

タンパク質合成系を支える tRNA の成熟化

富田 耕造

転移 RNA (tRNA) は mRNA 上の遺伝暗号と、それに対応するアミノ酸とを結びつけるアダプター分子である。tRNA は転写後、多種多様なプロセスを経て成熟化され、タンパク質合成工場であるリボソーム上で機能する。tRNA の成熟化には 5'あるいは 3'側の余分な RNA の切断、またヌクレオシドの修飾や校正 (エディティング)、さらに機能しない未成熟 tRNA を除去する品質管理等が含まれる。とくに修飾、エディティング等は tRNA の機能を拡張する役割を担っている。本総説では翻訳システムにおいて、鍵となる tRNA の成熟プロセスを簡潔に概説するとともに、最近の筆者らが行ってきた tRNA の成熟化に関する研究を紹介する。

はじめに

タンパク質合成系はセントラルドグマにおける、mRNA 上の遺伝情報をタンパク質へ変換するシステムであり、地球上に存在する全ての生命の根幹をなすシステムである。タンパク質合成系に関する研究は分子生物学の成長とともに飛躍的に進展し、現在では、リボソームおよび tRNA 以外の全ての因子を組換え体タンパク質へと置き換えた生体外タンパク質合成システムが構築されるまでになっている¹⁾。タンパク質合成系において、tRNA は mRNA 上の遺伝暗号を、それに対応するアミノ酸へと変換する際のアダプター分子である。tRNA は多種多様なプロセスを経て成熟化され、タンパク質合成工場であるリボソーム上で機能する。tRNA の成熟化には 5'あるいは 3'側の余分な RNA の切断、またヌクレオシドの修飾や校正 (エディティング)、さらに機能しない未成熟 tRNA を除去する品質管理等が含まれる。とくに修飾、エディティング等は tRNA の機能を拡張する役割を担っている。本総説ではタンパク質

合成系において、鍵となる tRNA の成熟プロセスを簡潔に概説するとともに、最近の筆者らが行ってきた tRNA の末端の成熟化に関する研究を紹介する。tRNA の成熟化の分子機構解明、およびそれらを用いた機能性 tRNA の創生は、現存する無細胞タンパク質合成システムと融合することにより、さらに洗練された高度無細胞翻訳システムを構築する技術要素となりうると期待される。

1. tRNA の成熟化システム

tRNA に関する研究は歴史が長く、その存在が明らかになってから、既に 40 年もの年月が過ぎた。tRNA は転写後、多岐にわたるプロセスを受けて、機能をもった分子として成熟化される。さらに、プロセスがうまくいかなかったときに生じうる欠陥 tRNA は、品質管理を受け、ポリアデニル化を介した分解経路によって除かれる (図 1)。

まず、転写された前駆体 tRNA の 5'リーダー配列および 3'テール配列が除去される。5'リーダー配列の除去は RNA を構成成分として含むリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体であるエンドヌクレアーゼ、RNaseP の作用によって行われる²⁾。真正細菌の場合には、このエンドヌクレアーゼ触媒活性は RNP 中の RNA 成分である RNaseP RNA に存在し、タンパク質成分はその触媒活性を補助する役割を果たしていることが明らかにされている。一方、3'テール配列の除去は複数のリボヌクレアーゼの作用によって協奏的に行われる。真正細菌の場合には、まず、3'テール配列

独立行政法人 産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1)

Cell-free translation and tRNA maturation

Kozo Tomita (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Institute for Biological Resources and Functions, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)

