

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251009

研究課題名(和文) RNA合成酵素複合体の分子構造進化基盤

研究課題名(英文) Mechanism and Evolution of RNA polymerases

研究代表者

富田 耕造 (Tomita, Kozo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：00345274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではtRNA末端を合成するCC-, A-, CCA-付加酵素、翻訳因子と複合体を形成するRNA合成酵素の反応分子機構を明らかにした。CC付加酵素では、tRNAがCC合成過程で酵素上を回転し、転移することによって1つの活性部位で2つのCが付加される機構を明らかにした。また、A付加酵素はtRNA上腕部の長さを測ることによって、末端のAが欠けたtRNAのみにAを付加する機構を明らかにした。また、CCA付加酵素には成熟tRNAと未成熟tRNAを識別する機構があることを明らかにした。さらに、S1蛋白質と複合体を形成するRNA合成酵素では、S1がRNA合成開始に必要な分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we focus on the molecular mechanism of RNA polymerizations by CC-, A-, CCA-adding enzymes and by RNA polymerase complexed with S1 protein. We clarified the mechanisms of CC-addition and A-addition by CC-adding and A-adding enzymes, respectively. We also clarify the mechanism by which CCA-adding enzyme discriminates mature tRNA from immature tRNA. We also clarified the molecular basis of replication initiation by using S1 protein in RNA polymerase complex.

研究分野：分子生物学、構造生物学

キーワード：RNA 構造 反応機構

### 1. 研究開始当初の背景

本申請課題では、蛋白質合成因子と複合体を形成して機能するウイルス RNA 合成酵素複合体、および、tRNA 末端を修復、合成する鋳型非依存的 RNA 合成酵素複合体の X 線結晶構造解析と機能解析を行い、これらの RNA 合成酵素群の反応分子基盤の全貌を明らかにする。これらの解析を通して RNA の機能が蛋白質へ委譲された分子進化基盤、RNA 合成システムから蛋白質合成システムへの分子進化基盤を提示し、生命進化における RNA ワールドから現在の DNA/蛋白質ワールドへ至る分子進化過程を記述することを目指した。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、I) Q $\beta$  ウイルス由来の RNA 依存性 RNA 合成酵素複合体(ホロ Q $\beta$  複製酵素複合体)の X 線結晶構造解析、機能解析を行い、リボゾーム蛋白質の RNA 合成における役割、ウイルスゲノム RNA の複製、転写の全解明を目指す。また、II) 真正細菌由来の鋳型非依存的 RNA 合成酵素である CC $^-$ 、A $^-$ 、CCA-付加酵素の tRNA との複合体の X 線結晶構造解析、機能解析を行い、CC $^-$ 、A $^-$ 、CCA-付加酵素の RNA 合成の動的分子基盤全貌を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本申請課題では以下の I)、および II) の研究を計画した。I) Q $\beta$  ウイルス由来の RNA 依存性 RNA 合成酵素(RdRp)であるホロ Q $\beta$  複製酵素複合体の X 線結晶構造解析、機能解析を行い、リボゾーム蛋白質の RNA 合成における役割、ウイルスゲノム RNA の複製、転写の全解明を目指す。また、II) 真正細菌・真核生物由来の鋳型非依存的 RNA 合成酵素である CCA 付加酵素(CC 付加酵素)の tRNA との複合体の X 線結晶構造解析、機能解析を行い、CCA 付加酵素の RNA 合成の動的分子基盤全貌を明らかにした。

### 4. 研究成果

以下の研究成果が得られた。

(1) 本研究では CC 配列合成過程を表した複数の酵素-RNA 複合体の X 線結晶構造解析、そして、それらをつなぎ合わせることによる CC 付加反応の動画の作成を行った。長年、鋳型非依存的な tRNA の 3' 末端の CC 配列の合成反応過程において、生化学的解析から tRNA は酵素上を動いたり、回転することはないと示唆されてきた。今回の解析から、CC 酵素が CC 配列を合成、付加していく過程での各反応ステージごとに、tRNA 分子は酵素の表面を動き、回転することが明らかになった。酵素上を RNA が動いて、回転をすることによって、ひとつの活性触媒ポケットを利用

して1番目のC付加反応と、2番目のC付加反応が同じ反応機構で進行することも明らかになった。さらに、CC配列が合成された後、tRNAがさらに後ろへ動き、回転することによって、tRNAはもはや酵素に結合することができず、酵素から解離することによりRNA合成が終結することも明らかになった。

