

MECHANISTIC FEATURES OF RNA-DIRECTED MOLECULAR ASYMMETRY OF AMINO ACIDS

Koji Tamura^{1,2,3}

¹Department of Biological Science and Technology, and ²Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan
³PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

koji@rs.tus.ac.jp

(Received April 27, 2011; Accepted July 27, 2011)

(Abstract)

Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix (progenitor of the modern tRNA) could provide a crucial clue to solve the origin of homochirality in a biological system. In this reaction, an amino acid donor (aminoacyl phosphate oligonucleotide) is placed in close proximity to minihelix with the help of a bridging oligonucleotide, which possesses sequences complementary to both donor nucleotide and single-stranded NCCA of minihelix, to accomplish the chiral (L-amino acid)-selective aminoacylation of the minihelix. Here, we propose a molecular mechanism of chiral selectivity based on the mutational analysis of the donor and bridging nucleotides. The selectivity for L-amino acids is dependent on the stereochemistry of RNA. Due to cation coordination and sugar pucker, the side chain of D-amino acids is brought much closer to the terminal adenosine of the minihelix, thereby causing steric hindrance of the D-amino acids during amino acid transfer from the donor nucleotide to minihelix. This mechanism completely explains the result of the original chiral-selective aminoacylation experiment without any contradictions. This selective process may have determined the homochirality of L-amino acids in the putative RNA world.

This article is dedicated to the memory of Dr. Kaoru Harada.

(Keywords)

homochirality; amino acid; RNA minihelix; aminoacylation; stereochemistry; extended double helix

RNA によるアミノ酸の分子非対称性選択の作用機構

田村浩二^{1,2,3}

¹東京理科大学・基礎工学部・生物工学科

²東京理科大学・総合研究機構

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

³科学技術振興機構・さががけ

〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

E-mail: koji@rs.tus.ac.jp

1. はじめに

生命は DNA の遺伝情報を翻訳したタンパク質が機能することで成り立っている[1,2]. タンパク質はアミノ酸がアミド結合(ペプチド結合)した構造を持ち、通常、20 種類の側鎖から成る多様

な化学的性質と立体構造から生み出される触媒能力は、他の人工物の追従を許さない。タンパク質を構成するアミノ酸は α -アミノ酸であり、立体化学的には、L-アミノ酸、D-アミノ酸の2種類が同等に存在できるはずであるが、不思議なことに、リボソームが作り出す天然タンパク質は、すべてL-アミノ酸から構成されている[3,4].

素粒子が持つ本質的な性質[5]、宇宙空間における円偏光の分布[6]、自己不斉触媒効果[7-9]などの立場から、アミノ酸のホモキラリティーの起源について、さまざまな議論が行われているが、地球上の生命に見られる tRNA のアミノアシル化の起源を探るモデル実験から、アミノ酸のホモキラリティーの謎の解明に関係した重要な発見があった。それは、RNA ミニヘリックスのキラリ選択的アミノアシル化であり、RNA とアミノ酸がはじめて出会うステップにおいて、アミノ酸のホモキラリティーが決定された可能性を強く示唆するものである[10-14].

ホモキラリティーの起源に関わる問題は、非常にデリケートであり、確定的な結論に至るには、まだ多くの証拠収集の必要性はあるものの、RNA ミニヘリックスのキラリ選択的アミノアシル化に見られるキラリ選択性は、実験系に関わる現実の分子(RNA とアミノ酸)が繰りなす分子認識の結果の産物である。本稿では、どのようなメカニズムで、実際に L-アミノ酸が選択されているのかについて、立体化学に基づいた議論を行いたい。

2. RNA ミニヘリックスのキラリ選択的アミノアシル化

キラリ選択性の議論をする前に、問題となっているモデルそのものについて、簡単に説明しておく必要がある。このモデルは、全生物に共通に見られる tRNA のアミノアシル化反応がどのようにして進化してきたのかを明らかにする目的で考案された[10-14]. tRNA のアミノアシル化は、DNA をコピーした mRNA 上の遺伝情報を、タンパク質に翻訳する際の鍵となる反応である[15,16]. 現在の生物系においては、20 種類のアミノ酸に対応した tRNA と、それぞれの tRNA に対応するアミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)というタンパク質が存在し、aaRS が間違いなくアミノ酸に対応する tRNA に結合させている(tRNA のアミノアシル化)[15,16]. そして、最終的にアミノアシル化された tRNA がリボソーム上でアミノ酸を繋げることによって、タンパク質が生成されることになる[1,2]. 生命進化の初期には、RNA ワールドというものが存在していたと考えられており[17-19], RNA ワールド仮説では、次

