

平成30年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14793

研究課題名(和文) 原始RNAポリメラーゼの探求のための試験管内進化実験

研究課題名(英文) Resurrection of primordial RNA polymerase by in vitro evolution experiments

研究代表者

田上 俊輔 (Tagami, Shunsuke)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：40586939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：地球上で生命がどのように誕生したかは生物学における最大の疑問のひとつである。特に現在の遺伝子発現システムがどのように成立したかは重要な問題である。本研究では、現存する全ての生命において遺伝子発現制御の中心を担っているRNAポリメラーゼを対象にした分子進化実験を行った。現存生物のRNAポリメラーゼは分子量約30万にもなる巨大なタンパク質複合体であるが、原始生命においてはRNAポリメラーゼもより単純なタンパク質として誕生したと考えられる。そこで本研究では、現存のRNAポリメラーゼの活性中心ドメイン(約100アミノ酸)のみを切り出した原始タンパク質を再現に挑戦した。

研究成果の概要(英文)：How life emerged on the primordial earth is one of the most important questions in biology. Of special interest is the emergence of gene expression system where different molecular species (DNA, RNA and protein) are interdependently synthesized and controlled. In its evolutionary process RNA polymerase probably played a pivotal role. However, the detailed path how it evolved into such a giant molecule (molecular weight ~300,000) is unclear. It is impossible for such huge molecules to have emerged all of a sudden at a certain point of the history of life. Therefore, RNA polymerase must have been gradually evolved from a simpler protein by acquiring ancillary parts through its long evolutionary history. Here, we performed experimental trials for resurrection of the catalytic core of a primordial RNA polymerase by using structural and synthetic biology techniques.

研究分野：生命の起原および進化

キーワード：生命進化 構造生物学 RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

生命の起源は生命科学が解明すべき最も重要な謎のひとつである。この問いに答えるためには、生命現象を支える様々なタンパク質がどのように誕生してきたかを理解する必要がある。そこで、実験的に古代のタンパク質を再現し、その機能を探るという手法が考案されている。これまでに、様々な祖先型タンパク質が再構築され、そのタンパク質の性質から進化の歴史をさぐる研究が報告されてきた (Thornton JW, et al., *Science*, 2003; Finnigan G, et al., *Nature*, 2012 等)。

これらの研究では現存生物のアミノ酸配列比較から共通祖先のタンパク質のアミノ酸配列を予測し、予測された配列のタンパク質を実際に発現・精製してその性質を調べている。だが、生命の起源を探るうえでこの方法には大きな弱点があった。それは全生命の最終共通祖先 (Last Universal Common Ancestor, LUCA) 以前のタンパク質配列は種間の配列比較からでは (比較する配列がないので) 予測ができないという点である。しかし、細胞システムの根幹 (セントラルドグマ等) は LUCA の時点で既にほぼ完成しており、なおかつ多くの重要な酵素 (RNA ポリメラーゼ、リボソーム等) が大型化・複雑化されていたと考えられる (図 1)。すなわち、LUCA 以前に重要な細胞システムの進化過程があると考えられ、LUCA 以前の進化の筋道を探ることが生命の起源・根幹を探るうえで重要であると考えられた。

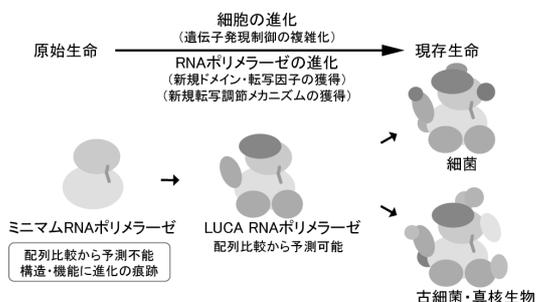


図 1. RNA ポリメラーゼの進化のシナリオ

2. 研究の目的

RNA ポリメラーゼは遺伝子発現調節の中核となる酵素で、巨大なタンパク質複合体である (分子量 30 万)。申請者はこれまでに RNA ポリメラーゼと転写因子の複合体の X 線結晶構造解析に成功し、転写因子による RNA ポリメラーゼの機能調整のメカニズムを明らかにしてきた (Tagami S, et al., *Nature*, 2010; Tagami S, et al., *GENES & DEVELOPMENT*, 2014)。これらの研究において、申請者は RNA ポリメラーゼの構造変化を分析し、RNA ポリメラーゼの立体構造が幾つかのモジュール

