

平成21年4月24日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18379001

研究課題名（和文）

Operational RNA Codeとリボスイッチから見た遺伝暗号の起源

研究課題名（英文）

Origin of the genetic code from a viewpoint of operational RNA code and riboswitches

研究代表者

田村浩二（TAMURA KOJI）

東京理科大学・基礎工学部・准教授

研究者番号：30271547

研究成果の概要：本研究は、これまで謎のままとされてきた遺伝暗号の成立過程に果敢にチャレンジするものである。現在の生物系における、tRNAのアミノアシル化とリボスイッチに実際に見られる形態をもとに、そこから過去にさかのぼって、遺伝暗号システムの進化を探る立場を取る。具体的には、(1) Operational RNA Codeとして典型的であるtRNA^{Ala}のAla特異性とG-U塩基対の存在の必然性、および、(2) Glyを認識するリボスイッチをもとにした遺伝暗号システムの進化、をメインに研究を進め、分子認識メカニズムに迫った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,100,000	0	10,100,000
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	1,500,000	16,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：生命起源

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝暗号は、真正細菌、古細菌、真核生物という現在の生物界で、基本的に共有されている。遺伝暗号は、RNAとアミノ酸という異質のものを特異的に対応させるものであり、現在の生物系においては、アミノアシルtRNA合成酵素と呼ばれる酵素が、特定のtRNAとアミノ酸のペアを間違いなく選び出すことにより成り立っているが、進化の過程でどのようにこの対応関係が生み出されてきたのか、という問題は、生命の誕生におけ

る最大の謎である。tRNAのアクセプターシステム中の塩基対がアミノ酸の特異性を決めている場合があり、通常の遺伝暗号に先立つ、「Operational RNA Code」という概念をも生み出しているが、その存在の必然性の根拠は知られていない。

(2) Cech、Altmanらによるリボザイムの発見に引き続き、Szostak、JoyceらによってRNAの試験管内選択の手法が開発された。この手法により、数々の結合活性を持った「アダ

マー」と呼ばれる人工 RNA が選択取得され、「RNA World 仮説」を裏づける証拠の1つと考えられてきた。しかし、常に言われ続けて来た批判は、そのような人工アプタマーに対応するような RNA が、実際の生物系に見られるのか？という問題であった。これに答えを与えたのは、Breaker らによる「リボスイッチ」の発見である。「リボスイッチ」の発見により、生物内には、小分子を認識する天然のアプタマーの存在が明らかになった。特に、最小のアミノ酸である Gly をエフェクターとするリボスイッチの発見は注目に値する。しかし、この Gly を認識するリボスイッチの機能解明の詳細や、更に、リボスイッチと遺伝暗号の起源を関連づけるというような試みは行われていない。

2. 研究の目的

(1) 遺伝暗号の成立の謎を解明するために、現在のtRNAおよびGlyを認識するリボスイッチに現実に含まれる要素に着目し、その物理化学的相互作用に立脚した解析を行う。

(2) 遺伝暗号の科学は、人工蛋白質の開発などへの発展性を秘めた、魅力ある学問でもある。本研究によって、遺伝暗号に関する新たな知見を得、これをベースとした技術開発への礎も築く。

3. 研究の方法

tRNA のアミノアシル化とリボスイッチに実際に見られる形態をもとに、そこから過去にさかのぼって、遺伝暗号システムの進化を探る立場を取る。具体的には、

(1) tRNA^{Ala}のAla特異性とG-U塩基対の必然性について

(2) Gly を認識するリボスイッチをもとにした遺伝暗号システムの進化について

をメインに研究を進めた。

(1) 現在のtRNAのアミノアシル化の中間体であるアミノアシル-AMPをミミックしたアミノアシル-リン酸-オリゴヌクレオチドを用いることにより、ミニヘリックス (tRNA) のアミノアシル化は、アミノアシルtRNA合成酵素を使用することなく起こる。この系において、tRNA^{Ala}のアクセプターステム中に存在し、Alaの特異性に重要なG-Uウォブル塩基対を、アミノアシル-リン酸-オリゴヌクレオチ

ドと相互作用 (塩基対形成) するRNAの配列中に有するようにデザインすることにより、直接的で特異的な相互作用形態の検出を試みた。

(2) Glyを直接認識できるというグリシンリボスイッチの特徴に注目し、現在のtRNA^{Gly}のアミノアシル化の中間体であるGly-AMPをグリシンリボスイッチと反応させた。そして、この反応によって、Glyがリボスイッチ部分にエステル結合を介して結合した形態が得られるかどうかを検証した。この形態は、アミノアシル化されたtRNAの存在形態と酷似している。また、*in vitro* selection法 (SELEX法) による分子取得の試みも行なった。

4. 研究成果

(1) tRNAのアミノアシル化反応では、アミノアシルtRNA合成酵素により、まず、アミノ酸が「アミノアシルAMP」という形に活性化される。そして、次に、この活性化アミノ酸がtRNAに転移されることによって反応が完結する。本研究で利用した反応形態は、無酵素的なアミノアシル化の方法である。tRNAに共通して存在する3' 末端のCCA配列、および、Ala-AMPをミミックした「Ala-リン酸-オリゴヌクレオチド」の双方に相補的な架橋オリゴを用いることによって、AlaがtRNAにアミノアシル化されることが分かった。このAla-リン酸-オリゴヌクレオチドと相補的な架橋オリゴの間に、G-U塩基対を導入すると、Alaのミニヘリックスへのアミノアシル化反応は起こらず、AlaはG-U塩基対が構成するポケットにトラップされる現象が観測された。これらの結果は、進化の初期において、G-U塩基対がAlaを直接認識した可能性を示唆するものである。