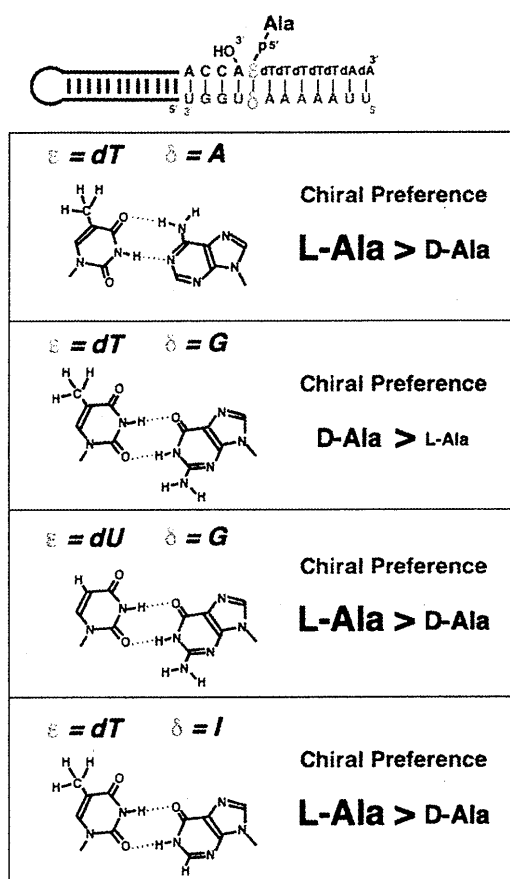


Figure 2. Chiral preferences of Ala aminoacylation by using Watson-Crick (dT-A) and wobble base pairs placed closest to the amino acid attachment site. The different font sizes correspond to relative activities of aminoacylation.

になった。dT-G の導入による L-Ala のアミノアシル化の活性低下から、L-Ala のメチル基はチミンのメチル基の近くに位置していることと、D-Ala のメチル基はアミノアシル化の場合であるミニヘリックスに近い位置に存在していることが予想される (Fig. 3) [21,22].

オリジナル反応におけるキラル選択性は、Ala のアミノ基をアセチル基でブロックした場合においても不変であった (L>D) [21]. フリーの Gly, および、N-アセチル-Gly の場合に Na^+ イオンが同じように bidentate mode で配位することが示されており[23], そのような配位状態を Ala の系に当てはめれば、Ala (および N-アセチル-Ala) のアミノ基とカルボニル酸素との間に、 Na^+ イオンが bidentate mode で配位していると考えられる。更に、DNA ポリメラーゼと基質の構造解析の結果からも明らかなように、カルボニル酸素とリン酸基の酸素間には Mg^{2+} が配位している可能性が高く[24,25], これらのカチオンの配位による立体障害を考慮すると、アミノ酸のアミノ基の部分は、二重らせんの外側に配置されていると考えることができる (Fig. 4). この配置は L-Ala, D-Ala の側鎖のメチル基が、それぞれ、ミニヘリックスから離れた状態、および、ミニヘリックスに近い状態に位置していることと矛盾していない (Fig.

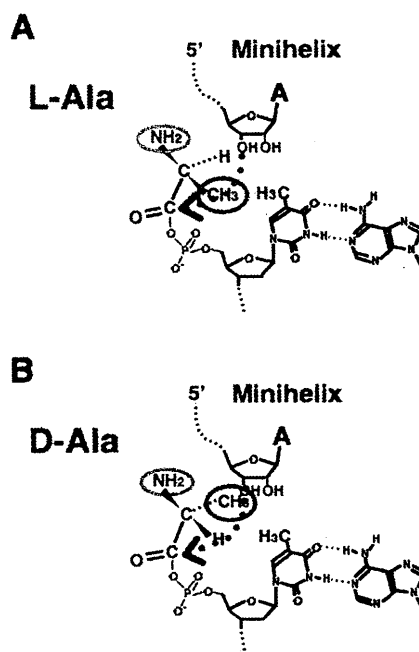


Figure 3. Schematic representation of the stereochemical positioning of (A) L-Ala and (B) D-Ala. The positioning of the CH_3 of Ala relative to that of the 3'-OH of the minihelix and to that of the CH_3 of thymidine determines the chiral preference during aminoacylation.