中でエンドヌクレアーゼである RNaseIII や RNaseE の作用によって、ある程度の長さのテールへと切断され、つづいてエクソヌクレアーゼである RNaseT, RNasePH, RNaseII, RNaseBN などの作用によって、tRNA の末端の CCA 配列 (tRNA のヌクレオチド位置 74, 75, 76) の下流までトリミングを受ける³⁾。また tRNA 遺伝子に CCA がコードされていない真正細菌,あるいはほとんど全ての真核生物の場合には、エンドヌクレアーゼである RNaseZ によって識別ヌクレオチド (tRNA のヌクレオチド位置 73) の下流で切断され⁴⁾、その後、CCA 付加酵素によって CCA 配列が付加される。これらのプロセス後、(あるいは途中で) tRNA はヌクレオシドの塩基部分,あるいはリボース部分の修飾を受ける。全ての tRNA が全く同じ様式で同じヌクレオシドの修飾を受けるわけではなく、それぞれの tRNA によって、修飾の種類,修飾の位置は異なっている。これらの修飾をつかさどる酵素群は最近の真正細菌,真核生物,古細菌のゲノム配列が解析されたことと、遺伝学的解析,生化学的解析を通して明らかになりつつある。また、ある tRNA の場合には RNA 校正 (エディティング) を受ける。以上の適切な tRNA の成熟化プロセスを経なかった tRNA,すなわち欠陥 tRNA は品質管理システムによって分解除去

されることが知られている。酵母などでは、修飾が欠失した tRNA は核内において、ポリ A ポリメラーゼである Trf4/Air2 複合体によって 3'末端にポリ A 配列が付加され、核内 RNA デグラソーム (分解複合体) で分解されることが知られている⁵⁾。本稿では、特に tRNA の 3'末端に普遍的に存在する CCA 配列を合成するユニークな CCA 付加酵素に関する筆者らの最近の研究成果を中心にその分子機構,進化に関して紹介する。

2. tRNA 末端を修復する CCA 付加酵素

全ての生物の tRNA の 3'末端には普遍的に CCA 配列 (ヌクレオチド位置 74, 75, 76) が存在する。CCA 配列は、アミノアシル tRNA 合成酵素による tRNA の 3'末端へのアミノ酸の付加に必須であることが明らかにされている⁶⁾。また、アミノアシル tRNA あるいはペプチジル tRNA の 3'末端の CCA 配列はリボソーム RNA と相互作用することが知られており、この相互作用はリボソーム上でのペプチド結合形成反応に必須であることも明らかにされている⁷⁾。CCA 配列は、CCA 付加酵素 [ATP : CTP-tRNA nucleotidyl-transferase] とよばれる鋳型非依存的な RNA 合成酵素によって合成,あるいは修復される⁸⁾ (図 2)。tRNA の 3'末

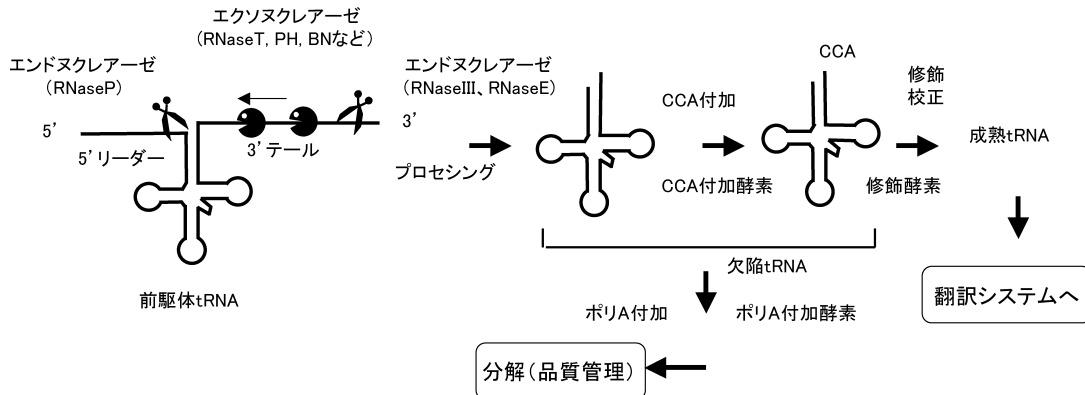


図 1 tRNA の成熟化プロセス

tRNA の成熟化プロセスは多種多様な因子が協奏的に作用して行われる。成熟した tRNA はタンパク質合成系で機能を発現する。また、成熟化プロセスが機能しなかった欠陥 tRNA は品質管理システムで分解除去される。

