

氏 名 (本籍)	つづみ 堤	けん 賢	いち 一
学位の種類	農	学	博 士
学位記番号	農 博 第	2 2 0	号
学位授与年月日	昭和 5 3 年	3 月 2 4 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻		
学位論文題目	家蚕後部絹糸腺の転移 RNA 生合成に関する研究 — tRNA 前駆体のプロセッシングを 中心として —		

論文審査委員 (主査)

教授 志村 憲助 教授 高橋 甫

助教授 伊崎 和夫

# 論文内容要旨

## 第 I 章 序 論

家蚕 (*Bombyx mori* L.) 5 令期の後部絹糸腺の tRNA はこの器官で合成される主要な蛋白質であるフィブロインのアミノ酸組成と大きな相関を示し、非常に偏った組成を持つ。

この様な tRNA の器官特異的な適応現象がどのような機構により発現しているのかという問題は、細胞分化における遺伝子の選択的発現の問題を含め興味深いものである。従来からこの問題は著者達の研究室を含め、いくつかのグループの大きな研究目標であった。著者は上述の課題を明らかにするためには、先ずこの器官における tRNA の生合成経路を解明することが 1 つのステップであると考え、これを本研究の目的とした。

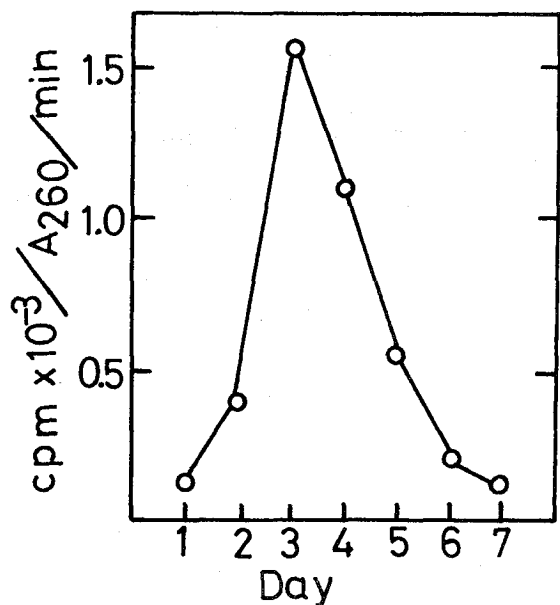
tRNA の生合成において、tRNA 分子が合成される前に中間体 (前駆体) が存在することが最初に示されたのは動物細胞であった。しかし、この点に関しその後詳細な研究が成されたのは大腸菌などの系であり、高等動物においてはその詳細は不明である。

著者は後部絹糸腺を用いて tRNA 前駆体の存在を示し、その成熟過程の概略を明らかにした。また、この過程に関与するリボヌクレアーゼ 2 種の存在を高等動物で初めて明らかにし、そのうちの 1 種については精製を行い、その性質を明らかにした。

## 第 II 章 家蚕 5 令期における RNA 合成能の変化

5 令期における後部絹糸腺の RNA 合成の概略を知る目的で 5 令 1 日から 7 日目までの絹糸腺の全 RNA への  $^3\text{H}$ -ウリジンの取り込みを検討した。その結果、RNA 合成能は 3 日目が最も高かった (図 1)。そこで次にこの時期の絹糸腺を選び tRNA 前駆体の分離および同定を行った。

