニングリンカーに合成DNAを組み込み、酵母フェニルアラニンtRNAの一部もしくは全部をT7 RNAポリメラーゼプロモーターの下流にコードするプラスミドを作製した。全工程で17種類の合成DNAと3種類のプラスミドを使用した。pYF01,02,04はpUC19のEcoRI-KpnIサイトに合成DNAを挿入して作成した。pYF03はpUC19のEcoRI-

PstIサイト間に合成DNAを挿入して作成した。これら4種類のプラスミドはいずれも酵母フェニルアラニンtRNA遺伝子の一部のみをコードしている（くわしい配列はFig2.3.1.-1に表記した）。

完全長のtRNA遺伝子を作成するために、まずpYF05を構築した。pYF05はpYF01を材料としてKpnI-BamHIサイト間に合成DNA4本をくみこんだ。pYF05のコードするtRNA遺伝子は完全長ではあるが挿入サイトのKpnIサイトがそのまま残っており、酵母フェニルアラニンtRNAの正しい塩基配列を有していない。

そこで部位指定変異誘発により塩基配列を修正するため、プラスミドののせかえを行なった。Kunkelの方法は一本鎖DNAの調製が必須であるが、pUC19には一本鎖DNA生産のための複製開始領域がコードされておらず、プラスミドを一本鎖DNA複製開始領域をコードするファージミド型ベクターpUC119に換装せねばならなかった。なお、Kunkelの方法については後述する。pUC19とpUC119は全く同じマルチクローニングリンカーをそなえているが、酵母フェニルアラニンtRNA遺伝子にはEcoRIサイトがふくまれており本来の挿入サイトであるEcoRIサイトが使用できず、挿入断片は合成DNAにデザインしておいたXhoIサイトとマルチクローニングリンカー上のHindIIIサイトを利用した。

このDNA断片をpUC119のSalI-HindIIIサイトに挿入しpYF06を構築した。なお、XhoIとSalIは連結反応が可能なコヘシヴ末端をもつコンバーチブル制限酵素である。

つぎにpYF06をトランスフォームした大腸菌CJ236にヘルパーファージM13KO7を感染させ一本鎖DNAを調製し部位指定変異誘発を行なった。変異プライマーはYFANTCを用いた。YFANTCの配列は5'-GCGCCAGACTGAAGATCTGGAGGT-3'である。運のよいことにこのプライマー配列中には偶然、BgIIIサイト（AGATCT）が含まれる。変異誘発の確認はKpnIサイト（GGTACC:pYF06のアンチコドン連結



部位)の消失とBgIIIサイトの生成で行なったが、最終的にはジデオキシ法<sup>(24)</sup>による塩基配列解析を行ない、正しい塩基配列をもち完全長のtRNA遺伝子をコードしているプラスミドをpYF07と命名した。さらに一本鎖DNA複製開始領域の方向がpYF07と逆になるようにSacI-HindIIIサイト間の挿入断片をpUC118のSacI-HindIIIサイト間に組み込み直しpYF08を構築した。最終的には構築したすべてのプラスミドの塩基配列決定を行ない目的どおりの配列を有することを確認した。(プラスミド構築の流れ図はFig2.3.1.-2にまとめる)

合成DNAの脱保護、精製、アニーリング、プラスミドの精製、制限酵素分解、修飾酵素処理、DNA連結反応、大腸菌の取り扱い、トランスフォーメーション、トランスフェクション等で、特記すべきと思われた事項はもれなく記述したつもりであるがそれ以外の事項は成書<sup>(28)</sup>を参考にした。

## (1) Kunkelの方法の概念

現在までに報告された部位特異的突然変異誘発の方法<sup>(29,30,31,32,33,34)</sup>はすべて、なんらかの鋳型一本鎖DNAに対して変異誘発の合成DNAプライマーをアニーリングさせ *in vitro* で二本鎖化の反応をおこない、最終的にはホスト菌内で変異部分のギャップを修復させる手法をとっている。多くの方法が考案されているが、それらは変異誘発の頻度をたかめたり、変異株の同定を簡便にすることを目的として工夫されたものであり、根本的な概念は共通である。

Kunkelの方法の特徴は大腸菌CJ236<sup>(35)</sup>をもちいることによってウラシルを含む鋳型DNAを得、二本鎖化の反応をおこなう点にある。ウラシルを含むDNAは正常なDNA修復酵素系をもつ大腸菌内ではウラシルがチミンに置換される。この時、変異をもたないウラシル鎖は分解され、変異をもつ *in vitro* 合成鎖を今度は鋳型としてDNA修復がおこなわれる。それ故、変異誘発の効率が既存の方法に比較して数倍以上であるといわれている。また、同じく高い変異導入率をもつ Eksteinの方法<sup>(34)</sup>では原理上、欠損型の変異は導入不可能であったが、Kunkelの方法は可能である。

(2) 大腸菌CJ236<sup>(35)</sup>の準備

大腸菌CJ236は *dut*, *ung* の復帰不能表現型を有しており、合成されるDNAはチミンの代りにウラシルが挿入される。ウラシルを含む一本鎖DNAを得るためには、ファージ由来の一本鎖DNA複製開始領域をもつ鋳型プラスミド（ファージミド）で大腸菌CJ236を形質転換し、さらにヘルパーファージを感染させ一本鎖DNAを含

むウイルス粒子を放出させる操作が必要である。

ヘルパーファージM13K07が感染するためにはホスト大腸菌がF<sup>+</sup>鞭毛を保持していなければならない。接合を行なわない条件下で継代培養を繰り返すと大腸菌はF<sup>+</sup>鞭毛形成の遺伝子を容易に脱落させてしまう。CJ236はF<sup>+</sup>鞭毛形成の遺伝子をコードするプラスミド(pCJ105)上にクロラムフェニコール耐性遺伝子を同時にコードしており、薬剤耐性によって鞭毛保持菌を選択することができる。さらに、鞭毛形成は35℃以下の温度では行なわれない。故にCJ236は必ず、37℃でクロラムフェニコールを含むLB培地で培養する。

CJ236の遺伝子型: *dur*, *ung*, *thi*, *relA*; pCJ105(Cm<sup>r</sup>)

### (3) コンピテントセルの作成

大腸菌CJ236のコンピテントセルの作成はカルシウム法<sup>(19,36)</sup>をもちいた。

- 3-1. 一晚、クロラムフェニコールを含む5ml LB培地で振とう培養したCJ236を翌日、5ml培地に1%植菌する。
- 3-2. 600nmの散乱光を測定し、0.5OD<sub>600</sub>に達したら、遠心し集菌する。
- 3-3. 培地をすて、氷冷した50mM CaCl<sub>2</sub>溶液を1ml加え、懸濁する。
- 3-4. 氷冷し20分間、放置する。
- 3-5. 遠心してからCaCl<sub>2</sub>溶液をのぞく。
- 3-6. 50mM CaCl<sub>2</sub>溶液200μlを加え、懸濁する。
- 3-7. 氷冷し2時間以上、放置してできあがり。48時間程度は形質転換に使用できる。

### (4) 大腸菌の形質転換



形質転換の方法は書籍<sup>(19)</sup>およびBio-Rad社のマニュアルを参考にした。

### (5) ヘルパーファージの感染

5-1. 目的のファージミドで形質転換した大腸菌CJ236をクロラムフェニコールを含む5mlLB培地で一晚、振とう培養する。

5-2. 翌日、100mlLB培地（濃度50mg/lでクロラムフェニコールを含む）に1%植菌する。

5-3. O.D. 600が0.3に達したら、 $2 \times 10^8$  pfu/ml<sup>\*</sup>（多重感染率<sup>\*\*</sup>：MOI=20）になるようにヘルパーファージM13KO7を加える。ヘルパーファージストックの感染率はあらかじめ測定しておく。

5-4. 37℃、1時間培養を続ける。

5-5. カナマイシンを終濃度70μg/mlになるように加える。

5-6. 一晚、37℃で振とう培養を続ける。

\* pfuとはプラークフォーミングユニットの略。1mlあたり何個のプラーク形成がみられるかを通常、評価する。

\*\* 多重感染率とは1個の細胞に対して何個のファージが感染する条件かを示す。ここでは、すべての細胞がヘルパーファージに感染するのが望ましいので多重感染率が大きな条件に設定してある。

### (6) ファージ粒子の回収

6-1. (5)の培養液を17000xgで15分間、4℃で遠心する。

6-2. 上清を新しい遠心管に移し、再度、6-1.の条件で遠心する。

6-3. 上清100mlに対して500μgの割合でRNaseAを加える。

- 6-4. 室温で30分間、放置する。
- 6-5. 氷冷し、4分の1量の20%PEG-6000/3.5M酢酸アンモニウムを加え、よくまぜる。
- 6-6. 17000xgで15分間、遠心し沈澱を集める。
- 6-7. 遠心管の内壁をキムワイプなどでぬぐって完全にPEGをのぞく。(ファージ粒子は数%のPEG存在下で沈澱するので、わずかでもPEGが残ると6-8.以降の操作がやりにくくなる。)
- 6-8. 沈澱を200 $\mu$ lのHigh Salt Buffer(300mM NaCl, 100mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)に懸濁する。
- 6-9. エッペンドルフ型遠心管に移し、氷冷し30分間おく。
- 6-10. 4°C, 15000rpm、2分間、遠心し上清をとる。この上清をファージ粒子ストックとして4°Cで保存する。

#### (7) 一本鎖DNAのファージ粒子からの抽出

DNAの抽出法はフェノール-クロロホルム処理によったが、ファージ粒子は大腸菌などよりも構造が固いため、より時間をかけて反復して抽出する必要がある。DNAはエタノール沈澱によって回収し、20 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。この試料1 $\mu$ lに含まれるDNA量は濃度既知の分子量マーカーとともにアガロースゲル電気泳動をおこない検定した。試料は最終的にTE緩衝液で200ng/ $\mu$ lになるように希釈した。

#### (8) 変異プライマーの5'-リン酸化

プライマーのリン酸化はT4ポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)を使用した。PNKによるリン酸化は1.1章で記述した方法をもちいた。ただし、BAPによる脱リン酸化の工程は必要ない。

(9) *In Vitro* 突然変異誘発反応

- 9-1. エッペンドルフ遠心管に一本鎖DNA200ng分 (1 $\mu$ l)、5'-リン酸化プライマー6pmole分(1 $\mu$ l)、10xアニーリング緩衝液1 $\mu$ l<sup>\*</sup>を加え、滅菌水で全量を10 $\mu$ lにする。
- 9-2. 9-1.の溶液を70℃で5分間加温したのち、自然冷却させアニーリングの操作をおこなう。
- 9-3. アニーリングさせたDNA-プライマー溶液を氷冷する。
- 9-4. 10xSynthesis Buffer<sup>\*\*</sup>を1 $\mu$ l加える。
- 9-5. T4 DNA Ligase 3unit(1 $\mu$ l)、T7 DNA Polymerase 0.5unit(1 $\mu$ l)を加える。
- 9-6. そのまま5分間、氷冷する。
- 9-7. 25℃で5分間、あたためる。
- 9-8. 37℃で90分間、反応させる。
- 9-9. 9-8.の反応液をそのまま、大腸菌MV1190の形質転換に使用する。もし、保存するならば、-20℃で凍結する。

<sup>\*</sup> 10xアニーリング緩衝液

20mM Tris-HCl (pH7.4), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl

<sup>\*\*</sup> 10x Synthesis Buffer

0.4mM dATP, 0.4mM dGTP, 0.4mM dCTP, 0.4mM dTTP, 0.75mM ATP, 17.5mM Tris-HCl(pH7.4), 3.75mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTT

## (10) 大腸菌MV1190の形質転換

大腸菌MV1190<sup>(37)</sup>の形質転換は他の菌株を扱うのと全くおなじである。コンピテントセルはカルシウム法 ( (3) の方法) 以外にルビジウム法<sup>(38)</sup>をよく用いた



が、どちらでも良好な成績をえられる。

大腸菌 M V 1190 の遺伝子型:  $\Delta(lac-proAB)$ , *thi*, *supE*,  $\Delta(srl-recA)306::Tn10(tet^r)$  [ $F'$ :*traD36*, *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>*ZAM15*]

#### (11) 変異株の選択

この章で作成したプラスミド pYF07 は幸いなことに制限酵素サイトの消失と生成が伴うので、その一次選択はそれを目標とすればよく、比較的容易であった。しかしながら、次章以降で作成した変異株の多くは DNA の塩基配列決定を一次選択の方法とするしかなく、この変異株選択の工程がもっとも時間と労力を要した。コロニーハイブリダイゼーション<sup>(28)</sup>もほとんどあたりのコロニーがない場合は併用したが、プローブ作成やコロニーうちかえの手間がかかる上、最終的には塩基配列決定の操作を行わねばならず、かえって時間がかかることも多かった。

また、tRNA 遺伝子は一本鎖 DNA が高次構造を形成しやすく変異導入率が概して低かった。とくに欠消変異の場合は変異導入率が数 100 分の 1 という場合もあり、たったひとつの変異株をひろうために 1 カ月以上かかったこともあった。

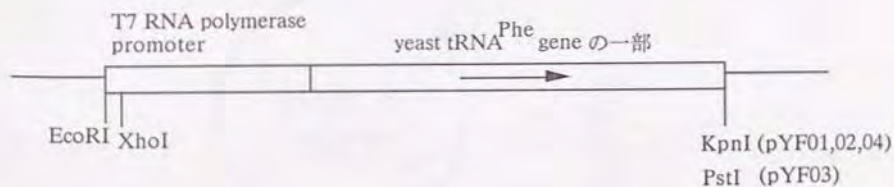
#### (結果)

目的どおりにすべてのプラスミドを構築した。

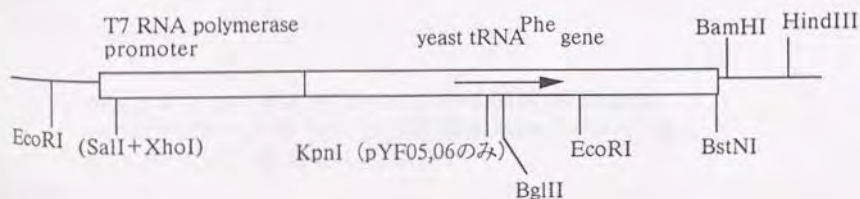
名前	vector	コードするtRNAの領域
pYF01	pUC19	1-32
pYF02	pUC19	1-26
pYF03	pUC19	4-26
pYF04	pUC19	10-26
pYF05	pUC19	全長*
pYF06	pUC119	全長*
pYF07	pUC119	全長
pYF08	pUC118	全長

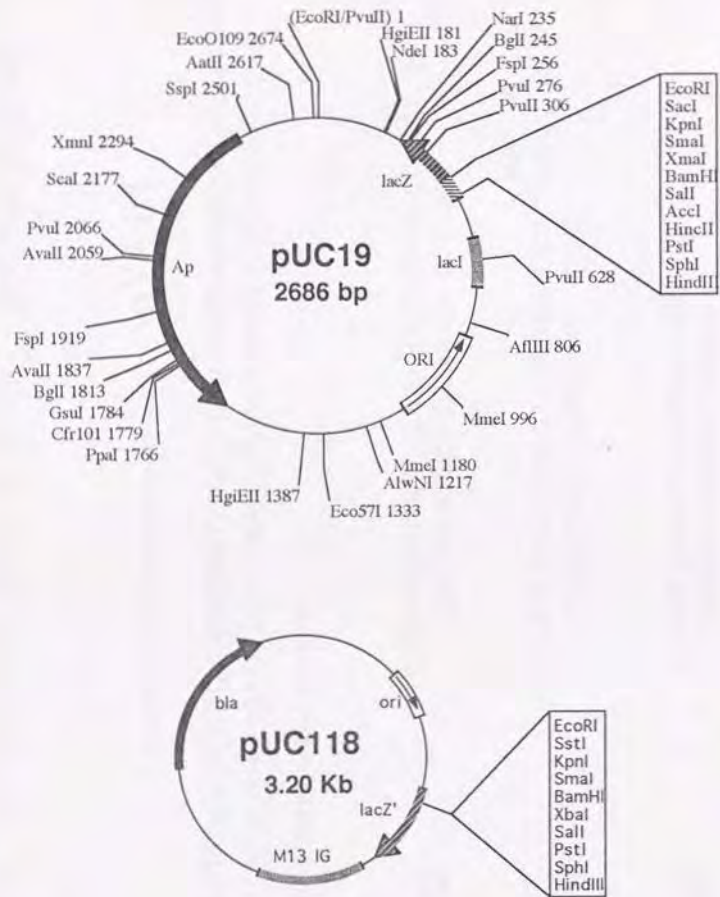
\*アンチコドンがKpnI siteになっている。

#### pYF01-04の制限酵素マップ



#### pYF05-08の制限酵素マップ





**Fig 2.3.1.-0 pUC19とpUC118の制限酵素地図**  
pUC118は一本鎖DNA複製開始領域(M13IG)を除くと  
pUC19と同じ構造をしている。



Fig2.3.1.1-1 pYF01-04のインサートの塩基配列

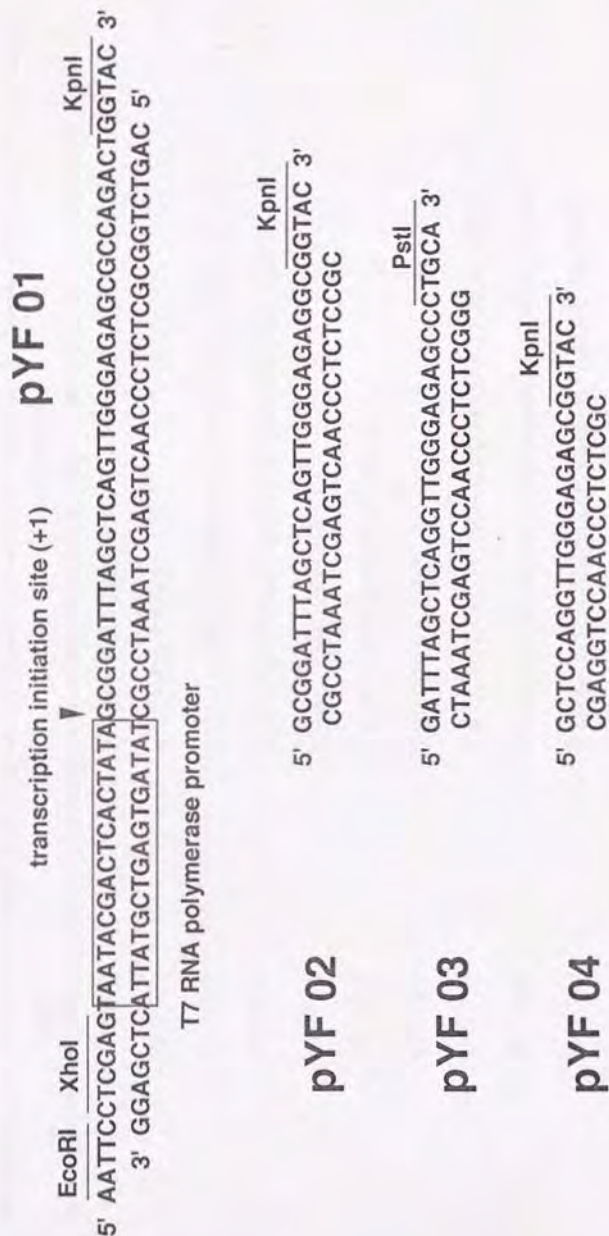
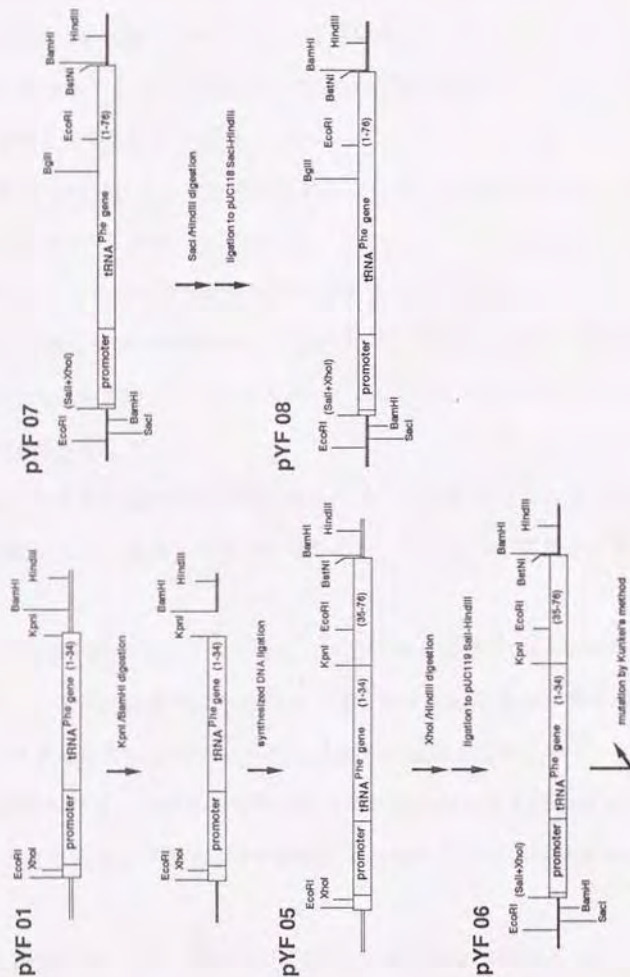


Table 2.3.1-1 p YF01-04 作製用合成DNA

name	sequence
YFT700	5'AAATTCCTCGAGTAATACGACTCACTATA3'
YFT701	5'GCGGATTTA3'
YFT702	5'GCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGGTAC3'
YFT703	5'CCGCTATAGTGAGTCGTATTACTCGAGG3'
YFT704	5'AACTGAGGCTAAAT3'
YFT705	5'CAGTCTGGCGCTCTCCC3'
YFT706	5'CGCTCTCCC3'
YFT707	5'AACTGAGCTATAGTGAGTCGTATTACTCGAGG3'
YFT708	5'GATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCTGCA3'
YFT709	5'TAAATCTATAGTGAGTCGTATTACTCGAGG3'
YFT710	5'GCGGGCTCTCCCAACTGAGC3'

Fig2.3.1-2 pYF 05-08の構築





### 2.3.2. PCR法による鋳型DNAの増幅

#### (目的)

T7 RNAポリメラーゼによる転写反応は2.3.1.で作製したプラスミドをそのまま使用しても可能であるが、その場合、次のような欠点がある。

- (1) 大量調製したプラスミドを大量消費しなければならない。
- (2) RNase阻害剤を使用しなければならない。
- (3) ホスト大腸菌のDNAメチル化を考慮せねばならず、制限酵素BstNIのより安価なアイソソマーMvaIを使用しにくい。
- (4) 一つのプラスミドから一種類の転写産物を得ることしかできない。
- (5) 転写終結点に何らかの制限酵素サイトをデザインせねばならず、場合によっては思い通りの転写産物を得ることができない。特に今回、我々が用いた実験系にはこの点が重大な足枷となる。

