

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19770083

研究課題名 (和文) RNA 分解酵素とその複合体の構造機能解析による RNA 分解系の研究

研究課題名 (英文) Structural and functional studies on RNases in the RNA degradation system

研究代表者

中川 紀子 (NAKAGAWA NORIKO)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50379278

研究成果の概要 (和文)：遺伝子の発現調節において、mRNA の分解はどの生物でも必須な因子の一つであり、これに異変のある生物は致命的な状態になる危険性がある。mRNA の分解には様々な RNA 切断酵素が働くが、その一つのグループとして $\beta$ -CASP family タンパク質が存在する。本研究では、 $\beta$ -CASP family タンパク質による普遍的な RNA 分解系と、新規な RNA 分解系の解析を行った。

研究成果の概要 (英文)：Degradation of mRNA plays an essential role in regulation of gene expression in all organisms. Defects in this process lead to potentially fatal defects. mRNA degradation is mediated by the concerted action of several ribonucleases including  $\beta$ -CASP family proteins. This study revealed the mechanism of RNA degradation by  $\beta$ -CASP family proteins and found a novel pathway that involves these proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	660,000	3,960,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：RNA, RNA 分解, 酵素反応, 立体構造, トランスクリプトーム解析, 相互作用解析, 高度好熱菌

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現調節において、RNA の分解とプロセッシングは必須な因子の一つである。mRNA の分解を開始する endonuclease として、 $\beta$ -CASP (metallo- $\beta$ -lactamase-associated CPSF Artemis SNM1/PSO2) を利用する生物種が多いが、大腸菌などでよく知られている RNase E を利用する生物種もある (図 1)。 $\beta$ -CASP family タンパク質には、RNA の分解だけでなく、RNA のプロセッシングや DNA の組換え修復にも関与するヌクレアーゼが含まれている。 $\beta$ -CASP family タンパク質は生物界に広く保存されたタンパク質群であるが、反応機構や細胞機能 (註: タンパク質の機能には、*in vitro* における分子物性としての「分子機能」と、タンパク質が存在する細胞内環境において発揮される機能の「細胞内機能」とがある) も不明な点が多かった。

そこで、構成タンパク質が安定であるため、立体構造解析や分子機能解析に適した高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のゲノム情報を探索したところ、2 つの  $\beta$ -CASP family タンパク質が同定された。これら 2 種類の  $\beta$ -CASP family タンパク質である (1) RNase J (TTHA1140) と、(2) 機能未知タンパク質 TTHA0252 の立体構造解析および機能解析を行うとともに、関連するヌクレアーゼの解析も行い、生物に普遍的な RNA 分解サブシステムの解明を目指して研究を行った。

## 2. 研究の目的

### (1) RNase J (TTHA1140)

RNase J は、多くのタンパク質と複合体を形成している可能性があると考え、RNase J の ① RNA 分解複合体を形成するタンパク質の解析、および、② 生体内における細胞内機能の解析を行った。

### (2) 機能未知タンパク質 TTHA0252

$\beta$ -CASP family はそのアミノ酸配列から、さらにいくつかのサブグループに分類されることが知られているが、TTHA0252 が属するサブグループの機能は未知である。そこで、新規 RNA 分解系、および、 $\beta$ -CASP family タンパク質の反応機構解明のため、TTHA0252 の ① 生体内における細胞内機能解析と、② 生化学的機能解析、③ 立体構造解析、④ TTHA0252 の変異体解析などを行った。

## 3. 研究の方法

Bacteria			Archaea		
	$\beta$ -CASP	RNase E		$\beta$ -CASP	RNase E
Actinobacteria	○	x	Euryarchaeota	○	x
Aquificae	△	x	Crenarchaeota	○	x
Bacteroidetes/Chlorobi	△	x			
Chlamydiae/Verrucomicrobia	x	x			
Chloroflexi	x	x			
Cyanobacteria	○	x			
Deinococcus-Thermus	○	x			
Fibrobacteres/Actinobacteria	○	x			
Firmicutes	○	x			
Fusobacteria	○	x			
Nitrospirae	○	x			
Planctomycetes	○	x			
Proteobacteria	○	x			
alpha	○	x			
beta	△	○			
gamma	x	x			
delta	○	x			
epsilon	○	x			
Spirochaetes	x	x			
Thermotogae	○	x			

