

Q β レプリカーゼの認識する鋳型 RNA の構造について

川崎医科大学 生化学教室

西原 徹

(平成 3 年 9 月 6 日受理)

Structure of template RNA recognized by Q β replicase

Tohru NISHIHARA

Department of Biochemistry,

Kawasaki Medical School,

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on September 6, 1991)

概 要

今日までに明らかにされてきた Q β レプリカーゼにより複製される RNA について概観した。さらにレプリカーゼにより認識される鋳型 RNA の塩基配列や二次構造について論じた。さらにレプリカーゼと鋳型との結合物の可能な一つのモデルを示した。

Abstract

I have summarized RNAs which are replicated by Q β replicase. Furthermore I have discussed the RNAs recognized by the replicase. And also I have presented a model for template recognition by Q β replicase.

1. はじめに

Q β レプリカーゼは RNA フェージ Q β の感染した大腸菌から分離された RNA 複製酵素である。1965年に分離されて以来、この酵素は鋳型となる RNA を選別する鋳型特異性があることでも注目された¹⁾。自らをコードとする Q β フェージ RNA は鋳型に用いられるが、それ以外の試みられたどの RNA も鋳型に用いられなかった¹⁾。

その後多数の RNA フェージが分離、分類されて、Q β フェージと同じグループのフェージも多数分離されて、それらのフェージ RNA に鋳型活性があることが確かめられてきた²⁾³⁾。

一方外部から鋳型 RNA を加えない酵素反応系の反応液から、約70から200ヌクレオチドの長さの自己複製する RNA が数種類分離され、その RNA の一次構造が明らかにされてきている⁴⁾⁻⁹⁾。

これらの一次構造の明らかにされた鋳型になる RNA の構造について概観し、レプリカーゼ

の認識する RNA の構造について検討を行った。

2. Q β レプリカーゼにより複製される RNA

Q β ファージから分離された Q β RNA が鋳型になるほかに, Q β ファージと同じ III-グループのファージ RNA は鋳型になり複製される²⁾³⁾。また似た性質を持った SP ファージを含む IV-グループのファージ RNA も複製される³⁾¹⁰⁾。しかし, この SP-RNA の複製の詳細な機構は明らかでない。この Q β RNA のプラス (+) 鎖の他にマイナス (-) 鎖も鋳型に用いられるが, (+) 鎖を鋳型に用いるときは宿主因子 I を必要とし, 他の鋳型を用いるときと異なっている¹⁾。また合成ポリマーである Poly(rC), Poly(dC) やシチジル酸を含む合成ポリマーも鋳型に用いることができるが, 相補鎖が合成されるだけで合成は停止する¹⁾。

一方, 通常条件では鋳型にならない RNA も反応系にマンガンを含むときには相補鎖を合成することができる。またプライマーを用いたり, 3' 側にシチジル酸残基 (またはデオキシシチジル酸残基) を伸ばすことによっても相補鎖の合成を可能にしている¹⁾。

また, 外部から鋳型を加えないで, Q β レプリカーゼの反応を行わせることによって分離された, 小さい RNA が数種類知られており, 一次構造が明らかにされてきている⁴⁾⁻⁹⁾。それらを Fig. 1 に示した。