図 1. 5 令期における後部絹糸腺 RNA の  $^3\text{H}$ -ウリジン取り込み能の変化



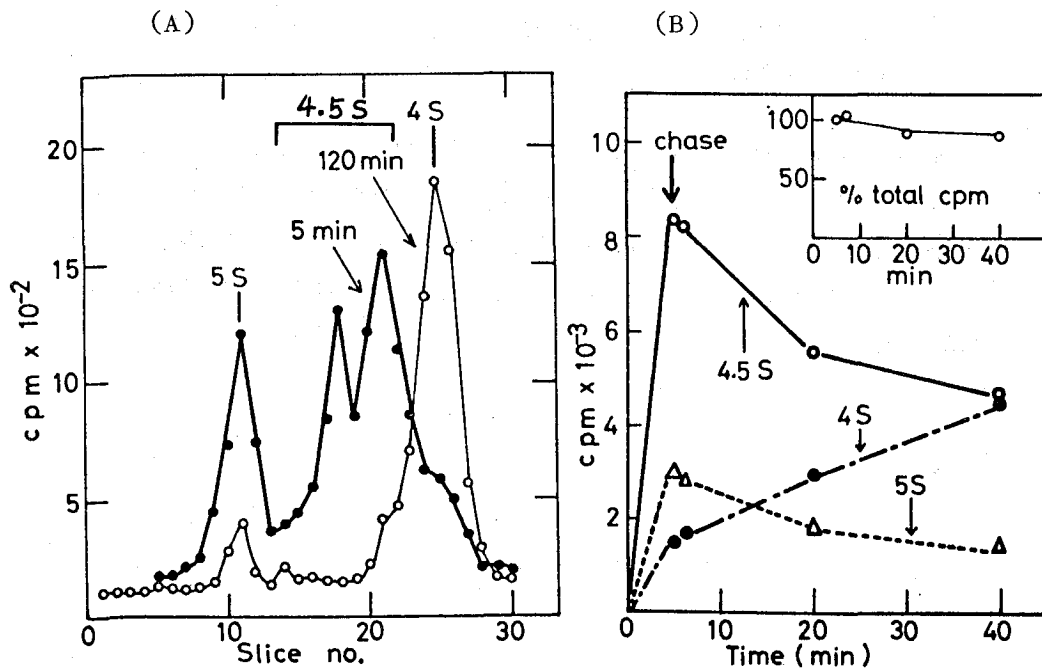
### 第 III 章 tRNA 前駆体の分離および同定

tRNA 生合成において中間体 (前駆体) が存在するとすれば、それは<sup>3</sup>H-ウリジンによって tRNA よりも先にラベルされ、しかも tRNA と同じ構造を含むものであろう。この様な前駆体を同定するために絹糸腺 RNA を<sup>3</sup>H-ウリジンによって5分パルスラベルした。

その結果、図2に示したように tRNA よりも先にラベルされる RNA (4.5 S) が存在し、しかもそれはチェイスにより tRNA に移行した。この RNA は DNA との結合において tRNA と競合した。従ってこの RNA は tRNA とよく似た1次構造を持つものであり、このものが tRNA の前駆体であることを示す。以下、この RNA を 4.5 S 前駆体と呼ぶことにした。これ以外に上記の性質を示す RNA は認められなかった。

4.5 S 前駆体は 90-100 ヌクレオチド程度の大きさを持つ。従って細胞内でこの RNA が tRNA 分子に成熟する過程では何らかの作用により RNA 鎖の切断 (プロセッシング) が生じているはずである。そこで次にこの反応に関与する特異的なリボヌクレアーゼを分離し、成熟反応の詳細を検討することにした。

図2. <sup>3</sup>H-ウリジンで5分ラベルした RNA のゲル電気泳動パターン(A)と、チェイス後の各 RNA の挙動(B)



## 第 IV 章 tRNA 前駆体のプロセシングに関与するリボヌクレアーゼの分離および精製

3 日目の後部絹糸腺 500 g を分画し、いくつかのサブフラクションに分けた。これらを 4.5 S 前駆体と反応させ tRNA サイズに切断する活性を検索した結果、この活性はリボソーム洗液中に認められた。そこで次にこの画分を硫酸分画、ハイドロキシアパタイト、DEAE-セルロース、P-セルロースあるいはセファデックス G-200 の各クロマトによって精製し、RNase P.Bmo と命名した (表 1)。

