

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18570113

研究課題名 (和文) シグナル認識粒子の立体構造解析

研究課題名 (英文) Structural analysis of signal recognition particle

研究代表者

坂本 泰一 (SAKAMOTO TAIICHI)

千葉工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40383369

研究成果の概要：

分泌タンパク質を認識して膜外に輸送するシグナル認識粒子(SRP)の立体構造解析を行った。また、SRPを構成するRNAとタンパク質の相互作用解析を行った。全体構造の決定には至らなかったが、RNAの部分構造が明らかとなった。SRPの形成のためにその部分構造が重要であることが示唆された。さらに、RNAの立体構造はタンパク質と相互作用することによって大きく構造変化することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：核酸，機能性RNA，NMR，シグナル認識粒子，構造生物学，タンパク質

1. 研究開始当初の背景

シグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle; SRP) は、分泌タンパク質がリボソームで合成される際に、そのN末端のシグナル配列を認識し、分泌タンパク質およびリボソームを小胞体膜に移行させる働きを持つ。しかし、その分泌メカニズムは原子座標のレベルで明らかにされていなかった。

本研究で研究対象としたのは、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来のSRPである。古細菌のSRPについては、1つのSRP RNAと2つのタンパク質 (SRP19, SRP54) が見つか

っている。これらのSRP構成因子の中で、シグナル配列と結合するのはSRP54タンパク質である。ヒトの場合、SRP19タンパク質はヒトSRPの編成に必須な因子であり、SRP54とSRP RNAが結合するためにはSRP19とSRP RNAの結合が必要であることが知られている。しかし、超好熱性古細菌 *P. furiosus* の場合には、SRP54は単独でSRP RNAと結合できる。ヒトの場合になぜSRP54タンパク質とSRP RNAの結合にSRP19タンパク質が必要であり、*P. furiosus* の場合にはなぜSRP19タンパク質を必要としないのかという点について明

らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SRP19 タンパク質の結合によって SRP RNA の構造変化がどのように起こり、その変化が SRP54 タンパク質と SRP RNA との相互作用、さらには SRP54 タンパク質とシグナル配列との相互作用にどのように影響するのかという点について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

本研究では、SRP の編成メカニズムを明らかにするために、*P. furiosus* 由来の SRP の S-domain の立体構造解析およびその構成因子である SRP RNA の helix 6 および helix 8, SRP19 タンパク質および SRP54 タンパク質の相互作用解析を行った。

(1) helix 6 および helix 8 の立体構造解析

helix 6 および helix 8 のような比較的短い RNA を調製するためには、鋳型となる DNA を化学合成し、T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写反応によって RNA を合成した。得られた RNA を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって精製した。¹³C および ¹⁵N の安定同位体標識についても *in vitro* 転写系を用いた。

RNA の構造解析に必要な一連の三重共鳴 NMR 測定を行った。Helix 6 については、NMR シグナルを RNA の各プロトンに帰属し、プログラム Discover を用いて立体構造決定を行った。また、熱融解曲線を解析し、helix 6 の熱力学的パラメータを調べた。

(2) S-domain RNA の立体構造解析

helix 6 および helix 8 をつなげたものに相当する S-domain RNA については、鋳型となる DNA を化学合成し、それを PCR によって増幅して転写反応に用いた。転写反応には、T7 RNA ポリメラーゼを用いた。得られた RNA の精製には、S-domain の立体構造を壊さずに精製するため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いた。

(3) SRP19 タンパク質の立体構造解析

大腸菌を用いた SRP19 タンパク質の大量発現系によって ¹³C および ¹⁵N の安定同位体標識を行った。ヒスチジンタグの付いた SRP19 タンパク質を Ni-NTA レジンを付いたアフィニティカラムクロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

タンパク質の構造解析に必要な一連の三重共鳴 NMR 測定を行った。得られた NMR シグ

ナルについてプログラム KIJIRA を用いて帰属した。

(4) SRP54 タンパク質の立体構造解析

SRP54 タンパク質は、N 末端の N domain, GTPase 活性を持つ G domain, さらに SRP RNA およびシグナルペプチドと結合する M domain の 3 つのドメインに分割することができる。全長の SRP54 タンパク質について、大腸菌による発現系による収量が非常に少なかったため、M domain の調製を試みた。M domain の調製のために理化学研究所の NMR 立体構造解析パイプラインを用いた。

