

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06519

研究課題名(和文) 逆方向塩基伸長酵素のRNA認識多様性とその分子機構

研究課題名(英文) Molecular basis of 3'-5' polymerase in a diverse RNA recognition

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・主任研究員

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)：近年、逆向きの3'-5'方向へ塩基伸長する酵素Thg1が発見され注目を浴びている。しかし、Thg1に現存する逆方向の塩基伸長活性の生物学的意義の解明には至っていない。本研究ではヒトThg1の異なる鋳型塩基に対する塩基付加活性測定から、ヒトThg1には2種類の塩基認識機構が存在することを明らかにした。この内、ヒトThg1が生成するU:A塩基対を含むtRNAは乳がん細胞等でpiRNAとして機能することが報告されており、逆方向の塩基伸長活性の新たな生体内機能を提唱した。また、ミトコンドリアtRNAとの複合体構造から、C末端ドメインとtRNAの結合が塩基認識にも関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではThg1の逆向きの3'-5'方向へ塩基伸長活性がpiRNA合成と関与することを明らかにし、新たな生体内機能を示唆することができた。さらに、ヒトThg1が様々な修飾塩基をRNAの5'末端に付加できることを明らかにしたことから、ヒトThg1を活用した新たなRNAラベリング技術開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Thg1 is an enzyme that extends nucleotide in the reverse direction. Its biological significance is not fully understood. In our study, we discovered two mechanisms of base recognition in Human Thg1. One mechanism involves the formation of a U:A base pair in tRNA, which has been reported to function as piRNA in breast cancer cells, suggesting a new biological role for reverse polymerization activity. Additionally, the binding between Thg1 and mitochondrial tRNA was found to play a role in base recognition.

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  
鋳型依存塩基伸長 3'-5'方向塩基伸長

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、研究者個人に帰属します。

### 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<sup>His</sup>)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<sup>His</sup> 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<sup>His</sup> 変異体に対し 5'-3'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。しかし、なぜ Thg1 には逆方向の塩基伸長活性が失われずに現存しているのか、その生物学的意義に関しては未解明である。

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にも存在し、ミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の成熟に関与している可能性が示唆されている。ミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> は細胞質 tRNA<sup>His</sup> 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。先行研究のヒト Thg1 の機能解析により、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が示された。しかしながら、ヒト Thg1 は、それぞれ G-1 の逆側にアデノシン(A73)およびシトシン(C73)を持つ細胞質およびミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の両方を基質とし G-1 を付加するがどのように 2 種類の tRNA を識別し反応機構を制御しているかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では自然界で唯一の逆方向塩基伸長酵素であるヒト Thg1 の RNA 認識の多様性に着目し、基質 RNA 配列と付加塩基の構造活性相関解析から反応制御メカニズムを解明することを目的とする。さらに逆方向塩基伸長活性を分子生物学の新しいツールとして活用するための分子基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

ヒト Thg1 が基質として認識する細胞質およびミトコンドリアの tRNA<sup>His</sup> の配列比較から、G-1 の逆側に位置する 73 番目の鋳型塩基の違いに着目する。73 番目の鋳型塩基を置換した tRNA 変異体を作成し、各変異体に関して化学的および構造的に異なる様々なヌクレオチドを伸長塩基として付加できるか活性測定を行うことで、RNA 認識とヌクレオチド認識の関連性を明らかにする。また、すでに RNA 認識が明らかになっている細胞質 tRNA と塩基配列や 2 次構造が大きく異なるミトコンドリア tRNA の認識機構を明らかにするために、ヒト Thg1 とミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の複合体立体構造解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト Thg1 による鋳型塩基に応じたヌクレオチド認識メカニズムの解明

ヒト Thg1 が鋳型塩基に応じてどのようにヌクレオチドを認識するか明らかにするために、A73 および C73 を含む基質 tRNA<sup>His</sup> (Two-piece tRNA<sup>His</sup>)を調製し、様々なヌクレオチドアナログに対する 3'-5'方向の塩基伸長活性を測定した (図 1)。

鋳型塩基が A73 の場合、真菌 Thg1 と同様にヒト Thg1 の塩基伸長にはトリリン酸構造が必須であり、G:A 非ワトソン・クリック塩基対を形成することを明らかにした。興味深い事に、ヒト Thg1 は真菌 Thg1 では活性が確認できなかった UTP も高活性で塩基伸長したことから、ワトソン・クリック塩基対を形成しやすいことが示唆された。

