

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370042

研究課題名(和文) 3' から 5' 方向への鋳型依存 RNA 伸長反応を行う酵素 Thg1 の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the enzyme Thg1 which catalyzes template-dependent RNA chain elongation in the 3'-5' direction

研究代表者

田中 勲 (TANAKA, Isao)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：70093052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000 円

研究成果の概要(和文)：真核生物型Thg1とtRNA(His)との複合体の構造解析を行い、Thg1がtRNAのCCA末端とアンチコドン認識して結合すること、DNA/RNAポリメラーゼと類似した活性部位に対し、tRNA鎖はDNA/RNAと逆の方向から結合することを明らかにした。また鋳型依存的に付加反応を行う原核生物型Thg1の解析では、Thg1はtRNA(Phe)の肩部分を認識して結合すること、GTPホモログ(GDPNP)を反応部位に挿入すると、tRNAとワトソン・クリック型の塩基対を形成し、5'末端の鎖が動いて伸長反応可能な構造に至ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The structure analysis of the complex of Thg1 from eukaryote which catalyzes G-1 addition of tRNA(His) in template-independent manner, with tRNA(His) revealed that tetrameric Thg1 binds to two tRNA(His) molecules by recognizing CCA terminus and anticodon region, and that tRNA chain accesses to the reaction site from the opposite direction to that of DNA/RNA polymerase. Subsequent analysis of the complex of prokaryote Thg1 which catalyzes template-dependent nucleotide addition reaction, with tRNA(Phe) revealed that the Thg1 recognizes the shoulder region of the tRNA rather than the anticodon region, and that this binding mode is changed to that for the G-1 addition reaction when the anticodon is changed to that of tRNA(His). Furthermore, when GTP homologue (GDPNP) was inserted in the reaction site, the inserted base formed the Watson-Crick base pair with the tRNA base, while the 5' end of the tRNA chain moved and resulted in the formation of the structure for the extension reaction.

研究分野：X線結晶学，構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 tRNA修飾 アミノアシル合成酵素 グアニン転移酵素 岡崎フラグメント 鋳型依存伸長反応 逆向き重合

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報をタンパク質のアミノ酸配列に正確に変換するためには、正しい組み合わせのアミノアシル tRNA が合成されなければならない。このために、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)は、アミノ酸とそれに対応する tRNA を厳密に識別している。多くの aaRS は、識別のために、アンチコドン塩基と 3'末端付近に位置するディスクリミネータ塩基(73番)を利用する。この点においてヒスチジンの tRNA (tRNA^{His}) は例外である。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 (G₁ と呼ぶ) が存在し、この G₁ が識別に利用されている。

tRNA^{His} に G₁ が付加される過程については、原核生物と真核生物とでは、大きく異なっている。原核生物の場合、G₁ は元々ゲノム上にコードされているが、真核生物では、tRNA^{His} guanylyltransferase (Thg1) によって G₁ が新たに付加される (図1)。Thg1 による G₁ の付加反応では、①まず基質 tRNA^{His} のアンチコドン部位を厳密に認識して結合する。②次に ATP を用いて tRNA^{His} の 5'末端リン酸基をアデニル化し活性化する。③最後に、アデニル化された 5'末端リン酸基にグアニン (G₁) が付加される⁽¹⁾。興味深いことに、真核生物由来 Thg1 は、*in vitro* で tRNA^{His} のディスクリミネータ塩基に変異を導入した場合、G 以外の塩基を -1 位に付加すること、さらに、-2 位、-3 位へも (すなわち通常とは逆向きに) 鋳型依存的に (ただし G, C のみ) RNA を伸長する能力を持つことが明らかになっている (図2)⁽²⁾。3'から 5'方向 (3'-5'方向) へ伸長する DNA ポリメラーゼが存在しないために、DNA 複製時に岡崎フラグメントが形成されることは良く知られている。したがって、限定的であるにしても、3'-5'方向へ伸長する能力を持つ RNA ポリメラーゼの発見は、生命の誕生に関連して極めて興味深く、非常に注目されている。さらに近年、原核生物の一部には、真核生物が持つ Thg1 (euThg1) とは異なる性質を持つ Thg1 (proThg1) が存在することも明らかになった^(3, 4)。最も注目すべきは、proThg1 では 3'-5'方向の RNA 伸長反応に対し全種類の塩基を基質に使用できることである。すなわち、proThg1 は、より汎用的な鋳型依存 RNA 伸長能力を持つ。

