

## Q $\beta$ レプリカーゼによる RNA 合成の分子基盤

富田 耕造, 竹下 大二郎

### 1. はじめに

ウイルスゲノムの複製は宿主由来のタンパク質に依存しているが、複製における核酸合成の触媒活性はウイルスゲノムにコードされている核酸合成酵素が担っている。動物、植物、細菌に感染する RNA ウイルスの中には、そのゲノムにコードされている RNA 合成酵素が宿主のタンパク質合成に関わる因子と複合体を形成し、ウイルスゲノム RNA の複製や転写に必須であることが知られている<sup>1)</sup>。

Q $\beta$  ウイルスは一本鎖 RNA をゲノムとして有する、大腸菌に感染するウイルスであり、Q $\beta$  複製酵素複合体 (Q $\beta$  レプリカーゼ) がウイルスゲノム RNA の複製、転写を行う。Q $\beta$  レプリカーゼはゲノムにコードされている RNA 依存的 RNA 合成酵素 ( $\beta$  サブユニット) と宿主由来翻訳伸長因子 EF (elongation factor)-Tu, -Ts, リボソームタンパク質 S1 からなる複合体である<sup>2-6)</sup>。EF-Tu, EF-Ts は全生物において普遍的に存在し、タンパク質合成のペプチド伸長サイクルに不可欠なタンパク質である。また、リボソームタンパク質 S1 は mRNA のタンパク質合成開始において必要なタンパク質である。Q $\beta$  ウイルスはそのゲノムの 3' 領域に tRNA 様配列を有し、その 3' 末端には tRNA と同様に CCA 配列を有する。Q $\beta$  ウイルスのゲノムの複製開始では、プライマーを必要せず、RNA 合成は GTP によって開始され、ゲノム 3' 末端の A は鋳型として使用されないことも報告された<sup>2)</sup>。しかし、長年、 $\beta$  サブユニット、EF-Tu, EF-Ts の複合体形成、複合体中の翻訳因子の RNA 複製、転写における役割、プライマーを必要としないゲノム RNA 複製開始等の分子機構は明らかにされなかった。

筆者らは Q $\beta$  レプリカーゼのコア複合体 ( $\beta$  サブユニット、EF-Tu, EF-Ts の三者複合体) の構造解析を通じ、Q $\beta$

レプリカーゼが RNA 合成をプライマーなしに開始し、そして Q $\beta$  レプリカーゼが鋳型依存的に RNA を合成、伸長する分子機構を初めて明らかにした<sup>7-9)</sup>。

### 2. コア Q $\beta$ レプリカーゼの複合体形成

Q $\beta$  ウイルス由来の  $\beta$  サブユニットと EF-Tu, EF-Ts との複合体はボートのような全体構造をとっており、 $\beta$  サブユニットと EF-Tu, EF-Ts とは 1:1:1 の比率で、複合体を形成していた (図 1)。 $\beta$  サブユニットは通常のウイルス由来の RNA を鋳型として用いる RNA 合成酵素と同様に、サム (Thumb)、パーム (Palm)、フィンガー (Finger) の三つのドメインからなる右手構造をしていた。EF-Tu と EF-Ts は強固な複合体を形成し、EF-Tu のドメイン 2 と呼ばれる領域は  $\beta$  サブユニットのフィンガー領域、EF-Ts のコイルドコイルドメインと呼ばれる領域は  $\beta$  サブユニットのサムドメインと疎水的な相互作用をしていた。これら翻訳因子と  $\beta$  サブユニットとの相互作用によって、RNA 合成複合体のパームドメインに位置する RNA 合成触媒中心構造が維持されていた。翻訳因子との相互作用を破壊すると、複合体形成が阻害され、また、 $\beta$  サブユニットの発現も著しく抑えられることが示された。これらのことから翻訳因子は  $\beta$  サブユニットの折りたたみと、三者複合体の形成を促進するシャペロン様の機能を有していると考えられる<sup>7)</sup>。

### 3. プライマーを必要としない RNA 合成開始

RNA 合成開始時構造を捉えるため、Q $\beta$  レプリカーゼ、3' 末端に CCA 配列を有する鋳型 RNA、GTP のアナログの三者複合体の構造を決定した (図 2)。鋳型 RNA の 3' 末端の CC 配列に二つの GTP が水素結合を形成しており、活性触媒残基、配位したマグネシウムイオンとの相対的位置関係から、一つはプライマーとして働く GTP (GTPp)、もう一つは付加される GTP (GTPi) であり、決定された構造が RNA 合成開始の状態を捉えていることが確認できた。鋳型 RNA の 3' 末端の A のリボース部位は水素結合によって認識されているが、アデニン塩基は酵素と特異的な水素結合を形成していない。しかし、アデニンは鋳型

