

特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

超好熱アーキアリボ核タンパク質酵素の構造機能相関と耐熱性

木 村 誠

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA の 5'末端プロセッシング反応を触媒する酵素で、触媒活性を持つ 1 分子の RNA と補因子であるタンパク質からなっている。我々は超好熱アーキア (古細菌) *Pyrococcus horikoshii* RNase P (*PhoRNase P*) が、触媒活性を持つ RNA (*PhopRNA*) と 5 種のタンパク質 (*PhoPop5*, *PhoRpp21*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38*) から構成され、*PhoRpp38* を除く 4 種のタンパク質と *PhopRNA* からなる再構成酵素 (R-4P) が、55°C で最大酵素活性を示すのに対し、5 種のタンパク質と *PhopRNA* を含む再構成酵素 (R-5P) は、70°C で最大酵素活性を示すことを明らかにした。さらに、構成タンパク質の結晶構造を決定するとともに、タンパク質 *PhoPop5* と *PhoRpp30* および *PhoRpp21* と *PhoRpp29* が複合体を形成し、それぞれ *PhopRNA* の機能ドメインである C ドメインと S ドメインの RNA シャペロンとして機能していることを明らかにした。一方、*PhoRpp38* は *PhopRNA* のヘリックス P15 に形成される K-turn に結合することにより、*PhoRNase P* に耐熱性を賦与していることを示唆した。

1. はじめに

第三の生物群であるアーキア (古細菌) は高熱、高圧、高塩などの異常環境下に生育する微生物から構成されている¹⁾。これまでの研究から、アーキアの遺伝情報は真正細菌よりも真核生物の情報に類似していることが明らかになっている。従って、アーキアを構成する生体高分子の構造と機能に関する研究は、タンパク質や RNA の分子進化や環境適応の分子機構に関する情報を提供するとともに、真核生物の相当分子の構造と機能を理解するための重要な基礎情報も提供している^{2,3)}。

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA (pre-tRNA) の 5'リーダー配列を特異的に切断するエンドヌクレアーゼである^{4,5)}。RNase P はタンパク質合成反応を触媒するリボ

ソームと同様、RNA とタンパク質から構成されているが、そのサブユニット組成は進化系統 (真核生物、真正細菌、アーキア) 間で異なっている。即ち、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 サブユニットのみで pre-tRNA を切断する。これまでの研究で、真正細菌 RNase P RNA が二つの機能ドメイン (C ドメインと S ドメイン) から構成されていることや、RNA の触媒活性に重要なヌクレオチドが同定されている。さらに、タンパク質サブユニットおよび RNA サブユニットの結晶構造が決定され、リボ核タンパク質複合体 (ホロ酵素) の構造解析や詳細な触媒機構の解明へ向けて研究が進められている^{6,7)}。

真核生物の RNase P は 1 分子の RNA と 10 種類以上のタンパク質からなる複合体で、RNA サブユニットは生理的条件下では酵素活性を示さず、タンパク質サブユニットとの相互作用によりその触媒活性が活性化される。既に、ヒト RNase P の RNA サブユニット (H1 RNA) と 10 種のタンパク質サブユニット (hPop1, hPop5, Rpp14, Rpp20, Rpp21, Rpp25, Rpp29, Rpp30, Rpp38, Rpp40) の再構成実験により、H1 RNA と 2 種のタンパク質サブユニット

九州大学大学院農学研究院生物機能化学部門 (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)

Structure-function relationship and thermostability of ribonucleoprotein enzyme from the hyperthermophilic archaeon
Makoto Kimura (Graduate School of Bioresource & Bioenvironmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan)

(Rpp21とRpp29)からなる再構成酵素が、僅かな pre-rRNA 切断活性を示すことが報告されている⁸⁾。しかし、本来の酵素に匹敵する再構成酵素や各サブユニットの構造と機能に関する情報はまだない。一方、アーキアの RNase P は、真核生物の RNase P 同様、1分子の RNA と複数のタンパク質サブユニットからなることは示唆されていたが、その正確な数は不明であった⁹⁾。しかし、近年のアーキアゲノムプロジェクトの進行により、RNase P 関連遺伝子の情報が入手できるようになり、数種のアーキアを対象にして研究が展開されている。

Pyrococcus horikoshii OT3 は沖縄海溝内の熱水鉱床から採取された絶対嫌気性の超好熱アーキアである。その生育温度範囲は 88°C~104°C、最適生育温度は 98°C で、硫黄を電子供与体としている。既に、全ゲノムの塩基配列が決定され、ゲノムとして 1.74Mbp の環状 DNA を有しており、総 ORF 数は 1,883 個で、1 個の 16S および 23S rRNA 遺伝子と 2 個の 5S rRNA 遺伝子、さらに 11 個のインテインを含むタンパク質遺伝子とイントロンを含む 2 個の tRNA 遺伝子が同定されている¹⁰⁾。既に、*P. horikoshii* OT3 のポストゲノム研究の進展により、多くのタンパク質の構造が決定されている。これらの研究成果は構造生物学やタンパク質の耐熱性機構等、基礎研究の発展に大きく寄与するとともに、*P. horikoshii* タンパク質はその耐熱性により、各種産業や医療等、バイオテクノロジーの分野でも有効利用されている。

著者らは *P. horikoshii* OT3 のポストゲノム研究の一環として、*P. horikoshii* RNase P (*PhoRNaseP*) 構成サブユニットを同定し、それらの構造と機能に関する研究を進めてきた。本総説では、*PhoRNaseP* サブユニットの構造と機能および *PhoRNaseP* の耐熱性の構造基盤について紹介する。

2. *PhoRNaseP* の機能解析

1) *PhoRNaseP* の再構成

ヒト RNase P 構成サブユニットの一次構造情報を基に、*P. horikoshii* のゲノム中に RNase P サブユニットの相同物を検索した結果、5 種の遺伝子 (locus tag number: PH1481, PH1496, PH1601, PH1771, PH1877) 産物がヒト RNase P タンパク質 (hpop5, hRpp38, hRpp21, hRpp29, Rpp30) にそれぞれ 15~29% の相同性を示すことを見出し、各遺伝子産物をヒトタンパク質にならぬ *PhoPop5*, *PhoRpp38*, *PhoRpp21*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30* と命名した (表 1)。また、ヒト RNase P RNA (H1 RNA) と類似した RNA 遺伝子 (PHrmpRNA01) を見出し、その転写産物を *PhopRNA* と命名した (表 1)。そこで、各タンパク質を大量発現・精製後、試験管内転写により調製した *PhopRNA* と混合し酵素活性の再構成を検討した。その結果、*PhoRpp38* を除く 4 種のタンパク質と *PhopRNA* からなる再構成酵素 (R-

表 1 *P. horikoshii* OT3 の RNase P サブユニットの性質

| <i>P. horikoshii</i> | 残基数 | 分子量 | 等電点 | <i>H. sapiens</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
|----------------------|-------|---------|------|-------------------|----------------------|
| <i>PhoPop5</i> | 120aa | 14,043 | 10.8 | hPOP5 | POP5 |
| <i>PhoRpp21</i> | 120aa | 14,588 | 11.3 | Rpp21 | RPR2 |
| <i>PhoRpp29</i> | 127aa | 15,053 | 11.8 | Rpp29 | POP4 |
| <i>PhoRpp30</i> | 212aa | 24,693 | 10.4 | Rpp30 | RPP1 |
| <i>PhoRpp38</i> | 124aa | 13,554 | 5.2 | Rpp38 | POP3 |
| <i>PhopRNA</i> | 324nt | 105,370 | | H1 RNA | RPR1 |