(5) S-domain RNA と SRP19 タンパク質との相互作用解析

S-domain RNA と SRP19 タンパク質の相互作用をゲルシフト法により解析した。S-domain RNA と SRP19 タンパク質が安定な複合体を形成する条件を調べた後、NMR を用いて相互作用解析を行った。

4. 研究成果

(1) helix 6 の立体構造解析

超好熱性古細菌 *P. furiosus* 由来 SRP RNA の helix 6 のループ部分に相当する 12 残基の RNA を調製し、その立体構造を NMR 法により決定した (図 1)。helix 6 の GAAG ループ部分は、既に報告している GNRR モチーフとよく似た特徴を示した。

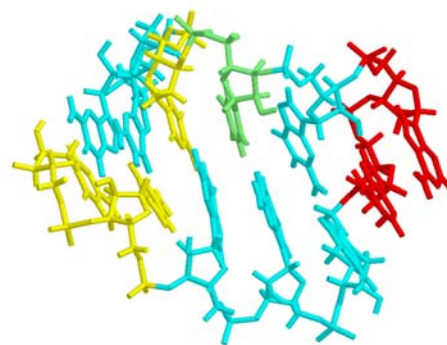


図 1 helix 6 の立体構造
赤 : A, 青 : G, 黄 : C, 緑 : U

GNRR モチーフでは、G と N の間で主鎖が折れ曲がり、NRR の塩基がスタッキングし、G と最後の R が塩基対を形成する。既に立体構造を決定しているヒトの GAGG ループと比較したところ、最後の G の塩基が副溝側に少し飛び出していることがわかった。これは、ループを閉じている塩基対がヒトでは GC 塩基対であるのに対して、*P. furiosus* では UG 塩基対となっており、ループ内の GG 塩基対とのスタッキングが小さいことが原因である

と考えている。さらに副溝側に飛び出しているGはSRP RNAのhelix 8と相互作用することがわかっており、*P. furiosus*のSRP RNAの立体構造形成において、このGが副溝側に飛び出すことによってhelix 8と相互作用しやすくなっていることが示唆された。

(2) helix 8の立体構造解析

helix 8に相当するRNA断片を大量調製し、NMRスペクトルを測定したが、シグナルがブロードで、重なりが激しいため、NMRスペクトルの解析が困難であった。NMRシグナルがブロードになった原因としては、非対称な内部ループがあるために立体構造が不安定になってしまったことが考えられる。シグナルの重なりが激しかった点については、GC含量が多かったためであると考えられる。そこで、helix 8の2つの塩基に対して塩基置換を施し、良好なNMRスペクトルを得ることを試みたが、NMRスペクトルの顕著な改善はみられなかった。これ以上の塩基置換については、SRPの活性を失う可能性があるで行わなかった。

(3) S-domain RNAの立体構造解析

helix 6およびhelix 8に相当するSドメインRNAを大量調製し、NMRスペクトルを測定したが、シグナルがブロードで、重なりが激しいため、NMRスペクトルの解析が困難であった。しかし、イミノプロトンシグナルの解析から、helix 6とhelix 8のNMRスペクトルをそれぞれ測定し、それらを足し合わせたスペクトルとS-domain RNAのNMRスペクトルが一致しないことが明らかとなった。これは、helix 6とhelix 8の間に相互作用していることを示唆している。X線結晶構造解析によって、他の生物種のS-domainにおいてhelix 6とhelix 8の間に相互作用があることが明らかとなっていたが、*P. furiosus*のSRP RNAも同様な相互作用があることが示唆された。

(4) SRP19タンパク質の立体構造解析

安定同位体標識した*P. furiosus*のSRP19タンパク質の三重共鳴スペクトルの測定により、主鎖については約90%のシグナルを帰属することができた。しかし、それ以上NMRシグナルの帰属は進まず、立体構造決定には至らなかった。原因は、試料濃度が低かったため、十分なシグナルが得られなかったことが原因と考えられる。現在、安定同位体標識したSRP19タンパク質を再調製し、解析を試みている。