(独)産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6-13)

#### Mechanism of RNA polymerization by Q $\beta$ replicase

Kozo Tomita and Daijiro Takeshita (Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

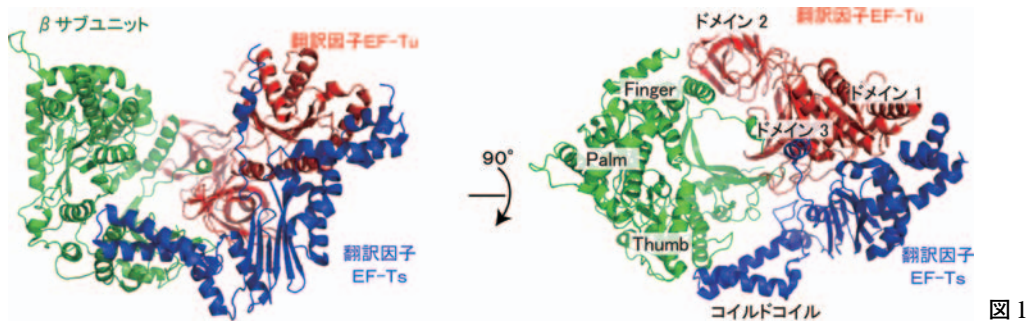


図1

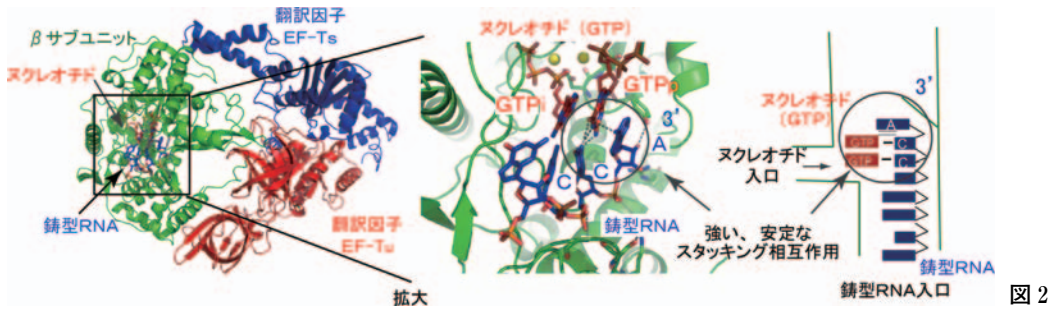


図2

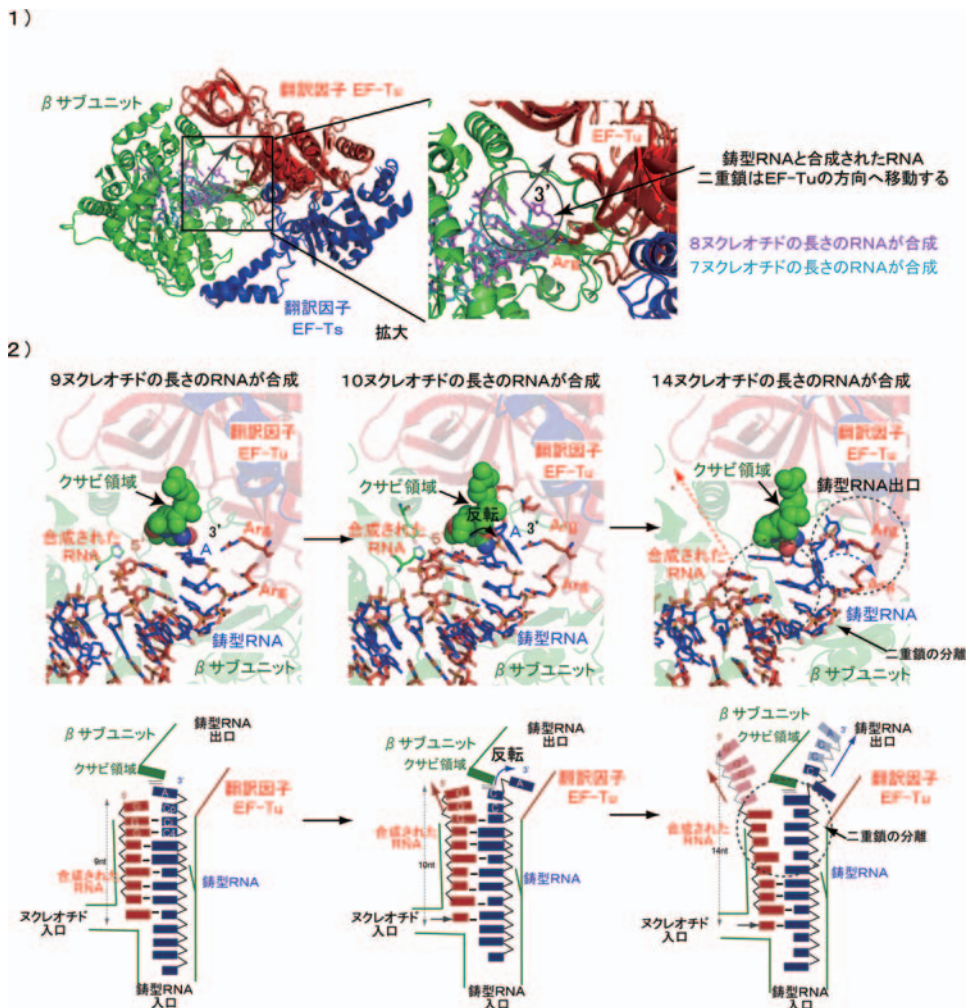


図3

RNAの3'末端から二番目のCとRNA合成開始のGTPpとの間に形成される水素結合と $\pi$ - $\pi$ スタッキング相互作用し、その結果、RNA合成開始時の複合体を安定化させていることが明らかになった。したがって、鋳型に用いられることのないRNAの3'末端のAはRNA合成開始を効率よく行わせる役割を担っていることが明らかになった(図2)。Q $\beta$ ウイルスは効率よく自分自身のゲノム複製を開始するために、そのゲノムの3'末端に鋳型として用いられないよけいなAを有していると考えられる。

#### 4. コアQ $\beta$ レプリカーゼによるRNA合成伸長過程

さらに、RNA合成伸長時の構造を捉えるため、コアQ $\beta$ レプリカーゼ、3'末端にCCA配列を有する鋳型RNA、鋳型RNAの末端の3'領域(末端のAは除く)に相補的な伸長されたRNAの三者複合体、あるいはそこにヌクレオチド(あるいはアナログ)を加えた構造を複数決定した。最終的に、コアQ $\beta$ レプリカーゼが鋳型依存的に7, 8, 9, 10, 14ヌクレオチドの長さのRNAを合成、伸長した状態の構造を決定した(図3)。これらの解析から、合成伸長過程において、8ヌクレオチドの長さのRNAが合成されるまで、合成されたRNAは鋳型RNAと二重鎖を形成し、その二重鎖は複合体中のEF-Tu、EF-Tsの方向へ進行していた。