

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380062

研究課題名（和文） リボ核タンパク質複合体酵素の構造活性相関と耐熱性

研究課題名（英文） Structure-activity relationship and thermostability of ribonucleoprotein enzyme

研究代表者

木村 誠 (KIMURA MAKOTO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：10204992

研究成果の概要（和文）：超好熱性古細菌（*Pyrococcus horikoshii*）由来リボ核タンパク質酵素・RNase Pの構成タンパク質は、蛍光共鳴エネルギー移動法による解析から、RNA アニールン促進活性と RNA シャペロン活性を有している事が明らかになり、これら両活性が RNase Pの触媒活性の活性化に関与していることを示唆した。さらに、*PhoRpp38* と *PhopRNA* の相互作用を熱力学的に解析した。その結果、それらの結合定数は  $1.56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  で、*PhoRpp38* は2つのステムループ構造に同等の親和性により結合することが分かった。以上の結果より、*PhoRpp38* の *PhopRNA* への結合が、CドメインとSドメインの適切な配置をもたらし、さらに *PhopRNA* の塩基スタッキングを増加していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：The ribonuclease P (RNase P) in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* comprises RNA (*PhopRNA*) and five proteins. We analyzed the RNA binding mode of the proteins, using a pair of complementary fluorescence-labeled oligoribonucleotides. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assays suggests that the RNase P proteins assist *PhopRNA* in attaining a functionally active conformation via a distinct mode of binding. Moreover, Thermodynamic analysis revealed that *PhoRpp38* and *PhopRNA* interact with each other with an association constant ( $K_a$ ) of  $1.56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ . It was further found that *PhoRpp38* simultaneously binds two stem-loop structures in *PhopRNA* approximately with an equal affinity. On the basis of the results, it was suggested that the simultaneous binding of *PhoRpp38* to SL1 and SL2 makes an appropriate orientation of the S and C domains and that *PhoRpp38* binding stabilizes base pairing, which increases base staking in *PhopRNA*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：酵素利用学、リボザイム

## 1. 研究開始当初の背景

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA の 5' 末端余剰配列の切断に関与するエ

ンドヌクレアーゼで RNA とタンパク質から構成されている。大腸菌を代表とする真正細菌の RNase P は、 $\text{Mg}^{2+}$  高濃度下では RNA 分子の

みで活性を持つリボザイムとして知られている。一方、古細菌や真核生物の RNase P は RNA のみで活性を持つことはなく、RNA とタンパク質の相互作用により RNA の触媒活性が活性化される。このような性質から、古細菌及び真核生物 RNase P は機能性 RNA のタンパク質による触媒活性の活性化機構を解明するためのモデル酵素と考えられ、当研究室では真核生物の RNase P に比べてタンパク質数が少ない超好熱古細菌 (*Pyrococcus horikoshii*) の RNase P を研究対象として、その構造と活性に関する研究を進めている。既に、超好熱古細菌 RNase P は触媒活性を持つ RNA (*Phop*RNA) と 5 種のタンパク質 (*Pho*Pop5, *Pho*Rpp21, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30, *Pho*Rpp38) から構成されていることが明らかになっていた。また、タンパク質 *Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 及び *Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 がそれぞれ複合体を形成し、*Phop*RNA の触媒 (C) ドメイン及び特異性 (S) ドメインの活性化に関与していることを明らかにしていた。さらに、分光学的な実験により、タンパク質複合体 *Pho*Pop5-*Pho*Rpp30 と *Pho*Rpp21-*Pho*Rpp29 が *Phop*RNA の塩基対を解くのに対して、*Pho*Rpp38 は *Phop*RNA の 2 本のステムループ構造に特異的に結合し、塩基対を形成することで温度安定性に寄与していることが明らかになっていた。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、超好熱性古細菌リボ核タンパク質複合体酵素・*Pho*RNase P の構造活性相関と耐熱性の構造基盤を解明するために、RNA サブユニットのタンパク質による構造形成機構と耐熱性獲得機構について検討した。

## 3. 研究の方法

RNase P の構成タンパク質の RNA 作用様式は、蛍光共鳴エネルギー移動法により解析した。また、RNase P 構成タンパク質 Rpp38 と RNA の相互作用を等温滴定カロリメトリーにより解析した。

