

Artificial evolution of RNA catalysts: Bridging a gap between the RNA world and the next world

Hiroaki Suga

Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

An evolving life form must possess the ability to manipulate its own surroundings through chemical transformation in order to provide an environment conducive to metabolic function. It must also provide a hereditary record necessary to carry out critical functions for future generations. Central to this theme is the discovery of catalytic ribonucleic acids (ribozymes) in the early 80's in which certain RNA molecules possess catalytic function in addition to hereditary function. This discovery has led us to hypothesize that RNA molecules could have central roles in evolving primitive life. This notion is called "the RNA world". Unfortunately, the naturally occurring ribozymes thus far found in nature are able to catalyze only phosphoryl transfer reactions. Clearly, this is not enough evidence for persuading the RNA world hypothesis.

In vitro selection is a powerful method for probing the catalytic possibilities of nucleic acids. This method allows us to isolate rare catalytically active sequences of RNA from a combinatorial library containing approximately 100 trillion different RNA molecules. This procedure is considered to be an in vitro version of Darwinian evolution, which is the preferential survival and reproduction of the fittest variants in the population. My laboratory uses this technique to evolve novel ribozymes in vitro, in order to obtain evidence that RNA may have served as the evolutionary vehicle necessary for the development of present day DNA/protein-based life forms.

In last a half decade, my laboratory has attempted to isolate ribozymes that are able to charge amino acids on transfer RNA (tRNA) [1–4]. This work has aimed at discovering ribozymes that can bridge a missing link between RNA and protein world. In the lecture, I shall describe a hypothesis of how amino acids could have been involved in an early stage of the replication of RNA molecules in the RNA world, and how such amino acids could have begun being utilized in a prototypical translation system. Then, I shall discuss our effort in isolating ribozymes with tRNA aminoacylation function, and revisit the hypothesis how the RNA world can bridge to the pre-modern world consisting of RNA and protein.

1. H. Saito, D. Kourouklis, H. Suga (2001) *EMBO J.*, **20**, 1797-1806.
2. Y. Bessho, D. Hodgson, H. Suga (2002) *Nature Biotechnol.*, **20**, 723-728.
3. H. Murakami, H. Saito, H. Suga (2003) *Chem. Biol.* **10**, 655-662.
4. H. Murakami, D. Kourouklis, H. Suga (2003) *Chem. Biol.* **10**, 1077-1084.

Vocabulary translation:

RNA-related terms

RNA: ribonucleic acid (リボ核酸)

RNA has two ends, called 5' and 3' end. It has four bases, called A (adenosine), G (guanosine), C (cytosine), and U (uridine), and the basic structure of RNA resembles to DNA. Like DNA, A pairs with U and G pairs with C via specific hydrogen bonding interaction, and hence RNA can form duplex. However, in cell or even in test tube, RNA often folds by itself and form a variety of non-canonical pairs stabilized by hydrogen bonding network, resulting in the formation of a higher order structure.

RNA は 5' 末端と 3' 末端の二つの末端を持つ。RNA の基本骨格は DNA と類似した構造を持ち、DNA と同じく4つの塩基(A, G, C, U)を持つ。DNA のように、RNA の核酸塩基も通常 A と U、G と C と塩基対を取り、2重らせん構造をつくる。しかし、細胞内や試験管内で、RNA は自己で折りたたまれ、通常の塩基対を超えた様々な塩基対を形成し、高次構造を構成する。

tRNA: transfer RNA (トランスファーRNA)

This RNA plays a critical role in reading the genetic alphabet encoded on mRNA (see below) in translation apparatus, called ribosome. Since 20 natural amino acids exist in cell, there are 20 functionally distinct tRNAs assigned to the cognate amino acids. The tertiary structure of tRNA is L-shaped, where one side, generally referred to as 3' end or aminoacyl-acceptor end, is charged with amino acids by the formation of ester bond (see chemistry term). The other side of the L-shape structure, called anticodon loop, is responsible to read the genetic triplet through base pair interactions with mRNA.

この RNA は mRNA(下を参照)上にコードされた遺伝子アルファベットをリボソーム翻訳系で読み取る働きをしている。細胞内では、20種類の天然アミノ酸があるため、それぞれに対応した20種類の tRNA が存在している。tRNA の3次元構造は L 型をしており、その L 型構造の一方側(通常 3' 末端もしくはアミノアシル受容末端と呼ばれるが)にアミノ酸がエステル結合様式(化学用語参照)を介して結合(チャージ)される。L 型構造のもう一方側はアンチコドンループと呼ばれ、mRNA 上の3塩基からなる遺伝暗号に対し塩基対を形成することでそれを読み取る機能を担っている。

ARS: aminoacyl-tRNA synthetase(アミノアシル合成酵素)

The above tRNA must be charged with the cognate amino acid. ARS is the protein enzyme responsible for carrying out this event. Generally, there are 20 ARSs that correctly charge the amino acids onto the cognate tRNAs.