その進行方向は、鋳型RNAのリン酸骨格がEF-Tuのドメイン2と水素結合を形成することによって決定されていた(図3上段)。9ヌクレオチドの長さのRNAが合成されると、鋳型RNAの3'末端の突出したアデノシンは $\beta$ サブユニットのC末端領域と相互作用し、その結果、鋳型RNAと合成されたRNAからなる二重鎖RNA間の水素結合は不安定化されていた(図3下段左)。10ヌクレオチドの長さのRNAが合成されると、鋳型RNAと合成されたRNAからなる二重鎖RNAはさらに複合体中のEF-Tu、EF-Tsの方向へ進行し、鋳型RNAの3'末端の突出したアデノシンは $\beta$ サブユニットC末端領域およびEF-Tuと相

互作用することによって反転し、 $\beta$ サブユニットとEF-Tuの間に形成されるトンネル(鋳型RNA出口)の方向へ導かれ、鋳型RNAと合成されたRNAからなる二重鎖RNA間の水素結合はさらに不安定化されていた(図3下段中央)。さらにRNAが合成されると(14ヌクレオチド)、鋳型RNAと合成されたRNAからなる二重鎖RNA間の水素結合は $\beta$ サブユニットC末端領域(クサビ領域)によってほとんど解かれ、鋳型RNAは鋳型RNA出口へ入り込み、また合成されたRNAの5'側は複合体から解離していた(図3下段右)。

以上の解析から、Q $\beta$ レプリカーゼ中の翻訳因子はRNA合成伸長過程において、鋳型RNAと合成されたRNAの二重鎖RNAを解き、効率よくRNA伸長合成が行われるのを補助する役割を有するとともに鋳型RNAの出口トンネルを形成することによって(図3)、ウイルスRNAゲノムの複製が完結するまで、鋳型RNAが複合体から解離してしまうのを防ぐ役割を有していることが判明した。タンパク質合成で働く翻訳因子がRNA合成を促進するといったこれまで知られていなかった機能を担っていることが明らかになった。Q $\beta$ ウイルスは効率よく、かつ完全に自分自身のゲノムを複製するために、宿主由来の因子を利用していると考えられる。

