

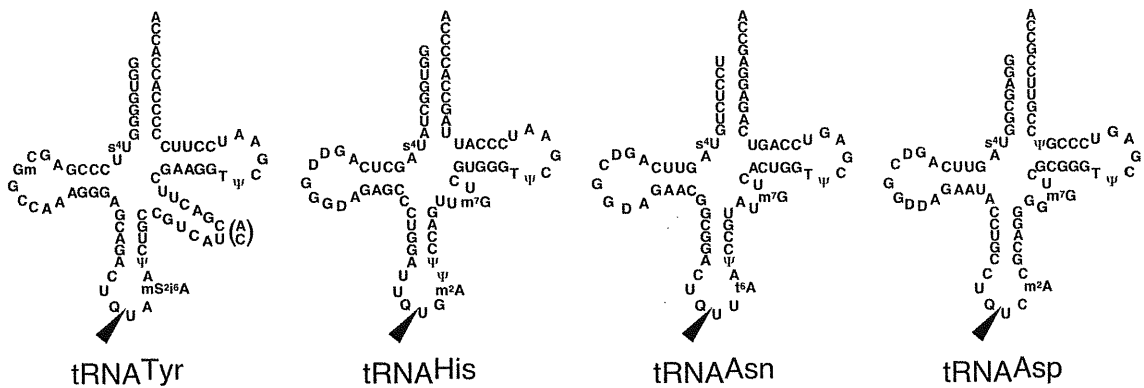
論文の内容の要旨

論文題目 tRNA を標的とする毒素タンパク質の
 作用機構と応用に関する研究

氏 名 小 川 哲 弘

生物は、様々な手段を用いてそれぞれのニッチを守っている。微生物における「手段」とは、例えば抗生物質の生産や、バクテリオシンと呼ばれる抗菌作用を示す一群のタンパク質の生産である。本研究テーマであるコリシンは、大腸菌および近縁細菌が持つ Col プラスミドにより生産されるバクテリオシンであり、「他の大腸菌に対して殺菌活性を示す」として定義される。ビタミン B₁₂ の取り込みに必須な BtuB レセプターを介して感受性菌内へと侵入するコリシンを E 群コリシンと呼んでいる。E 群コリシンには、これまでに(1)イオンチャンネル型、(2)DNase 型、(3)16S-rRNA を切断してタンパク合成を止める RNase 型、の三つの作用機構が知られていた。著者は、修士論文において、これまで殺菌のメカニズムが明らかにされていなかったコリシン E5 が、*in vitro* および *in vivo* で感受性菌の tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} を切断することを明らかにし、作用機構として第 4 番目の「tRNase 型コリシン」の存在を示した。コリシン E5 の基質 tRNA には共通してアンチコドン 1 文字目にキューイン (Q 塩基) という修飾塩基が存在し、切断はこのキューインの結合したリボースの 3'側で起こる。大腸菌細胞内には、およそ 50 種類もの tRNA 分子が存在する。このような中で、コリシン E5 がどのようにして特定の基質 tRNA のみを認識、切断するか大変興味深い。それぞれの tRNA を特異的に認識する酵素の代表例はアミノアシル tRNA 合成酵素である。この一群の酵素は、分子量 4 万~26 万であり、アンチコドンやディスクリミネーター塩基等の数塩基を厳密に認識して、正しい tRNA を見分けている。一方、コリシン E5 の C 末端活性ドメイン

(E5-CRD と呼ぶ) は分子量 1 万程度であり、アミノアシル tRNA 合成酵素のような複雑な基質認識は期待出来ない。そこで、本論文では、コリシン E5 の基質認識機構の解明を目指した。また、コリシン E5 は tRNA という、全ての生物を通じて普遍性の高い分子を切断する「細胞致死活性因子」であり、近年話題となっている Drug Delivery System との組み合わせにより、癌細胞等を標的とした創薬への利用が考えられる。こうした応用的な利用方法を探索する第一段階として、真核細胞内で E5-CRD を発現させ、それに対する細胞応答を調べた。



コリシンE5の切断する大腸菌tRNA (矢印は切断部位を表す)

1. コリシン E5 の持つ tRNA 切断活性と殺菌活性

コリシン E5 は、1982 年に Mock や Pugsley により、感受性菌のタンパク合成を阻害することが示唆されていた。そこで、E5-CRD を精製し、これが *in vitro* でタンパク合成阻害活性を示すかどうかを調べた。E5-CRD は、大腸菌由来のタンパク合成系を阻害し、この阻害活性は、インヒビターである ImmE5 の添加により抑制された。次に、コリシン E5 の tRNA 切断活性が、殺菌活性の原因となっているかどうか調べた。段階的に希釈したコリシン溶液を加えて大腸菌を培養した後、生菌数をコロニー形成数から計算して生菌数を調べる一方、集菌した菌体から RNA 画分を抽出した。この RNA に対し、基質 tRNA に相補的なプローブを用いてノザン解析を行い、細胞内の tRNA の状態を追跡した。結果は、生菌数に影響が開始する限界より低いコリシン濃度で tRNA^{Tyr} と tRNA^{Asp} の切断が観察された。尚、基質 tRNA の、切断活性に対する感受性には差があり、tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp} は感受性が高いが、tRNA^{His}, tRNA^{Asn} は低く、生菌数に影響が開始する頃から切断片が確認され始めた。以上の結果から、コリシン E5 による tRNA の切断と生菌数との間には高い相関が見られることが示され、コリシン E5 の殺菌活性の原因が tRNA 分解であると判断した。

