

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291082

研究課題名(和文) RNAとアミノ酸：生命世界の非対称性の謎の解明

研究課題名(英文) RNA and Amino Acid: Elucidation of the Mystery of the Asymmetry of Life

研究代表者

田村 浩二 (TAMURA, Koji)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：30271547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：地球上の生命の非対称性(核酸はD型の糖から、タンパク質はL型のアミノ酸から構成されている)の起源に迫るため、RNAとアミノ酸とがはじめて出会うステップであるtRNAのアミノアシル化に注目し、研究を進めた。本研究代表者が発見した「RNAのキラル選択的アミノアシル化」の結晶解析によるメカニズム解明を目指したモデル分子の合成を行った。また、分子動力学を用いた最終産物のエネルギーも計算した。シアヌル酸の存在下で、D型天然ヌクレオチドの塩基のスタッキングに起因すると思われる溶液の粘度の変化を見て取ることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the origin of the asymmetry of life on Earth (nucleic acids are composed of D-sugars, whereas proteins are composed of L-amino acids), I focused on the process of tRNA aminoacylation that is the first encounter step between RNAs and amino acids. The model molecule synthesis based on "chiral-selective aminoacylation of RNA", which I discovered in 2004, for the purpose of performing X-ray crystallography was successful. In addition, comparison of the energies of the final products of the reaction was done by using molecular dynamics. I also found the change of the viscosity of nucleotide solution containing cyanuric acid.

研究分野：生体物質化学

キーワード：RNA アミノ酸 ホモキラリティー 起源

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上の生命は、極めて非対称性を持ったものとして存在しており、核酸はD型(右手型)の糖から、タンパク質はL型(左手型)のアミノ酸からのみ構成されている。しかし、この起源についての解答は与えられていない。

(2) RNA とアミノ酸とがはじめて出会うステップであるtRNAのアミノアシル化に注目し、本研究代表者は非酵素的にキラル選択的(L-アミノ酸優先的)に、RNA にアミノアシル化が起こる現象を発見したがこの反応における識別メカニズム、および、なぜRNAはD-リボースから構成されたのかという問題の解明にはほど遠い状況である。

2. 研究の目的

本研究では、RNA とアミノ酸のホモキラリティーの謎を解明するために、以下の2つの観点から研究を推進する。

(1) RNA のキラル選択的アミノアシル化の構造生物学的基盤の確立

(2) RNA がなぜD-リボースから構成されているのか、その起源へのアプローチ

これらを基に、生物がなぜL-アミノ酸を使うのかという生命の本質に迫る問いに対し、その起源と進化を明らかにし、分子識別のメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

(1) 安定的なアミノアシルリン酸結合アナログを含むヌクレオチドの合成を試みる。

(2) X線構造解析へ向けたアミノアシル化モデル分子の結晶化、および、エネルギー計算を行う。

(3) 回転・種々の溶媒条件下でのモノヌクレオチドのキラル選択的相互作用の検出、および、重合を試みる。

4. 研究成果

(1) 3体分子からなる「RNAのキラル選択的アミノアシル化」反応を模倣する1分子RNA(図1)の利用を検討した。このモデルに存在するアミノアシルリン酸結合は、非常に不安定であり、同じコンフォメーションを持つ安定結合(スルファモイル結合)を介したアナログ分子の合成を試みた。質量分析の結果、目的の質量を持つ分子が合成されていることが明らかになった(図2)

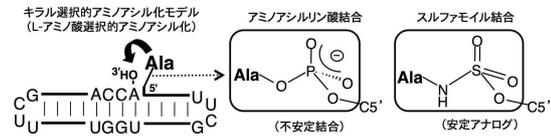


図1 キラル選択的アミノアシル化モデル

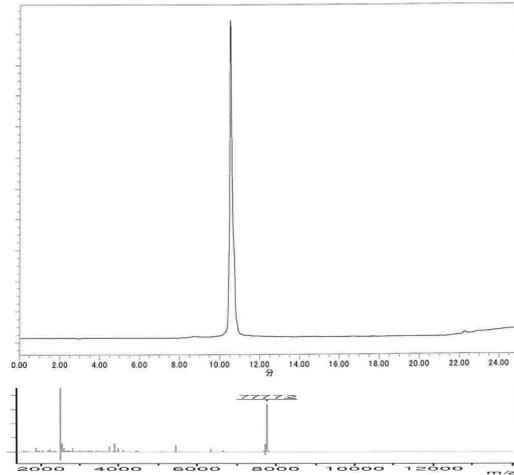


図2 安定アナログ分子の分析

(2) このモデル分子のX線構造解析に先駆けて、まずはアミノ酸を結合していない状態のRNAの結晶化への試みを行った。まだ十分な結晶までは得られていないが、微結晶の作製に成功した。今後、結晶化条件を精密化すると共に、L-、D-アミノ酸を結合した状態でのモデル分子(図1)の結晶化とX線構造解析を行い、キラル選択性の構造基盤を明らかにしていく。