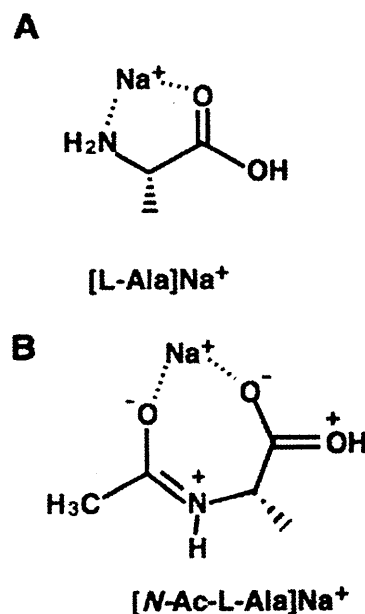


Figure 4. Bidentate coordination of Na^+ (A) between the carbonyl and amino groups of Ala and (B) between the 2 carbonyl O-atoms of N-acetyl-Ala.

3). また、この配置において、dT-A から dT-G への変異に伴い引き起こされる、チミンのメチル基の張り出しによる L-Ala のメチル基との立体障害に関しても、矛盾なく説明できる (Fig. 3) [22].

チミンのメチル基の張り出しによる L-Ala の

メチル基との立体障害に関しては、チミンをウリジンに換えた dU-G タイプで、L-Ala のアミノアシル化活性が元に戻ることも信憑性が得られる (Fig. 2). 一方、dT-G と同じようにウォブル塩基対を形成し、dT-G と同様なチミンのメチル基の張り出し効果を期待できるペアとして dT-I (I: イノシン) がある. dT-G ウォブル塩基対において、G の 1 位の NH と 6 位の C=O が dT の 2 位の C=O と 3 位の NH とそれぞれ水素結合を形成することで、G の 2 位のアミノ基が二重らせんのマイナーグループ側に張り出し、通常のワトソン・クリック塩基対に比べて、らせんが歪むことになる. I は G の 2 位のアミノ基を水素原子で置き換えたものであり、dT に対する水素結合形成の観点からは、dT-G と dT-I はまったく同様なウォブル塩基対を形成する. しかしながら、dT-I の場合は、dT-G の場合のような、L-Ala のアミノアシル化の減少は見られなかった (Fig. 2) [21,22]. この dT-G と dT-I の場合のアミノアシル化の結果の違いは何を意味するのだろうか?

4. リボースのパッカリングとアミノアシル化

リボースを構成するフラノース 5 員環は平面構造ではない. 平面から飛び出している原子のうち、C5' と同じ側にあるものを *endo* と呼び、反対側にあるものを *exo* と呼んでいる [26]. これで、糖のパッカリングを定義する. リボースの 2 つの主なパッカリング様式は、C2'-endo および C3'-endo である (Fig. 5) [26].

tRNA のアンチコドンの修飾ウリジンの種類により、 xo^5U 型の修飾は C2'-endo 型を安定化し、 xm^5U 型の修飾は C3'-endo 型を安定化することが知られている [27,28]. 温故知新、このようなパッカリングによる違いが、前節で述べた、dT-G と dT-I の場合の結果の違いに関係しているのではないかと明らかにするために、Ala がリン酸基を介して結合している dT の糖の 2' の位置

に O-CH₃ 基を導入することを試みた (Fig. 6) [21,22]. 2'-O-CH₃ 基の導入により、糖のパッカリングが C3'-endo 型に固定されることが知られている (Fig. 6) [29]. この T(2'-O-CH₃)-G という塩基対の場合、dT-G に見られた L-Ala のアミノアシル化の低下は見られず、これらは dT-G の dT のパッカリングが C3'-endo 型ではなく、C2'-endo 型であることを示唆している (Fig. 6) [21,22].

