

謝辞

本稿に紹介した筆者らの研究は、国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部で土肥多恵子先生の御指導のもと行われました。また、愛知県がんセンター研究所・分子病態部の神奈木玲児先生、札幌医科大学・豊田実先生をはじめ、本研究を支えてくださいました諸先生方に心より感謝申し上げます。

- 1) Montiel, M.D., Krzewinski-Recchi, M.A., Delannoy, P., & Harduin-Lepers, A. (2003) *Biochem. J.*, **373**, 369-379.
- 2) Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K.O., Shiku, H., & Furukawa, K. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 12082-12089.
- 3) Dohi, T., Nishikawa, A., Ishizuka, I., Totani, M., Yamaguchi, K., Nakagawa, K., Saitoh, O., Ohshiba, S., & Oshima, M. (1992) *Biochem. J.*, **288**, 161-165.
- 4) Morton, J.A., Pickles, M.M., & Vanhegan, R.I. (1988) *Immunol. Invest.*, **17**, 217-224.
- 5) Dohi, T., Ohta, S., Hanai, N., Yamaguchi, K., & Oshima, M. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 7880-7885.
- 6) Dohi, T., Hanai, N., Yamaguchi, K., & Oshima, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 24038-24043.
- 7) Kawamura, Y.I., Kawashima, R., Fukunaga, R., Hirai, K., Toyama-Sorimachi, N., Tokuhara, M., Shimizu, T., & Dohi, T. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 6220-6227.
- 8) Morton, J.A., Pickles, M.M., & Vanhegan, R.I. (1988) *Immunol. Invest.*, **17**, 217-224.
- 9) Malagolini, N., Dall'Olio, F., Di Stefano, G., Minni, F., Marano, D., & Serafini-Cessi, F. (1989) *Cancer Res.*, **49**, 6466-6470.
- 10) Piller, F., Cartron, J-P., & Tuppy, H. (1980) *Blood Transf. Immunohaematol.*, **23**, 599-611.
- 11) Capon, C., Maes, E., Michalski, J.C., Leffler, H., & Kim, Y.S. (2001) *Biochem. J.*, **358**, 657-664.
- 12) Dohi, T., Yuyama, Y., Natori, Y., Smith, P.L., Lowe, J.B., & Oshima, M. (1996) *Int. J. Cancer*, **67**, 626-631.
- 13) Kawamura, Y.I., Toyota, M., Kawashima, R., Hagiwara, T., Suzuki, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., Kannagi, R., & Dohi, T. (2008) *Gastroenterology*, in press.
- 14) Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., & Kannagi, R. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 4498-4505.
- 15) Dall'Olio, F., Malagolini, N., Di Stefano, G., Ciambella, M., & Serafini-Cessi, F. (1990) *Biochem. J.*, **270**, 519-525.

河村 由紀

(国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部)

Sd^a blood group carbohydrate antigen, exclusively expressed in normal gastrointestinal mucosa but not in cancer tissues
Yuki I. Kawamura (Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

CCA 付加反応のダイナミクス

1. トランスファー RNA (tRNA) の 3'末端 CCA 配列

大腸菌からヒトにいたるあらゆる生物で、タンパク質はリボソームと呼ばれるタンパク質合成工場において、遺伝子情報に基づいてアミノ酸をつなげて作られることが分かっている。遺伝子の情報は、一旦、遺伝子 (DNA) から RNA ポリメラーゼによって RNA に転写して書き換えられ、メッセンジャー RNA (mRNA) が作られる。この mRNA がリボソームと結合し、アミノ酸を先端に結合させたトランスファー RNA (tRNA) が mRNA と次々と結合していき、tRNA の先端についたアミノ酸が順々につながってタンパク質が完成する。さらに細かく言うならば、mRNA 上のコドン (3 塩基からなる遺伝情報の 1 単位) が、tRNA を介して、1 アミノ酸に変換されることで、タンパク質が合成されていく。したがって、tRNA はコドンというヌクレオチド配列の情報をアミノ酸配列の情報に変換するアダプター分子として働く。L 字型の高次構造をした tRNA の一方の末端には、アンチコドンという領域があり、コドンと塩基特異的に水素結合を形成する。一方、tRNA のもう一方の末端である 3'末端に活性部位は CCA (C74-C75-A76) という決まった配列があり、アミノアシル tRNA 合成酵素が末端のアデノシンに特異的なアミノ酸を結合させる。