(3) 「RNAのキラル選択的アミノアシル化」は、3'末端のアデノシンの3'-OHに起こる。最終産物のモデル分子として、3'-L-Ala-アデノシンと3'-D-Ala-アデノシンを取り上げ、これらの分子の自由エネルギーを、分子動力学を用いて計算した。その結果、3'-L-Ala-アデノシンの方が3'-D-Ala-アデノシンよりも、わずかにエネルギーが低いことが明らかになった(図3)。

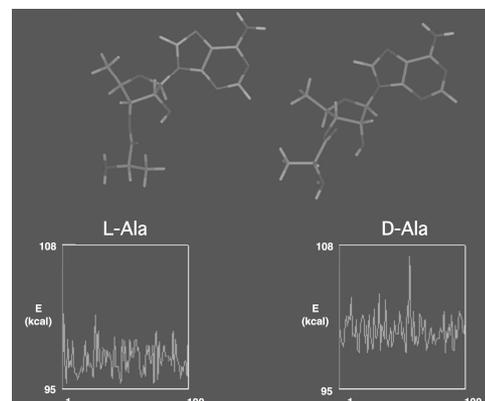


図3 3'-Ala-アデノシンのエネルギー

(4) D-リボースが選ばれた理由の解明に向けて、D-、L-モノヌクレオチドが「重合のために有利なコンフォメーションを取る」のはどのような条件が満たされた場合かを明らかにしていくことを調べた。重合した物質である D-、L-ジヌクレオチドの CD スペクトルは、塩基のスタッキングにより、モノヌクレオチドとは異なる特徴的なスペクトルを示すので、D-、L-モノヌクレオチドのスペクトルがいかなる条件のもとに、D-、L-ジヌクレオチドのスペクトルに近づくのか（これは即ち、重合のために有利なコンフォメーションを取っていることの指標になる）を検討した。セル内に渦（右回り、左回り）を発生させ、CD スペクトルの違いを観察した。ポルフィリンを用いた予備実験では、渦の向きによって、スタッキングの重なり方のキラリティーが変換することを確認したが、D-、L-モノヌクレオチドの場合には、スペクトルに違いを見出すことはできなかった（図 4）。一方、D-モノヌクレオチド（5'-pA）の 5'-リン酸基に 2-メチルイミダゾール基を付加した 5'-2-MeImpA を用いて、反応溶液中に渦（右回り、左回り）を発生させた場合の重合の解析、および、反応条件についての検討を詳細に行ったが、残念ながら、今のところ、渦の影響による重合の効果の違いは見出されていない（図 5）。

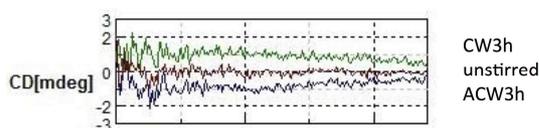


図 4 渦による CD スペクトルの変化

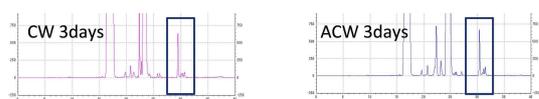


図 5 渦による HPLC プロファイルの変化

(5) CD スペクトル解析を用いた D 型天然ヌクレオチドのスタッキングの解析では、シグナルの質が十分でなく、確固たる結果を得るには至らなかったものの、シアヌル酸の存在下で、D 型天然ヌクレオチドの塩基のスタッキングに起因すると思われる溶液の粘度の変化を見て取ることでできた（ゲル様構造の生成）。図 6 はチューブ内のゲル様構造の生成の様子をチップの陥入度を目安に調べたものである。また、このゲル様構造の生成が、溶液内の陰イオンの存在に、大きく影響していることが示唆された。