C2'-endo 型と C3'-endo 型の違いの 1 つに、C4'-C5' 結合のリボース環に対する傾きの違いが挙げられる [26]. C2'-endo 型の場合、C4'-C5' 結合は環に対して立った状態であるのに対し、C3'-endo 型の場合、C4'-C5' 結合は環に対して寝ている (Fig. 5) [26]. C5' はリン酸基を介して Ala に結合しているため、最終的な Ala の位置というものは当然ながら C4'-C5' 結合の有り様によって影響される. C3'-endo 型である T(2'-O-CH₃)-G の

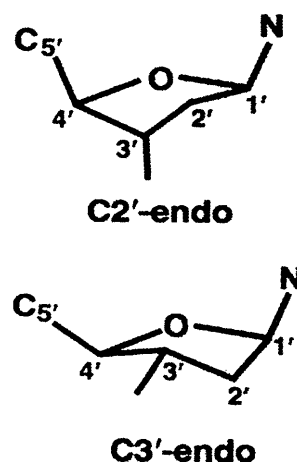


Figure 5. Schematic representation of typical puckering of the ribose ring (Saenger, 1984).

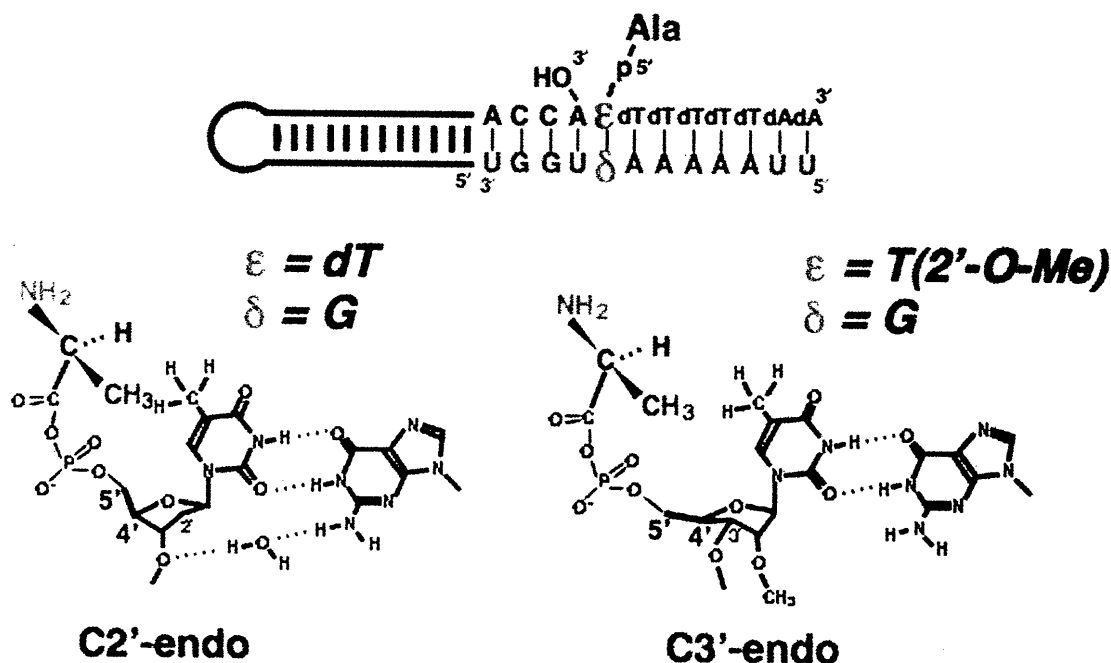


Figure 6. Possible differences in the positioning of L-Ala based on differential ribose puckering with dT-G and T(2'-O-Me)-G at the position closest to the amino acid attachment site.