2. コリシン E5 の酵素学的性質および基質上の認識残基の同定

E5-CRD は、tRNA^{Tyr} のアンチコドンステム/ループを擬して作製した minihelix (YMH と呼ぶ)を切断する。そこで、YMH を用いて E5-CRD の酵素学的性質を調べた。E5-CRD は EDTA を添加しても十分活性があることから、二価カチオンは要求しないことが分かった。また、至適 pH 条件はアルカリ側に偏っていることが分かった。

次に、E5-CRD の認識する tRNA 上の残基の同定を試みた。E5-CRD の基質 tRNA に共通する塩基配列はアンチコドンループ内の UQU である。これらの tRNA に修飾塩基キューインを導入する酵素である tRNA グアニトランスグリコシラーゼは、前駆体 tRNA のアンチコドンループ内の UGU 配列を認識する。そこで、E5-CRD も同じ UGU 配列を認識する可能性を考え、YMH のループ内の UGU 配列に変異を導入し、その切断感受性から、認識に必須な塩基を調べた。その結果、UGU のうち、GU 配列を変化させると切断されなくなった。また、tRNA^{Lys} のアンチコドンステム/ループを擬した minihelix に GU 配列を導入したところ、E5-CRD の切断を受けた。以上より、GU 配列が認識に必須であることが明らかになった。

3. コリシン E5 の切断活性に影響を与える因子について

tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} のアンチコドンステム/ループを擬した minihelix (順に GGYMH, GGHHMH, GGNMH, GGDMH と呼ぶ) を作製し、これらを基質として E5-CRD の活性を調べた。結果は、GGYMH>GGDMH>GGHHMH>GGNMH の順に、活性の低下が見られた。この原因が、E5-CRD の持つサブサイトによると考え、サブサイトと相互作用する可能性がある GU の両側の塩基に対し変異を導入し、これらの変異体 minihelix に対する E5-CRD の活性を調べることにした。まず、YMH の GU 配列の 5'側の塩基を、他の塩基に置換した変異体 minihelix(YMH(U7A), YMH(U7G), YMH(U7C))を作製し、活性を調べた。その結果、GU の 5'側にピリミジン塩基が存在すると高い活性を示した。一方、プリン塩基の場合、活性は著しく低下した。次に、GU の 3'側の塩基 (アンチコドン 3 文字目に相当) を、他の塩基に置換した変異体 minihelix(YMH(A10G), YMH(A10C), YMH(A10U))を作製し、同様に活性を調べた。その結果、A>C>G>U の順で活性が低下した。前述の天然型 minihelix において、GGYMH>GGDMH>GGHHMH>GGNMH の順に活性が低下することを示したが、これらのアンチコドン 3 文字目はそれぞれ A, C, G, U であり、アンチコドン 3 文字目の塩基が基質の感受性の決定因子になっている可能性がある。また、YMH とループ部分の配列は同一であり、ステムを作らないようにデザインした minihelix(YMHL)と YMH に対する E5-CRD の活性を比較したところ、ステムを形成する YMH の方が高いことが分かった。

4. コリシン E5 の最小基質の同定、およびオリゴヌクレオチドに対する反応速度解析

様々なジヌクレオチドを作製し、E5-CRD と反応させた。その結果、GpUp が切断されることが分かった。これに対し、3'末端にリン酸基を持たない GpU は、今回の条件では切断は見られなかった。GpUp を基質とし、各 pH 条件における反応速度を解析したところ、pH の上昇に応じて、 k_{cat} 値の上昇が見られた。一方、 K_m 値には著しい変化は見られなかった。 k_{cat}/K_m に基づく曲線は、前述の *minihelix* の反応進行度に基づいて描いた曲線とほぼ一致した。

次に、GpUp の両側に塩基を伸ばしたオリゴヌクレオチドに対する反応速度を解析したが、GpUp の両側の塩基は反応速度論量に大きな影響を与えなかった。このことから、GU の両側の塩基に対するサブサイトは存在しないと考えられる。一方、UpGpUp の k_{cat}/K_m 値は、UpGpU のものと比較すると約 30 倍大きい。これは、GpUp と GpU との間に見られる結果と一致する。これより、U の 3'末端のリン酸基に対するサブサイトが存在する可能性がある。

5. E5-CRD の酵母細胞内での発現

大腸菌と同様、酵母の tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} もアンチコドンに GU 配列を持つ。実際、E5-CRD は、*in vitro* で酵母由来の上記の tRNA を切断することから、E5-CRD は酵母に対して致死活性を示す可能性がある。そこで、E5-CRD と ImmE5 とを、独立のプラスミドに導入し、これらのプラスミドを用いて酵母を形質転換した。E5-CRD はメチオニン非存在下で、そして ImmE5 はガラクトースの添加により活性化するプロモーターで発現制御を行った。結果は、E5-CRD を発現すると、形質転換酵母の生育が阻害された。また、ImmE5 を同時に発現することにより、生育が回復した。一方、活性中心変異体 E5-CRD を発現させた株では生育に全く影響は見られなかった。また、野生型 E5-CRD を発現している酵母内の tRNA の状態をノザン解析により調べたところ、tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} の切断が見られた。以上のことから、E5-CRD は酵母に対して生育阻害効果を発揮することが示され、大腸菌のみならず、真核細胞を含めた様々な宿主に対しても作用しえりと結論した。将来的には、標的細胞へ特異的に送り込み、不要な細胞を消失させる治療技術への応用が期待される。