H. sapiens と *S. cerevisiae* はヒトおよび酵母の相同サブユニットを示している。

aa, アミノ酸; nt, ヌクレオチド

4P) が 55°C で最大酵素活性を示すのに対し、5 種のタンパク質と *PhopRNA* を含む再構成酵素 (R-5P) は、*P. horikoshii* から得られた粗精製 RNase P と同様、70°C で最大酵素活性を示すことを明らかにした (図 1)^{11,12)}。

続いて、各タンパク質サブユニットの酵素活性への寄与を検討するために、1 種のタンパク質を欠く 5 種の再構成粒子の酵素活性を詳細に検討したところ、タンパク質 *PhoRpp29* または *PhoRpp38* を欠く再構成粒子は R-5P の 60~85% の酵素活性を示すのに対して、タンパク質 *PhoPop5*, *PhoRpp21*, または *PhoRpp30* を欠く再構成粒子は R-5P の酵素活性と比較して著しく活性 (10~20%) が低いことが分かった¹³⁾。以上の結果より、*PhoRNase P* 構成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、タンパク質 *PhoRpp38* は高温環境下での *PhopRNA* のコンホメーションの最適化に関与していることが推定された。

2) *PhoRNase P* RNA サブユニット (*PhopRNA*) の触媒残基

RNase P RNA の全体的な二次構造は進化系統間で異なっているが、真正細菌 RNase P RNA において触媒活性に重要なヘリックス P4 は、アーキアや真核生物の RNase P RNA においてもよく保存されている (図 2)。従って、アーキアや真核生物の RNase P RNA も真正細菌のそれと同様の作用機構により触媒反応を行っていることが推定されている。しかし、アーキアや真核生物の RNase P RNA が RNA のみでは触媒活性を示さないことから、生物種間においてよく保存されているヌクレオチドの触媒活性への関与は不明であった。著者らは *PhoRNase P* の再構成系を用いて、*PhopRNA* の触媒残基の同定を試みた¹⁴⁾。即ち、真正細菌 RNase P RNA に関する研究結果に基づいて、*PhopRNA* の相当ヌクレオチド (A40, A41, U44) と近傍に位置するヌクレオチド (A37~G39 および G42 と U43) をその他の 3 種のヌクレオチドに置換した 24 種の変異体 *PhopRNA* を試験管内転写反応により調製し、5 種の

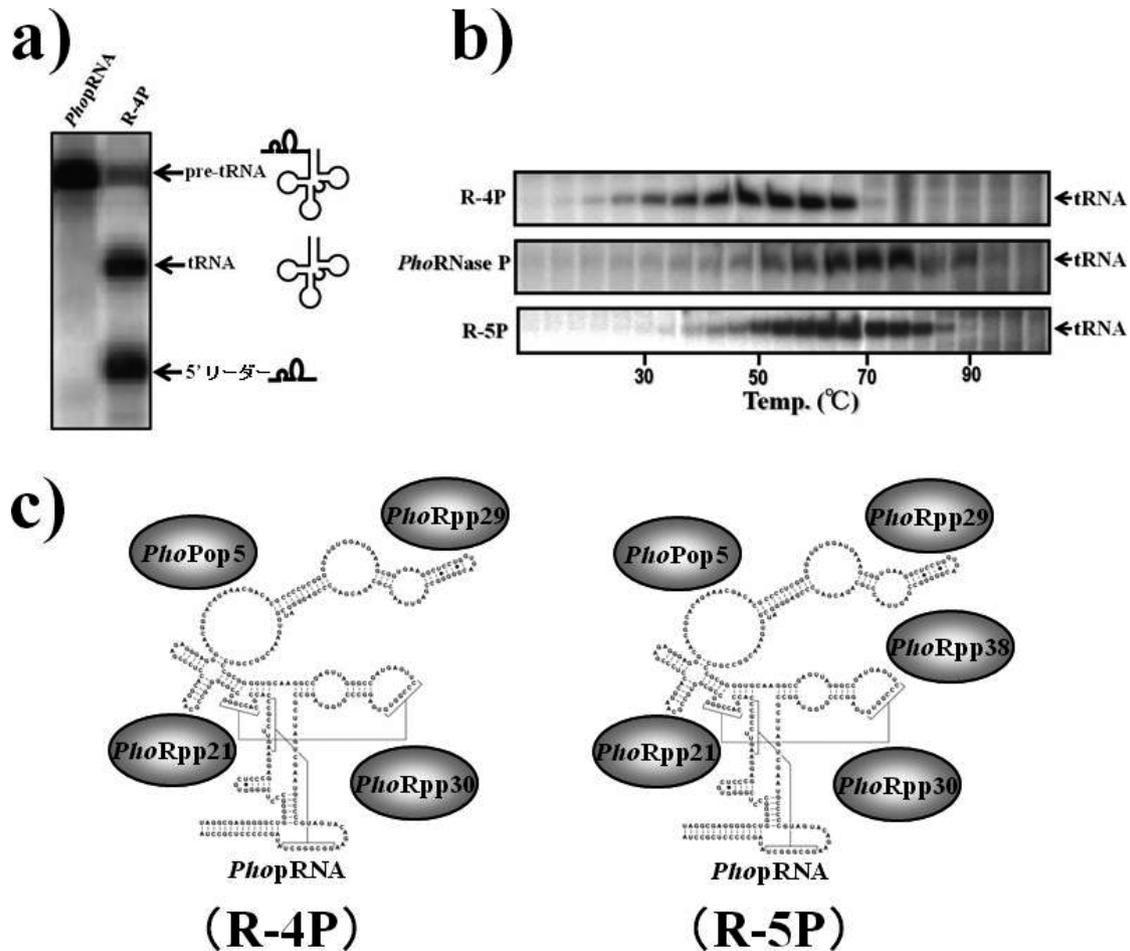


図1 超好熱アーキア *P. horikoshii* OT3 RNase P (*PhoRNase P*) の再構成

a) *PhoRNase P* RNA (*PhopRNA*) と再構成酵素 R-4P の pre-tRNA 切断活性. 矢印は pre-tRNA, tRNA, および 5'リーダ配列の RNA バンドを示している. b) 再構成酵素 R-4P と R-5P および *P. horikoshii* 由来粗精製酵素 *PhoRNase P* の pre-tRNA 切断活性の温度依存性. 各酵素の pre-tRNA 切断活性を異なった温度で測定した. 図は tRNA のバンドのみを示している. c) 再構成酵素 R-4P と R-5P の構成サブユニットの模式図.

PhoRNase P タンパク質サブユニットと混合することにより pre-tRNA を基質として酵素活性を測定した. その結果, A40 と A41 をその他のヌクレオチドに置換すると, その酵素活性が野生型の 20% に低下した. また, バルジ構造を形成していることが推定される U44 を置換すると野生型の 30% に低下した. 一方, その他の変異体 *PhopRNA* は野生型とほぼ同程度の活性を示した. さらに, 活性の低下した変異体 *PhopRNA* について Mg^{2+} 濃度との相関を検討したところ, 高濃度の Mg^{2+} により pre-tRNA 切断活性が回復した. 以上のことから, A40 と A41 および U44 が形成するバルジ構造が *PhopRNA* の酵素活性に重要であり, これらのヌクレオチドが触媒活性に重要な Mg^{2+} の配位に関与していることが明らかになった. 続いて, 同様の手法により, pre-tRNA の認識に関与することが推定される *PhopRNA* のループ構造 L15/16 に位置する G269 と G270 が, 大腸菌 RNase P RNA (M1 RNA) の相当残基と同様, アクセプター末端 (CCA) との塩基対による pre-tRNA の

認識に関与していることを明らかにした¹⁴⁾. 以上の結果から, アーキアと真正細菌 RNase P RNA の二次構造は全体的には異なっているが, アーキア RNase P RNA は真正細菌のそれと同様の作用機構により触媒反応を行っていることが示唆された.

