

研 究 報 告 書(公開)

「RNA末端合成プロセス装置の分子基盤」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：富田 耕造

1. 研究のねらい

DNA からRNAへと遺伝情報が転写された後、RNAは多岐にわたるプロセスを経て機能しうるRNAへと成熟化されます。この成熟化プロセスにおいて、多くのRNAの3'末端にはDNA上にコードされていない配列が鋳型非依存的RNA合成酵素によって合成付加されます。このRNA3'末端配列は、RNAの翻訳、分解、品質管理等、遺伝子発現に重要な役割をはたしています。本研究では、鋳型非依存的RNA合成酵素(CCA付加酵素、ポリA付加酵素)に注目し、これらのRNA合成酵素が核酸の鋳型を用いずに特定の配列を付加する分子機構を解明し、核酸の鋳型としての役割が蛋白質へと写し取られた過程の分子進化基盤を探ることを目指します。また、RNAの3'末端領域の配列は、RNAをゲノムとして有する太古生命体においては、自分自身のRNAゲノムの複製、保存のために必要な現在のテロメアとしての機能を有していたという仮説があります。したがって、RNAの末端へ鋳型非依存的にRNAを合成付加する酵素は現在のテロメラーゼに相当すると考えることもできます。本研究では、これら仮説に基づき、ゲノムRNAの3'末端領域を認識して、自分自身のゲノムの複製、転写を開始するRNAウイルス由来鋳型依存的RNA合成酵素(Q β レプリカーゼ)にも注目し、このRNA合成酵素のRNA合成の分子メカニズムを解明し、ウイルスRNA合成酵素複合体の進化基盤を探ることをも目指します。

2. 研究成果

鋳型非依存的RNA合成酵素の分子機構

tRNAの3'末端に普遍的に存在するCCA配列(位置:74、75、76)はCCA付加酵素によって核酸の鋳型を用いずに合成、付加されます。CCA付加酵素は二つのクラスに分類され、古細菌型CCA付加酵素はクラスI、真正細菌、真核生物型CCA付加酵素はクラスIIに属します。クラスIとクラスII CCA付加酵素は全く同じ反応を触媒するにも関わらず、そのアミノ酸配列の相同性は低いことが知られています。また、真核生物のポリA付加酵素はクラスIIに、真正細菌のポリA付加酵素はクラスIIに属します。クラスIIに属するCCA付加酵素とポリA付加酵素はそのアミノ酸配列、特にN末端側の25KDa領域の相同性が高く、アミノ酸配列からでは、その酵素活性を予測するのが不可能です。本研究では鋳型非依存的RNA合成酵素に関して、以下の[1]～[3]の研究を行いました。

[1] クラスI CCA付加酵素が正しい配列合成を維持する分子メカニズム

クラスI CCA付加酵素の特異性の切り替えの分子基盤は、これまで研究者らおよびアメリカのグループによって精力的に研究が進められ、その動的な反応分子基盤は明らかにされています。クラスI CCA付加酵素では鋳型がRNAと蛋白質複合体の共同で形成されていることが明らかになりました。具体的にはATPの6位およびCTPの4位のアミノ基がRNAのリン酸骨格と水素結合することによって部分的に認識されていることが明らかになりました。一方で、古くから、CCA付加酵素は間違ったヌクレオチドをRNAに付加した際に、間違ったヌクレオチドを除去する校正機構を有さないことが知られていました。しかし、CCA付加酵素が正しいヌクレオチドを選択する方法以外に、正しい配列(CCA)をもつ tRNA のみを生産する分子基盤は明らかにされていませんでした。

本研究では、クラスI CCA付加酵素とRNAの3'末端(74、75位)に変異を導入した tRNA の二者複合体、さらにその複合体にヌクレオチドを加えた三者複合体、合計十一種類のX線結晶構造解析を行い、さらに変異RNA(計二十種類)を用いた生化学的解析を行うことに

よって、CCA付加酵素が間違っただヌクレオチドを付加したときに、3'末端が間違っただ配列をもったtRNAが生産されないようにする忠実性維持の分子機構を明らかにしました。

