

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：13701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22550148  
 研究課題名（和文） 酵母チロシン tRNA の立体構造および生理活性に及ぼす修飾塩基の影響  
 研究課題名（英文） Effect of modified bases on the three-dimensional structure and physiological activities of yeast tyrosine tRNA.  
 研究代表者  
 西川 一八 (NISHIKAWA KAZUYA)  
 岐阜大学・工学部・教授  
 研究者番号：60109262

研究成果の概要（和文）：当初は酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> と tRNA<sup>Tyr</sup> 転写物をそれぞれ限定分解して得た 5'-および 3'-半分子を交換再結合した 2 種のキメラ tRNA (T5N3, N5T3), および原材料の 2 種の tRNA<sup>Tyr</sup>, 計 4 種類の tRNA<sup>Tyr</sup> について T<sub>m</sub> 測定や酵素プローブ法を用いて立体構造の安定性と修飾塩基構成との相関について検討する予定であった。しかし、キメラ tRNA の合成収率が低下したため、測定に十分な tRNA 標品を確保することに困難が生じた。そこで、最近当研究室で開発されたアンチコドンヌクレアーゼ VapC を利用して tRNA を 5'-半分子と 3'-半分子に分割する方法で同様の実験を行った。そのため tRNA は大腸菌の tRNA<sup>Leu</sup> に変更した。調製した計 4 種類の tRNA の熱融解曲線を測定することで、tRNA<sup>Leu</sup> 転写物 < T5N3 < N5T3 < 天然型 tRNA<sup>Leu</sup> の順で安定性を増すこと、したがって修飾ヌクレオチド、特に 5'-半分子に含まれる修飾ヌクレオチドには tRNA の構造を安定化する効果があることが分かった。しかし、Mg<sup>2+</sup> 非存在下では天然型の方が転写物よりも構造が不安定になるという予想外の結果が得られた。修飾塩基はおそらく Mg<sup>2+</sup> との相互作用次第で tRNA の高次構造の安定化にも不安定化にも寄与するという点で興味深い。

研究成果の概要（英文）：Originally, it was planned that two types of chimeric tRNA (T5N3, N5T3) were synthesized by exchanged re-union of 5'-and 3'-half fragments obtained through limited digestion of yeast tRNA<sup>Tyr</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup> transcript and used for the analyses on the relationship between the modified base-content and the stability of three-dimensional structure of tRNA. However, it was turned out to be difficult by technical reasons. Therefore, similar experiments were performed by using the anticodon nuclease VapC which was recently developed in our laboratory and *E. coli* tRNA<sup>Leu</sup>. The result of T<sub>m</sub>-measurement showed that the heat-stability of tRNAs increased in the order of tRNA<sup>Leu</sup> transcript < T5N3 < N5T3 < native tRNA<sup>Leu</sup>, indicating that the modified bases, especially those contained in the 5'-half fragment (N5) have the effect of stabilizing three-dimensional structure of tRNA. However, unexpected result was also obtained that the native form of tRNA<sup>Leu</sup> is less stable than the transcript tRNA in the absence of Mg<sup>2+</sup>. It is interesting in a sense that the modified bases can contribute to both of the stability and instability of the higher-order structure of tRNA depending on the state of interaction with Mg<sup>2+</sup>.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体認識・機能化学，修飾塩基

## 1. 研究開始当初の背景

tRNA はタンパク質合成過程においてアミノ酸をリボソームの A-site にあるコドンに運ぶ役割を担っている。この RNA は鎖長 80 ヌクレオチド前後の低分子 RNA であるにもかかわらず、1 分子あたり平均 10~15 残基もの修飾塩基（通常の A,C,G,U がメチル化等の転写後修飾を受けたもの）を持つことが特徴である。この修飾塩基の生理的機能については、長年にわたる研究にもかかわらず、個別の機能が解明されたのはごく例外的である。一般にアンチコドン 1 文字目に修飾を受けると wobble 対合を制御することでコドン認識に関わるものが多い。tRNA 分子中には、 $m^1G$  や  $m^2G$  などのメチル化塩基が比較的多く含まれているが、これらの生理的機能については「全体として tRNA の立体構造の安定化に役立っている」という説から、「単なるメチル基の保管場所に過ぎない」という説まで両極端の説がある。