3) アーキアと真正細菌 RNase P タンパク質の機能相関

大腸菌 RNase P は M1 RNA と一つのタンパク質 C5 から構成されている. タンパク質 C5 の一次構造はいずれの *PhoRNase P* 構成タンパク質とも類似していない. 従って, 真正細菌とアーキアのタンパク質は進化的には相関せず, 真正細菌とアーキアが分岐した後, それぞれの進化系統間で独自に RNase P タンパク質遺伝子が誕生したと推定されている. しかし, 大腸菌タンパク質 C5 と *PhoRNase P* 構成タンパク質は, 進化系統間で保存されている RNase P RNA の活性化に関与していることから, 進化的には異なるものの機能的には相関している可能性が示唆された. そ

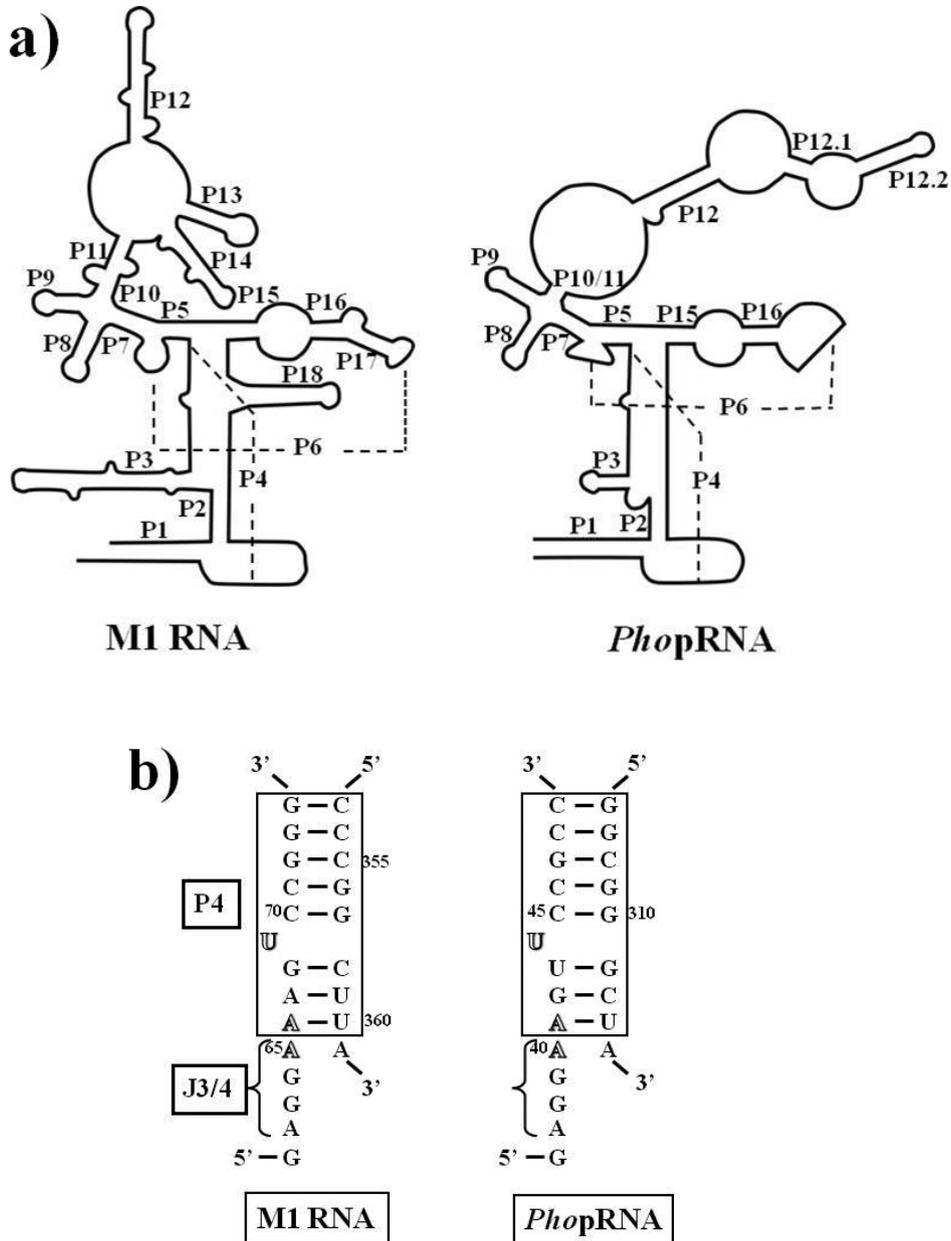


図2 大腸菌RNase P RNA (M1 RNA) と *PhopRNA* の二次構造
 a) M1 RNA と *PhopRNA* の二次構造. *PhopRNA* のヘリックス (P) は M1 RNA の命名法に従った. 点線は塩基対相互作用を示している. b) M1 RNA と *PhopRNA* の触媒部位であるヘリックス P4 と J3/4 の二次構造. 触媒活性に重要な M1 RNA の A65, A66, U69, および *PhopRNA* の A40, A41, U44 を白抜き文字で示している.

ここで, *PhoRNase P* 構成タンパク質の機能を明らかにすることを目的として, 大腸菌タンパク質 C5 と 5 種の *PhoRNase P* 構成タンパク質の機能的相関を再構成実験により検討した. 即ち, 大腸菌 M1 RNA に 5 種の *PhoRNase P* タンパク質を添加し, pre-tRNA 切断活性の有無を検討した. その結果, いずれのタンパク質も M1 RNA を活性化しなかった. 一方, 大腸菌タンパク質 C5 を *PhoRNase P* タンパク質とともに *PhopRNA* に添加し, C5 の *PhopRNA* への影響を検討したところ, C5 タンパク質も *PhopRNA*

を活性化しなかった. 以上の結果より, 5 種の *PhoRNase P* タンパク質単独では大腸菌タンパク質 C5 と機能的に相関していないことが判った (投稿中).

続いて, M1 RNA の S および C ドメインと *PhopRNA* の相当ドメインを相互に入れ替えた 2 種のキメラ RNA を調製し, 各タンパク質の存在下, 酵素活性の有無を検討した (図 3). その結果, M1 RNA の S ドメインと *PhopRNA* の C ドメインからなる PCES (*P. horikoshii* の C ドメインと *E. coli* の S ドメイン) は, アーキアタンパク質 *PhoPop5*