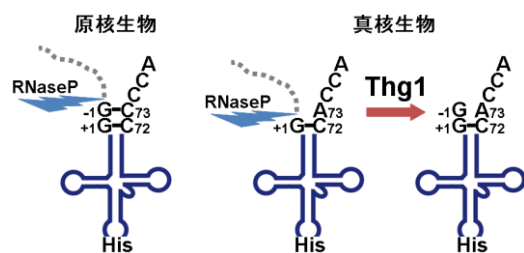


図1. G₁を持つ tRNA^{His} の成熟



図2. Thg1 による 3'-5' 方向への鋳型依存的 RNA 伸長

2. 研究の目的

ヒト由来 euThg1 のアポ体、および dGTP 複合体の構造解析は、Hyde らによって報告されている⁽⁵⁾。それによると、Thg1 は 4 量体として機能する。興味深いことに、euThg1 の活性部位の構造は、DNA/RNA ポリメラーゼの活性部位に高い構造相同性を示す。このことから、Thg1 は、DNA/RNA ポリメラーゼの祖先型が tRNA^{His} 特異的に G₁ を付加するよう進化したものであると示唆された。しかし、tRNA^{His} 複合体の構造解析が行われていないため、最も注目されている 3'-5'方向 RNA 伸長反応機構の解明はできていない。一方、研究代表者らは、これまでに真菌由来 euThg1 のアポ体、ATP および GTP 複合体の構造解析に成功している (図3)。さらに ATP および GTP 複合体の結合様式の違いから、proThg1 と euThg1 の tRNA^{His} 活性化機構の違いに関する新たな知見を得ており、euThg1 および proThg1 変異体を作製し、両酵素の反応特異性の違いを構造から説明するための研究を開始した。同時に、tRNA^{His} の大量調製系の構築を行い、euThg1-tRNA^{His} 複合体の結晶化にも取り組み、既に初期結晶を得ている (図4)。

現在、多くの研究者は Thg1 が持つ 3'-5'方向 RNA 伸長反応に注目しているが、現状では Thg1 の本来の反応機構である G₁ 付加反応すらその詳細が解明されていない。その一番の原因は、Thg1 の基質である tRNA^{His} との複合体の立体構造解析が全く進んでいないためである。そこで、本研究では現在初期結晶の得られている euThg1-tRNA^{His} 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにすることを第一の目標とする。同時に proThg1 の単体および tRNA^{His} 複合体の X 線結晶構造解析にも取り組み、最終的には euThg1 と proThg1 の構造と反応機構を明らかにし、それらを DNA/RNA ポリメラーゼと比較することで、鋳型依存 DNA/RNA 合成の分子生物学の新しい展開を図る。

Thg1 は、3'-5'方向へ鋳型依存的に RNA を伸長する唯一の酵素である。その活性部位の構造が 5'-3'方向 DNA/RNA ポリメラーゼとの間に相同性を有していることから、Thg1 の 3'-5'方向の RNA 伸長反応機構を解明し、すでに構造機能解析の進んでいる 5'-3'方向 DNA/RNA ポリメラーゼの反応機構と比較することで、鋳型依存 DNA/RNA 合成の進化、あるいは、両酵素の共通部分から、初期生命

が初めに獲得した鋳型依存 DNA/RNA ポリメラーゼに迫ることができる。遺伝情報の保存と複製がどのようにして始まったのか、生命誕生の謎を解明する上で、本研究は、非常に重要で全く新しい手掛かりを与える可能性を持つ研究課題である。

DNA/RNA ポリメラーゼは生命の遺伝情報の保存・複製に関わる重要な酵素であり、分子生物学上の重要な鍵酵素として研究が行われてきたが、同時に、現在では分子生物学研究に欠かすことのできない「道具」としても利用されている。本研究により Thg1-tRNA^{His} 複合体の立体構造解析から 3'-5'方向の RNA 伸長反応に対し構造基盤を確立することができれば、試験管内進化法などと組み合わせることにより、将来的には、分子生物学の新たな「道具」を創成する方向への展開も期待できる。