さらに、Operational RNA Codeの認識と進化に、特に重要であると考えられる、ナノアーキア (*Nanoarchaeum equitans*) のアミノアシル化過程を解析する試みも開始した。ナノアーキアは最小のゲノムサイズを持つ古細菌であり (約50万塩基対)、そのtRNAやアミノアシルtRNA合成酵素の中には、対応する遺伝子が2つに分断されているものが存在している。アラニルtRNA合成酵素 (AlaRS) 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、大腸菌内でこれらのタンパク質の発現系の構築に成功した。そして、tRNAトランスクリプトを基質としたアミノアシル化活性を確認した。

(2) 生命の進化の初期段階には、RNAが遺伝情報と機能の両面での役割を果たしていたであろうという「RNA World」が存在していたと考えられている。この立場からは、原始のtRNAは、タンパク質の介入なしに直接アミノ酸を認識し、アミノアシル化を行っていたということになる。そこで本研究では、この仮説の検証を念頭におきながら、最小のアミノ酸であるGlyを自己アミノアシル化するRNAを、進化分子工学的手法で取得し、その構造と機能の関係を明らかにすることを目指した。グリシンリボスイッチは209ヌクレオチドからなるオン型のリボスイッチである。Glyを認識する天然のアプタマーの部分は、隣接した2つのRNAモチーフで構成され、これらが協同的に2つのGly分子に結合し、Gly切断に関与しているオペロンをオンにしているが、これらの隣接したRNAモチーフそれぞれにGlyが結合することが示されている。本研究では、tRNAを念頭におき、1つのGlyを認識するように、グリシンリボスイッチのタンデム構造の一方である1~109ヌクレオチドの部分を利用した。そして、Gly-AMPによるGly-RNA生成実験を行った。

Gly-AMPを、GlyとAMPからDCCを用いて化学合成し、これをグリシンリボスイッチと反応させることにより、アミノアシル化されたtRNAと同様の分子が生成されるかを検証した。しかし、そのような分子は検出されなかった。次に、グリシンリボスイッチのGly認識に重要な部位以外に、28ヌクレオチドのランダム配列を導入したRNA (N28) を用いて、*in vitro* selection法 (SELEX法) による試みも行なったが、目的RNAは取得されなかった。

そこで、第2のアプローチの立場から、グリシンリボスイッチとは無関係に、70ヌクレオチドのランダム配列RNAを出発物質とし、SELEX法による自己アミノアシル化RNAの創出を試みた。セレクションの過程においては、グリシル化されたRNAのGlyのアミノ基を Sulfo-NHS-SS-BiotinでBiotin化し、BiotinのStreptavidin-Agaroseへの結合性を利用した。そして、トラップされたRNAをDTTによるS-S結合の還元切断反応を用いて回収し、逆転写、PCR増幅、転写という一連の操作を経て、活性のあるRNAを取得した。これらのセレクションサイクルを11回行なうことにより、Gly-AMPと結合し、自己アミノアシル化するRNAを得ることができた。得られたRNAのシーケンスを調べたところ、配列が2つのグループに収束していることがわかった。第一グループの配列に関しては、二次構造の

予測においてtRNAと類似した形状を得られ、原始のアミノアシル化がRNAのみで行なわれていたという可能性を強く示唆している。これらの結果は、RNAのみから構成される分子が、現在のアミノアシルtRNA合成酵素 (タンパク質) と同様な活性を持ちうることを示しており、「RNA World」の有力なサポートになると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Tamura, K. "Mechanism of chiral-selective tRNA aminoacylation and the origin of amino acid homochirality" *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 415-416 (2008), 査読無.
- ② Tamura, K. "Origin of amino acid homochirality: Relationship with the RNA world and origin of tRNA aminoacylation" *BioSystems*, **92**, 91-98 (2008), 査読有.
- ③ Tamura, K. and Schimmel, P. R. "Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix: Mechanistic features and chiral suppression" *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 13750-13752 (2006), 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Tamura, K. "Mechanism of chiral-selective tRNA aminoacylation and the origin of amino acid homochirality" Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、平成20年9月8日-12日、京都大学
- ② 田村浩二 "オペレーショナルRNAコードの立体化学的基盤" 生命の起原および進化学会第33回学術講演会、平成20年3月18日、東京薬科大学
- ③ 田村浩二 "tRNAのアミノアシル化の起

源とアミノ酸のホモキラリティーの誕生” 無細胞生命科学研究会 第2回研究会、平成19年10月19日、東京大学柏キャンパス

〔図書〕(計 1 件)

- ① 田村浩二、株式会社エヌ・ティー・エス 生物の科学 遺伝 9月号「RNAワールドから見たアミノ酸のホモキラリティーの誕生」、2008年、総ページ数5ページ (pp. 92-96)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/TAMU/kojitamuralab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 浩二 (TAMURA KOJI)
東京理科大学・基礎工学部・准教授
研究者番号：30271547

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者