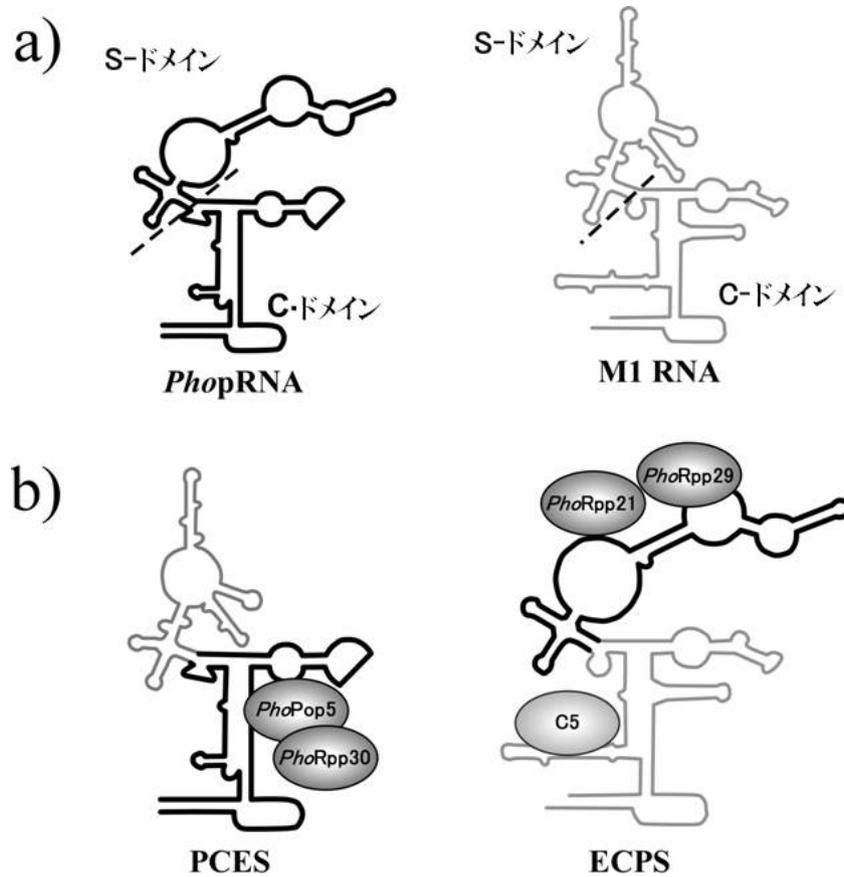


図3 *PhoRNase P* タンパク質の機能解析
 a) *M1 RNA* (細線)と *PhoRNA* (太線) の二次構造と機能ドメイン・SドメインとCドメインの模式図。b) キメラRNAである *PCES*と *ECPS* の二次構造の模式図と両RNAを活性化するタンパク質を示している。

と *PhoRpp30* の存在下で酵素活性を示した。一方、*M1 RNA* のCドメインと *PhoRNA* のSドメインからなる *ECPS* (*E. coli* Cドメインと *P. horikoshii* Sドメイン)は、タンパク質 *C5* とアーキアタンパク質 *PhoRpp21* と *PhoRpp29* によって活性化された(投稿中)。既に、タンパク質 *C5* は *M1 RNA* のCドメインの活性化に関与することが報告されている¹⁵⁾。また、後述のように、*PhoRNase P* タンパク質 *PhoPop5* と *PhoRpp30* はヘテロ四量体、タンパク質 *PhoRpp21* と *PhoRpp29* はヘテロ二量体として機能していることが推定されている。以上の知見を総合して、*PhoRNase P* タンパク質複合体 *PhoPop5-PhoRpp30* は大腸菌タンパク質 *C5* と機能的に相関し、*PhoRNA* のCドメインの活性化に関与すること、一方、*PhoRpp21-PhoRpp29* は *PhoRNA* のSドメインの活性化に関与していることが示唆された(図3)。

3. *PhoRNaseP* サブユニットの構造解析

1) *PhoRNase P* タンパク質の結晶構造

PhoRNase P の構造機能相関解明を目指して、タンパク

質サブユニットの結晶構造を高分解能で決定した(図4)^{12,16~19)}。タンパク質 *PhoPop5*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38* は球状タンパク質で、それぞれRBD, Smフォールド, TIMバレル構造, およびRBDの各構造モチーフを形成していた。また、*PhoPop5*, *PhoRpp29*, *PhoRpp38* はN末端またはC末端に塩基性アミノ酸に富むランダム構造を形成していた(図4)。リボソームの結晶構造解析により、数種のリボソームタンパク質は同様のランダム構造をN末端またはC末端に持ち、リボソームRNAとの相互作用に関与していることが報告されている²⁰⁾。従って、*PhoPop5*, *PhoRpp29*, *PhoRpp38* のN末端またはC末端領域が、*PhoRNA* との相互作用に重要な役割を担っていることが推定された。一方、*PhoRpp21* は2本の α ヘリックスと3本の β ストランドから構成されたL字型構造を形成し、CドメインがmRNAを認識し切断する転写伸長因子TFIISのzincリボンモチーフと類似していた(図4)¹⁷⁾。

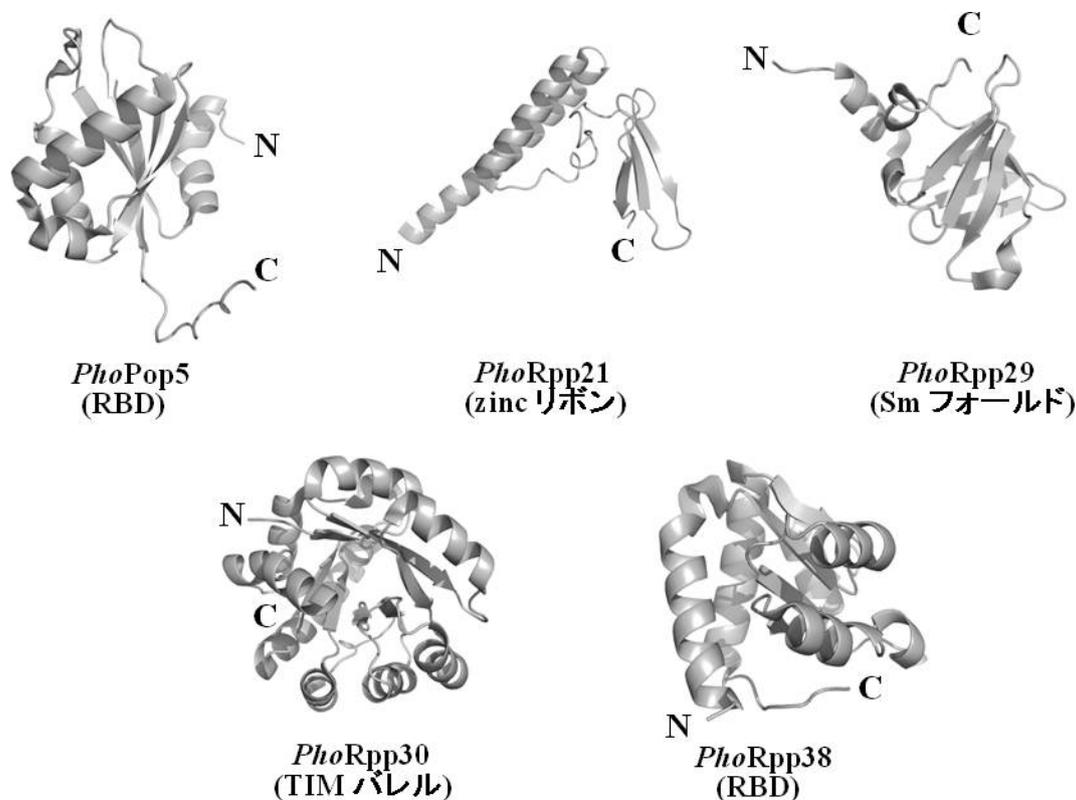


図4 *PhoRNase P* タンパク質の結晶構造
タンパク質 *PhoPop5*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38* は球状タンパク質で, *PhoPop5*, *PhoRpp29*, *PhoRpp38* は, N 末端または C 末端にランダム構造を持っていた. それぞれのタンパク質の構造モチーフを括弧内に示している.