Eukaryotes		
	$\beta$ -CASP	RNase E
Alveolata	○	x
Euglenozoa	○	x
Fungi/Metazoa group	○	x
Viridiplantae	○	x

○ : 90% 以上の生物種で保存されている  
 △ : 90%~10% の生物種で保存されている  
 x : 10% 以下の生物種で保存されている

図 1.  $\beta$ -CASP ファミリータンパク質と RNase E の分布

### (1) RNase J (TTHA1140)

#### ① 細胞内機能解析

相同組み換えによって、*T. thermophilus* HB8 の RNase J 遺伝子欠損株を作製し、その表現型から、RNase J の細胞内での役割を解析した。

#### ② 相互作用解析

RNase J ウサギ抗体を用い、*T. thermophilus* HB8 の破砕液に対して免疫沈降を行い、RNase J に結合したタンパク質群を質量分析法 (ESI-Q-TOF MS) で同定した。結合したタンパク質を、別途発現精製しておき、表面プラズモン法を利用して、*in vitro* で相互作用の定量的解析を行った。

### (2) 機能未知タンパク質 TTHA0252

#### ① 細胞内機能解析

相同組み換えによって、*T. thermophilus* HB8 の TTHA0252 遺伝子欠損株を作製し、その表現型から、TTHA0252 の細胞内での役割を解析した。

#### ② 生化学的機能解析

TTHA0252 を、大腸菌で組換えタンパク質として発現させ、精製を行った。これを用いて、RI で放射標識した様々なオリゴヌクレオチドに対する活性を調べた。

#### ③ 立体構造学解析

TTHA0252 タンパク質を結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。さらに、RNA アナログを用いて基質複合体の構造解析を行った。

#### ④ TTHA0252 の変異型酵素の解析

TTHA0252 タンパク質の立体構造解析結果から活性部位に存在するアミノ酸残基が推定できたので、それらのアミノ酸を置換した変異型酵素を作製した。これらを用いて、オリゴヌクレオチドに対する活性測定と立体構造解析を行った。それら変異型酵素の結果と野生型酵素の結果とを比較することによって、TTHA0252 の酵素反応機構が明らかになった。

#### 4. 研究成果

##### (1) RNase J (TTHA1140)

###### ① 相互作用解析

免疫沈降法で数種類のタンパク質が結合することが明らかになった。それによって、*in vivo*において、RNase Jが複数のタンパク質と相互作用している可能性が示された。それらタンパク質の中には、RNA degradosomeを構成すると期待されたRNaseも含まれていた。それらタンパク質間の相互作用は、単一精製したタンパク質とRNase Jとの、*in vitro*での相互作用解析でも確認された。

###### ② 細胞内機能解析

TTHA1140 遺伝子欠損株作製の過程から、必須遺伝子であることが示唆された。この結果は、TTHA1140が*T. thermophilus* HB8において必須で、重要な役割を果たしていることを示している。

以上の研究結果より、高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 を含む多くのバクテリア間に、RNA分解を行うRNA degradosome複合体が普遍的に存在することが示唆された。

##### (2) 機能未知タンパク質 TTHA0252

###### ① 細胞学機能解析

TTHA0252 遺伝子欠損株の mRNA をゲノム全体で解析するトランスクリプトーム解析を行ったところ、野生株と大きな変化は見られなかったが、cold shock protein の mRNA には増加がみられた。

###### ② 生化学的機能解析

TTHA0252 は様々なオリゴヌクレオチドに対して 5'→3' exonuclease 活性と endonuclease 活性を示した。また、TTHA0252 は DNA よりも RNA をより効率的に分解し、2本鎖の核酸より1本鎖の核酸基質に対して強い活性を示した。

###### ③ 立体構造学的解析

TTHA0252 の X線結晶解析を行い、β-CASP family のタンパク質としては初めて、立体構造を明らかにした(図2)。それにより、活性部位に存在するアミノ酸残基が明らかになり、酵素反応機構を解析するための重要な手がかりが得られた。

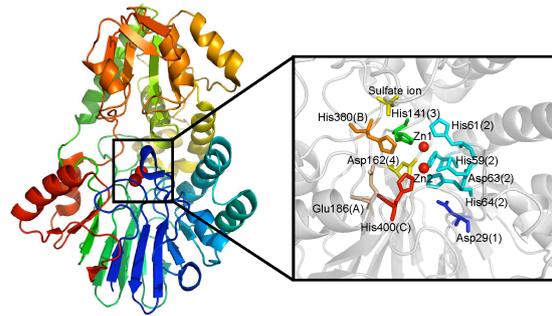


図 2. TTHA0252 の立体構造と活性部位

###### ④ TTHA0252 の変異型酵素の解析

立体構造解析から得られた情報をもとにして、活性部位に存在する5つのアミノ酸残基を置換した変異型酵素を作製し、それぞれの酵素の活性測定と立体構造解析を行った。その結果、触媒残基の同定することが可能になり、活性部位に存在する亜鉛イオンの役割も明らかになった。

さらに、触媒基を変異したことによって酵素活性がほとんど無くなった変異型酵素を大腸菌体内で発現させて精製し、結晶化して立体構造を解析したところ、大腸菌由来のRNAと結合していることがわかった。その結果から、TTHA0252の基質はRNAであることが示唆された。そこで、合成オリゴヌクレオチドを用いた*in vitro*での実験で、RNAに対する基質特異性を確認した。

さらに、TTHA0252とRNAアナログとの複合体の構造解析にも成功した(図3)。この立体構造から、TTHA0252がDNAとRNAを区別する機構と、5'→3' exonuclease 活性を示す酵素反応機構が明らかになった。

以上の研究結果より、生物界に普遍的なRNaseであるβ-CASP familyタンパク質の触媒反応機構が明らかになり、RNA分解サブシステムの解明に向けて、大きな手がかりが得られた。

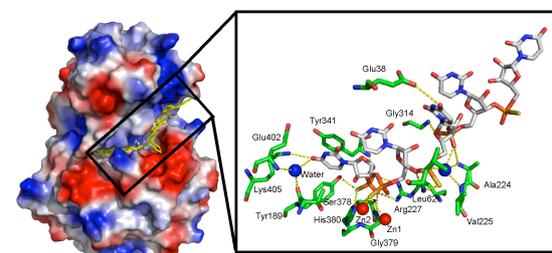


図 3. TTHA0252 と RNA アナログの複合体立体構造と基質結合部位

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 14 件)

- ① Nishida, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Crystal Structure of An Archaeal Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor Subunit from *Pyrococcus horikoshii*, *Proteins*, 査読あり, 2010, in press
  - ② Shimada, A., Masui, R., Nakagawa, N., Takahata, Y., Kim, K., Kuramitsu, S., and Fukui, K., A Novel Single-Stranded DNA-Specific 3'-5' Exonuclease, *Thermus thermophilus* Exonuclease I, Is Involved in Several DNA Repair Pathways, *Nucleic Acids Res.*, 査読あり, 2010, in press
  - ③ Shimada, A., Ishikawa, H., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., The First Crystal Structure of An Archaeal Metallo-beta-Lactamase Superfamily Protein; ST1585 from *Sulfolobus tokodai*, *Proteins*, 査読あり, 2010, in press
  - ④ Wakamatsu, T., Kitamura, Y., Kotera, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Structure of RecJ Exonuclease Defines Its Specificity for Single-Stranded DNA, *J. Biol. Chem.*, 査読あり, Vol.285, No.13, 2010, pp.9762-9769
  - ⑤ Nakane, S., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Characterization of DNA Polymerase X from *Thermus thermophilus* HB8 Reveals the POLXc and PHP Domains are both Required for 3'-5' Exonuclease Activity, *Nucleic Acids Res.*, 査読あり, Vol.37, No.6, 2009, pp.2037-2052
  - ⑥ Yamamura, A., Okada, A., Kameda, Y., Ohtsuka, J., Nakagawa, N., Ebihara, A., Nagata, K., and Tanokura, M., Structure of TTHA1623, A Novel Metallo-beta-lactamase Superfamily protein from *Thermus thermophilus* HB8, *Acta Cryst.*, 査読あり, Vol.F65, No.5, 2009, pp.455-459
  - ⑦ Kondo, N., Nishikubo, T., Wakamatsu, T., Ishikawa, H., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Insights into Different Dependence of dNTP Triphosphohydrolase on Metal Ion Species from Intracellular Ion Concentrations in *Thermus thermophilus*, *Extremophiles*, 査読あり, Vol.12, No.2, 2008, pp.217-223
  - ⑧ Yamamura, A., Ohtsuka, J., Kubota, K., Agari, Y., Ebihara, A., Nakagawa, N., Nagata, K., and Tanokura, M., Crystal Structure of TTHA1429, A Novel Metallo-beta-lactamase Superfamily Protein from *Thermus thermophilus* HB8, *Proteins*, 査読あり, Vol.73, No.4, 2008, pp.1953-1057
  - ⑨ Fukui, K., Nishida, M., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S., Bound Nucleotide Controls the Endonuclease Activity of Mismatch Repair Enzyme MutL, *J. Biol. Chem.*, 査読あり, Vol.283, No.18, 2008, pp.12136-12145
  - ⑩ Morita, R., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., An O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase-Like Protein from *Thermus thermophilus* Interacts with A Nucleotide Excision Repair Protein, *J. Biochem.*, 査読あり, Vol.144, No.2, 2008, pp.267-277
  - ⑪ Morita, R., Ishikawa, H., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Crystal Structure of a Putative DNA Methylase TTHA0409 from *Thermus thermophilus* HB8, *Proteins*, 査読あり, Vol.73, No.1, 2008, pp.259-264
  - ⑫ Fukui, K., Takahata, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Analysis of a Nuclease Activity of Catalytic Domain of *Thermus thermophilus* MutS2 by High-Accuracy Mass Spectrometry, *Nucleic Acids Res.*, 査読あり, Vol.35, No.15, 2007, e100
  - ⑬ Kosaka, H., Hoseki, J., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R., Crystal Structure of Family 5 Uracil-DNA Glycosylase Bound to DNA, *J. Mol. Biol.*, 査読あり, Vol.373, No.4, 2007, pp.839-850
  - ⑭ Hori, M., Ishiguro, C., Suzuki, T., Nakagawa, N., Nunoshiba, T., Kuramitsu, S., Yamamoto, K., Kasai, H., Harashima, H., and Kamiya, H., UvrA and UvrB Enhance Mutations Induced by Oxidized Deoxyribonucleotides, *DNA Repair*, 査読あり, Vol.6, No.12, 2007, pp.1786-1793
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 大山礼雅, 石川大仁, 中川紀子, 増井良治, 倉光成紀, Interaction analysis of a