(2) A付加酵素によるRNA合成(A付加反応)を表した酵素および酵素-tRNA複合体などを含む十二種類の構造を解析し、得られた構造を基に機能解析を行った。その結果、酵素にはtRNAの結合部位が一か所のみ存在し、L字構造をとるtRNAの肘の部分が酵素上のくぼみに結合することがわかった。そして、この酵素のくぼみを起点として酵素がtRNAの上部のRNAヘリックスの長さを測り、3'末端のAがかけたtRNAのみに一つのAヌクレオシドのみを付加することができることが明らかになった。

(3) 真正細菌由来のCCA付加酵素と末端にCCA配列をもつ成熟tRNAの複合体の構造を解析した。その結果、tRNAの酵素への結合様式は少なくとも2モード有り、末端が未成熟なtRNAと成熟化したtRNAとでは、酵素に対して異なる様式で結合することがわかった。これらの解析から、真正細菌由来のCCA付加酵素には末端が成熟したtRNAと未成熟のtRNAを識別する機構が存在することが明らかになった。

(4) リボゾーム蛋白質S1を含む、ウイルスゲノム複製能力を有するウイルスRNA合成酵素複合体の構造を解析した。生化学的な解析をも行うことによって、S1蛋白質はそのN末端側で、RNA合成酵素と結合していること、さらにRNA合成酵素と相互作用しないS1蛋白質中のRNA結合ドメインがウイルスゲノムの特定の領域を認識していることが明らかになり、複合体中のS1蛋白質のウイルスゲノム複製開始における役割の分子基盤が示唆された。

### 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 11 件)

1) Yamashita S, Takagi Y, Nagaike T, Tomita K.

Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase

*Nature Communications*, 2017 in press (査読有)

2) Kawasaki S, Fujita Y, Nagaike T, Tomita K., \*Saito H.

Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells

*Nucleic Acids Res.* 2017 in press (査読有)

### 3) Tomita K

A possible link between specific transfer RNA methylation and tumorigenic phenotype of breast cancer.

*RNA & DISEASE*, 4: e1530; doi:

10.14800/rd.1530, 2017 (査読有)

4) Martinez A, Yamashita S, Nagaike T, Sakaguchi Y, Suzuki T, \*Tomita K

Human BCDIN3D Monomethylates Cytoplasmic Histidine Transfer RNA.

*Nucleic Acids Res.* DOI:10.1093/nar/gkx051, 2017 (査読有)

5) Mannen T, Yamashita S, Tomita K, Goshima N, \*Hirose T.

The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL.

*J Cell Biol.* Vol. 214, pp45-59, 2016 (査読有)

6) Yamashita S, \*Tomita K

Mechanism of 3'-matured tRNA discrimination from 3'-immature tRNA by class-II CCA-adding enzyme.

*Structure* Vol. 24, No6, pp918-925, 2016 (査読有)

7) Yamashita S, Martinez A, \*Tomita K

Measurement of acceptor-TΨC helix length of tRNA for terminal A76-addition by A-adding enzyme.

*Structure* Vol. 22, No 5, pp830-842, 2015 (査読有)

### 8) Tomita K

Structures and Functions of Qβ Replicase: Translation factors beyond protein synthesis.

[Review in Special Issue: *Functions of the Transfer RNA* ]

*Int. J. Mol. Sci.* 15, 15552-15570;

doi:10.3390/ijms150915552; 2014 (査読有)

9) Takeshita D, Yamashita S & \*Tomita K

Molecular insights into replication initiation by Qβ replicase using ribosomal protein S1.

*Nucleic Acids Res.* Vol. 42, No16, pp10823-10831, 2014 (査読有)

10) \*Tomita K & Yamashita S

Molecular mechanisms of template-independent RNA polymerization by tRNA nucleotidyltransferases.

[Review in *Molecular Biology of the Transfer RNA Revisited* ]

*Front. Genet.* 5: 36. doi:

10.3389/fgene.2014.00036, 2014 (査読有)

11) Yamashita S, Takeshita D, \*Tomita K

Translocation and rotation of tRNA during template-independent RNA polymerization by tRNA nucleotidyltransferase.