#### 5. おわりに

ウイルス由来RNA合成酵素の中には、翻訳伸長因子以外のタンパク質合成に関わる因子と複合体を形成するものがあることも知られている<sup>1)</sup>。今後、これらのタンパク質合成に関わる因子のRNA合成における機能の解析により、翻訳因子の進化、起源が明らかにされると期待される。生命進化において、RNA合成-複製システムはタンパク質合成システムよりも先に出現したと考えられている<sup>10)</sup>。翻訳因子にRNA合成、伸長を促進する役割があるということは、RNAゲノムからなる太古生命体では、翻

図1 コアQ $\beta$ レプリカーゼの複合体構造

全体として、ボート様構造をとる。 $\beta$ サブユニット(緑)は右手構造をとり、サム、パーム、フィンガーの三つのドメインからなる。パームドメインに触媒ポケットが位置する。EF-Tu(赤)、EF-Ts(青)。

図2 コアQ $\beta$ レプリカーゼによるRNA合成開始

$\beta$ サブユニット(緑)、EF-Tu(赤)、EF-Ts(青)との複合体。鋳型RNA(スティック表示:青)、ヌクレオチド(GTP:スティック表示:赤)。鋳型RNAの末端のAはGTPと鋳型のCとの塩基対と相互作用し、RNA合成複合体を安定化する。

図3 コアQ $\beta$ レプリカーゼによるRNA合成伸長

1) 鋳型RNAと合成されたRNAの二本鎖は、RNA伸長に伴って、複合体中のEF-Tuの方向へ移動する。7ヌクレオチドRNA合成と鋳型RNAの二本鎖RNAをシアン、8ヌクレオチドRNA合成と鋳型RNAの二本鎖RNAとマゼンタで示す。2) 鋳型RNAと合成されたRNAの二重鎖RNAは $\beta$ サブユニットC末端領域(クサビ領域)とEF-Tuの作用により分離される。9ヌクレオチド(左)、10ヌクレオチド(中央)、14ヌクレオチド(右)の長さが合成された状態の構造。14ヌクレオチドの長さのRNAが合成された状態では、鋳型RNAと合成されたRNAの二重鎖RNAは完全に分離され、鋳型RNAは $\beta$ サブユニットとEF-Tuで構成される鋳型出口へ入り込んでいる。

訳因子は元来、RNA ゲノムの複製や転写を促進する補因子としての役割を担っており、その後、出現した現在のタンパク質合成システムが、このRNA 合成補因子を翻訳因子として取り込んだのかもしれない。

- 1) Lai, M.M. (1989) *Virology*, 244, 1-12.
- 2) Blumenthal, T. & Carmichael, G.G. (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 525-548.
- 3) Blumenthal, T., Landers, T.A., & Weber, K. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1313-1317.
- 4) Kondo, M., Gallerani, R., & Weismann, C. (1970) *Nature*, 228, 525-527.
- 5) Kamen, R. (1970) *Nature*, 228, 527-533.
- 6) Wahba, A.J., Miller, M.J., Niveleau, A., Landers, T.A., Carmichael, G.G., Weber, K., Hawley, D.A., & Slobin, L.I. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 3314-3316.
- 7) Takeshita, D. & Tomita, K. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 15733-15738.
- 8) Takeshita, D. & Tomita, K. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 229-237.
- 9) Takeshita, D., Yamashita, S., & Tomita, K. (2012) *Structure*, 20, 1-9.
- 10) Crick, H.F.C. (1968) *J. Mol. Biol.*, 38, 367-369.

#### 著者寸描

##### ●富田 耕造 (とみた こうぞう)

(独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 RNA プロセシング研究グループ研究グループ長。博士 (工学)。

■略歴 1993年東京大学工学部卒業、98年同大学院工学系研究科博士課程修了、同大学院農学系研究科、IBPM du CNRS (仏、ストラスブール)、Yale 大学 (米、ニューヘブーン)、ワシントン大学 (米、シアトル)、東京大学新領域創成科学研究科、産業技術総合研究所生物機能工学研究部門をへて、2005年生物機能工学研究部門、機能性核酸研究グループ長、10年バイオメディカル研究部門 RNA プロセシング研究グループ長、11年より東京大学大学院新領域創成科学科メディカルゲノム専攻連携教授。

■研究テーマと抱負 分子生物学、生化学、構造生物学を駆使して、低分子 RNA が成熟化されるプロセス、また、それらの RNA の生体内での代謝制御機構に関する研究。

■ホームページ <http://www.tomita-lab.net>