に分割できることを明らかにした (図 2)。

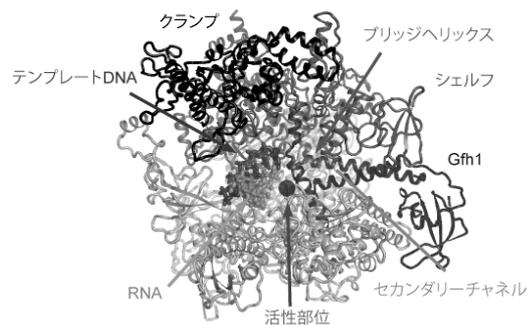


図 2. RNA ポリメラーゼと転写因子 Gfh1 の複合体の結晶構造 (PDB: 3A0H)

これらのモジュール (クランプ、シェルフ等) はお互いの相対位置を変化させて RNA ポリメラーゼの全体構造の変化を引き起こす。さらに全体構造の変化を活性部位付近のローカルな構造変化 (ブリッジヘリックス等) と同期することで、RNA ポリメラーゼの活性状態が制御されている。このような複雑かつ精巧な制御メカニズムは分子進化の長い歴史の到達点であるといえるが、そのような分子進化の過程を理解することは「分子によってどこまで複雑な機能が実現しうるのか」という化学の究極的な課題に取り組む助けにもなると考えられる。本研究では RNA ポリメラーゼの分子進化の過程を実験的に再構築し、生体高分子に見られる複雑な分子作用機序がどのように実装されてきたかを明らかにすることを目的とした。

近年盛んに行われているアミノ酸配列比較では LUCA 以前の進化にまで遡ることは難しい。そこで本研究では、RNA ポリメラーゼの構造・機能自体に進化の過程が内包されていると考え、分子進化実験から LUCA 以前の進化の歴史をさぐることにした。現存生物において RNA ポリメラーゼは多種多様な調節因子が相互作用するプラットフォームとなっているが、原始生命では遺伝子発現調節はもっと単純で、RNA ポリメラーゼも小さなタンパク質から進化してきたと考えられる。そこで、現存生物の RNA ポリメラーゼから本質的な活性に不要なドメインを切り詰めて原始 RNA ポリメラーゼを構築することで、生命誕生から LUCA に至るまでの RNA ポリメラーゼの構造・機能の進化の過程を実験的に再構築することを試みた。

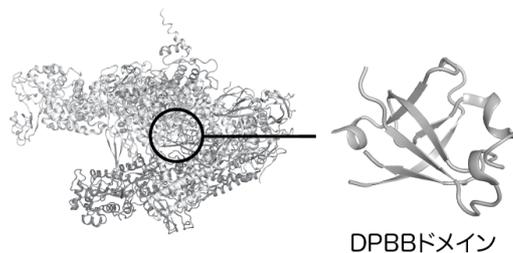
3. 研究の方法

現存生命の RNA ポリメラーゼは巨大なタンパク質 (分子量約 30 万) であるが、もともとはその中心部にある活性ドメイン (DPBB2, 約 100 アミノ酸) から進化してきたのだと考

えられている (図3, Iyer LM et al., BMC Struct Biol, 2003). そこで本研究ではまず既知の RNA ポリメラーゼの結晶構造から進化の途中で獲得したと考えられるインサーションを削っていくことで, RNA ポリメラーゼの巨大化の過程をモデル化した. さらに, 実験的にこれらのインサーションを順番に除いていくことによって, RNA ポリメラーゼの進化の過程を再現しようと試みたが, このような巨大なサブユニットの酵素をエンジニアリングすることは遺伝子操作やタンパク質発現の面で大きな困難を伴った. そこで, 方針を変更し, まずは現存の RNA ポリメラーゼの活性中心ドメイン (約 100 アミノ酸) のみを切り出した原始タンパク質を再現することにした.

4. 研究成果

まず現存の RNA ポリメラーゼから活性中心ドメイン (DPBB2) を短いインサーション (Dock) とともに切り出して発現させることを試みた. しかし, このような部分構造タンパク質の可溶性率は非常に低かった (図4, 図5左). そこで, 通常の祖先配列推定を行い, RNA ポリメラーゼの活性ドメインの細菌共通祖先配列や古細菌共通祖先配列の発現を試みた. しかし, このような共通祖先配列をもつタンパク質の可溶性は十分ではなかった (図5中央).