我々は長らく酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> のアミノ酸受容特異性 (tRNA identity) 決定の分子機構に関する研究を行ってきたが、その関連で酵母チロシル-tRNA 合成酵素のアミノ酸基質特異性の遺伝子工学的改変に成功し、さらに大腸菌のタンパク質合成関連の因子や酵素類を純化し、それらを再調合することで安定な生体外タンパク質合成系を構築することにも成功した。それらの利用により非天然アミノ酸であるチロシンアナログをタンパク質に組込むことが可能になってきたが、その際酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> 由来のアンバーサプレッサー tRNA 転写物を利用してきた。しかし、このような“修飾塩基を全く含まない tRNA 転写物”が天然の tRNA と同等の忠実度 (fidelity) や効率で遺伝情報の翻訳に機能しているのかについては常に疑念を持ってきた。

そこで、今回は酵母チロシン tRNA の修飾塩基の役割について検討することを計画した。特定の修飾塩基だけを持つ（あるいは持たない）tRNA を通常の転写法で作成することはできないが、我々が長年培ってきた RNA の分子整形技術を利用すればそれが可能になる。

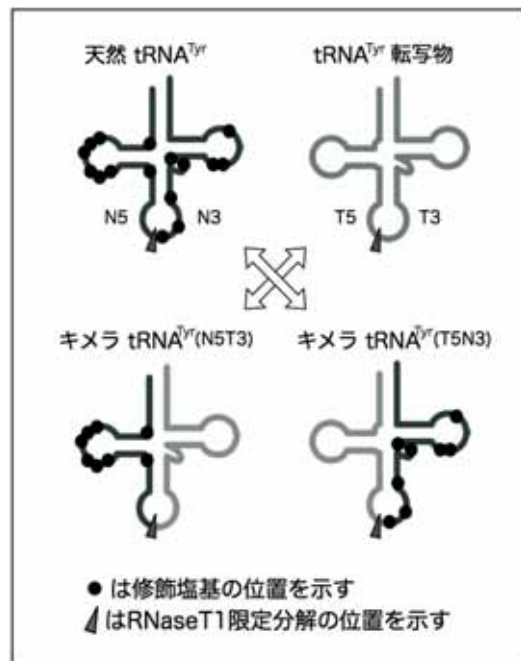
## 2. 研究の目的

平成 22-24 年度の 3 年間に以下のような目標を設定する。修飾塩基含量の異なるキメラ tRNA の作成：天然の酵母 tRNA<sup>Tyr</sup>（修飾塩基を分子内に 16 個持つ）と *in vitro* で作製した tRNA<sup>Tyr</sup> 転写物（修飾塩基を全く含まない）を出発原料とし、RNA の分子整形技術を

利用してキメラ分子を作製することで修飾塩基含量の異なる tRNA<sup>Tyr</sup> 分子を調製する。修飾塩基構成と立体構造の安定性との相関性の検討：得られた修飾塩基含量の異なる 4 種類の tRNA<sup>Tyr</sup> について種々のイオン環境・温度下に、 $T_m$  測定や酵素プローブ法による構造解析を行い、修飾塩基含量と tRNA 構造の安定性との相関性について検討する。tRNA<sup>Tyr</sup> のアンチコドン内に含まれる  $\Psi$  の意義の検討：分子整形技術を利用してアンチコドン一文字目の G を  $\Psi$  や U に、二文字目の  $\Psi$  を U に置換した tRNA<sup>Tyr</sup> 分子を作成し、そのコドン解読特性を天然型のアンチコドン配列を持つものと比較する。

