転移リボ核酸のコンホメーション

一定の塩基配列で規定される転移リボ核酸 (tRNA) は鎖内部での特異的塩基対形成によってクローバー葉形の二次構造をとる。三次元的にはクローバー葉構造が折りたたまれて高次構造を形成するが、その存在は主として熱変性過程の研究から明らかになった。tRNA のコンホメーションの安定化には陽イオン、とりわけ二価金属イオンが大きな効果を示す。Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ などは tRNA に約 20~30 個特異的に結合し、その会合定数は 10⁸~10⁴ の大きさである。ある種の tRNA には生物活性形と変性形が見出され、相互変換には二価イオンが決定的な役割を果す。活性形は約 2~3 個の二価イオン部位をよけいにもち、変換にはリン酸基の中和を伴うコンホメーション変化が起こると考えられる。tRNA コンホメーションを探索する手段の一つとして赤外吸収スペクトル法は塩基対の様子を調べるのにすぐれているのでその応用を述べた。さらに他の様々な手法が概観された。

樋口 成定*

1. はじめに

転移リボ核酸 (transfer ribonucleic acid, 以下 tRNA と略す) は分子量約 27000, 重合度約 80 の一本の鎖から成る生体高分子である¹⁾。生物は life cycle を通じ、活発にタンパク合成を行なう。tRNA はその過程で遺伝子の本体であるデオキシリボ核酸 (DNA) に書き込まれている遺伝暗号をアミノ酸に翻訳する役割をもっている。すなわち、tRNA は生物的機能として特定のアミノ酸を認識結合しうること、DNA (実際にはメッセンジャー-RNA) の遺伝暗号を解読しうること、タンパク合成が実際に行なわれる部位であるリボゾーム顆粒に結合すること、ができなければならない。このことは tRNA の分子量から考えても tRNA が一種類ではないことを予想させるが、事実一生物種あたり 20 の必須アミノ酸の数に対応するよりも多い数の tRNA が報告されている。いくつかの tRNA は一次構造 (ヌクレオチド配列) が決められている²⁾ が、空間的にいかなるコンホメーションをとるかは分子レベルではわかっていないといってよい。ここでは tRNA のコンホメーションの研究が、現在どのように行なわれているかの一面を述べてみたい。

2. 一次および二次構造

リボ核酸 (RNA) の一次構造の単位 (ヌクレオチド)

は第1図にみられるようにリン酸リボースが主鎖を形成し、塩基が側鎖をつくる。塩基の種類は微量塩基をのぞき、アデニン (A), ウラシル (U), グアニン (G), シトシン (C) の4種類である。核酸鎖中の塩基どうしは他の鎖、または同一鎖内でワトソン-クリック形の特異的な相補的塩基対 (第2図) を A と U の間および G と C の間でつくる。それゆえ、tRNA のコンホメーションは主鎖によるほかに分子鎖内の離れた部分が、側鎖どうしの塩基対形成によって結びつけられて決まってくると考えられる。というのは一次構造が決められた tRNA は 15 種以上あるが、第2図の塩基対を最も多くつくるように核酸鎖をたたむと、すべて第3図のような二次構造モデルに帰着するからである³⁾。これをクローバーリーフモデルと呼んでいるが、特有のヌクレオチド群または配列が一定の位置に出現することからも、偶然の結果とは考えにくく、機能と関係のある二次構造と信じられてい

第1図 リボ核酸の一次構造

* Shigesada HIGUCHI 東京大学薬学部 (113 東京都文京区本郷) 助手・薬博

The Conformation of Transfer RNA

第2図 ワトソン-クリック形塩基対

第3図 クローバーリーフモデル
(・は塩基, tRNA種により異なる。
...は水素結合をあらわす。)

る。クローバーリーフモデルで Amino acid arm と名付けられている arm の 3' 末端のアデニル酸のリボース 3'OH 基には、各 tRNA に特異的なアミノ酸がアミノアシル tRNA 合成酵素の作用で結合される。TψC arm は常に同じ位置に微量成分であるチミン (T)、プソイドウリジン (ψ), C とつづく配列が出現することによる。Anticodon arm ではループになっている部分の中央の三つ組ヌクレオチド (triplet) がいわゆる Anticodon を形成する。Anticodon は DNA の遺伝情報を運ぶメッセンジャー RNA 上の遺伝暗号の単位 (codon triplet) に相補的塩基配列によって対応する。hU (ジヒドロウリジン) arm はこの arm に hU 塩基が選択的に出現することによる。

3. tRNA のコンホメーション

クローバーリーフモデルは、arm の根元部分の塩基

第4図 酵母 tRNA の紫外吸収、粘度、沈降定数の温度変化

対の連なりが短い二重らせんを形成することを示している。tRNA 分子に二重らせんが存在することは、繊維状試料の X 線回折や tRNA 溶液の紫外吸収の温度変化でわかる。しかしながら、tRNA 分子には二重らせんだけではなく一本鎖ループ部分も存在し、現実の tRNA のコンホメーションは一本鎖ループと二重らせんの複雑な組み合わせで成り立っていると想像されている。

Fresco ら⁴⁾ は熱変性の過程から tRNA のコンホメーションの知識を得ることを試みた。第4図に示されているように、0.2M NaCl 中性緩衝液中で粘度、沈降係数の温度変化は段階的であることが見出された。20°C から 40°C の間で紫外吸光度の変化が小さいにもかかわらず——すなわち、二重らせんおよび stacking (塩基の積重なり) があまりこわれていないとき——粘度および沈降係数は 40°C 以上とはちがう形式的変化を示す。このことは tRNA の二次構造 (またはらせん構造) がこわれる前に tRNA の分子形の変化、言い換えれば高次構造が変化していることを示すものと考えられる。50°C 以上になるとらせん部分までこわれて、ランダムコンホメーションになるとされる。

上記の実験は未分画の tRNA で行なわれたが、その

樋口成定氏 昭和43年東京大学大学院薬学系研究科修了。専門は生体高分子化学、とくに天然核酸、合成核酸の構造および物理化学。

後単一に精製された tRNA について紫外吸収の温度変化が調べられたところ^{5),6)}, ある tRNA は二段階的に熱変性することが明らかになった。このことは各 arm のらせん→コイル変化が, ある程度独立して起こったためか, 高次構造の変化が紫外吸収変化に反映されたためであると解される。

tRNA の紫外吸収の熱変性曲線は 100% 二重らせん RNA のそれと比べて転移がゆるやかであるから, らせんの長さはかなり短いうに, 何種かの転移点の異なる曲線の重なりと考えられる。このことはクローバーリーフモデルからも容易に推論されることである。熱変性曲線の形, および転移温度 (中点温度) はまわりのイオンの種類と濃度に敏感である。Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺ などの二価金属イオンの存在で曲線の立ち上りは著しく鋭くなり, 転移温度もずっと高くなる⁷⁾。すなわち, これらの二価金属イオンは tRNA のコンホメーションを安定化する効果がある。粘度, 沈降係数およびそれらの温度変化からも⁷⁾ 二価イオンによって, tRNA 分子がより compact になることが示された。

二価陽イオンはリン酸イオンの電荷をしゃへいすることにより, tRNA 分子の構造を安定化すると定性的には説明される。それでは二価イオンの結合する数や強さはどうであろうか。Mn⁺⁺ イオンが tRNA に結合すると溶媒の水プロトンの核磁気共鳴の緩和時間に対する常磁性効果が変化する現象を利用して, Mn⁺⁺ の tRNA への結合には会合定数の異なる強弱二種類があること, 強い結合部位の数は tRNA 一分子あたり 6~11, 弱い結合部位の数は 6~20 であることが報告された^{8),9)}。ESR を使って未結合状態の Mn⁺⁺ イオン濃度を定量する方法でも同様な結果が得られた¹⁰⁾。一方, tRNA-Mg⁺⁺ イオン系の電位差滴定からは結合部位は一種類で約 25 個の Mg⁺⁺ が tRNA に結合するといわれている¹¹⁾。

筆者らは同じ目的で, 520 nm に吸収極大をもつ Co⁺⁺ イオンを Mg⁺⁺ イオンの代りに使うことを試みた¹²⁾。tRNA が共存すると Co⁺⁺ イオンの吸収は増大する。

また 520 nm 付近には Co⁺⁺ だけのときには, 検出されない円偏光二色性が観測されるようになるから, Co⁺⁺ イオン chromophore は tRNA の高次構造部分との相互作用によって, 光学活性になると考えられる。透析平衡法と吸光度増大の測定とを組み合わせると未結合 Co⁺⁺ イオンと結合 Co⁺⁺ イオンの濃度を知ることができる。Scatchard プロット^{12a)} をつくって得られた tRNA 上の Co⁺⁺ イオンの結合部位の数は約 20 である。

第 1 表には結合数, および会合定数に関するデータを集めてある。かなりのばらつきがみられるが結合部位の総数は約 20~30 である。飽和値 (二価イオン/tRNA リン酸基=1/2 と考えて約 40 前後) より小さいことは注目してよい。これは tRNA の折りたたまれた構造を示唆し, 共存している一価イオンでは, 代替しえない部位の存在を暗示すると思われる。筆者らの得た会合定数は他の研究者の報告より一桁小さいが, 10⁻⁴M 程度の一価イオンの共存が影響したためかもしれない。

ここで興味があるのは二価イオンと tRNA の生物活性との関連である。酵母から抽出されたロイシン tRNA⁷⁾, 大腸菌から抽出されたトリプトファン tRNA¹³⁾ には酵素的にアミノシル化しうる活性形と生物機能のない変性形があることが知られている。両形の相互変換には Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺ イオンやポリアミンなどの二価イオンが大きな役割を果たす。たとえば 10⁻²M 程度の Mg⁺⁺ イオンの存在下で短時間 (数分) 60°C で加熱すると活性化されるが, 透析などで脱 Mg⁺⁺ するとすみやかに変性形に変わる。ゲルろ過溶出パターン, 流体力学的諸定数, リボヌクレアーゼ抵抗性に差が認められ, 両形の間にある種のコンホメーションの違いがあることは疑いないが, 分子レベルでの実体的な差はわかっていない。最近大腸菌トリプトファン tRNA, およびその突然変異 tRNA の一次構造が決定された。変異による差は hU arm の塩基がただ一つ A→G に変わったことであったが, 変異形は変性形になる能力を失なった¹⁵⁾。特定の位置に特定の塩基が出現することは, 正しい分子内水素結合の形成

第 1 表 二 価 イ オ ン と tRNA の 結 合

二 価 イ オ ン	一 価 イ オ ン	結 合 数		会 合 定 数		方 法	文 献
		強い部位	弱い部位	強い部位	弱い部位		
Mn ⁺⁺	0.01MKCl 2×10 ⁻³ M トリス緩衝液	11	6	3×10 ⁴	2×10 ³	NMR	8)
Mn ⁺⁺	0.05MKCl 0.05M トリス緩衝液	6	22	2~4×10 ⁴	—	NMR, 透析平衡	9)
Mn ⁺⁺	5×10 ⁻³ MNaCl 5×10 ⁻³ M トリエタノールアミン	10	21	2×10 ⁵	5×10 ³	E S R	10)
Mg ⁺⁺	0.6~2.5×10 ⁻³ M リン酸ナトリウム		25	2×10 ⁴		電位差滴定	11)
Co ⁺⁺	0.15MKCl 0.01M カコシル酸		20	2×10 ³		可視スペクトル 透析平衡	12)

に決定的な影響を与えると同時に、コンホメーションをもきびしく規定していることがこれでわかったわけである。

変性形は特定の tRNA の属性ではなく普遍的なもので、大多数の tRNA は常温での変換速度がロイシン tRNA などに比べ、非常にはやいので検出されないという考え方もある。事実、ロイシン tRNA 変性形は 10^{-2} M MgCl_2 , 25°C での変換の半減期は約 24 時間であるが、他の何種類かの tRNA は半減期が数分～数十分で酵素的検出可能の限界上にあるといわれている。

変性形から活性形に移り変わるとき、二価イオンの結合数に変化があるかという問題はコンホメーションの点からも興味がある。未結合の Co^{++} イオン濃度に対しロイシン tRNA 活性形の量をプロットすると第 5 図のようになる¹²⁾。直線部分は原点に外挿しないからロイシン tRNA が変性形から活性形に変化するとき、 Co^{++} イオンはある程度協同的に結合すると解される。これが正しいとすると、第 5 図の曲線の両対数プロットは直線となり、こう配は変換に際し、結合する二価イオンの数を与えるはずである。結果は予想どおりで、こう配から活性形ロイシン tRNA は Co^{++} イオンが 2 個よけいに結合することが示された。 Mg^{++} , Mn^{++} , ポリアミンイオンなどについても未結合の二価イオン濃度を tRNA 濃度を極端に下げることによって、近似的に求めて同様な分析を行なうと、変換の際によぶにつく二価陽イオンの数は 3 個であることがわかった¹⁶⁾。これらの結果はロイシン tRNA が活性形へ変換するときには、4～6 個のリン酸基の中和を必要とするようなコンホメーションの変化が生ずることを示している。協同的な中和を必要とする部位は局所的に近接しており、高次構造による折

第 5 図 酵母ロイシン tRNA 活性形の量とまわりの Co^{++} イオン濃度の関係

りたたまりとも関係があるのであろう。

もっと直接的に tRNA 分子中の塩基対の様子を調べる方法に赤外線吸収スペクトルがある。第 6 図に大腸菌ホルミルメチオニン tRNA の重水溶液のスペクトルが示してある¹⁷⁾。1750～1450 cm^{-1} の領域の吸収は塩基対に由来する。スペクトルの内訳は塩基対を形成した A・U スペクトル、G・C スペクトルとそうでない A, U, G, C, および微量塩基の各スペクトルから成るものと考えることができる。それゆえ、上記の標準スペクトルを作成して組成を未知数とし、和のスペクトルをいろいろな組合せでつくり、実測と比較してよく合うものを探し出せば、tRNA 分子中の塩基対の数がわかるはずである¹⁸⁾。これを実際に行なった結果が第 6 図に点線で示しており、 $2\text{A}\cdot\text{U}+17\text{G}\cdot\text{C}$ という組合せが実測スペクトルともっともよく一致する。ホルミルメチオニン tRNA のクローバーリーフモデルに出現する塩基対の数はその程度であるから、赤外スペクトル法によってクローバーリーフモデルが支持されたといえるであろう。ホルミルメチオニン tRNA の赤外スペクトルの温度変化も同時に調べられ¹⁷⁾、塩基対のこわれ方は紫外吸収の場合と同様協同性が認められる。同様な試みはいくつかのアミノ酸特異的 tRNA についても行なわれた¹⁸⁾が、クローバーリーフモデルよりも塩基対数をふやさないを実測に合わない例も見られる。これは水素結合による塩基対形成の効果だけが、赤外吸収スペクトルに反映されるとする標準スペクトルのとり方が原因であるかも知れない。

高次構造の存在およびコンホメーションの変化を検出する物理化学的方法は、他にケイ光測定、旋光分散、円偏光二色性、スピニング標識、トリチウム交換、X 線小角散乱、微分熱変性曲線などがある¹⁹⁾がいずれも決定的なものではない。現在、tRNA の結晶構造解析が日本を含む世界の数研究室で進行中である。いまのところ tRNA 分子の形状が球状でなく回転楕円体に近いという程度のことしかわからないが、これが成功すれば tRNA コン

(—); 実測曲線 (0.2 M NaCl —0.005 M MgCl_2 —0.001 M カコジル酸ナトリウム PD7.6)
(···); $2\text{A}\cdot\text{U}+17\text{G}\cdot\text{C}$ の計算曲線

第 6 図 大腸菌ホルミルメチオニン tRNA 重水溶液の赤外線吸収スペクトル

ホメーションの全貌は一挙に明らかになるであろう。さらに、tRNAの生物的功能を果すための機能部位なども見当をつけることが容易になると思われる。

tRNAのコンホメーションには化学修飾による方法でも調べられている¹⁹⁾。多くの試薬が塩基対を形成すると考えられる部分よりも一本鎖ループにある塩基の方に、より高い親和性をもつことが知られた。これらの研究はクローバーリーフモデルを支持するとともに、一本鎖と思われる部分に存在する塩基のなかにも反応性からみて高次構造中に埋まっている場合があることを示した。また、化学修飾後の生物活性を調べる機能部位の検索も行なわれている。tRNA分子をリボヌクレアーゼで限定分解するとか、化学的に特別の位置で鎖を切断したのち、いくつかの断片にわけてコンホメーションや生物活性の残存をみたり、再構成によって生物活性とコンホメーションの回復がどのように行なわれるかを調べる実験がなされており、この方面からも機能を発揮するためにはコンホメーションが重要な因子であることが示された²⁰⁾。

4. おわりに

tRNAのコンホメーションについては、それが生物的功能の遂行に重要な意味をもつことは明らかであるが、分子構造レベルでの実体や変化の様相はまだ明らかにされていない。さまざまな実験事実をもっともよく説明するために、いくつかのモデルが提出されている。そのなかでもっとも評価されているものを一例として第7図に示す²¹⁾。もとより、このモデルが正しいかどうかは保証の限りではなく、歴史の判定を待たねばならないが、80残基程度のヌクレオチド鎖が、このように複雑な構造を

第7図 Levitt の tRNA モデル

安定にとりうる、またはとる必要があることの一例としてみていただけるとよいと思う。

終りに、未発表のデータ、および図の使用を許してくださった Princeton 大学の Professor Fresco, ならびに原稿をご校閲くださった東京大学薬学部、坪井正道教授に感謝いたします。

文 献

- 1) T. Lindahl, D.D. Henley, J.R. Fresco : *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 4961 (1965)
- 2) 竹村彰祐 : 生化学, **43**, 135 (1971)
- 3) J. T. Madison : *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 131 (1969)
- 4) D.D. Henley, T. Lindahl, J.R. Fresco : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **55**, 191 (1966)
- 5) J.R. Fresco : "Informational Macromolecules", Academic Press, p. 121 (1963)
- 6) F. Cramer, H. Doepner, F. von der Haar, E. Schlimme, H. Seidel : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **61**, 1384 (1968)
- 7) J.R. Fresco, et al. : *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, **31**, 527 (1966)
- 8) J. Eisinger, F. Fawaz-Estrup, R. G. Shulman : *J. Chem. Phys.*, **42**, 43 (1965)
- 9) M. Cohn, A. Danchin, M. Grunberg-Manago : *J. Mol. Biol.*, **39**, 199 (1969)
- 10) A. Danchin, M. Guéron : *Europ. J. Biochem.*, **16**, 532 (1970)
- 11) C. Sander, P.O.P. Ts'o : *J. Mol. Biol.*, **55**, 1 (1971)
- 12) S. Higuchi, J.R. Fresco : 未発表
- 12a) T.R. Hughes, I.M. Klotz : *Methods Biochem. Anal.*, **3**, 265 (1956)
- 13) 石田寅夫 : 蛋白質核酸酵素, **16**, 96 (1971)
- 14) A. Adams, T. Lindahl, J.R. Fresco : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57**, 1684 (1967)
- 15) D. Hirsh : *J. Mol. Biol.*, **58**, 439 (1971)
- 16) J.R. Fresco : 私信
- 17) M. Tsuboi, S. Higuchi, Y. Kyogoku, S. Nishimura : *Biochim. Biophys. Acta.*, **195**, 23 (1969)
- 18) 坪井正道 : 生物物理, **10**, 24 (1970)
- 19) F. Cramer : *Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.*, **12**, 391 (1971)
- 20) 瀬野悍二 : 蛋白質核酸酵素, **15**, 1005 (1970)
- 21) M. Levitt : *Nature*, **224**, 759 (1969)