

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380060

研究課題名（和文）リボ核タンパク質複合体酵素の作用機構に関する研究

研究課題名（英文）Study on the mechanism of the ribonucleoprotein complex

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

研究成果の概要（和文）：超好熱古細菌（*Pyrococcus horikoshii*）RNase P は、触媒活性を持つ RNA（*PhopRNA*）と 5 種のタンパク質（*PhoPop5*, *PhoRpp21*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38*）から構成されている。本研究では、タンパク質複合体（*PhoRpp21-PhoRpp29*）の結晶構造を決定した。さらに、タンパク質と *PhopRNA* の相互作用部位を生化学的手法により検討するとともに、タンパク質による *PhopRNA* の構造変化を円二色性（CD）および紫外（UV）吸収スペクトルにより検討した。

研究成果の概要（英文）：Ribonuclease P (RNase P) is composed of a catalytic RNA (*PhopRNA*) and five proteins (*PhoPop5*, *PhoRpp21*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38*). In this study, we determined the crystal structure of the protein complex composed of *PhoRpp21* and *PhoRpp29*. Furthermore, we examined the protein binding sites on *PhopRNA* by biochemical methods and analyzed the activated structure of RNase P RNA (*PhopRNA*) in *Pyrococcus horikoshii* OT3 was characterized by circular dichroism (CD) and ultraviolet (UV) absorbance spectra.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は全生物種に存在する前駆体 tRNA (pre-tRNA) の 5'-末端プロ

セシング酵素であるが、そのサブユニット構成は進化系統間で著しく異なっている。即ち、真正細菌のそれは触媒活性を持つ 1 分子の RNA と 1

分子のタンパク質からなるのに対し、古細菌や真核生物のそれは1分子のRNAと複数のタンパク質からなっている。既に、大腸菌 RNase P に関する研究から、RNase P RNA(M1 RNA)は触媒活性に関与するCドメインと、基質との相互作用に関与するSドメインからなり、タンパク質C5はCドメインと相互作用する補因子であることが明らかにしたが、*Phap*RNA のタンパク質による活性化機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質複合体の結晶構造を決定するとともに、*Phap*RNA のタンパク質による活性化機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

タンパク質複合体の結晶を蒸気拡散法により調製した。さらに、タンパク質との相互作用による *Phap*RNA の構造変化を円二色性 (CD) および紫外 (UV) 吸収スペクトルにより検討した。

4. 研究成果

大腸菌 RNase P RNA (M1 RNA) に、5種の超好熱古細菌 (*Pyrococcus horikoshii*) RNase P タンパク質を添加し、5 mM Mg²⁺存在下、pre-tRNA 切断活性の有無を検討したところ、いずれのタンパク質も M1 RNA を活性化しなかった。一方、50 mM Mg²⁺存在下で大腸菌タンパク質 C5 を古細菌タンパク質とともに古細菌 RNase P RNA (*Phap*RNA) に添加し、C5 の *Phap*RNA への影響を検討した結果、C5 タンパク質も古細菌 *Phap*RNA を活性化しなかった。続いて、M1 RNA の S および C ドメインと、*Phap*RNA の S および C ドメインを相互に入れ替え、各タンパク質の存在下、酵素活性の有無を 10 mM および 50 mM Mg²⁺存在下で検討した。その結果、M1 RNA の S ドメインと *Phap*RNA の C ドメインからなる RNA は、古細菌タンパク質 *Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 の存在下で酵素活性を示した。一方、M1 RNA の C ドメインと *Phap*RNA の S ドメインからなる RNA では、タンパク質 C5 と古細菌タンパク質 *Pho*Rpp21、*Pho*Rpp29 の存在下で活性を示した。以上の結果より、古細菌タンパク質 *Pho*Pop5 と *Pho*Rpp30 は *Phap*RNA の C ドメインの活性化に関与し、*Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 は *Phap*RNA 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。