<参考文献>

- (1) Gu, W, *et al.* (2003) *Genes Dev.* **17**, 2889-2901
- (2) Jackman JE. and Phizicky EM. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8640-8645
- (3) Abad, M. G., *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 674-679
- (4) Rao, B. S., *et al.* (2011) *Nucl. Acid Res.* **39**, 1833-1842
- (5) Hyde, S. J., *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 20305-20310

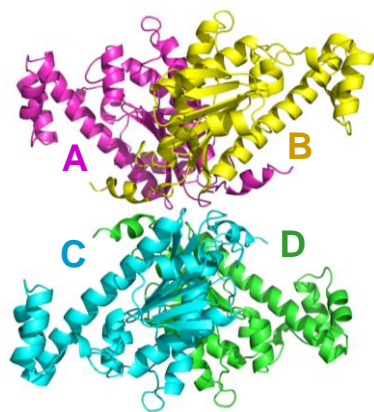


図3. 真菌由来 Thg1 の 4 量体構造

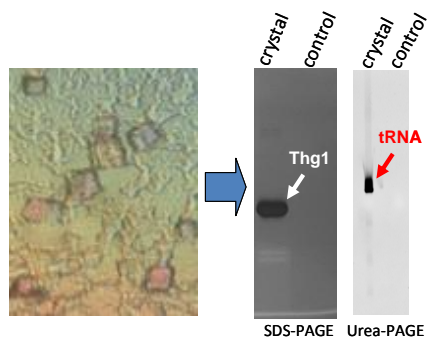


図4. 真菌由来 Thg1-tRNA^{His} の結晶とその電気泳動写真

3. 研究の方法

(1)真核生物由来 euThg1-tRNA^{His} 複合体の構造機能解析

①euThg1-tRNA^{His} 複合体の構造解析

euThg1 の大量調製系は既に確立済みであり、His タグを融合させた euThg1 を Ni-アフィニティークロマトグラフィーで精製後、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過で精製することにより高純度でかつ大量の euThg1 を得ることができる。タンパク質の精製には当研究室に既存の高速クロマトグラフィーシステムを使用する。

tRNA^{His} の大量調製系も既に確立済みである。tRNA^{His} は T7 RNA Polymerase を用いた *in vitro* transcription により大量調製し、Urea-PAGE ゲルからの切り出し後、高速クロマトグラフィーシステムを用いて陰イオン交換樹脂で精製する。

euThg1-tRNA^{His} 複合体は、それぞれ高純度に精製した euThg1 と tRNA^{His} の混合によって再構成する。その際、euThg1 と tRNA^{His} の安定な複合体を得るために、混合比の最適化を行う。混合比の検討には、後述の小角 X 線散乱および ITC による解析の結果も利用する。

現在までに、大量調製した euThg1-tRNA^{His} を用いて結晶化スクリーニングを行い、初期結晶を得ることに成功している。既に得られた初期結晶の条件に基づいて、結晶化条件の最適化を行う。まず、結晶化のスケールをアップして、pH、沈殿剤濃度と複合体の濃度の 3 次元で結晶化条件の最適条件を探索する。さらに、euThg1-tRNA^{His} 複合体を形成する際の混合比も変化させ、結晶化を行う。場合によっては、euThg1 および tRNA^{His} の調製法を再検討し、回折実験が可能な良質な単結晶を作製する。

良質な単結晶が得られた場合には、X線回折実験を行う。その際の子備実験は、本研究室に既存の X線回折装置を用いて行い、回折データの収集はシンクロトロン放射光施設 SPring-8 と PF を利用する。構造因子の初期位相は、現在得られている euThg1、PDB に登録されている tRNA 単体の構造を用いて分子置換法より決定する。分子置換法の計算が難航する場合には、euThg1 の Se-Met 置換体を作製し、Se-SAD 法あるいは tRNA のリン酸原子を利用した P-SAD 法を用いて位相の計算を行う。構造の精密化は、研究代表者らが開発した自動精密化プログラム LAFIRE を用いて行う。