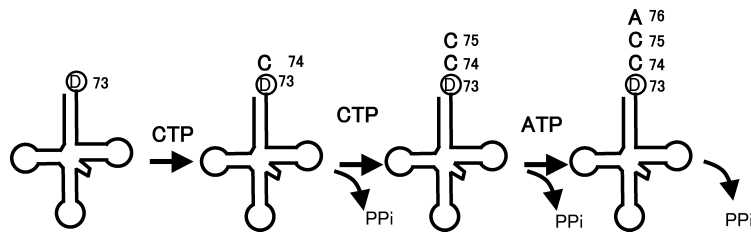


図 2 CCA 付加反応

CCA 付加酵素は tRNA の 3'末端に普遍的に存在する CCA 配列を鋳型非依存的に修復,合成する。tRNA の D (ヌクレオチド位置 73) は識別ヌクレオチドと呼ばれ, tRNA によってヌクレオチドの種類が異なる。PPi はピロリン酸を示す。

端へのCCA付加活性は、真正細菌、真核生物、古細菌のすべてに見いだされ、進化的に保存された活性である⁹⁾。多くの真正細菌、全ての真核生物、古細菌ではtRNA遺伝子の3'末端にはCCAがコードされておらず、この場合、tRNAの3'末端のCCAは3'プロセス後にCCA付加酵素によって付加される。一方、大腸菌のような、全てのtRNA遺伝子の3'末端にCCAがコードされている場合には、ヌクレアーゼ等によって削られたtRNAの3'末端の修復がCCA付加酵素によって行われている¹⁰⁾。

CCA付加酵素は、唯一、核酸性の鋳型を用いることなく定まった配列(CCA)を定まったRNA(tRNA)の3'末端へ付加するユニークな鋳型非依存性RNA合成酵素である。また、tRNAの3'末端の様式を厳密にモニターし、必要に応じてCCAを再構築(再合成)する。CCA付加酵素が核酸性の鋳型を用いずに定まった配列を合成する分子機構に関して、この三十年の間、いくつかのモデルが提唱されてきたが詳細な分子機構は未解決であった¹¹⁾。

3. CCA付加酵素の分類と進化

およそ十年前に、古細菌のCCA付加酵素が精製され、その遺伝子が分離された。この古細菌のCCA付加酵素のアミノ酸一次配列を真正細菌、真核生物のCCA付加酵素のアミノ酸配列と比較したところ、古細菌CCA付加酵素は真正細菌、真核生物のCCA付加酵素とは相同性が非常に低いことが明らかになり、CCA付加酵素が二つのクラスに分類されることになった⁹⁾。

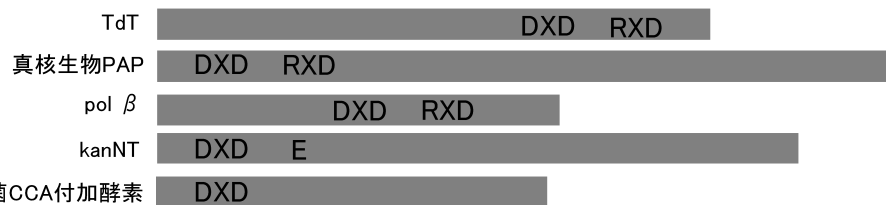
古細菌のCCA付加酵素はクラスIに属し、真正細菌/真核生物のCCA付加酵素はクラスIIに属するとされた(図3)。クラスI、IIのCCA付加酵素は全く同じ反応を触

媒し、またtRNAの交換も可能であるにも関わらず、そのアミノ酸配列の相同性は低く、触媒残基の周辺のせいぜい十数残基に保存性が認められるのみである。なお、クラスIには真核生物のポリAポリメラーゼ(PAP)、クラスIIには真正細菌のPAPが含まれる。