次に、*Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 の複合体の結晶構造を分解能 2.2 Å で決定した。その結果、*Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 はヘテロ二量体を形成し、*Pho*Rpp21 の N 末端側の 2 本の α -ヘリックス ($\alpha 1$ と $\alpha 2$) と、*Pho*Rpp29 の N 末端領域、中央領域 (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。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、*Pho*Rpp21 と *Pho*Rpp29 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。また、複合体の表面電荷を計算したところ、複合体形成により特定部位に正電荷を帯びた面が創られ、この面が RNA (pRNA、pre-tRNA) との相互作用部位であることが示唆された。以上の結果を踏まえ、*Pho*RNase P ホロ酵素の全体構造を推定した。

続いて、*Pho*Rpp38 を除く 4 種のタンパク質を *Phap*RNA に加えると、*Phap*RNA の CD スペクトルのピーク (265 nm) の楕円率は減少し、UV スペクトルのピーク (260 nm) の吸収は増加した。次に、*Pho*Rpp38 を含む 5 種のタンパク質を *Phap*RNA に加えると、*Phap*RNA の CD スペクトルのピークの楕円率は増加し、UV 吸収スペクトルのピークは減少した。この結果より、4 種のタンパク質 (*Pho*Pop5、*Pho*Rpp21、*Pho*Rpp29、*Pho*Rpp30) は、*Phap*RNA の塩基対を解くことにより *Phap*RNA を活性型構造へと導く RNA シャペロンとして機能していること、5 番目のタンパク質 (*Pho*Rpp38) は *Phap*RNA の塩基対を増加させることにより、*Phap*RNA の耐熱性構造を形成していることが示唆された。

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 16 件)

- A. Terada, T. Honda, and M. Kimura, Identification of nucleotide residues essential for RNase P activity from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有、71, 2007, 1940-1945
- K. Yamamoto, M. Kimura, Y. Aso, Y.

- Banno, and K. Koga. Characterization of superoxide dismutase from the fall webworm, *Hyphantria cunea*: comparison of its properties to superoxide dismutase from the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Entomol. Zool.* 査読有、42, 2007, 465-472
- X. Zhang, T. Nakashima, Y. Kakuta, M. Yao, I. Tanaka, and M. Kimura, Crystal structure of an archaeal Ski2p-like protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Protein Sci.* 査読有、2008, 17, 136-45
- K. Hada, T. Nakashima, T. Osawa, H. Shimada, Y. Kakuta, and M. Kimura, Crystal structure and functional analysis of an archaeal chromatin Alba from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有、72, 2008, 749-758
- J. Noguchi, Y. Hayashi, Y. Baba, N. Okino, M. Kimura, M. Ito, and Y. Kakuta, Crystal structure of the covalent intermediate of human cytosolic β -glucosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、374, 2008, 549-552
- N.T. Vu, H. Shimada, Y. Kakuta, T. Nakashima, H. Ida, T. Omori, A. Nishi, H. Satoh, and M. Kimura, Biochemical and crystallographic characterization of the starch branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有、72, 2008, 2858-2866
- T. Honda, Y. Kakuta, K. Kimura, J. Saho, and M. Kimura, Structure of an archaeal homolog of the human protein complex Rpp21-Rpp29 that is a key core component for the assembly of active ribonuclease P. *J. Mol. Biol.* 査読有、384, 2008, 652-662
- K. Doi-Kawano, E. Nishimoto, Y. Kouzuma, D. Takahashi, S. Yamashita, and M. Kimura, Steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopic studies on interaction of the N-terminal region with the hairpin loop of the phytocystatin Scb. *J. Fluoresc.*, 査読有、19, 2009, 631-639
- T. Osawa, N. Sugiura, H. Shimada, R. Hirooka, A. Tsuji, T. Shirakawa, K. Fukuyama, M. Kimura, K. Kimata, and Y. Kakuta, Crystal structure of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* K4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、378, 2009, 10-14
- T. Teramoto, Y. Sakakibara, M-C. Liu, M. Suiko, M. Kimura, and Y. Kakuta, Structural basis for the broad range substrate specificity of a novel mouse cytosolic sulfotransferase-mSULT1D1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、379, 2009, 76-80
- K. Yamamoto, Y. Shigeoka, Y. Aso, Y. Banno, M. Kimura, and T. Nakashima, Molecular and biochemical characterization of a zeta-class glutathione S-transferase of the silkworm. *Pest. Biochem. Physiol.* 査読有、94, 2009, 30-35
- T. Teramoto, Y. Sakakibara, M-C. Liu, M. Suiko, M. Kimura, and Y. Kakuta, Snapshot of a Michaelis complex in a sulfuryl transfer reaction: crystal structure of a mouse sulfotransferase, mSULT1D1, complexed with donor substrate and acceptor substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、383, 2009, 83-87
- T. Akasaka, N.T. Vu, K. Chaen, A. Nishi, H. Satoh, H. Ida, T. Omori, and M. Kimura,

