

研究報告書

「ヌクレオチドの分子認識能を基盤とした tRNA アミノアシル化機構の解明と応用」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：田村 浩二

1. 研究のねらい

現存する生命において、RNA の塩基配列をタンパク質中のアミノ酸の配列に変換するアルゴリズムが遺伝暗号であり、tRNA のアミノアシル化は遺伝暗号の成立過程に関わっている。本研究は、RNA がヌクレオチドレベルで示すキラル選択性や分子認識・識別メカニズムを明らかにすることにより、生物学的な tRNA のアミノアシル化の進化過程を解明すると同時に、有効な tRNA の化学的アミノアシル化の実現と RNA 超分子創製の基礎構築を目指すものである。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドによる tRNA のアミノアシル化法は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) なしで、有効なアミノアシル化を実現する可能性がある。また、これらの分子メカニズムを解明することによって、生物界のホモキラリティーや遺伝暗号、更には、tRNA のアミノアシル化の起源に迫ることができる。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドは、現在の aaRS の反応中間体であるアミノアシル AMP と同じ結合を有し、生命の進化の連続性の観点からも注目に値する。と同時に、この機構を利用した非天然アミノ酸導入の新しい方法論を確立し、人工タンパク質の合成へのブレイクスルーと RNA ナノテクノロジーの開発を目指す。

2. 研究成果

A. キラル選択的アミノアシル化メカニズムの解明

アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応は、L-アミノ酸を D-アミノ酸より優位に結合する(約4倍の差)が、この差は繰り返し反応が起こることを考慮すれば、天然のタンパク質が L-アミノ酸から構成されている謎についての理由を説明可能である。しかし、この系における L-アミノ酸の識別メカニズムについては明らかになっていなかった。このメカニズムを明確にするために、アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応の詳細な検討を行った。

まず、この系はアミノアシル-p-オリゴヌクレオチドとミニヘリックスとが、架橋オリゴヌクレオチドを介して近接することによって起こる。5'-リン酸基にアミノアシルリン酸結合を介してつながっているアミノ酸は、高エネルギー状態にあり、このアミノ酸は何もしなければ、加水分解されるが、近接位置に水に代わる官能基が存在すれば、その位置への結合の転移が起こりうる。丘を下るが如くの、いわゆる downhill reaction であり、その可能性の場としては、ミニヘリックスの 3' 末端アデノシンの 2'-OH か 3'-OH の部位がその candidate となる。しかし、この反応は、3'-OH にしか起こらないことが分かった。これは、反応部位が自由な環境にあるのではなく、極めて空間的に制限を受けた形で構成されていることに由来する。これを可能にするのが、架橋オリゴヌクレオチドによって二重らせん様構造(Extended Double Helix 構造と呼ぶ)が作られているからであり、これらを構成するヌクレオチドは C3'-endo 型のパッカリングコンフォメーションを取っていることが明らかになった。アミノアシル化部位に最近接した位置のオリゴヌクレオチドの塩基配列置換体(G-T、G-U、I-T、G-T(2'-O-CH₃))を用いた実験から、D-アミノ酸

側鎖の立体障害が反応性の低さを説明することが示唆されたが、そのモデルは実験結果を矛盾なく説明することができた。ただし、I-Tの場合において、Iのケト・エノール変換の影響については、今後、検討して行く必要がある。また、L-アミノ酸、および、D-アミノ酸の双方を用いて、反応系を構成する分子の構造解析に向けた試みを現在進行中である。

B. アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを用いた tRNA の新規アミノアシル化法の開発

アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応を tRNA に応用することを試みた。tRNA もミニヘリックスと同様に 3' 末端部分に CCA という一本鎖配列を有しており、架橋オリゴヌクレオチドによって、ミニヘリックスと同様の反応が起こると期待できる。しかも、L-アミノ酸は D-アミノ酸より優位に結合するするとは言え、D-アミノ酸は結合されないわけではないので、ドナー側のアミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを大量に使用することで、どのようなアミノ酸にも利用できる tRNA のアミノアシル化法の開発を目指した。

まず、非天然蛍光アミノ酸である β -[benzo[b]acridin-12(5H)-on-2-yl]-L-alanine をサブプレッサー tRNA にアミノアシル化することに成功した。さらに、非天然アミノ酸を含む複数のアミノ酸をアンバーサブプレッサー tRNA に導入することに成功し、得られたアミノアシル-tRNA を、3 番目のコドンをストックドン(アンバーコドン)に変換した eGFP 発現プラスミドを含む大腸菌の S30 *in vitro* translation 系に導入したところ、従来の方法では、わずか1種類のアミノ酸の導入だけでも容易でないのに対し、20 種類の天然型 L-アミノ酸のすべてに加え、D-アミノ酸を5種類、さらに、非天然アミノ酸を2種類の、計 27 種類のアミノ酸を eGFP に導入することに成功した。これらは、eGFP が持つ 509nm の蛍光検出を行うことで確認した。

このアミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを用いたアミノアシル化法を用いた、非天然アミノ酸導入タンパク質の合成法の問題点として、バックグラウンドの高さが顕著に現れることが明らかになった。これに対処するために、アクセプターステム中に C1-G72 塩基対を導入した tRNA を大量に調製する必要が生じた。T7RNA ポリメラーゼによる転写は G がスタートでないと、その効率が著しく落ちるため、C1 でスタートする tRNA の上流に、この C1 の 5'-リン酸基を残すように切断するリボザイムの配列を有する RNA トランスクリプトを転写するシステムを構築した。現在、このリボザイムの切断活性を最適化するための条件を検討していると同時に、G1-C72 塩基対を導入した tRNA を用いたアミノアシル化効率の向上を試みている。

C. ナノ古細菌のアミノアシル化システムの解明と分子認識

現在の生物系における tRNA のアミノアシル化システムがどのように進化してきたのかを明らかにするために、最小のゲノムサイズを持つ古細菌であるナノアーキア (*Nanoarchaeum equitans*) のアミノアシル化過程の解析を行った。まずはアラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS) とグリシル tRNA 合成酵素 (GlyRS) の遺伝子を、ナノアーキアのゲノム DNA からクローニングし、大腸菌内でのこれらのタンパク質の発現系を構築した。ナノアーキアの AlaRS は α 、 β 、2 つのペプチドに分断されてコードされているが、 α 、 β 、および、その変異体のタンパク質発現系を構築し、得られたタンパク質と tRNA^{Ala} トランスクリプトを用いたアミノアシル化活性の測定を行った。その結果、ナノアーキアの AlaRS は α 、 β の両方が存在しないとアミノアシル化が起こらないこと、および、 β は全長でなく、N 末端側の約 100 アミノ酸残基 (β') だけで、全長と同程度のアミノアシル化への寄与をすることが明らかになった。さらに、 β ドメインの最小化

をはかるために、新たな変異体 (β'') の構築を行った。GlyRSによるtRNA^{Gly}の認識機構について研究を行った結果、tRNA^{Gly}のディスクリミネーター塩基、アクセプターステム中の塩基対、および、アンチコドン2文字目、3文字目がGlyRSによって認識されていることが明らかになった。しかし、これらの塩基の認識の度合いは、他の生物のGlyRSによる認識とは違っていることが明らかになった。また、グリシルtRNA合成酵素 (GlyRS) とアラニルtRNA合成酵素 (AlaRS) についての機能最小化の解析を継続的に行っており、特に、GlyRSのCCD (Catalytic Central Domain) について、*T. thermophilus*のGlyRSとの相違を発見した。

3. 今後の展開

本研究の典型的な応用は、新規人工タンパク質の作製であろう。上記のオリゴヌクレオチドを用いたアミノアシル化の系を利用して、少数の限られたアミノ酸に留まらず(従来の aaRS の変異体を用いた方法では、天然に似たようなアミノ酸しか導入できない)、任意のアミノ酸を有効に容易に tRNA にアミノアシル化することが可能になり、また、さまざまな RNA に見られる高次相互作用を、アミノ酸と RNA の新規相互作用、及び、金属イオンを介した新しい相互作用、Kissing 相互作用などと組み合わせることにより、新たな超分子 RNA ナノテクノロジーの創製にもつながる可能性があろう。これらは RNA 超分子形成機構の解明とも相まって、将来的な創薬などをも見据えた社会への貢献は大きい。また本研究は、RNA が持つ本質的な分子認識機構を解明することも目指しているため、純粋な科学としての観点からも極めて重要であり、医療技術等の応用につながると同時に、生命の起源の謎の解明にもつながる基礎研究になる可能性もある。

4. 自己評価

さきがけ研究期間で、今後につながる数々の結果が得られた。文字通り「さきがけ」としての取っ掛かりはつかめたが、まだ詳細に至る詰め段階には到達していない。当然ながら、当初の目標に対して、十分でない点多々あることも否めない。以下、具体的に、それらを記載したい。

キラル選択的アミノアシル化メカニズムの解明に関しては、実験結果を矛盾なく説明するモデルを作成することができたが、このモデルは極端に単純化した状態を説明しているに過ぎない可能性がある。Extended Double Helix を構成しているであろう反応システムにおいて、モデルが主張している結果が正しいのかどうかには決着をつけるためには、最終的には X 線結晶構造解析などの構造生物学的な解析が重要である。当初の目標においてもこれを掲げていたが、不安定な実際の反応系をミミックする安定物質のアナログ合成に思いのほか手間取り、この点についての進展は余りなかった。今後、これらについて、研究を進めていきたい。

アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを用いた tRNA の新規アミノアシル化法の開発については、複数のアミノ酸に対して、普遍的に使える可能性は示唆できたが、まだまだ実用段階にはほど遠い状況である。今後、反応条件の最適化を行い、効率的に tRNA のアミノアシル化とタンパク質合成が行えるようにしていきたい。

ナノ古細菌のアミノアシル化システムの解明と分子認識に関しては、いくつかの個々の系においては、個々の認識機構の一端を明らかにすることができた。しかしながら、あくまでも

一端に過ぎないので、今後は、全貌の解明に努力したい。そして、その延長線上には、やはり、生命が単純な系からどのように現在の系になっていったのかという、生命の本質の理解があると思う。

「知を愛する」というところから来ている科学の歴史を鑑み、即効的に目に見えるような技術だけではなく、科学の成果というものは、知的文化、知的遺産といった人類共通の文化の構築の点からも捉えるべきであろう。その意味でも、本研究の発展は人間の知的好奇心にも訴えるに違いないと信じている。

5. 研究総括の見解

本研究は、RNA ワールドからの生命の進化の過程を想定しつつ、tRNA のアミノアシル化の進化過程を解明し、RNA がヌクレオチドレベルで示すキラル選択性や分子認識・識別メカニズムを明らかにすることを目的としている。同時に、この機構を利用した非天然アミノ酸導入の新しい方法論を確立し、人工タンパク質の合成や RNA ナノテクノロジーの開発を目指している。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応では、L-アミノ酸が D-アミノ酸より約4倍優位に結合する。この実験結果を矛盾なく説明するモデルを作成したことは、高く評価出来る。また、多くのアミノ酸に利用できる tRNA のアミノアシル化法の開発にも成功し、普遍性を与えたことは、今後の応用研究にとって重要である。さらに、ナノ古細菌を使用して、現在の生物系における tRNA のアミノアシル化システムへの進化を研究中である。当研究者の研究は、生命の起源・進化に原点を置いており、常に地球レベルの環境の影響を視点に入れている点が特徴であり、豊かな創造性に繋がっている。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Tamura, K. Ribosome evolution: Emergence of peptide synthesis machinery. <i>Journal of Biosciences</i> , Vol. 36, 921-928, 2011 |
| 2. Tamura, K. Molecular Basis for Chiral Selection in RNA Aminoacylation. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. 12, 4745-4757, 2011 |
| 3. Tamura, K. Peptide Bond Formation: RNA's Big Bang. <i>Journal of Cosmology</i> , Vol. 13, 3800-3810, 2011 |
| 4. Tamura, K. Amino Acid Homochirality and the RNA World: Necessities for Life on Earth. <i>Journal of Cosmology</i> , Vol. 5, 883-889, 2010 |
| 5. Tamura, K. Molecular handedness of life: significance of RNA aminoacylation. <i>Journal of Biosciences</i> , Vol. 34, 991-994, 2009 |

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

1. 田村浩二、RNA ワールドと生命における L-アミノ酸の起源、理研・千葉工大共催シンポジウム「生命システム原材料の起源と進化：生体分子は如何にして作られたか？」(2011.11.26)
2. 田村浩二、地球上の生物が左利きアミノ酸を使うようになった理由についての一考察、明治大学科学技術研究所・2011 年度 第 2 回公開講演会「ケミカルバイオロジー研究の地平線」(2011.10.22)
3. 田村浩二、RNA のキラル選択的アミノアシル化と識別メカニズム、千葉工業大学・第8回構造生物学セミナー (2010.7.9)
4. 田村浩二、アミノ酸のホモキラリティーの起源：RNA ワールドの立場から、弘前大学・第 65 回遺伝子実験施設セミナー (2009.9.29)

主要な学会発表

1. 阿留多伎美沙, 榎原琢哉, 田村浩二、ナノアーキアAlaRSによるtRNA^{Ala}の認識機構の解明、第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.14 横浜)
2. 田村浩二、RNA ワールドとアミノ酸のキラル選択性の起源、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010.12.8 神戸)
3. 田村浩二、アミノ酸ホモキラリティー選択性の分子基盤、第 35 回生命の起原および進化学会学術講演会 (2010.3.16 函館)
4. 田村浩二、アミノ酸のホモキラリティーの起源と tRNA のアミノアシル化、第 82 回日本生化学会大会 (2009.10.24 神戸)
5. Tamura, K. Molecular basis for chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix. International Meeting on Fluorinated-Peptide Chemistry, Ochanomizu University, Tokyo (2008.11.4)

著作物

1. Tamura, K. Amino Acid Homochirality and the RNA World: Necessities for Life on Earth. Origins, Abiogenesis and the Search for Life (2010.10 Edited by Michael Russell, Cosmology Science Publishers, Cambridge, MA)
2. 田村浩二、アミノ酸の非対称性の起源：RNA ワールドの観点から、生物物理, Vol. 50, 180-181, 2010