クラスI CCA付加酵素はtRNAの74位に間違っただヌクレオチドを付加しても、それを間違いと認識できず、次の75位にCを付加してしまいます。これは、74位にC以外のヌクレオチドが存在しても、酵素は次の75位にCを付加できる活性型へ移行しうることにより起因することが構造的に明らかになりました。しかし、74、75位に間違っただ(C以外の)ヌクレオチドが付加されている場合には、RNAの末端構造がRNA合成が進行するために必要な活性型構造をとることができず、最後の76位へのAの付加反応が進行しないことが構造的に明らかになりました。すなわち、最終反応の際に、74、75位のヌクレオチド組成を酵素が認識していることが最後の76位へAを付加するために必要であることが明らかになりました。したがって、クラスI CCA付加酵素は、正しいヌクレオチドを特異的に選択的する以外に、合成されたRNAの3'末端配列を厳密にモニターし、間違っただ配列をもつRNAが合成できないような通常のDNA/RNA合成酵素とは全く異なっただ”Proofreading”機能を有していることを明らかにしました。なお、本成果はEMBO J (2008)に本研究者を論文責任者として発表を行いました。

[2] クラスII CCA付加酵素がRNA合成伸長、終結を規定する分子メカニズム

これまで、クラスII CCA付加酵素に関して、研究者らおよびアメリカのグループによって精力的に研究が進められてきました。アメリカのグループによって、クラスII CCA付加酵素単体、CTP、ATPの複合体構造が解析され、CTPもATPも同じヌクレオチド結合ポケットで認識され、CTP、ATPともに同じアミノ酸(AspとArg)とワトソン-クリック様水素結合を形成することによって認識が行われていることが示唆されました。また、研究者らによって、クラスIIのA付加酵素とtRNA、ATPアナログの三者複合体の構造が解析され、その結果、ATPはアミノ酸(Asp、Arg)とワトソン-クリック様水素結合を形成して認識されていることが明らかにされました。これらのことから、クラスII CCA付加酵素ではクラスIとは異なり、蛋白質がヌクレオチドの鋳型であると考えられました。しかしながら、クラスII CCA付加酵素の特異性切り替えの分子機構、酵素が付加するヌクレオチドの数を規定し、正しい数のヌクレオチドが付加された後反応を終結する分子機構は明らかにされていませんでした。そこで、A付加酵素と非常にアミノ酸配列の相同性が高く、進化的に近類のCCA酵素に注目し、その構造と機能を、研究者らが解析したA付加酵素と比較することによって、クラスII CCA付加酵素の分子機構を解明することを目指しました。

本研究ではクラスII A付加酵素と近類のCCA付加酵素単体およびCTP、ATPとの複合体のX線結晶構造解析を行い、構造を決定しました。高分解能でのクラスII CCA付加酵素の構造決定、および、A付加酵素とCCA付加酵素の三次元構造比較を元にしたキメラ酵素の生化学的、遺伝学的解析から、クラスII CCA付加酵素内の、付加するヌクレオチドの数、特異性を規定する部位、さらにRNA合成を終結させる部位を明らかにし、クラスII CCA付加酵素の分子機構を提唱しました。

アメリカのグループが報告していたように、ATPもCTPも酵素のヌクレオチド結合部位の同じアミノ酸によって認識されており、蛋白質性の鋳型によってヌクレオチド選択が行われていることが示唆されました。しかし、高分解能での構造解析から、活性触媒ドメイン内の可変ループが伸長してきたRNAの74、75位のCC配列を認識し、その結果、ヌクレオチド結合部位特異性を決定するアミノ酸のコンフォーメーションがATPのみに適したように固定化されて76位にAが付加されて、合成反応が終結することが明らかになりました。また、構造を基にしたA付加酵素とCCA付加酵素のキメラ酵素の遺伝学的、生化学的解析から、付加されるヌクレオチドの数、特異性は、ヌクレオチド結合ドメイン背後のヘリックス間水素結合と活性触媒ドメインとの動的な共同で行われていることが示唆されました。クラスII CCA付加酵素の鋳型は当初、蛋白質であると考えられてきましたが、今回の解析から、正確な分子機構はクラスIとクラスII CCA付加酵素では異なりますが、少なくともクラスII CCA付加酵素による76位へのA付加反応はRNAと蛋白質が共同的に特異性を決定していることが明らかになりました。また、特異性の切り替えは酵素の活性触媒ドメインとヌクレオチド結合ドメインの動的な共同によって行われていることが明らかになりました。なお、本成果はEMBO J (2009)に本研究者を論文責

