

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性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、Mg²⁺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Mg²⁺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に関する知見は無かった。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

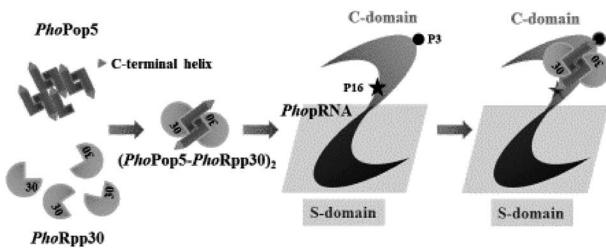
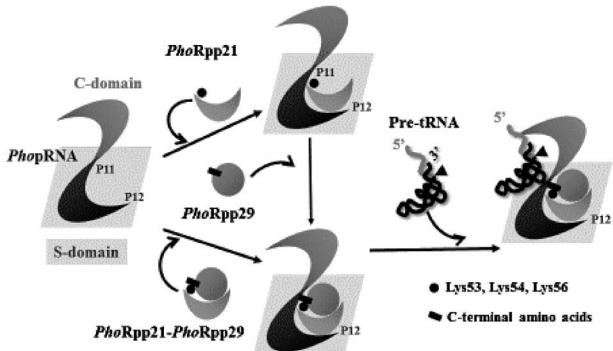
遺伝子がヒトRNAサブユニット(H1 RNA)と類似していることを見出し、各遺伝子産物をヒトタンパク質にならい*PhoPop5*, *PhoRpp21*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38*と命名し、RNase P RNAを*PhopRNA*と命名した。続いて、各タンパク質を大量発現・精製後、*PhopRNA*と混合し酵素活性の再構成を検討した結果、*PhopRNA*と5種タンパク質複合体がpre-tRNAの切断活性を示すことがわかった。一方、超好熱性古細菌を培養しpre-tRNA切断活性を指標にしてRNase Pを粗精製し、塩依存性や最適温度など酵素化学的な性質を再構成酵素のそれと比較した。その結果、*PhopRNA*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(*PhopRNA*)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*PhopRNA*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*PhopRNA*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、*PhopRNA*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、*PhoPop5*>*PhoRpp30*>*PhoRpp21*>*PhoRpp29*>*PhoRpp38*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*PhopRNA*との相互作用を検討したところ、*PhoPop5*と*PhoRpp30*が相互作用し*PhopRNA*の触媒ドメイン(C-ドメイン)の構造形成に、また*PhoRpp21*と*PhoRpp29*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*PhoRpp38*は*PhopRNA*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. *PhoPop5*と*PhoRpp30*

*PhoPop5*と*PhoRpp30*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 [*PhoRpp30-(PhoPop5)2-PhoRpp30*]を形成していた。また、両タンパク質の生化学的解析より、*PhoPop5*は溶液状態では自己会合体を形成しているのに対して*PhoRpp30*は単量体で存在していること、さらに*PhopRNA*の活性化にはヘテロ四量体を形成することが必須で、*PhopRNA*への結合とその活性化には*PhoPop5*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、*PhopRNA*とタンパク質の相互作用に関する研究より、*PhoPop5*と*PhoRpp30*は*PhopRNA*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、*PhoRpp30*は*PhoPop5*の分子シャペロンとして機能して*PhoPop5*と適切な四量体を形成し、その結果として*PhoPop5*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2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

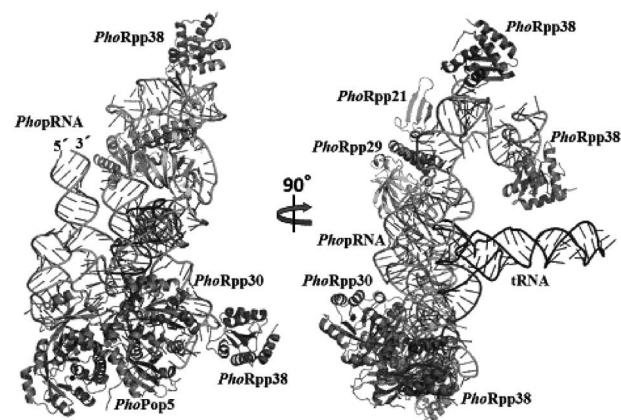


図3. 超好熱性古細菌RNase P-tRNA複合体の高次構造モデル

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な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。