場合、O-C4'-C3'で形成される面に対する C4'-C5' 軸の角度は、C2'-endo の場合よりも大きいために、L-Ala のメチル基の位置はチミンのメチル基と立体障害にならないくらい遠くに位置しているに違いない。これに対し、dT-G で L-Ala のアミノアシル化が減少したのは、L-Ala のメチル基とチミンのメチル基のクラッシュによるものであり、dT-G の dT のパッキングが C2'-endo 型のため、C4'-C5' 結合は環に対して立っており、両メチル基間の距離を小さくさせている可能性が考えられる (Fig. 6)。T(2'-O-CH₃)-G が O-CH₃ 基を持つコンフォーメーションの制約のために C3'-endo 型を固定するように、dT-G 塩基対における dT のパッキングが C2'-endo 型を取るためには、何らかの条件が付されなければならない。dT の C2'には水素原子が2つ結合しているに過ぎないため、その周りの立体障害は少ない。一方、C3'には酸素原子が結合しており、ホスホジエステル結合の形成に寄与している。また、dT-G 塩基対の G に目を転じると、マイナーグループ側に張り出した2位のアミノ基が存在しており、このアミノ基と dT の 3'-O の間に構造的な制約を課せば、dT のコンフォーメーションは C2'-endo 型になると考えられる。実際、NMR による dT-dG を含むオリゴヌクレオチド構造が明らかにされているが、この時の dT のパッキングは C2'-endo 型で、dT の 3'-O とグアニンの2位のアミノ基の H の距離は 7.2 Å である[30]。これは水が1分子入り込み、水素結合を形成するのに最適の距離である。この水分子による水素結合が C2'-endo 型のコンフォーメーションを固定している可能性がある (Fig. 6)。この dT-dG を含むオリゴヌクレオチドのパッキングや各原子間の距離の情報は、ドナーアミノ酸が結合した部位に dT-G を有するオリゴヌクレオチドを用いたアミノアシル化モデルでのキラル選択性を説明する重要なデータに成り得る。

いずれにせよ、ワトソン・クリック型の相互作用を介して二重らせん様構造を形成しているこのモデル反応において、L-アミノ酸の側鎖はミニヘリックスに対して反対側に位置し、D-アミノ酸の側鎖はミニヘリックスの近くに位置しているということが明らかになった。このために、D-アミノ酸の側鎖の立体障害によって、D-アミノ酸の移動が阻害されているということになる (Fig. 3)。

5. おわりに

生物界のホモキラリティーの起源は、生命の根本的な謎の1つである。この問題の解明に、さまざま説明がなされているが、現実の生命の根幹であるタンパク質合成系の最大のイベントである tRNA のアミノアシル化の過程に、その謎を解く鍵があるということは、極めて重要であるだろう [10-14]。生命の進化を考える上でも、進化の初期の段階で RNA が中心となった RNA ワールドと呼ぶべき世界があったであろうことは間違いないと思われる (RNA ワールドが生命の起源であるかどうかは別として)。本稿で示したアミノアシル化過程で見られるキラル選択性は然るべき立体化学的解釈に基づいており、現時点で、筆者がこの実験結果を矛盾なく説明する方法は、これ以外に考えられない。生命は、原始地球上で生成

された様々なブロック分子が化学反応サイクルを生み出すことでスタートした可能性が考えられる。生命の起源の謎を解明するためには、ブロックとなる小分子がどのように生成されたのかという過程と、それらがどのように相互作用を開始し始めるのかという過程の、2つの側面からアプローチする必要がある。前者に関して、原田馨先生が残された功績は非常に大きい[31-33]。しかし、今後の課題は、間違いなく後者の問題であり、生命の本質の解明のために更なる研究の発展が求められるであろう。

謝辞

The Scripps Research Institute の Paul Schimmel 博士には有益な助言を賜り、また、科学技術振興機構・さがけ (RNA と生体機能)、および、文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業による助成をいただいた。ここに感謝の意を表したい。