tRNA の 3'末端の CCA 配列は、興味深いことに、大腸菌からヒトに至るまで全ての生物において保存されている。この CCA 配列は、アミノ酸を受容するためだけではなく¹⁾、リボソーム上で、リボソーム RNA のペプチジル転移反応部位に水素結合を介して認識されるためにも必須である²⁾。真性細菌と古細菌の一部では tRNA の遺伝子に CCA 配列がコードされている。しかし、古細菌の多くと真核生物においては、ゲノム上に tRNA の CCA 配列はコードされていない。そこで、CCA 付加酵素という RNA ポリメラーゼが存在し、tRNA の 3'末端に新規に CCA 配列を付加する。また、真性細菌にも CCA 付加酵素が存在し、その遺伝子を欠失させると菌の増殖が悪くなる。その理由は、tRNA は最初 RNA ポリメラーゼによって 3'末端にトレーラー配列という余分な配列を含んだ前駆体として転写され、この配列を RNase PH というエキソヌクレアー

ゼが1ヌクレオシドずつ切断していく際に、切り込みすぎてCCA配列を失ってしまった場合、あるいは老化してtRNAがCCA末端の一部を失った場合、CCA付加酵素がこれを機能性RNAに修復するためである。

CCA付加酵素は、ヌクレオチジルトランスフェラーゼファミリーに属し、ポリAポリメラーゼ(PAP:真核生物でmRNAの3'末端にポリアデニンを結合させる)、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT:DNAの3'末端に任意のdNTPを結合させる)、DNAポリメラーゼb(pol b)、カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ(KNT)などが同じ酵素ファミリーに属する。このうち、pol bなどは、DNAの鋳型にしたがってその相補鎖を合成するのに対し、CCA付加酵素やPAP、TdTは、同じ核酸の重合反応を触媒するにもかかわらずDNAの鋳型を必要としない、鋳型非依存性ポリメラーゼである。さらに、PAPやTdTは重合する(d)NTPが1種類あるいは任意であり、その数も任意であるのに対し、CCA付加酵素は、CCAという決まった配列の3ヌクレオシドを正確に付加する点で、極めて精巧な仕組みを備えた鋳型非依存性RNAポリメラーゼである。25年以上前から、CCA付加酵素はC、C、Aのそれぞれに特異的な三つのポケット(活性部位)を持つとか、活性部位は一つであるがtRNAが徐々に動いてCCAが結合される、など様々な仮説が提唱されてきた。しかし、これまでのところ、CCA付加酵素がどのようにして核酸の鋳型の助けを借りずに決まった配列を合成できるのかについては未解決であった。

2. 二つのクラスのCCA付加酵素

興味深いことに、同じ反応を触媒し、基質であるtRNAを交換することも可能であるにもかかわらず、真性細菌および真核生物由来のCCA付加酵素と古細菌由来のCCA付加酵素ではアミノ酸配列の相同性がほとんどない。そこで、真性細菌および真核生物由来のCCA付加酵素はクラスII、古細菌由来のCCA付加酵素はクラスIと呼ばれてきた。一方、アミノ酸配列の相同性から、真核生物および真性細菌のポリAポリメラーゼ(真性細菌の酵素はmRNAの分解過程に働く)はクラスI、古細菌のポリAポリメラーゼはクラスIIに属している。2002年に、中等度好熱菌*Bacillus stearothermophilus*由来のCCA付加酵素の結晶構造が3.0Å分解能で発表され³⁾、ついで古細菌*Archaeoglobus fulgidus*のCCA付加酵素の結晶構造が2.0Å分解能で決定された^{4,5)}(図1)。