novel ribonuclease from *Thermus thermophilus* HB8, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 12 日, 横浜

- ② 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural and functional analysis of TTHA0252, a novel RNase of the beta-CASP family, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸
- ③ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural and functional analysis of TTHA0252, a novel RNase of the beta-CASP family, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009 年 5 月 20 日, 熊本
- ④ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural and functional analysis of TTHA0252, a novel RNase of the beta-CASP family, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 2008 年 12 月 12 日, 神戸
- ⑤ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural Analysis of the Beta-CASP Family, A New Member of the Metallo-beta-lactamase Superfamily, ISGO International Conference On Structural Genomics Oxford 2008 (ICSG2008), 2008 年 9 月 20-21 日, イギリス・オックスフォード
- ⑥ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural and functional analysis of TTHA0252, a novel RNase of the beta-CASP family, XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008), 2008 年 8 月 28-29 日, 大阪
- ⑦ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural and functional analysis of TTHA0252, a novel RNase of the beta-CASP family, 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 3P-037, 2008 年 6 月 12 日, 東京
- ⑧ 石川大仁, 若松泰介, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, *Thermus thermophilus* を用いた生物界に普遍的な新規 RNA 分解系の探求, 第 2 回日本ゲノム微生物学会年会, 2008 年 3 月 6-8 日, 大阪
- ⑨ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Functional identification of protein from *Thermus thermophilus* HB8: Structural and functional analysis of TTHA0252, a novel RNase of the beta-CASP family, 第 30 回日

本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007), 2007 年 12 月 11 日, 横浜

- ⑩ 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治, Structural and functional analysis of TTHA0252 from *Thermus thermophilus* HB8, a novel RNase of the beta-CASP family, 第 7 回日本蛋白質科学会年会, 2007 年 5 月 26 日, 仙台

〔図書〕(計 2 件)

- ① 中川紀子, 増井良治, 倉光成紀, 他, 朝倉書店, 酵素ハンドブック, 2008
- ② 中川紀子, 他, 共立出版, 構造生物学—ポストゲノム時代のタンパク質研究—, 2007, 25-33

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_web/lab\\_page/kuramitu/](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/kuramitu/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 紀子 (NAKAGAWA NORIKO)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50379278