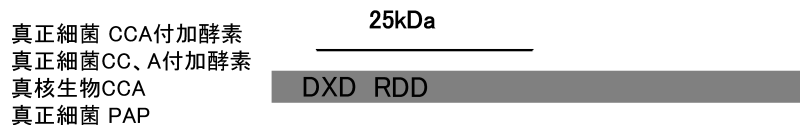
また、CCA付加酵素は、その酵素活性が発見されて以来、1種類の酵素によってCCAがtRNAへ付加されると考えられてきた。実際、ほとんどの真正細菌、真核生物、古細菌において、1種類の酵素によってその反応は触媒される。しかしながら、数年前に進化的に古い真正細菌において、tRNAへのCCA付加がクラスIIに属するCCを付加するCC付加酵素とAをつけるA付加酵素の独立した二つの酵素で行われていることが筆者らによって明らかにされた¹²⁾。この二つの酵素によるCCA付加反応は、CC付加酵素とA付加酵素の協奏的反応によって進行し、tRNAの末端にCC付加酵素によってCCが付加された後、tRNAはCC付加酵素を離れ、A付加酵素へ結合し最後のAが付加されるということも明らかになった。これらの二つに分断されたCCA付加活性が進化的に非常に古い真正細菌でみられることから、もともと、(少なくとも)真正細菌においてはCCを付加する酵素とAを付加する酵素の二つへ分断されていた可能性が示唆された。さらに真正細菌のCCA付加酵素、CC付加酵素、A付加酵素のアミノ酸配列をもとにした系統樹から、現在の真正細菌のCCA付加酵素はCC付加酵素よりもむしろA付加酵素に近いことが示されている。したがって、現在のCCA付加酵素はA付加酵素を起源としていると考えられている¹³⁾。

数年前に、筆者らのグループおよび他のグループによって、クラスIの古細菌CCA付加酵素、およびクラスIIの

クラスI



クラスII



DXD: 活性触媒残基

図3 CCA付加酵素はクラスIとクラスIIへ分類される

クラスIには、TdT(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)、polβ(DNAポリメラーゼベータ)、kanNT(カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ)、真核生物PAP(ポリAポリメラーゼ)が含まれる。また、クラスIIには進化的に古い真正細菌由来のCC付加酵素、A付加酵素、さらに真正細菌由来PAPが含まれる。

真正細菌、および真核生物のCCA付加酵素の単体のX線結晶構造が報告され、クラスIのCCA付加酵素とクラスIIのCCA付加酵素は一見全く異なった三次元構造をとることが明らかになった(図4)¹⁴⁻¹⁷。

クラスIはN末端、セントラルドメイン、C末端ドメインによって囲まれたU字型構造をとり、テールドメインがC末端ドメインに挿入されている(図4A)。一方、クラスIIはヘッド、ネック、ボディそしてテールの四つのドメインからなるタツノオトシゴで言い表せる構造をとっている(図4B)。しかしながら、活性触媒残基を含むアミノ末端領域の立体構造(クラスIではN末端ドメイン、クラスIIではヘッドドメイン)は互いに似通っており、五つのβシートと二つのαヘリックスからなる。これらの活性ドメイン構造はDNAポリメラーゼβ, TdT(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), ポリAポリメラーゼを含むヌクレオチジルトランスフェラーゼ(nucleotidyltransferase: NTR)ファミリーに保存されているものであった¹⁸。さらにクラスIおよびクラスIIのCCA付加酵素における三つの活性触媒残基の地理的な位置は二つのクラスで保存されている。これらのことから、クラスI, IIともに同じNTRの共通祖先から派生し、分岐後、それぞれ独立して進化をとげたと考えられている¹⁴。