2) *PhoRNase P* タンパク質間相互作用と複合体の結晶構造

PhoRNase P のタンパク質間相互作用を酵母 (AH109 株) によるツーハイブリッドシステムを用いて検討した. 即ち, 各タンパク質をそれぞれ GAL4DNA 結合ドメインと GAL4 活性化ドメインとの融合タンパク質として発現させ, それぞれの相互作用の有無をレポーター遺伝子 (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1*) の転写活性で評価した. その結果, *PhoPop5* と *PhoRpp30* および *PhoRpp21* と *PhoRpp29* が強く相互作用し, *PhoPop5* と *PhoRpp21* が弱く相互作用していることが解った²¹⁾. さらに, *PhoRNase P* の最適温度の上昇に参与している *PhoRpp38* は, いずれのタンパク質とも相互作用しないことが示唆された²²⁾. RNase P タンパク質間相互作用については, ヒトや酵母およびメタン生産アーキア等で検討され, *PhoRNase P* と類似した相互作用が報告されている^{22~24)}. 従って, *PhoPop5* と *PhoRpp30* および *PhoRpp21* と *PhoRpp29* の相互作用が *PhoRNase P* の活性発現に重要な役割を担っていることが推定された.

これらのタンパク質間相互作用を確認すること, およびその複合体構造を明らかにすることを目的として, *PhoPop5-PhoRpp30* 複合体を調製し結晶化を試みた. その

結果, 良質な結晶が得られ複合体の結晶構造をセレン原子による多波長異常分散 (MAD) 法により 2.0 Å の分解能で決定した¹⁹⁾. 図 5a に示すように, *PhoPop5-PhoRpp30* 複合体は結晶学的な非対称単位中に 2 分子含まれており, *PhoPop5* はそれぞれ 2 分子の *PhoRpp30* と相互作用しヘテロ四量体を形成していた. そこで, ヘテロ四量体の重要性を評価するために, *PhoPop5* の $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ループ領域の 8 残基を欠損した変異体を作成し, 複合体形成能と再構成による酵素活性を検討した. その結果, 変異体 *PhoPop5-PhoRpp30* 複合体はゲルろ過クロマトグラフィーにおいて分子量約 40,000 の位置に溶出したことから, 変異体 *PhoPop5* と *PhoRpp30* は四量体を形成することができず, ヘテロ二量体を形成していること, また変異体 *PhoPop5* を含む再構成酵素の pre-tRNA 切断活性は著しく低下していることがわかった¹⁹⁾. 以上の結果より, タンパク質 *PhoPop5* と *PhoRpp30* はヘテロ四量体を形成することが *PhoRNase P* の酵素活性に重要であることが示唆された.

次に, *PhoRpp21* と *PhoRpp29* の複合体の結晶構造を分解能 2.2 Å で決定した (図 5b)²⁵⁾. その結果, *PhoRpp21* と *PhoRpp29* はヘテロ二量体を形成し, *PhoRpp21* の N 末端側の 2 本の α ヘリックス ($\alpha 1$ と $\alpha 2$) と, *PhoRpp29* の N

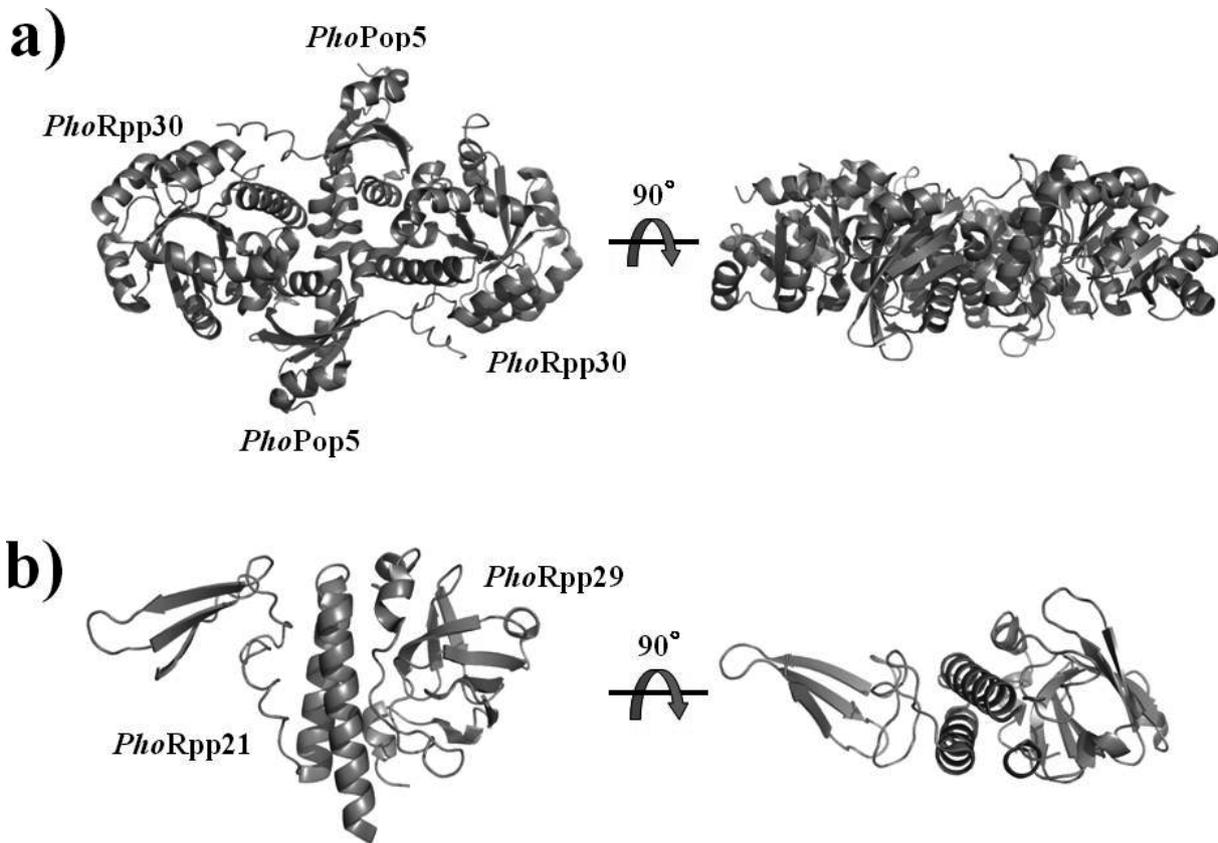


図5 *PhoRNase P* タンパク質の相互作用

a) *PhoPop5-PhoRpp30* 複合体 (ヘテロ四量体) の結晶構造. b) *PhoRpp21-PhoRpp29* (ヘテロ二量体) の結晶構造.

末端領域, 中央領域 ($\beta 2$), C末端付近の α ヘリックス ($\alpha 3$) との間で相互作用していた (図 5b). これらの相互作用の重要性を確認するために, 相互作用面への変異の導入による RNase P 活性への影響を検討したところ, いずれの変異も触媒活性の低下を示したことから, *PhoRpp21* と *PhoRpp29* の複合体形成が触媒活性に重要であることが検証された²⁵⁾.

4. *PhoRNase P* の耐熱性

1) 再構成酵素の耐熱性

PhoRNase P は触媒活性を持つ *PhopRNA* と 5 種のタンパク質から構成され, 前述のように *PhopRNA* と *PhoRpp38* を除く 4 種のタンパク質からなる再構成酵素 (R-4P) が 55°C で最大酵素活性を示すのに対し, 5 種のタンパク質を含む再構成酵素 (R-5P) は 70°C で最大酵素活性を示す (図 1). そこで, R-4P と R-5P の耐熱性を検討するために, 両再構成酵素を異なった温度で処理した後, それらの pre-tRNA 切断活性を測定した. その結果, R-4P の活性は 45°C 以降の処理により酵素活性が低下したのに対して, R-5P の活性は 80°C 処理後でも維持されていた (図 6a). この結果より, *PhoRNase P* は *PhoRpp38* により耐熱性を獲得していることが確認された (未発表). 上記

のように, *PhoRpp38* は他の 4 種のタンパク質と相互作用しないことから, *PhoRpp38* は *PhopRNA* と直接結合することにより, *PhoRNase P* に耐熱性を賦与していることが推定された.

