

論文の内容の要旨

論文題目 *In vitro* evolution of a ribozyme with tRNA aminoacylation activity
(和訳 tRNA へのアミノ酸転移を触媒するリボザイムの創成と機能解析)

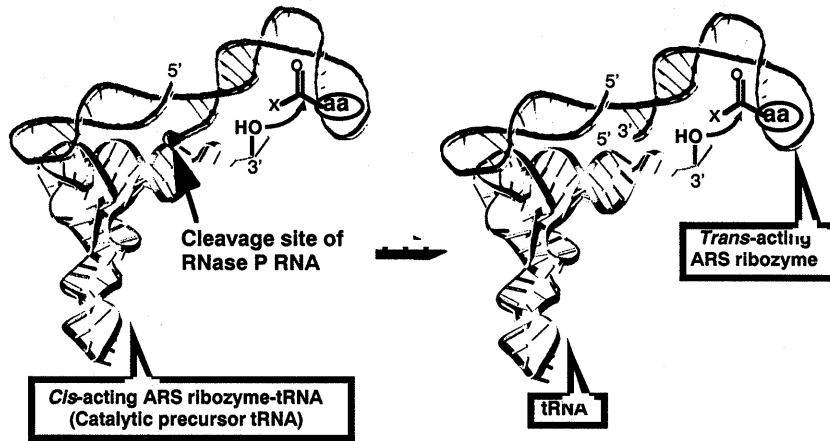
氏名 齊藤 博英

1. 緒言

現在の蛋白質合成系で本質的な役割を果たすのは、リボソーム、mRNA、tRNA、そしてアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) である。最近リボソームの結晶構造が解析され、大サブユニットに存在する RNA 成分 (23S rRNA) は、ペプチド結合生成反応を触媒する RNA 酵素 (リボザイム) であることが証明された。これとは対照に、全ての生命の遺伝暗号形成に必須であるアミノ酸の tRNA への特異的結合は、蛋白成分のみから構成される ARS により触媒される。しかしながら、「生命の起源は遺伝情報と触媒機能を備えた RNA に端を発した」とする RNA ワールド仮説によれば、原始蛋白質合成系の主役は RNA 酵素であり、それ故に ARS の機能を有したリボザイムが過去に存在していた可能性が示唆されている。だがこれまでの研究で、リボザイムが tRNA のアミノアシル化を触媒できるという実験的証拠は得られていない。さらにリボザイムが、蛋白質酵素のようにアミノ酸や tRNA を特異的に認識する能力を有するのかも明らかではない。

本研究において私は、試験管内で分子進化した RNA 酵素が ARS の反応を触媒できる可能性を追求した。その結果、アミノ酸の活性体を基質として、自己アミノアシル化反応を行う tRNA 前駆体の分子進化に成功した。この tRNA 前駆体は、触媒活性を有する 5'リーダ部位と tRNA から構成される (Fig. 1, left)。さらに私は、この tRNA 前駆体は、自然界に存在する RNA 酵素である RNase P RNA により切断され、その結果生じた 5'リーダ-RNA は、tRNA をアミノアシル化する RNA 酵素 (ARS-リボザイム) として機能することを見出した (Fig. 1, right)。