4. CCA付加の分子機構

最近、クラスIの古細菌のCCA付加酵素および筆者らによるクラスIIの真正細菌のA付加酵素と、RNAプライマーおよびヌクレオチド(あるいはヌクレオチドアナログ)の三者複合体の構造が、X線結晶構造解析によって明らかにされた^{19,20}。先に記したように、クラスIとクラスIIのCCA付加酵素では、アミノ酸の一次配列の相互性が低く(図3)、さらに全体の三次元構造も全く異なっている(図4)。これらの解析より、正確なヌクレオチドの選択に関する分子基盤はクラスIとクラスIIとは異なることが示唆された(図5)。クラスIのCCA付加酵素では付加されるヌクレオチドの塩基(シトシンの4位のアミノ基, アデニンの6位のアミノ基)がRNAプライマーの3'末端のリン酸主鎖と水素結合を形成しており、また、さらに塩基(シトシンの3位のN, アデニンの1位のN)は酵素のアミノ酸残基(Arg224)で認識されていた(図5A)¹⁹。一方、クラスIIのA付加酵素では付加されるヌクレオチド(ATP)の塩基部分は酵素のアミノ酸(Asp149およびArg152)とのワトソン-クリック対合で認識されており、さらに塩基部分は、RNAプライマーの3'末端ヌクレオチドの塩基とスタッキング相互作用をしていた(図5B)²⁰。すなわち、クラスIIの酵素は、クラスIの酵素と比して、より酵素依存したヌクレオチド認識機構を採用しているということが示された。

これらの異なる二つのクラスの三者複合体構造解析から、「付加されるヌクレオチドの結合ポケットがプライマーの3'末端のヌクレオチドと酵素の協同で形成される」ということが、両方のクラスに共通したことから明らかになった²¹。これは、これまで提唱されてきた幾つかのCCA付加モデルのうち、ヌクレオチドの鑄型が酵素だけではなく、RNAと酵素の複合体(リボヌクレオプロテイン; RNP)の協同で行われるとする「タンパク質とRNAの協調的な鑄型」モデルの本質を示すものであった²²。

5. CCA付加の動的反応機構

特異性切り替えの分子機構に関しては、先のクラスIIのCCA付加酵素の2種類の反応ステージを表した三者複合体解析¹⁹(酵素, RNA, CTPからなる三者複合体と酵素, RNA, ATPからなる三者複合体)から、「動きやすいN末端ドメインを3'末端にヌクレオチドを付加したRNAが外側へ押し出し、その過程でRNAとタンパク質の協同的なヌクレオチド結合部位の“大きさ”と“形”が変化してCCAが付加される」というモデルが提唱された^{19,23}。一方、クラスIIに関しては、1種類の反応ステージの三者複合体解析から、筆者らは、鑄型依存的なRNA合成酵素のように、「酵素の開いた構造から閉じた構造への動的な動きに伴った、塩基認識に関わるアミノ酸のコンフォメーション変化によって特異性が変化してCCAが付加される」というモデルを提唱した²⁰。

ごく最近、筆者らは、クラスI古細菌のCCA付加酵素とRNA, ヌクレオチドのCCA付加反応の開始, 伸長, 終結反応を表した連続した複数の構造をX線結晶構造解析によって決定し、クラスIIのCCA付加酵素によるRNAへのCCA配列の付加反応における酵素, RNA, そして付加されるヌクレオチドの動的分子基盤の全貌を明らかにした²⁴。

その結果、C付加反応においては酵素とRNAの二者複合体の酵素はCTPによってN末端ドメインが“開いた”構造から“閉じた”構造へと変化し(図6A)、それに伴ってRNAプライマーの3'末端ヌクレオチドがひっくり返り、反応が進行する活性型へ移行し、CTPが付加されることが明らかになった(図7A)。これはRNAプライマーが酵素へ結合した時点(二者複合体)ではヌクレオチド特異性が決定されておらず、ヌクレオチドによって誘導される酵素, RNAの動的要素によって特異性が決定されていることを示唆する。一方、二つ目のC付加反応後は、酵素は“閉じた”活性型構造に固定化され(図6B)、ATPが結合すればそのまま反応が進行することが明らかになった。ATP付加反応は、動的なCTP選択反応とは対照的に、RNAプライマーが結合することによってのみでATPの選択性が決定されていることが明らかになった(図7B)。さ