References

1. Tamura, K. and Alexander, R. W. Peptide synthesis through evolution, *Cell. Mol. Life. Sci.* 61, 1317-1330 (2004).
2. Tamura, K. Peptide bond formation: RNA's big bang, *J. Cosmol.* 13, 3800-3810 (2011).
3. Lake, J. A. The ribosome, *Sci. Am.* 245, No. 2, 84-97 (1981).
4. Doolittle, R. F. Proteins, *Sci. Am.* 253, No. 4, 88-99 (1985).
5. Hegstrom, R. A. Parity violation and symmetry breaking of a racemic mixture, *Biosystems* 20, 49-56 (1987).
6. Fukue, T., Tamura, M., Kandori, R., Kusakabe, N., Hough, J. H., Bailey, J., Whittet, D. C., Lucas, P. W., Nakajima, Y. and Hashimoto, J. Extended high circular polarization in the Orion massive star forming region: implications for the origin of homochirality in the solar system, *Orig. Life. Evol. Biosph.* 40, 335-346 (2010).
7. Soai, K., Shibata, T., Morioka, H. and Choji, K. Asymmetric autocatalysis and amplification of enantiomeric excess of a chiral molecule, *Nature* 378, 767-768 (1995).
8. Blackmond, D. G. Asymmetric autocatalysis and its implications for the origin of homochirality, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5732-5736 (2004).
9. Kawasaki, T., Matsumura, Y., Tsutsumi, T., Suzuki, K., Ito, M. and Soai, K. Asymmetric autocatalysis triggered by carbon isotope (¹³C/¹²C) chirality, *Science* 324, 492-495 (2009).
10. Tamura, K. and Schimmel, P. Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix, *Science* 305, 1253 (2004).
11. Tamura, K. Molecular handedness of life: significance of RNA aminoacylation, *J. Biosci.* 34, 991-994 (2009).
12. Tamura, K. Amino acid homochirality and the RNA world: necessities for life on Earth, *J. Cosmol.* 5, 883-889 (2010).
13. Tamura, K. Origin of asymmetry of amino acids: relationship to the RNA world, *Biophysics* 50, 180-181 (2010).
14. Tamura, K. RNA-directed molecular asymmetry of amino acids, *Viva Origino* 38, 18-22 (2010).
15. Berg, P. Specificity in protein synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 30, 293-324 (1961).
16. Schimmel, P. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs, *Annu. Rev. Biochem.* 56, 125-158 (1987).
17. Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena, *Cell* 31, 147-157 (1982).
18. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell* 35, 849-857 (1983).
19. Gilbert, W. The RNA world, *Nature* 319, 618 (1986).
20. Carpenter, F. H. The free energy in hydrolytic reactions: the

- non-ionized compound convention, *J. Am. Chem. Soc.* 82, 1111-1122 (1960).
21. Tamura, K. and Schimmel, P. R. Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix: mechanistic features and chiral suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13750-13752 (2006).
 22. Tamura, K. Origin of amino acid homochirality: relationship with the RNA world and origin of tRNA aminoacylation, *Biosystems* 92, 91-98 (2008).
 23. Cerda, B. A., Hoyau, S., Ohanessian, G. and Wesdemiotis, C. Na⁺ binding to cyclic and linear dipeptides. Bond energies, entropies of Na⁺ complexation, and attachment sites from the dissociation of Na⁺-bound heterodimers and ab initio calculations, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 2437-2448 (1998).
 24. Joyce, C. M. and Steitz, T. A. Polymerase structures and function: variations on a theme?, *J. Bacteriol.* 177, 6321-6329 (1995).
 25. Steitz, T. A. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms, *J. Biol. Chem.* 274, 17395-17398 (1999).
 26. Saenger, W. Principles of nucleic acid structure, Springer, New York (1984).
 27. Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Miyazawa, T. Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of anticodon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4905-4909 (1985).
 28. Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K. and Muto, A. Recent evidence for evolution of the genetic code, *Microbiol. Rev.* 56, 229-264 (1992).
 29. Venkateswarlu, D., Lind, K. E., Mohan, V., Manoharan, M. and Ferguson, D. M. Structural properties of DNA: RNA duplexes containing 2'-O-methyl and 2'-S-methyl substitutions: a molecular dynamics investigation, *Nucleic Acids Res.* 27, 2189-2195 (1999).
 30. Isaacs, R. J., Rayens, W. S. and Spielmann, H. P. Structural differences in the NOE-derived structure of G-T mismatched DNA relative to normal DNA are correlated with differences in ¹³C relaxation-based internal dynamics, *J. Mol. Biol.* 319, 191-207 (2002).
 31. Fox, S. W. and Harada, K. Thermal copolymerization of amino acids to a product resembling protein, *Science* 128, 1214 (1958).
 32. Harada, K. and Fox, S. W. A total resolution of aspartic acid copper complex by inoculation, *Nature* 194, 768 (1962).
 33. Harada, K. and Fox, S. W. Thermal synthesis of natural amino acids from postulated primitive terrestrial atmospheres, *Nature* 201, 335-336 (1964).