



逆方向のヌクレオチド伸長反応の構造的分子基盤を初めて解明

研究成果のポイント

- ・ Thg1-tRNA 複合体の立体構造を決定し、Thg1 と tRNA の相互作用を明らかにした。
- ・ Thg1 のホモ 4 量体が 2 個の tRNA 分子と結合することを明らかにした。
- ・ G_{-1} 付加反応の分子機構の詳細を解明した。
- ・ 通常の 5' -3' 方向の DNA ポリメラーゼと同様の触媒コアを持つにもかかわらず、逆方向のヌクレオチド伸長反応を行う分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要

DNA や RNA の合成は細胞が生命を維持するために必須の反応ですが、この反応は一方方向 (5' -3' 方向) にしか進みません。言い換えれば逆向きに進める酵素は存在していません。そのため DNA 合成の際に、岡崎フラグメント*が作られることは分子生物学の分野ではよく知られた事実です。tRNA^{His} guanylyltransferase (Thg1) は tRNA^{His} の 5' 末端にグアニル基 (G_{-1}) を付加する (3' -5' 方向の伸長反応) 酵素です。興味深いことに、この Thg1 の活性部位は通常の DNA/RNA ポリメラーゼの活性部位と共通な構造を持っています。私たちの構造解析によって、Thg1 の G_{-1} 付加反応の分子機構の詳細を解明しました。また、Thg1 が DNA/RNA ポリメラーゼと同じ構造を持ちながら RNA を逆方向へ伸長させる能力を持っている理由が明らかになりました。簡単に言えば、2つの酵素は基質である DNA/RNA が互いに反対方向から侵入するようになっていました。今回の構造解析により大昔に誕生した 1つの酵素が両方向に伸長する酵素へと進化したことがわかりました。通常の DNA/RNA ポリメラーゼと逆向きに進む本酵素は将来、分子生物学の新たな「道具」となることが期待されています。

論文発表の概要

研究論文名: Structural basis of reverse nucleotide polymerization (逆方向のヌクレオチド伸長反応の構造的基盤)

著者: 氏名 (所属): 中村彰良^{(1), (2)}, 根元太維城⁽¹⁾, Ilka U. Heinemann^{(2), (3)}, 山下恵太郎⁽¹⁾, 園田知世⁽¹⁾, 薦田啓介⁽¹⁾, 田中勲⁽¹⁾, Dieter Söll⁽²⁾, 姚閔⁽¹⁾

(1)北海道大学大学院 生命科学院/先端生命科学研究院, (2)エール大学, (3)ウエスタン大学

公表雑誌: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (米国科学アカデミー紀要)

公表日: 米国東部時間 2013年12月24日

研究成果の概要

(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りません。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ます。アミノ酸の一種であるヒスチジン (His) 用の tRNA の場合には、その 5' 末端にあるグアニル基 (G_{-1}) が識別マーカーとなって、His が付加されます。Thg1 (tRNA^{His} guanylyltransferase) は、この G_{-1} を tRNA に付加する酵素です。これがないと遺伝暗号どおりに蛋白質がつかれないので Thg1 はヒトを含む高等生物にとって必須の酵素です。興味深いことに Thg1 は、通常の DNA ポリメラーゼ (5' -3') と共通な触媒コア構造を持つにも関わらず、逆方向 (3' -5') に鋳型依存的に RNA を伸長する能力を持っている酵素であることが明らかになりました。生体内で 5' -3' 方向への鋳型依存 DNA/RNA の合成は細胞が生命を維持するために必須の反応です。しかし、逆方向 3' -5' へ伸長する酵素がないことは細胞に様々な問題を引き起こしています。例えば、直鎖状染色体の「ショートニング」は細胞老化を誘発し様々な加齢に関連する疾病を引き起こします。これに対応するために様々な仕組みが、細胞内で作られています。DNA 複製時に岡崎フラグメントが形成されることはその 1 つです。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いものです。

(研究手法)

私たちは真菌由来の組み替えタンパク質 Thg1 と *in vitro* 転写で合成した tRNA を用いて複合体を再構成させ、X 線結晶構造解析法により立体構造を明らかにしました。得られた複合体の構造情報と Thg1 および tRNA の変異体の実験を組み合わせて、Thg1-tRNA 複合体形成に関わる重要なアミノ酸残基を同定し、 G_{-1} の付加反応のメカニズムも提案しました。さらに、通常の 5' -3' DNA ポリメラーゼの DNA 複合体構造との比較によって、同様な触媒コアを利用して逆方向 (3' -5') のヌクレオチド伸長反応を行う分子基盤を明らかにしました。

(研究成果)

得られた構造から 2 分子の tRNA が 4 量体の Thg1 分子と結合していることが分かり、それぞれの tRNA が 3 つの Thg1 と結合し Thg1 の異なる分子の同じドメイン ($\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$) が 2 種類の tRNA と結合能力 (アクセプターステムとアンチコドンループとの結合) を持つことが解明しました。このような相互作用は tRNA の認識および活性部位への tRNA 末端の配置に必要と考えられます。また、構造的、生化学的、および系統学的データから逆方向への伸長反応は進化初期に登場し、それぞれのドメインの機能を維持しながら順方向への伸長反応に対して鏡像的に進化していったことを明らかにしました。

(今後への期待)

いくつかの変異体は逆方向への伸長反応を促進することが示されています。高効率の逆方向ポリメラーゼである変異体はシーケンシング、3' UTR 分析および 3' DNA/RNA 標識を含む生物学・生化学的研究などの様々な分野に影響を与え、今後のタンパク質工学の重要なツールになりうると期待されます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授 姚 閔 (やお みん)

TEL: 011-706-4481 FAX :011-706-4481 E-mail: yao@castor.sci.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

<用語解説>

* **岡崎フラグメント**：2本鎖 DNA が複製される際には，2本の鎖が末端から解けながら同時に複製される。2本の鎖は互いに逆向きなので，同時に合成されるためには，2種類の酵素が必要であると考えられたが，実際には1種類しかなく，一方の鎖は，短い断片（フラグメント）として合成され，それが結合していく。岡崎令治（おかざきれいじ）によって発見されたので，岡崎フラグメントと呼ばれる。