平成25年度以降も引き続き、高分解能での euThg1-tRNA^{His} 複合体の構造解析を行う。euThg1-tRNA^{His} 複合体の調製は、平成24年度に行った SAXS および ITC を用いた会合状態の解析の結果を踏まえ、複合体を形成する条件を最適化し、高純度なサンプルを調製し、より良質な結晶を作製する。回折実験に適用できる良質な結晶を得ることができたら、シンクロトロン放射光施設にてデータ収集し、構造解析へ進める。

②構造情報を用いた変異体解析による euThg1 の G₁ 付加反応機構の解明

euThg1-tRNA^{His} 複合体の高分解能構造が得られた場合、その構造情報を用いて G₁ 付加反応機構を推測し、様々な変異体を作製しその仮説を証明する。変異体の作製に際し、euThg1 の tRNA^{His} 認識機構とアデニル化およびグアニル化反応機構と大きく2つに分け、tRNA^{His} の認識機構に関し euThg1-tRNA^{His} 複合体の高分解能構造が得られた場合、その構造情報を用いて G₁ 付加反応機構を推測し、様々な変異体を作製しその仮説を証明する。変異体の作製に際し、euThg1 の tRNA^{His} 認識機構とアデニル化およびグアニル化反応機構と大きく2つに分け、tRNA^{His} の認識機構に関しては、ITC および DSC を用いた熱力学解析と [α -³²P] ATP および [α -³²P] GTP を用いた生化学解析 (RI 実験) を行い tRNA^{His} 認識に重要なアミノ酸残基を特定する。アデニル化およびグアニル化反応機構の解析は主に [α -³²P] ATP および [α -³²P] GTP を用いた生化学解析を行い、変異体を評価する。最終的にそれぞれの結果をまとめることで、euThg1 の G₁ 付加反応機構の解明を行う。

③小角 X 線散乱 (SAXS) および ITC による euThg1 と tRNA^{His} 会合体の溶液状態の解析

euThg1 は溶液中で4量体を形成するが、現時点で、その4量体に何分子の tRNA^{His} が同時に結合するかは未知である。本研究では、様々な混合比で Thg1-tRNA^{His} 複合体を調製し X 線結晶構造解析を進めると共に、溶液中での euThg1 と tRNA 会合体の状態の SAXS による解析も並行して行う。4量体を形成した euThg1 の SAXS データと euThg1-tRNA^{His} 複合体の SAXS データを比較することにより、euThg1 の溶液中での分子間の配向やフレキシビリティについての情報が得られることが期待される。SAXS 実験は放射光施設 SPring-8 と PF にて行い、分子モデリングにはプログラム GASBOR を用いる。分子モデリングを行う際に、euThg1 および tRNA の立体構造を、SAXS より得られる動的な構造情報と併せることにより、euThg1 と tRNA^{His} の会合情報を得ることができる。

また、euThg1 と tRNA^{His} の結合比に関しては、本研究室に既存の ITC を用いて解析を試みる。ITC を用いることで、euThg1 と tRNA^{His} の化学量論比のみならず、結合定数も求めることができるため、結晶化の最適化が難航した場合、ITC を利用して euThg1 と tRNA^{His} が強固に結合するような変異体の探索を行うことも視野に入れている。

(2) 原核生物由来 proThg1 および proThg1-tRNA^{His} 複合体の構造解析

本研究の研究目的である Thg1 が持つ 3'-5' 方向 RNA 伸長反応機構解明を行うために、proThg1 のおよび proThg1-tRNA^{His} の構造解析は必須である。そのため、tRNA^{His} の大量調製系を平成 24 年度に構築する。好熱古細菌、メタン産生古細菌および真正細菌由来 proThg1 をターゲットとし、大腸菌を用いた

大量発現系を構築する。その後、可溶化効率および安定性などを指標にターゲットを絞り、精製系を確立する。大量かつ高純度に proThg1 が調製できた場合、同生物由来 tRNA^{His} の大量調製系の検討を行う。その際、既に確立された真核生物由来 tRNA^{His} の調製系を参考に、T7 RNA Polymerase を用いた *in vitro* transcription により調製する。