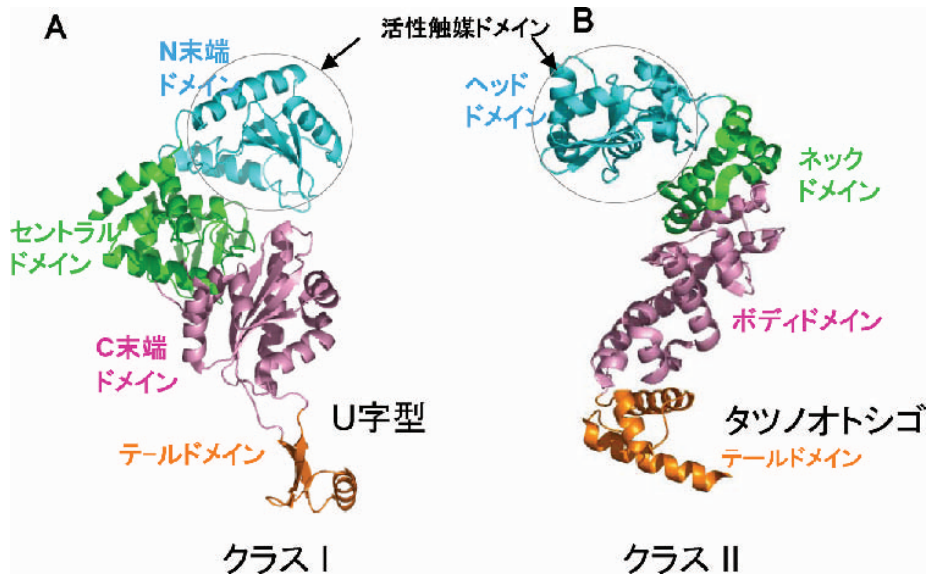


図4 クラスI, クラスII CCA付加酵素の三次元全体構造

A. クラスIはU字型構造, B. クラスIIはタツノオトシゴ構造をとる. クラスIおよびクラスIIのCCA付加酵素の活性触媒部位を含むドメイン(クラスI N末端ドメイン, クラスIIヘッドドメイン)はヌクレオチルトランスフェラーゼに共通してみられる構造をとっている.

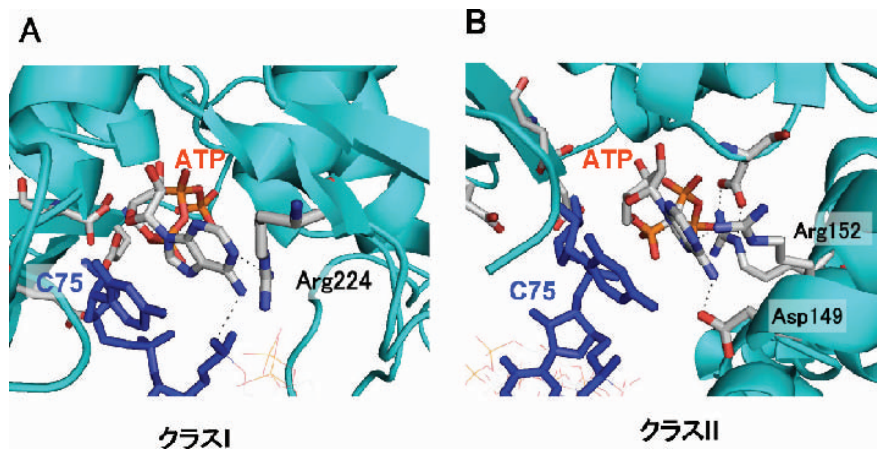


図5 クラスI CCA付加酵素, クラスII CCA付加酵素のRNAとの複合体におけるヌクレオチド選択

A. クラスIではATPの6位のNH₂がRNAのリン酸骨格と水素結合, さらにATPのN1がArg224と水素結合. B. クラスIIではATPの6位のNH₂がAsp149と水素結合, N1はArg152と水素結合.

らに, CTPとATPとの識別, 特異性の切り替えは, 先に述べたクラスIで提唱されているモデルとは異なり, 鍵となるアミノ酸残基(Arg224)のコンフォメーションが酵素全体の動的なCTPの取り込みの時と, 静的なATPの取り込み反応では異なっていることによって行われていることも明らかになった(図7C).