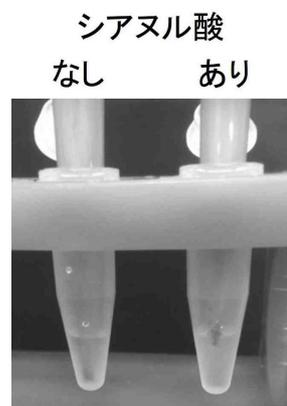


図 6 シアヌル酸による効果

(6) なぜ L でなく D-リボースから構成される RNA が選択されたのかについては、残念ながら、まだ解決までには至らなかった。しかし、この問題は、極めて重要なにも関わらず、過去の科学者もこれまでに答えを出せていない難問であることには違いない。今回の試みによって解答は得られないにしても、解答へのベクトルが正しい方向を向いているのかどうかについての示唆は得られた。少なくとも、現時点の実験条件では、自然はその答えを顕にしてくれていないことだけは確かだ。今後、より条件を検討して、この問題に引き続きチャレンジしていきたいと思う。しかしながら、ヌクレオチド重合におけるスタッキング形成を誘引する効果については、重要な知見が得られたと考える。実験によるきちんとした検証を今後の課題としていきたい。

## 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 7 件)

Tamura, K., Origins and early evolution of the tRNA molecule, *Life*, 査読有, 2015, 5, 1687-1699  
doi: 10.3390/life5041687

Tamura, K., Beyond the frozen accident: Glycine assignment in the genetic code, *J. Mol. Evol.*, 査読有, 2015, 81, 69-71  
doi: 10.1007/s00239-015-9694-8

Tamura, K., RNA evolution conjectured from tRNA and riboswitches, *Hypothesis*, 査読有, 2015, 13, e3  
<http://www.hypothesisjournal.com>

Kurihara, E., Uchida, S., Umehara, T. and Tamura, K., Development of a functionally minimized mutant of the R3C ligase ribozyme offers insight into the plausibility of the RNA world hypothesis, *Biology*, 査読有, 2014, 3,

452-465

doi: 10.3390/biology3030452

Komatsu, R., Sawada, R., Umehara, T. and Tamura, K. Proline might have been the first amino acid in the primitive genetic code, J. Mol. Evol., 査読有, 2014, 78, 310-312

doi: 10.1007/s00239-014-9629-9

Hamachi, K., Hayashi, H., Shimamura, M., Yamaji, Y., Kaneko, A., Fujisawa, A., Umehara, T. and Tamura, K. Glycols modulate terminator stem stability and ligand-dependency of a glycine riboswitch, BioSystems, 査読有, 2013, 113, 59-65

doi:10.1016/j.biosystems.2013.05.004

Umehara, T., Kitagawa, T., Nakazawa, Y., Yoshino, H., Nemoto, R. and Tamura, K. RNA tetraplex as a primordial peptide synthesis scaffold, BioSystems, 査読有, 2012, 109, 145-150

doi:10.1016/j.biosystems.2012.03.003

〔学会発表〕(計5件)

田村 浩二、キラリティーの起源における糖とアミノ酸の相互作用、生命の起原および進化学会第41回学術講演会、2016年3月15日、鳴門教育大学

Koji Tamura, Origins of tRNA and protein biosynthesis, “The International Seminar on the Origin of Life and Chemical Evolution of RNA” in Hiroshima Shudo University, 2015年10月30日、広島修道大学

田村浩二、RNAワールドから翻訳系の誕生、日本進化学会第16回大阪大会、2014年8月23日、高槻現代劇場

Kokoro Hamachi, Takuya Umehara, Koji Tamura, Domain structures and evolution of tRNA, aminoacyl tRNA synthetases, and riboswitches, AARS2013 2013 9th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 2013年10月6日, The Prince Hakone

田村浩二、ヌクレオチドとアミノ酸の相互作用とホモキラリティーの関係：立体化学的な視点、電気通信大学生命科学シンポジウム「生命システム原材料の起源と進化：生化学的禁制律」、2013年3月9日、電気通信大学

〔図書〕(計2件)

マット・リドレー(著)、田村 浩二(訳)、勁草書房、フランス・クリック：遺伝暗号を発見した男、2015年

田村 浩二、羊土社、生命分子を統合するRNA—その秘められた役割と制御機構、

2013年、23-29

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kojitamura.web.fc2.com/>

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・教授  
研究者番号：30271547

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：