平成 24 年度で構築した proThg1 の大量調製系により、proThg1 を大量かつ高純度に精製し、結晶化条件の探索を行う。結晶化の初期スクリーニングは市販のキットを用い、約 600 条件で行う。その際、当研究室に既存の自動蛋白質結晶化ロボットモスキートを用いて少量のサンプル (100nl/ condition) で大量の条件を短時間に自動的にスクリーニングする。初期結晶が得られた場合には、結晶化のスケールをアップして、pH、沈殿剤濃度と複合体の濃度の3次元で結晶化条件の最適条件を探索する。場合によってはサンプル調製法の再検討を行う。proThg1-tRNA^{His} 複合体は、euThg1-tRNA^{His} 複合体と同様の方法で大量調製する。大量調製した proThg1-tRNA^{His} 複合体は proThg1 単体と同様に結晶化、回折実験を行う。回折実験に適用できる良質な結晶を得ることができたら、シンクロトロン放射光施設にてデータ収集し、構造解析へ進める。

(3) Thg1 の 3'-5' 方向 RNA 伸長反応機構の解析 ① euThg1 と proThg1 の立体構造比較

euThg1 および proThg1 の立体構造解析に成功した場合、両者の立体構造比較を行い、3'-5' 方向 RNA 伸長反応の違いを考察する。euThg1-tRNA^{His} 複合体の構造機能解析により明らかにした、G₁ 付加反応部位を中心に構造比較を行い、3'-5' 方向 RNA 伸長反応に関与すると考えられるアミノ酸残基を同定する。また、euThg1 は G または C のみを基質とし、proThg1 はすべての塩基を基質に使用できる。この基質特異性の違いも両者の立体構造比較から推測する。さらに、euThg1-tRNA^{His} 複合体の立体構造から求めた tRNA^{His} 認識部位についても構造比較を行う。

② 変異体解析による 3'-5' 方向 RNA 伸長反応機構の検証

euThg1 と proThg1 の立体構造比較から見出した、3'-5' 方向 RNA 伸長反応に関与すると考えられるアミノ酸残基に変異を導入し、3'-5' 方向 RNA 伸長反応活性測定を行い、仮説の検証を行う。さらに、euThg1 と proThg1 の両者に 3'-5' 方向 RNA 伸長反応部位を相補する変異を導入し、3'-5' 方向の RNA 伸長反応活性が相補するかも合わせて検討する。また、euThg1 と proThg1 の基質特異性の違いも変異体を作製し、生化学実験により明らかにするとともに、ITC および DSC を用いて熱力学解析も行うことで、基質認識機構をより詳細に解析する。最終的には Thg1 が持つ 3'-5' 方向 RNA 伸長反応機構の全体像を明らかにし、Thg1 の試験管内進化を行うための構造基盤を確立する。

4. 研究成果

研究計画に基づき、平成 24 年度には euThg1-tRNA^{His} 複合体の構造解析を重点的に行った。その結果、Thg1-tRNA^{His} 複合体の構造を 3.6Å 分解能で解明する事に成功し、同時に ATP との複合体の構造を 2.4Å 分解能で明らかにした。得られた構造では、2 分子の tRNA が 4 量体の Thg1 と結合しており、1 分子の tRNA は 3 分子の Thg1 と相互作用をしている。このサブユニットにまたがる結合が、小さな Thg1 分子がアンチコドンと CCA 端という tRNA 分子の両端を認識することを可能にしている。また Thg1 の活性部位の構造は、通常の鋳型依存 DNA/RNA ポリメラーゼと類似しているが、tRNA は DNA/RNA と比べて反対の方向から活性部位に近づいている。これにより類似の活性部位を用いながら、逆向きの伸長が可能になる。また、原核生物型 Thg1 についても、発現、精製、結晶化に成功し、その構造を 3.1Å 分解能で解明した。

平成 25 年度は、3.1Å 分解能で解析した原核生物型 Thg1 (proThg1) の構造の精密化を終了させ、得られた proThg1 の構造を、euThg1-tRNA 複合体の構造と重ね合わせて構造比較を行った。proThg1 では、euThg1 において tRNA のアクセプターステムを認識するヘリックス $\alpha 5$ が、活性部位に向かって 4.8Å 内側に配置していた。このヘリックス $\alpha 5$ により、tRNA のアクセプターステムが Thg1 内部により深く押し込まれ、5'末端の+3 位まで欠失した tRNA に対するヌクレオチド付加が可能になると考えられた。さらに、tRNA^{His} 複合体 (proThg1-tRNA^{His} 複合体) の結晶化にも成功し、構造解析を進めた。