おわりに

本稿ではタンパク質合成システムにおける重要な分子tRNAの成熟化プロセスのうち, CCA付加酵素に関する最

近の筆者らの研究内容を概説した. 先に述べたように, 近年, tRNAの成熟化に関与する酵素群が遺伝学的手法, 生化学的手法によって明らかになってきている. また, その分子メカニズム解析に関しても, 生化学的, 構造生物学的手法を用いて明らかになってきている. 翻訳システムにおける重要な分子である機能性tRNAができるまでの過程の詳細な分子機構を解明することにより, これらの分子基盤を無細胞タンパク質合成システムへ組み込むことによって, さらにチェーンアップしたシステムが構築されることを期待したい.

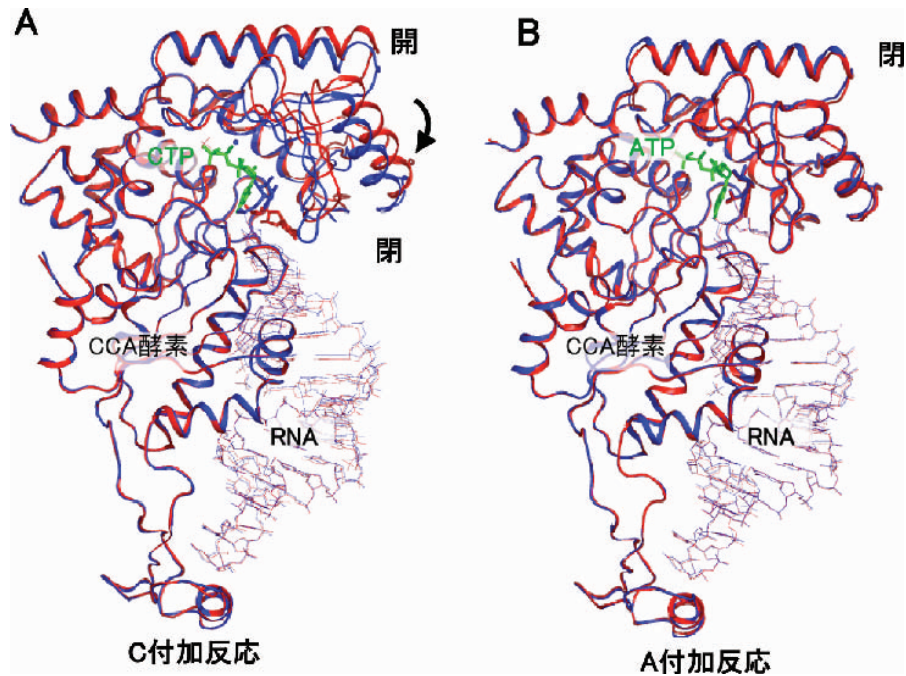


図6 クラスICCA付加酵素によるRNA重合反応における酵素の動き
 A. CTP付加反応では開いた構造から閉じた構造へ変化. 赤;二者複合体, 青;三者複合体. B. ATP付加反応では閉じた状態のまま固定化されている. 赤;二者複合体, 青;三者複合体