任者として発表を行いました。

[3]クラスII ポリア付加酵素の基質特異性を規定する分子メカニズム

クラスIIのCCA付加酵素と、ポリA付加酵素はそのアミノ酸配列の相同性が高く、CCA付加酵素においてCTPとATPの認識に関与するアミノ酸(Asp、Arg)もポリA付加酵素では保存されています。しかし、ポリA付加酵素が、CTPを基質としてもちいず、ATPのみを特異的に基質として認識する分子機構は明らかにされていませんでした。そこで、クラスIIのポリA付加酵素の構造を決定し、それをこれまで解析されたCCA付加酵素のそれと比較してCCA付加酵素とポリA付加酵素のヌクレオチド選択の分子基盤の違いを明らかにすることを目指しました。

本研究ではクラスII 真正細菌由来のポリA付加酵素単体およびATPとの複合体のX線結晶構造解析を行い、構造を決定しました。この構造をクラスII CCA付加酵素の構造と比較、および生化学的解析を行うことにより、ポリA付加酵素のヌクレオチド特異性の分子基盤、クラスII酵素群の特異性の違いの分子基盤を明らかにしました。

クラスII ポリア付加酵素の活性触媒ドメイン、ヌクレオチド結合部位の構造はCCA付加酵素のそれと非常に似通っていましたが、ヌクレオチド結合部位内のヌクレオチド認識に関わるアミノ酸(Asp、Arg)の構造が異なっていました。ポリA付加酵素ではこれらのアミノ酸が、活性部位の他のアミノ酸と分子内水素結合を形成し、ヌクレオチド結合部位が固い構造をとっていました。その結果、ヌクレオチド結合ポケットの形と大きさがATPのみに適したものになっており、保存されたふたつのアミノ酸のうちひとつのアミノ酸(Arg)のみがヌクレオチドの塩基認識に用いられていることが明らかになりました。さらに、ポリA付加酵素の、固いヌクレオチド結合ポケット構造の維持は、ヌクレオチド結合ドメインとRNA結合ドメインとの相互作用によることが示唆されました。また、ポリA付加酵素のC末端側領域が、CCA付加酵素とは異なり一定の構造をとりえないRNA結合部位であることを明らかにし、この領域は、ポリA付加酵素があらゆるRNAをプライマーとして用いて、RNAプライマーをRNA合成過程において転移させる機能を有することを明らかにしました。

本研究から、ポリA付加酵素のA付加の特異性とCCA付加酵素のtRNAの76位のA付加の特異性の分子基盤が異なることが明らかになり、ポリA付加酵素では純粋な蛋白質が鋳型となっていることが明らかになりました。なお、本成果はStructure (2011)に本研究者を論文責任者として発表を行いました。

鋳型依存的RNA合成酵素に関する研究

Q β ウイルスは一本鎖のRNAをゲノムとして有するウイルスであり、Q β レプリケースによってそのRNAゲノムの複製・転写を行います。Q β レプリケースはQ β ウイルスゲノムRNA上にコードされているRNA依存的RNA合成酵素(β サブユニット)、宿主由来の翻訳伸長因子EF-Tu、EF-Ts、およびリボソームタンパク質S1から構成されます。Q β レプリケースによるRNA複製・転写活性には β サブユニットと宿主由来の翻訳因子EF-Tu、EF-Tsとが三者複合体を形成することが必要であることが知られています。しかしながら、これらの翻訳因子の、翻訳伸長過程における確立した機能を越えた役割、すなわち、RNA合成における役割は明らかにされていませんでした。本研究では以下の[4]の研究を行いました。