アミノ酸配列の相同性から推定されたように、真性細菌由来のクラスII CCA付加酵素は、古細菌由来のクラスI CCA付加酵素とは、ドメインの配置もその構造も(後述の触媒ドメインを除いては)全く異なっていた(図1)。一方、クラスIのCCA付加酵素の構造は、真核生物のポリAポリメラーゼの構造と良く似ていた^{4,5)}(図1)。さらに、ヌクレオチド(ATP, CTP)の認識に関しては、クラスIとIIでは、その認識様式は大きく異なっていた。このことから、クラスIとクラスIIのCCA付加酵素は、極めて古い時期に分岐して以来、独自の分子進化を経て、構造の異なる二つの分子に進化したと考えられる。

これら2種類の結晶構造から、クラスIのCCA付加酵素もクラスIIのCCA付加酵素も共に、N末端にポリメラーゼなどのヌクレオチジルトランスフェラーゼに共通したドメインを持っており、これが触媒ドメインであると考えられる。さらに、両クラスとも、ヌクレオチドのポケットは一つで、一つのポケットでATPとCTPの両方を認識できることが明らかになった⁵⁻⁷⁾。かつて、CCA付加酵素はC、C、Aに対する三つのポケットを持つと考えられた時期もあったが、本結晶構造解析の結果よりこの仮説は否定された。しかし、CCA付加酵素が、いかにして核酸の鋳型の助けを借りずに、C、C、Aを順々に結合していけるのかというダイナミックな反応機構は未だ明らかでなかった。我々はCCA付加酵素と末端のアデノシンを欠いたtRNAプライマーと基質ATPの3者複合体の結晶構造を解明し、CCA付加酵素はDNAの鋳型の代わりにタンパク質性の鋳型によって新規ヌクレオチドとtRNAプライマーの末端を認識することで、定まったCCA配列を重合することを明らかにしている⁶⁻⁸⁾。

3. クラスI CCA付加酵素による重合反応のスナップショット

最近、我々はクラスI(*Archaeoglobus fulgidus*由来)のCCA付加酵素と様々な伸長段階の3'末端を持つプライマーtRNAミニヘリックスと基質となるNTPの3者複合体の結晶構造計六つを、分解能2.5-2.8Åで決定し、ダイナミックな付加反応のスナップショットを撮ることに成功した⁹⁾。ミニヘリックスはtRNAのアクセプターステムとT_ΨCアームから構成されるtRNAの1ドメイン(ヘリックス)で、CCA付加酵素に対して完全な基質として働くことが報告されている。また、我々は、各伸長段階を、mini-Dステージ(tRNAプライマー末端がD73)、mini-DCステージ(末端がC74)、mini-DC+CTPステージ、mini-

DCC ステージ (末端が C75), mini-DCC+ATP ステージ, mini-DCCA ステージ (末端が A76) と命名し, さらに 2004 年にエール大学の Steitz 博士らが *Nature* に発表した *A. fulgidus* 由来 CCA 付加酵素と完全長 tRNA との複合体の結晶構造 (6Å 分解能) を release ステージとして加え, ムービーを作成した⁹⁾. 2004 年に Steitz 博士らが提唱した CCA 付加反応の動的機構では, 三つの結晶構造のうち二つが低分解能であり, 解釈に誤りがあったため, 我々はこれを修正した.

クラス I の CCA 付加酵素は, head, neck, body, tail ドメインから構成されていた (図 2a). まず, すべての段階の結晶構造に共通のこととして, tRNA ミニヘリックスの TΨC ループが酵素の tail ドメインによってしっかり認識されており, tRNA プライマーは酵素の上を動くことができないよう固定されていた (図 2b). 現に tail ドメインを欠失した変異体 CCA 付加酵素は, tRNA のゲルシフト解析においても, RNA に対する結合能を失い, RNA 重合活性も著しく低下していた⁹⁾. また, tRNA プライマーのステム領域は, リン酸やリボースなどの親水性骨格が, 塩基非特異的に, neck, body ドメインからの親水性相互作用によって認識を受けていた (図 2d). また, 酵素の活性部位に入ってきた tRNA プライマーの末端のヌクレオチドが収納されるポケットを, 活性部位に近い方から P 部位, S1 部位, S2 部位と命名し, 新規のヌクレオチドが結合するポケットを N 部位 (塩基部分) および T 部位 (3 リン酸部分) と命名した (図 2c).