そこで一度PCR法により目的遺伝子部分を増幅した後、転写反応を行なうことにした。この方法は上記の欠点を解消することができるが、新たに次の問題点が生じてくる。

- (1) プラスミド自身を直接鋳型にした場合、塩基配列の確認はDNAレベルで行なって問題ないが、PCR産物を鋳型にした場合、予定通りの転写産物が得られているかどうかチェックするためにRNAレベルの塩基配列の確認が必要である。
- (2) 全工程数が長くなる。一種類の転写産物を最終的に得るためには電気泳動だけでも最低7回必要である。プラスミドを鋳型にした場合ならば、電気泳動は最低4回ですむ。

このような欠点も派生してくるが、PCR法を利用する長所はそれをおぎなっておりある。最大の利点は、プライマーの組み合わせによって一種類のプラスミドか

らたくさんの種類の転写産物をえることができる点である。

# (方法)

PCR法は原則的に文献<sup>(40)</sup>に従った。プライマーのデザインはその互換性を考慮して25塩基以上のアニール部位を持つことを原則とした。アニール温度はプライマーの組み合わせにより変化させたが、副反応を極力おさえるため、50もしくは55°Cで行なった。遺伝子解析などに利用されているPCR反応との最大の違いはプライマーの相対量が多い点である。下記に典型的なプロトコールの例を示しておく。また、プライマーのデザインおよびその組み合わせはTable2.3.2.-1にまとめておく。

## 鋳型DNAのPCR (例)

10x Taq pol. buffer	10μl
5mM dNTP mix.	8μl
primer 1	100pmol
primer 2	100pmol
plasmid	3pmol
100mM MgCl <sub>2</sub>	2μl
Ampli Taq DNA polymerase	1μl

上記組成に水を加え100μlとする。

これをアニーリング温度50-55°C、酵素反応温度72°C、変性温度94°Cで25サイクル増幅する。

初期に使用したプロトコールは遺伝子解析用のもの<sup>(40)</sup>であったので、その時間プログラムはアニーリング90秒、酵素反応2分、変性1分であったが、短鎖なtRNA

遺伝子では酵素反応時間が短くても十分であることがわかり酵素反応90秒に短縮したプログラムを後期では使用した。

#### (結果)

個々の実験例のなかにはプライマーのデザインが適切でなかったり、アニール温度の選択が適当でなかったりして失敗したこともあったが、最終的に目的とするPCR産物がえられないということにはなかった。Fig2.3.2-1.および2.3.2.-2に具体例を示しておく。





Table 2.3.2.-1 鎖長改変体用 P C R の  
プライマー・プラスミドの組み合わせ


fragment	plasmid	primer1	primer2
1-34	pYF 01	 YFT700	YFT7121
1-30	pYF 01		YFT7111
1-28	pYF 01		YFT7052
1-26	pYF 02		YFT7062
4-34	pYF 03		YFT7121
4-30	pYF 03		YFT7111
4-28	pYF 03		YFT7052
4-28+	pYF 03		YFT7052
4-26	pYF 03		YFT7062
10-34	pYF 04		YFT7121
10-30	pYF 04		YFT7111



Fig 2.3.2-2 PCR産物の生成量を8%未変性PAGEでチェックした例

1 : transcript 1-30転写用鋳型DNA 2 : transcript 4-34転写用鋳型DNA 3 : transcript 4-30転写用鋳型DNA 4 : transcript 10-34転写用鋳型DNA 5 : transcript 10-30転写用鋳型DNA 各20分の1量を電気泳動した。各々のPCR産物の鎖長は57、58、54、52、48bpであり、1塩基の差も分析できている。各PCR産物は次に大量精製用のゲルをもちいて精製し、回収量を測定した後、転写反応に供する。各転写産物はくわしくは2.3.5.2章を参照されたい。





Fig 2.3.2-3 精製したPCR産物の8%未変性PAGEによる分析

1: transcript 4-26用鋳型DNA、2: transcript 4-28用鋳型DNA、3: transcript 1-26用鋳型DNA、4: transcript 1-28用鋳型DNA 各々、回収量の20分の1量を泳動した。各々のPCR産物の鎖長は53、55、56、58bpである。各レーンともPCRプライマーやPCR産物がうまく除けていることがわかる。T7 RNA polymeraseの転写反応には、通常この5倍量程度のDNAを鋳型としてもちいる。

### 2.3.3. T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

#### (材料)

T7 RNAポリメラーゼは大腸菌発現システムBL21/pAR1219<sup>(41)</sup>より精製した。

このシステムはF. William Studier博士よりいただいた。

#### (方法)

T7 RNAポリメラーゼの精製はJ.J. Dunn の論文<sup>(42)</sup>に原則的にしたがったが、カラムクロマトグラフィーで用いる樹脂は代用品をもちいた。下記に我々の使用したT7 RNAポリメラーゼの精製法をしるす。

5'-半分子アナログをもっとも大量に転写できた時のプロトコールをTable 2.3.3.-1にあげておく。スベルミジン濃度とマグネシウムイオン濃度が転写量に影響するが、それ以上に影響を与えるのは転写産物自身の塩基配列、長さである。T7 RNAポリメラーゼによる転写反応で塩基長の短いRNAを効率よく転写するプロトコールは未だに完成していない。一般に短鎖の転写産物を目的とする場合には、スベルミジン濃度を上昇させたほうがよいが転写産物の3'-末端にCが付加した副産物の生成量も増加する。特に塩基長20以下のRNAを転写させようとするとき単一のCが付加した副産物だけでなく、ポリCが付加した副産物が生じ、これが収率の低下の一因となる。そこで半分子以下のRNAを転写させるには反応系をtRNAを転写させるときの10倍以上にスケールアップする必要がある。

転写産物は10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(7M尿素)で精製した。

また、プラスミドから直接、転写させる場合には制限酵素による分解

(pYF01,02,04-KpnI, pYF03-PstI, pYF05,06,07,08-BstNI(MvaI))をおこなった後、

誘型DNAとして使用した。

106

### T7 RNAポリメラーゼの精製-----

#### (1) 大腸菌BL21/pAR1219の取り扱い

原則的には他の大腸菌株とおなじ取り扱いをしてくまわれないが、T7 RNAポリメラーゼの大量発現を目的とする場合、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子が*lacUV5*プロモーターの下流に接続されているので遺伝子産物がリークするのを防ぐためグルコース効果によるカタボライト抑制をかけておいたほうが、菌の生育がよく、プラスミドも安定に保持される<sup>(41)</sup>。

それ故、T7 RNAポリメラーゼの大量発現の場合は培地はM9T B 培地を使用した。

#### M9T B 培地 (1 l あたり)

Bactotryptone	10g
NaCl	5g
20x M9 salts *	50ml
20% glucose	20ml
1M MgSO <sub>4</sub>	1ml

\* 20x M9 salts (1.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g NH<sub>4</sub>Clを1 l にとかす)

上記組成のうち、20xM9 salts, 20% glucose, 1M MgSO<sub>4</sub>は別途、オートクレーブ滅菌しておき後で混合する。

大腸菌BL21の遺伝子型: derived strain B, F', *hsdS*, *ompT*, *r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>*

#### (2) T7 RNAポリメラーゼの誘導



M9 T B 培地に1%植菌したBL21/pAR1219の生育を600nmの散乱光でモニター 107  
し、0.5に達したところでIPTG(isopropyl  $\beta$ -D-thio-galactopyranoside)を終濃度  
1mMになるように加え、lacUV5プロモーターをデリブレスしT7 RNAポリメラーゼ  
を誘導した。

### (3) 溶菌

3-1. (2) でT7 RNAポリメラーゼを誘導したBL21/pAR1219は2時間後、遠心し  
て集菌する。

3-2. 菌を氷冷したLB緩衝液<sup>\*</sup> (PMSF<sup>\*\*</sup> 1mg, leupeptin<sup>\*\*\*</sup> 100 $\mu$ gを含む) 24ml  
に懸濁する。

3-3. 1.5mg/ml 卵白リゾチームを6ml加え、20分おく。

3-4. 0.8%デオキシコール酸ナトリウムを2.5ml加え、さらに20分おく。

上記操作でほぼ完全にBL21/pAR1219は溶菌するが、これ以降の操作を楽にする  
ため、下記の操作をおこなう。

3-5. 氷冷しつつソニックを15秒かける。

3-6. 2M硫酸アンモニウムを5ml加える。

<sup>\*</sup>LB緩衝液 50mM Tris-HCl(pH8.1), 20mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM DTT

<sup>\*\*</sup>PMSF phenylmethylsulfonylfluoride イソプロピルアルコールに20mg/mlに  
溶かして使用する。

<sup>\*\*\*</sup>leupeptin 5mg/mlに水に溶かして使用する。

### (4) ポリミンPによる脱核酸と硫酸沈澱

4-1. 10%Polymin P<sup>\*</sup> 5mlをゆっくりかきまわしつつ加える。

- 4.2. 20分間、氷冷する。
- 4.3. 39000gで4℃、15分間、遠心し上清をとる。
- 4.4. 氷冷した飽和硫酸ナトリウム溶液<sup>\*\*</sup>を上清の0.82量、ゆっくりと加える。
- 4.5. 氷冷しつつ15分間、攪拌する。
- 4.6. 沈澱を集め、Buffer C<sup>\*\*\*</sup> (20mg/lの割合でPMSFを含む) に対して透析する。

\* Polymix P 10%溶液をHClでpH8にあわせておく。

\*\* 飽和硫酸ナトリウム溶液 室温で飽和させTris baseでpH7に調整し、  
0.45μmのフィルターにたおす。

\*\*\* buffer C 20mM sodium phosphate(pH7.7), 1mM EDTA, 1mM DTT, 5% glycerol に原則として100mM NaClを含む。NaCl濃度は精製のステップによって  
は変化する。

#### (5) カラムクロマトグラフィー

透析したT7 RNAポリメラーゼ画分はSP-Toyopearl、CM-Toyopearl、DEAE-Toyopearlの各カラムクロマトグラフィーによってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で単一バンドをあたえるまで精製した。

なお、CM-Toyopearlはフロースルー画分をもちいるのでDEAE-Toyopearlのプレカラムとして使用し、精製時間を短縮した。また、原報<sup>(42)</sup>では各々のカラム樹脂は、Trisacryl-SP、TSK-CM、DES2を使用している。

#### (6) T7 RNAポリメラーゼの保存

(5) で純度を検定したT7 RNAポリメラーゼは最終的に50%グリセロールを含むbuffer Cに対して透析濃縮し-20℃に保存した。

(結果)

各カラムクロマトグラフィーによる精製パターンはFig2.3.3.-1、2にしめす。精製したT7 RNAポリメラーゼのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンはFig2.3.3.-3にしめす。

収率の問題こそあれ、最終的に目的とするT7 RNAポリメラーゼ転写産物が得られないということとはなかった。Fig2.3.3.-4と2.3.3.-5に典型的な転写例を示しておく。



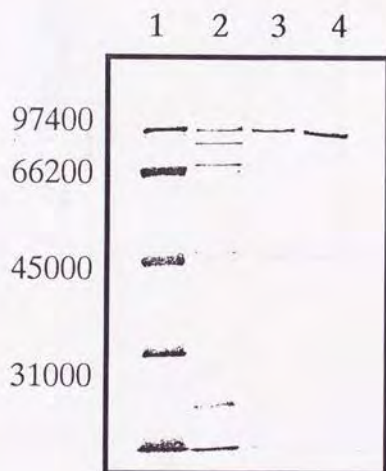
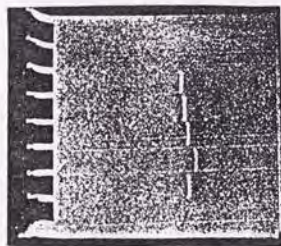


Fig2.3.3-3 T7 RNA polymeraseの精製純度を10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。

1：分子量マーカー、2：硫酸沈澱上清、3：CM-Toyopearlにかける前の試料、4：最終精製標品(500ng)

(a)

1 2 3 4 5



(b)

1 2 3 4 5



Fig 2.3.3-4 T7 RNA polymeraseによる転写反応の例 (その1)

(a) 鋳型となるPCR産物の8%未変性PAGEによる分析

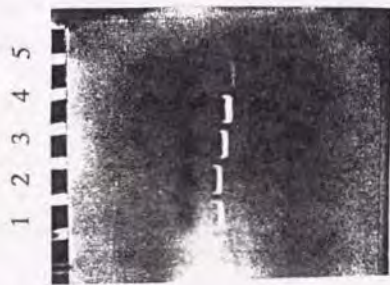
1 : wild type(unmodified), 2 : L3, 3 : SR, 4 : L10, 5 : L12

(b) (a)のPCR産物を鋳型として転写したRNA産物の10%変性PAGEによる解析

1 : wild type(unmodified), 2 : L3, 3 : SR, 4 : L10, 5 : L12

各改変体ともPCR産物の鎖長に応じて転写産物ができていることがわかる。また、目的の産物以外に数塩基長い副産物も生じている。これら、転写産物は大量調製用のゲルで電気泳動し精製する。

(a)



(b)

5 4 3 2 1

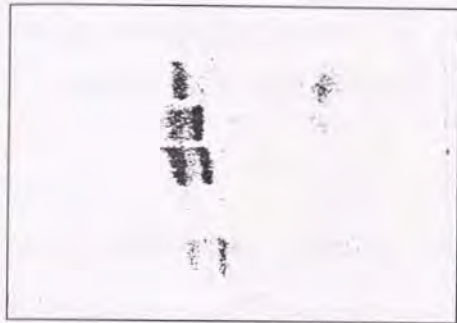


Fig 2.3.3-5 T7 RNA polymeraseによる転写反応の例 (その2)

(a) 鋳型となるPCR産物の8%未変性PAGEによる分析

1: 1-30, 2: 4-34, 3: 4-30, 4: 10-34, 5: 10-30

(b) (a)のPCR産物を鋳型として転写したRNA産物の10%変性PAGEによる解析

1: 1-30, 2: 4-34, 3: 4-30, 4: 10-34, 5: 10-30

各改変体ともPCR産物の鎖長に応じて転写産物ができているものとする主産物以外にポリCの付加した副産物が同じぐらいできている。スベルミジン濃度とマダネシウム濃度を低くすると副産物の生成は抑えられるが、転写産物の絶対量も減少する。鎖長の短い転写産物の転写効率はtRNA全体の転写に比べてきわめて低い。スベルミジン濃度とマダネシウム濃度について、いろいろな濃度で予備実験を繰り返したが、ついに効率のよい転写条件はみつからず、実験に供するだけのRNAを貯めるためにはこのような転写実験を何十回となく、繰り返しねばならなかった。



### 2.3.4. Donis-Keller法によるRNA塩基配列の確認

#### (目的)

PCR法で突然変異を導入したDNAを鋳型としてT7 RNAポリメラーゼ転写反応を行なう場合には、DNAの塩基配列確認のステップがないので、得られた転写産物が目的通りの塩基配列をもっていることを確認する必要がある。

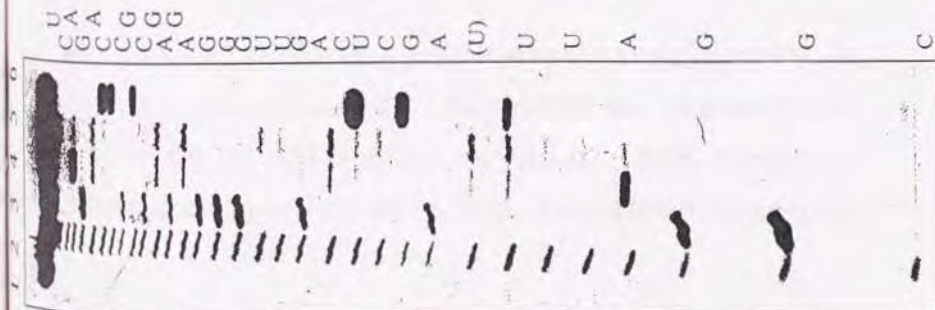
#### (方法)

原則的に Donis-Kellerの原報<sup>(23)</sup>に従った。酵素活性の調整等は西川の方法に従い、吉成氏の意見に従った。くわしい方法は2.1章に記述した。

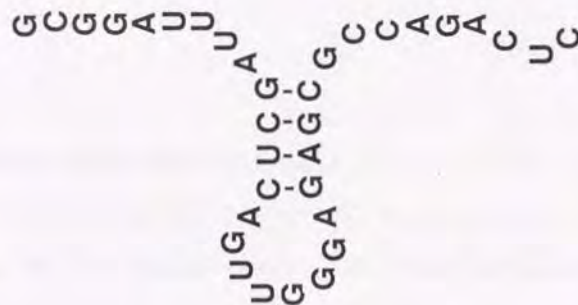
#### (結果)

T7 RNAポリメラーゼによる転写産物のうち、PCRプライマーで変異を導入したものはすべて、その塩基配列の決定を行なった。その結果、転写反応の条件によっては3'-末端にCもしくはポリCが付加した副産物が生成することを見いだした。これら副産物の中にはGm-メチラーゼの基質として利用可能なものもあった。また、3'-末端のCの付加以外は転写産物の配列が予想外であったことはなく、T7 RNAポリメラーゼの転写反応はRNAの構造にかかわらず正確に行なわれていることが確認できた。Fig 2.3.4.-1に基本となる酵母tRNA<sup>Phe</sup>の5'-半分子に対応する転写産物のオートラジオグラムをあげておく。

yeast tRNA<sup>Phe</sup> 5'-half T7 RNA polymerase transcript  
のDonis-Keller法による塩基配列の確認



- 1 : control enzyme-
- 2 : アルカリラダー
- 3 : RNaseT1
- 4 : RNaseU2
- 5 : RNasePhyM
- 6 : RNaseCL3



酵母フェニルアラニンtRNAの5'-半分子に対応するT7 RNAポリメラーゼ転写産物の塩基配列をDonis-Keller法を用いて確認した。図では、U2からU32までの配列が読みとれる。U8のボジションはRNaseと非常に反応性が高く、RNaseCL3でもよく切断される。

### 2.3.5. T7 RNAポリメラーゼ転写産物のG m-メチラーゼによるメチル化

#### 2.3.5.1. 酵母フェニルアラニンtRNA<sup>5'</sup>-半分子とT7 RNAポリメラーゼ転写産物の比較

##### (方法)

メチル化活性の測定は2.1章で述べた方法にしたがった。ただし、スベルミジンを添加してその活性を比較することも行なった。T7 RNAポリメラーゼ転写産物の作製法は2.3.3.章と2.3.4.章と同じである。なお、目的とするT7 RNAポリメラーゼ転写産物をえるプラスミドとプライマーの組み合わせは何通りか考えられるが、この実験では鋳型とするプラスミドはpYF01を、合成DNAプライマーはYFT700, YFT709を使用した。くわしいプラスミドとプライマーの組み合わせは2.3.2.章に記述した。

##### (結果)

初速の測定結果とえられた酵素学的パラメーターはFig2.3.5.1-1とTable2.3.5.1-1にまとめる。

##### (考察)

酵母フェニルアラニンtRNA<sup>5'</sup>-半分子とそれに対応するT7 RNAポリメラーゼ転写産物（以下、unmodificationと表記する）の根本的な違いは修飾塩基の有無である。G m-メチラーゼはtRNA修飾酵素のなかでは比較的、基質特異性が低く、Dループ中に共通配列G 18 G 19をもつtRNAならば、その塩基配列が決定的に作用す



ることではないと考えられていた。しかるにunmodificationに対するメチル化活性は極めて低い。その初速は酵母フェニルアラニンtRNA<sup>5'</sup>-半分子に比較して20%。全鎖長をもつ天然のtRNAと比較すると5%しかない。この理由はつまるところ、修飾塩基の有無に帰する。酵母フェニルアラニンtRNA<sup>5'</sup>-半分子には5種類の修飾塩基が6箇所に入っている。その内、Cm32とGm34はアンチコドンループに挿入された修飾であり、2.2.章ですでに述べたようにアンチコドンループ部分はその塩基配列はもちろん、その存否すらG m-メチラーゼの酵素活性に影響を与えない。それ故、Cm32,Gm34の欠損がこれほどのメチル化活性の低下をまねいたのではない。つまり、他の3種類の修飾塩基の効果の合算がG m-メチラーゼのメチル化活性の低下として現われているのである。それでは、これら、3種類の修飾塩基はいったい、いかなる形でその効果を発揮しているのだろうか。各々の修飾塩基についてその役割を徹底的に追及した研究はいまだにない。しかしながら、修飾塩基の存在する位置や塩基自身の性質からtRNAの高次構造が形成される上で積極的な役割を果たしているであろうと類推されている。このことから考えて、これらの修飾塩基はtRNA<sup>5'</sup>-半分子においてすらも構造の保持に何らかの影響を与えているであろう。

酵母フェニルアラニンtRNA<sup>5'</sup>-半分子とunmodificationの基質としての特性差がRNA自身の構造の安定性に帰すると予想されたので、次にスベルミジンを反応溶液中に加えてその効果をみた。スベルミジンは、tRNAに結合してその立体構造の保持に貢献するポリアミンの一種である。その結果はFig2.3.5.1.-1にあるようにほとんど影響を与えなかった。tRNA全構造が存在すれば形成されるポリアミンの結合サイトは半分子RNAでは形成されないと考えられる。

上記の考察は動力学的パラメーターを議論することによって補強される。

Table2.3.5.1.-1.にあげたようにunmodificationのKm値は酵母フェニルアラニンtRNA<sup>5'</sup>-半分子のKm値に比べて4倍以上大きい。つまり、酵素とRNAとの親和性が

かなり低下している。一方、 $V_{max}$ 値はそれほど低下しておらず、両者の会合性の低さがそのまま、メチル化活性の低下として現われているものと解釈できる。

### 2.3.5.2. 種々の長さのT7 RNAポリメラーゼ転写産物のメチル化

#### (目的)

本章の目的はG m-メチラーゼがメチル化可能な最小基質を明らかにし、本酵素が本質的に必要とする部位を明らかにすることにある。

#### (方法)

2.3.5.1.章の方法とおなじである。

#### (結果)

作製したRNAフラグメントはFig2.3.5.2-1に一覧表としてまとめる。また、メチル化活性の初速をTable2.3.5.2-1にまとめる。

#### (考察)

G m-メチラーゼが基質とする最小のRNAフラグメントは4-28であった。このフラグメントは酵母フェニルアラニンtRNAのG4からC28までに対応しており、アミノアシルステムの半分とアンチコドンステムの一部を加えたD-アーム全領域を含んでいる。これより短鎖のフラグメントは現在、我々が用いているメチル化反応のシステムではメチル化活性を検出することができなかった。この実験結果は非常に予想外であった。この実験を行なうにあたって、我々はG m-メチラーゼが基質として本質的に認識している部位はD-アーム領域のみであろうと予想していた。しかしながら予想は裏切られ、G m-メチラーゼがその酵素活性を発揮するにはD-