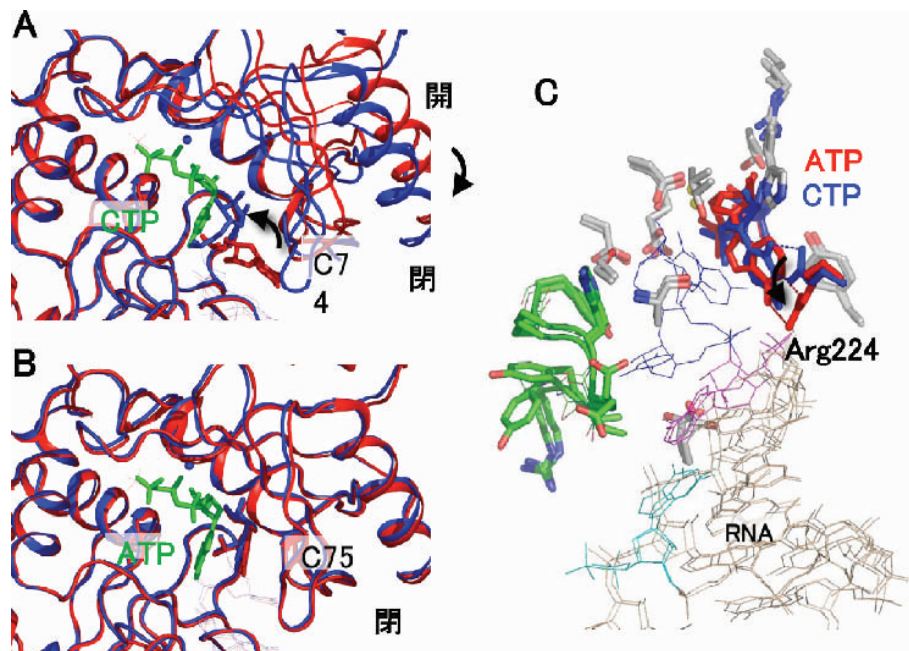


図7 クラスICCA付加酵素による, CTP付加, ATP付加反応における酵素, RNAの動きとCTPとATPの識別機構

A. CTPによってRNAの3'末端ヌクレオシドがひっくり返り活性化構造になる. B. ATPはRNA3'末端ヌクレオシドの構造変化を誘起せず, 二者複合体の状態では活性型構造である. C. CTPとATPの識別はArg224のリオリエンテーションによって制御されている.

文 献

- 1) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-755.
 - 2) Frank, D.N. & Pace, N.R. (1998) *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 153-180.
 - 3) Deutcher, M.P. (1990) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **39**, 209-240.
 - 4) Schiffer, S., Rosch, S., & Marchfelder, A. (2002) *EMBO J.*, **21**, 2769-2777.
 - 5) Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A. M., Hinnebusch, A.G., & Anderson, J. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 1227-1240.
 - 6) Sprinzel, M. & Cramer, F. (1979) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **22**, 1-69.
 - 7) Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 920-930.
 - 8) Zhu, L.Q., Cudny, H., & Deutscher, M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 14875-14877.
 - 9) Yue, D., Maizels, N., & Weiner, A.M. (1996) *RNA*, **2**, 895-908.
 - 10) Zhu, L. & Deutscher, M.P. (1987) *EMBO J.*, **6**, 2473-2477.
 - 11) Weiner, A.M. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 883-885.
 - 12) Tomita, K. & Weiner, A.M. (2001) *Science*, **294**, 1334-1336.
 - 13) Tomita, K. & Weiner, A.M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48192-48198.
 - 14) Okabe, M., Tomita, K., Ishitani, R., Ishii, R., Takeuchi, N., Arisaka, F., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2003) *EMBO J.*, **22**, 5918-5927.
 - 15) Xiong, Y., Li, F., Wang, J., Weiner, A.M., & Steitz, T.A. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 1165-1172.
 - 16) Li, F., Xiong, Y., Wang, J., Cho, H.D., Tomita, K., Weiner, A. M., & Steitz, T.A. (2002) *Cell*, **111**, 815-824.
 - 17) Augustin, M.A., Reichert, A.S., Betat, H., Huber, R., Morl, M., & Steegborn, C. (2003) *J. Mol. Biol.*, **328**, 985-994.
 - 18) Holm, L. & Sander, C. (1995) *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 345-347.
 - 19) Xiong, Y. & Steitz, T.A. (2004) *Nature*, **430**, 640-645.
 - 20) Tomita, K., Fukai, S., Ishitani, R., Ueda, T., Takeuchi, N., Vassilyev, D.G., & Nureki, O. (2004) *Nature*, **430**, 700-704.
 - 21) Schimmel, P. & Yang, X.L. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 807-808.
 - 22) Shi, P.Y., Maizels, N., & Weiner, A.M. (1998) *EMBO J.*, **17**, 3197-3206.
 - 23) Xiong, Y. & Steitz, T.A. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 12-17.
 - 24) Tomita, K., Ishitani, R., Fukai, S., & Nureki, O. (2006) *Nature*, **443**, 956-960.
-