



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

酵母チロシンtRNAの分子識別部位の同定とその改変

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西川, 一八 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/574

研究成果：

要約

(1) 大腸菌 RNase P の構成成分である "C5 タンパク質" と "M1 RNA" をそれぞれ独立に大量調製し、*in vitro* で再構成して「試薬量」の RNase P 標品を確保するための方法を確立した。"C5 タンパク質" については His-tag 付きでクローン化した遺伝子から大量発現し、アフィニティークラムにより精製した。"M1 RNA" は遺伝子を鋳型に T7 RNAポリメラーゼで転写して作製した。

(2) 5'-末端側に extra 配列を持つ酵母チロシン tRNA 遺伝子 DNA (野生型・変異型) を合成し、変異導入のための適当なプライマーセットと共に PCR して変異チロシン tRNA 前駆体の遺伝子 DNA を作成した。これを鋳型として T7 RNAポリメラーゼで転写して変異チロシン tRNA 前駆体を作製した。これを (1) の RNase P を用いて切断して一連の変異チロシン tRNA を作製し、その塩基配列を解析して変異個所を確認した。

(3) これらの変異チロシン tRNA につき酵母チロシル-tRNA 合成酵素 (TyrRS) によるチロシン受容能を測定し、 k_{cat}/K_m を求めて正のアイデンティティー要素を確認した。

(4) 酵母チロシン tRNA を大腸菌生体外タンパク質合成系で使おうとすると、大腸菌リシル-tRNA 合成酵素 (LysRS) により僅かにミスアシル化を受けることが判明したので、このミスアシル化を防ぐこと、即ち LysRS に対する負のアイデンティティー要素を決定することにした。

(5) 大腸菌リシン tRNA の配列を参考に (2) と同様の方法でアンチコドンステム内の 3 つの A-U 対を G-C 対に改変したものやアクセプターステム内の数カ所に変異を入れた tRNA を作成し、これらにつき酵母 TyrRS によるチロシン受容能と大腸菌 LysRS によるリシンの誤受容能を測定した。

(6) その結果、アンチコドンステム内の 3 つの A-U 対を G-C 対に改変した変異体はチロシン受容能を保持したまま劇的にリシンの誤受容が減少していること、すなわちこれらの変異は大腸菌リシル-tRNA 合成酵素に対する負のアイデンティティー要素であり得ることが判明した。

(7) 酵母チロシル-tRNA 合成酵素 (TyrRS) に遺伝子工学的改変を導入し、本来は基質にならない 3-置換チロシンアナログを基質にできる改変型酵素の取得に成功した。

(8) 酵母チロシン tRNA のアンチコドンと mRNA のコドンに Watson-Crick 塩基対以外の新規塩基対を導入し、新しい塩基対合ルールを開拓することを試み、一応の成功をみた。

上記 (1)~(6) については、英語論文は現在準備中であるので以下に和文で詳しく述べる。(7)、(8) については既に学会誌に発表済みであるのでそのコピーを添付する。