

平成 31 年 4 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18511

研究課題名(和文) 逆方向RNA伸長酵素のRNA選択機構の解明

研究課題名(英文) Study on a switching mechanism in RNA recognition by 3'-5' RNA polymerase

研究代表者

中村 彰良 (NAKAMURA, Akiyoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：10583891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：tRNAHis guanylyltransferase (Thg1)は自然界で唯一、RNAを逆方向(3'→5'方向)に塩基伸長する酵素である。Thg1の逆方向塩基伸長活性は一般的なポリメラーゼでは不可能な5'末端への修飾塩基の導入などに応用が期待されている。本研究では、Thg1が2本鎖に分断したtRNAも認識できることを見出し、Thg1の逆方向塩基伸長活性を1本鎖RNAへ拡張することに成功した。さらに、Thg1はこれまで報告されていた細胞質tRNAHisのみだけでなく、ミトコンドリアtRNAHisの成熟にも関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸を伸長する酵素(ポリメラーゼ)は、生体外においても容易に核酸の複製や修飾ができることから、遺伝子の解析や組換えなどの技術に幅広く活用されており、生命科学の発展に欠かせないものとなっている。ポリメラーゼの1種であるThg1は自然界で唯一他のポリメラーゼとは逆方向に核酸を伸長する能力があることから、これまでにない遺伝子解析や組換え技術開発への応用が期待されている。本研究ではThg1の機能解析から、Thg1をより多様な核酸に適用できる可能性を見出した。本研究成果を元に、今後Thg1を利用した新たな核酸合成・修飾技術開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The tRNAHis guanylyltransferase (Thg1) is a unique enzyme which catalyzes a reverse (3'-5' direction) polymerization. It is expected that the reverse polymerization activity of Thg1 is applied to a novel nucleotide modification or elongation technologies. In this study, we successfully constructed a two-stranded tRNA molecule composed of a primer and a template strand by dividing the parent tRNAHis. It allows Thg1 to incorporate a nucleotide triphosphate onto the 5'-end of single-stranded RNA in the 3'→5' direction. Furthermore, we demonstrated that human Thg1 catalyzes the nucleotide addition reaction for both human cytosolic tRNAHis and mitochondrial tRNAHis.

研究分野：構造生物学、分子生物学

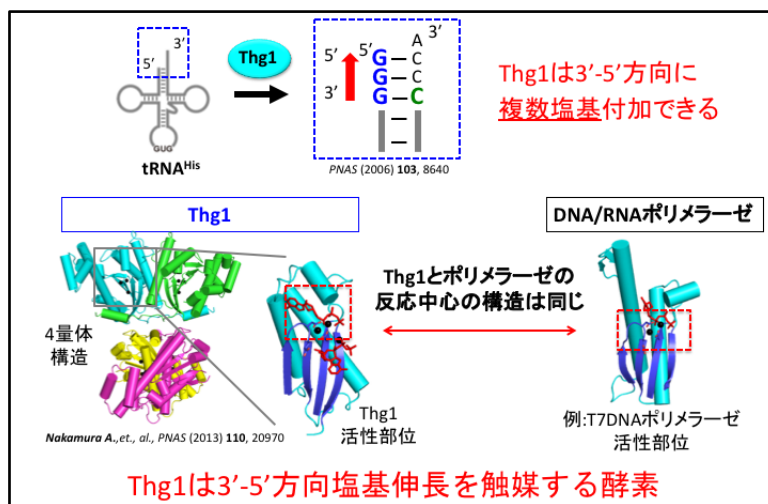
キーワード：X線結晶構造解析 tRNA修飾 アミノアシルtRNA合成酵素 DNA/RNAポリメラーゼ 核酸 タンパク質 鋳型依存伸長反応

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内で遺伝情報をタンパク質に正確に変換するためには、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) が各アミノ酸に対応する tRNA を厳密に識別することが必須である。ヒスチジンの tRNA (tRNA^{His}) の場合、通常の tRNA よりも 5'末端側に 1 塩基分伸びたグアニン塩基(G-1)が存在し、aaRS の識別に利用される。真核生物においてこの G-1 を付加する酵素が tRNA^{His} guanylyltransferase (Thg1) である。興味深いことに、Thg1 は G-1 の付加だけでなく、tRNA^{His} 変異体に対し 3'-5'方向に鋳型依存的な塩基伸長活性を有することが生化学実験から明らかになった。さらに驚くべきことに、Thg1 の立体構造解析の結果、Thg1 は一般的な DNA/RNA ポリメラーゼと共通の活性部位構造を有していた。これまで、すべての DNA/RNA ポリメラーゼは 5'-3'方向に塩基伸長することは定説であった。そのため、逆方向への塩基伸長活性を有し、DNA/RNA ポリメラーゼと構造相関がある Thg1 は自然界で唯一の逆方向ポリメラーゼとして脚光を浴びた。