Fig. 1

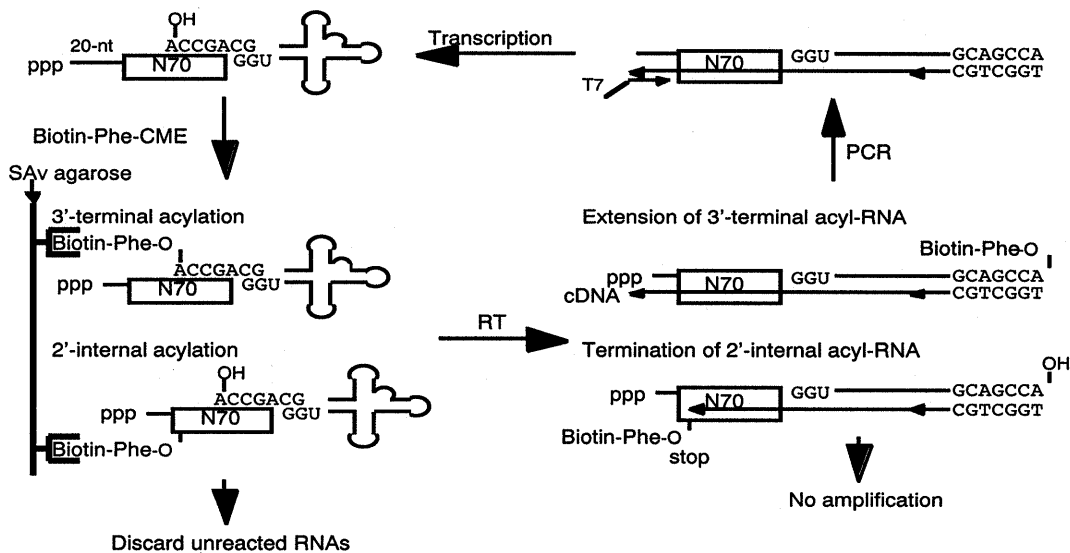


2. 自己アミノアシル化活性を触媒する tRNA 前駆体の分子進化実験系

tRNA 前駆体の分子進化のために、まず私は、 10^{15} の異なる配列 を有する DNA プールを合成した。この DNA プールは、70 ヌクレオチドのランダムな配列から成る 5'-リーダー配列と合成 tRNA の遺伝子から構成される。この DNA プールを試験管内転写することで、 10^{15} の異なる配列 を有する tRNA 前駆体プールが得られる。

反応系には、フェニルアラニン(Phe)の活性体である Biotin-L-phenylalanyl-cyanomethyl ester (Biotin-Phe-CME)を加えた。自己アミノアシル化するわずかな tRNA 前駆体は、それ自身に Biotin-Phe を結合するので、ストレプトアビジン-バイオチンの相互作用により単離することができる。反応に活性を示す tRNA 前駆体を容出後、RT-PCR によりその DNA 配列を増幅させ、T7 RNA ポリメラーゼにより RNA に転写し、反応系に加えるという分子進化実験を 17 世代にわたりくり返した (Figure 2)。その結果、非酵素反応と比較して 1.6×10^5 倍自己アミノアシル化を促進する tRNA 前駆体の分子進化に成功した。

Fig. 2



3. 自己アミノアシル化する tRNA 前駆体の生化学的解析及びアミノ酸特異性

次に私は、得られた新規 tRNA 前駆体酵素 (pre-24) を生化学的に解析した。まずアミノ酸結合部位を厳密に調べるため、過ヨウ素酸化処理及び 3'-末端のアデノシン(A76)を欠如した pre-24 を用いて反応活性を調べた。その結果、3'-末端 A76 の水酸基に特異的にアミノ酸が結合することを見出した (Fig. 3, left)。この pre-24 の基質濃度に対する反応速度解析の結果、 $K_m=2.8\pm 0.61$ mM, $k_{cat}=0.13\pm 0.014$ min⁻¹ という値が得られた (Fig.3, right)。更にアミノ酸の特異性を調べるため、種々の異なるアミノ酸活性体を用いて反応解析を行った結果、pre-24 は Phe の活性体の特異的に認識し、反応を促進していることがわかった (Fig.4)。また基質からのバイオチンの削除、及び活性部位 CME の他の活性基への変換は、反応に重要な影響を及ぼさないことがわかった。これらの結果は、pre-24 は、Phe の側鎖を本質的に認識していることを示唆する。

