

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04487

研究課題名(和文) 前駆体tRNAプロセシング酵素の構造と機能の解明とその有効利用

研究課題名(英文) Study on structure and function of the processing enzyme for pre-tRNA and its application

研究代表者

木村 誠 (Kimura, Makoto)

九州大学・農学研究院・学術特任教員

研究者番号：10204992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体tRNA (pre-tRNA) のプロセシングを触媒するエンドヌクレアーゼで、触媒残基を持つRNAと補助因子であるタンパク質から構成されるリボ核タンパク質酵素である。本申請研究では、超好熱性アーキアRNase Pを研究対象として、その構造と機能を解明するとともに、超好熱性アーキアRNase P構成タンパク質を用いた塩基置換検出法の開発を目指した。

研究成果の概要(英文)：Ribonuclease P (RNase P) is a ribonucleoprotein that cleaves off 5' leader sequences from tRNA precursors in all living cells and consists of a catalytic RNA and protein cofactors. In this study, I performed the structure and functional study of RNase P from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horioshii and also examined potentiality of the RNase P proteins for bioanalytical application where precise hybridization of nucleic acids is needed.

研究分野：生物化学

キーワード：リボヌクレアーゼP アーキア tRNAプロセシング酵素

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 (pre-tRNA) の 5' 末端余剰配列のプロセッシングを触媒するリボ核タンパク質複合体で、その全体構造と RNA のタンパク質による活性化の観点から興味を持たれている。最近、真核生物の RNase P は前駆体 tRNA のプロセッシングに加え、様々な機能性 RNA (ncRNA: non-coding RNA) のプロセッシングを触媒するとともに、RNA 合成酵素 I と III の転写調節因子としても機能していることが報告されているが、その詳細は未解明である。申請者は、超好熱性アーキア (*Pyrococcus horikoshii*) RNase P の RNA サブユニット (PhopRNA) が、それ自身では触媒活性を示さず、5 種のタンパク質 (PhoPop5、PhoRpp21、PhoRpp29、PhoRpp30、PhoRpp38) との相互作用により活性化されることを見出し、各サブユニットの構造と機能に関する研究を進めてきた。この研究過程で、PhoRpp38 を除く 4 種のタンパク質が RNA の解離会合を促進することにより RNA の構造形成を補助する “RNA シャペロン” であることを明らかにした。さらに、アーキア RNase P の新機能解明を目指して、遺伝子操作系が確立されている超好熱性アーキア (*Thermococcus kodakarensis*) RNase P RNA 遺伝子に変異を導入することにより、pre-tRNA のプロセッシング活性が低下した *T. kodakarensis* 異株を調製した。

2. 研究の目的

超好熱性アーキア RNase P を研究対象として、その構造と機能を解明するとともに、超好熱性アーキア RNase P 構成タンパク質を用いた塩基置換検出法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本申請研究では、リボ核タンパク質複合

体酵素・アーキア RNase P の構造と機能の全容を、生化学的解析、結晶構造解析、電子顕微鏡構造解析、および次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析により解明した。さらに、*P. horikoshii* RNase P 構成タンパク質の RNA 解離会合促進活性 (RNA シャペロン活性) を応用した塩基置換検出法 (遺伝子検査技術) を、Cy3 と Cy5 標識オリゴヌクレオチドを用いた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による開発を目指した。

4. 研究成果

超好熱性アーキア (*Pyrococcus horikoshii*) RNase P の再構成実験から、それが RNA (PhopRNA) と 5 種のタンパク質 (PhoPop5、PhoRpp21、PhoRpp29、PhoRpp30、PhoRpp38) から構成されている。本申請研究では、タンパク質 PhoPop5 と PhoRpp30 は四量体を形成し、PhoPop5 の C 末端に位置するヘリックスが、PhopRNA の触媒ドメインに含まれる 2 本のヘリックス (二本鎖構造) を架橋することにより触媒部位の構造を形成していることを明らかにした。一方、PhoRpp21 と PhoRpp29 は二量体を形成し、PhoRpp21 の分子表面に広く存在する塩基性アミノ酸残基を介して PhopRNA の P11 と P12 を結ぶ一本鎖領域に結合し、PhopRNA の基質結合部位の構造形成に関与するとともに、PhoRpp29 の C 末端ヘリックスが PhopRNA の P12 を安定化していることを明らかにした。5 番目のタンパク質 PhoRpp38 は PhopRNA に存在する K-turn モチーフに結合し、その耐熱性向上に関与していることを明らかにした。さらに、以上の結果を総合して構築した超好熱性アーキア RNase P の高次構造モデルを作成するとともに、構造既知の真正細菌 RNase P との比較についても考察した。