## 3. 研究の方法

天然の酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> と RNA ポリメラーゼによる転写法で作成した tRNA<sup>Tyr</sup> 転写物を出発原料とし、それぞれのアンチコドン内で RNaseT1 により限定分解して作成した 5'-および 3'-半分子を交換再結合した 2 種のキメラ tRNA (N5T3, T5N3) を調製する (下図)。



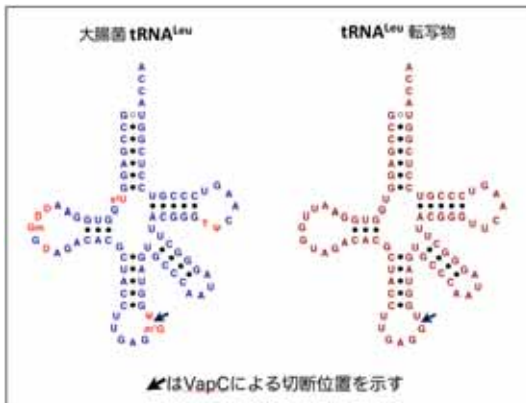
これらのキメラ tRNA はそれぞれの分子内の 5'-半分子に 8 個、あるいは 3'-半分子に 8 個の修飾塩基を含む。

種々のイオン環境下に  $T_m$  測定や酵素プローブ法による高次構造解析を行って立体構造の安定性と修飾塩基構成との相関について検討する。また、無細胞タンパク質合成系中でこれら修飾塩基含量の異なる tRNA<sup>Tyr</sup> 分子によるタンパク質合成を行い、生じたタン

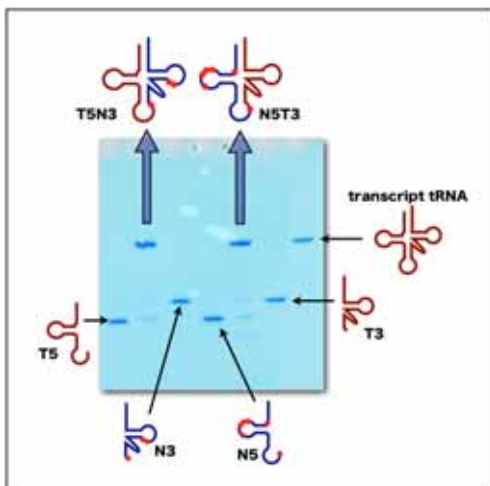
パク質/ポリペプチドのプロテアーゼ分解断片を質量分析することでコドン翻訳時のデコーディング忠実度を解析する。

#### 4. 研究成果

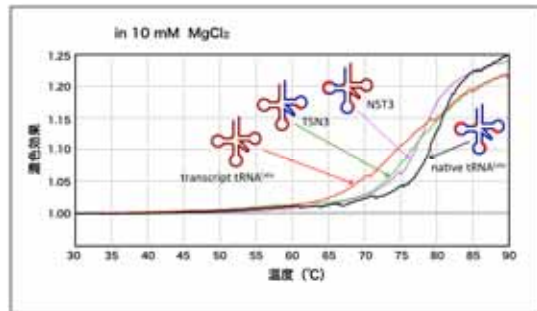
修飾塩基含量の異なるキメラ tRNA の作成：当初の予備実験では計画どおり酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> と tRNA<sup>Tyr</sup> 転写物をそれぞれ限定分解して得た 5'-および 3'-半分子を交換再結合して2種のキメラ tRNA (T5N3, N5T3) が作成できていた。ところが大量調製して熱融解曲線(Tm) 測定や酵素プローブ法による構造解析を実行する段階でキメラ tRNA の合成収率が低下し、測定に十分な tRNA 標品を確保することが困難になった。そこで、最近当研究室で開発された好酸好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来のアンチコドンヌクレアーゼ VapC を利用することで同様の実験を行うことにした。そのため tRNA は VapC の基質になり易い大腸菌 tRNA<sup>Leu</sup> に変更した(下図)。