アーム領域を含む、ある程度まとまった長さのフラグメントが必要であった。

この結果を解釈する方法は2通り考えられる。ひとつはRNAが水素結合を形成しD-アームらしい構造をとるには、ステム&ループを形成する塩基以外に何らかの補助となる塩基が必要であるとする考え方である。もうひとつの考え方はGm-メチラーゼが直接、基質として認識するサイトがD-アーム領域以外にも存在するという考え方である。言うならば、前者はRNA側に原因があるとする考え方で後者は酵素側に原因があるとする考え方である。どちらの解釈が正しいのであろうか。前者を補強する実験的事実は多い。まず、wild (T7 RNA ポリメラーゼ転写産物) と酵母フェニルアラニンtRNA 5'-半分子のメチル化活性の違いが挙げられる。この二つのRNAフラグメントの本質的な相違点はすでに述べたように修飾塩基の存否のみである。しかるに基質としての特性は圧倒的に酵母フェニルアラニンtRNA 5'-半分子のほうがすぐれている。酵母フェニルアラニンtRNA 5'-半分子にはステムの付け根にメチル基をもつ修飾塩基が存在するが、この修飾がたとえ半分子になろうともD-アーム構造の保持に効いているのではないだろうか。これはすなわち、D-アーム構造以外の塩基がステム&ループの形成に役かっている可能性を示している。さらに、フットプリンティングの実験結果も前者の考え方を支持している。フットプリンティングの実験では酵素がカバーする領域はD-アームを含むごく限られた領域であった。けっしてG4-C28などという広い範囲ではない。ただし、ここでさらに議論しておくべき点がないわけではない。Gm-メチラーゼがtRNAに結合した時にアミノアシルステムやアンチコドンステムをときほぐするような大規模な構造変化をとまなうとすれば、ステムに通常は埋もれていてリボヌクレアーゼの攻撃を受けにくかった塩基の反応性は当然たかまるであろう。そのような塩基自身もしくはその近傍がGm-メチラーゼの認識部位であった場合、フットプリンティングの実験結果のみですべてを議論することは困難になってくる。つまり、フットブ



リンテイングでリボヌクレアーゼによる分解を受けにくくなった領域は明らかに酵素によってカバーされていると言ってよいが、逆に分解反応が促進された領域に関しては酵素が結合していないとは断言できないのである。特に G m-メチラーゼの場合、フットプリンテイングのデータでアミノアシルステムの G クラスターの反応性が顕著に上昇しており、アミノアシルステムがほどかれている可能性を議論しておく必要がある。もし、アミノアシルステムがその構造を保持したままであり、D-アームに G m-メチラーゼが結合しているとすると、当然、リボヌクレアーゼは D-アームの反対側から接近せざるを得ず、結果としてアミノアシルステムの G クラスターの反応性に差が生じるはずである。つまり、アミノアシルステムもらせん構造をとっているならば、G m-メチラーゼと反対側にある塩基部分が優先的にリボヌクレアーゼ分解を受けることになる。それでは実際のデータはどうであろうか。酵母フェニルアラニン tRNA に対するフットプリンテイングでは tRNA の塩基配列上の問題でこの点を確認することができないが、大腸菌 tRNA<sup>Met</sup> に対するフットプリンテイングの実験結果では G5, G6, G7 の反応性に明らかに差が生じている。この点を考慮すれば、少なくとも G5-G7 はステム構造を保持していると考えられる。とくに D-アーム側にあり、これらの塩基のなかでは G m-メチラーゼにもっとも接近している G7 のリボヌクレアーゼ感受性の低さはこの考え方を強力に支持している。つまり、G m-メチラーゼが結合しても G5-G7 の関与するアミノアシルステム部分はほどかれず、フットプリンテイングの実験結果はステムの崩壊を勘案せずに評価することができ、少なくとも第4番目から第7番目の塩基と G m-メチラーゼは直接会合していないと結論づけられる。さて、ここでもう一度議論をもとにもどそう。G m-メチラーゼの最小基質が 4-28 となる理由が RNA の構造に起因するという考え方を補強する証拠をもうひとつ、挙げておこう。ある RNA フラグメントが存在し、そのなかにステム&ループ構造が存在するとする。(注：今回、実験で用いたすべ

てのフラグメントは、少なくとも一次構造上、この例にあてはまる。)もしそのとき、ステム&ループ構造と他の部分との相互作用がないとすれば、最末端の塩基は別として、ステム&ループ構造以外の塩基のヌクレアーゼに対する感受性は原則的に等価なはずである。しかるに今回、実験で用いたフラグメントを保存していると非常に不思議な現象が生じる。U8での切断が優先的に生じるのである。ヌクレアーゼによる感受性を議論する場合は、その前後の塩基配列を考慮しヌクレアーゼ自身の特性を勘案せねばならないので、この現象のみから明確な結論を引き出すことはできない。しかしながら、7箇所あるUのなかでU8の反応性のみが著しく高いということは、ステム&ループ構造以外の塩基部分にも何らかの定まった構造が存在していることを意味しているのではないだろうか。

このように、ステム&ループ構造以外のRNA鎖の構造上の問題がGm-メチラーゼの最小基質認識において決定的な役割をはたしているとする概念には支持すべき点が多いが、Gm-メチラーゼ自身がステム&ループ構造以外のRNA鎖と直接、会合する可能性は全面否定されたわけではない。

ステム&ループ構造以外のRNA鎖が、たとえ半分子以下のフラグメント中であっても何らかの構造を保持し、それがステム&ループ構造をよりD-アームらしく演出する上で重要な機能をはたしているとすれば、その塩基配列を変化させるとメチル化活性に影響をおよぼすにちがいない。とりわけ、ミトコンドリアtRNAなどの例外を除けば、すべてのtRNAで保存されている共通塩基U8, Pu9, Pu26の存在は注目に値する。それらの塩基の効果については3.2.4章で取り扱うことにする。

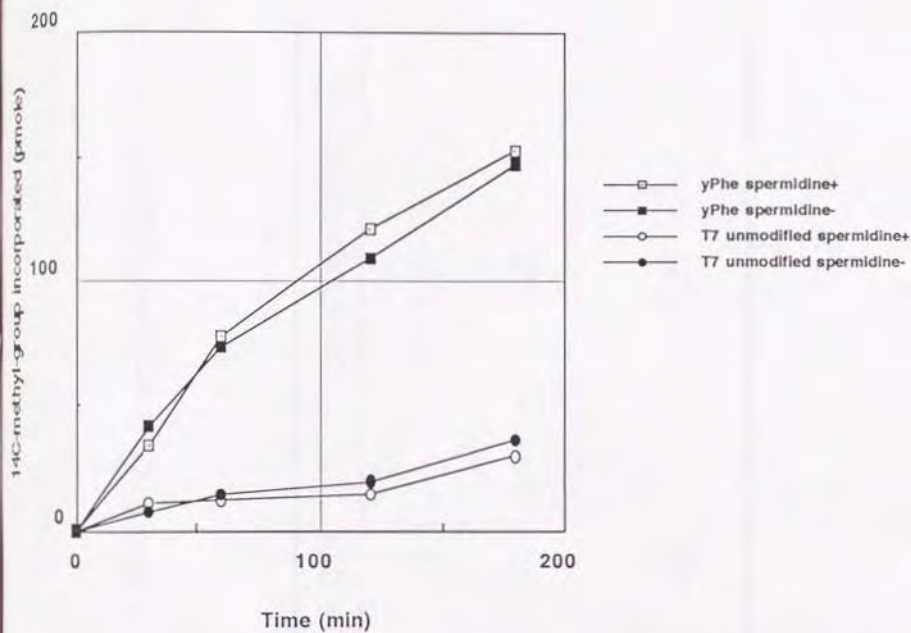


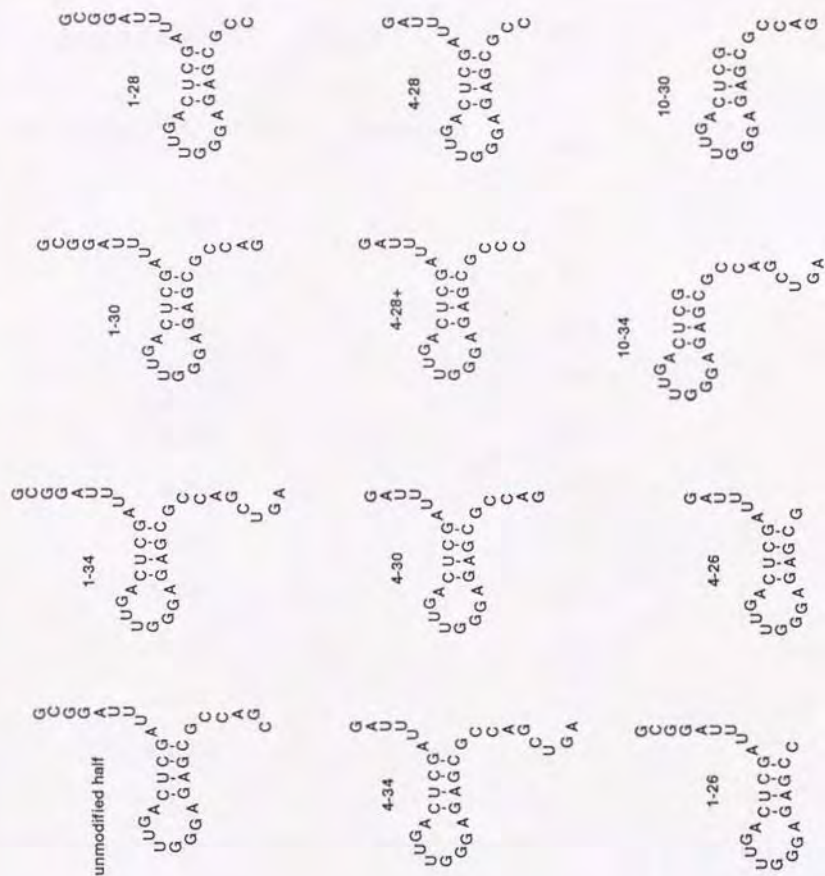
Fig 2.3.5.1-1 Initial velocity of methylation activity for tRNA 5'-half fragment or T7 unmodified transcript



Table 2.3.5.1-1 Gm-メチラーゼのT7 RNA polymerase 転写産物に対する  
酵素学的パラメーター

基質	$K_m$ (nM)	$V_{max}$ (nmole/mg.min)
yeast tRNA <sup>Phe</sup>	<5	1.49
yeast tRNA <sup>Phe</sup> 5'-half	35	1.25
T7 RNA polymerase transcript		
yeast tRNA <sup>Phe</sup> 5'-half	155	0.98

Fig2.3.5.2-1 鎖長改變體一覽



# 鎖長改変体のメチル化活性の比較

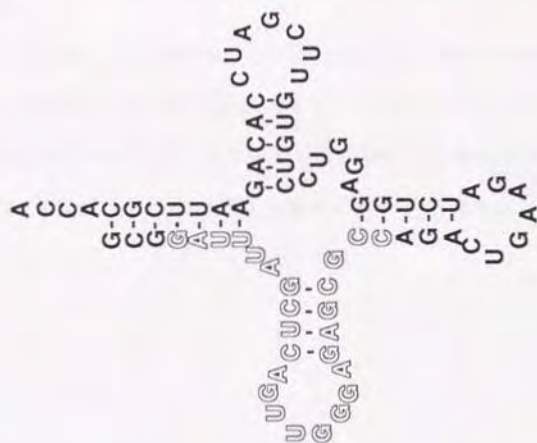
name			cpm
yeast tRNA	Phe	5'-half	1442
yeast tRNA	Phe	5'-half transcript	354
		1-34	305
		1-30	381
		1-28	220
		1-26	55 *
		4-34	315
		4-30	195
		4-28	171
		4-28+	212
		4-26	94 *
		10-34	-
		10-30	-

\* 酵母フェニルアラニンtRNAに対する初速が0.5%以下なので、この論文ではメチル化活性が検出限界以下であると、取り扱った。

・ 事実上、メチル化活性が全く検出できない。



# 最小基質4-28フラグメントのtRNA上の位置



name	<sup>14</sup> C-methyl group incorporation (relative)	(%)
pYF 01 transcript		
1-34	100	100
1-30	86	86
1-28	107	107
1-26	62	62
4-34	89	89
4-30	55	55
4-28+	60	60
4-28	48	48
1-26	-	-
4-26	-	-
10-34	-	-
10-30	-	-

## 2.4. 化学合成RNAによるメチル化

### (目的)

T7RNAポリメラーゼによる転写系は短鎖RNAの合成には向いておらず、また、5'末端はGである必要がある。そこでD-ア-ム領域のみからなるフラグメントは化学合成し、そのメチル化活性を調べた。

### (材料)

合成D-arm 18mer、および19mer (Fig.2.4)は石川正英博士(現:東京工業大)と平尾一郎博士(現:東京薬科大)により合成されたものをわけていただいた。

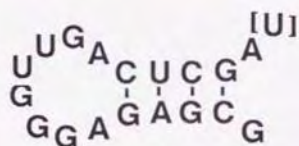
### (方法)

2.3章の方法に準ずるが、ここでは酵素反応の温度を30℃とし18時間以上、反応させるなどの方法も試みた。

### (結果と考察)

合成D-arm 18mer、および19merはいずれもG m-メチラーゼの基質とはならなかった。また、低温下で長時間反応させてもメチル基の取り込みは観察されなかった。この結果は先のT7RNAポリメラーゼ転写産物による解析と矛盾せず、D-ア-ム構造のみでは基質となりえないことが具体的に証明された。

Fig2.4 合成 D-arm18mer,  
19merの塩基配列



D-arm18merはポジション9-26に対応しており、  
19merは8-26に対応する。



### 第三部 Gm-メチラーゼのより効率的なメチル化に必要なtRNAの構造

### 3.1. D-アーム構造は必要か?

#### (目的)

Gm-メチラーゼのメチル基導入部位はD-アーム上に存在する共通配列G18のリボース環である。したがって、D-アーム構造はメチル化にとって必須であるとかんがえられる。しかしながら、T7 RNA ポリメラーゼの転写系が発達するまではD-アーム構造のない酵母tRNA<sup>Phe</sup>の改変体を得ることができず、もっとも直接的かつ基本的な証明がなされていなかった。まず、“D-アーム構造は必要である”という我々のかつての作業仮説を証明する。

#### (方法)

D-アーム構造のない酵母tRNA<sup>Phe</sup>の改変体(ΔD-arm)を作成し、そのメチル化活性を測定することにした。ΔD-armはFig3.1.-1の塩基配列を有する。

鋳型プラスミドpΔD-armはKunkel法<sup>(21,22)</sup>によって作成した。RNAの転写、精製、Gm-メチラーゼの酵素活性の検出等は2.3.章と同じである。

#### (結果と考察)

T7 RNA ポリメラーゼ転写産物ΔD-armは全くメチル化されなかった。Gm-メチラーゼの基質としてD-アーム構造は必要である。





3.2.1. 大腸菌tRNA<sup>Ser3</sup>とそのT7 RNA ポリメラーゼ転写産物のメチル化

## (目的)

我々が実験に使用しているGm-メチラーゼは高度好熱菌由来の酵素であるが、G18からGm18へのメチル化は真核生物、原核生物といった生物種の大枠をこえて広く分布している（ただし、古細菌には発見されていない。）（48,49,52,54）。大腸菌もまた例外ではなく、Gm18の修飾をもつ生物の一種であり、Gm-メチラーゼをもっている（49,53,55）。大腸菌Gm-メチラーゼは高度好熱菌のGm-メチラーゼのようにほとんどすべてのtRNA分子種をメチル化できるわけではなく、極く限られた種類のtRNAのみを基質としている。つまり、厳密に言えば、まったく別の酵素なのであるが、G18をメチル化するGm-メチラーゼであるという点は共通しており、その基質認識のパターンは高度好熱菌のGm-メチラーゼの基質認識機構を類推する上でよい参考になる。渡辺、松本らはこの点に最初に着目した報告をおこなっている<sup>(10)</sup>。

大腸菌のGm-メチラーゼが基質とするtRNAはどのようなtRNAであろうか。ざっと列挙してみよう。

tRNA<sup>Gln1</sup>, tRNA<sup>Gln2</sup>, tRNA<sup>Leu1</sup>, tRNA<sup>Leu2</sup>, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Met<sub>m</sub></sup>, tRNA<sup>Ser1</sup>, tRNA<sup>Tyr1</sup>, tRNA<sup>Tyr2</sup>。ただし、tRNA<sup>Met<sub>m</sub></sup>の修飾は部分的である。

これらのtRNAに共通した特徴は何か。まず、第一にロイシン、セリン、チロシンといったtRNAはエクストラループの長いクラスIIタイプのtRNAである。クラスIIタイプのtRNAはエクストラループが長いという他、D-ステムが3塩基対で構成

されることが多い、D-ループが9塩基以上の長さがある等の特徴を持っている。

tRNA<sup>Gln</sup><sub>1</sub>, tRNA<sup>Gln</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>Met</sup><sub>m</sub>はエクストラループが短かく、クラスIタイプのtRNAに属しているが、やはり、D-ループが長い等の特徴は共通している。ただし、tRNA<sup>Met</sup><sub>m</sub>の修飾は部分的である。

それでは、上記の特徴を持ちながらGm18の修飾を受けないtRNAはないのだろうか。たったひとつの例外ではあるが、tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>はクラスIIタイプのtRNAに属しながらGm18の修飾を受けない。このtRNAはなぜ、大腸菌Gm-メチラーゼの基質となりえないのであろうか。より基質認識の幅の広いと考えられる高度好熱菌Gm-メチラーゼは、はたしてこのtRNAをメチル化することができるのであろうか。

#### (方法)

酵素活性の測定およびtRNAの分析は前述の方法に従った。また、大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>遺伝子をT7プロモーター下流に接続したプラスミドpES3は姫野俵太博士よりいただいた。

大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>のT7 RNA ポリメラーゼ転写産物は前述の方法に従って調製した。大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>は林宣宏氏よりいただいた。

#### (結果)

大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>に対するメチル基転移反応の結果はFig3.2.1.-1に示した。また、このtRNAに対するT7 RNA ポリメラーゼ転写産物のメチル化活性も測定したが、現在使用している分析手段ではその活性をとらえることができなかった。

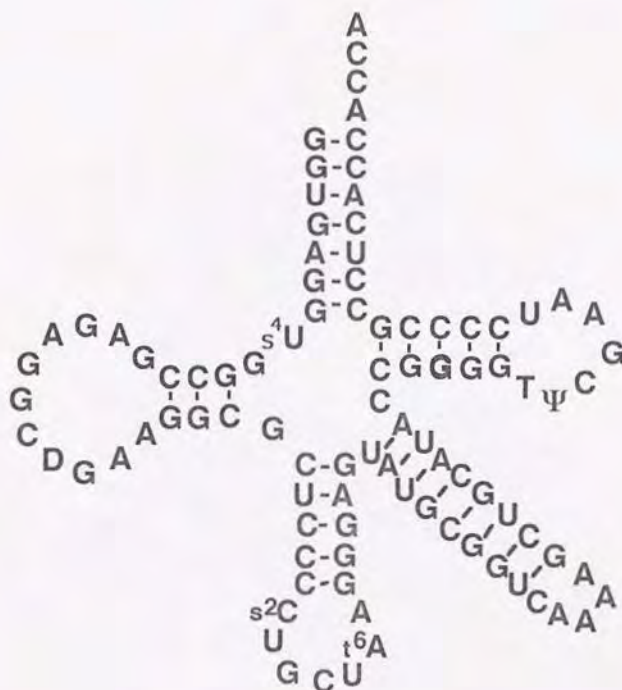
## (考察)

Fig3.2.1.1に示した大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>に対するメチル化活性は極めて微弱であり、このtRNAが本当にメチル化されるのかどうかは結論づけることができなかった。天然の未分画tRNAを初発材料として精製されたtRNAを完全に単一標品にすることは非常にむずかしく、この微弱なメチル化活性が、わずかに混入している他のtRNAに由来している可能性を否定することはできない。大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>が共通配列G18G19をもつtRNAのなかではG m-メチラーゼにとっていままでになく劣悪な基質であることは間違いないが、このtRNA自身が本当にメチル化されるかどうかを確かめるためT7 RNA ポリメラーゼ転写産物の解析を行なった。その結果、メチル化活性をとらえることができず、少なくとも生理的に意義のあるレベルでメチル化反応は進行しないことがわかった。

それでは大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>がG m-メチラーゼの基質として適していない理由は何であろうか。大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>にはそのD-ループの塩基配列が酷似したアイソアクセプターtRNA、tRNA<sup>Ser</sup> (CGA)、tRNA<sup>Ser</sup> (GGA)、tRNA<sup>Ser</sup> (UGA)、が存在する。これらのtRNA<sup>Ser</sup>はG18がGm18に修飾を受けており、tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>と比較することによって大腸菌G m-メチラーゼの基質認識機構を類推することができる。また、これを高度好熱菌G m-メチラーゼの基質認識機構にまで拡張することも可能かも知れない。tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>が他のアイソアクセプターと異なる点は、G18の修飾の有無の他に17番目の塩基の差がある。つまり、tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>はA17G18G19となっているのに対して、他の



tRNA<sup>Ser</sup><sub>1</sub>はPy17G18G19となっている。通常、17番目の塩基はピリミジンであり、tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>のようにプリンが配置されることは非常にまれである。大腸菌tRNAでは他にtRNA<sup>Glu</sup>(UUC)があるのみで、オルガネラで機能しているtRNA群を除けば、生物界全体を見回しても古細菌の一部のtRNAや真核生物のtRNA<sup>Met</sup>の一部に散見される程度である。また、A17G18G19の塩基骨格をもち、G18がGm18にメチル化されているのは、ホウレンソウのミトコンドリアtRNA<sup>Val</sup>が唯一、例外的に知られているのみである<sup>(56)</sup>。このような点を考慮すると、Gm-メチラーゼが基質として認識するため必要な一次構造はPy17G18G19という配列ではないだろうか。



*E. coli* tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>

Fig 3.2.1-1 大腸菌tRNA<sup>Ser</sup><sub>3</sub>

いままでもチル化を試みた天然のtRNAのうち、Gm-メチラーゼがもっともメチル化しにくかったtRNAである。基本的な共通配列はすべて存在しているが、長大なエクストラループをもち、D-ループも大きい。



Fig3.2.1-2 大腸菌tRNA<sup>Ser3</sup>の転写産物  
T7 RNA polymeraseによる転写産物の最終精製標品  
0.02A<sub>260</sub>unitsを10%変性PAGEにかけて分析した。  
塩基配列はDonis-Keller法で確認した。



Table 3.2.1-1 Gm-メチラーゼの各種基質に対する酵素活性

基質	cpm
yeast tRNA <sup>Phe</sup>	4980
<i>E. coli</i> tRNA <sub>f</sub> <sup>Met</sup>	4220
<i>E. coli</i> tRNA <sup>Ile</sup> <sub>major</sub>	4410
<i>E. coli</i> tRNA <sub>3</sub> <sup>Ser</sup>	235
<i>E. coli</i> tRNA <sub>2</sub> <sup>Glu</sup>	716
<i>E. coli</i> tRNA <sub>3</sub> <sup>Ser</sup> transcript	90

*E. coli* tRNA<sub>2</sub><sup>Glu</sup> もポジション17がAのtRNAであり、Gm-メチラーゼの基質としてはあまりよくない。



