



## 核酸結合タンパク質の構造機能相関と機能開発

九州大学大学院農学研究院 木村 誠

## 1. はじめに

触媒活性を持つ RNA (リボザイム) や RNA 干渉の発見により, RNA が遺伝子の発現調節において重要な役割を担っていることが明らかになっている。これらの機能性 RNA は、多くの場合 RNA のみでは活性を示さず、タンパク質と複合体 (リボ核タンパク質) を形成することにより機能している。従って、機能性 RNA の作用機構を理解するためには、タンパク質と RNA の相互作用を詳細に解析することが必須である。演者は、前駆体 tRNA プロセシング酵素であるリボヌクレアーゼ P (RNase P), タンパク質合成を触媒するリボソーム、およびタンパク質合成を阻害するリボソーム不活化タンパク質を研究対象として、RNA 結合タンパク質の構造と機能について研究を進めてきた。一方、これらの研究過程で見出した核酸結合タンパク質に関して、各タンパク質の特性 (核酸シャペロン活性、耐熱性、塩基特異性) を応用した機能開発を試みてきた。本講演では、超好熱性古細菌 RNase P を研究対象とした RNA 結合タンパク質の構造機能相関に関する研究を紹介したい。

## 2. リボヌクレアーゼ P (RNase P)

RNase P は前駆体 tRNA (pre-tRNA) の 5' 末端余剰配列を特異的に切断するエンドヌクレアーゼで、触媒活性を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。RNase P は全ての進化系統ドメイン (真正細菌、古細菌、真核生物) に存在しその機能はよく保存されているが、サブユニット組成と酵素化学的性質は進化系統ドメイン間で著しく異なっている。大腸菌を代表とする真正細菌の RNase P は 1 分子の RNA と 1 分子のタンパク質からなり、 $Mg^{2+}$  の高濃度条件下では RNA 成分のみで酵素活性を発揮するリボザイムである。既に、真正細菌 RNase P と tRNA 複合体の結晶構造が決定され、その触媒活性に重要な  $Mg^{2+}$  の配位部位や基質である pre-tRNA との結合に関与するヌクレオチドが明らかになっている。一方、古細菌と真核生物の RNase P は 1 分子の RNA と、古細菌では 4~5 種、真核生物では 9~10 種のタンパク質から構成され、RNA 成分のみでは酵素活性を示さず、タンパク質との相互作用によりその触媒活性が発現される。このような性質と RNase P の酵素活性測定が容易なことから、古細菌と真核生物 RNase P は機能性 RNA のタンパク質による活性化の分子機構を研究するための良いモデル酵素と考えられている。演者らはタンパク質成分の少ない超好熱性古細菌 (*Pyrococcus horikoshii*) RNase P を研究対象として、RNA 結合タンパク質の構造機能相関について研究を進めてきた。

## 3. 超好熱古細菌 RNase P の再構成

研究を始めた 2001 年頃、ヒト核 RNase P 構成サブユニットの一次構造情報が報告されていたが、古細菌 RNase P に関する知見はなかった。そこで、ヒト RNase P の情報をもとに、*P. horikoshii* ゲノム情報を検索した結果、5 種の遺伝子産物がヒト RNase P タンパク質 (hpop5, hRpp21, hRpp29, Rpp30, Rpp38) にそれぞれ 15~29% の相同性を示すこと、また一つの

遺伝子がヒト RNA サブユニット (H1 RNA) と類似していることを見出し、各遺伝子産物をヒトタンパク質にならない *Pho*-pop5, *Pho*Rpp21, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30, *Pho*Rpp38 と命名し、RNase P RNA を *Phop*RNA と命名した。続いて、各タンパク質を大量発現・精製後、*Phop*RNA と混合し酵素活性の再構成を検討した結果、*Phop*RNA と 5 種タンパク質複合体が pre-tRNA の切断活性を示すことがわかった。一方、超好熱性古細菌を培養し pre-tRNA 切断活性を指標にして RNase P を粗精製し、塩依存性や最適温度など酵素化学的性質を再構成酵素のそれと比較した。その結果、*Phop*RNA と 5 種のタンパク質からなる再構成酵素が、*P. horikoshii* から粗精製した酵素とほぼ同一の性質を示したことから、*P. horikoshii* RNase P は 1 分子の RNA (*Phop*RNA) と 5 種のタンパク質から構成されていることを確認した。