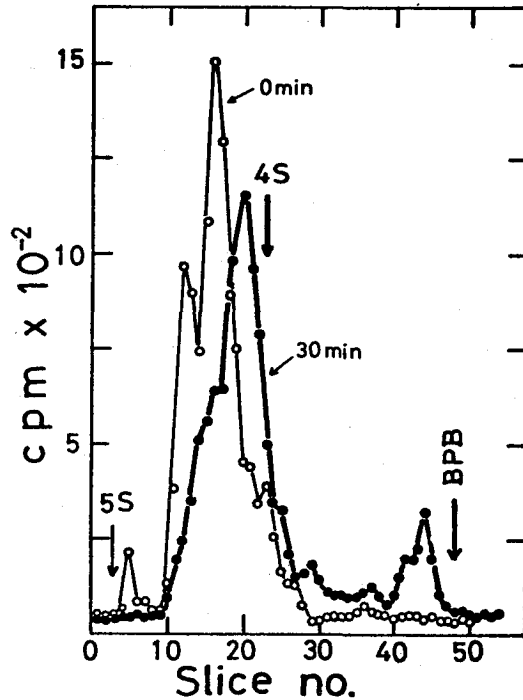
表 1. 後部絹糸腺より前駆体を切断するリボヌクレアーゼの精製

精製過程	全蛋白 (mg)	全活性 <sup>※</sup> (unit)	比活性 (units/mg)	精製度 (倍)
1. リボソーム洗液	606	5,029	8.3	1.0
2. 硫酸分画	362	5,828	16.1	1.9
3. ハイドロキシアパタイト	60.5	4,531	74.9	9.0
4. DEAE-セルロース	10.1	3,612	357.6	43.1
5. セファデックス G-200	5.6	3,352	598.5	72.1
“ (ピーク)	0.7	672	960.5	115.7

※1 unit: 37°C, 10分で 4 SRNA (あるいは 41 SRNA) 500 cpm を生成させ得る酵素量

4.5 S 前駆体はこのヌクレアーゼによって切断され、2つの産物を与える (図 3)。1つは tRNA (4 S) よりも若干大きく、他は 10-15 ヌクレオチドのフラグメントである。このような酵素をここまで精製出来たのは動物細胞では最初のものであり、その性質についてはほとんど知られていない。そこで、RNase P.Bmo の切断様式その他の性質について次章で検討した。

図3. RNase P.Bmo によって切断された 4.5 S 前駆体のゲル電気泳動パターン



## 第 V 章 RNase P. Bmo の諸性質

### 1. 4.5 S 前駆体の切断の部位

4.5 S 前駆体の大きさから判断して、この前駆体中に存在する tRNA 配列以外の余分な部分は末端側に位置していると思われる。5'-末端を  $^{32}\text{P}$  でラベルした 4.5 S 前駆体を基質として RNase P. Bmo 反応を行った結果、本酵素はこの前駆体の 5'-側 10-15 ヌクレオチドを切断することが判明した。また、この反応により生成した tRNA よりも若干大きな RNA の 5'-末端を解析した結果、tRNA のそれと良く一致した。

従って RNase P. Bmo は 4.5 S 前駆体の 5'-側の余分な部分を完全にしかも厳密に切断し、正確な tRNA の 5'-末端を出現せしめる作用をもつと推定した。

しかしながら、上述の反応産物は tRNA よりも若干大きく（以後 4.1 S 前駆体とする）まだ余分な部分が結合している。ところが、上述のように、RNase P. Bmo によって 5'-側は完全に除去されていることから、この RNA は余分なヌクレオチドは 3'-側に結合していると思われる。この部分のプロセッシングについては第 VI 章で検討した。

## 2. 基質特異性

絹糸腺から rRNA, 5 S RNA および tRNA を調製し, RNase P.Bmo と反応させた。その結果, これらに対してはほとんど作用しないことが判明した。また 4.1 S 前駆体にも作用しない。これらの結果は, RNase P.Bmo が高度の特異性を持つことを示唆する。おそらく前駆体の高次構造を識別しているのであろう。実際, アデノシン類縁体であるホルマイシンを鎖中に含み, 2次あるいは3次構造に変化を来たしたと考えられる 4.5 S 前駆体は RNase P.Bmo によって切断されにくいことを明らかにし, このことが *in vivo* での tRNA 合成阻害につながることを明らかにした。