### 3.2.2. D-ループ部分の塩基置換の影響

#### (目的)

最小基質4-28フラグメントにふくまれる構造のうちD-ループ部分は直接、Gm-メチラーゼと会合する。まずD-ループ部分の塩基を置換して必要な構造を明らかにする。とくにG18,G19の共通配列の役割と3.2.1.章で指摘したポジション17の塩基の役割を明らかにする。

#### (方法)

鋳型DNAの部位特異的突然変異導入にあたってはKunkelの方法(前述)を用いた。

RNAの転写及び精製、Gm-メチラーゼの活性測定等は前述の方法にしたがった。

#### (結果)

この章で使用した改変体とえられた酵素学的パラメーターはFig 3.2.2.1.にまとめらる。図中で - の印はメチル基転移の初速が野生型の0.5%以下であることをしめす。

#### 1. 共通配列 G18 G19 について

共通配列 G18 G19 の両方、あるいはいずれか片方を他の塩基に置換すると Gm-メチラーゼによるメチル基転移反応は測定不可能なほど減少した。また、この共通配列の位置をずらしてもメチル化活性は検出されなかった。

#### 2. ポジション17の塩基配列置換に関して



ポジション17のUをプリン塩基に置換すると*Kcat*値が大きく減少することがわかった。また、ピリミジン塩基であるCに改変した場合はメチル化活性にはほとんど影響がなかった。

### 3. そのほかの塩基置換について

D-ループの塩基配列のうち、A13とA21はほとんどすべてのtRNAで保存されている塩基であるが、これらを他の塩基に置換してもメチル化活性にはほとんど影響がなかった。G15をCに置換した改変体は*Kcat*値が減少を示した。U16, G20の改変体はその効果がほとんどメチル化活性に影響を与えなかった。

### (考察)

#### 1. 共通配列 G18 G19 について

まず最初に共通配列 G18 G19 を含む G18 G19 G20 を U18 U19 U20 に置換した改変体 (GGG/UUU) を作製した。この転写産物は全くメチル化されず、D-ループ部分の塩基配列は本質的に Gm-メチラーゼの基質認識に影響を与えることがわかった。また、同様に共通配列 G18 G19 の位置を16, 17のポジションにずらした改変体(L-RV)も全くメチル化されず、Gm-メチラーゼはこの共通配列部分のループ中での位置を認識していることが示唆された。

そこでD-ループに含まれるすべての塩基に変異を導入することにした。その結果、まずG18またはG19のいずれか一方でもG以外の塩基に置換した場合、メチル化活性は検出できないレベルまで低下することがわかった。すなわち、Gm-メチラーゼの基質認識にとってG18およびG19は必須である。このような性質は2'-O-メチル型のメチル基転移酵素としてはじめてであり、従来報告されていた両棲類のGm(34)-メチル化酵素<sup>(67)</sup>とはかなり異なった基質認識機構を持っていることが

わかった。

## 2. ポジション17の塩基配列置換に関して

次に通常、ピリミジン塩基が配置されることが多いポジション17をプリン塩基で置換した改変体を用いて実験を行った。その結果、 $K_m$ 値はさほど変化が見られなかったが、 $K_{cat}$ 値が大きく減少することがわかり、大腸菌tRNA<sup>Ser3</sup>で見られた傾向を酵母tRNA<sup>Phe</sup>のアナログを用いて検証することができた。この原因として、四つの可能性が考えられる。

まず第一に酵素自身が直接、ポジション17の塩基を認識している可能性。次にプリン塩基のほうがピリミジン塩基よりも嵩高いので立体障害を形成し、酵素の活性アミノ酸残基とリボース環との会合が妨げられる可能性。そして同じ立体障害でも酵素との複合体形成ではなく、tRNA自身の高次構造がゆがめられる可能性。さらにポジション17とポジション18の間のスタッキングが強まり酵素がメチル基転移をするため基質の構造変換をする際、この速度が減少させられる可能性。の四つである。

もちろん、これらの原因が複合していることも考えられる。まず第一の可能性にあげた酵素自身が直接、修飾を行わない塩基や隣接する塩基も認識する現象はtRNA修飾酵素、とくにアンチコドンの修飾酵素では極めて一般的に知られた現象(48,51,62,63,64)である。第二の可能性にあげた立体障害の形成は基質アナログを用いて酵素反応を解析する上では必ず考慮せねばならない問題であろう。第三の可能性のtRNA自身の高次構造がゆがめられる現象は研究の進んでいるアミノアシルtRNA合成酵素のグループで近年、よく議論されている問題点のひとつである(57,58,59,60)。第四のスタッキング効果がどれだけ酵素反応に影響を及ぼすかについては全くわからない。

### 3. そのほかの塩基置換について

A13、A21およびU8は相互に水素結合を形成する共通配列であり、D-ループの構造を決める上で重要な役割を担っている。A13、A21の置換は当然、メチル化活性に影響を及ぼすであろうと予想されたが、驚くべきことにGm-メチラーゼの酵素活性にはほとんど影響がでなかった。Gm-メチラーゼはループ全体を認識しているのではなく、ごく局所すなわちポジション17、18、19のみを認識しているらしい。しかしながら、その局所が空間的にどこに位置するかを決定する上で、tRNAの他の部分との相互作用が重要であることは疑いようがなく、問題はそれがどの塩基とどの塩基の間に形成される水素結合であるかということである。D-アームの各塩基はtRNAの他の部分と数多くの水素結合を形成する。A13、A21およびU8の水素結合はそのひとつであるが、T-ループ、エクストラ-ループなどに散在する沢山の共通配列にも変異を導入し解析することの重要性が再認識された。なお、これらの改変体に関しては3.2.4章で取り扱う。

なお、G15は多くのtRNAでプリン塩基が配置されるポジションでありC48との間に水素結合を形成する。

\*この章以降で議論する酵母tRNA<sup>Phe</sup>の高次構造については主としてX線結晶構造解析<sup>(46,47)</sup>および酵母フェニルアラニルtRNA合成酵素の基質認識に関する文献<sup>(66)</sup>を参考にしました。



Table3.2-1 部位指定突然変異プライマー  
一覧表 (Kunkel法) その1


name	sequence	鋳型plasmid
U8A	5' CAGTCTGGCGCTCTCCCAACTGAGCTTAATCCGC 3'	 <p>pYF 08</p>
U8G	5' CAGTCTGGCGCTCTCCCAACTGAGCTCAATCCGC 3'	
U8C	5' CAGTCTGGCGCTCTCCCAACTGAGCTGAATCCGC 3'	
T17A	5' AGTCTGGCGCTCTCCC <del>T</del> ACTCACCTAAATCC 3'	
T17G	5' AGTCTGGCGCTCTCCC <del>C</del> ACTCACCTAAATCC 3'	
G18A	5' AGTCTGGCGCTCTCCTAACTCACCTAAATCC 3'	
G18C	5' AGTCTGGCGCTCTCC <del>G</del> AACTCACCTAAATCC 3'	
G18T	5' AGTCTGGCGCTCTCC <del>A</del> AACTCACCTAAATCC 3'	
G19A	5' AGTCTGGCGCTCTCTCAACTCACCTAAATCC 3'	
G20A	5' AGTCTGGCGCTCTTCCAACCTCACCTAAATCC 3'	
G26A	5' CAAGGTCTGGT <del>G</del> GCTCCTCCCAACTGAAGCT 3'	<p>pYF 07</p>
G26T	5' CAAGGTCTGG <del>A</del> GCTCCTCCCAACTGAAGCT 3'	
G45C	5' AAGATCTGG <del>A</del> CGTCCTGTGTTC 3'	
G46C	5' AGATCTGGAG <del>C</del> TCCTGTGTTCG 3'	
C48A	5' CTGGAAGGTACTGTGTTCGAT 3'	
T54A	5' GAAGGTCCTGTGATCGATCACAG 3'	
T54G	5' GAAGGTCCTGTG <del>G</del> TCGATCACAG 3'	
T54C	5' GAAGGTCCTGTG <del>G</del> TCGATCACAG 3'	
T55A	5' GTCCTGGTGTACGATCCACAGAA 3'	
C56G	5' GTCCTGTGTT <del>G</del> GATCCACAGAA 3'	
A58G	5' CCTGTGTTCG <del>G</del> TCCACAGAA 3'	

Table 2.3.-2 部位指定突然変異 プライマー  
一覧表 (Kunkel法) その2

name	sequence	鋳型 plasmid
L4FA	5' AGTCTTGGCGCTCCCATGAGCTAAA 3'	pYF 08
L5	5' AGTCTTGGCGCTCTCCAIGAGCTAAA 3'	
L6	5' AGTCTTGGCGCTCTCCAATGAGCTAAA 3'	
L7	5' AGTCTTGGCGCTCTCCAACCTGAGCTAAA 3'	
L10	5' AGTCTTGGCGCTCTCCCAAACTGAGCTAAA 3'	pYF 07
L12	5' AGTCTTGGCGCTCTCCCAAAAACTGAGCTAAA 3'	
SR	5' AGTCTTGGCCGAGTCCCAACTCTCGTAAA 3'	
RV	5' AGTCTTGGCGAGCTCCCAACTGCTCTAAA 3'	
LRV	5' AGTCTTGGCGCTCTCAACCCCTGAGCTAAA 3'	pYF 07
GGG/UUU	5' AGTCTTGGCGCTCTAAAACTGAGGCTAAA 3'	

下線部分に突然変異がかかる

Fig3.2.2-1 メチル化されなかった2種類の改変体

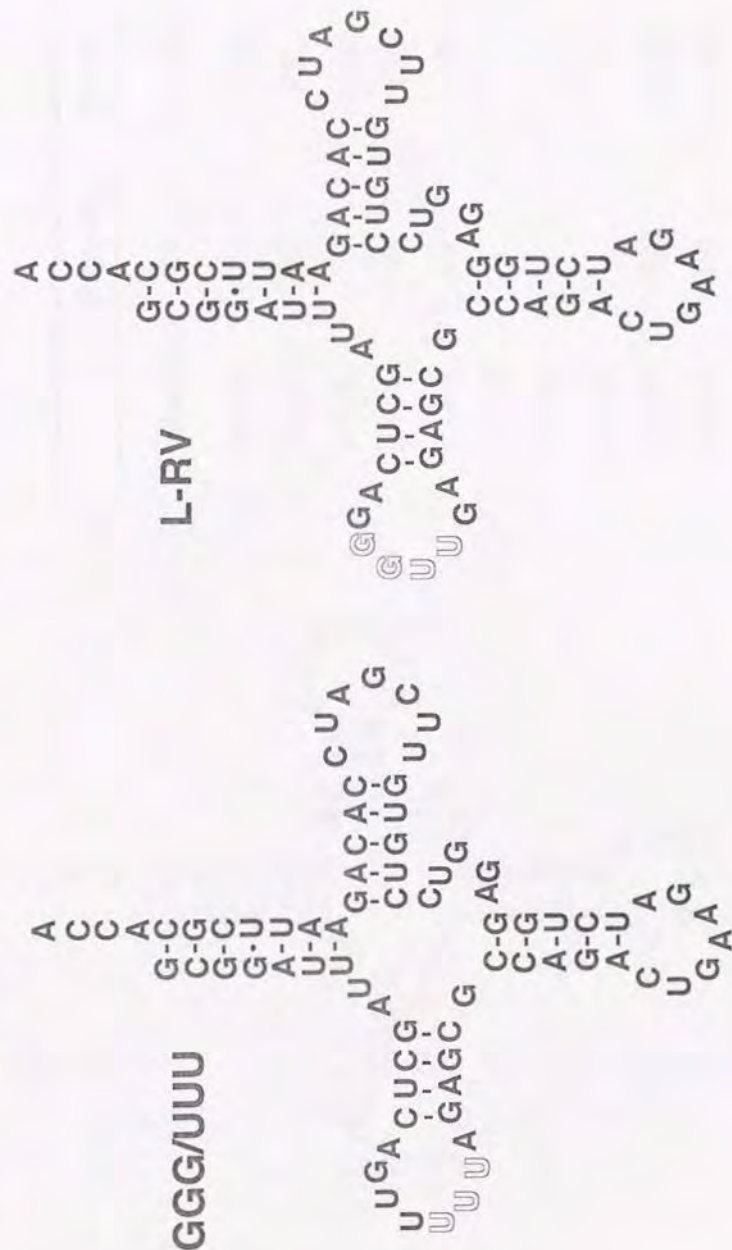
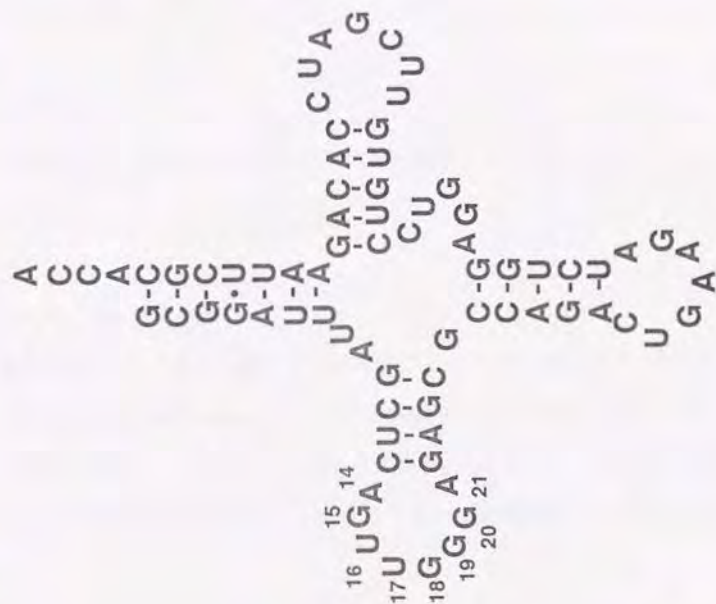




Fig 3.2.2-2 D-ル-フ部分の改变体と酵素学的パラメーター



	Km(nM)	Vmax
unmodified	80	1650
A14C	110	1325
G15U	90	650
U16A	80	1600
U17A	60	125
U17G	60	50
G18A	-	-
G18C	-	-
G19A	-	-
G20A	100	1125
A21C	90	1350

### 3.2.3. D-ステム部分の塩基配列置換の影響

#### (目的)

D-ステムは最小基質4-28フラグメントの唯一、取り得る二次構造である。このステム構造にはtRNAに保存されている共通構造も含まれており、多くのアミノアシルtRNA合成酵素では基質認識部位として機能しているし<sup>(68,69)</sup>、修飾酵素ではポジション26のメチル化パターンのきりかえに関与することが指摘されている<sup>(39)</sup>。これらがメチル基転移反応に及ぼす影響を調べる。

#### (方法)

T7RNAポリメラーゼ転写系による酵母フェニルアラニンtRNAアナログの作成と精製、鋳型プラスミドの作成、およびGm-メチラーゼの酵素活性の測定は3.2.2.章の方法に従った。

#### (結果および考察)

この章で使用した改変体と得られた酵素学的パラメーターはFig 3.2.3-1にまとめらる。

#### GCUC/AAAA

まず、最初にD-ステム構造を壊すようにG10C11U12C13の配列をすべてAに置換した改変体GCUC/AAAAを作成した。この改変体を用いてGm-メチラーゼによるメチル化活性を測定したところ、活性は全く検出されなかった。このことより、Gm-メチラーゼが基質とするためにはD-ステム構造が必要であるとわかった。

## R V

D-ステムの配列のうち、U12-A23の塩基対はすべての原核生物のエロンゲーターtRNAにおいてピリミジン12-プリン23塩基対として保存されている共通配列である。この共通部分を含むC11-G24, U12-A23を逆転させA11-U24, G12-C23とした改変体RVを作成した。

RVより得られたGm-メチラーゼの酵素学的パラメーターは*Kcat*値が減少するものの*Km*値も小さくなり、酵素反応の初速はほとんど変化ないか、やや小さくなるという複雑なパターンを示した。具体的にいかなる理由によってこのような現象が生ずるのか不明であるが、D-ステムの配列によっては酵素と基質の親和性や酵素の処理速度自身も数倍程度は変動することが示され、D-ステムと酵素が直接、会合している可能性もあると考えられる。

## S R

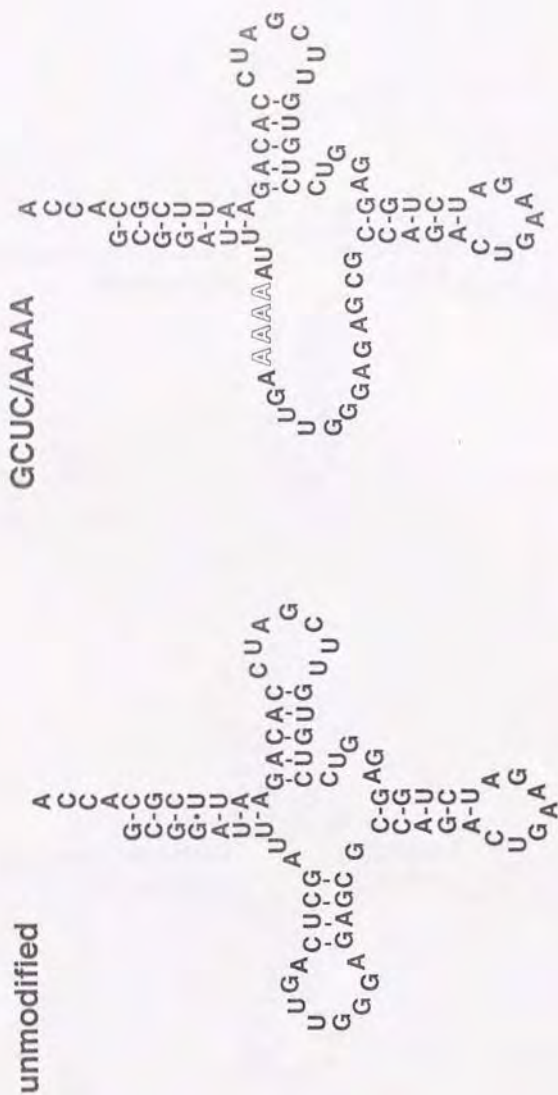
先に得たRVの結果を踏まえ、さらに改変体SRを作成した。この改変体ではピリミジン12-プリン23塩基対はもちろん、すべてのD-ステム塩基対が入れ変っている。このため、エクストラループに存在するG45, G46とD-ステムとの水素結合も形成されないと考えられる。

SRに対するGm-メチラーゼの酵素学的パラメーターはRVに比較してもとの酵母tRNA<sup>Phe</sup>に対するパラメーターに近い。ステム部分の配列は完全に置換していることから、Gm-メチラーゼの認識は特定の配列に対してはないと考えられる。

以上をまとめるとGm-メチラーゼの基質認識においてD-ステム部分は、ステム構造の形成自身が本質的に必要な要素であり、その塩基配列は酵素の親和性や活性に多少の変動を与えるものの本質的には影響しないことがわかった。



Fig 3.2.3-1.1 D-システム改変体の構造 (その1)



注：図で白抜きの塩基が改変した部分である。



Table 3.2.3-1 D-システム改変体の酵素学的パラメーター

name	$K_m$ (nM)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
unmodified	80	5.8
GCUC/AAAA	-	-
RV	45	1.6
SR	130	5.2



### 3.2.4. 最小基質に含まれない共通塩基置換の影響

#### (目的)

2.3.5.章で述べたように最小基質4-28フラグメントに含まれる構造はtRNAの他の部位との間に数多くの水素結合を形成する。また、水素結合にあずからなくても保存されている塩基がある。

最小フラグメントや5'-半分子のメチル化活性はtRNA全体構造に比べてかなり低く、効率的なメチル化反応にはこれらの要素が関係していると考えられる。どの塩基、どの水素結合が重要であるかを調べた。

#### (方法)

この章で使用した方法は3.2.2.章の方法と同じである。

ここで作成した改変体は主として3通りに大別できる。すなわち、D-ステムの付け根に位置する塩基、エクストラループの塩基、Tループの塩基の3つである (Fig 3.2.4.-1)。この他にtRNAの共通塩基としてはアンチコドンループのピリミジン31、U32などがあるが2.2.章で示したようにこれらの塩基は存在すらメチル化活性に影響を与えず、かつD-アーム領域となんら会合することもないので改変体は作成しなかった。

#### (結果)

得られた酵素学的パラメーターはTable 3.2.4-1にまとめる。

## (考察)

## 1. D-ステムの付け根に位置する塩基

この領域にはU8、A9、G26の三つの保存配列が存在する。U8は1.2章で述べたように酵母tRNA<sup>Phe</sup>はもちろん、それ以外のtRNAでもA14と水素結合を形成しD-アーム構造に影響を与えていると考えられている。一方、9番のポジションはほとんどの場合、A、まれにGかその修飾塩基もしくはUの修飾塩基が位置する。酵母tRNA<sup>Phe</sup>の場合、A9はU12-A23との間に水素結合を形成し、やはりD-アーム構造に影響を与えていると考えられている。また、ポジション26は天然のtRNAではメチル化されたG、もしくは未修飾のAが位置しており、tRNAのL字型構造に影響を与えていると考えられている。

とくにU8のポジションは我々が化学修飾や紫外線による分子内架橋を用いて解析し着目した部位であり、Gm-メチラーゼの酵素活性にかなりの影響を与えるものと予想された。結果はTable 3.2.4-1にあるように*K<sub>cat</sub>*値はほとんど変化しないが*K<sub>m</sub>*値は大きくなるという化学修飾や紫外線による分子内架橋の実験で示された傾向を再現する形になった。しかしながら、*K<sub>m</sub>*値の増大や初速の減少は化学修飾や紫外線による分子内架橋の実験ほど大きくなく、化学修飾ではベンゼン環を付加したことによる立体障害の影響が複合して現れていたものと考えられる。

A9はUに置換しても全く影響がでなかった。これは改変体RVの解析による、原核生物エロンゲーターtRNAの共通配列ピリミジン12-プリン23の塩基対はGm-メチラーゼの酵素活性に本質的影響を与えないという結果とあわせて、A9-Py12-Pu23の水素結合は酵素の基質認識に一切、関与していないと推測される。

G26はAに置換しても全く影響がでなかった。しかしながら、Uに置換すると*K<sub>m</sub>*、*K<sub>cat</sub>*ともに動き、結果として初速は4分の1に減少した。これは、Uに置換すること

によってエクストラループとの間にワトソン-クリック型の水素結合が形成されるようになりtRNAの全体構造がかなり変化してしまうためであろう。

## 2. エクストラループの塩基

この領域にはG45, G46, C48といったクラスI型tRNAに共通な塩基配列が存在する。高度好熱菌のGm-メチラーゼはクラスI型tRNAのみならず、エクストラループの長いクラスII型tRNAをもメチル化するので、この領域には必須な配列はないと予想された。しかしながら、いずれの塩基もD-アーム領域との水素結合形成に関与しておりメチル化の効率には関与する可能性があった。

G45はD-ステムのG10-C25塩基対とまた、G46はC13-G22塩基対とC48はG15と各々、水素結合を形成する。

G45をCに置換した改変体G45Cは興味深いことに酵素との親和性が若干、減少傾向を示した。D-ステムのG10-C25塩基対を置換した改変体SRでも同様の傾向があり、G45-G10-C25の会合はかなり弱いながらも酵素とtRNAの複合体形成に影響を与えているかも知れない。

