

逆方向のヌクレオチド伸長反応の構造的分子基盤の解明

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110, 20970-20975 (2013)

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 (図 1)。

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、逆向き(3'-5')に鑄型依存的に 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(図 2)。生体内で 5'-3'方向への鑄型依存 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。

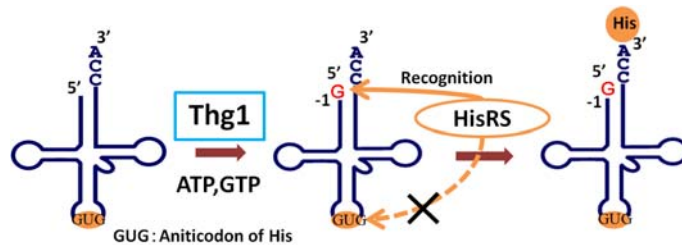


図 1. His-tRNA^{His} の成熟
HisRS: His アミノアシル tRNA 合成酵素

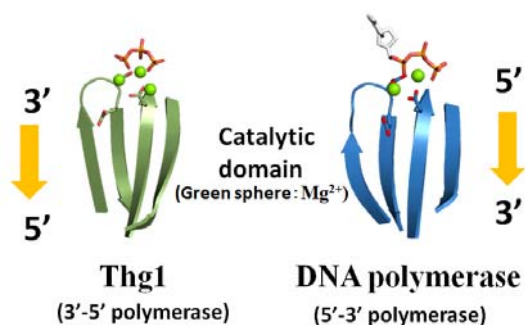


図 2. 触媒コア構造

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、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 (α_5 , α_6 , α_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

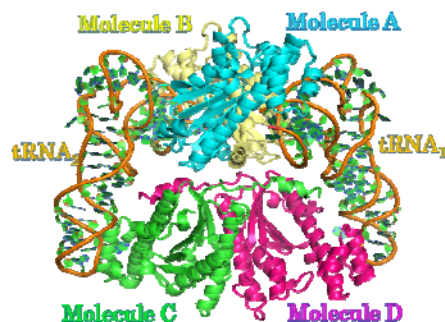


図 3. Thg1-tRNA 複合体の立体構造

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。

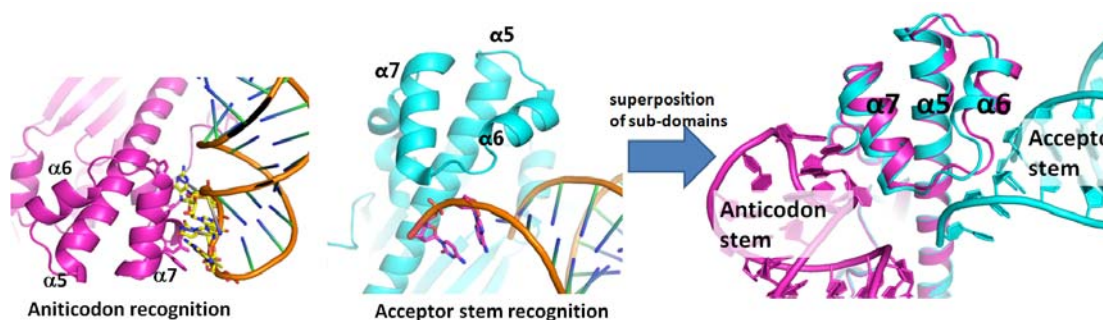


図 4. Thg1 の tRNA 認識

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。