Fig. 3

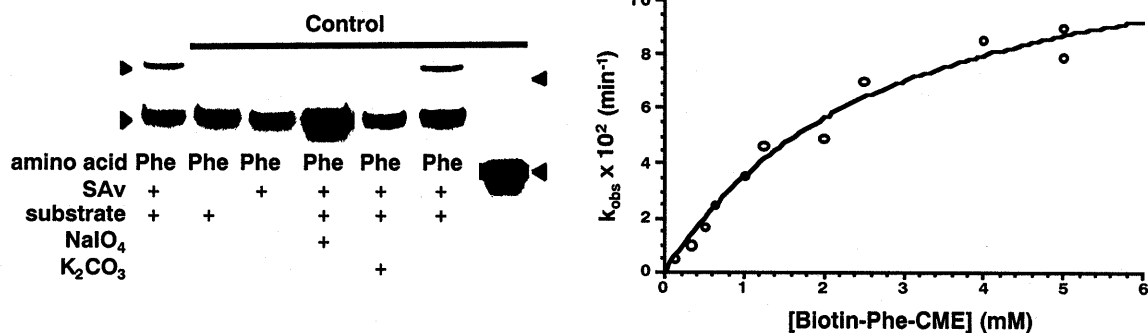
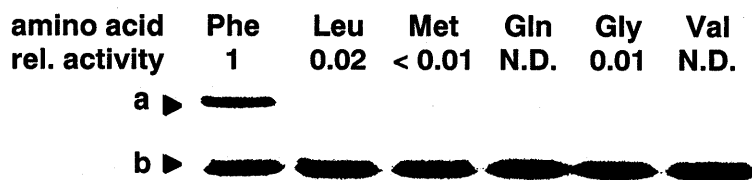


Fig. 4

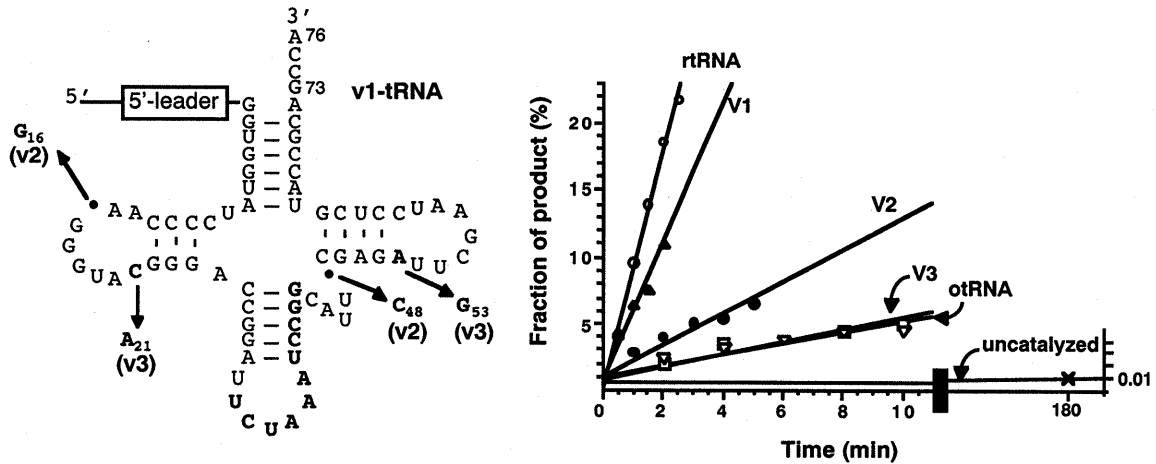


4. tRNA に生じた特異的塩基置換及び欠如の理由

自己アミノアシル化する tRNA 前駆体の DNA 配列の解析の結果、得られた全てのリボザイムの tRNA 配列には、変異が生じていることがわかった。観察された変異は、アンチコドン stem-loop の欠如、及び D-loop、T-loop に存在する塩基の点変異、欠損である。この理由を明らかにするために、私は部位特異的塩基置換法を用いてそれぞれの変異の重要性を研究した。

その結果、アンチコドン部位及び V-region に生じた塩基欠損は活性に大きな影響を与えないが、D-loop、T-loop に生じた塩基置換は、活性に重要であることがわかった (Fig.5)。これらの実験事実は、D-loop または T-loop の塩基置換部位が 5'-リーダー配列との相互作用に本質的役割を果たすことを示唆している。