上記の tRNA は同種のアミノ酸でチャージされなければならない。この反応を担うのが、ARS と呼ばれるタンパク質酵素である。一般には、20種類の天然アミノ酸に対応した20種類の ARS があり、ARS は間違いを犯すことなくそれぞれに対応した tRNA にアミノ酸をチャージする機能を持っている。

mRNA: messenger RNA (メッセンジャーRNA)

This RNA has the encoded genetic information that is translated to a protein sequence. Generally, the genetic code consists of triplet of bases, and assigned the initiation, elongation (for 20 different amino acids), and termination of the translation. The triplet bases designating each amino acid interact with the anticodon of tRNA (see above) and the genetic codon is translated.

この RNA は、タンパク質に翻訳される暗号化された遺伝情報を持っている。一般的には、遺伝暗号は3塩基からなり、mRNA はそれぞれ翻訳の開始、伸長(20種類のアミノ酸に対応している)、停止の暗号から構成される。3塩基はそれぞれのアミノ酸を指定しており、その遺伝暗号は tRNA が持つアンチコドンループと塩基対構成して翻訳される。

ribosome (リボソーム)

This is the molecular machinery that translates the genetic information encoded on mRNA, and synthesizes proteins. It consists of rRNA (see below) and ribosomal proteins. However, very recently it has been shown that the catalytic function relies on the component of rRNA.

リボソームは、mRNA 上の遺伝情報を翻訳し、タンパク質を合成する分子装置である。それは、リボソーム RNA とリボソームタンパク質から構成されるが、最近になりその触媒活性中心がリボソーム RNA にあることがわかった。

rRNA: ribosomal RNA (リボソーム RNA)

The rRNA refers to as the RNA component of ribosome, which is divided into two big RNA molecules (called 23S and 16S in prokaryotic ribosome) and one small RNA molecule (called 5S). The 23S and 5S assemble together that is responsible for catalyzing peptide bond formation, and the 16S rRNA directly interact with mRNA and stabilize the interaction between mRNA and tRNA.

リボソーム RNA は、リボソームの RNA 構成要素を指し、2つの大きい RNA 分子(真核生物のリボソームでは 23S と 16S と呼ばれる)と1つの小さい RNA 分子(5S と呼ばれる)から構成される。23S と 5S は会合して巨大複合体を構成し、ペプチド結合合成機能を持つ。一方、16S は直接 mRNA の相互作用を持ち、mRNA と tRNA の相互作用の安定化に寄与している。

precursor tRNA (前駆体 tRNA)

In prokaryotic cell, tRNA is generally transcribed as a precursor tRNA, containing an extra sequence at the 5' end of tRNA, called 5'-leader sequence. This 5'-sequence is processed by RNase P (or M1 RNA, see below) and removed to produce the mature tRNA.

真核生物では、一般的に tRNA は 5' 末端に余分な塩基配列(5' リーダー配列という)も持った前駆体 tRNA として転写される。この 5' リーダー配列は RNase P(もしくは M1 RNA、下参照)により除去され、成熟型 tRNA に変換される。

M1 RNA

This RNA is an RNA component of RNase P, known as an endonuclease that cleaves 5'-leader sequence of precursor tRNA. Although prokaryotic RNase P contains M1 RNA and a small protein, Sidney Alterman et al. discovered that M1 RNA alone exhibits the endonuclease activity; thus it is a ribozyme.

この RNA は、前駆体 tRNA の 5' リーダー配列を切断除去する RNase P の RNA 構成要素のことである。真核生物由来の RNase P は M1 RNA と小さいタンパク質の複合体であるが、シドニーアルトマンらが M1 RNA そのものにエンドヌクレアーゼ (RNA 分子を内部塩基配列部位で特異的に切断する酵素) 活性があることを発見し、リボザイム (下参照) であることが判明した。

ribozyme (リボザイム)

Ribozyme is a hybrid word of ribonucleic acid and enzyme. It referred to as RNA molecule that has a catalytic function.

リボザイムとは、核酸 (ribonucleic acid) と酵素 (enzyme) の混種語で、触媒機能を持つ RNA 分子のことを指す。

Chemistry terms:

Ester bond (エステル結合)

Ester bond presents the bond consisting of $R-C(O)-OR'$ (R and R' is arbitral chemical group). The bond is hydrolytically less stable than amide (peptide) bond consisting of $R-C(O)-NH-R'$. However, this in turn provides an energetically higher source to form amide (peptide) bond in the translation.

エステル結合は $R-C(O)-OR'$ (R と R' は任意の化学官能基) の一般化合物式で示される結合である。その結合は、 $R-C(O)-NH-R'$ の一般化合物式で表されるアミド (ペプチド) 結合よりも加水分解されやすい。しかし、このエステル結合の特徴は、一方でエネルギー的に高いことを意味し、翻訳系でアミド (ペプチド) 結合の生成に寄与している。

Aminoacylation (アミノアシル化)

Aminoacylation is a specific term for the formation of ester bond between amino acid and the 3'-hydroxyl group of tRNA.

アミノアシル化とは、一般的に tRNA の 3' 末端で起きるアミノ酸のエステル結合形成を指す。