## 4. 研究成果

まず、*P. horikoshii* RNase P 構成タンパク質の RNA に対する作用様式を明らかにするために、タンパク質の存在下または非存在下で、Cy3 もしくは Cy5 で蛍光標識した 2 本の相補的塩基配列を持つ RNA (Oligo-1 と -2、各 21 nt) を室温で混合後、日立蛍光分光光度計により Cy3 を励起波長  $\lambda=535\text{nm}$  で照射し、 $\lambda=590\text{nm}$  の蛍光強度の減少を測定することによりアニーリング促進活性を評価した。

続いて、上記の系に Cy3-RNA と同配列を持つ未標識 RNA を加え、 $\lambda=590\text{nm}$  の蛍光強度の回復を測定することにより解離促進活性 (RNA シャペロン活性) を評価した。その結果、タンパク質非存在下では、Oligo-1 と -2 のアニーリング反応の半減期は 185 秒であった。しかし、タンパク質 (*Pho*Pop5, *Pho*Rpp21, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30) の存在下では、アニーリング反応の半減期が約 1/10 に短縮されていることから、これら 4 種のタンパク質はアニーリング促進活性をもつ事が示唆された。一方、タンパク質 *Pho*Rpp38 の存在下では、Oligo-1 と -2 のアニーリング反応に影響を与えず、*Pho*Rpp38 はアニーリング促進活性を有していない事が示唆された。続いて、未標識の RNA を添加すると、*Pho*Pop5, *Pho*Rpp29, *Pho*Rpp30 は Oligo-1 と -2 の解離反応を促進し、その半減期はそれぞれ 326 秒, 268 秒, 166 秒であった。この結果より、これら 3 種のタンパク質は RNA シャペロン活性を有することが示唆された。一方、*Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp38 は Oligo-1 と -2 の解離反応を促進しなかった。

次に、*Phop*RNA と *Pho*Rpp38 の相互作用を検討するため、*Phop*RNA、P12 を欠損させた変異体  $\Delta$ P12、P16 を欠損させた変異体  $\Delta$ P16、P12 断片および P16 断片を作成し ITC を測定した。その結果、*Pho*Rpp38 と *Phop*RNA の結合定数 ( $K_a$ ) は  $1.56 \times 10^7 \text{M}^{-1}$  で結合比 (N) は 1:1 であった。 $\Delta$ P12 と  $\Delta$ P16 の  $K_a$  を見ると、それぞれ  $6.71 \times 10^6 \text{M}^{-1}$  と  $5.08 \times 10^6 \text{M}^{-1}$  であり *Pho*Rpp38 は両ステムループ構造に同等の結合親和性を持つことがわかった。この結果より、*Pho*Rpp38 は P12 および P16 へ同等の強さで同時に結合し、P12 を含む特異性 (S) ドメインと P16 を含む触媒 (C) ドメインをコンパクトに折りたたみ構造を安定化することによって *Phop*RNA の耐熱性を向上させると推定された。また、結合比 (N) を比べると、*Pho*Rpp38 は *Phop*RNA と  $\Delta$ P12 に対しては 1:1 であったが、 $\Delta$ P16 および P12 に対しては 1:2 であった。これより、*Pho*Rpp38 には P12 と P16 のそれぞれの結合部位があり、P12 は P16 の結合部位にも結合できることが推定された。以上の結果より、*Pho*Rpp38 の *Phop*RNA への結合が、C ドメインと S ドメインの適切な配置をもたらし、さらに *Phop*RNA の塩基スタッキングを増加していることを示唆した。