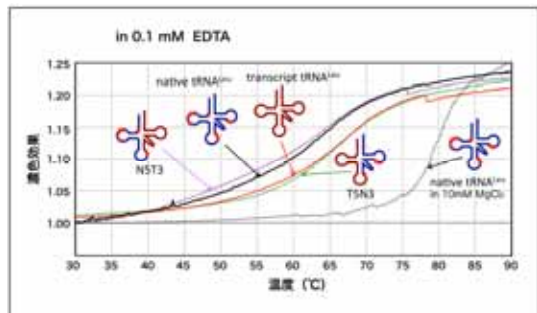
大腸菌 tRNA<sup>Leu</sup> と tRNA<sup>Leu</sup> 転写物をそれぞれ VapC で切断して得た 5'-および 3'-半分子を交換し RNA リガーゼで再結合して2種のキメラ tRNA<sup>Leu</sup> (N5T3, T5N3) を作成した結果を下図に示す。



修飾塩基構成と立体構造の安定性の相関性の検討：調製した計4種類の tRNA の熱融解曲線を 10mM MgCl<sub>2</sub> 中で測定することで、tRNA<sup>Leu</sup> 転写物 < T5N3 < N5T3 < 天然型 tRNA<sup>Leu</sup> の順で安定性が増すこと、したがって修飾ヌクレオチド、特に 5'-半分子に含まれる修飾ヌクレオチドには tRNA の立体構造を安定化する効果があることが示唆された(下図)。



しかし、同様の測定を 0.1mM EDTA 中 (Mg<sup>2+</sup> 非存在下) で行うと、天然型の方が転写物よりも構造が不安定になっているという予想外の結果が得られた(下図)。



今回は研究途中で実験材料を酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> から大腸菌 tRNA<sup>Leu</sup> に変更せざるを得なかったため、残念ながら酵素プローブ法などの手段で高次構造の変化を追跡することができなかったが、修飾ヌクレオチドはおそらく Mg<sup>2+</sup> との相互作用次第では tRNA の高次構造の安定化にも不安定化にも寄与し得ることを示唆する結果が得られたことは興味深い。

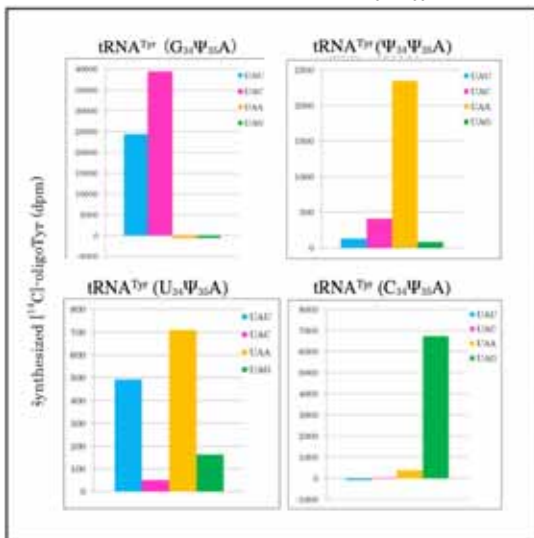
また、アンチコドンヌクレアーゼ VapC を用いることで高収率かつ安定的に tRNA の 5'-および 3'-半分子を調製することができることが示されたので、今後 tRNA の構造-機能相関やスプライシング機構を研究する上で有力なツールとなるであろう。

tRNA<sup>Tyr</sup> のアンチコドン内に含まれるΨの意義の検討：酵母 tRNA<sup>Tyr</sup> のアンチコドン 2 文字目には Ψ<sub>35</sub> が含まれているが、このこ