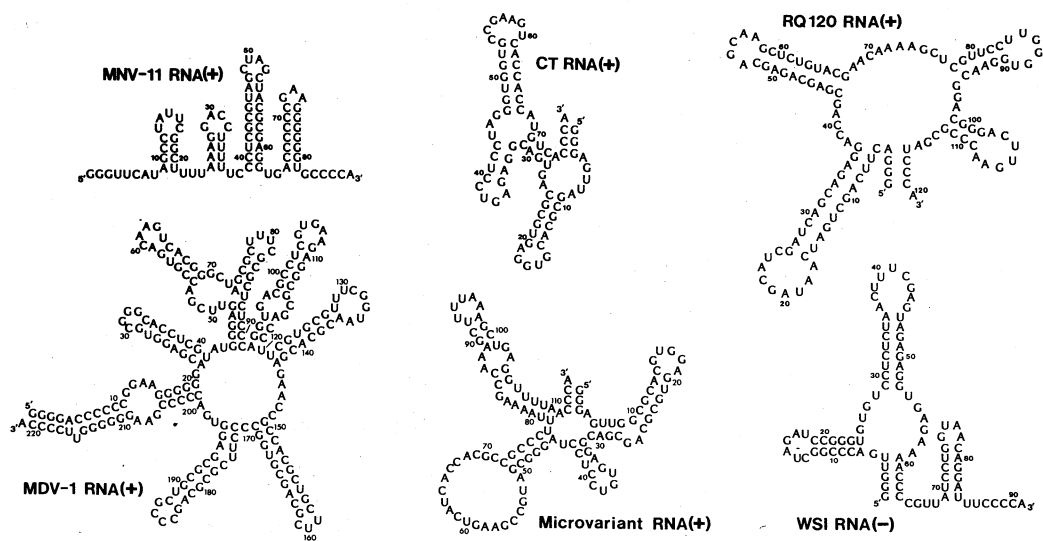


Fig. 1. Nucleotide sequence of some selfreplicating RNA by Q β replicase: MDV-1 RNA (Mills ら⁴⁾), Microvariant RNA (Mills ら⁵⁾), WSI RNA (Schaffner ら⁶⁾), MNV-11 RNA (Biebricher ら⁷⁾), CT RNA (Priano ら⁸⁾) and RQ120 RNA (Munishkin ら⁹⁾).

3. Q β レプリカーゼの認識する鋳型 RNA の構造

Fig. 1 に記した RNA はすべて自己複製する小さい RNA で約70から200ヌクレオチドより

成る。いずれも分子内に多くのステム、ループ構造を持っていることがわかる。どの RNA 分子を見ても共通に存在するヌクレオチド配列は 5', 3' の両末端にある短い配列以外には見当たらない。

Template RNAs		Non-template RNAs	
..GGGGGAUCUGCUUUGCCUCUCUCUCCCAOH (+)	Q β	..GUAACUAGCUGCUUGGCUAGUUACCACCCAOH (+)	MS2
..GUGAGGUGACCCCUAAAGGGGGUCCCAOH (-)		..UGACGAGACCCCGAAAGGGGUCCACCCAOH (-)	
..GACACACCCGGAUCUAGCCGGGUCAACCCAOH (+)	WSI	..CCGCCUCUCUCCGAGGGUCAUCGGAACCAOH	TYMV
..CCCCUUUAUCUGGUAACAGGAUUUCCCAOH (-)		..CGAAUCCCCGUUACCCCGGUAGGGGCCAOH	TMV
..GCGAGGUGACCCCGAAGGGGGUUCCCAOH (+)	MDV-1	..AGGGAAACCGCGGUUGGAUCCUCCUUAOH	16S rRNA
..CACCUGUCCCCUUCCGGGGGUCCCAOH (-)			
..CAAAGCUUUUAAAGCUGAGGUUUUACCCAOH (+)	Microvariant		
..CGCGUGCACUCCAGUGCGCAACUCCCAOH (-)			
..GUGUGCGGAAGUCACCACCAUGUCACCCAOH (+)	CT		
..GAACGGACGGGACUUGAACCCGGGAUCCCAOH (+)	RQ120		
..GAUCGAUCUAUUGAUCAGCUGAAGUCCCAOH (-)			
..CGAGGUGACCCCGAAGGGGGUCCCAOH (+)	MNV-11		
..CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	Poly(C)		

Fig. 2. 3'-terminal sequences of various RNAs with or without template activity for Q β replicase. Non template RNAs (Meyer ら¹¹⁾), Q β RNA (Weissmann ら¹⁵⁾) and Fig. 1.

Q β レプリカーゼの鋳型になる RNA の構造をその鋳型上で RNA 合成が開始される 3' 側の塩基配列を Fig. 2 に示した。ここには鋳型にならない RNA も同様に記した。このうち鋳型になる RNA の 3' 側に共通に存在する配列は CCC または CCCC であることがわかる。しかしこの CCC 配列は鋳型にならない MS2, TMV にも存在している。従ってこの配列だけが、Q β レプリカーゼが鋳型を認識して鋳型特異性を担っているとはできない。このレプリカーゼが Q β RNA を認識して、結合する部位が RNA 中央部に約 300 ヌクレオチドの長さにわたって存在しており (M 部位), この内にはいくつかのステム、ループ構造が作られている¹¹⁾。また Q β RNA の 3' 側を含む約半分に切断された断片も、この上述の M 部位を含み、レプリカーゼの鋳型として用いられる^{11, 12)}。いずれにしろ、RNA 合成の開始のためには CCC を含む 3' 末端側の RNA を認識して、その部位を鋳型にして RNA 合成を開始すると考えてよいであろう¹¹⁾。そのときに、3' 側の鋳型を適切な部位に結合させて安定化させるための 3' 末端以外の構造が必要であろう。そのためには特定のヌクレオチド配列よりはむしろステム、ループを含む二次構造が結合に関係していると考えられる。ステム、ループをいくつも含む Q β RNA 中の M 部位がそのような安定化に関与していると考えられるが、直接の証拠は得られていない。また、鋳型になる 221 ヌクレオチドよりなる MDV-1 RNA では Q β レプリカーゼは RNA の中央部分に結合することが明らかにされている¹²⁾。