続いて、再構成実験により *Phop*RNA の触媒残基を特定するために、真正細菌 RNase P RNA の触媒残基および基質結合残基に相当する残基を変異した *Phop*RNA 変異体を調製し、タンパク質と混合後、pre-tRNA の切断活性を検討した。その結果、*Phop*RNA は単独では触媒活性を示さないものの、真正細菌と同様に pre-tRNA を切断していることが示唆された。一方、各タンパク質の触媒活性への寄与を検討したところ、各タンパク質は触媒活性には必須ではないが、*Pho*Pop5 > *Pho*Rpp30 > *Pho*Rpp21 > *Pho*Rpp29 > *Pho*Rpp38 の順に酵素活性に関与していることが推定された。次に、タンパク質間相互作用と各タンパク質と *Phop*RNA との相互作用を検討したところ、*Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 が相互作用し *Phop*RNA の触媒ドメイン (C-ドメイン) の構造形成に、また *Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 が相互作用し基質との結合に関与する特異性ドメイン (S-ドメイン) の構造形成に関与していることが推定された。一方、5 番目のタンパク質 *Pho*Rpp38 は *Phop*RNA の 2 本のステムループ構造に結合し、RNase P の最適温度の上昇に関与していることが推定された。

## 4. 超好熱古細菌 RNase P タンパク質の構造機能相関

4.1. *Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30

*Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 の結晶構造を解析したところ、両タンパク質はヘテロ四量体 [*Pho*Rpp30-(*Pho*Pop5)<sub>2</sub>-*Pho*Rpp30] を形成していた。また、両タンパク質の生化学的解析より、*Pho*Pop5 は溶液状態では自己会合体を形成しているのに対して *Pho*Rpp30 は単量体で存在していること、さらに *Phop*RNA の活性化にはヘテロ四量体を形成することが必須で、*Phop*RNA への結合とその活性化には *Pho*Pop5 の C 末端ヘリックス構造が重要であることが分かった。さらに、*Phop*RNA とタンパク質の相互作用に関する研究より、*Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 は *Phop*RNA の C-ドメインに含まれる 2 本のステムループ構造 (P3 と P16) に結合することが分かった。以上の結果より、*Pho*Rpp30 は *Pho*Pop5 の分子シャペロンとして機能して *Pho*-Pop5 と適切な四量体を形成し、その結果として *Pho*Pop5 の C

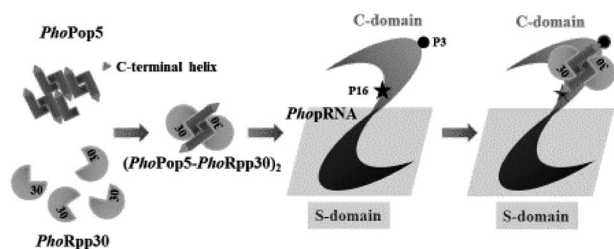


図1. *PhoPop5-PhoRpp30* による *PhopRNA* 活性化モデル

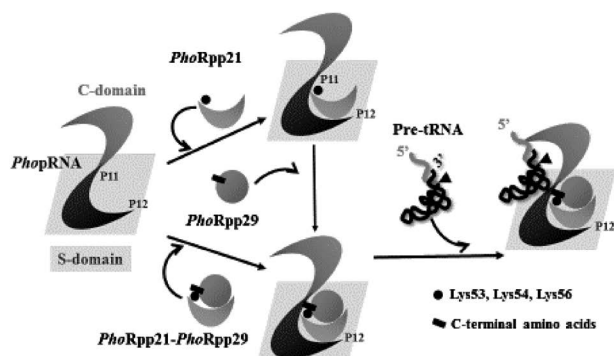


図2. *PhoRpp21-PhoRpp29* による *PhopRNA* 活性化モデル

末端ヘリックスが *PhopRNA* の C-ドメインの二本鎖構造（ヘリックス）P3 と P16 を架橋し、*PhopRNA* の触媒部位の構造を形成していることが示唆された（図1）。

#### 4.2. *PhoRpp21* と *PhoRpp29*

*PhoRpp21* と *PhoRpp29* の結晶構造解析より、両タンパク質はヘテロ二量体を形成していること、*PhoRpp21* と *PhoRpp29* の *PhopRNA* に対する結合能を検討した結果、*PhoRpp21* は単独で *PhopRNA* と結合できるのに対し、*PhoRpp29* は *PhoRpp21* の非存在下では *PhopRNA* に対する結合能が弱いことが分かった。次に、*PhoRpp21* と *PhoRpp29* の *PhopRNA* 活性化に関与するアミノ酸を検討したところ、*PhoRpp21* の N 末端ヘリックスに位置する Lys53, Lys54, Lys56 と、*PhoRpp29* の C 末端 10 アミノ酸残基が *PhopRNA* の活性化に重要であることが分かった。次に、*PhoRpp21-PhoRpp29* 複合体の *PhopRNA* における結合部位の特定を試みたところ、*PhopRNA* の P11 と P12 ヘリックス（二本鎖構造）を繋ぐループ近傍に結合していることが分かった。以上の結果より、*PhoRpp21* が P11 と P12 ヘリックスを繋ぐループ近傍に結合して、それを足場として *PhoRpp29* が結合する。もしくは、*PhoRpp21* と *PhoRpp29* が複合体を形成し、*PhoRpp21* を介して *PhopRNA* に結合する。その結果、*PhoRpp21* の N 末端ヘリックスに位置する Lys53, Lys54, Lys56 と *PhoRpp29* の C 末端 10 アミノ酸残基が、*PhopRNA* の pre-tRNA 結合領域の構造形成を促進していることが示唆された（図2）。