*Structure* Vol. 22, No 2, pp315-325, 2014(査読有)

[学会発表] (計 15 件)

#### 1) Kozo Tomita

Methylation of 5' -phosphate of cytoplasmic tRNA<sup>His</sup> in human  
26th tRNA Conference (2016 9.4-8, Jeju, Korea) Invited

#### 2) Anna Martinez & Kozo Tomita

Recognition of tRNA<sup>His</sup> by tRNA<sup>His</sup> specific methyltransferase, ThMTase  
26th tRNA Conference (2016 9.4-8, Jeju, Korea)

#### 3) Seisuke Yamashita & Kozo Tomita

Mechanism of 3' -matured tRNA discrimination from 3' -immature tRNA by class-II CCA-adding enzyme  
26th tRNA Conference (2016 9.4-8, Jeju, Korea)

#### 4) Takashi Nagaike & Kozo Tomita

Regulation of Poly(U) Polymerase by Poly(ADP-ribose)  
21st Annual meeting of the RNA Society (2016 6.28-7.2 Kyoto International Conference Center, Kyoto Japan)

#### 5) Seisuke Yamashita & Kozo Tomita

Molecular Basis of A-addition by Aquifex aeolicus A-adding enzyme  
10th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases 2015AARS (2015.10.17-22, Barcelona, Spain)

#### 6) 高木悠友子、山下征輔、富田 耕造

U6 snRNA 特異的 TUTase (TUT1)による U6 snRNA 認識機構 第17回 日本 RNA 学会年会 (2015 7.15-17 ホテルライフオーブ札幌 北海道、札幌)

#### 7) 山下征輔、富田 耕造

Aquifex aeolicus A 付加酵素による A 付加反応の分子基盤 第17回 日本 RNA 学会年会 (2015 7.15-17 ホテルライフオーブ札幌 北海道、札幌)

#### 8) Kozo Tomita

Molecular mechanism of template-independent CCA-addition  
JAJ RNA (Joint Australia and Japan RNA meeting)  
(2014 11.02-05, Sydney, Australia)  
Invited

#### 9) Takashi Nagaike & Kozo Tomita

Regulation of Poly (U) Polymerase by ADP-ribosylation  
JAJ RNA (Joint Australia and Japan RNA meeting)  
(2014 11.02-05, Sydney, Australia)

#### 10) Seisuke Yamashita & Kozo Tomita

Molecular basis for CC-addition by Aquifex aeolicus CC-adding enzyme

25th tRNA Conference (2014 9.21-25,  
Kyllini Pelopponese, Greece)

**11) Daijiro Takeshita & Kozo Tomita**

Molecular mechanism of replication  
initiation of Q $\beta$  RNA by Q $\beta$  replicase

25th tRNA Conference (2014 9.21-25,  
Kyllini Pelopponese, Greece)

**12) 山下征輔、富田 耕造**

Aquifex aeolicus CC 酵素による CC 付加反応  
の分子基盤 第 16 回 日本 RNA 学会年会  
(2014 7.23-25 ウィンク愛知、愛知、名古屋)

**13) 竹下大二郎、富田 耕造**

Q $\beta$  レプリケースによるゲノム RNA 複製開始  
の分子基盤 第 16 回 日本 RNA 学会年会

(2014 7.23-25 ウィンク愛知、愛知、名古屋)

**14) 永池崇、富田 耕造**

ADP リボシル化によるポリ U 付加酵素の制御  
機構 第 16 回 日本 RNA 学会年会 (2014  
7.23-25 ウィンク愛知、愛知、名古屋)

**15) 山下征輔、富田 耕造**

CC 付加酵素による CC 配列合成の動的反応分  
子基盤 第 14 回 日本蛋白質科学会年会

(2014 6.25-27、ワークピア横浜、神奈川、  
横浜)

[図書] (計 2 件)

**1) 富田耕造、山下征輔**

古典的 ncRNA、tRNA の機能

「ノンコーディング RNA—RNA 分子の全体像  
を俯瞰する」

Dojin Bioscience 25、2016; 3-14. 化学同  
人

**2) 富田耕造、竹下大二郎**

Q $\beta$  レプリケースによる RNA 合成の分子基盤  
生化学、2014; 86(3): 391-395 日本生化学  
会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 耕造 ( TOMITA, Kozo )

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教  
授

研究者番号 : 0 0 3 4 5 2 7 4