そこで, *PhoRpp38* の添加による *PhopRNA* の耐熱性の違いが, *PhopRNA* の構造変化によるものであることを円二色性 (CD) と紫外吸収 (UV) スペクトルを測定することにより検証した (図 6b と c). その結果, R-4P を構成する *PhopRNA* の CD スペクトルは遊離の *PhopRNA* のスペクトルに比べピーク (265nm) の楕円率が減少し, さらに, R-5P を構成する *PhopRNA* は R-4P の *PhopRNA* と比較してピークの楕円率が増加していた (図 6b). 一方, R-4P を構成する *PhopRNA* の UV スペクトルは遊離の *PhopRNA* のスペクトルの 260nm の吸収が増加し, さらに, R-5P を構成する *PhopRNA* は R-4P の *PhopRNA* と比較して 260nm の吸収が減少していた (図 6c) (投稿中). 核酸の CD および UV スペクトルの研究より, ピークの楕円率の低下と UV 吸収の増加は塩基スタッキングの減少に起因することが知られており, 特に核酸の熱変性による UV 吸収の増加は濃色効果と呼ばれている. また, RNA 結合タンパク質と標的 RNA との相互作用に関する研究から, RNA 結合タンパク質は RNA への作用様式に基づき二つの

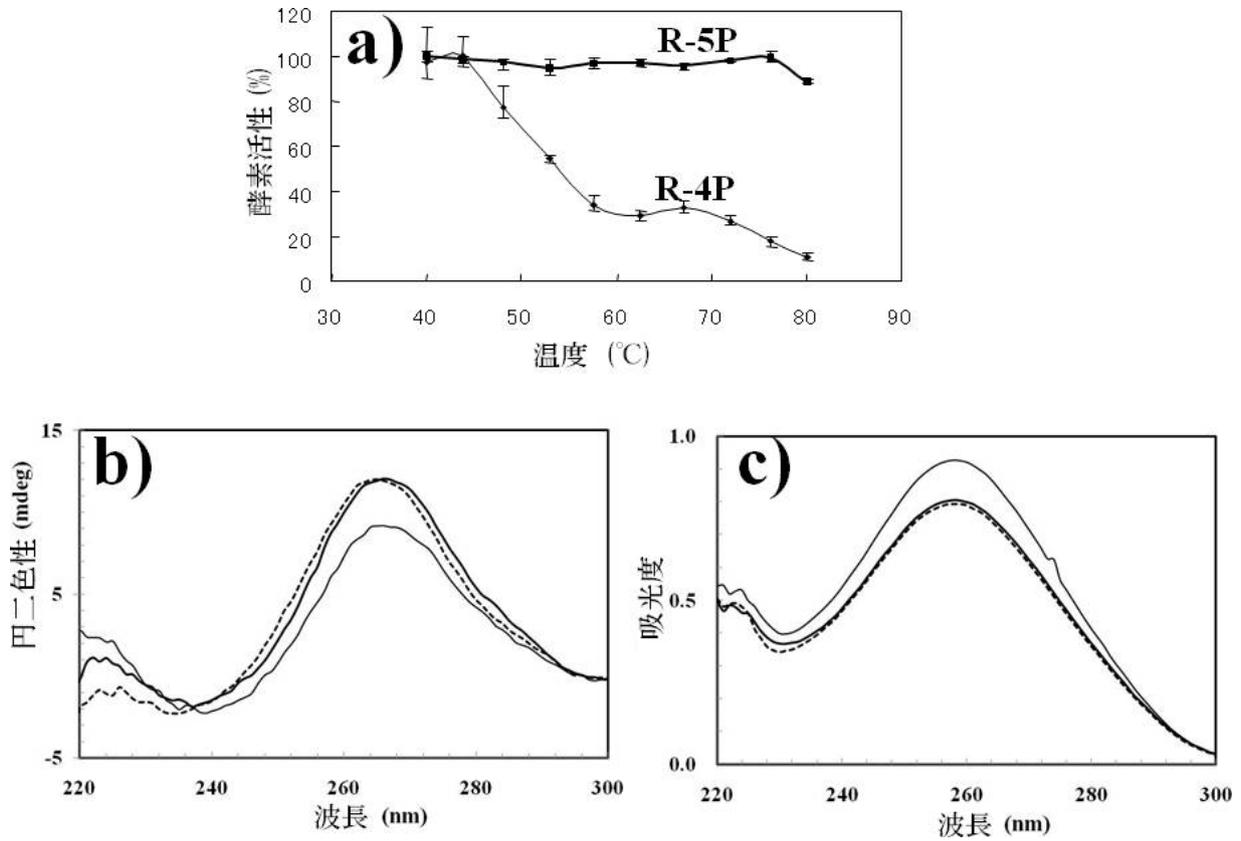


図 6 *Pho*RNase P の耐熱性

a) 再構成酵素の pre-tRNA 切断活性を指標とした耐熱性。再構成酵素 R-5P と R-4P を異なった温度で 1 時間処理した後、両酵素の pre-tRNA 切断活性を 55°C で測定した。b) *Pho*RNA (破線), R-4P (細い実線), R-5P (太い実線) の CD スペクトル。c) *Pho*RNA (破線), R-4P (細い実線), R-5P (太い実線) の UV 吸収スペクトル。

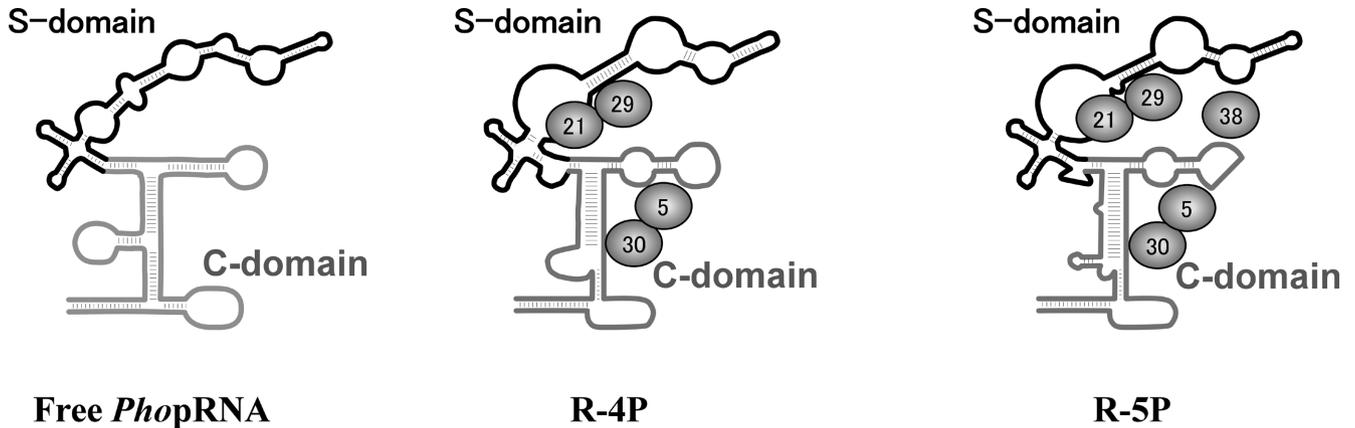


図 7 *Pho*RNA の構造変化による *Pho*RNase P の耐熱性モデル

5, 21, 29, 30, 38 はタンパク質 *Pho*Pop5, *Pho*Rpp21, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30, *Pho*Rpp38 を示している。なお、各タンパク質の化学量は無視している。

