

論文の内容の要旨

論文題目 CCA 末端修復酵素の反応機構

氏名 泊 幸秀

[緒言]

現在までに一次構造が決定された tRNA の 3'末端は、例外なく CCA という配列で保存されており、この配列は tRNA の機能発現において重要な役割を担っている。CCA 配列は tRNA のプロセッシングやアミノ酸受容能に必須であるとされ、また、翻訳の過程においても、CCA 配列が大サブユニットリボソーム RNA のドメイン V と言われる領域と相互作用する事によって、tRNA の 3'末端に結合したアミノ酸をペプチド転移反応の活性中心に配置することが可能になると考えられている。

CCA 末端修復酵素[ATP (GTP): tRNA nucleotidyltransferase]は、この tRNA 3'末端 CCA 配列の合成または修復反応を触媒する酵素である。本酵素は nucleotidyltransferase superfamily の中でも、tRNA 様の構造を認識し、核酸などの鋳型なしに正確に CCA 配列を付加するという特徴的な性質を持っている。

本研究では、本酵素の tRNA 様構造の認識機構と、CCA 配列の合成プロセスを詳細に解析し、CCA 末端修復酵素の反応機構を解明することを目的とした。

[CCA 付加反応のメカニズム]

まず、大腸菌の CCA 末端修復酵素の発現系を構築し、酵素を大量に調製した。驚くべきことに、精製後の酵素画分にはかなりの量の ATP が混在していた。通常の前製プロセスにおいてヌクレオチドが混入することは考えにくく、また、今回の場合でも GTP の存在は検出できなかったことから、生体内において、ATP が高い結合能で CCA 末端修復酵素に結合していることが強く示唆された。そこで、ヘキソキナーゼによって ATP を ADP に分解した後、再度精製することによって、内在性の ATP を完全に除去することに成功した。

この ATP を持たない酵素を用い、ゲルシフトアッセイ、ゲルろ過、固相法による反応論的解析などの手法を用いて、精製された酵素と、ATP および GTP との結合能を定量的に検討したところ、ATP の酵素との結合能は GTP よりも約 30 倍強いことが示された。この事実は、生体内において、酵素が ATP 結合型で存在していることを示唆している。また、この結合した ATP を除去した酵素画分を用い ATP 非存在下・GTP 存在下で反応させると、基質 RNA への GTP の付加反応は 2 分子では終結せず、3 分子以上の Poly(C)が付加される活性を示すことが確認された。以上の結果から、この酵素は ATP が強固に結合した部位とは別に、Poly(C)付加反応を行う活性部位が存在することが示唆された。

さらに、この Poly(C)伸長反応の途中で ATP を加えると、Poly(C)の後に A を付加し、反応が終

結することが明らかになった。A がひとたび付加されると、その RNA は、もはや基質とはなり得ず、それ以上の C や A の伸長は起こらないことも確認された。

また、Poly(C)の伸長反応については、2 個までの非常に速い付加反応と、3 個目以降の遅い付加反応の、2 段階の反応様式から構成されていることが示された。これを説明するメカニズムとして、C を 2 個付加する反応までは tRNA 本体は酵素のポケットにきちんと収まっているが、3 個以上付加されると、3'端は酵素の反応部位に結合したまま tRNA 本体はポケットから外れ、トランスロケーションしながら Poly(C)付加反応を行うというモデルを提案した。

このモデルを検証するため、CCA 末端修復酵素の認識に大きく関与しているとされる、tRNA の T ループの領域に変異を導入して酵素との結合能を低下させた変異型 tRNA を作成し、これを基質として Poly(C)付加の速度を検討した。その結果、変異型 tRNA に対する Poly(C)の付加においては、2 段階の反応様式は観察されず、正常型 tRNA に対して C を付加するときの 3 個目以降と同じ遅い反応速度で進行するという結果が得られた。これは、前述のトランスロケーションモデルを強く支持する結果である。

以上の考察をもとに以下のような新しい反応モデルを仮説として提唱した。

- ATP が反応液中に存在する場合は、Poly(C)部位によって C が 2 個まで伸長されると、-CC の配列を認識し、強固に酵素に結合している内在性の ATP が付加され、RNA が酵素から遊離して反応は終結する。こうして正しく CCA の配列が合成される。
- ATP が存在しない場合は、Poly(C)部位で C の付加反応が継続する。この際、C が 3 個以上付加されると、立体的な障害により、3'端近傍は反応部位に結合したまま RNA 本体は酵素のポケットから外れ、トランスロケートしながら反応が進む。

[後生動物ミトコンドリア CCA 末端修復酵素の基質認識]