[4]ウイルス由来RNA合成酵素(Q β レプリカーゼ)の複合体形成分子メカニズム

Q β レプリケースのコア複合体(β サブユニット、宿主由来の翻訳伸長因子EF-Tu、EF-Ts)の複合体形成分子機構を解明するために、コア複合体のX線結晶構造解析を行い、構造を決定しました。この解析から、EF-Tu、EF-Tsは β サブユニットと疎水的相互作用し、その結果、コア複合体の中の β サブユニットの活性触媒コアの構造が維持されていることが明らかになりました。また、生化学的解析から、EF-Tu、EF-Tsと β サブユニットの相互作用は、コア複合体形成に必要であることを示し、EF-Tu、EF-Tsがシャペロン機能を有していることを明らかにしました。鋳型RNA、合成されたRNA、付加されるヌクレオチドのコア複合体活性部位へのモデル構築から、ヌクレオチドおよび鋳型RNAの活性部位へ通じるトンネルを同定しました。また、このモデルから、コア複合体内のEF-Tuが、RNA合成のプロセッシブなRNA伸長反応を促進する“Modulator”としての、翻訳過程での役割を越えた、新たな

機能を有する可能性を提示しました。本成果はPNAS(2010)に本研究者を論文責任者として発表を行いました。

3. 今後の展開

本研究をさらに遂行し、鋳型非依存的なRNA合成酵素の動的な反応分子基盤の詳細を提示すると同時に、これらの解析から鋳型非依存的なRNA合成酵素群の分子機構の全貌を明らかにしていきたいと考えています。また、最近、鋳型非依存的なRNA合成酵素群が多種多様な遺伝子発現、RNAの分解、品質管理、RNAの発現制御に関与していることが報告されてきています。今後、これらの新規な鋳型非依存的なRNA合成酵素の反応分子機構、制御機構をも、構造生物学的、生化学的、分子細胞生物学的手法を相補的に用いて明らかにしていきたいと考えています。さらに、鋳型依存的RNA合成酵素についても、特にウイルス由来のRNA合成酵素複合体による動的な反応分子基盤の全貌を明らかにし、宿主由来の蛋白質のRNA合成における役割を明らかにし、ウイルスゲノムRNAの複製装置の機能構造解析を進めていきたいと考えています。

4. 自己評価

鋳型非依存的RNA合成酵素である CCA 付加酵素の研究から、RNAと蛋白質の共同的なRNA合成忠実性の維持分子機構や、基質特異性を決定する分子機構を明らかにできたと考えています。さらにRNAと蛋白質の共同的な機能発現という点から、これらの鋳型非依存的RNA合成酵素の機能発現様式は、RNA-蛋白質ワールドの分子化石の状態を示したものであると考えます。また、鋳型非依存的RNA合成酵素であるポリA付加酵素の研究から、ポリA付加酵素ではRNAの助けを借りずに蛋白質のみが機能発現に関与していることが明らかになり、進化的にCCA付加酵素からポリA付加酵素が派生してきたという考えを提唱できたと考えています。また、ウイルスRNA合成酵素複合体解析から新たな翻訳因子の役割を提唱でき、太古生命体における翻訳因子はRNA複製補因子であって、現在の翻訳システムはRNA合成システムから、それらの因子を譲り受けたという翻訳因子の進化、起源についての理解が深まったと考えています。これらの一連の研究は研究者らが主体となって、構造解析、生化学的、遺伝学的解析を相補的に用いて、他の研究グループ等と共同研究なしに独自に遂行したものであり、研究目標に向かって確実に研究を遂行できたと考えています。

5. 研究総括の見解

本研究は、構造生物学、生化学、分子細胞生物学的な研究手法を駆使し、鋳型非依存的RNA合成酵素である、CCA付加酵素およびポリA付加酵素の反応の分子基盤の詳細を明らかにしたものである。CCA合成の忠実性がRNAと蛋白質の共同的作用で維持される分子機構を明らかにし、ポリA合成酵素との構造比較から基質特異性を決定する分子機構を解明した。さらに、 $Q\beta$ ファージ RNA合成酵素複合体の解析から、翻訳因子の新たな役割も提唱した。これらの結果は、RNAワールドからの分子機構が現在も働いていることを示し、翻訳因子の進化や起源についての説明ともなっている。非常に、詳細な構造生物学であるが、生物学全体へ波及する影響を持ち、創造性の高い研究である。非常に高く評価できる。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Toh Y, Numata T, Watanabe K, Takeshita D, Nureki O, Tomita K*.