最初の mini-D ステージでは, ディスクリミネーター D73 (ここでは A73) が張り出して head ドメインのポリメラーゼ活性部位である catalytic triad (Glu59, Asp61, Asp110) の近傍の S1 部位に来ていた (図 3). しかし次の mini-DC ステージでは, A73 が 1 塩基分引っ込んで S2 部位に入り, C74 が S1 部位に来ていた. ここで思い出していただきたいことは, tRNA プライマーは CCA 付加酵素に固定されており, 動けないはずであった. 実は mini-D ステージと mini-DC ステージの間では, tRNA プライマーのステムが伸縮していたのである. すなわち, ステムの末端から 8, 9 番目の塩基対が開裂し, ステムは 1 塩基分伸びて A73 を S1 部位に届かせていた. その後 C74 が A73 に重合すると, ステムは 1 塩基分縮んでもとの構造に戻り, C74 が S1 部位に納まったわけである (図 3).

mini-DC ステージでは, S1 部位の C74 は, Glu96・Ala126 (・は水素結合), His97・Ser125 が形成する水素結合のプラットフォームに由来する相互作用によって固定さ

れていた (図 3). His97 を Ala に置換した変異体では, CMP の取り込み, さらに次の段階の AMP の取り込み活性が上昇しており, これらのアミノ酸残基によって C74 の動きが抑制されていることが示唆される.

ところが, ここに CTP を加えた mini-DC+CTP ステージでは, head ドメインが neck ドメインに向かって大きく動き, 閉構造をとっていた (図 4). これと呼応して Glu96 も大きく動き, 固定が外れた C74 のシチジン塩基はフリップアウトして新規に入ってきた CTP のシチジン塩基とスタッキングしていた (図 3, 4). また, head ドメイン上の catalytic triad が CTP の 3 リン酸および C74 のリボースに近づき, RNA 重合反応を触媒することが推定された. したがって, CMP が重合する過程は, head ドメインが首を振る knock-in ダイナミクスによって駆動されることが示唆された.

この CTP が C75 として重合された mini-DCC ステージでは, C74 は S1 部位に戻っていたが, C75 はすでにポケットがいっぱいなため, P 部位にとどまっていた. そして C74, C75 はそれぞれ Glu96, Thr130 による水素結合によって固定されていた (図 3). この結果, CCA 付加酵素の head ドメインの閉構造も固定されていた. そして mini-DC+ATP ステージでは, 空いた N・T 部位に ATP が, 酵素の構造変化を伴わずに入ってきて, 重合反応を受け, mini-DCCA ステージの構造になっていた.

通常の tRNA では, CCA 末端は塩基部分がお互いにスタッキングし, D73 から連なるスタッキング構造をとって安定化している. 2004 年に Steitz 博士らが発表した release ステージの構造では, head ドメインが大きく開き, D73, CCA がスタッキングしている (図 3). したがって, 最終的に CCA, D73 がスタッキング構造をとることで, head ドメインを大きくこじ開け, 酵素との親和性の低下した成熟末端を持つ tRNA は解離していくものと考えられる.

それでは, CCA 付加反応の最初と 2 番目の反応ではなぜ CTP が選択され, 最終反応では ATP が選択されるのであろうか. まずこれら 3 段階を通じて, CTP および ATP の環外アミノ基は A73 および C74 のリン酸基により水素結合を受けて認識されており, CTP および ATP が優先的に選択されている. そして最初と 2 番目の反応では, head ドメインが首振り構造変化をするのと呼応して, Arg224 の側鎖が活性部位に伸長し, 新規に入ってきた CTP の塩基を 2 本の水素結合で認識していた (図 3). これらの段階では, 活性ポケットにおける立体障害により, ATP の取り込みは阻害されている. 最終段階では, head ドメ