レプリカーゼと Q β RNA のいくつかの結合実験を基にして、Weissmann は Q β レプリカーゼが Q β RNA を認識するモデルを提出している¹³⁾。このモデルは二つの認識部位を想定している。また、Küppers と Sumper は 2 カ所の C-連鎖を含む部位がレプリカーゼによって認識されるモデルを示している¹⁴⁾。しかし、CT RNA (+) 鎖 (Fig. 1) には 2 つ目の C-連鎖がみられないなど、このモデルをすべてに当てはめるにはやや無理があると考えられる。また Weissmann のモデルは、Q β RNA にレプリカーゼが結合するループをいくつも含む、大きな M 部位などの存在を基にして作成されたものであり、大きな構造体の場合には部位を 2 つに分ける意

味は大きいと考えられる。しかし、小さな自己複製する RNA については、より詳しい検討が可能なので、違った面を考慮したモデルの作成を試みた。そのために、WSI RNA (-) 鎖 (Fig. 1) を切断した RNA の 3' 末端側の鋳型活性を調べた。その結果、5' 側から 21 番目まで切断したものでは、鋳型活性を保持していたにもかかわらず、43 番目まで切断されて、中央のループを失った 3' 側 RNA は鋳型活性がみられなかった (未発表)。このことから 3' 末端に近いループの他に中央のループ構造もレプリカーゼの鋳型認識に関与しているのではないかと考えられる。小さな鋳型になる RNA についての結果を基にして、Fig. 3 にレプリカーゼと鋳型との結合の一つのモデルを示した。

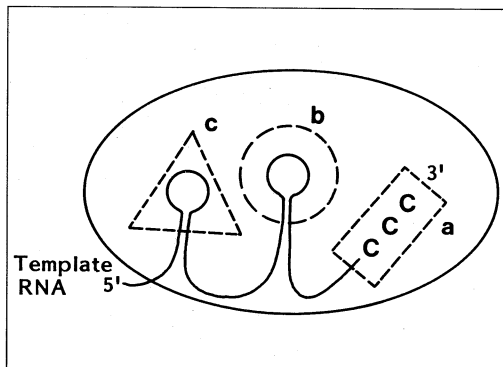


Fig. 3. Model for template recognition by $Q\beta$ replicase.

以上、 $Q\beta$ レプリカーゼの複製する RNA とその鋳型認識について記した。モデルについては実験的に不十分な点が多いのでさらに検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) Blumenthal, T. and Carmichael, G.G. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48: 525-548.
- 2) Haruna, I., Nishihara, T. and Watanabe, I. (1967) *Proc. Japan Acad.* 43: 375-377.
- 3) Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Itoh, Y.H., Yamane, K. and Watanabe, I. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 2022-2024.
- 4) Mills, D.R., Kramer, F.R. and Spiegelman, S. (1973) *Science* 180: 916-927.
- 5) Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara, T. and Spiegelman, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 4252-4256.
- 6) Schaffner, W., Rüegg, K.J. and Weissmann, C. (1977) *J. Mol. Biol.* 117: 877-907.
- 7) Biebricher, C.K. (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52: 299-306.
- 8) Priano, C., Kramer, F.R. and Mills, D.R. (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52: 321-330.
- 9) Munishkin, A.V., Voronin, L.A. and Chetverin, A.B. (1988) *Nature* 333: 473-474.
- 10) Nishihara, T., Haruna, I., Yamaguchi, N. and Watanabe, I. (1972) *Nature New Biology* 238: 141-142.
- 11) Meyer, F., Weber, H. and Weissmann, C. (1981) *J. Mol. Biol.* 153: 631-660.
- 12) Nishihara, T., Mills, D.R. and Kramer, F.R. (1983) *J. Biochem.* 93: 669-674.
- 13) Weissmann, C. (1974) *FEBS Lett. (Suppl.)* 40: S10-S18.
- 14) Küppers, B. and Sumper, M. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 2640-2643.
- 15) Weissmann, C., Billeter, M.A., Goodman, H.M., Hindley, J. and Weber, H. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42: 303-328.