Molecular basis for maintenance of fidelity during the CCA-adding reaction by a CCA-adding enzyme.

EMBO J. 2008 ; 27, 1944-1952.

2. Toh Y, Takeshita D, Numata T, Fukai S, Nureki O, Tomita K*.

Mechanism for the definition of elongation and termination by the class II CCA-adding enzyme.

EMBO J. 2009; 28, 3353–3365.

3. Takeshita D, Tomita K*

Assembly of QB viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 ; 107, 15733–15738.

4. Toh Y, Takeshita D, Nagaike T, Numata T, Tomita K*

Mechanism for the alteration of the substrate specificities of template-independent RNA polymerases

Structure, 2011 ; 19 (2), 232–243.

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

(招待講演)

- | |
|---|
| 1. 2010年 11月 第39回 日本環境変異原学会年会 (つくば)
「鋳型非依存的RNA合成酵素の性質と、そのRNAサーベイランス機構における役割」 |
| 2. 2008年 12月 第31回日本分子生物学会年会 (神戸)
第6回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞 講演
「鋳型非依存的RNA合成酵素の進化・分子機構に関する研究」 |
| 3. 2008年 2月 千里ライフサイエンスセミナー (大阪)
「鋳型なしRNA合成酵素の進化・分子機構」生命機能を支える生体超分子の高次構造と機能」 |

(受賞)

- | |
|--|
| 1. 2010年 文部科学大臣表彰 科学技術分野(研究部門) 受賞
「酵素反応の動的分子機構の構造的な研究」 |
| 2. 2008年 日本分子生物学会 第6回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞 受賞
「鋳型非依存的RNA合成酵素の進化・分子機構に関する研究」
(Mechanism and evolution of template-independent RNA polymerases) |
| 3. 2007年 茨城県科学振興財団 第17回つくば奨励賞若手研究者部門 受賞
「鋳型を用いないRNA合成酵素の分子構造基盤研究」 |

(総説、著書)

- | |
|---|
| 1. <u>富田耕造</u> 、沼田倫征
4章 生命現象の理解に迫る構造生物学研究 4.3 翻訳 担当
「入門 構造生物学」－放射光X線と中性子で最新の生命現象を読み解く－
高エネルギー加速器研究機構 構造生物学研究センター 編 2010 共立出版 |
| 2. 渡邊和則、董雪松、 <u>富田耕造</u>
アミノアシル tRNA 蛋白質転移酵素の基質認識、反応触媒の分子機構の解明
<i>生化学</i> , 2009; 81(4): 294–298 日本生化学会 |
| 3. 董雪松、 <u>富田耕造</u>
鋳型非依存的RNA合成酵素, CCA付加酵素のRNA合成忠実性維持の分子基盤
<i>実験医学</i> , 2008; 26(19): :3058–3061羊土社出版 |
| 4. 渡邊和則、 <u>富田耕造</u>
tRNA を使うリボソームによらないペプチド結合形成反応
<i>蛋白質核酸酵素</i> , 2008; 53(9):1152–1157. 共立出版 |

(プレス発表等)

1. プレスリリース「鋳型なしRNA合成において正しい配列を維持するための分子機構を解明
2008年7月8日(独)産業技術総合研究所発表
2008年7月9日(水)日刊工業新聞、2008年7月9日(水)日経産業新聞、2008年7月18日
(金)科学新聞、に掲載

2. 産業技術総合研究所HP「主な研究成果」掲載
真正細菌の鋳型なしRNA合成酵素の反応の分子機構を解明—新たなRNA合成酵素による機能
性RNA研究へ—
2009年10月5日(独)産業技術総合研究所発表

3. プレスリリース「ウイルスRNA合成酵素と宿主翻訳因子との複合体の構造を解明—新たな抗
RNAウイルス薬開発へ期待—」
2010年8月24日(独)産業技術総合研究所と(独)科学技術振興機構との共同発表
2010年8月24日(火)化学工業日報、2010年8月24日(火)日刊工業新聞に掲載