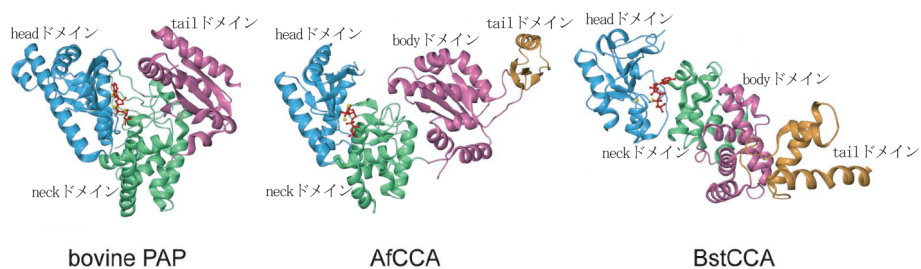


図 1 ウシ PAP, クラス I (*Archaeoglobus fulgidus* CCA 付加酵素, AfCCA) およびクラス II (*Bacillus stearothermophilus* CCA 付加酵素, BstCCA) の CCA 付加酵素の結晶構造の比較

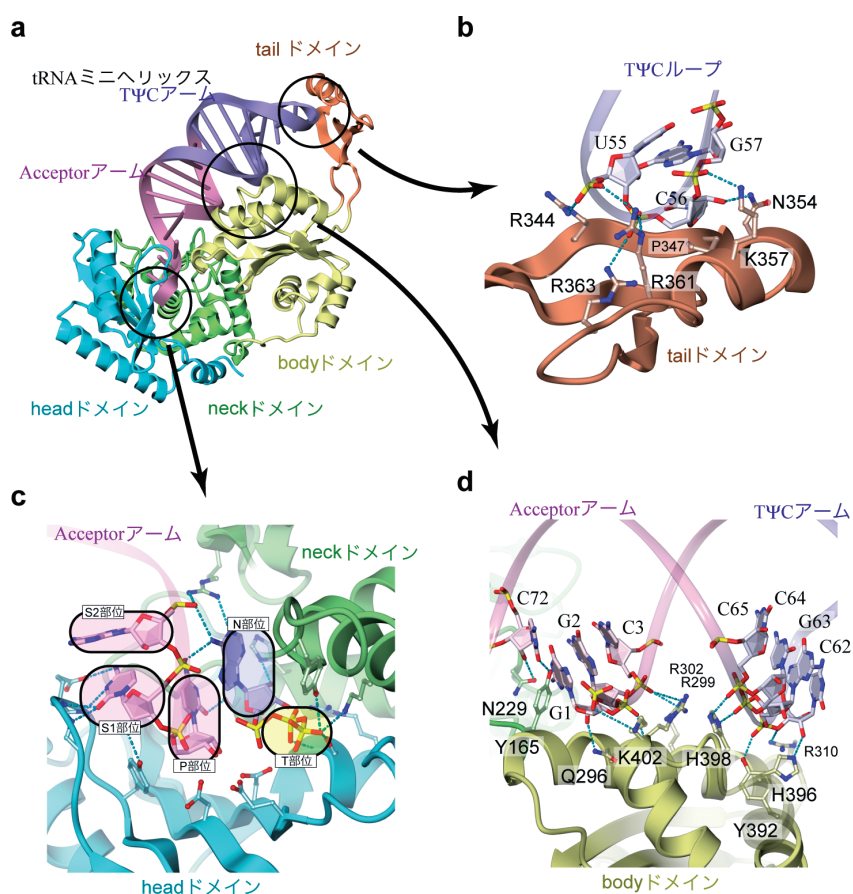


図 2 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 CCA 付加酵素と tRNA ミニヘリックスの複合体の結晶構造

(a) 全体構造 (b) tail ドメインによる TΨC ループの認識 (c) 活性部位におけるプライマー末端, 新規ヌクレオチドの認識 (d) body ドメインによるステムの認識

ンの閉構造が固定されており, Arg224 はより安定な折れ曲がった構造をとることで, 活性ポケットの空間には余裕が生じ, より大きな ATP が優先的に取り込まれると考えられる (図 3)。