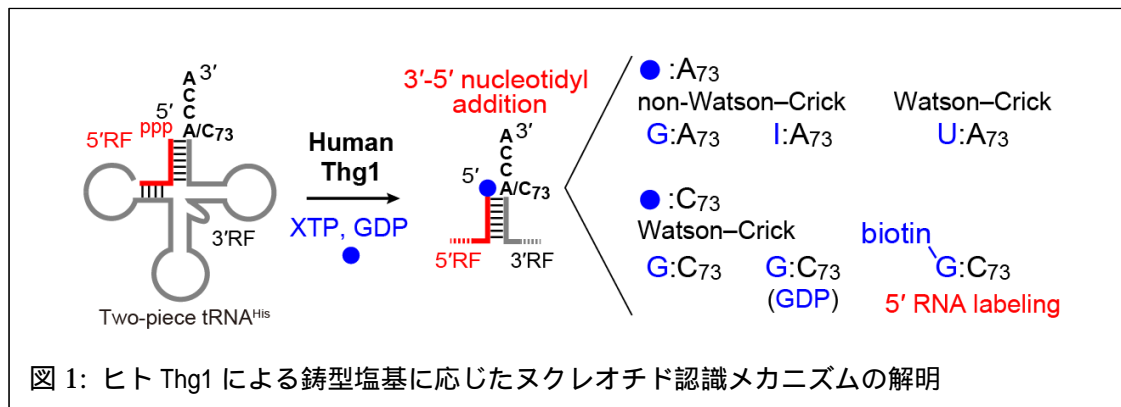


図 1: ヒト Thg1 による鋳型塩基に応じたヌクレオチド認識メカニズムの解明

一方、鋳型塩基が C73 の場合、A73 とは異なり GDP を高活性で伸長した。この結果からも、ヒト Thg1 はトリリン酸との結合は必須ではなく、鋳型塩基とのワトソン・クリック塩基対形成がヌクレオチド認識に重要であることが強く示唆された。

以上の結果から本研究ではヒト Thg1 の 2 種類のヌクレオチド認識メカニズムを提唱した。1 つはトリリン酸結合依存の G:A 非ワトソン・クリック塩基対形成であり、もう 1 つはトリリン酸結合に依存せず、ヌクレオチドと鋳型塩基との間で強いワトソン・クリック塩基対形成である。

### (2) ヒト Thg1 による 5'末端 RNA ラベリングのための 5'-ヌクレオチド付加活性

RNA の 3'末端は酵素的または化学的な技術によってヌクレオチドや非ヌクレオチド分子で比較的容易に修飾することができる。一方、RNA の 5'末端の転写後修飾は困難である。そこで、ヒト Thg1 を RNA の 5'末端ラベリングに応用するために、Two-piece tRNA システム (図 2)を用いて様々な GTP アナログに対する活性を測定した。驚くことに、ヒト Thg1 は Biotin-GTP を鋳型塩基 C73 に対して高活性で付加することができた(図 2)。また、2'OH にアジド基を含む GTP (2azG)も 5'末端に付加することができた(図 2)。Biotin-GTP ラベリングはストレプトアビジンやアビジンと特異的な相互作用を利用して興味のある RNA の検出や捕捉に利用することが可能となる。また、2azG で RNA の 5'末端をラベリングすることで、クリック反応による化学修飾が可能となる。今後、本研究成果を活用した新規 5'末端 RNA ラベリング法の開発が期待される。