一方、超好熱性アーキア RNase P を構成する 4 種の RNA シャペロンの DNA 会合解離促進活性に与える影響を FRET で測定し

たところ、すべての RNA シャペロンにおいて DNA の会合解離促進活性が認められ、これら 4 種の RNA シャペロンは DNA にも作用する核酸シャペロンであることが確認された。次に、各 RNA シャペロンを用いて DNA の一塩基変異の検出能を同様に FRET で検討したところ、一塩基変異を含む DNA 鎖 (G10 A、G4 C、A18 T) は 21 mer DNA と比較して、鎖交換反応速度および相対蛍光強度が低下した。さらに、塩基の欠失/挿入の変異 DNA 鎖 (Del AG, Ins C, Del T) も同様に 21 mer DNA と比較して、鎖交換反応速度および相対蛍光強度の低下が認められた。この結果は、超好熱性アーキア RNase P を構成する 4 種の RNA シャペロンの遺伝子の塩基配列置換検出法への有効利用の可能性を示した。

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 9 件)

1. K. Oshima, X. Gao, S. Hayashi, T. Ueda, T. Nakashima, and M. Kimura, Crystal structure of an archaeal ribonuclease P protein Rpp38 in complex with RNA fragments containing a K-turn motif. *Acta Cryst.* **F74**, 57-64 (2018).
2. D. Jiang, K. Izumi, T. Ueda, K. Oshima, T. Nakashima, and M. Kimura, Functional characterization of archaeal homologues of a human nuclear RNase P proteins Rpp21 and Rpp29 provides insights into the molecular basis of their cooperativity in catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**, 68-74 (2017).
3. X. Gao, K. Oshima, T. Ueda, T. Nakashima, and M. Kimura, A three-dimensional model of RNase P of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 1063-1068 (2017).
4. M. Kimura, Structural basis for activation of an archaeal ribonuclease P RNA by protein cofactors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1670-1680 (2017).
5. M. Hamasaki, K. Hazeyama, F. Iwasaki, T. Ueda, T. Nakashima, Y. Kakuta, and M. Kimura, Functional implication of the heterotetrameric formation of archaeal homologues of human RNase P protein pairs Pop5 with Rpp30. *J. Biochem.*, **159**, 31-40 (2016).
6. K. Oshima, Y. Kakiuchi, Y. Tanaka, T. Ueda, T. Nakashima, M. Kimura, and M. Yao, Structural basis for recognition of a kink-turn motif by an archaeal homologue of human RNase P protein Rpp38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **474**, 541-546 (2016).
7. K. Suematsu, T. Ueda, T. Nakashima, Y. Kakuta, and M. Kimura, On archaeal homologs of the human RNase P proteins Pop5 and Rpp30 in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 6, 952-959 (2015).
8. M. Miyanoshita, T. Nakashima, Y. Kakuta and M. Kimura, Archaeal ribonuclease P proteins are potential for biotechnological application where a precise hybridization of nucleic acids is needed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 2014-2017 (2015).
9. T. Ueda, S. Ishino, K. Suematsu, T. Nakashima, Y. Kakuta, Y. Ishino, and M. Kimura, Mutation of the gene encoding the ribonuclease P RNA in the hyperthermophilic archaeon

Thermococcus kodakarensis causes decreased growth rate and impaired processing of tRNA precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 468, 660-665 (2015).

〔学会発表〕(計 1件)

1. 木村誠、核酸結合タンパク質の構造機能相関と機能開発、日本農芸化学会 2017 年度京都大会、2017 年 3 月 17 日~3 月 20 日、ウエスティン都ホテル京都および京都女子大学

〔図書〕(計 3件)

1. 木村誠、タンパク質研究の変化に呼応して。化学と生物, 53, 1(巻頭言)(2015).
2. 木村誠、アーキアの転写後修飾・RNA プロセッシング、アーキアの生物学、(日本アーキア研究会監修、石野良純、跡見晴幸 編)、共立出版、pp. 107-113 (2017) .
3. M. Kimura, K. Oshima, X. Gao, D. Jiang, T. Nakashima, and T. Ueda, Structure and function of archaeal ribonuclease P. *In Nucleic Acids and Molecular Biology Vol. 32, RNA Metabolism and Gene Expression in Archaea*, B. Clouet-d'Orval (Eds) Springer Nature, pp. 159-175 (2017).
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-65795-0_7

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

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

中島 崇 (NAKASHIMA Takashi)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：20380553

(3)連携研究者

真柳 浩太 (MAYANAGI Kota)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：50418571

(4)研究協力者

なし