CCA 末端修復酵素はミトコンドリアにも存在する。ミトコンドリアの tRNA 遺伝子上には、3' CCA 配列がコードされていないため、CCA 末端修復酵素による CCA 配列の付加は、ミトコンドリア tRNA の正常な機能に不可欠なプロセスである。一般的に、CCA 末端修復酵素は tRNA の T ループと D ループから構成される elbow region と呼ばれる部分、中でも特に T ループ内の保存配列を認識しているということが示されているが、後生動物ミトコンドリアの tRNA の多くは T ループの保存配列を欠き、線虫ミトコンドリア tRNA には T ループや D ループそのものを欠いたものも存在する。

これまでに当研究室の永池らにより、ヒトミトコンドリア CCA 末端修復酵素が単離・クローニングされ、その基質認識が検討された結果、ヒトミトコンドリア CCA 末端修復酵素は T ループの保存配列を持たないミトコンドリア tRNA にも効率よく CCA 配列を付加することが明らかになった。しかし、T ループ全体を欠くような線虫ミトコンドリア tRNA に対しての反応効率は低く、ヒトミトコンドリア CCA 末端修復酵素が効率よく CCA を付加するには T ループの存在が必要であることも示唆された。

そこで、ヒトミトコンドリア CCA 末端修復酵素のアミノ酸配列を元に、線虫(*C. elegans*)ミトコンドリア CCA 末端修復酵素のクローニングを行い、その基質認識を調べた結果、線虫ミトコンドリア CCA 末端修復酵素に対しては、T ループや D ループ全体を欠く線虫ミトコンドリア tRNA も効率のよい基質であることが明らかとなった。

以上の知見から、後生動物ミトコンドリアにおいては、ミトコンドリア tRNA の構造の変化と、CCA 末端修復酵素の基質認識機構が共進化し、異常構造をとるミトコンドリア tRNA を認識できるようになった、と考えることができる。アミノ酸配列を比較すると、N 末端付近は非常によく保存されているのに対し、C 末端付近での保存性は低く、tRNA の認識は C 末端付近で行われていることが予想された。

また最近になって、ウシ肝臓の細胞質画分から CCA 末端修復酵素を部分精製することに成功し、その部分アミノ酸配列を解析した結果、ミトコンドリアの酵素と同一の遺伝子由来のものであることが明らかとなった。細胞質由来の酵素は、保存配列を持った細胞質型 tRNA には効率良く CCA を付加できるものの、異常構造をもったミトコンドリア型 tRNA に対する反応効率は、ミトコンドリア由来の酵素に比べて著しく低いことが明らかとなった。この知見は同一遺伝子由来の酵素が異なる基質認識機構を持つという点で興味深く、その認識機構のスイッチのメカニズムについて現在さらに研究をすすめているところである。

[ミトコンドリア病の病因性変異をもつ tRNA における CCA 末端付加効率の低下]

ミトコンドリア DNA の変異が様々なミトコンドリア病の病因になっていることは良く知られているが、その多くは tRNA 遺伝子上に存在している。中でも乳児致死性心筋症の病因であるミトコンドリア tRNA^{leu} 遺伝子の A4317G 変異、幼児突然致死症候群を引き起こすとされるミトコンドリア tRNA^{gly} 遺伝子の A10044G 変異は、いずれも tRNA の T ループの、CCA 末端修復酵素の認識に重要と思われる場所に位置している。前述のようにミトコンドリアにおいては CCA 末端修復酵素による 3' 末端 CCA 配列の付加が tRNA の成熟過程に必須であるため、この過程での効率の低下が発症の原因になっている可能性があると考え、それぞれの病因性変異をもつ tRNA に対する CCA 末端修復酵素による反応効率を調べた。その結果、どちらの変異型 tRNA においても、CCA 付加効率が著しく低下していることが明らかとなった。特に A4317G 変異では CCA の取り込みはほとんど確認できなかった。また、反応論的解析から、反応効率の低下は K_m ではなく K_{cat} の低下に由来するものであることが明らかとなり、変異を持った tRNA は酵素に結合できるものの、CCA 付加の触媒的反応が正常に進行しないことが示唆された。

それぞれの変異 tRNA における CCA 付加効率の低下の原因を探るため、nuclease probing と呼ばれる方法を用いて tRNA の立体構造を解析した。その結果、A10044G 変異においては、T ループ-D ループ間の立体的相互作用が顕著に低下していること、さらに、A4317G 変異においては、T ステムの組み換えが起こり T ループ近傍の立体構造が大きく変化していること、T ループ-D ループ間の立体的相互作用が低下していることが示された。