平成 26 年度は、原核生物型 Thg1 と tRNA^{Phe} の複合体 (proThg1-tRNA^{Phe} 複合体) の立体構造を分解能 2.21Å で決定し、proThg1 は tRNA^{Phe} のアンチコドン部を認識せずに結合すること、アンチコドンを His のものに変えた tRNA 変異体に対しては、G-1 付加型の結合が変わることを明らかにした。さらに、活性部位に GTP ホモログ (GDPNP) を挿入した反応中間体の構造も 2.70Å の分解能で決定し、塩基部分はタンパク質と相互作用をしておらず、tRNA とワトソン・クリック型の塩基対を形成していることを明らかにした (図 5)。これにより proThg1 による tRNA 鋳型依存ヌクレオチド伸長機構を、構造に基づいて説明することに成功した。3'-5'方向の合成反応の詳細を含め、現在、本研究で得られた成果を取りまとめた論文を準備している。

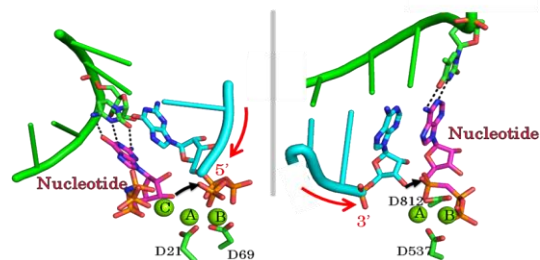


図5. 3'→5'方向にtRNAを伸長するproThg1(左)と、5'→3'方向へ伸長するT7 RNA polymerase(右)の反応構造の比較。相同な反応部位に対して、基質であるRNA鎖は逆向きに侵入する。さらにヌクレオチドが相補鎖との間で塩基対を形成することで反応構造に至る。反応に関与するマグネシウム(A, B, C)と、それに配位する保存アスパラギン酸残基も示した。

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1件)

1. Akiyoshi Nakamura, Taiki Nemoto, Ilka U. Heinemann, Keitaro Yamashita, Tomoyo Sonoda, Keisuke Komoda, Isao Tanaka, Dieter Söll, and Min Yao, Structural basis of reverse nucleotide polymerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 20970-20975 (2013)
査読有, DOI: 10.1073/pnas.1321312111

[学会発表] (計4件)

1. 木村匠子, 鈴木干城, 于健, 薦田圭介, 田中勲, 姚閔, Thg1-like タンパク質の機能構造解析 (The functional and structural analysis of Thg1-like protein), 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25-27日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
2. Akiyoshi Nakamura, Taiki Nemoto, Isao Tanaka, Min Yao, Structural analysis of tRNA^{His} guanylyltransferase complexed with rRNA, XXIII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), 2014年8月5-12日, The Palais des congrès de Montreal (Montreal, Canada)
3. Akiyoshi Nakamura, Taiki Nemoto, Ilka Heinemann, Isao Tanaka, Dieter Söll and Min Yao, Structure of tRNA^{His} guanylyltransferase with substrate tRNA, The 9th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases in 2013 (AARS2013), 2013年10月6-11日, The Prince Hakone (神奈川県箱根町)
4. Akiyoshi Nakamura, Taiki Nemoto, Ilka Heinemann, Tomoyo Sonoda, Isao Tanaka,

Dieter Söll and Min Yao, Substrate recognition of tRNA^{His} guanylyltransferase Thg1, The 24th tRNA Conference, 2012年12月2-6日, Hosteria El Copihue (Olmue, Chile)

[その他]

北海道大学 X 線構造生物学研究室

ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 勲 (TANAKA, Isao)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・

特任教授

研究者番号：70093052

(2)研究分担者

姚 閔 (YAO, Min)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・

教授

研究者番号：40311518

(3)連携研究者

薦田 圭介 (KOMODA, Keisuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・

特任助教

研究者番号：40581640

(4)研究協力者

中村 彰良 (NAKAMURA, Akiyoshi)

木村 匠子 (KIMURA, Shoko)