グループに分類されている²⁶⁾。一つのグループには RNA ヘリカーゼを代表とする RNA 結合タンパク質が含まれている。これらの RNA 結合タンパク質は塩基配列非特異的に結合し、RNA の塩基スタッキングを解くことにより、RNA を正常なコンホメーションへ導くことから、RNA シャペロンと定義されている²⁷⁾。一方、他のグループには

塩基配列に特異的に結合し、RNA の安定化に関与する RNA 結合タンパク質が含まれている。これらの知見を総合すると、*Pho*RNase P タンパク質複合体 *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 と *Pho*Rpp21-*Pho*Rpp29 はそれぞれ *Pho*RNA の C および S ドメインの RNA シャペロンとして機能し、誤って形成された塩基対を解くことにより *Pho*RNA を活

性型構造へと導き, *PhoRpp38* は *PhopRNA* と特異的に相互作用し, 塩基のスタッキングを増加させることにより, *PhopRNA* の耐熱性構造を形成していることが示唆された(図7).

2) *PhoRpp38* 結合部位

PhoRpp38 のアミノ酸配列が好塩アーキア (*Haloarcula marismortui*) のリボソームタンパク質 L7Ae と類似していることから, *PhoRpp38* はリボソームを構成するタンパク質 L7Ae であることが推定されている²⁸⁾. また, L7Ae は前駆体 rRNA のプロセシングに関与するリボ核タンパク質複合体・box C/D および box H/ACA の構成タンパク質でもある²⁹⁾. 従って, *PhoRpp38* はリボソーム, box C/D および box H/ACA, そして RNase P の構成タンパク質として機能するマルチ機能タンパク質と推定されている. 既に, L7Ae と rRNA との複合体や box H/ACA との複合体の結晶構造から, L7Ae は RNA の K-turn に結合することが報告されている^{20,30,31)}. K-turn は全ての生物種に見出されている RNA の構造モチーフで, 連続した2本のヘリッ

クス構造が, ヘリックス間の3ヌクレオチドによって折曲がった構造である³²⁾. 現在報告されている *PhopRNA* の二次構造には K-turn モチーフは予測されていない. そこで, *PhopRNA* の *PhoRpp38* 結合部位をフットプリンティング法を用いて検討した. 即ち, *PhoRpp38* の存在下および非存在下で *PhopRNA* をジメチル硫酸で修飾後, *PhopRNA* の修飾塩基をプライマー伸長反応により同定した. その結果, *PhopRNA* の C190, A227, A228, A234, C243, A245, A261, A272 が *PhoRpp38* の存在下でジメチル硫酸による修飾から保護されることが解った¹²⁾.

さらに, 試験管内分子進化法の一つである SELEX 法³³⁾ を用いて *PhoRpp38* と特異的に結合する RNA を検索した. その結果, 複数のクローンが得られ, それらの塩基配列を決定したところ, それらは *PhopRNA* の G127~C189 までのステムループ領域 (P12.1 と P12.2) と, G232~A271 番目までのステムループ領域 (P15) の塩基配列と類似していた (未発表). この結果とジメチル硫酸を用いたフットプリンティングにより得られた結果を総合して, *PhoRpp38* は *PhopRNA* のヘリックス P12.1 と P12.2 およ

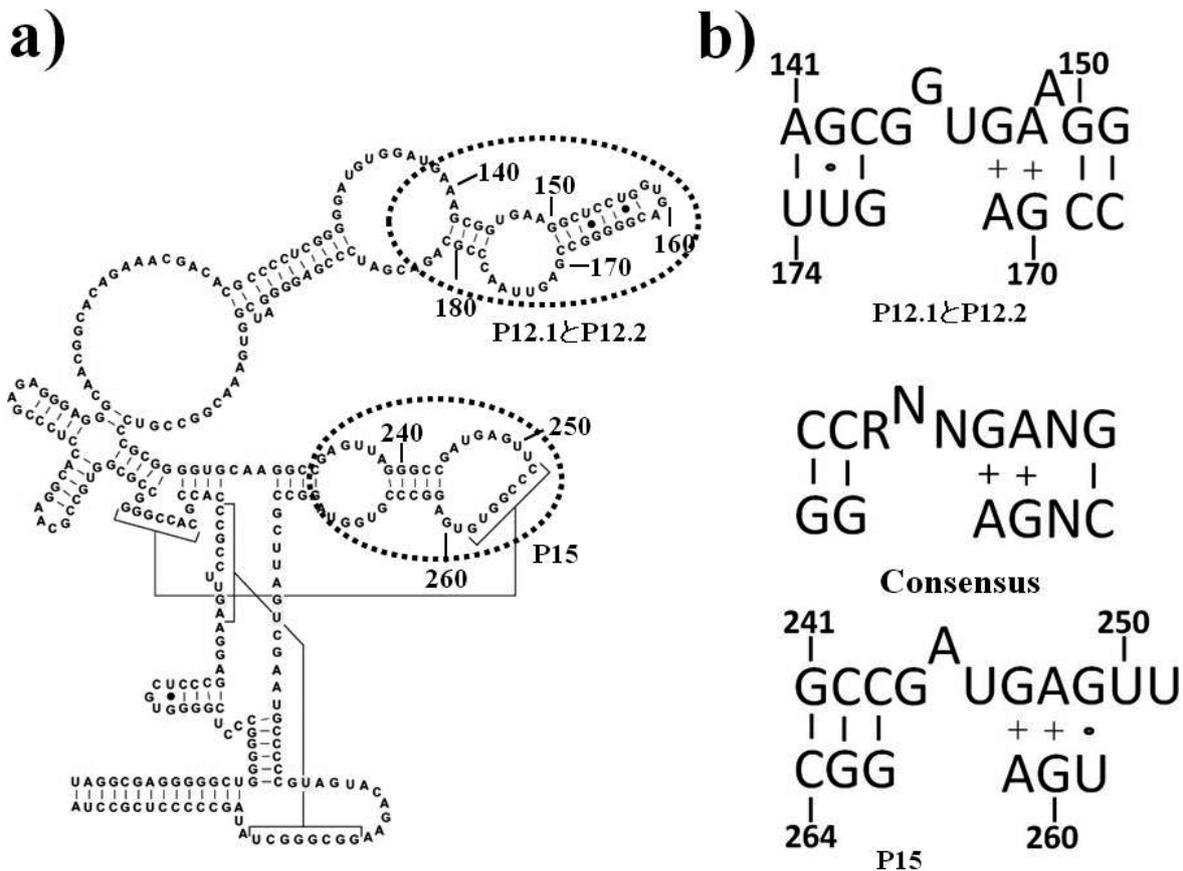


図8 *PhoRpp38* の *PhopRNA* 結合部位

a) ジメチル硫酸によるケミカルフットプリンティングと SELEX 法により推定された *PhoRpp38* の *PhopRNA* 結合部位. :ヘリックス P12.1 と P12.2 および P15 を破線で示した. b) ヘリックス P12.1 と P12.2 および P15 に推定された K-turn 構造を示す. 中央には K-turn の共通構造 (Consensus) を示す³²⁾. なお, R はプリン塩基, N は4種の塩基を示す.