Fig. 5



5. tRNA のアミノアシル化を触媒する ARS-リボザイムの創製

次に私は、tRNA 前駆体に存在する触媒活性を有する 5'-リーダー配列が、tRNA をアミノアシル化する能力を持つか調べた。その結果、本来の tRNA 配列を有する tRNA 前駆体は、自然界に存在するリボザイムである *E. coli* RNaseP RNA によって切断され (Fig.6, left)、切断された 5'-リーダー部位は、tRNA を *in trans* でアミノアシル化できることがわかった (Fig. 6, right)。それゆえに、この 5'-リーダー-RNA は、tRNA のアミノアシル化を触媒する ARS-リボザイムとして機能する。

さらに私は、ARS-リボザイムがどのように tRNA を認識しているのかを部位特異的塩基置換法により解析した。その結果、ARS-リボザイムに存在する GG 配列が、tRNA 3'末端の CC と塩基対を形成し反応を促進していることが明らかになった。この塩基対はアミノアシル化反応に必須であり、この部位の他の塩基への置換は、反応活性を著しく阻害する。興味深いことに、自然界に存在する二つのリボザイムも tRNA の認識のために同様の塩基対を用いている。RNaseP RNA は、GG 配列で pre-tRNA の 3'末端の CC 配列と塩基対を形成し、pre-tRNA から 5'-リーダー部位の切断反応を触媒する。またリボソーム大サブユニットに存在する 23S rRNA も同様の塩基対で tRNA の 3'末端を認識し、ペプチド結合生成反応を触媒している。このように、tRNA の 3'末端の CC 塩基は、tRNA と相互作用する RNA 酵素のための本質的認識部位として進化したかもしれない。

以上の研究は、蛋白質合成系の起源において、自己アミノアシル化する tRNA 前駆体がま

ず進化し、その後 tRNA 前駆体の一部 (5'-リーダー配列) が ARS-リボザイムとして機能した可能性を実験的に支持している。

Fig. 6

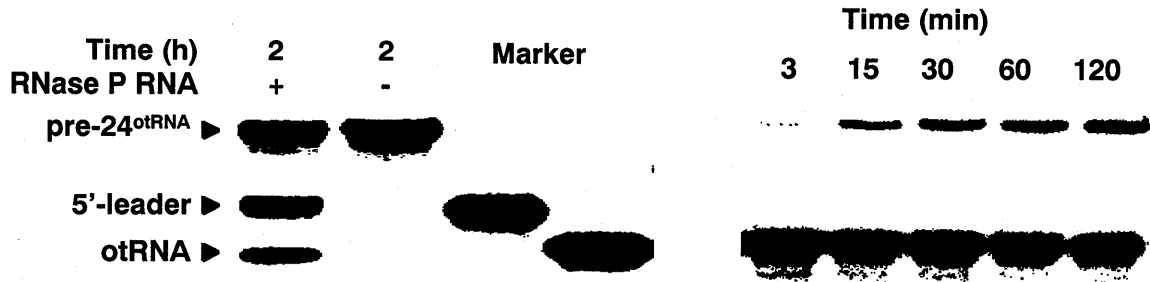
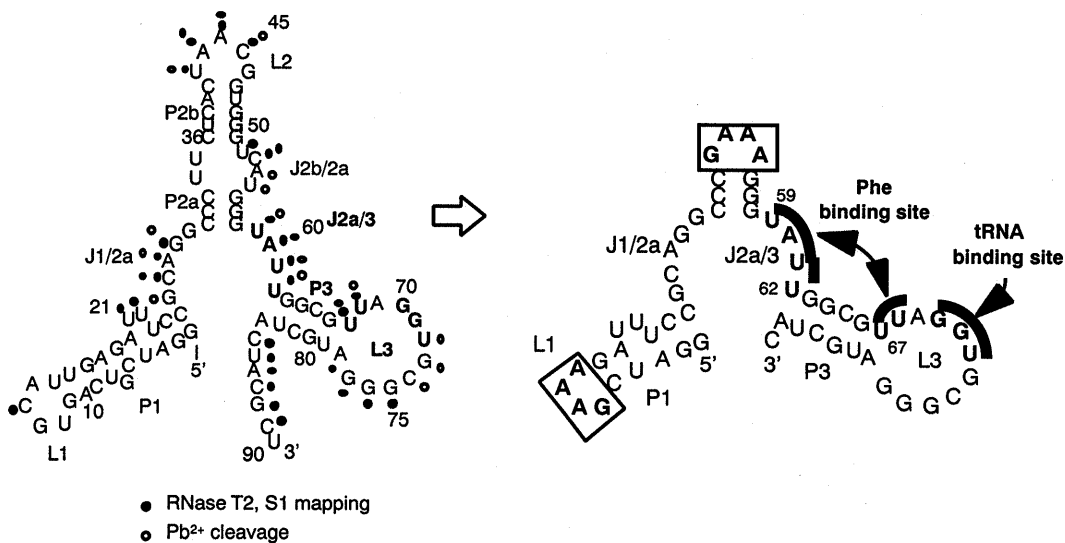