との生理的意義を探るため、 $\Psi_{35}$ を $U_{35}$ に改変した  $tRNA^{Tyr}(GU_{35}A)$  を調製することを計画した。その過程で対照として作成した、アンチコドン 1 文字目の  $G_{34}$  を  $U_{34}$  に改変した  $tRNA^{Tyr}(U_{34}\Psi_{35}A)$  のコドン認識が Crick の提唱した wobble 説に反するという、予想外の知見が得られたため、アンチコドン 1 文字目の  $G_{34}$  を  $U_{34}$  や  $C_{34}$ 、 $\Psi_{34}$  に改変した  $tRNA^{Tyr}$  を作成した。大腸菌由来の生体外タンパク質合成系を用いて  $oligo(UAN)_{11}$  ( $N=U,C,A,G$ ) を鋳型とし、上記 3 種の  $tRNA$  および比較のために天然型の  $tRNA^{Tyr}(G_{34}\Psi_{35}A)$  を加えた 4 種の  $tRNA$  によるオリゴチロシン合成反応を行った。因みに  $oligo(UAA)_{11}$  が Ochre コドンに、 $oligo(UAG)_{11}$  が Amber コドンに、 $oligo(UAU)_{11}$  と  $oligo(UAC)_{11}$  は tyrosine コドンに対応している。4 種の  $tRNA \times 4$  種の鋳型 = 16 通りの反応の結果をまとめたものを下図に示す。縦軸は各図上部に示すそれぞれのアンチコドンを持つ 4 種の  $tRNA$  が 4 種の鋳型 (青色は  $oligo(UAU)_{11}$ 、赤色は  $oligo(UAC)_{11}$ 、橙色は  $oligo(UAA)_{11}$ 、緑色は  $oligo(UAG)_{11}$ ) に対応して合成したオリゴチロシンの相対量である。

一見して天然型  $tRNA^{Tyr}(G_{34}\Psi_{35}A)$  (図左



上)が UAU および UAC コドン (すなわち正規の tyrosine コドン) に対応してオリゴチロシンを合成したことがわかる。Amber サプレッサーである  $tRNA^{Tyr}(C_{34}\Psi_{35}A)$  (図右下) は確かに UAG (amber) コドンにのみ対応している。本研究で合成した  $tRNA^{Tyr}(\Psi_{34}\Psi_{35}A)$  (図右上) は期待通り UAA (ochre) コドンにのみ対応し、UAG コドンには対応しないので Ochre サプレッサーを創成できたといえるが、正規の tyrosine コドン (特に UAC) への対応性も若干残している。問題の  $tRNA^{Tyr}(U_{34}\Psi_{35}A)$  (図左下) は主として UAA (ochre) コドンに対応

するものの、若干 UAG (amber) コドンにも対応し、さらに正規の tyrosine コドンである UAU にも対応できることがわかった。すなわち、アンチコドン 1 文字目の U は Crick の提唱どおり wobble していることになる。この結果は左記の「予想外の」結果とは整合性がなく、 $tRNA^{Tyr}(U_{34}\Psi_{35}A)$  を再調製して実験をやり直す必要があるが、上述のように現在は残念ながら酵母  $tRNA^{Tyr}$  変異体の調製には技術的困難が生じている。おそらく分子整形技術に使用する RNA リガーゼあるいは RNaseT1 の純度の問題であると思われるので、この問題解決のため鋭意努力中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

F. Iraha, K. Oki, T. Kobayashi, S. Ohno, T. Yokogawa, K. Nishikawa, S. Yokoyama and K. Sakamoto,

Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Tyr</sup> pair by the archaeal tyrosine pair in *Escherichia coli* for genetic code expansion.

*Nucleic Acids Res.*, 38, 3682-3691 (2010)

査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

関本文音, 松浦由佳, 大野敏, 西川一八, 横川隆志, 好酸好熱古細菌 *Sulfolobus tokodai i* 由来トキシン-アンチトキシン VapBC の tRNA 切断活性. 第 85 回日本生化学会大会, 平成 24 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場.

〔図書〕(計 1 件)

T. Yokogawa, S. Ohno and K. Nishikawa, Chapter 19, Incorporation of 3-azidotyrosine into proteins through engineering yeast tyrosyl-tRNA synthetase and its application to site-selective protein modification, in “*Cell-Free Protein Production*” (Y. Endo *et al.* eds.), Humana Press, pp.227-242 (2010).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 一八 (NISHIKAWA KAZUYA)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号: 60109262

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし