リボフラビン存在下, 大腸菌転移 RNA¹⁾ の光増感失活に関する研究 (第 1 報²⁾)
転移 RNA の光増感失活に伴う構成塩基類の化学的变化

上原喜八郎, 早川堯夫, 鍋島俊隆, 山村雅一
大阪大学薬学部³⁾

Studies on Photodynamic Inactivation of *Escherichia coli* tRNA¹⁾ in the
Presence of Riboflavin. I.²⁾ The Chemical Changes in
the Base Components of tRNA associated
with Its Photodynamic Inactivation

KIHACHIRO UEHARA, TAKAO HAYAKAWA, TOSHITAKA NABESHIMA
and MASAICHI YAMAMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University³⁾

(Received October 18, 1972)

Irradiation of *Escherichia coli* transfer RNA (tRNA) with visible light in the presence of oxygen and riboflavin led to the loss of its amino acid-accepting activity. In an attempt to elucidate the basic mechanism involved in the riboflavin-sensitized photoinactivation of tRNA, changes in base compositions of tRNA as a result of photodynamic treatment were examined. The photodynamic inactivation of tRNA was found to be ascribable to the selective destruction of guanine residues in tRNA and to the changes in its tertiary structure, which involved decrease in the degree of base stacking and disruption of base pairs. The modification of 4-thiouracil residues in tRNA may also be involved in the riboflavin-sensitized photoinactivation, since its characteristic absorption maximum near 335 m μ disappeared by the photodynamic treatment. Though guanine and adenine derivatives are susceptible to the riboflavin-sensitized photodegradation, the adenine residues in tRNA were unaffected even when amino acid-accepting activity of tRNA was almost completely lost.

DNA,⁴⁾ TMV-RNA⁵⁾ および酵母 tRNA¹⁾ などの種々の核酸はメチレンブルー, チオピロニン, ルミクローム, プロフラビンなどの合成色素を光増感剤として可視光線を照射すれば失活することが知られているが, その原因は, それらの構成塩基の一つであるグアニン (Gua) 残基が選択的に光増感分解されることにあると考えられている。⁶⁾

また, これらの光増感剤存在下, 核酸を構成する塩基類ならびにそれらのヌクレオシド, ヌクレオチドの光増感反応においても Gua およびその誘導体のみが分解されることが報告されている。⁷⁾

上原らは, 生体色素であるリボフラビンが前記の色素類とは異なり Gua のみならずアデニン (Ade) をも光増

1) 転移リボ核酸.

2) 本研究の一部は, 日本生化学会近畿支部第 15 回例会, 京都, 1968 年 6 月, 生化学, **40**, 391 (1968) および日本薬学会第 92 年会, 大阪, 1972 年 4 月に発表.

3) Location: 6-1-1 Toneyama, Toyonaka, Osaka.

4) デオキシリボ核酸.

5) タバコモザイクウイルスリボ核酸.

6) a) M. I. Simon, H. Van Vunakis, *J. Mol. Biol.*, **4**, 488 (1962); b) J.S. Sussenbach, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 154 (1963); c) B. Singer, H.F. Conrat, *Biochemistry*, **5**, 2446 (1966); d) M. Kuwano, Y. Hayashi, H. Hayashi, K. Miura, *J. Mol. Biol.*, **32**, 659 (1968).

7) a) M.I. Simon, H. Van Vunakis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 197 (1964); b) K.S. Sastry, M.P. Gordon, *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 42 (1966); c) A. Wacker, H. Dellweg, L. Träger, A. Kornhauser, E. Lodemann, G. Türck, R. Selzer, P. Chandra, M. Ishimoto, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 369 (1964).

感分解させるといふ興味深い現象を新たに発見し、⁸⁾ さらに Ade を含む NAD⁹⁾ などのヌクレオチド類も分子中の Ade 残基がリボフラビン存在下光増感分解を受けその生物活性を失うことを明らかにした。¹⁰⁾

その後、著者らは、リボフラビンにより、大腸菌 tRNA が光増感反応を受け失活することを認め、¹¹⁾ 失活に伴い構成塩基類がいかに変化するかを検討したので、その結果をここに報告する。

実験の部

実験材料 tRNA は, Tissières の方法¹²⁾ で培養した大腸菌 B No. 3209 より Kagawa らの方法¹³⁾ を一部改良した方法を用いて分離、精製した。すなわち Kagawa らの方法のフェノール処理で得た水層にその 1/2 量の 80% フェノールを加え室温で 40 分間攪拌する操作および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで得られた粗 tRNA を 0.02 M 酢酸緩衝液, pH 5.0 に溶かし、この溶液を 0.3 M 食塩を含む上記緩衝液で緩衝化した DEAE-セファデックス A-50 カラムに吸着させ、直線の食塩濃度勾配 (0.3 M より 0.8 M) で溶出する操作を従来の方法に加えた。

この方法により得られた tRNA はジフェニルアミン反応、¹⁴⁾ インドール反応¹⁵⁾ により DNA 含量は 0.5% 以下、Lowry らの方法¹⁶⁾ によりタンパク質含量は 1.5% 以下であった。また、tRNA の 1% 溶液 (0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.0) の分子吸光係数は、260 mμ で 211.0 であった。

L-[¹⁴C]-アミノ酸は第一化学薬品より購入したもので、[¹⁴C]-トリプトファンおよびシスチンのみ DL-体である。また、リボフラビンは片山化学工業の製品を用いた。

4-チオウリジン (s⁴U) は Sigma 社製 4-チオウリジンジスルフィドを Lipsett の報告¹⁷⁾ にしたがって 2-メルカプトエタノールで還元したのち、n-ブタノール-水 (86: 14 v/v) を展開溶媒としてペーパークロマトグラフィーで分離 ($R_f=0.36$)、精製することにより得た ($UV\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}\mu: 332, 245; UV\lambda_{\text{min}}^{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}\mu: 275, 225; OD_{331}/OD_{260}=7.75, OD_{331}/OD_{245}=5.53$)。溶液中の s⁴U 濃度は 331 mμ における分子吸光係数 $\epsilon=21200^{18)}$ から算出した。

実験方法 tRNA のアミノ酸受容能——tRNA のアミノ酸受容能は反応温度を 30° とした以外は Zubay の方法¹⁹⁾ に準じて測定した。なお、測定に用いた酵素は、Zubay の方法¹⁹⁾ で得た酵素画分に硫酸を加えて硫酸 85% 飽和の沈殿として得た。反応を停止後、反応液をミリアフィルターで濾過し、フィルターを 5% トリクロル酢酸および水で洗浄後、乾燥させ、Bray の溶液²⁰⁾ を加えて溶解し放射活性を測定した。またアミノ酸受容能は、Table III にその結果を示した実験を除いて [¹⁴C]-ロイシンを用いて測定した。

光照射——食塩を 17.1 mM 含む 0.005 M 酢酸緩衝液, pH 5.0 に tRNA とリボフラビンとをそれぞれ 4.22 A₂₆₀-unit/ml,²¹⁾ 10⁻² μmole/ml となるように溶かして試験管に入れ、これを 30° の恒温槽内に保って 20 cm の距離から 500 W のフラッドランプ (ナショナルレフランプ) を用いて光照射した。なお、試料は恒温槽のガラス壁より 10 cm の距離に保たれておりそこでの照度は約 45000 ルックスであった。

s⁴U の光照射は s⁴U 濃度を 2×10⁻² μmole/ml となるようにして 25° で光照射した以外は tRNA の光照射の場合と同じ条件で行なった。

分析法 tRNA の構成塩基組成の分析は Yoshida らの方法²²⁾ にしたがって、またリンの定量は竹村らの方法²³⁾ にしたがって行なった。

8) K. Uehara, T. Mizoguchi, Y. Okada, *J. Biochem.* (Tokyo), **55**, 685 (1964).

9) ニコチンアミド-アデニンヌクレオチド。

10) a) K. Uehara, T. Mizoguchi, Y. Okada, J. Kuwashima, *J. Biochem.* (Tokyo), **59**, 433 (1966); b) K. Uehara, T. Mizoguchi, Y. Okada, J. Umemoto, *ibid.*, **59**, 556 (1966); c) K. Uehara, T. Hayakawa, *ibid.*, **71**, 401 (1972); d) K. Uehara, T. Hayakawa, *ibid.*, **71**, 685 (1972).

11) A. Tugita, Y. Okada, K. Uehara, *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 360 (1965).

12) A. Tissières, *J. Mol. Biol.*, **1**, 365 (1959).

13) H. Kagawa, H. Fukutome, Y. Kawade, *J. Mol. Biol.*, **26**, 249 (1967).

14) Z. Dische, K. Schwarz, *Mikrochim. Acta*, **2**, 13 (1937).

15) G. Ceriotti, *J. Biol. Chem.*, **198**, 297 (1952).

16) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

17) M.N. Lipsett, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 224 (1965).

18) N.K. Kochetkov, E.I. Budowsky, V.N. Shibaev, G.I. Yeliseeva, M.A. Grachev, V.P. Demushkin, *Tetrahedron*, **19**, 1207 (1963).

19) G. Zubay, "Procedures in Nucleic Acid Research," eds by G.L. Cantoni, D.R. Davies, A. Happer and Row, Publishers, Inc., New York, 1966, p. 455.

20) G.A. Bray, *Anal. Biochem.*, **1**, 279 (1960).

21) tRNA を 260 mμ での吸光度が 1.0 になるように溶かした時、1 ml 中に含まれる tRNA の量を A₂₆₀-unit/ml という。

22) H. Yoshida, M. Shibata, *J. Biochem.* (Tokyo), **66**, 737 (1969).

23) 竹村彰祐, 三浦謹一郎, 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 516 (1966).

測定機器——放射活性は、Pacard TRI-CARB 液体シンチレーションカウンター 2002 型および Beckman LS-150 液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。円偏光二色性は、日本分光製自記旋光分散記録計 ORD/UV-5 型で 2 mm のセルを用いて 24.5°C にて測定した。紫外吸収スペクトルは島津分光光度計 QV-50 型、UV-200 型および日立自記分光光度計 EPS-3T 型を用いて測定した。

結 果

I. リボフラビン存在下、tRNA の光増感失活

tRNA にリボフラビンを添加して、好氣的条件下で、可視光線を照射すると、tRNA のアミノ酸受容能は、みかけの一次反応にしたがって急速に減少する。

この現象は、リボフラビン、酸素、可視光線の存在下におこるもので、これらのいずれが欠けても tRNA のアミノ酸受容能に変化は認められなかった (Fig. 1)。

Fig. 1. Time-Course of the Photodynamic Inactivation of tRNA in the Presence of Riboflavin

The reaction mixtures containing 4.22 A_{260} -units/ml of tRNA, 10 μ moles/ml of riboflavin and 17.1 μ moles/ml of NaCl in 5×10^{-3} M acetate buffer, pH 5.0, were irradiated in a glass-wall temperature controlled water bath (30°) at a distance of 20 cm from 500 W flood lamp (about 45000 luxes). Aliquots (0.1 ml) were removed, and assayed for the accepting activity of tRNA for [14 C]-leucine.

reactions in the light:

△—△: tRNA(aerobic)

○—○: tRNA+riboflavin(aerobic)

×—×: tRNA+riboflavin(anaerobic)

reactions in the dark:

●—●: tRNA+riboflavin(aerobic)

▲—▲: tRNA+riboflavin(anaerobic)

TABLE I. Effect of pH on the Photodynamic Inactivation of tRNA

Buffer	pH	Remaining activity(%) ^{a)}
Acetate buffer	4.0	64.7
	5.0	77.2
Citrate buffer	5.0	103.9
	6.0	75.1
	6.9	78.0
Phosphate buffer	6.9	93.6
	8.0	75.3

The reaction mixtures were irradiated and assayed as described in Fig. 1 except that acetate buffer was replaced by citrate buffer or phosphate buffer.

a) Remaining activity of tRNA irradiated for 7 min.

II. tRNA の光増感失活におよぼす pH の影響

すでに分子中の Ade 部分の分解に起因することが明らかにされている NAD の光増感失活や、5'-アデニル酸の光増感分解の場合は、その分解速度が反応液の pH に依存し、pH 4.0 で最も著しいことが知られているところから^{10a, d)}もし、tRNA の光増感失活の原因が Ade 残基の光増感分解にあるとすると、同様の傾向が観察されるのではないかと予想し、リボフラビンによる tRNA の光増感失活と pH との関係を検討した。

その結果を Table I に示したが、tRNA の失活の程度は、pH 4.0 から pH 8.0 の範囲では、ほぼ一定であった。このことから、リボフラビンによる tRNA の光増感失活の原因は NAD の場合^{10a, c)}とは異なっている可能性が示唆された。

III. 光増感失活した tRNA の構成塩基組成の変化

つぎに tRNA の光増感失活の原因をさらに詳しく検討する目的で、光増感失活した tRNA の構成塩基組成の分析を行なった。

その結果を Table II に示したが、tRNA のみに可視光線を照射した場合や、リボフラビンを tRNA に加えても遮光して保温した場合には、いずれも tRNA の主要構成塩基含量に関して変化は認められなかった。しかし、リボフラビン存在下、tRNA に可視光線を照射すると照射時間に応じてアミノ酸受容能が低下し、その際、主要構成塩基のうち Gua 残基のみが選択的に分解され、その含量が減少するのが認められた。

また、II の実験結果 (Table I) から tRNA の光増感失活の原因として、Ade 残基の分解による可能性は少ないことが予想されたが、Table II の実験結果からその予想の正しいことが確認された。

TABLE II. Base Composition of tRNA before and after Irradiation

Reaction system	Irradiation time (min)	Base composition (%)				Yield ^{a)} (%)	Remaining activity (%)
		Uridylic acid	Cytidylic acid	Adenine	Guanine		
tRNA	0	20.4	26.6	19.9	31.7	98.6	100.0
	60	19.7	27.8	21.2	32.5	101.2	103.1
tRNA + Riboflavin	0	20.5	27.5	20.6	31.4	100.0	98.9
	3	19.9	26.3	20.2	31.3	97.7	92.3
	10	19.9	26.4	19.8	30.1	96.2	49.4
	20	20.7	26.1	20.3	25.1	92.2	17.1
	40	20.5	26.4	19.5	20.2	86.6	5.4
	60	20.1	26.7	20.6	18.7	86.1	4.9

The reaction mixtures containing 8.44 A_{260} -units/ml of tRNA, 20 μ moles/ml of riboflavin and 17.1 μ moles/ml of NaCl in 5×10^{-3} M acetate buffer, pH 5.0, were irradiated and assayed as described in the text. After irradiation, riboflavin were removed by passage of the samples through Sephadex G-25 column with water and the tRNA were lyophilized. The recovered tRNA were hydrolyzed with 1 N HCl and analyzed by column chromatography as described by Yoshida and Shibata.²²⁾ Base composition were expressed as mole percent of total phosphate of the applied tRNA hydrolysate.

a) yield = (moles of recovered bases) $\times$ 100 / moles of total phosphate of the applied tRNA hydrolysate.

IV. 光増感失活した tRNA の 4-チオウラシル (⁴Sur) 残基の変化

上記の実験結果から、リボフラビンによる tRNA の光増感失活の原因の一つはそれを構成する 4 つの主要塩基の中の、Gua 残基の分解にあると考えられるが、tRNA 中には、4 つの主要塩基の他に多数のいわゆる微量塩基が含まれているところから、²⁴⁾ それらのいずれかがリボフラビンによって光増感反応を受け、tRNA の失活の一因となっている可能性も残されている。とりわけ著者らの実験に用いている大腸菌 tRNA には、微量塩基の一つとして 4-チオウリジン (⁴sU) が含まれており、²⁵⁾ また、リボフラビンによりシステイン、メチオニンなどの分子中にイオウ原子を含んだアミノ酸が光酸化されることが知られている²⁶⁾ ところから、⁴sU がリボフラビンによる光増感反応を受けるか否か検討してみた。

Fig. 2 に示すように、⁴sU は 330 m μ 付近を中心とする主要吸収帯を有するが、この溶液にリボフラビンを加え光照射すると、時間と共に吸光度の減少を伴うスペクトルの変化が認められた。なお、⁴sU 溶液のみを光照射した場合や、リボフラビンを加え遮光して保温した場合には、このようなスペクトル上の変化は認められなかった。

このようにして光照射した反応液を Dowex 50 $\times$ 4 (H⁺) カラムに通しリボフラビンを吸着させたのち、未吸着画分の ⁴sU 量を測定すると、⁴sU のみを光照射した場合は、ほぼ定量的に照射前の ⁴sU が回収されたのに対し、リボフラビンを加えて光照射した場合は、光を照射した反応液の 330 m μ 付近の吸光度の減少に相当する量の ⁴sU が失われていた。また、この未吸着画分には紫外外部吸収スペクトルの測定結果から、未反応の残存 ⁴sU に加えて、260 m μ 付近に極大吸収を有する反応生成物が含まれている可能性があったので、この画分をペーパークロマトグラフィーなどによって精製し、ウリジンが含まれていることを明らかにした。²⁷⁾

Fig. 2. Photodynamic Degradation of 4-Thiouridine in the Presence of Riboflavin

The reaction mixtures containing 20 μ moles/ml of 4-thiouridine and 10 μ moles/ml of riboflavin in 5×10^{-3} M acetate buffer, pH 5.0, were irradiated in a temperature controlled water bath (25°) at a distance of 20 cm from 500 W flood lamp (about 45000 luxes).

24) a) 実吉峯郎, 蛋白質・核酸・酵素, **12**, 627 (1967); b) 実吉峯郎, *ibid.*, **15**, 251 (1970).

25) M.N. Lipsett, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3975 (1965).

26) J.S. Bellin, C.A. Yankus, *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 18 (1968).

27) K. Uehara, T. Hayakawa, T. Nabeshima, *J. Biochem.* (Tokyo), 執筆中.

これらの結果から、リボフラビンにより s^4U が光増感反応を受け、それに伴って $330\text{ m}\mu$ 付近の吸光度が減少することが確認された。

s^4U に光増感反応を受けるという性質があることが明らかになったので、われわれは tRNA をリボフラビン存在下光増感失活させた場合の 4-チオウラシル (^4Sur) 残基の変化をしらべることにした。

ところで分子中に ^4Sur 残基を含む大腸菌 tRNA などでは、 $260\text{ m}\mu$ 付近を中心とする主要吸収帯に加え $335\text{ m}\mu$ 付近を中心とする吸収帯を示すことが紫外吸収スペクトル上の特性とされている。^{25,28)} 分子中に ^4Sur 残基を含まない酵母 tRNA などでは、このような $335\text{ m}\mu$ 付近の吸収帯をもっていない。

著者らが大腸菌から得た精製未分画 tRNA も $335\text{ m}\mu$ 付近を中心とする吸収帯を有していたが、リボフラビンによる光増感反応の実験に先立ってこの吸収帯が ^4Sur 残基に由来することをつぎの方法で再確認した。

すでに tRNA 中の ^4Sur 残基は N-エチルマレイミドにより特異的に化学修飾され、²⁹⁾ あるいはヨード (I_2) により酸化されること、³⁰⁾ そのいずれの場合にも tRNA の $335\text{ m}\mu$ 付近の吸収帯が減少することが報告されているが、この方法を著者らが得た大腸菌 tRNA に適用したところ、いずれの処理によっても tRNA の $335\text{ m}\mu$ 付近の吸収帯が減少することが認められた。

すなわち、Carbon らの方法²⁹⁾ にしたがって $4.0\text{ }\mu\text{mole/ml}$ の N-エチルマレイミドを含む 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.4) 10 ml に tRNA を 1 mg/ml となるように溶かし、 37° に保温した。その後、 10 時間にわたって、 2 時間毎にこの反応液に $4.0\text{ }\mu\text{mole/ml}$ の N-エチルマレイミドを含む上記緩衝液を 10 ml ずつ加えて 37° に保温した。反応液から tRNA をエタノールにより沈殿させ、未反応の N-エチルマレイミドおよびその加水分解生成物を除き、この tRNA の紫外吸収スペクトルを測定した。反応前の tRNA については $335\text{ m}\mu$ における吸光度と $260\text{ m}\mu$ における吸光度の比が、 1.70×10^{-2} であったが、N-エチルマレイミドで処理した後は、その値が 0.89×10^{-2} となっていた。

また、Lipsett の方法³⁰⁾ にしたがって tRNA 10 mg を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に溶かし、これに、 I_2 を 1.0 mM 、KI を 0.5% 含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) を等量加えて 0° で 20 分間静置した。反応液から tRNA をエタノールにより沈殿させ、未反応の I_2 を除き、 I_2 酸化した tRNA を得た。この tRNA の $335\text{ m}\mu$ における吸光度と $260\text{ m}\mu$ における吸光度の比は 0.44×10^{-2} に減少していた。また、 I_2 処理した tRNA に β -メルカプトエタノールを加えて保温し還元すると $335\text{ m}\mu$ 付近の吸収極大が再び観察されるようになった。

Fig. 3 にはリボフラビン存在下、tRNA を光照射し、その $335\text{ m}\mu$ 付近の吸光度の変化をしらべた結果を示している。照射時間に応じた吸光度の急速な減少がみられ、約 10 分間の照射で $335\text{ m}\mu$ 付近における特徴的な吸収極大はほとんど消失する。tRNA のみを光照射したり、リボフラビンが共存していても遮光して保温した場合にはいずれも $335\text{ m}\mu$ における吸収の変化は認められなかった。また tRNA をあらかじめ N-エチルマレイミドによる修飾²⁹⁾ や I_2 酸化³⁰⁾ をほどこし、その $335\text{ m}\mu$ 付近の特徴的な吸収極大がなくなった試料にリボフラビンを加えて光照射してもそれ以上の吸収変化は観察されなかった。

大腸菌 tRNA に含まれる ^4Sur 残基がアミノ酸受容能になんらかの役割を演じているか否かに関してはすでに N-エチルマレイミド処理、過酸化水素処理、ヨード酸化、紫外線照射などの種々の方法で ^4Sur 残基のみを修飾し、その際のアミノ酸受容能を測定することにより検討されている。^{28b-30)} これらの結果によれば、 ^4Sur 残基が修飾されたことによる未分画および各種のアミノ酸に特異的な tRNA におけるアミノ酸受容能の消失率はほぼ $10-20\%$ 前後である。このことは、 ^4Sur 残基はアミノ酸受容能に直接関与する必須な残基とはいえないにしても、これが変化すればある程度の機能低下をもたらすことを示唆している。

したがって、tRNA をリボフラビン存在下で光照射した際に認められるアミノ酸受容能の低下の原因として、リボフラビンによる Gua 残基の光増感分解に加えて ^4Sur 残基の変化も考えなければならないと思う。

V. 光増感失活した tRNA の円偏光二色性

これまでの実験結果からリボフラビンにより光増感失活した tRNA においては構成塩基類のうちいくつか

28) a) M. Saneyoshi, S. Nishimura, *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 389 (1970); b) L. Shugart, *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 488 (1972).

29) J. Carbon, H. David, *Biochemistry*, **7**, 3851 (1968).

30) M. N. Lipsett, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4067 (1967).

Fig. 3. Effect of Irradiation with Visible Light on Ultraviolet Absorption of 4-Thiouracil Residues in tRNA

The reaction mixtures containing 12.66 A_{260} -units/ml of tRNA, 80 μ moles/ml of riboflavin and 17.1 μ moles/ml of NaCl in 5×10^{-3} M acetate buffer, pH 5.0, were irradiated as described in the text.

—: tRNA(light), tRNA+riboflavin(dark)
 ----: tRNA+riboflavin(light)

Fig. 4. Circular Dichroism of Intact and Irradiated tRNA

The reaction mixtures containing 6.33 A_{260} -units/ml of tRNA, 12.5 μ moles/ml of riboflavin and 17.1 μ moles/ml of NaCl in 5×10^{-3} M acetate buffer, pH 5.0, were irradiated for 60 min as described in Fig. 1.

—: tRNA(light), tRNA+riboflavin(dark)
 ----: tRNA+riboflavin(light)

光増感分解されていることが強く示唆されたので、つぎにその際、いかなる構造的変化が起きているのかしらべる目的で円偏光二色性の測定を行なった。

Fig. 4 に示したように、intact な tRNA では、265 $m\mu$ 付近に正の極大が存在し、237 $m\mu$ 付近に負の極大が存在する。ところが光増感失活した tRNA では正の極大が約 5/7 に減少するとともに 274 $m\mu$ 付近に移動した。また、正の極大のみならず、237 $m\mu$ 付近の負の極大も 243 $m\mu$ 付近に移動した。

これらの結果から光増感失活した tRNA では各塩基の stacking の減少、および水素結合の開裂が示唆される。また、すでにポリヌクレオチドの Gua-Cyt^{31a)} 塩基対は 235 $m\mu$ 付近に、ポリヌクレオチドの Ade-Ura^{31b)} 塩基対は 242 $m\mu$ 付近に負の極大を示すことが知られている³²⁾ ところから、Fig. 4 で示したように負の極大が 237 $m\mu$ から 243 $m\mu$ に変化したことは、tRNA 中の Gua 残基の分解に伴って Gua-Cyt の塩基対が開裂され、その結果、光増感反応に安定な Ade-Ura 塩基対の円偏光二色性に対する寄与が相対的に大きくなったことによるものではないかと思われる。

VI. 光増感反応後の tRNA のアミノ酸受容能

tRNA はリボフラビンによる光増感反応によって失活し、その構成塩基である Gua 残基が分解され、さらに ⁴Sur 残基の変化の可能性も強く示唆された。また、高次構造上の変化の可能性も示された。つぎにこの光増感反応を利用して tRNA を修飾し、ロイシン受容能以外のアミノ酸受容能におよぼす光増感反応の影響についても検討した。すなわち、リボフラビン存在下、tRNA を光照射し、種々の [¹⁴C]-アミノ酸を用いてその残存活性を測定した。

その結果は Table III に示したが、ここで検討した tRNA の各種アミノ酸受容能は光照射により低下することがわかった。われわれの用いた tRNA は未分画標品であり、ある特定のアミノ酸の受容にあずかる tRNA は必ずしも一つではなく、いくつか存在している場合もある³³⁾ ので、ここに得られた結果から直ちに各 tRNA の

31) a) Cyt: シトシン; b) Ura: ウラシル。

32) a) F.H. Wolfe, K. Oikawa, C.M. Kay, *Can. J. Biochem.*, **47**, 977 (1969); b) J. Brahms, *J. Mol. Biol.*, **11**, 785 (1965); c) H. Hashizume, K. Imahori, *J. Biochem. (Tokyo)*, **61**, 738 (1967).

33) a) B. Weisblum, S. Benzer, R.W. Holley, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1449 (1962); b) T.P. Bennet, J. Goldstein, F. Lipmann, *ibid.*, **53**, 385 (1965).

TABLE III. Amino Acid-Accepting Activity of tRNA Irradiated in the Presence of Riboflavin

Amino acid accepted	Remaining activity (%) ^{a)}	Amino acid accepted	Remaining activity (%) ^{a)}
Tryptophan	92.0±2.4	Tyrosine	66.0±3.4
Histidine	89.8±5.4	Isoleucine	60.3±3.8
Cystine	85.2±3.1	Threonine	59.0±2.7
Alanine	78.8±1.7	Arginine	60.2±2.0
Valine	74.6±2.2	Leucine	58.1±2.7
Lysine	73.0±2.9	Serine	59.0±4.0
Glycine	72.4±3.0	Proline	53.2±2.0
Aspartic acid	66.0±3.3	Phenylalanine	50.0±0.9

The reaction mixtures were irradiated for 5 min as described in Fig. 1. Irradiated samples were assayed for various amino acid-accepting activities as described in the text.

a) The amino acid-accepting activity of intact tRNA for each amino acid was defined as 100.

光増感失活の受け易さを知ることはできない。将来、特異性の単一な tRNA を用いて光増感失活の受け易さと一次構造との関係を明らかにしたいと考えている。

考 察

大腸菌 tRNA はリボフラビンと酸素の存在下で可視光線を照射すると、そのアミノ酸受容能を失う (Fig. 1, Table III). 光増感失活した tRNA では、その主要構成塩基である Gua 残基の分解が選択的に起っている (Table II). また、⁴Sur 残基の分解の可能性も強く示唆される (Fig. 3).

tRNA の失活の原因として、これら残基の分解とそれに伴って誘起されるであろう塩基の stacking の減少および水素結合の開裂などの高次構造の変化などが考えられる (Fig. 4).

なお、著者らはすでに 5'-グアニル酸の光増感分解生成物の一つとして 5'-イノシン酸を、³⁴⁾ s⁴U の光増感分解生成物の一つとしてウリジンを同定している。²⁷⁾ tRNA 中の Gua および ⁴Sur 残基の光増感分解の際にも同様な反応が起っている可能性があるがこれらは今後の検討に待たねばならない。

また、リボフラビン存在下のこの光増感反応により、他の微量塩基類、7-メチルグアニン、1-メチルグアニンおよび 2-チオ塩基誘導体の分解の可能性も考えられるので今後この点も検討する必要がある。

一方、はじめに触れたように NAD などの低分子の Ade 誘導体では、リボフラビンにより分子中の Ade 残基が、光増感分解され、^{10c,d)} その生物活性を失うことが知られている。^{10a,b)} したがって、tRNA の光増感失活においても、同様に分子中の Ade 残基が分解されることが予想されたが、Table II に示したように、tRNA のアミノ酸受容能がほとんど失われた時点においてさえ、Ade 残基の分解を認めることができなかった。

NAD のようなオリゴヌクレオチドの場合はその空間構造も比較的簡単であり、Ade 残基以外に光増感反応を受ける部分もないので、Ade 残基が光増感分解を受けるが、tRNA のようなポリヌクレオチドの場合には空間構造も複雑であり、また Ade 残基以外に比較的光増感反応を受け易い Gua 残基も含まれているために本実験条件下では Gua 残基のみの光増感反応が起るのではないかと考えられる。なお、リボフラビン存在下で DNA を光照射した場合にも、まず Gua 残基のみの光増感分解が起り、これがほとんど分解された後始めて Ade 残基の分解が起ることが認められている。³⁵⁾

結 論

1) リボフラビンと酸素存在下において大腸菌 tRNA に可視光線を照射すると tRNA はそのアミノ酸受容能を失う。

2) 光増感失活した tRNA では、その主要構成塩基である Gua 残基の分解が選択的に起っていることを確認した。また ⁴Sur 残基の分解の可能性も強く示唆された。tRNA の失活の原因として、これら残基の分解と、そ

34) K. Uehara, T. Hayakawa, *J. Biochem.* (Tokyo), **70**, 873 (1971).

35) K. Uehara, T. Mizoguchi, S. Hosomi, *J. Biochem.* (Tokyo), **71**, 811 (1972).

れに伴って誘起されると考えられる塩基の stacking の減少および塩基対の開裂などの高次構造の変化などが考えられる。

3) リボフラビンにより Gua のみならず Ade 誘導体が光増感分解されることが知られているが, tRNA においては, そのアミノ酸受容能がほとんど失われた時点でさえ, Ade 残基の光増感分解は認められなかった。

謝辞 本研究を進めるに当り, 大腸菌 B 株を分与いただいた財団法人醸酵研究所, Packard TRI-CARB 液体シンチレーションカウンターを貸与いただいた国立療養所刀根山病院, 日本分光旋光分散自記記録計を貸与いただいた大阪大学理学部 奥貫研究室, また, 実験に当ってご協力いただいた河田恵美子, 上田久枝, 村井喜代子の三学士に深謝いたします。