## 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 6 件)

1. T. Hara, A. Terada, H. Yamaguchi, T. Nakashima, Y. Kakuta, and M. Kimura, The contribution of peripheral stem-loops to catalytic activity of archaeal RNase P RNA from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 816-819 (2011).
2. J. Noguchi, K. Chaen, N.T. Vu, T. Akasaka, H. Shimada, T. Nakashima, A. Nishi, H. Satoh, T. Omori, Y. Kakuta, and M. Kimura, Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding. *Glycobiology*, **21**, 1108-1116 (2011).
3. C. Zwieb, Y. Nakao, H. Nakashima, H. Takagi, S. Goda, E.S. Andersen, Y. Kakuta, and M. Kimura, Structural modeling of RNase P RNA from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 517-522 (2011).
4. K. Oshima, T. Nakashima, Y. Kakuta, K. Tsumoto, and M. Kimura, Thermodynamic analysis of a multifunctional RNA-binding protein *PhoRpp38* in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1252-1255 (2012).
5. K. Chaen, J. Noguchi, T. Omori, Y. Kakuta, and M. Kimura, Crystal structure of the rice branching enzyme I (BEI) in complex with maltopentaose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 508-511 (2012).
6. M. Ishihara, Nishimoto, S. Yamashita, Y. Kakuta, and M. Kimura, A distinct binding mode of archaeal ribonuclease P proteins to the RNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 2335-2337 (2012).
4. 山口浩輝、真柳浩太、角田佳充、木村誠、古細菌 RNase P の電子顕微鏡による単粒子構造解析、平成 24 年 5 月 27 日、日本生化学会九州支部例会（福岡大学）
5. 今井崇喜、中山郁、角田佳充、木村誠、シロイヌナズナ由来前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP1 の大腸菌での発現と結晶化、平成 24 年 5 月 27 日、日本生化学会九州支部例会（福岡大学）
6. 今井崇喜、中山郁、角田佳充、木村誠、シロイヌナズナ細胞小器官前駆体 tRNA プロセシング酵素・PRORP1 の調製と結晶化、平成 24 年 6 月 21 日、第 12 回日本蛋白質科学会（名古屋国際会議場）
7. 大嶋浩介、中島崇、濱崎真人、角田佳充、木村誠、古細菌リボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 Rpp38-RNA 複合体の熱力学的性質と結晶化、平成 24 年 6 月 21 日、第 12 回日本蛋白質科学会（名古屋国際会議場）
8. 石原雅人、西本悦子、山下昭二、角田佳充、木村誠、超好熱古細菌 RNase P RNA の活性化機構の解析、平成 24 年 6 月 21 日、第 12 回日本蛋白質科学会（名古屋国際会議場）
9. 今井崇喜、中山郁、前田卓、角田佳充、木村誠、Arabidopsis thaliana 由来リボヌクレアーゼ P-様タンパク質・PRORP1 の酵素化学的性質と結晶化、平成 24 年 12 月 15 日、第 85 回日本生化学会（福岡国際会議場）
10. 石原雅人、古谷貴志、濱崎真人、栢山紘輔、角田佳充、木村誠、リボヌクレアーゼ P 構成タンパク質の RNA シャペロン活性に関する研究、平成 24 年 12 月 15 日、第 85 回日本生化学会（福岡国際会議場）

[学会発表] (計 10 件)

1. 濱崎真人、石原雅人、角田佳充、木村誠、超好熱古細菌 RNase P タンパク質 PhoPop5-PhoRpp30 と RNA 複合体の結晶化、平成 24 年 5 月 27 日、日本生化学会九州支部例会（福岡大学）
2. 大嶋浩介、中島崇、濱崎真人、角田佳充、木村誠、RNase P 構成タンパク質 Rpp38 と RNA の相互作用様式と複合体の結晶化、平成 24 年 5 月 27 日、日本生化学会九州支部例会（福岡大学）
3. 石原雅人、西本悦子、山下昭二、角田佳充、木村誠、リボヌクレアーゼ P タンパク質の RNA 活性化機構、平成 24 年 5 月 27 日、日本生化学会九州支部例会（福岡大学）
6. 研究組織
  - (1) 研究代表者  
木村 誠 (KIMURA MAKOTO)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：10204992
  - (2) 研究分担者  
郷田 秀一郎 (GODA SYUICHIROU)  
長崎大学・工学部・准教授  
研究者番号：00346587
  - (3) 連携研究者  
山下 昭二 (YAMASHITA SHOJI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：70089936

角田 佳充 (KAKUTA YOSHIMITSU)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：00314360