一般的な 5'-3'方向の核酸伸長酵素は長年の機能解析により明らかになった特性を元に、核酸増幅技術、配列解析技術、核酸標識技術など多種多様な用途へ応用されており、それらは現在の生命科学には欠かせない技術になっている。一方、Thg1 の 3'-5'方向塩基伸長活性を活用する技術開発が期待されているが、機能解析が不十分であり特性解明までに至っていない。特に、Thg1 の 3'-5'方向塩基伸長活性は tRNA のみ限定されているため、多様な RNA へ対象を拡大する技術が求められている。



2. 研究の目的

本研究では、既存の構造情報を利用し、tRNA のみならず多様な RNA に対し 3'-5'方向への塩基伸長を可能とする手法を確立し、全く新しい研究ツールへの応用に繋げる。さらに、研究が進んでいないミトコンドリア tRNA^{His} をターゲットとした Thg1 の構造機能解析を行い、新規 RNA 認識機構を解明する。

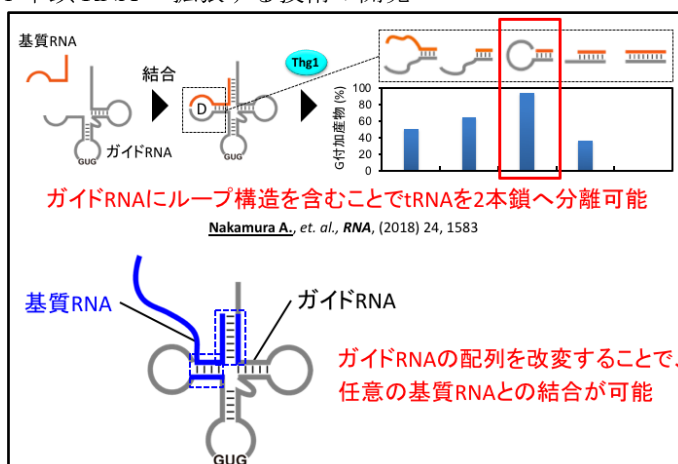
3. 研究の方法

新規の核酸伸長技術を開発する足がかりとして、既存の構造情報を基盤とし、基質 tRNA を 2 本鎖に分断した Split tRNA の作成を試みる。その後、分断部位や相補差領域の長さを最適化することによって、自然界では tRNA に限定されている 3'-5'方向の RNA 伸長活性をより多様な RNA に応用する手法を確立する。加えて、ミトコンドリア tRNA^{His} を調製し、Thg1 が基質として認識できるか生化学実験により解析する。

4. 研究成果

(1) Thg1 の 3'-5'方向塩基伸長活性を 1 本鎖 RNA へ拡張する技術の開発

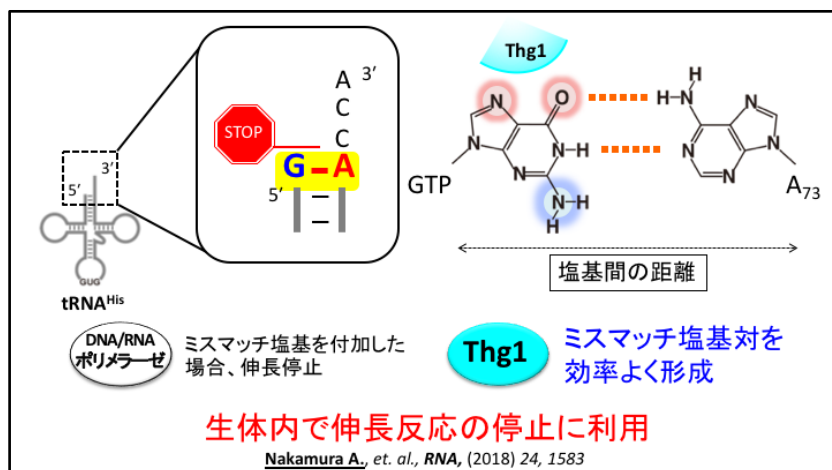
Thg1 活性を保持したまま tRNA をガイド RNA と基質 RNA に分断するためには、タンパク質との相互作用には影響せず、かつ tRNA の 3 次元構造を維持する必要がある。その条件を踏まえ、これまで解析に成功した Thg1-tRNA^{His} 複合体構造に基づき、まず tRNA の D ループでの分断を試みた。その結果、ガイド RNA に D ループ構造を保持した場合に最も高活性を示すことを明らかにした。更に、ガイド RNA を熱力学的により安定になるよう配列置換したとこ