#### 4.3. *PhoRpp38*

*PhoRpp38* はそのアミノ酸配列の類似性から、RNA の構造モチーフの一つである Kink-turn (K-ターン) を認識して結合するリボソームタンパク質 L7Ae ファミリーに分類される。そこで、K-ターンの共通配列に基づいて *PhopRNA* の塩基配列を検索すると、3箇所（P12.1, P12.2, P16）に K-ターン構造が予測された。次に、これらの領域を含む RNA 断片と *PhoRpp38* との複合体の結晶化を試みたところ、P12.2 を含む RNA 断片と *PhoRpp38* 複合体の結晶が得られ、その結晶構造を決定し

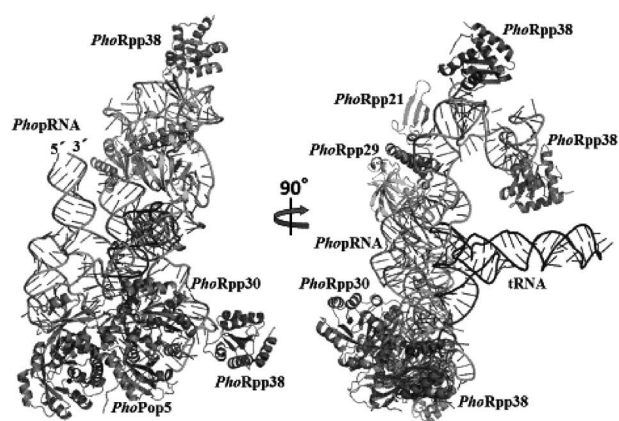


図3. 超好熱性古細菌 RNase P-tRNA 複合体の高次構造モデル

た。その構造に基づき *PhoRpp38* の K-ターン結合に関与するアミノ酸残基の変異体を調製し、*PhopRNA* との相互作用能を検討したところ、その結合能は消失していた。この結果より、*PhopRNA* の 3箇所 の K-ターン構造にそれぞれ *PhoRpp38* が結合していることが推定された。

#### 5. 超好熱性古細菌 RNase P の高次構造モデル

*PhopRNA* の高次構造を明らかにするために結晶化条件を検討してきたが、良質な結晶は得られていない。そこで、真正細菌の RNase P RNA の高次構造および RNA 高次構造モデリングソフトを用いて *PhopRNA* の高次構造モデルを作成した。このモデル構造に対して、各タンパク質の結晶構造、各タンパク質の *PhopRNA* 結合部位、および tRNA の結晶構造情報に基づき、超好熱性古細菌 RNase P-tRNA 複合体の高次構造モデルを図3のように作成した。このモデル構造と真正細菌 RNase P の高次構造を比較すると、真正細菌の RNase P RNA において触媒部位と基質結合部位の構造形成に関わっている RNA-RNA 相互作用が、古細菌では *PhoPop5-PhoRpp30* と P3 および P16 との相互作用、および *PhoRpp21-PhoRpp29* と P11-P12 間のループとの相互作用に置き換わっていることが示唆された。今後は、超好熱性古細菌再構成酵素 RNase P の結晶構造解析と電子顕微鏡による単粒子構造解析を実施し、この高次構造モデルを実験的に検証することにより、機能性 RNA のタンパク質による活性化の構造基盤を解明するとともに、RNA からタンパク質への機能移行についても構造の観点から解明したい。

謝 辞 九州大学大学院時代には九州大学名誉教授 船津軍喜先生にタンパク質科学の基礎をご指導頂くとともに、当時のリボソーム研究の世界最大研究拠点であったマックスプランク分子遺伝学研究所（ベルリン）への留学へと導いて頂きましたこと、ここに深謝します。また、マックスプランク分子遺伝学研究所では、故 Wittmann 博士や故 Nierhaus 博士など多くの優秀な研究者から、研究を進める上で必要と多くのことを学ぶことが出来ました。今回の受賞対象の研究は、マックスプランク研究所の共同研究者、九州大学大学院農学研究院生物化学研究室の教員と多くの卒業生、および農学研究院生命機能科学部門の先生方のご支援によるもので、ここに感謝いたします。最後になりましたが、受賞に際してご推薦頂きました西日本支部支部長の九州大学大学院農学研究院教授園元謙二先生や支部の先生方にお礼申し上げます。