## 3. イオン要求性および pH の影響

RNase P.Bmo 反応の進行には二価陽イオンとして  $Mg^{++}$  あるいは  $Mn^{++}$  が必要である。  $Mg^{++}$  5 mM の存在下で  $NH_4^+$  あるいは  $K^+$  が反応を促進する効果を示した。至適 pH は 8.0 - 8.2 であった。

これらの結果およびその他を表 2 にまとめた。

表 2. RNase P.Bmo の諸性質

至 適 pH	8.0 - 8.2
二価陽イオン要求性	$Mg^{++}$ あるいは $Mn^{++}$
一価陽イオン活性化剤	$NH_4^+$ あるいは $K^+$
切 断 様 式	エンド型
産 物	5' Pを持つ RNA
基 質	4.5 S 前駆体のみ
阻 害 剤	EDTA
分 子 量	約 20 万

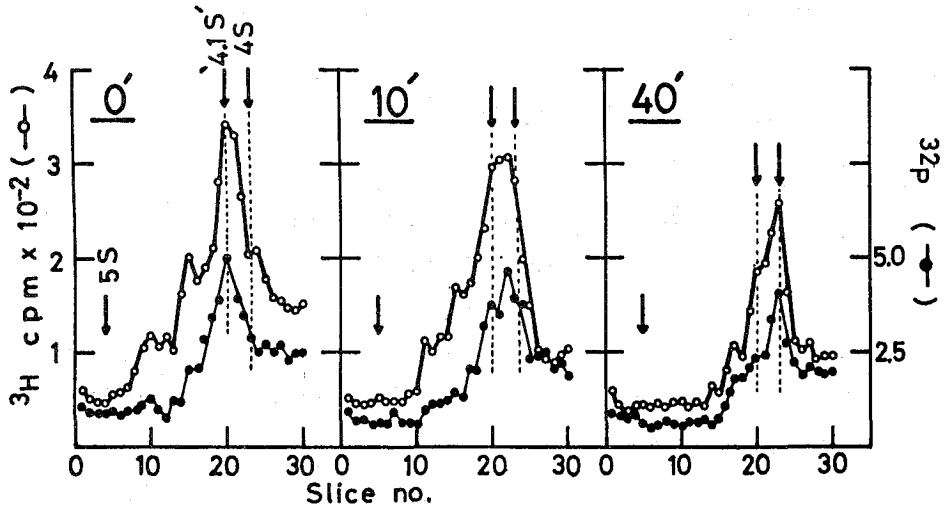
## 第 VI 章 前駆体のプロセシングに関与する RNase P. Bmo 以外のヌクレアーゼ

前章で述べたように, 4.5 S 前駆体は RNase P. Bmo によって 4.1 S 前駆体にプロセスされる。この RNA は tRNA よりもやや大きく, さらにもう 1 段の切断反応を必要とすることが予想された。

事実, この 4.1 S 前駆体を再度硫酸アミノ酸の酵素と反応させた所, tRNA とまったく同じサイズのものが生成した。しかもこの反応は末端ラベルした基質を用いて 3' 側のみを切断することが判明した (図 4)。この画分を DEAE-セルロースによって精製した結

果, RNase P.Bmo とは異なる画分にこの活性が認められた。従ってこの反応に関与するヌクレアーゼは RNase P.Bmo とは異なるものであり, RNase Q.Bmo と命名した。RNase Q.Bmo は 4.5 S 前駆体には働かない。従って, 4.5 S 前駆体が RNase P.Bmo によって切断されたのち, この酵素が作用するものと思われる。