G46をCに置換した改変体G46Cは驚いたことにかかなりの親和性の低下を引き起こした。G46は天然のtRNAでは通常<sup>m7</sup>G、まれにAであるがC13-G22と水素結合を形成する。D-ステム改変体から得た結果からはこれほどの酵素活性の低下は理解しがたく、酵素自身が直接、G46と会合する可能性も再考される。

C48をAに置換した改変体C48Aはほとんど、活性に変化が見られなかった。C48はG15と水素結合を形成するが、改変体G15Uで示されたような*Kcat*値の減少はなく、従って、C48-G15の水素結合は酵素の基質認識に関与しないことが示された。

## 3. Tループの塩基



TループにはtRNAのL字型構造を決める上で重要な役割をもつU54U55C56配列が存在する。天然のtRNAではこの配列はわずかの例外をのぞいてT54Ψ55C56もしくはその類縁の修飾がほどこされ<sup>(48,53,54)</sup>、Ψ55-G18、C56-G19の間に水素結合が形成される。この配列および修飾がtRNAの熱安定性を直接決定することも知られている。また、酵母tRNA<sup>Phe</sup>ではU54とA58の間にも水素結合が形成され、この結合はTループの構造の保持に関与していると考えられている。

結果は改変体U55A、C56Gともに酵素との親和性が大きく減少し、初速もそれに準じて減少した。立体構造上ではこれらの塩基はD-ループのG18G19配列にもっとも近く、*K<sub>cat</sub>*値の減少も予想されたが、C56Gにわずかな減少傾向がみられただけで、酵素はU55、C56とは直接、会合していないことが再確認できた。

また、保存配列U54をAに置換した改変体U54Aにも酵素との親和性の低減が観察され、tRNAの耐熱機構で論じられているようにポジション54の塩基は隣接するU55、C56がD-ループと水素結合を形成するのにある程度、影響を与えることがわかった。

さらに保存配列A58をGに置換した改変体も作成したが、これはほとんど酵素活性に影響を与えなかった。U54-A58の水素結合は酵素の基質認識に関与しないとわかった。

Table 3.2.4-1 共通配列置換の影響

transcript	$K_m$ (nM)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
unmodified	80	5.8
U8A	240	5.0
U8G	170	4.6
U8C	280	5.4
A9U	80	6.0
G26A	70	5.5
G26U	130	3.3
G45C	210	4.8
G46C	520	4.4
C48A	110	5.1
U54A	160	5.7
U55A	440	5.3
C56G	840	4.6
A58G	110	6.3

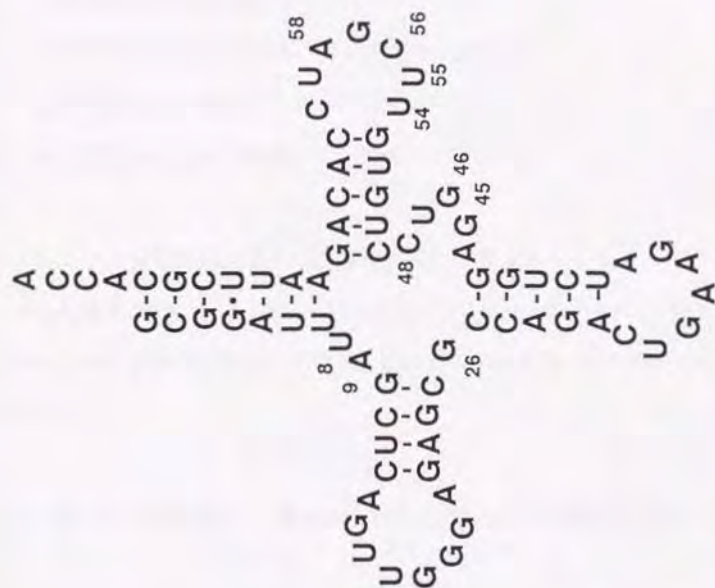


Fig 3.2.4.-1 変異を導入した共通配列の位置

### 3.2. 章のまとめ

T7 RNAポリメラーゼによる塩基置換転写産物の酵素活性解析の結果を総括する。

Gm-メチラーゼのメチル化活性は

- 1) D-アーム構造を必要とする。
- 2) D-ループ中の共通配列G18G19を必要とする。
- 3) D-ループ中の共通配列A14,A21を必要としない。
- 4) ポジション17がピリミジンであったほうがよい。
- 5) ポジション15の塩基に多少、影響を受ける。
- 6) D-ステム構造を必要とする。
- 7) D-ステムの塩基配列によって多少変動するものの、絶対に必要とする配列はない。
- 8) ポジション8は共通配列Uのままであったほうがよい。
- 9) ポジション26はプリンのほうがよい。
- 10) 共通配列G45,G46の置換によって低下する。
- 11) 共通配列U55,C56の置換によって大きく低下する。
- 12) 共通配列U54の置換によって少し低下する。
- 13) 共通配列C48,A58の置換に全く影響をうけない。

さらにD-アーム領域に形成される水素結合についてまとめると

もっとも重要なのはG18-U55, G19-C56であり、G10-C25-G45, C13-G22-G46は弱いながらも影響があるかもしれない。U8-A13, A9-U12-A23, G15-C48は影響を与えない。

Gm-メチラーゼが効率よく酵素活性をしめすためには上記条件がひとつでも多



くクリアされることが必要なだろう。

国名	人口(万人)	GDP(億ドル)
USA	270	5.2
USSR	240	4.8
FRG	61	2.4
UK	56	2.2
FR	54	1.8
BR	180	1.7
Italy	56	1.2
Japan	120	1.2
Canada	28	0.9
Spain	40	0.8
Sweden	8	0.7
Belgium	10	0.7
Austria	8	0.7
Denmark	5	0.7
Netherlands	15	0.7
Portugal	10	0.6
Greece	11	0.6
Finland	4	0.6
Switzerland	3	0.6
South Korea	35	0.5
China	11	0.5
India	8	0.5
South Africa	3	0.5
Israel	0.5	0.5
Others	10	0.5

## 塩基置換の影響

transcript	$K_m$ (nM)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
unmodified	80	5.8
U8A	240	5.0
U8G	170	4.6
U8C	280	5.4
A9U	80	6.0
A14C	110	4.6
G15U	90	2.3
U16C	80	5.6
U17A	60	0.2
U17G	60	0.1
G18A	-	-
G18C	-	-
G19A	-	-
G20A	100	3.9
A21C	90	4.7
G26A	70	5.5
G26U	130	3.3
G45C	210	4.8
G46C	520	4.4
C48A	110	5.1
U54A	160	5.7
U55A	440	5.3
C56G	840	4.6
A58G	110	6.3

### 3.3 D-ループ鎖長改変体のメチル化

#### (目的)

3.1章と3.2章でG m-メチラーゼはループ内におけるG 18 G 19配列の位置をかなり厳密に認識していることが示された。この点について最適配列P y G Gを含む様々な鎖長改変体をもちいて検証する。

#### (方法)

3.1章、3.2章に従う。鎖長改変体はループ部分の長さが4から12までの5通り(Fig.3.3)を用意し、これとループ部分の長さが8のunmodifiedを比較した。

#### (結果)

得られた初速はTable3.3にまとめた。

#### (考察)

非常に驚いたことに、すべての改変体はメチル化された。これは、G m-メチラーゼはある程度のフレキシビリティをもってループ中のG G配列を認識しうること示している。実験を試みた改変体はすべて基本的にはG G配列の5'側に欠失もしくは挿入を導入したが、G m-メチラーゼはD-ループの3'側から認識することが示唆される。また、unmodifiedよりループ部分の長さを短くした変異体はいずれも十分な酵素活性を示したが、3.2.2章で示したようにG m-メチラーゼのD-ループ内の認識部位は最大でもG 15-G 19の5塩基であり、おそらくわずか4塩基からなるL4FAでもループ部分の認識部位としては十分機能するのであろう。



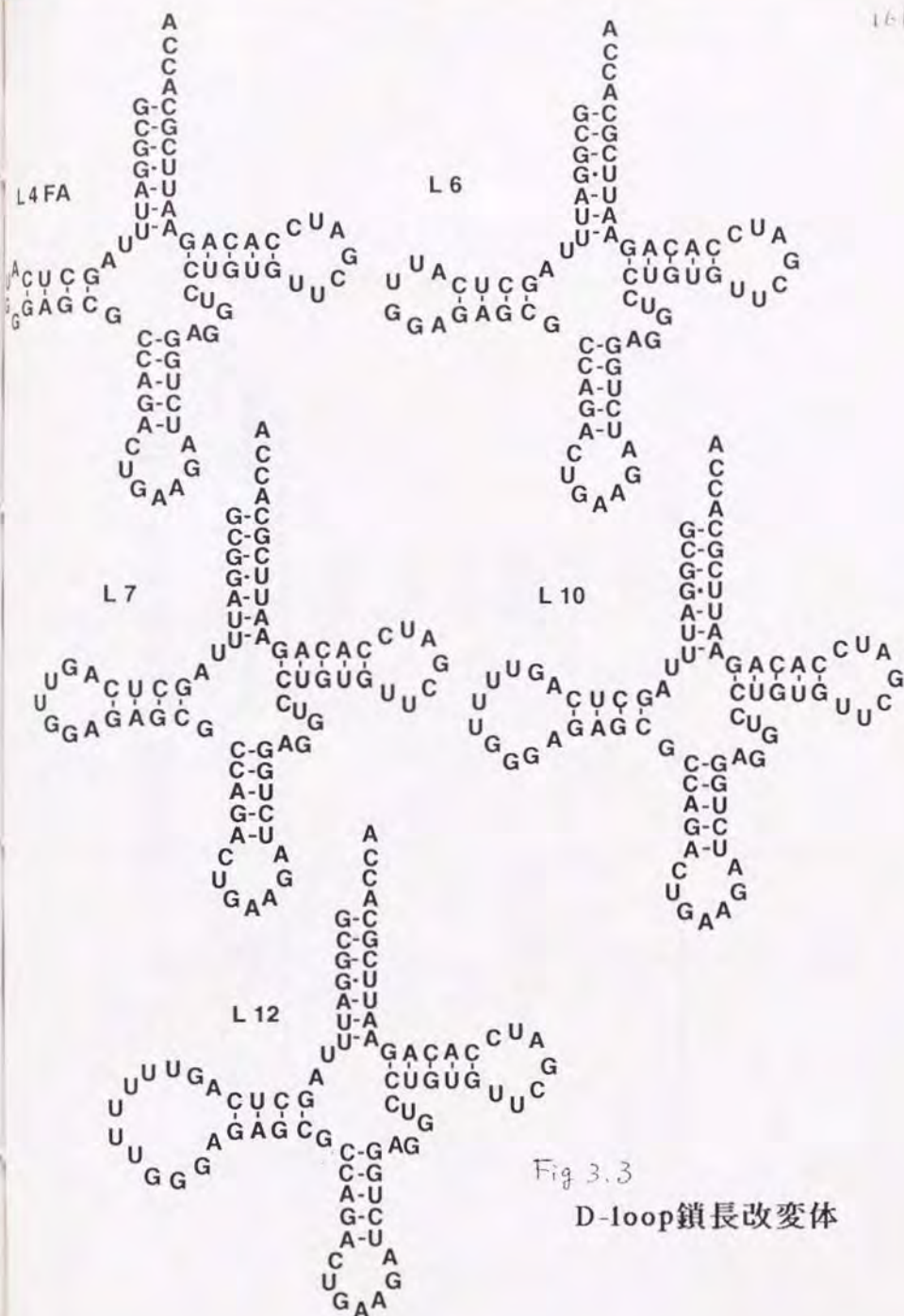


Fig 3.3

D-loop鎖長改变体

Table 3, 3

## D-ループ鎖長変体のメチル化

名前	メチル基のとりこみ(cpm)
L4FA	2699
L6	3109
L7	3414
unmodified	3507
L10	747
L12	333

### 3.4 非メチル化型転写産物による活性阻害

#### (目的)

非メチル化型転写産物であるG18C、G18A、G19A、LRV、 $\Delta$ D-armについて酵素に対する親和性をunmodifiedに対する阻害効果で検討する。

#### (方法)

G18C、G18A、G19A、LRV、 $\Delta$ D-armをunmodifiedに対してモル比で1:1もしくは1:2で共存させ、初速を測定する。

#### (結果と考察)

結果はTable3.4にまとめた。G18C、G18A、G19Aの阻害は予想通りで、これら転写産物は*K<sub>cat</sub>*が減少することによってメチル化されなくなっていることが示された。しかしながら、LRV、 $\Delta$ D-armによる阻害は意外であった。特にG m-メチラーゼの基質認識部位のほとんどすべてを欠く $\Delta$ D-armにより、ある程度の阻害がかかる事実は、G m-メチラーゼの初期会合における親和性は、メチル基転移のために必要な認識部位に対する親和性ではなく、もっと漠然としたtRNA様構造であることを示している。また、この事実はG m-メチラーゼの基質認識が多段階から成立していることを示している。この件に関しては、あらためて論文の総まとめの章で考察することにする。



Table 3.4 D-ループ改変体の活性阻害

基質	メチル基の取り込み (cpm)
unmodified	3507
unmodified + G18C (1:1)	2101
unmodified + G18C (1:2)	1459
unmodified + G18A (1:1)	2309
unmodified + G18A (1:2)	1607
unmodified + G19A (1:1)	2410
unmodified + G19A (1:2)	1780
unmodified + LRV (1:2)	1610
unmodified + $\Delta$ D-arm (1:1)	3018
unmodified + $\Delta$ D-arm (1:2)	2585

## 論文の総まとめ

本論文では高度好熱菌の G m-メチラーゼの基質認識について、精製した酵素といろいろな tRNA アナログを用いて *in vitro* での研究を行なった。

私が研究を開始した当初、本酵素の基質認識に関しては次のことが明かであった。

- 1) 未修飾の保存配列 G 18 G 19 を持つ tRNA であれば、原核、真核のいずれの生物由来であるかを問わず、すべての tRNA が修飾可能であること。
- 2) tRNA を半分子化した RNA 分子も基質となりうること。
- 3) 酵素活性と tRNA の融点の間には相関関係があり、tRNA の L 字型構造が崩壊しはじめるとともに、酵素活性が低下すること。また、tRNA の構造を安定化させるポリアミンやマグネシウムイオンの存在によって酵素活性が増強されること。

実験を開始するにあたって、これらの知見のうち、1) に関しては割合、素直に解釈することができた。すなわち、G m-メチラーゼの認識する構造は、すべての tRNA に共通な構造である。G m 18 の修飾が、好熱菌の中ではほぼ普遍的におこっていることから、これは納得できる。

それでは、共通な構造とは何か？これが本論文の中心命題である。まず、第一に G m-メチラーゼは半分子 tRNA を修飾可能なのであるから、必須な構造はこの半分子 tRNA に含まれることになる。この必須な部分を抽出する作業がフットプリンティングであり、化学合成 RNA や T7 RNA ポリメラーゼによる鎖長改変体転写産物による実験である。これらを通して、G m-メチラーゼは 4-28 転写産物を最少とする、D-アームとそれに付随する数塩基の構造を本質的に必要とすることが、明かとなった。

それでは、このステム-ループ構造の塩基配列は、G m-メチラーゼの活性と関係があるものであろうか？この D-アームを含む領域には、U 8、A 14、G 18、G 19、A 21 といった保存配列が散在しており、これらの配列が G m-メチラーゼの認識部位となっているのではないだろうか？

それを分析したのが、T7 RNA ポリメラーゼ転写産物による D-ループと D-ステムの塩基置換の実験である。その結果、保存配列 G 18 G 19 が必須であること、また、17 番のポジションはピリミジンであるのが最適であること、D-ステム部分の塩基配列は認識してはいないが、ステムが形成されていることが必須であることなどが明かとなった。また、意外なことに D-ループ中の保



存配列A14、A21は他の塩基に置換しても酵素活性に全く影響を与えず、その酵素学的パラメーターも変化しないことから、G m-メチラーゼのループ中の認識部位は最大でもG15-G19のわずか5塩基であることが判明した。その一方で、U8は化学修飾や分子内架橋、あるいは塩基置換のいずれでも酵素活性を低減させること、G26はピリミジンに変換した場合、酵素学的パラメーターの変動を伴うことなどから、最小基質が4-28フラグメントであることとあわせて、塩基配列を直接認識してはいないが、ステム構造とその付け根の部分の構造もG m-メチラーゼは認識していることも明かとなった。

ここまでは、G m-メチラーゼが本質的に活性に必要としている認識部位の同定であったが、その一方で、半分子tRNAをはじめとする短鎖の基質に対する活性がtRNA全体分子に比べて、何故、著しく低いのかという問題も浮上してきた。

この点を究明することは、私の前任者である松本隆博士の残した知見2)と3)をも統一して理解する作業でもある。

半分子でもメチル化できる。本質的に必要な構造は、その中に含まれるG18G19をもつD-アーム構造である。ここまではよい。

それでは、何が足りないから半分子に対する活性が低いのか？あるいは酵素活性がtRNAの熱融解に依存して低下する根源的理由は何か？さらに言えば、我々はtRNAのL字型構造の存在が効率よいメチル化に必要と漠然と主張してきたが、事実上は、どの塩基配列、あるいは水素結合の存在が酵素活性に影響を与えるのか？

この点を明かにしたのが、T7RNAポリメラーゼによる共通配列改変体の実験である。

その結果、本酵素にとって最大の影響を与えるのは、T-ループ部分とD-ループ部分の会合を断つ改変であることがわかった。また、D-アームとエクストラループとの間に形成される水素結合も、T-ループ-D-ループ間の水素結合ほどではないが、影響力をもつことも示唆された。

そしてさらに、メチル化活性を示さない改変体を用いて、unmodified (wild type) に対する酵素活性の阻害を調べた。保存配列G18、G19の改変体は予想通り、強力な活性阻害を示したが、それ以上に驚いたことはループ部分のG m-メチラーゼの認識配列をすっかり置換したLRVやD-アームさ

え、取り払ってしまった $\Delta D$ -アームですら、ある程度の阻害をみせるという現象である。これは本酵素が最終的にメチル基を転移しないまでもtRNA様のRNAにはある程度以上の親和性で結合してしまうことを示している。

これらを総合して、判断されるG m-メチラーゼの基質認識機構とはいったい、いかなるものなのであろうか？

私は、この酵素の基質認識が多段階から構成されてると考えると、これらの現象を統一して理解できるのではないかと考える。

まず、最初の会合は酵素学の基礎概念に基づいて、単純衝突によるとしよう。この衝突が生じた時、相手がtRNA様の構造を保持していれば、G m-メチラーゼはある程度の親和性でトラップする。この時点での親和性がどういったものかはわからない。また、tRNA様の構造のどこを見ているかも不明である。ただ単にリン酸骨格をもったある一定以上の大きさを持った分子とといったようなレベルなのかも知れない。

そこで最初の関門はL字型構造が保持されているかどうかである。ここで、T-ループとD-ループの会合を欠いているような分子種は、親和性が弱く、次の段階には進みにくい。しかしながら、*in vitro*で他に競合するような基質がなく、しかもKmをクリアするに足る十分な濃度があれば、半分子のような基質でも酵素反応は検出可能なレベルで進行する。すなわち、この第一関門は絶対ではない。

次の関門はD-ステムとその付け根の数塩基が存在するかどうかである。このD-ステムに関する判定を第2関門とするのは、D-ループ部分の変異はいずれもKm値を変動させないが、D-ステムやその近傍の改変はKm値を変化させ、酵素が最終的にメチル基転移を行なう、最適誘導に至る前段階で活性に影響を与えていると考えられるからである。この関門は、最小基質に対する酵素の挙動からみて絶対であり、この条件を満たさない限り酵素反応は進行しない。D-ステムとその付け根の数塩基は次の段階でG 18のリボース環の2'-OHを空間的に認識するための基準となっていることも大いに考えられる。

また、この第2関門を通過するまでの過程で、酵素は直接、D-ステムやその近傍の配列と会合するので主としてエクストラループとの間に存在していた水素結合は切断されるであろうし、T-ループとD-ループの会合も切断され、tRNA分子内部にたたまれていた標的部位のG 18のリボース環の2'-OH



基が酵素の活性中心に接近するような構造変換も進行する可能性が高い。

そして次の段階は、ループ中のG18、G19配列を認識してのメチル基転移反応で、この段階ではG18、G19およびG18のリボース環の2'-OHが必要である。

さらに酵素反応を最終段階まで考慮すれば、メチル基を転移された基質はすみやかに親和性を失い、複合体は解離するはずであるが、この過程がいかなるメカニズムによるのかは我々は何も手がかりをもっていない。

このようにGm-メチラーゼの酵素反応をいくつかの段階に分けて考えると、これまでに得られた知見のすべてを矛盾なく解釈することができる。

しかしながら、未だに疑問点も残る。そのなかでも比較のおおきな問題は、もうひとつの基質であるS-アデノシル-L-メチオニンに関する問題である。私の行なった一連の実験は、あくまでtRNAのアナログを利用して酵素のtRNA認識を調べること为目标としていたが、S-アデノシル-L-メチオニンがいつ、どこで、どのように関与するかを明確にせねば、トータルの酵素反応機構は完成しない。

もっとも簡単に短期間で可能な解析は、古典的な酵素反応機構の解析である。つまり、ランダム-Bi-Bi機構なのか、それともピンポン機構によるのかの解析である。転移酵素の場合、いままでに報告された酵素はこのいずれかの反応機構をもっているのだが、どちらであるかによってS-アデノシル-L-メチオニンの存在下と非存在下でのtRNAの認識機構が異なる可能性がある。

もし、Gm-メチラーゼの反応機構がピンポン機構であるならば、S-アデノシル-L-メチオニンは酵素上でtRNAと共存せず、その存否は考慮しなくてもよいが、逆にランダム-Bi-Bi機構であった場合はtRNAの構造変化を伴うどこかの段階で酵素-tRNA複合体は停止し、S-アデノシル-L-メチオニンの結合を待つ状態になる。これは我々がフットプリンテイングの解析を行なった複合体の状態であるが、もし万一、S-アデノシル-L-メチオニンの結合によって構造変化がさらに進むとなると、フットプリンテイングから得られた情報は必ずしも酵素がメチル基転移を行なう直前の最適誘導された複合体の情報ではないことになる。もちろん、酵素活性の測定をおこなった系はすべてS-アデノシル-L-メチオニン存在下での基質認識を調べたことになるので、その点における結果の再考は必要ないが、もうひとつの基質であるS-アデノ



シル-L-メチオニンの存在を最後まで軽視していたのはうかつであった。

今後もし、G m-メチラーゼの酵素反応機構の解析を行なうことがあれば、まず最初にこのどちらのメカニズムであるかを明らかにする必要があるだろう。この点を明確にしておかないと、X線結晶構造解析やNMRによって酵素-基質複合体の解析を行なっても、その情報を解釈する上で重大な足かせとなってしまうだろう。また、G m-メチラーゼはその反応途上で酵素も基質も構造変化するであろうから、動的構造解析の格好の素材といえるが、それらを行なう上でも基礎情報として古典的酵素反応機構は解析しておく必要がある。

## 謝辞

この研究を行なうにあたり、指導教官として最後までみはなさずに御尽力くださった渡辺公綱東京大学教授に感謝いたします。

熊谷泉東京大学助教授には、酵素の精製からSDS電気泳動の方法にいたるまで細かな指導をいただき、酵素の認識機構に関してはもっとも頼りになる議論の相手となっていました。

西川一八東京工業大学助教授にはRNAを取り扱う実技の面で御指導いただきました。半分子フラグメントの作成やRNAの塩基配列決定は先生の御指導なしではとてもできない技術でした。

上田卓也東京大学助手にはT7RNAポリメラーゼ転写系に関して御指導いただいたのみでなく、実験機材の準備などでつねに御配慮いただきました。

河合剛太東京大学助手には高分子の構造解析に必要な着想を伝授していただきました。先生の鋭い議論は私には思い付かないものが多く、大変参考になりました。

平尾一郎東京薬科大学助教授には、DNA合成の実際を手ほどきいただいた上、D-arm RNAを合成していただきました。

姫野依太弘前大学助教授には、T7RNAポリメラーゼ転写系のトラブルシューティングなど実験上のことばかりでなく、公私ともによき相談相手になっていただきました。また、大腸菌tRNA<sup>Ser3</sup>の転写系をいただきました。

松本隆博士にはGm-メチラーゼの取り扱いについての基礎を教えてくださいました。先生の博士論文なしには、この研究はありえませんでした。

実吉峯郎教授にはこころよくs4U化学修飾試薬をゆずっていただきました。どうもありがとうございます。

内田庸子先生には大変な御迷惑をおかけしたにもかかわらず、随分と暖かいいはげましをいただきました。研究者としてなんとかやっていこうという心境によりやく立ち至りましたのも先生のおかげです。

佐藤尚武三菱化成生命研部長にはGm-メチラーゼのアミノ酸分析をおこなっていただきました。また、研究所在職中は随分と御迷惑をおかけしました。

川畑聖子さん、ほか三菱化成生命研のみなさまには菌体の培養などで御迷惑をおかけしました。また、在職中はたんぱく質研究室のみなさまに御心配をおかけしました。

大島泰郎東京工業大学教授には好熱菌培養で御迷惑をおかけした他、ポリアミン分析の方法を教えてくださいました。

川崎博史都立臨床研研究員にはGm-メチラーゼのアミノ酸配列の分析を手伝っていただきました。Gm-メチラーゼのクローニングをいまだ果たせず、心残りに思っております。

個々の御名前をあげませんが、三浦研、渡辺研をとおしましてともに遊び、ともに研究したすべての方々に感謝いたします。

また、無職の私を拾い上げてくださった上、この論文をまとめる時間的余裕まであたえてくださいました岡崎太郎日本医大教授と西野武士日本医大教授ほか第一生化学教室のみなさまに感謝いたします。

最後に東京大学工学系研究科への進学を許可していただき、ずばらな私を研究室においてくださった三浦謹一郎学習院大学教授に感謝いたします。



## 参考文献

- (1) Kumagai, I., Watanabe, K., Oshima, T. 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1922-26
- (2) Izzo, P., Gantt, R., 1977 *Biochemistry* 16:3576-3581
- (3) Kumagai, I., Watanabe, K., Oshima, T. 1982 *J. Biol. Chem.* 257: 7388
- (4) 堀弘幸 東京大学農学系修士論文 1985
- (5) Oshima, T., Imahori, K. 1971 *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17: 513
- (6) Oshima, T., Imahori, K. 1974 *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 102
- (7) 大島泰郎、川畑聖子 *personal communication*
- (8) 大島泰郎 1978 好熱性細菌 東京大学出版会
- (9) H. Hori, T. Matsumoto, K. Watanabe, K. Miura 1985 *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 16: 225-228
- (10) 松本隆 東京大学農学系博士論文 1985
- (11) Gambaryan, A.S., Venkstern, T.V., Bayev, A.A. 1976 *Nucleic Acids Res.* 3:2079-2086
- (12) Kuchino, Y., Seno, T., Nishimura, S. 1971 *Biochem. Biophys. Res. Com.* 43:476-483
- (13) Gu, X., Santi, D. A. 1991 *Biochemistry* 30:2999-3002
- (14) Yamazaki, N., Hori, H., Ozawa, K., Nakanishi, S., Ueda, T., Kumagai, I., Watanabe, K., Nishikawa, K. 1992 *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 27:141-142
- (15) Yamazaki, N., Hori, H., Ozawa, K., Nakanishi, S., Ueda, T., Kumagai, I., Watanabe, K., Nishikawa, K. (submitted to *Biosci. Biotec. Biochem.*)
- (16) 山崎紀彦 東京工業大学総合理工博士論文 1993
- (17) T. Matsumoto, K. Nishikawa, H. Hori, T. Ohta, K. Miura, K. Watanabe 1990 *J. Biochem.* 107: 331-338
- (18) Morozov, I.A., Gambarian, A.S., Lvova, T.N., Nedospasov, A.A., Venkstern, T.V. 1982 *Eur. J. Biochem.* 129:429-436
- (19) Messing, J. 1983 *Methods Enzymol.* 101:20
- (20) Vieira, J., Messing, J. 1987 *Methods Enzymol.* 153:2
- (21) Kunkel, T. A. 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:488
- (22) Kunkel, T. A., Roberts, J. D., Zakour, R. A. 1987 *Methods Enzymol.* 154:367
- (23) Donis-Keller, H. 1980 *Nucleic Acids Res.* 8:3133-3142
- (24) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977 *Proc. Natl. Sci. USA* 74:5463-5467
- (25) Salas, C.E., Dirheimer, G. 1979 *Nucleic Acids Res.* 6:1123-1133
- (26) Dubois, E.G., Dirheimer, G., Weil, J.H. 1974 *Biochim. Biophys. Acta.* 374:332-341
- (27) Ginsberg, T., Rogg, H., Staehelin, M. 1971 *Eur. J. Biochem.* 21:249-257
- (28) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989 *Molecular Cloning 2nd edition* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- (29) Hutchison, C. A. III, Phillips, S. Edgell, M. H. Gillam, S. Jahnke, P.



- Smith, M. 1978 *J. Biol. Chem.* 253:6551
- (30) Razin, A., Hirose, T., Itakura, K., Riggs, A. D. 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4268
- (31) Zoller, M. J., Smith, M. 1982 *Nucleic Acids Res.* 10:6487
- (32) Norris, K., Norris, F., Christiansen, L., Fiil, N. 1983 *Nucleic Acids Res.* 11:5103
- (33) Smith, M. 1985 *Annu. Rev. Genet.* 19:423
- (34) Taylor, J. W., Ott, J., Eckstein, F. 1985 *Nucleic Acids Res.* 13:8764-8785
- (35) Lindahl, T. 1982 *Annu. Rev. Biochem.* 51:61
- (36) Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. 1972 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110
- (37) Zoller, M. J., Smith, M. 1987 *Methods Enzymol.* 154:329
- (38) Hanahan, D. 1983 *J. Mol. Biol.* 166:557
- (39) Edqvist, J., Straby, K. B., Grosjean, H., 1993 *Nucleic Acids Res.* 21:413-417
- (40) McPherson, M. J., Quirke, P., Taylor, G. R. 1991 *PCR* IRL Press
- (41) Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. 1990 *Methods Enzymol.* 185:60-89
- (42) Grodberg, J., Dunn, J. J. 1988 *J. Bacteriol* 170:1245-1253
- (43) Turnbough, C. L., Jr., Neill, R. J., Landsberg, R., Ames, B. N. 1979 *J. Biol. Chem.* 254:5111-5119
- (44) Keith, J., Winters, E. M., Moss, B. 1980 *J. Biol. Chem.* 255:4636-4644
- (45) Szweykowska-Kulinska, Z., Beier, H. 1993 *tRNA work shop* CAP' DAGDE France 講演
- (46) Robertus, J. D., Ladner, J. E., Finch, J. T., Rhodes, D., Brown, R. S., Clark, B. F. C., Klug, A. 1974 *Nature* 250:546-551
- (47) Kim, S. H., Sussman, J. L., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, A., Wang, A. H. J., Seeman, N. C., Rich, A. 1974 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4970-4974
- (48) Bjork, G. R., Ericson, J. U., Gustafsson, C. E. D., Hagervall, T. G., Jonsson, Y. H., Wikstrom, P. M. 1987 *Annu. Rev. Biochem.* 56:263-287
- (49) Tsang, T. H., Buck, M., Ames, B. C. 1983 *Biochim. Biophys. Acta* 741:180-196
- (50) Soll, D., Kline, L. K. 1982 *The Enzymes*, vol 15 Academic Press 557-566
- (51) Kline, L. K., Soll, D. 1982 *The Enzymes*, vol 15 Academic Press 567-582
- (52) Bjork, G. R. In Hatfield, D. L., Lee, B. J., Pirtle, R. M. (eds) 1992 *Transfer RNA in Protein Synthesis* CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.23-85
- (53) Edmonds, C. G., Crain, P. F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C. H., Kowalak, J. A., Pomerantz, S. C., Stetter, K. O., McCloskey, J. A. 1991 *J.*

*Bacteriol.* **173**:3138-3148

- (54) Grosjean, H., Cedergren, R.J., McKay, W. 1982 *Biochimie* **64**:387-397
- (55) Geftter, M.L. 1969 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**:435-441
- (56) 1992 *Nucleic Acids Res. Compiration*
- (57) Schulman, L.H., Abelson, J. 1988 *Science* **240**:1591-1592
- (58) Shimmel, P. 1989 *Biochemistry* **28**:2747-2759
- (59) Ortwerth, B.J., Lin, V.K., Lewis, J., Wang, R.J. *Nucleic Acids Res.* **12**:9009-9023
- (60) Himeno, H., Hasegawa, T., Asahara, H., Tamura, K., Simizu, M. 1991 *Nucleic Acids Res.* **23**:6379-6382
- (61) Matsumoto, T., Nishikawa, K., Hori, H., Ohta, T., Miura, K., Watanabe, K. 1990 *J. Biochem.* **107**:331-338
- (62) Szweykowska-Kulinska, Z., Beier, H. 1992 *EMBO J.* **11**:1907-1912
- (63) Holmes, W.M., Andraos-Selim, C., Roberts, I., Wahab, S.Z. 1992 *J. Biol. Chem.* **267**:13440-13445
- (64) Grosjean, H., Henau S. de, Doi, T., Yamane, A., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Beauchemin, N., Nicoghossian, K., Cedergren, R. 1987 *Eur. J. Biochem.* **166**:325-332
- (65) 西川一八 1986 統生化学実験講座 (日本生化学会編) 第一巻 遺伝子研究法 I. 3. 63-78
- (66) Sampson, J. R., Drenzo, A. B., Behlen, L. S., Uhlenbeck, O. C., *Biochemistry* **29**:2523-2532
- (67) Droogmans, L., Haumont, E., Henau S. de, Grosjean, H. 1986 *EMBO J.* **5**:1105-1109
- (68) Rould, M.A., Perona, J. J., Steitz, T.A. 1991 *Nature* **352**:213-218
- (69) Ruff, M., Krinshnaswamy, S., Boeglin, M., Potertszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J. C., Moras, D. 1991 *Science* **252**:1682-1689
- (70) Carbon, F., Haumont, E., Fournier, M., Henau S. de, Grosjean, H. 1983 *EMBO J.* **2**:1093-1097
- (71) Curnow et al. 1993 *Biochemistry* **32**:5239-5246
- (72) 中西ら 未発表
- (73) 清水幹夫、姫野俵太 1994 生化学 **66**:320-341

## tRNA修飾酵素研究の歴史的概観

論文本文中で引用した文献の背景についてある程度の説明が必要と考えられましたのでこの一文を付します。



tRNAの第一義的な機能はタンパク質合成の際、アミノ酸のキャリアーとして働くことにある。tRNAは通常、RNAを構成するA,U,G,C以外に様々な修飾塩基を含んでいる。(1,2,103,104) 修飾塩基は原核生物で約40種類、

真核生物で50種類以上、その存在が確認されている<sup>(1)</sup>が、当然その各々に対応する修飾酵素が少なくとも1つはあるはずと考えられる。これを遺伝子の上で助案すると莫大なスペースをtRNA修飾のためにさいていることになる。たとえば、大腸菌の場合、全ゲノムの1%がtRNA修飾酵素をコードするために使用されていると予想される<sup>(2)</sup>。しかしながら、その遺伝子が特定されたtRNA修飾酵素はごく一部にすぎない<sup>(3,4,5)</sup>。現在までに大腸菌の全ゲノムの60%は何をコードしているのか解明されたが、残りの40%中にはほとんどすべてのtRNA修飾酵素遺伝子がふくまれているはずである<sup>(2)</sup>。このようにtRNA修飾酵素の研究が他の分野に比べて遅れたのは、酵素の細胞内含有量が少ないとか、不安定で失活しやすいというタンパク質上の問題に加え、適当な基質がない、あるいは不明であるため酵素活性自身をとらえることができないという核酸、代謝経路上の問題も大きかった。

これらの問題点を克服するためにはらった先人の努力は膨大である。1962年にtRNAメチル化酵素の大部分はメチル基供与体としてS-アデノシル-L-メチオニンを使用することが判明し<sup>(7)</sup>、1960年代後半から、未修飾tRNAを他の生物種や大腸菌の変異株から供給することによって、数多くのtRNAメチル化酵素が研究された。

1970年、口野、西村は精製された大腸菌tRNAを駆使しラット肝から $m^2G(10)-$ 、 $m^2G(26)-$ 、 $m^2_2G(26)-$ 、 $m^1G$ (おそらく37)-メチラーゼ活性を検出し、これらのメチル化がtRNA分子種に応じて起こることを報告した<sup>(8)</sup>。一方、Baguleyらはラットひ臓より $m^1A(58)-$ メチラーゼ活性を見いだしたが、この酵素は酵母の細胞内にある酵母 $m^1A(58)-$ メチラーゼがメチル化できな

117

い酵母tRNA<sup>Ser</sup>のA(58)をメチル化でき、同じポジションの同じ修飾でも生物種によっては異なる分子認識機構が用いられていることを示した<sup>(9)</sup>。翌年の1971年には、口野らはラット肝にもm<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼ活性が存在することを見だし、さらにm<sup>2</sup>G(26)-とm<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼはtRNAの限定分解フラグメントをも基質とすることを示した<sup>(10)</sup>。また、Ginsbergらはラット肝tRNA<sup>Ser</sup>の構造を決定したが、その論文のなかで酵母tRNAとその修飾を比較し、ラット肝m<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼが基質とするtRNAには共通な構造があるだろうと予測した<sup>(11)</sup>。なお、Ginsbergらはこの論文でtRNA修飾酵素のみならず、セリルtRNA合成酵素の認識についても言及しており興味深い。

これら一連の報告は現在のtRNAメチル化酵素研究の基礎となるものであったが、実験に用いた酵素はいずれも部分精製された画分で、口野らはm<sup>2</sup>G(26)とm<sup>2</sup><sub>2</sub>G(26)が同一の酵素による修飾かどうかという点について断言を避けているし、Baguleyらのm<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼ画分は細胞粗抽出液なので複数の酵素<sup>(12,13,19)</sup>活性を同時に測定していた可能性もある。また、Ginsbergらの概念は画期的ではあるが、具体的にどの部分が酵素の認識に関与するかを示しておらず、Baguleyらの示した酵母とラット肝m<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼの基質認識の差異を説明できてはいない。これらの報告で実際に示されたデータから判断しても酵素活性はかなり微弱であり、当時それ以上の精製は困難であったと思われる。

口野らの報告を受けて立つ研究はKrausらによってなされた。かれらはポジション26のメチル化に焦点をあて、m<sup>2</sup>G(26)-メチラーゼを注意深く精製し、この酵素画分にはm<sup>2</sup><sub>2</sub>G(26)-メチラーゼ活性が検出されないことを示し、m<sup>2</sup>G(26)とm<sup>2</sup><sub>2</sub>G(26)の修飾は別々の酵素に由来することを証明した<sup>(14)</sup>。



しかしながら、かれらの用いた酵素画分は $m^2G(10)$ -と $m^2G(26)$ -メチラーゼの混合画分であり、これら二つの酵素活性の分離には成功していない。一方、酵母では欠損株を解析することによって $m^2G(26)$ と $m^2_2G(26)$ の修飾は別々の遺伝子に制御されていることが示唆されていた<sup>(15)</sup>が酵素自身をとらえる試みはなされていなかった。その後、 $m^2_2G(26)$ -メチラーゼは酵母欠損株を解析することによってクローニングされ遺伝子構造が明かとなった<sup>(5)</sup>が、ふたつのメチル基を同時に転移するという複雑な酵素反応は未だに手付かずの問題として残っている。 $m^2G(26)$ -メチラーゼに関しては何故か1970年代半ば以降報告がなく、酵素学的研究はもちろん、遺伝学的な研究もなされていない。

一方、 $m^1A(58)$ -メチラーゼは口野らが酸性硫酸沈澱を併用する精製法を開発し、他のメチラーゼ活性をほとんど含まない標品を得ることに成功した<sup>(17)</sup>。また、同時期にAgrisらも厳密に硫酸沈澱を行なうことによって、他のメチラーゼ活性をほとんど含まない $m^1A(58)$ -メチラーゼ画分をHeLa細胞より調製することに成功し<sup>(96)</sup>、両者の精製した酵素によって、Baguley、Ginsbergらの示した概念がほぼ正しいことが証明された。

ラット肝の酵素はさらに後年、Glickらによって比活性8000倍にまで精製され<sup>(18)</sup>、均一な標品となった数少ないtRNAメチラーゼのひとつに数えられる。Glickらによると、この酵素は20-40mMという高濃度のブトレンで活性化され、マグネシウムイオンで不活性化されるという特異な性質をもつ。

また、口野らの示したtRNAメチラーゼが半分子RNAもメチル化可能であるとする説に対してはソ連のグループから対立する説が提唱された。

Gambaryanらは酵母tRNAを基質としてラット肝を検索し、新たに $m^5C(48)$ -メチラーゼ活性を見だし、 $m^2G(26)$ -、 $m^1A(58)$ -メチラーゼについても報告した<sup>(19)</sup>。かれらは構造の類似したtRNAを基質アナログとして阻害実験



を行ない、tRNAメチル化酵素はtRNAの全構造を必要とすると結論づけた。かれらが実験に用いた酵素は口野らと同じラット肝 $m^2G(26)$ -メチラーゼを含んでおり、両者の意見は全く対立する格好となった。そのため、tRNA修飾酵素を研究する上でその酵素がtRNAの全構造を必要とすかどうかは現在でも重要な争点となっている。この論文でも示したが、tRNA修飾酵素の短鎖RNAに対する活性は概して低く、「効率のよいtRNA修飾にはtRNAの全構造があったほうがよいが、本質的な酵素活性自身を示すにはtRNAの部分構造で十分」とする考え方が現在では一般的になっている。ともあれ、Gambaryanらの示した阻害実験の結果は従来の比較的単純な酵素反応論では追いつけない、複雑なtRNA修飾酵素反応の一端を示している。

$m^5C(48)$ -メチラーゼに関する報告例はほとんどないが、唯一、1980年にKeithらがHeLa細胞から部分精製した報告がある<sup>(105)</sup>。なおこの報告には、 $m^5C(48)$ -メチラーゼは大腸菌tRNAの他にpoly(A,C)、poly(A,C,G,U)、rRNAをメチル化するがtRNA半分子はメチル化できないという不可解な性質が記述されている。

1970年代半ばになると大腸菌の $met^-$ ,  $rel^-$ 変異株<sup>(20)</sup>から供給された部分修飾tRNAを基質としてメチル化酵素を精製する試みがなされた。Smolarらは酵母から $m^1G(9)$ -、 $m^1G(37)$ -メチラーゼ画分を各々部分精製し、両者が別々の酵素であることを証明した<sup>(21)</sup>。不思議なことに彼女らは $m^2G(10)$ -、 $m^2G(26)$ -、 $m^2_2G(26)$ -、 $m^1A(58)$ -メチラーゼといった他の研究者が報告したメチル化酵素活性は検出不可能であったと報告しているが、 $m^5U(54)$ -メチラーゼを同定しており、よい基質が手に入ればそれまで活性測定が困難だった酵素も十分、研究対象となりうることを示した。

大腸菌 $m^5U(54)$ -メチラーゼは小麦胚芽tRNA<sup>Gly</sup>を基質としてMarcuらによって均一標品に精製され<sup>(22)</sup>、さらにBjorkらによってクローニングされて<sup>(2)</sup>現在では最もよく研究されている酵素となっている<sup>(23,24,25)</sup>。

また後年、Delkらは*B. subtilis*と*S. faecalis*の $m^5U(54)$ -メチラーゼを均一標品に精製した<sup>(26,27)</sup>が、これらの酵素はFADを補酵素として $S_{10}$ -メチレンテトラヒドロ葉酸からメチル基転移をする特殊なtRNAメチル化酵素であり、彼らはこの特殊な酵素活性を精製に利用した<sup>(27)</sup>。枯草菌の他のtRNA-メチラーゼについては精製例がなく断言はできないが、Delkらの示した2次元薄層クロマトグラフィーの結果<sup>(26)</sup>から判断するとテトラヒドロ葉酸依存性は $m^5U(54)$ -メチラーゼ特異的で他のtRNA-メチラーゼにはあてはまらないようである。さらに、*M. lysodeikticus*の23S-rRNAの $m^5U$ はS-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体としているとの報告<sup>(28)</sup>もあり、グラム陽性菌の $m^5U$ 生合成系は複雑である。

大腸菌の*met<sup>-</sup>*、*rel<sup>-</sup>*変異株に話しをもどすと、この部分修飾tRNAを用いた典型的成功例は、田矢らの大腸菌 $mnm^5s^2U(34)$ -メチラーゼの精製<sup>(29)</sup>である。かれらは $mnm^5s^2U(34)$ -メチラーゼを均一なタンパク質に精製し、この複雑な修飾塩基が複数種類の酵素によって合成されることを酵素学的に明かとした。なお、 $mnm^5s^2U(34)$ が複数種類の酵素によって合成されることは大腸菌変異体の解析によりMarinus<sup>(30)</sup>、Bjork<sup>(31)</sup>らが推定していたが、実際に何種類の酵素が必要であるかは今なお確定していない。Hagervallらによって $mnm^5s^2U(34)$ -メチラーゼは $cmnm^5s^2U(34) \rightarrow nm^5s^2U(34)$ 活性をもあわせもつことが報告され、現在では4種類の酵素が最低必要と予想されている<sup>(32)</sup>。

1970年代の後半からはメチル化酵素の分布に臓器特異性や細胞内での局在性があるのではないかという方向の仕事もなされた。

Salasらはラット脳に $m^1A(14)$ -メチラーゼ活性を発見し、この酵素は $m^1A(58)$ -メチラーゼとは別のタンパク質であり、子供の時代にのみ発現し



ていることを明かにした<sup>(12)</sup>。一方、Duboisらは高等植物 (*Phaseolus vulgaris*) には最低3種類の $m^1A$ -メチラーゼが存在し、細胞質画分の酵素は $m^1A(58)$ -メチラーゼであるが、ミトコンドリア及び葉緑体から得た酵素画分には $m^1A(58)$ -メチラーゼ活性の他に $m^1A(7)$ -メチラーゼ活性が存在することを示した<sup>(13)</sup>。これらDirheimerのグループによってなされた仕事は、tRNA修飾酵素の発生、分化上での制御、細胞内局在性について言及しており先駆的である。

tRNA修飾酵素の発生、分化の分野での研究は一部のガン細胞についてはなされている<sup>(33)</sup>ものの、ほとんど手付かずのまま取り残されている。また、細胞内局在性についてはHopperらによって酵母の細胞質とミトコンドリア内の $m^2_2G(26)$ -,  $m^5U(54)$ -メチラーゼが各々同一遺伝子に由来することが遺伝学的に証明された<sup>(34)</sup>。さらにやはり酵母で $i^6A(37)$ の修飾も細胞質とミトコンドリアで同じ遺伝子産物に由来することが確認された<sup>(35)</sup>。これらは細胞質とミトコンドリアで同じ酵素が機能している数少ない例として知られているが、タンパク質自身の解析は行なわれておらず、唯一、 $m^2_2G(26)$ -メチラーゼに関して遺伝学的手法でシグナル配列について議論されている<sup>(5)</sup>ことを除けば、シグナル配列の除去や輸送機構、細胞質とミトコンドリアでの配分、タンパク質の修飾などについては未解明である。また、近年、植物ミトコンドリアでは細胞質から輸入された $tRNA^{Leu}$ のG18がGm18にメチル化されていることが報告され<sup>(36)</sup>、Gm(18)-メチラーゼがミトコンドリアで特異的に機能しているか、ミトコンドリアへの輸送に関与していると考えられている。

1970年代後半からは、酵素の精製が困難な哺乳類臓器からではなく、好熱菌や大腸菌、酵母などからより純度の高い酵素標品を得る試みがtRNA-メチラーゼ研究の主流となってきた。



IzzoらはS-アデノシル-L-メチオニン固定化アフィニティカラムを開発し、ニワトリのm<sup>2</sup>G(10)-メチラーゼの精製に使用した。かれらは比活性を6200倍に高めるという好成績を得たが、ついに単一標品とはできなかった<sup>(37)</sup>。

熊谷、渡辺らは、この論文でとりあげる高度好熱菌Gm(18)-メチラーゼの精製にこのアフィニティカラムを応用し、本酵素を均一なタンパク質として精製することに成功した<sup>(38)</sup>。この成功はすぐれたアフィニティカラムを使用した以外に、好熱菌タンパク質が安定で失活しにくいという素材上の長所にも起因している。

海外ではソ連のMorozovらがやはり、別種の高度好熱菌からtRNA固定化アフィニティカラム<sup>(39)</sup>を使用してm<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼを部分精製した<sup>(40)</sup>。なお、tRNA固定化アフィニティカラムは田矢らのmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U(34)-メチラーゼ<sup>(29)</sup>やGreenらのtRNA-プソイドウリジン合成酵素I(後述)<sup>(41)</sup>の精製でも使用されており、固定の方法も現在までに幾通りか開発されている<sup>(42,43)</sup>。また、Morozovらによるとm<sup>1</sup>A(58)-メチラーゼ以外にm<sup>7</sup>G(46)-メチラーゼも検出したことが報告されている<sup>(40)</sup>。かれらが基質として使用した大腸菌tRNA<sup>Glu</sup><sub>2</sub>によってm<sup>7</sup>G(46)-メチラーゼの酵素活性がどの程度検出可能か疑問も残るが、報告例の少ないm<sup>7</sup>G(46)-メチラーゼに関する記述は興味深い。m<sup>7</sup>G(46)-メチラーゼの活性を検出した例として、Aschhoff、Kerstenらが枯草菌tRNA<sup>Met</sup>を基質として大腸菌酵素を部分精製した報告がある<sup>(43)</sup>。大腸菌m<sup>7</sup>G(46)-メチラーゼ活性はゲルろかで分子量10万と30万の2つのピークに分離され、この酵素が他のタンパク質と巨大な複合体を形成しているらしいことが示されている。我々もまた、高度好熱菌m<sup>7</sup>G(46)-メチラーゼ活性をリボソームからのアンモニウム塩溶出画分に見いだしており、この酵素は生体内ではリボソームに結合しているのではないかと考えている<sup>(44)</sup>。

高度好熱菌の $m^1A(58)$ -メチラーゼはその後、山崎、渡辺らによりほぼ均一なタンパク質として精製され、この酵素もtRNAの部分構造をメチル化しうることが証明された<sup>(45,46,47)</sup>。

一方、大量培養が容易で遺伝学的にも解析の進んでいた大腸菌を初発材料としてtRNA修飾酵素をほぼ均一に精製した例として、 $mnm^5s^2U(34)$ -<sup>(29)</sup>、 $m^5U(54)$ -<sup>(22)</sup>、 $m^1G(37)$ -メチラーゼ<sup>(48)</sup>、tRNA-グアニンリボシルトランスフェラーゼ(tgt gene product:Q-enzymeと略称される)<sup>(49)</sup>、tRNA イソペンテニルピロリン酸トランスフェラーゼ<sup>(50)</sup>などがある。

$m^5U(54)$ -、 $m^1G(37)$ -メチラーゼはともにBjork、Bystromらのグループにより大腸菌の温度感受性変異株を相補する形でクローニングされ<sup>(3,4)</sup>、大量発現する形質転換株から精製された<sup>(23,48)</sup>。特に $m^1G(37)$ -メチラーゼは通常細胞あたりの分子数が数10個しかないと推定される極微量酵素であり、このような形質転換株がなければ、5段階にもおよぶカラムクロマトグラフィーで比活性を10000倍以上にもたかめる精製に耐えなかったであろう。

tRNA-グアニンリボシルトランスフェラーゼはこれらより数年早く、岡田、西村らによって精製され<sup>(49)</sup>、塩基自身を入れ換えるという特殊な酵素活性で注目された<sup>(50)</sup>。本酵素は後年、Kersternらのグループと渡辺らのグループで各々独立して大量発現系が確立され<sup>(51,52)</sup>、より精密な酵素解析が行なわれつつある。フリーのQ塩基は、粘菌で細胞分化に関与することが知られており<sup>(96)</sup>、tRNA-グアニンリボシルトランスフェラーゼはそのような生理活性物質の調節因子として機能する側面があるかも知れない。

同様に生理活性物質をtRNA修飾に用いている例として $i^6A$ 、 $ms^2i^6A$ （後述）などが知られているが、近年、酵母tRNA<sup>Met</sup><sub>initiator</sub>でA(64)がO-リン酸-リボシル化されて $2'-1''-\beta-(5''\text{-phosphoryl})\text{-riboseyl-A}$ となっている（何故か略号はないようである）ことが報告された（原報では5'末端側から正



確に塩基数を数えているためA(65)となっているが、ここでは一般的なポジション64を採用する。)<sup>(97)</sup>。タンパク質のリボシル化は通常、ADPを結合しており、解糖系の停止、ペプチド鎖伸長因子の修飾によるタンパク質合成の停止、アデニル酸サイクラーゼのGTP結合サブユニットの修飾によるプロテインキナーゼ-カスケードの停止、ras類縁タンパク質の修飾による転写調節系の阻害、RNAポリメラーゼの不活化によるRNA合成停止などを引き起こし、染色体のヒストンや非ヒストンタンパク質のポリADP-リボシル化のように機能未解明なものもある<sup>(98)</sup>。tRNAのこのリボシル化はADP部分を伴っておらず、全く異なった反応機構によると考えられ、初発物質がATPであるかどうか不明である。発見当初、このA(64)の修飾はタンパク質合成を停止させる機構のひとつではないかと考えられた<sup>(97)</sup>がアミノアシル化、タンパク質合成の開始には影響がなく<sup>(99)</sup>、T-ステムのこの領域はEF-Tuの結合部位であるので開始tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>と伸長tRNA<sup>Met</sup><sub>e</sub>のアイテンティティ決定部位ではないかと考えられている。Kiesewetterらにより、この修飾のないtRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>は読み枠途中のMetコドンでも使用され、EF-Tuとの親和性が増加することが示されたが<sup>(111)</sup>、この修飾は高等植物<sup>(111)</sup>と酵母でのみ発見されており、真核生物一般のtRNA<sup>Met</sup>の使い分けを説明するには至っていない。もちろん、修飾酵素は未知である。

哺乳類組織を初発材料とする精製の試みで、注目すべき成功例はGreenらによる牛胸腺からのtRNA-プソイドウリジン合成酵素I<sup>(41)</sup> ( $\Psi$ (38-40)-synthetase:anticodon  $\Psi$  synthetase: $\Psi$  synthetase I)とElliottらによる培養がん細胞からのtRNA-7-(3,4-trans-4,5-cis-dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deaza-guanine ribosyltransferase(I-enzymeと略称される)<sup>(53)</sup>の精製である。

Greenらはイオン交換やゲルろかなどの一般的なカラムを全く使用せず、アフィニティーカラムのみを3種類組み合わせて精製し、基質として *Salmonella typhimurium* の



*hisT*<sup>-</sup>変異株<sup>(54)</sup> (*hisT*はバクテリアのtRNA-プソイドウリジン合成酵素I遺伝子名)から得たtRNAを使用した。かれらの得た酵素の比活性はきわめて高く、哺乳類組織からの酵素精製ではこのような方法が最善かもしれない。一方、ElliottらのI-enzymeの精製はがん細胞のようなある程度均一で大量培養可能な系からの精製で、微量タンパク質の精製法として現在では一般的な系になりつつある。また、I-enzymeはQ-enzymeとならんで塩基自身を入れ換えるという特異な活性をもっていることが示された。

酵素の精製が困難であるため、分子生物学、細胞工学的手法を用い*in vivo*での修飾を追う手法も発展した。

Grosjeanのグループはアフリカツメガエルの卵に基質tRNAをマイクロインジェクションする手法を駆使し、数々の修飾塩基の生成を生体内で同時に追跡することに成功した<sup>(55,56,57,58)</sup>。かれらは修飾酵素やその関連代謝経路が未知のmanQ(34)、Gm(34)、 $t^6A$ (37)の他、 $m^2_2G$ (26)、Q(34)、I(34)、 $i^6A$ (37)、 $m^5C$ (48)、T(54)、 $\Psi$ (55)の塩基配列特異性や生成の経時変化を明かにし、Q(34)の修飾はスプライシングの後にのみ起こること、 $\Psi$ (55)の修飾はT(54)の修飾に先んずることなども報告した。かれらの研究によってtRNAの修飾にはある程度、順序があることもわかった。この手法では個々のメカニズムは明かにはならないという批判はあるものの、実際に生体内で起こっている現象をとらえていることはまちがいない。修飾酵素に関する数多くの情報をこれからも提供していくであろう。

また、基質tRNAをマイクロインジェクションする手法で注目すべき報告としてはMeltonらの酵母tRNA<sup>Tyr</sup>に関するものもある<sup>(59)</sup>。かれらはtRNAの修飾の順序とスプライシングの關係に着目し、ほとんどの修飾 ( $m^1A$ (58)、 $m^5C$ (48)、 $\Psi$ (55)、D(46)、D(16)) は5'-リーダー配列の除去とCCA末端の付加の前に行なわれること、 $\Psi$ (39)の修飾はスプライシングの途中で行なわれることを示した。後にJohnson, Abelsonはかれらが言及しなかった $\Psi$ (35)と $\Psi$ (39)の修飾はイントロンがないと正しい位置に入らないことを証明した

(60)

$\Psi(39)$ の修飾は大腸菌などでは *HisT* 遺伝子産物に由来する<sup>(54)</sup>ことが知られており、この酵素は修飾位置がポジション38、39、40と可変であろうと考えられている。酵母でのスプライシングとの関係といい、大腸菌での不思議な認識機構といい、アンチコドン $\Psi$ 合成酵素は未知の魅力にあふれている。 $\Psi$ は修飾ポジションの非常に多い塩基でもあり、生体内にいったい何種類の酵素があるのかという疑問もつきない。

なお、1988年には *Mattochia* らがマイクロインジェクションの手法を用いスプライシング酵素の認識機構を調べたが、U8、C56の配列が必須であることを報告している<sup>(61)</sup>。

*Emilsson*、*Kurland* らはアフィニティー電気泳動を開発し、大腸菌内での硫黄修飾塩基の生成を測定することに成功した<sup>(62)</sup>。硫黄修飾塩基はその硫黄供与体が完全には特定されておらず、修飾酵素についての解析がほとんどなされていない分野である。かれらは従来報告のあった  $S^4U(8)$  の生合成<sup>(63)</sup>の他に  $mnm^5s^2U(34)$  の生合成速度を測定しており、不明な点の多い硫黄修飾塩基の生合成経路の解明に可能性を示した。

なお、 $S^4U(8)$  は大腸菌のチアミン要求株で欠損することから、チアミン代謝系酵素群（これらも未知）のサブユニットのうち幾つか（Factor A と Factor C と仮称されている）が  $tRNA-S^4U(8)$  合成酵素のサブユニットもしくは補助因子ではないかと考えられている<sup>(64)</sup>。それ故、 $tRNA-S^4U(8)$  合成酵素遺伝子は *nuvA*、*nuvC* と命名されているが、この領域は複数の読み枠が錯綜しているためチアミン代謝系酵素遺伝子と  $tRNA-S^4U(8)$  合成酵素遺伝子がオーバーラップしている可能性も指摘されており<sup>(1,90)</sup>、事実上塩基配列は未知である。また、 $tRNA-S^4U(8)$  合成酵素活性はATP要求性でおそらく $\beta$ -メルカプトピルビン酸が真の硫黄供与体であると思われるが、Factor A と Factor C がどのように協調して働くのかわかっていない



(65)。

一方、 $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}(34)$ の硫黄転位に関する遺伝子としては $\text{asuE}$ がマップされている<sup>(66)</sup>が、こちらも酵素、遺伝子とも未解明である。

さらに哺乳類 $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ の分子種の変動は細胞の分裂周期を規定するという驚くべき現象が複数のグループで確認されている<sup>(100,101)</sup>が、この現象にはアンチコドン34の修飾 ( $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ 、 $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ の類縁体らしい) が関与すると考えられている<sup>(1,102)</sup>。細胞の分裂周期の制御が $\text{tRNA}$ の機能自体に由来するのか、周辺の代謝系を含んでの問題なのか不明であるが、G1期ブロックが起こるハムスターの温度感受性培養細胞(Ts-694株)は $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ 類縁体修飾酵素の突然変異株であるらしい<sup>(102)</sup>。代謝系が関与するならば、硫黄、シギミ酸、メチル基代謝以外にスレオニン代謝 ( $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}(37)$ ; ラット肝 $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ の修飾<sup>(102)</sup>)、セレン代謝 ( $\text{mnm}^5\text{Se}^2\text{U}(34)$ )<sup>(2)</sup>が関与する可能性もあるかもしれない。また、この実験系は温度感受性突然変異株を使用しているので熱ショックタンパク質との相関もあるかもしれない。さらに、酵母で細胞周期を制御する遺伝子のひとつとしてナンセンスサブプレッサー $\text{tRNA}$ 遺伝子( $\text{cdc25}$ )が知られており<sup>(103)</sup>、非常に特殊な $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ が機能している可能性もある。

精製された $\text{tRNA}$ 修飾酵素のなかにはその機能が周辺領域の代謝経路の調節を含むため、複雑すぎて十分解明されていない例もある。

$\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}(37)$ は複数の酵素によって合成されることが大腸菌変異株の解析によって明かとなっている。Bartzらは大腸菌から $\text{A}(37) \rightarrow \text{i}^6\text{A}(37)$ の変換を行なう $\text{tRNA}$  イソペンテニルピロリン酸トランスフェラーゼを精製し、イソペンテニル基がイソペンテニルピロリン酸の形でメバロン酸経路より供給されることを明かにした<sup>(67)</sup>。

Connolly, winklerはこの酵素遺伝子



*miaA*<sup>(68)</sup> (旧 *trpX*: イソペンテニル基の供給系の問題から古くはこの名称が使用された。Cailletらにより、*rpsL*との複合変異株がストレプトマイシン要求性を示すことを指標にクローニングされたが、コーディング枠未決定である。)を中心にトランスポソンを打ち込んだ変異体をシリーズで作成し、*miaA*が *mutL*-47Kpとオペロンを形成していることを明かとした<sup>(69)</sup>。

*miaA*の変異株は生育速度が低減するほか、翻訳時のエラーが少なくなる(つまり、修飾が存在したほうがエラーが多い)、アンチコドン-コドンの結合の安定性が低下する<sup>(70)</sup>といったtRNA修飾に直接起因すると思われる現象に加え、リボソーム上でのペプチドリリース速度が減少する<sup>(71)</sup>、ストレプトマイシン耐性を示す(正確には表現型  $S_m^P$  が  $S_m^d$  になる)<sup>(68,72)</sup>、*trp*、*phe* オペロンのアデニユエター活性低下<sup>(73)</sup>、芳香族アミノ酸の膜輸送の上昇<sup>(74)</sup>、*leu* オペロンの転写低下<sup>(75)</sup>と数多くの現象がおこることが報告されており、これはtRNA修飾酵素が複雑な生体内での調節の一環として機能しうることを示している。また、これらの現象は同時に転写される *mutL*-47Kpの機能が関与していないことも証明されている<sup>(69)</sup>。

$ms^2i^6A(37)$  は  $i^6A(37)$  からさらに複数の酵素によって生合成されると考えられている。Geftterによって、この経路では硫黄はシステイン類縁体からメチル基はS-アデノシル-L-メチオニンから由来することが報告されている<sup>(76)</sup>が、酵素と遺伝子は不明である。何ステップの反応かも不明で、どのステップに関与するかもわかっていないが、芳香族アミノ酸代謝欠損株の解析からコリスミン酸の代謝産物であるエンテロケリンを補助因子として必要とすることが示唆されている<sup>(77)</sup>。Buckらによるとこの過程では鉄イオンが必須であり鉄代謝系の制御を受ける<sup>(78)</sup>。鉄代謝系は好氣的、嫌氣的代謝条件下で切り替わるので必然的に酸素分圧による制御も受けることになる<sup>(78)</sup>。

なお、Geftterの論文ではメチル基飢餓状態の大腸菌CA274株を<sup>14</sup>C-メチオ

ニンを用いてブレ-ラベルし、tRNA<sup>Tyr</sup>を精製、分析してその修飾酵素活性を測定しているが、あらゆる論文のなかでおそらく唯一、大腸菌Gm(18)-メチラーゼの活性について言及している<sup>(76)</sup>。

枯草菌では、胞子形成時にはms<sup>2i6</sup>A(37)の修飾が行なわれなくなる<sup>(79)</sup>が、同様にms<sup>2t6</sup>A(37)の修飾も減少し、これら2つの塩基の修飾はバクテリアの生育フェイズにあわせて切り替えられることがわかっている<sup>(80)</sup>。しかしながら、同じ酵素に由来する修飾かどうかは確認されていないし、どのようなメカニズムで制御されているのかも不明である。

*S. typhimurium*ではms<sup>2i6</sup>A(37)はさらにms<sup>2io6</sup>A(37)へ変換されるが、この過程も酸素分圧による制御を受ける<sup>(81)</sup>。この酵素も全く未知である。

また、cmo<sup>5</sup>U(34)、mcmo<sup>5</sup>U(34)の修飾も同様に芳香族アミノ酸代謝の調節を受け<sup>(82)</sup>、cmo<sup>5</sup>U(34)→mcmo<sup>5</sup>U(34)の変換にはsupK遺伝子が関与する<sup>(83)</sup>が、酵素自身はとらえられていない。

tRNA修飾酵素の中には、その修飾が普遍的であったり注目されたりしているにも関わらず、ほとんど未解明なものも多い。

DはD-ループを中心にtRNAの随所に散見される普遍的修飾塩基である<sup>(1,2)</sup>が、酵素、遺伝子ともに未知である。Dの生合成はUが酸化されることによると思われるが、この酸素がO<sub>2</sub>に由来するのか、H<sub>2</sub>Oに由来するのかといった酸化酵素の基本事項についても明かではない。Dの修飾位置は複数あるが、生体内に何種類の酵素が存在しているかも類推の域をでない。

yW(37)とその誘導体は真核生物tRNA<sup>Phe</sup>などに普遍的にみられる<sup>(1,2,6)</sup>が、この修飾酵素も不明であり何ステップの反応で合成されるのかもわかっていない。このような大型の修飾は欠損株による中間代謝産物の同定によって反応経路が類推されることが多いが、yW(37)は真核生物特異的であるためほとんど解明されていない。放射性同位元素を用いたトレーサー実験によると、酵母ではメチオニンの炭素鎖が取り込まれ哺乳類ではリジンが取り込ま



れるので、この複雑な環構造は複数のアミノ酸を原料とするらしい<sup>(6)</sup>。また、yW(37)誘導体の生合成系についても不明である。

t<sup>6</sup>A(37)とその誘導体はあらゆる生物に普遍的であり<sup>(1,2,6)</sup>、スレオニン代謝経路から基質は供与される<sup>(84,85)</sup>。しかしながら、カルバモイル基がどこから供給されるか不明であり、複数の酵素活性がスレオニンからの修飾に必須の可能性もある<sup>(86)</sup>。

k<sup>2</sup>C(34)は大腸菌tRNA<sup>Ile</sup><sub>major</sub>に見られ<sup>(103)</sup>、アミノアシルtRNA合成酵素の基質認識に不可欠な修飾である<sup>(88)</sup>。修飾塩基の存在がアミノアシル化に重大な影響を与える例としては酵母tRNA<sup>Tyr</sup><sub>Ψ</sub>(35)が知られている<sup>(89)</sup>が、k<sup>2</sup>C(34)は認識するアミノアシルtRNA合成酵素が切り替わる点で特異的である。しかしながら、リジンが基質であることはわかっている<sup>(87)</sup>が、酵素については不明である。

渡辺らの発見したm<sup>5</sup>S<sup>2</sup>U(54)は、高度好熱菌に特有でtRNAの耐熱性を増強することが知られている<sup>(91)</sup>。しかしながら、生合成経路は不明である。低温培養下ではポジション54の修飾はm<sup>5</sup>Uとなる<sup>(91)</sup>ことから、U(54)→m<sup>5</sup>U(54)→m<sup>5</sup>S<sup>2</sup>U(54)と修飾が進むと考えられるが、我々はm<sup>5</sup>U(54)-メチラーゼ活性を検出していない。

また、硫黄部分はs<sup>4</sup>U(8)のようにシステインから直接供与する活性が測定できず、なんらかの補助因子（例えば、ATP、ポリアミン）が必要か、システイン類縁化合物（例えば、β-メルカプトビルビン酸）しか基質とならない可能性もある。s<sup>4</sup>U(8)、mnm<sup>5</sup>S<sup>2</sup>U(34)、ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A(37)、ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A(37)のように硫黄代謝は高次の調節を受けているのが普通であるので、ビタミンB群代謝、芳香族アミノ酸代謝、コリスミン酸、シキミ酸代謝、鉄代謝系などとの関連も調べるべきかも知れない。特にビタミンB群代謝との関連は硫黄転移のみならず、Ψ(38,39,40:hisT)がピリドキサルリン酸（ビタミンB6）生合