The action of rice branching enzyme I (BEI) on starch. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有、73, 2009, 2516-2518

C. Kikutake, M. Shinohara, H. Takagi, T. Nakashima, and M. Kimura, The C-terminal portion of an archaeal toxin aRelE plays a crucial role in protein synthesis inhibition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、73, 2009, 2766-2768

T. Honda, T. Hara, J. Nan, X. Zhang, and M. Kimura, Archaeal homologs of human RNase P protein pairs Pop5 with Rpp30 and Rpp21 with Rpp29 word on distinct functional domains of the RNA subunit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、74, 2010, 266-273

S. Kosaka, K. Hada, T. Nakashima, and M. Kimura, Structural changes in ribonuclease P in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3 induced on interaction with proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、74, 2010, 394-396

〔学会発表〕(計10件)

本田貴史、角田佳充、木村誠、リボヌクレアーゼPタンパク質 Rpp21 と Rpp29 の複合体形成が触媒活性に重要である、平成20年12月4日、日本生物物理学会(福岡国際会議場)

今村悠佑、郭巾旭、木村誠、大腸菌トキシン・アンチトキシン (RelE-RelB) 複合体の調製とその性質、平成21年3月27日、日本農芸化学会(福岡国際会議場)

閻思遠、原田実季、張小冬、木村誠、超高温古細菌 *Pyrococcus horikoshii* Ski2p 様タンパク質の酵素活性について、平成21年3月27日、日本農芸化学会(福岡国際会議場)

原唯史、本田貴史、中尾祐士、木村誠、RNase P タンパク質複合体 Pop5-Rpp30 と Rpp21-Rpp29 はそれぞれ RNase P RNA

の触媒(C)ドメインと特異性(S)ドメインを活性化する、平成21年10月31日、日本農芸化学会西日本、中四国、関西支部合同大会(琉球大学)

篠原雅明、菊竹智恵、今村悠佑、森美佐子、中島崇、木村誠、タンパク質合成抑制因子・RelE の C 末端領域の重要性、平成21年10月31日、日本農芸化学会西日本、中四国、関西支部合同大会(琉球大学)

小坂俊介、波田一誠、木村誠、RNase P タンパク質は RNase P RNA を解くことにより活性化する、平成21年10月31日、日本農芸化学会西日本、中四国、関西支部合同大会(琉球大学)

松尾尚紀、角田佳充、木村誠、大腸菌トキシン・アンチトキシン・DinJ-YafQ の生化学的性質と結晶化、平成21年10月31日、日本農芸化学会西日本、中四国、関西支部合同大会(琉球大学)

赤坂泰輝、茶円喜美子、西愛子、佐藤光、井田寛子、大森俊郎、木村誠、イネ澱粉枝作り酵素 I(BEI)の澱粉に対する作用、平成21年10月31日、日本農芸化学会西日本、中四国、関西支部合同大会(琉球大学)

篠原雅明、郭巾旭、森美佐子、中島崇、西本悦子、山下昭二、木村誠、タンパク質合成抑制因子・RelE の C 末端塩基性アミノ酸の役割、平成22年3月29日、日本農芸化学会(東京大学)

小坂俊介、波田一誠、中島崇、木村誠、RNase P タンパク質は RNA シャペロンとして機能する、平成22年3月29日、日本農芸化学会(東京大学)

〔図書〕(計0件)

〔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

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/seibutu/>

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 YOSHIMITSU)

(九州大学・大学院農学研究院・准教授)

研究者番号：0031436

(3) 連携研究者

()

研究者番号：