図 4. 5'-末端を  $^{32}\text{P}$  でラベルした  $^3\text{H}$ -4.1 S 前駆体の 4 S RNA への切断反応



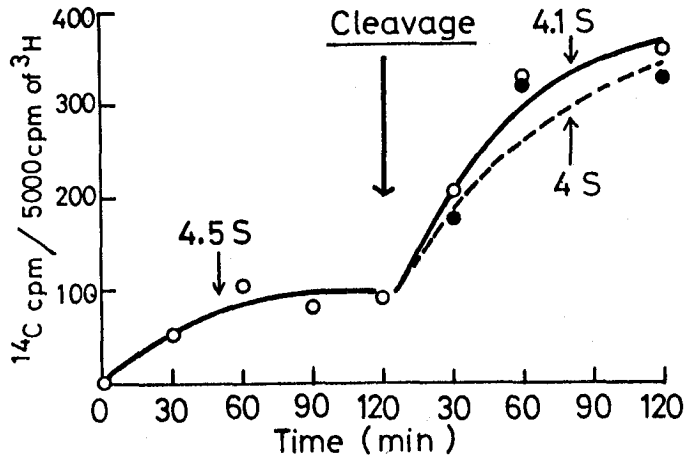
## 第 VII 章 前駆体のプロセッシングと塩基の修飾反応

一般に tRNA はその配列中に多くの修飾塩基を持つ。これらは転写以後生成されると考えられているが, これらの修飾反応と, これまで述べて来た前駆体のプロセッシングとがどのように関連を持つのかは興味ある問題である。

著者は  $^{32}\text{P}$  正リン酸あるいは [メチル- $^{14}\text{C}$ ]メチオニンでラベルした 4.5 S 前駆体および tRNA を RNase T<sub>2</sub> で完全分解し, 修飾塩基を解析した。その結果, tRNA 生合成のごく初期と後期の 2 つのステップで修飾反応が生じていることが示唆された。このことは *in vitro* の実験によっても支持された。

絹糸腺より硫酸分画および DEAE-セルロースによって部分精製した tRNA メチラーゼを用いて 4.5 S 前駆体および tRNA と反応させた。その結果, 4.1 S 前駆体が最も有効な基質であった。また RNase P.Bmo および Q.Bmo によって生成させた 4 S RNA も同様に有効であった。4.5 S 前駆体を予め  $^{14}\text{C}$ -メチルで飽和させてから切断し 4.1 あるいは 4 S としたのちも同様な取り込みが見られた (図 5)。

図5. *in vitro* での  $^{14}\text{C}$ -メチルの 4.5 S 前駆体への取り込みのタイムコース



従って、このことは 4.5 S 前駆体および 4.1 S, 4 S RNA の間で質的に異なるメチル化が生じていることを示すものである。これらは、修飾酵素の認識部位が前駆体の立体構造と密接な関係を持つことを示すものと言える。

## 要 約

家蚕後部絹糸腺において、tRNA は 4.5 S および 4.1 S 前駆体と名づけた中間体を経て生合成されることを、パルスチェイス実験、DNA-RNA ハイブリッド形成反応および精製した酵素による切断実験等によって明らかにした。

4.5 S 前駆体は 5' および 3' 両末端側に tRNA 配列以外の余分な配列を 15-25 ヌクレオチド分程度有し、またシドウリジン、デヒドロウリジンその他多くのメチル化塩基を有していた。この前駆体は最初にその 5'-末端側の余分なヌクレオチドが切断されて 4.1 S 前駆体になり、次に 3'-側が除去され tRNA と同じ分子量を持つ RNA となる。これらの切断過程に関与する特異的なリボヌクレアーゼはそれぞれ RNase P.Bmo および RNase Q.Bmo と名づけた 2 種であることを動物細胞で最初に明らかにした。さらに RNase P.Bmo については約 115 倍に精製することが出来、その諸性質を調べた。