一方、部分的ではあるが、化学シフト値を

用いた二次構造解析から、2つの α -ヘリックスと3つの β -ストランドを持ち、既に構造決定されている他の生物種のSRP19タンパク質とほぼ同じ二次構造を持つことが示唆された。

(5) SRP54タンパク質の立体構造解析

大腸菌を用いた大量発現系を用いてSRP54タンパク質の大量調製を試みたが、非常に収量が低く、構造解析に十分な量を得ることはできなかった。そこで、理化学研究所のNMR立体構造解析パイプラインを利用して、M domainを調製し、HSQCスペクトルを測定した。しかし、良好なNMRスペクトルは得られず、構造決定には至らなかった。

(6) S-domain RNAとSRP19タンパク質の相互作用解析

S-domain RNAとSRP19タンパク質の相互作用を30°Cで解析したところ、イミノプロトンシグナルに大きな変化は観測されなかった。しかし詳細については、シグナルの重なりとブロードニングのため解析できなかった。一方、高温下(55°C)でS-domain RNAのNMRスペクトルを測定したところ、非ワトソクリック型塩基対であるGU塩基対およびUU塩基対に由来するシグナルは観測されなかった。これは、温度上昇によってS-domain RNAの運動性が高まったこと、またイミノプロトンと水との交換速度が速くなったことが原因であると考えられる。さらに、S-domain RNAにSRP19タンパク質を加えたところ、GU塩基対およびUU塩基対が観測されるようになった。このことから、SRP19タンパク質の結合によってS-domain RNAの立体構造が安定化することが示唆された。さらに、S-domain RNAの変異体を用いた解析から、SRP19タンパク質の結合部位から離れた部位の非ワトソクリック型U:U塩基対が安定化されることが明らかとなった。よって、SRP19タンパク質の結合によるSRP RNAの構造変化は大きいものだと考えられる。SRP19タンパク質の結合によってSRP54タンパク質のSRP RNAに対する結合が促進されることから、今回観測された大きな構造変化によって、SRP54の結合部位が安定化していることが示唆される。

(7) SRP19タンパク質に結合するRNAの解析

S-domain RNAのNMRスペクトルの解析は困

難であるので、SRP19 タンパク質に結合する RNA アプタマーを SELEX 法により取得した。アプタマーの配列および予想される二次構造は、S-domain RNA のものとは大きく異なることがわかった。現在、そのアプタマーと SRP19 タンパク質の相互作用を NMR で解析することで、SRP19 タンパク質との相互作用に必須の RNA 構造が明らかになることを期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Haraguchi Y., Kuwasako K., Muto Y., Bessho Y., Nishimoto M., Yokoyama S., Kanai A., Kawai G., Sakamoto T., Characterization of RNA aptamers against SRP19 protein having sequences different from SRP RNA, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, (2009) in press, 査読無
- ② 坂本泰一, NMRによるRNAの立体構造解析, 分光研究, 55 巻, 173-181, (2006), 査読無
- ③ Okada K., Takahashi M., Sakamoto T., Kawai G., Nakamura K., Kanai A., Solution Structure of a GAAG Tetraloop in Helix 6 of SRP RNA from *Pyrococcus furiosus*, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **25**, 383-395 (2006), 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 助川伸也, 岡田潔, 高橋真梨, 中村幸治, 金井昭夫, 河合剛太, 坂本泰一, 超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* の SRP の構造解析, 平成 20 年度日本生化学会関東支部例会, 2008 年 6 月 21 日, 群馬大学 (桐生)
- ② 松田崇志, 高橋真梨, 越智丈衆, 助川伸也, 岡田潔, 中村幸治, 金井昭夫, 坂本泰一, 河合剛太, 超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* の SRP の構造と機能の解析, 第 7 回極限環境微生物学会年会, 2006 年 11 月 29 日, 明治大学 (川崎)

[図書] (計 1 件)

- ① 河合剛太, 坂本泰一, クバプロ, 機能性 Non-coding RNA, 2006 年, 145-159

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 泰一 (SAKAMOTO TAIICHI)
千葉工業大学・工学部・准教授

研究者番号 : 40383369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

河合 剛太 (KAWAI GOTTA)
千葉工業大学・工学部・教授
研究者番号 : 70211860