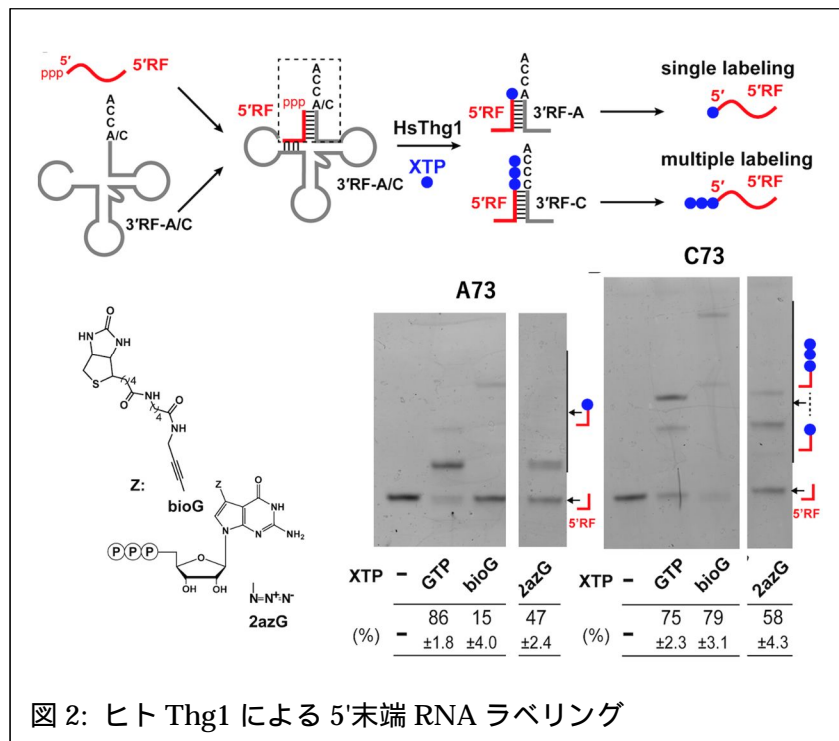


図 2: ヒト Thg1 による 5'末端 RNA ラベリング

### (3) ヒト Thg1-ミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> 複合体の立体構造解析

ヒト Thg1 は、細胞質 tRNA<sup>His</sup> とミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の両方の 5'末端に GTP を付加するが、ヒト Thg1 とミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の複合体構造は未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではヒト Thg1 とミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の共結晶化を行った。その結果、ミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の全長構造は確認できなかったが、ミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の部分的な電子密度が確認され、その近傍に細胞質 tRNA<sup>His</sup> との複合体構造では確認されなかったヘアピン構造の電子密度が確認できた。このことから、このヘアピン構造による tRNA 認識がミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> との結合に重要であり、この結合によってヌクレオチド認識を切り替える新たな反応メカニズムを提唱した (図 3)。

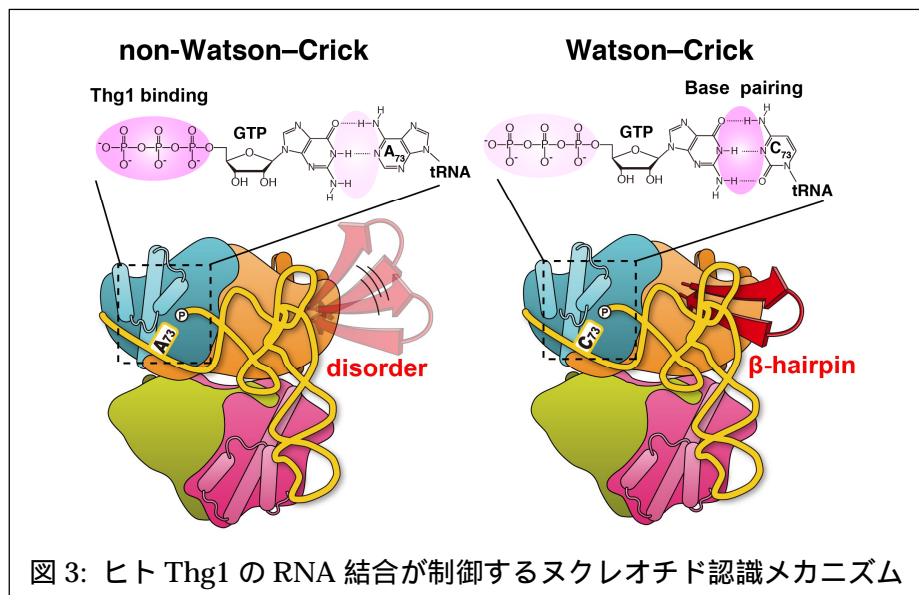


図 3: ヒト Thg1 の RNA 結合が制御するヌクレオチド認識メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiyoshi Nakamura, Daole Wang, Yasuo Komatsu	4. 巻 27(6)
2. 論文標題 Analysis of GTP addition in the reverse (3' -5') direction by human tRNA <sup>His</sup> guanylyltransferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 665-675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.078287.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 彰良、汪 道楽、小松 康雄
2. 発表標題 ヒト由来tRNA <sup>His</sup> グアニルトランスフェラーゼによる逆方向（3' -5'）の塩基付加反応の解析とRNA5'末端修飾への応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 彰良、汪 道楽、小松 康雄
2. 発表標題 Human tRNA <sup>His</sup> guanylyltransferaseのヌクレオチド認識機構の解明
3. 学会等名 令和3年（2021年）度日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 彰良、汪 道楽、小松 康雄
2. 発表標題 Nucleotide recognition mechanism of human tRNA <sup>His</sup> guanylyltransferase and its application to RNA 5'-modification
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 碓井 拓哉, 大江 花, 中村 彰良, 尾瀬 農之, 姚 閔
2. 発表標題 2-セレノウリジン合成酵素SeIUのtRNA選択性
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 彰良
2. 発表標題 ヒト由来tRNAHis guanylyltransferaseのヌクレオチド認識機構
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村彰良、汪道楽、小松 康雄
2. 発表標題 ヒト由来tRNAHis guanylyltransferaseによるミトコンドリアtRNAHisの5'末端修飾反応の解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiyoshi Nakamura, Daole Wang, Yasuo Komatsu
2. 発表標題 The nucleotide recognition mechanism of human tRNAHis guanylyltransferase in 3' -5' nucleotide addition reaction
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村彰良、汪道楽、小松 康雄
2. 発表標題 Human tRNAHis guanylyltransferaseのRNA複合体構造解析
3. 学会等名 2019年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関