現存生命のRNAポリメラーゼ

図3. RNA ポリメラーゼ内に残る原始タンパク質ドメイン

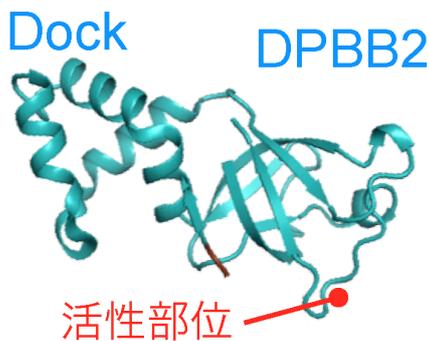


図4. RNA ポリメラーゼから切り出した活性ドメイン (DPBB2) とインサーション (Dock)

RNA ポリメラーゼのような巨大なタンパク質では, その活性中心ドメインはその他のドメインに取り囲まれている (図6). その為, 活性中心ドメインのみを切り出してくると, 周りのドメインとの相互作用に使われている疎水性残基が表面に露出してしまうことになる. 結果, 活性中心ドメインのみ切り出してきたタンパク質の可溶性率が低くなってしまったものだと考えられた.

そこで, これまでに報告されていた RNA ポリメラーゼの結晶構造をもとに, 活性ドメインを切り出すことで新たに露出した疎水表面に変異を導入していくことにした. この際に, 予測された共通祖先配列では疎水性アミノ酸になっている部位のいくつかを, 現存生命の何らかの種が同じ部位に保持している親水性アミノ酸によって置き換えた. この結果, 可溶性の高い活性ドメインを取得することに成功した (図5右). 今後, この活性ドメインが実際にどのような活性を持ちうるのかを合成生物学的手法によって明らかにすることが出来れば, RNA ポリメラーゼの初期機能・進化の経路を明らかにできるだろう.

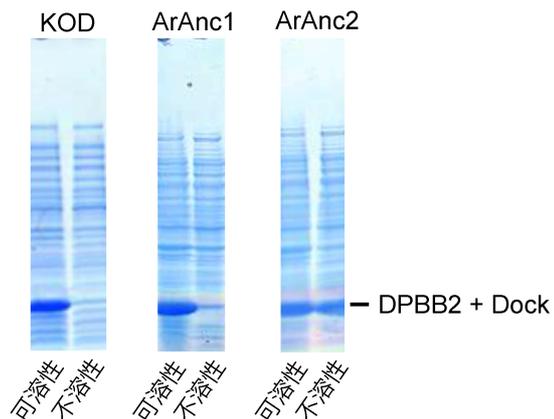


図5. DPBB2 + Dock の発現

KOD: *Thermococcus kodakarensis*

ArAnc1: 古細菌祖先型予測配列

ArAnc2: ArAnc2 に親水性残基を導入したもの

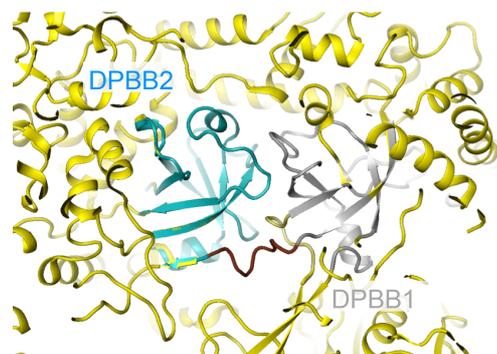


図6. RNA ポリメラーゼ内の活性ドメイン (DPBB2)

また、今回の実験で行った祖先配列測定と疎水表面残基の置き換えを組み合わせる方法は、より一般的に可溶性の低いタンパク質の性質改善に用いることが出来るかもしれない。

さらに、本研究では DPBB ドメインの性質を模倣する短いペプチドの作製にも挑戦した。DPBB ドメインは正電荷を多く持つ（すなわち核酸結合能を持つ） β ドメインであるが、本研究では親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸をうまく配置することで、正電荷を多く持つ β シートの形成に成功している。今後、このようなペプチドによる β シートによって RNA ポリメラーゼの活性部位のコンフォメーションを再現することが出来れば、RNA ポリメラーゼの進化の歴史をさらに遡り、単純なペプチドからどのように機能をもつタンパク質が進化してきたのかについての重要な示唆が得られると期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 2 件）

① 田上 俊輔，簡単なペプチドによるリボザイムの活性化，第 43 回 生命の起原および進化学会学術講演会

② 田上 俊輔，タンパク質と核酸の共進化の道筋を探る一鶏と卵はどちらが先か？一，第 3 回 Keio Astrobiology Camp 2018

6. 研究組織

(1)研究代表者

田上 俊輔 (TAGAMI, Shunsuke)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス基盤技術研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：40586939