び P15 の 2 箇所 に結合することにより, *PhoRNase P* の耐熱性に寄与していることが示唆された (図 8a)。

以上の結果に基づいて, *PhopRNA* のヘリックス P12.1 と P12.2 および P15 の領域に K-turn を検索した。その結果, 図 8b に示したように, P12.1 と P12.2 および P15 に K-turn が形成されている可能性が示唆され, *PhoRpp38* の結合部位がヘリックス P12.1 と P12.2 およびヘリックス P15 の 2 箇所であることが強く支持された。そこで, *PhoRpp38* の耐熱性への寄与を考察すると, *PhopRNA* の P12.1 と P12.2 はヒト H1 RNA においても保存され, K-turn モチーフの可能性が指摘されていることから³⁴⁾, *PhoRpp38* の P12.1 と P12.2 への結合が耐熱性に関与する可能性は低い。一方, *PhopRNA* のヘリックス P15 はヒト H1 RNA には保存されていないが, 大腸菌 M1 RNA には相当する構造が存在している。しかし, *PhopRNA* の P15 を構成する塩基配列は M1 RNA においては保存されていなく, K-turn の形成は不可能である。さらに, *Pyrococcus* 属の box C/D RNA の構造研究から, K-turn と L7Ae との相互作用が耐熱性をもたらしていることが強く推定されている³⁵⁾。以上のことから, *PhoRpp38* の P15 に形成される K-turn への結合が, 高度好熱アーキアリボ核タンパク質酵素である *PhoRNase P* の耐熱性に関与していることが示唆された。

5. ま と め

既述したように, *PhoRNase P* タンパク質複合体 *PhoPop5-PhoRpp30* と *PhoRpp21-PhoRpp29* は, *PhopRNA* の C ドメインと S ドメインの RNA シャペロンとして機能していることが推定された。一方, *PhoRpp38* は *PhopRNA* の末端ヘリックス構造 P12.1 と P12.2 および P15 と特異的に相互作用し, 特に P15 に形成される K-turn 構造への結合が塩基のスタッキングを増加させ, *PhopRNA* の耐熱性構造を形成していることが示唆された。

最近, miRNA (micro-RNA) や siRNA (small interfering RNA) 等, 機能性 RNA が生体内反応や遺伝子の発現調節に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 の多くは, RNA-タンパク質複合体として機能している。本総説で紹介した *PhoRNase P* をモデルとしたリボ核タンパク質複合体酵素の構造と機能に関する研究は, 単にアーキアおよび真核生物の RNase P の触媒作用機構の解明のための知見を与えるばかりではなく, 機能性 RNA の耐熱性やフォールディング機構についても重要な基礎情報を与えるものと期待している。

謝辞

超好熱古細菌 RNase P の構造と機能に関する研究は, 九州大学大学院農学研究院生物化学研究室で行われたもの

で, 角田佳充准教授, 中島崇助教をはじめ, 研究室のメンバー (卒業生および在校生) に感謝致します。また, この研究は日本学術振興会からの科学研究費および応用酵素協会からの研究助成によって行ったものです。

文 献

- 1) Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088-5090.
- 2) Hecker, A., Dorlet, P., Gabelle, D., Graille, M., Justome, A., Dorlet, P., Brochier, C., Quevillo-Cheruel, S., Lecam, E., Tilbeurgh, H.V., & Forterre, P. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6042-6051.
- 3) Berthon, J., Cortez, D., & Forterre, P. (2008) *Genome Biology*, **9**, R71.
- 4) Altman, S. & Kirsebom, L. (1999) in *The RNA World*, (Gesteland, R.F., Cech, T., & Atkins, J.F. eds.), pp. 351-380, Cold Spring Harbor, New York.
- 5) Jarrous, N. & Reiner, R. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3519-3524.
- 6) Kazantsev, A.V. & Pace, N.R. (2006) *Nature Rev.*, **4**, 729-740.
- 7) Smith, J.K., Hsieh, J., & Fierke, C.A. (2007) *Biopolymer*, **87**, 329-338.
- 8) Mann, H., Ben-Asouli, Y., Schein, A., Moussa, S., & Jarrous, N. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 925-935.
- 9) Andrews, A.J., Hall, T.A., & Brown, J.W. (2001) *Biol. Chem.*, **382**, 1171-1177.
- 10) Kawarabayashi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosigi, H., Ho- soyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., & Kikuchi, H. (1998) *DNA Res.*, **5**, 55-76.
- 11) Kouzuma, Y., Mizoguchi, M., Takagi, H., Fukuhara, H., Tsukamoto, M., Numata, T., & Kimura, M. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 666-673.
- 12) Fukuhara, H., Kifusa, M., Yamaguchi, H., Watanabe, M., Terada, A., Honda, T., Numata, T., Kakuta, Y., & Kimura, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 956-964.
- 13) Terada, A., Honda, T., Fukuhara, H., Hada, K., & Kimura, M. (2006) *J. Biochem.*, **140**, 293-298.
- 14) Terada, A., Yoshida, T., & Kimura, M. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1940-1945.
- 15) Loria, A. & Pan, T. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1892-1897.
- 16) Takagi, H., Watanabe, M., Kakuta, Y., Kamachi, R., Numata, T., Tanaka, I., & Kimura, M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 787-794.
- 17) Kakuta, Y., Ishimatsu, I., Numata, T., Tanaka, I., & Kimura, M. (2005) *Biochemistry*, **44**, 12086-12093.
- 18) Numata, T., Ishimatsu, I., Kakuta, Y., Tanaka, I., & Kimura, M. (2004) *RNA*, **10**, 1423-1432.
- 19) Kawano, S., Nakashima, T., Kakuta, Y., Tanaka, I., & Kimura, M. (2006) *J. Mol. Biol.*, **357**, 583-591.
- 20) Timsit, Y., Acosta, Z., Allemand, F., Chiaruttini, C., & Springer, M. (2009) *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 817-834.
- 21) Kifusa, M., Fukuhara, H., Hayashi, T., & Kimura, M. (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1209-1212.
- 22) Jiang, T., Guerrier-Takada, C., & Altman, S. (2001) *RNA*, **7**,

- 937-941.
- 23) Houser-Scott, F., Xiao, S., Millikin, C., Zengel, J.M., Lindahl, L., & Engelke, D.R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2684-2689.
- 24) Hall, T.A. & Brown, J.W. (2004) *Archaea*, **1**, 247-253.
- 25) Honda, T., Kakuta, Y., Kimura, K., Saho, J., & Kimura, M. (2008) *J. Mol. Biol.*, **384**, 652-662.
- 26) Schroeder, R., Barta, A., & Semrad, K. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 908-919.
- 27) Herschlag, D. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20871-20874.
- 28) Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., & Steiz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 905-920.
- 29) Rozhdestvensky, T.S., Tang, T.H., Tchirkova, I.V., Brosius, J., Bachelier, J.-P., & Httenhofer, A. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 869-877.
- 30) Li, L. & Ye, K. (2006) *Nature*, **443**, 302-307.
- 31) Hamma, T. & Rerre-D'Amare, A.R. (2004) *Structure*, **12**, 893-903.
- 32) Tiedge, H. (2006) *RNA Biol.*, **3**, 133-139.
- 33) Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., & Yarus, M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 763-797.
- 34) Lopez, M.D., Rosenblad, M.A., & Samuelsson, T. (2009) *RNA Biol.*, **6**, 1-13.
- 35) Nolvos, S., Carpousis, A.J., & Clouet-d'Orval, B. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6507-6514.
-