また、tRNA 中に存在する種々の修飾塩基の生成過程についても検討を行い、*in vivo* および *in vitro* での実験の両面からそれらの塩基が生合成のごく初期—恐らく転写直後—および RNase P.Bmo による切断後の 2 つの段階での反応によって生成されることを示した。



以上の実験結果をふまえて第Ⅷ章で後部絹糸腺の tRNA 生合成経路およびその調節機構について考察を行った。

本研究に関して発表した論文

1. Tsutsumi, K., Majima, R. and Shimura, K. (1974) *J. Biochem.* **76**, 1143-1145 'Conversion of Transfer Ribonucleic Acid Precursors to 4S RNA by Enzymes from *Bombyx mori*'
2. Tsutsumi, K., Majima, R. and Shimura, K. (1976) *J. Biochem.* **80**, 1039-1045. 'The Biosynthesis of Transfer RNA in Insects II. Isolation of Transfer RNA Precursors from the Posterior Silk Gland of *Bombyx mori*'
3. Majima, R., Tsutsumi, K., Suda, H. and Shimura, K. (1977) *J. Biochem.* **82**, 1161-1166. 'The Effect of Formycin on the Processing of Transfer RNA Precursors in the Posterior Silk Gland of *Bombyx mori*'
4. Tsutsumi, K., Tsutsumi-Majima, R. and Shimura, K. *J. Biochem.* (投稿中) 'Purification and Some Properties of a Specific Nuclease Which Cleaves Transfer RNA Precursors from the Posterior Silk Gland of *Bombyx mori*'

## 審査結果の要旨

家蚕後部絹糸腺中に含まれる tRNA のアミノ酸種は、この器官で合成される主要蛋白質であるフィブロインのアミノ酸組成と密接に関連している。このような特異的な器官適応現象を明らかにする研究の一環として、本研究では、絹糸腺における tRNA の生合成反応について研究を行った。

5 令期家蚕では、3 日目が RNA 合成能はもっとも高いので、本研究では主にこの時期の絹糸腺を用いた。<sup>3</sup>H-ウリジンの RNA へのとりこみ実験により、tRNA よりもやや分子量の大きい 4.5 S RNA 画分に放射能が先づ入り、ついでこの画分が 4 S RNA に移行することを発見し、前者を tRNA の前駆体と結論した。

ついで 4.5 S 前駆体から 4 S RNA にいたる反応を検討し、これに関与する酵素を 2 種類はじめて分離し、前駆体 RNA の切断を触媒する作用から、RNase P. Bmo および RNase Q. Bmo と命名した。RNase P. Bmo は、4.5 S 前駆体に作用してその 5'-末端部分のヌクレオチド鎖を切出す酵素で、生成物は 4.1 S 前駆体と 10~15 ヌクレオチドのフラグメントである。RNase Q. Bmo は、上の 4.1 S 前駆体にさらに作用して 4 S RNA にする酵素である。この反応では 4.1 S 前駆体の 3'-末端部で分解が行われるものと推定された。

RNase P. Bmo を精製しその性質を調べた結果、この酵素は基質に対する特異性が極めて高く、別に絹糸腺より調整した rRNA, 5 S RNA, tRNA にはほとんど作用しないことが明らかになった。一方、RNase Q. Bmo は、4.5 S RNA には作用せず、4.1 S RNA に特異的に作用することも明らかになり、tRNA の生合成は、4.5 S 前駆体 → 4.1 S 前駆体 → 4 S RNA の径路で進むものと結論した。

tRNA の合成反応には、さらに核酸塩基の修飾反応も含まれるので、上記のプロセッシングとメチル反応との関係についても検索し、4.5 S 前駆体および 4.1 S 前駆体でそれぞれ特異的なメチル化反応が行われていることを明らかにした。

以上の研究は動物細胞でははじめて明らかにされたもので、特に新しい 2 種の酵素の分離は、tRNA の生合成研究に重要な知見を与えるものである。本研究は、生化学分野のみならず広く応用面にも貢献するところが大きく、農学博士の学位を与えるに充分なものと判定する。