ろ、大幅に活性が上昇することを見出した。今後、最適化したガイド RNA の配列を改変することで、3'-5'方向塩基伸長反応を任意の基質 RNA へ適応することが期待される。

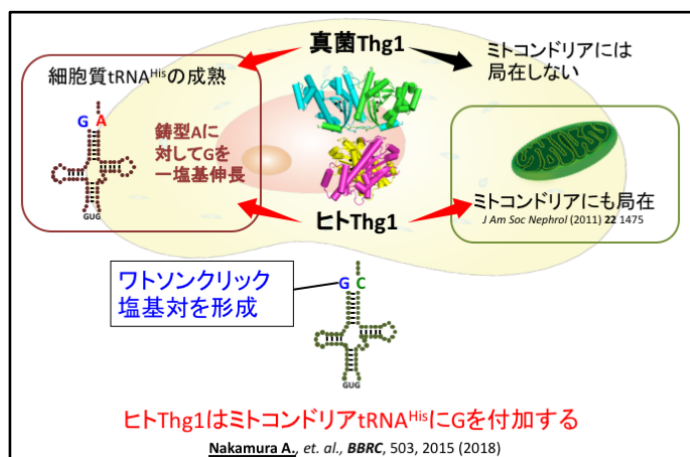
(2) Thg1 の伸長塩基の分子認識機構の解析

Thg1 はポリメラーゼとほぼ同様の活性部位構造を持つにも関わらず、塩基伸長時の鋳型塩基に依存して、伸長する塩基の数が異なることが報告されている。特に、生体内では細胞質 tRNA^{His} に対し一塩基のみ選択的に伸長して停止することから、伸長反応を制御する機構が存在すると考えられる。そこで、先ず Thg1 の伸長塩基数の制御機構を明らかとするために、基質となる塩基の認識機構の解析を試みた。具体的には、真菌由来の Thg1 を利用して、伸長反応の基質となるリボヌクレオチドの誘導体（官能基を変えた分子）と、鋳型塩基の全てのパターン（AUGC）において反応率、反応速度、伸長塩基数などを解析した。その結果、ポリメラーゼとは異なり Thg1 は、伸長する塩基と鋳型塩基を含めた塩基対として認識していること、および生体内ではミスマッチ塩基対を高効率で形成することで伸長を停止することを明らかにした。



(3) ヒト Thg1 の機能解析

近年、ヒトを含む哺乳類では、真菌とは異なり Thg1 が細胞質だけでなくミトコンドリア(mt)にも存在し、mt-tRNA^{His} の成熟に関与している可能性が示唆されている。mt-tRNA^{His} は細胞質 tRNA^{His} とは鋳型塩基や構造が大きく異なることから、ヒト Thg1 には真菌とは異なる伸長制御機構が存在すると考えられる。候補者はその制御機構を解析するためにヒト Thg1 の機能解析に取り組み、真菌とは異なる機構で伸長塩基を認識し、塩基対ではなく 5'末端のリン酸基の分解により伸長反応を停止している可能性を明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) **Nakamura A**, Wang D, Komatsu Y. Biochemical analysis of human tRNA^{His} guanylyltransferase in mitochondrial tRNA^{His} maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) **503**, 2015, 査読有, doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.150
- (2) **Nakamura A**, Wang D, Komatsu Y. Molecular mechanism of substrate recognition and specificity of tRNA^{His} guanylyltransferase during nucleotide addition in the 3'-5' direction. *RNA* (2018) **24**,1583, 査読有, doi:10.1261/rna.067330.118

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 中村彰良, 汪道楽, 小松康雄, 「3'-5'方向塩基伸長を触媒する tRNA 修飾酵素の基質特異性解析」, 日本薬学会 第 137 年会, 仙台, (2017.3)
- (2) 汪道楽, 中村彰良, 小松康雄, 「3'-5'方向への塩基伸長反応を触媒する Thg1 の基質特異性解析」, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会, 札幌, (2017. 6)
- (3) 中村彰良, 汪道楽, 小松康雄, 「Human tRNA^{His} guanylyltransferase の機能解析」, 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, (2018. 11)
- (4) 中村彰良, 「ヒト由来 tRNA^{His} guanylyltransferase の立体構造解析」, 2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ, つくば, (2019. 3)

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/index.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。