成系と同一オペロンに属し直接制御される<sup>(94)</sup>などtRNA修飾酵素には散見される傾向である。またさらに、アミノ酸代謝酵素はビタミンB群を補酵素とすることも多い。アミノ酸は単なる修飾供与体としてのみではなく、プリン環、ピリミジン環の原料でもあり、塩基を作ること自身が直接、アミノ酸代謝と関連があるのは言うまでもない。

この他にも原核生物で $acp^3U(20/47)$ 、 $s^2C(32)$ 、 $Cm(32)$ 、 $Um(32)$ 、 $m^2A(37)$ 、 $mn m^5Se^2U(34)$ 、真核生物で $ac^4C(12)$ 、 $m^1I(37)$ 、 $m^3C(32/47c)$ 、 $Cm(4/13/32/34)$ 、 $Um(4/32/44)$ 、 $m^5C(38/40/72)$ 、 $\Psi m(32/39)$ 、 $m^5Um(54)$ などの修飾酵素についてはほとんど報告がなく、 $m^1\Psi(54)$ 、 $m^2_2Gm(26)$ など特異な修飾が存在する古細菌群では全くわかっていない<sup>(1,2,6,106,109)</sup>。

近年、T7 RNAポリメラーゼによってRNAを転写する手法が開発された<sup>(92,107)</sup>が、この技術によって今まで得ることの出来なかった未修飾RNAを基質として供給することが可能となった。さらに遺伝子工学技術の進歩により、鋳型DNAを思い通りに改変する<sup>(108)</sup>こともあたりまえとなった。T7 RNAポリメラーゼ転写産物を酵素の分子認識解析に最初に応用したのはアミノアシルtRNA合成酵素の研究分野であった。修飾塩基のうちアミノアシルtRNA合成酵素の認識に必須なものは例外的にしかなく<sup>(2,88,89)</sup>、T7 RNAポリメラーゼを使用する方法はもっとも標準的な手法となった<sup>(100,101,110)</sup>。

当然、これら分子生物学的手法は、よい基質を得ることが困難で停滞していたtRNA修飾酵素の研究にも大きな影響を与えた。

1991年、Gu、SantiはT7 RNAポリメラーゼ転写によって大腸菌tRNA<sup>Val1</sup>のT-アーム領域を合成し、大腸菌 $m^5U(54)$ -メチラーゼの基質となることを証明した<sup>(23)</sup>。彼らのもちいたT-アーム領域RNAはわずか、17merであり、現在までに報告されたtRNA修飾酵素の基質としては最小である。また、そのメチル化活性はきわめて強く、天然のtRNAに比較してKm値

が5倍程度、大きいだけであった。マイクロインジェクションを用いた実験系では $m^5U(54)$ の修飾は $\Psi(55)$ の修飾の後に生じることから、 $m^5U(54)$ -メチラーゼの基質認識には $\Psi(55)$ が必要ではないかと考えられていたが、少なくとも大腸菌酵素にはあてはまらないようである。

1992年にはSzweykowska-Kulinska, Beierが高等植物*Arabidopsis*の $tRNA^{Tyr}$ 遺伝子を鋳型として様々な改変体を作成し、 $\Psi(35)$ -シンセターゼの活性を測定した<sup>(95)</sup>。 $\Psi(35)$ の修飾はすでに述べたようにイントロンがないと正しい位置に修飾が入らないことが酵母で報告されており<sup>(60)</sup>、その後、両棲類の卵細胞でもマイクロインジェクションの手法をもちいて同様の性質がきらかとなっていた<sup>(96)</sup>。彼女らの報告は $\Psi(35)$ の修飾とイントロンの関係が高等植物でも成立することのみならず、U33N34U35A36Pu37が $\Psi(35)$ -シンセターゼにとって絶対に必要な共通配列であることを証明した。

1992年にはまた、HolmesらがT7 RNAポリメラーゼ転写産物を基質として大腸菌 $m^1G(37)$ -メチラーゼの認識機構について報告した<sup>(93)</sup>が、結果はきわめて難解であり、G(37)が必要という以上のことは断言できない。彼らは実験にカラムをひとつしか通していない部分精製酵素をもちいているが、これが結果を複雑にしているのではなかろうか。彼らはこの酵素画分に他の $tRNA$ -メチル化酵素が混入していないことを確認してはいるものの、RNAと会合しうるタンパク質成分は必ずあるはずで、それらがどのような挙動を示すかは予想できない。

1993年には、EdqvistらがT7 RNAポリメラーゼ転写産物をマイクロインジェクションの系に使用し、 $tRNA^{Asp}$ の高次構造に関与する塩基の変異が修飾にどう影響するかを調べた<sup>(58)</sup>。これも結果はかなり複雑であるが、

$m^1G(37)$ 、Q(34)、 $manQ(34)$ の修飾はD-ステム領域の配列に影響されること、 $m^2G(26)$ 、 $m^2_2G(26)$ の修飾はボジション10の塩基配列によって切り替わること、 $m^2G(6)$ の修飾は少なくとも実験によって生じた構造の変化には



影響されないこと、 $m^5C(49)$ の修飾はD-ステム領域の配列およびエクストラループの長さに影響されないことなどが明かとなった。いずれも報告例のない新発見であるが、特にQ(34)の修飾は、我々は精製した酵素を用いた実験系で、本質的な酵素の基質認識にはD-ステム領域は必要ないという結論を得ており興味深い。生体内でQ-enzymeが基質tRNAと複合体を形成する時には何か基質認識を巧妙にする補因子が存在するのかも知れない。

といったようにT7 RNAポリメラーゼ転写産物を用いた実験系は、tRNA修飾酵素の未知の性質をときあかしつつあり、今後も基質認識を研究する上で、あるいはタンパク質とRNAの会合を調べる上で、貴重な武器として活躍するであろう。

tRNA修飾で不思議なことは、ある修飾が存在するとすれば必ず何らかのパターンが存在することである。修飾の役割が合理的に説明できるアンチコドンとその周辺を除外すると、それ以外の領域には修飾の必然性らしきものがない。 $m^7G$ があるとすれば必ずポジション46であるし、 $m^5C$ があるとすればポジション48か49でその他の部位は希であるが、何故、そこにその修飾が必要かとなると構造上の議論以上には踏み込めない。例えば、 $m^7G(46)$ と未修飾G(46)の場合を比較すると、tRNAのエクストラループとD-ステムの会合が微妙にずれるということはわかっているものの、研究された範囲内では何の生化学的機能差も見いだせないし $m^7G(46)$ が未修飾のままでも立派に大腸菌は生きて行ける。ただし、 $m^7G$ -メチラーゼの欠損株は野性型に比べると生育が遅いので微妙な構造の違いがtRNAの機能の何かに役だっているであろう。それでは何故、ポジション46の修飾は $m^7G$ なのか、そのほかの修飾ではいけないのかとなると誰も答えを出していない。 $m^7G(46)$ の修飾は生物の長い進化の歴史のなかで淘汰されずに残ってきた。なんらかの必然性があるにせよ、あつてしかるべきだろう。

似たような例に $m^1A(58)$ がある。58番のポジションの修飾は例外なく、存



在するとすれば $m^1A(58)$ である。この修飾は $m^7G(46)$ の修飾ほどは生物全体に普及してはいない。しかしながら、生物界全体にとびとびに現れる。ある種の真性細菌、酵母、線形動物、脊椎動物、植物、ミトコンドリア、クロロプラスト、古細菌。Bjorkはその総説のなかで $m^1A(58)$ -メチラーゼは共通の祖先から進化し部分的に淘汰され、離れ小島のようにあちこちに残ったのではないかと類推している。

はたしてそうであろうか？  $m^1A(58)$ -メチラーゼはtRNA修飾酵素のなかで、もっとも多様な生物材料から調べられてきた。そしてまた、解析された酵素の性質もまた、多様なものである。Baguleyらの酵母とラット肝の酵素が異なる認識機構をもっているという指摘しかり、Glickらの精製した酵素のポリアミン、カチオンに対する挙動しかり。これらがもともと、同じタンパク質に由来するのであるか？ 58番のポジションに $m^1A$ の修飾をいれるべく、全く異なるタンパク質が機能取れんした結果とは考えられないだろうか？

機能取れんという観点から言えば、 $m^5U(54)$ -メチラーゼはどうだろう。この酵素のメチル基供与体は少なくとも二とおりある。S-アデノシル-L-メチオニンと5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸である。これらふたつのタイプは明かに反応様式そのものが異なる。これも元々、別々のタンパク質であったものが、ポジション54に $m^5U$ をいれるべきなんらかの必然的要求のために機能取れんしたのではないだろうか？

修飾塩基がいったいなんのために存在するかは謎だらけである。この序論のなかでは、修飾塩基の存在意義として比較的よく議論されている、コドン-アンチコドンの対合、フレームシフトの頻度、翻訳速度とその正確さ、tRNAの構造の安定化、アミノアシル化等の問題についてはあえてほとんど触れなかった。しかしながら、上記メカニズムで説明できていない修飾塩基にもなんらかの役割があるのではないだろうか？ そうでなければ、生物全体を通して保存されている修飾パターンの説明がつかないのではなからうか？

かつては「メチル基は生体内の老廃物、あまったメチル基を核酸の修飾に捨てているのだらう。」などという議論さえあった。しかしながら、ジーン

インプリンティング、ドーセージコンペンセーションなどの現象がみつかるに及んで、いまやDNAのメチル化は発生、分化、細胞のがん化を制御する因子として脚光を浴びつつある。tRNAの修飾にも何か必然性があり、注目されるような日がいつかくるのではないだろうか。

## 序論の参考文献

- (1) Björk, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E.D., Hagervall, T.G., Jonsson, Y.H., Wikström, P.M. 1987 *Ann. Rev. Biochem.* **56**:263-87
- (2) Björk, G.R. In Hatfield, D.L., Lee, B.J., Pirtle, R.M. (eds) 1992 *Transfer RNA in Protein Synthesis* CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.23-85
- (3) Ny, T., Björk, G.R. 1980 *J. Bacteriol.* **142**:371-379
- (4) Bystrom, A.S., Hjalmarsson, K.J., Wikström, P.M., Bjork, G.R. 1983 *EMBO J.* **2**:899-905
- (5) Ellis, S.R., Hopper A.K., Martin, N.C. 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5172-5176
- (6) Kline, L., Söll, D. 1982 *The Enzymes* vol. XV pp567-582
- (7) Fleissner, E., Borek, E. 1962 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:1199-1203
- (8) Kuchino, Y., Nishimura, S. 1970 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**:306-312
- (9) Baguley, B.C., Wehrli, W., Staehelin, M. 1970 *Biochemistry* **9**:1645-1649
- (10) Kuchino, Y., Seno, T., Nishimura, S. 1971 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**:476-483
- (11) Ginsberg, T., Rogg, H., Staehelin, M. 1971 *Eur. J. Biochem.* **21**:249-257
- (12) Salas, C.E., Dirheimer, G. 1979 *Nucleic Acids Res.* **6**:1123-1133
- (13) Dubois, E.G., Dirheimer, G., Weil, J.H. 1974 *Biochim. Biophys. Acta.* **374**:332-341
- (14) Kraus, J., Staehelin, M. 1974 *Nucleic Acids Res.* **11**:1479-1496
- (15) Phillips, J.H., Kjellin-Sträby, K. 1967 *J. Mol. Biol.* **26**:509-518
- (16) Ellis, S.R., Hopper A.K., Martin, N.C. 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5172-5176



- (17) Kuchino, Y., Nishimura, S. 1974 *Biochemistry* **13**:3683-3688
- (18) Glick, J.M., Leboy, P.S. 1977 *J. Biol. Chem.* **252**:4790-4795
- (19) Gambaryan, A.S., Venkstern, T.V., Bayev, A.A. 1976 *Nucleic Acids Res.* **3**:2079-2087
- (20) Hurwitz, J., Gold, M., Anders, M. 1964 *J. Biol. Chem.* **239**:3462-3473
- (21) Smolar, N., Hellman, U., Svensson, I. 1975 *Nucleic Acids Res.* **2**:993-1004
- (22) Marcu, K.B., Dudock, B.S. 1976 *Nature* **261**:159-162
- (23) Gu, X., Santi, D.V. 1991 *Biochemistry* **30**:2999-3002
- (24) Gustafsson, C., Björk, G.R. 1993 *J. Biol. Chem.* **268**:1326-1331
- (25) Persson, B.C., Gustafsson, C., Berg, D.E., Björk, G.R. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3995-3998
- (26) Delk, A.S., Romeo, J.M., Nagle, D.P., Jr., Rabinowitz, J.C. 1976 *J. Biol. Chem.* **251**:7649-7656
- (27) Delk, A.S., Nagle, D.P., Jr., Rabinowitz, J.C., Straub, K.M. 1979 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**:244-251
- (28) Schmidt, W., Arnold, H.H., Kersten, H. 1977 *J. Bacteriol.* **129**:15-21
- (29) Taya, Y., Nishimura, S. 1973 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**:1062-1068
- (30) Marinus, M.G., Morris, N.R., Soll, D., Kwong, T.C. 1975 *J. Bacteriol.* **122**:257-265
- (31) Björk, G.R., Kjellin-Sträby, K. *J. Bacteriol.* **133**:508-517
- (32) Hargervall, T.G., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A., Björk, G.R. 1987 *J. Biol. Chem.* **262**:8488-8495
- (33) Dirheimer, G. 1983 *Recent Results Cancer Res.* **84**:15-46
- (34) Hopper, A.K., Furukawa, A.H., Pham, H.D., Martin, N.C. 1982 *Cell* **28**:543-550
- (35) Martin, N.C., Hopper, A.K. 1982 *J. Biol. Chem.* **257**:10562-

10565

- (36) Marechal-Drouard, L., Neuburger, M., Guillemaut, P., Douce, R., Weil, J.-H., Dietrich, A. 1990 *FEBS letters* **2**:170-172
- (37) Izzo, P., Gantt, R., 1977 *Biochemistry* **16**:3576-3581
- (38) Kumagai, I., Watanabe, K., Ohshima, T. 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1922-1926
- (39) Gambarian, A.S., Morozov, I.A., Venkstern, T.V., Bayev, A.A. 1979 *Nucleic Acids Res.* **6**:1001-1011
- (40) Morozov, I.A., Gambarian, A.S., Lvova, T.N., Nedospasov, A.A., Venkstern, T.V. 1982 *Eur. J. Biochem.* **129**:429-436
- (41) Green, C.J., Kammen, H.O., Penhoet, E.E. 1982 *J. Biol. Chem.* **257**:3045-3052
- (42) *Affinity Chromatography* IRL Press
- (43) Aschhoff, H.J., Elten, H., Aronold, H.H., Mahal, G., Kertsen, W., Kertsen, H. 1976 *Nucleic Acids Res.* **3**:3109-3122
- (44) Our Results:未発表
- (45) Yamazaki, N., Hori, H., Ozawa, K., Nakanishi, S., Ueda, T., Kumagai, I., Watanabe, K., Nishikawa, K. 1992 *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **27**:141-142
- (46) Yamazaki, N., Hori, H., Ozawa, K., Nakanishi, S., Ueda, T., Kumagai, I., Watanabe, K., Nishikawa, K. (submitted to *Biosci. Biotech. Biochem.*)
- (47) 山崎紀彦 東京工業大学総合理工博士論文 1993
- (48) Hjalmarsson, K.J., Byström, A.S., Björk, G.R. 1983 *J. Biol. Chem.* **258**:1343-1351
- (49) Okada, N., Nishimura, S. 1979 *J. Biol. Chem.* **254**:3061-3066
- (50) Okada, N., Noguchi, S., Kasai, H., Sindo-Okada, N., Ohgi, T., Goto, T., Nishimura, S. 1979 *J. Biol. Chem.* **254**:3067-3073
- (51) Kersten, H. personal commun.
- (52) Our results:未発表



- 199
- (53) Elliott, M.S., Trewyn, R.W. 1984 *J. Biol. Chem.* **259**:2407-2410
- (54) Turnbough, C.L., Jr., Neill, R.J., Landsberg, R., Ames, B.N. 1979 *J. Biol. Chem.* **254**:5111-5119
- (55) Carbon, F., Haumont, E., Fournier, M., Henau S. de, Grosjean, H. 1983 *EMBO J.* **2**:1093-1097
- (56) Droogmans, L., Haumont, E., Henau S. de, Grosjean, H. 1986 *EMBO J.* **5**:1105-1109
- (57) Grosjean, H., Henau S. de, Doi, T., Yamane, A., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Beauchemin, N., Nicoghosian, K., Cedergren, R. 1987 *Eur. J. Biochem.* **166**:325-332
- (58) Edqvist, J., Stråby, K.B., Grosjean, H., 1993 *Nucleic Acids Res.* **21**:413-417
- (59) Melton, D.A., Roberitis, E.M. de, Cortese, R. 1980 *Nature* **284**:143-148
- (60) Johnson, P.F., Abelson, J. 1983 *Nature* **302**:681-687
- (61) Mattoccia, E., Baldi, I.M., Gandini-Attardi, D., Ciafre, S., Tocchini-Valentini, G.P. 1988 *Cell* **55**:731-738
- (62) Emilsson, V., Naslund, A., Kurland, C.G. 1992 *Nucleic Acids Res* **20**:4499-4505
- (63) Kline L., Soll, D. 1982 *The Enzymes* vol. XV 567-582
- (64) Ryals, J., Hsu, R.-Y., Lipset, M.N., Bremer, H. 1982 *J. Bacteriol.* **151**:899-904
- (65) Lipset, M.N. 1978 *J. Bacteriol.* **135**:993-997
- (66) Elseviers, D., Petrullo, L.A., Gallagher, P.J. 1984 *Nucleic Acids Res* **12**:3521-3534
- (67) Bartz, J.K., Kline, L.K., Soll, D. 1970 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**:1481-1487
- (68) Caillet, J., Droogmans, L. 1988 *J. Bacteriol.* **170**:4147-4152
- (69) Connolly, D. Winkler, M.E. 1989 *J. Bacteriol.* **171**:3233-3246
- (70) Bouadloun, F., Srichaio, T., Isaksson, L.A., Bjork, G.R. 1986 *J.*



*Bacteriol.* **166**:1022-1027

- (71) Petrullo, L.A., Elseviers, D. 1986 *J. Bacteriol.* **165**:608-611
- (72) Diaz, I., Ehrenberg, M., Kurland, C.G. 1986 *Mol. Gen. Genet.* **202**:207-211
- (73) Yanofsky, C., Soll, L. 1977 *J. Mol. Biol.* **113**:663-677
- (74) Griffiths, E., Humphreys, J. 1978 *Eur. J. Biochem.* **82**:503-513
- (75) Blum, P.H. 1988 *J. Bacteriol.* **170**:5125-5133
- (76) Gefter, M.L. 1969 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**:435-441
- (77) Buck, M., Ames, B.N. 1984 *Cell* **36**:523-531
- (78) Buck, M., Griffiths, E. 1981 *Nucleic Acids Res.* **9**:401-414
- (79) Keith, G., Rogg, H., Dirheimer, G. 1976 *FEBS lett.* **73**:210-214
- (80) Buu, A., Menichi, B., Heyman, T. 1981 *J. Bacteriol.* **146**:819-822
- (81) Björk, G.R. 1980 *J. Mol. Biol.* **38**:25-34
- (82) Reeves, R.H., Roth, J.R. 1971 *J. Mol. Biol.* **56**:523-533
- (83) Colby, D.S., Schedl, P., Guthrie, C. 1976 *Cell* **9**:449-463
- (84) Powers, D.M., Peterkofsky, A. 1972 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**:831-838
- (85) Elkins, B.N., Keller, E.B. 1974 *Biochemistry* **13**:4622-4628
- (86) 小沢潔 1992 東京工業大学総理工修士論文
- (87) Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T., Yokoyama, S. 1988 *Nature* **336**:179-181
- (88) Muramatsu, T., Yokoyama, S., Horie, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T. 1988 *J. Biol. Chem.* **263**:9261-9267
- (89) Bare, L.A., Uhlenbeck, O.C. 1986 *Biochemistry* **25**:5825-5830
- (90) Belfort, M., Pedersen-Lane, J. 1984 *J. Bacteriol.* **157**:126-129
- (91) Watanabe, K., Shinma, M., Oshima, T., Nishimura, S. 1976 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**:1137-1144
- (92) Chu, W., Horowitz, J. 1989 *Nucleic Acids Res.* **17**:7241-7252
- (93) Holmes, W.M., Andraos-Selim, C., Roberts, I., Wahab, S.Z. 1992

*J. Biol. Chem.* **267**:13440-13445

(94) Winkler, M.E., Arps, P.J. 1986 *ASM Ann. Meet. Abstr. H53*, pp136

(95) Szweykowska-Kulinska, Z., Beier, H. 1992 *EMBO J.* **11**:1907-1912

(96) Choffat, Y., Suter, B., Behra, R., Kubli, E. 1988 *Mol. Cell. Biol.* **8**:3332-3337

(97) Desgres, J., Keith, G., Kuo, K., Gehrke, C.W. 1989 *Nucleic Acids Res.* **17**:865-882

(98) 生化学辞典 第2版 東京化学同人

(99) Kieseewetter, S. et al. 1993 *tRNA work shop CAPD'AGDE France* 講演

(100) Schulman, L.H., Abelson, J. 1988 *Science* **240**:1591-1592

(101) Shimmel, P. 1989 *Biochemistry* **28**:2747-2759

(102) Ortwerth, B.J., Lin, V.K., Lewis, J., Wang, R.J. *Nucleic Acids Res.* **12**:9009-9023

(103) Harada, F., Nishimura, S. 1974 *Biochemistry* **13**:300-307

(104) Pegg, A.E. 1974 *Biochem. J.* **137**:239-248

(105) Keith, J., Winters, E.M., Moss, B. 1980 *J. Biol. Chem.* **255**:4636-4644

(106) Edmonds, C.G., Crain, P.F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C.H., Kowalak, J.A., Pomerantz, S.C., Stetter, K.O., McCloskey, J.A. 1991 *J. Bacteriol.* **173**:3138-3148

(107) Milligan, J.F., Groebe, D.R., Wilherell, G.W., Uhlenbeck, O.C. 1987 *Nucleic Acids Res.* **15**:8783-8798

(108) この論文の本文第三部で引用した大半の論文が参考論文として該当します。個々の技術についてはなるべく、本文に記述しました。

(109) Grosjean, H., Cedergren, R.J., McKay, W. 1982 *Biochimie.* **64**:387-397

(110) Himeno, H., Hasegawa, T., Asahara, H., Tamura, K., Simizu,

M. 1991 *Nucleic Acids Res.* **23**:6379-6382

(111) Kieseewetter, S., Ott, G., Sprinzl, M. 1990 *Nucleic Acids Res.*

**18**:4677-4682





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

**KODAK Color Control Patches** © The Tiffen Company, 2000

**Kodak**  
LICENSED PRODUCT

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

**Kodak Gray Scale**

**C Y M**

© Kodak, 2007 TM Kodak

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