Fig. 7



6. ARS-リボザイムの 2 次構造及び活性部位の同定

自然界に存在する RNA 酵素は、ribosomal RNA を除き、全て RNA のリン酸結合の切断または連結を触媒している。本研究において私は、アミノ酸の転移を触媒する ARS-リボザイムの分子進化に成功したが、この反応機構は全く未知のものである。よってこのリボザイムの構造及び反応活性部位を研究することは、RNA 酵素が触媒する反応機構の拡大につながり非常に興味深い。まず私は、種々のリボヌクレアーゼ及び鉛を用いて ARS-リボザイムの 2 次構造を同定した (Fig.7, left)。また、このリボザイムがどのようにして Phe と tRNA を認識するのかを化学修飾剤を用いた foot printing assay により研究した。その結果、リボザイムに存在する単純な配列のモチーフが基質認識に重要な役割を果たすことを明らかにした (Fig. 7,

right)。以上の結果は、単純な配列から構成される RNA 酵素が、tRNA とアミノ酸という2つの基質を同時に認識し、アミノ酸の転移を触媒できることを示している。

7. 結論

私は、試験管内分子進化法を用いて、自己アミノアシル化を触媒する tRNA 前駆体の創製に成功した。この tRNA 前駆体の 5'-リーダー配列は、RNase P RNA による切断後、tRNA をアミノアシル化する ARS-リボザイムとして機能することがわかった。この ARS-リボザイムの速度論及び生化学的解析から、以下に挙げる実験事実が得られた。(1) リボザイムは、フェニルアラニンの活性体の特異的に認識する。(2) リボザイムは、生体内アミノアシル化反応に必須であるアミノアシルアデニレートを経験として認識できる。(3) tRNA の 3'末端配列 CCA、及びそれに隣接するディスクリミネーター塩基は、リボザイムのアミノアシル化反応に必須である。(4) リボザイムは、tRNA の祖先と考えられているミニヘリックス (tRNA のアクセプターステムと TψC ループから構成される)をアミノアシル化できる。これらの実験事実は、蛋白質 ARS における tRNA アミノアシル化の反応機構と類似しており、RNA 酵素が蛋白質 ARS と同様の触媒能を有することを示唆している。

これらの実験事実は、蛋白質合成系の起源において、RNA 酵素がアミノ酸の tRNA への結合を触媒し、初期遺伝暗号の形成に本質的役割を果たしたことを強く示唆している。分子進化学を用いた ARS-リボザイムのさらなる研究は、生命の起源において遺伝暗号はどのように進化したのかという問題の解明に重要な鍵を与えるかもしれない。

8. 発表状況

1. Hirohide Saito, Dimitrios Kourouklis, Hiroaki Suga “An *in vitro* evolved precursor tRNA with aminoacylation activity” The EMBO Journal, Vol. 20, No. 7, 2001
2. Hirohide Saito, Hiroaki Suga “A ribozyme exclusively aminoacylates the 3'-hydroxyl group of the tRNA terminal adenosine ”J. Am. Chem. Soc. 123: (29), 2001
3. Hirohide Saito, Kimitsuna Watanabe, Hiroaki Suga “Concurrent molecular recognition of both the amino acid and tRNA by a ribozyme” RNA, Vol. 7, No 12, 2001