4. CCA 付加反応のダイナミクス

以上の動的な CCA 付加反応機構を, 我々は Vice-anchored knock-in-and-lock ダイナミクスと称した (図 5)。すなわち,

- 1) まず, tRNA の L 字型構造の角の部分 (コア) は CCA 付加酵素の tail ドメインによって固定される。
- 2) さらに, アクセプター・T Ψ C ステムは 1 塩基分伸長し, D73 (ここでは A73) が活性部位に近づく。
- 3) 最初の CTP が入ってくると, head ドメインは knock-in ダイナミクスにより首を振り, A73 がフリップアウトして最初の RNA 重合反応が起こる。
- 4) A73, C74 はそれぞれ S2 部位, S1 部位に戻り, アクセプター・T Ψ C ステムは収縮し, 元の構造を復活する。
- 5) 2 番目の CTP が入ってくると, head ドメインは再び首を振って閉構造をとり, C74 がフリップアウトして CMP が重合する。
- 6) C74 は S1 部位に戻るが, C75 は P 部位にとどまり, C74, C75 はロックされて, 酵素の閉構造も固定される。
- 7) 空いた N・T ポケットに ATP が入り, 最後の RNA 重合反応が起こり, CCA 重合反応は終結する。
- 8) CCA は D73 (A73) とスタッキング構造をとるため, head ドメインがこじ開けられて, 酵素は超開構造をとり, tRNA が解離する。

これらの動的な反応機構は, さらに鋳型非依存性ポリメラーゼの反応に関して, 新たな知見を与える。CCA 付加酵素では, tRNA プライマーが tail ドメインによって固定されて動けないため, 3 ヌクレオシドの重合反応で活性ポケットがいっぱいになると, 反応は終結する。ところが, クラス I CCA 付加酵素とよく似た構造を持つ前出の真核生物のポリ A ポリメラーゼは, tail ドメインを欠損している。このため, mRNA プライマーは固定されておらず, ポリ A ポリメラーゼ上を動いて行けるため, 数多くのアデニンが重合し, ポリ A 配列が付加されるのであろうと考えられる。

1) Sprinzl, M. & Cramer, F. (1979) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 22, 1-69.

- 2) Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2000) *Science*, 289, 920-930.
- 3) Li, F., Xiong, Y., Wang, J., Cho, H.D., Tomita, K., Weiner, A.M., & Steitz, T.A. (2002) *Cell*, 111, 815-824.
- 4) Okabe, M., Tomita, K., Ishitani, R., Ishii, R., Takeuchi, N., Arisaka, F., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2003) *EMBO J.*, 22, 5918-5927.
- 5) Xiong, Y., Li, F., Wang, J., Weiner, A.M., & Steitz, T.A. (2003) *Mol. Cell*, 12, 1165-1172.
- 6) Tomita, K., Fukai, S., Ishitani, R., Ueda, T., Takeuchi, T., Vassylyev, D.G., & Nureki, O. (2004) *Nature*, 430, 700-704.
- 7) Xiong, Y. & Steitz, T.A. (2004) *Nature*, 430, 640-645.
- 8) Schimmel, P. & Yang, X.-L. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 807-808.
- 9) Tomita, K., Ishitani, R., Fukai, S., & Nureki, O. (2006) *Nature*, 443, 956-960.

濡木 理

(東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻)

Dynamic mechanism of CCA-adding polymerization reaction
Osamu Nureki (Department of Biological Information,
Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo
Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku,
Yokohama-shi, Kanagawa 226-8501, Japan)

極長鎖脂肪酸代謝と疾患

1. はじめに

極長鎖脂肪酸 (炭素数 C22 以上) は生体成分としては微量であるが, 生理・病理的に重要な役割を担っていることが明らかにされてきている。例えば, C24 や 26 の飽和および一価不飽和極長鎖脂肪酸は脳に比較的多く, その大部分はミエリンに存在している。ミエリン膜にはコレステロールとスフィンゴミエリンに富んだラフト構造が存在し, ラフト外膜側のスフィンゴ脂質の飽和極長鎖脂肪酸 (C22:0-C26:0) が内膜側のリン脂質と相互作用することでラフト構造が安定に維持されと考えられている¹⁾。また極長鎖脂肪酸延長酵素 (ELOVL4) に変異をもつ患者やノックアウトマウスの解析より, C26-C36 の極長鎖脂肪酸は網膜光受容体の機能や皮膚のバリアー形成に必須であることが明らかにされた²⁾。一方, 極長鎖脂肪酸の蓄積はペルオキシソーム病と呼ばれる疾患と関連している。ペルオキシソーム病のひとつである副腎白質ジストロフィー (ALD) では患者脳に極長鎖脂肪酸が異常に蓄積し, 神経