

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06032

研究課題名（和文）エンザイム型RNase P（PRORP）によるtRNA成熟化反応の構造基盤解明

研究課題名（英文）Cryo-EM structure of minimal protein-only RNase P, HARP reveals structural insights into precursor tRNA recognition and catalysis

研究代表者

寺本 岳大（Teramoto, Takamasa）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：80868993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生命は進化によって、様々な機能を持つ酵素を生み出してきた。その中でも、リボヌクレアーゼP（RNase P）は、前駆体tRNAから5'側の余剰配列を切断する。このRNase Pは、核酸であるRNA分子が触媒活性を持つRNA型とタンパク質が触媒活性を持つタンパク質型が存在し、全く同じ酵素反応を担っている。従って、この二種類のRNase Pを比較することで、酵素の多様性と分子進化を考察できる。そこで、本研究計画は、その詳細な比較に必須なタンパク質型RNase PのひとつであるHARPの立体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析によって決定し、その反応機構の構造基盤を原子レベルで解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、酵素の多様性とダイナミックな分子進化を考察することができた。タンパク質とRNAというまったく異なる分子種が、同じ基質（pre-tRNA）を認識するために、原子レベルで類似の基質認識機構を持つことに至った収斂（しゅうれん）進化の例を提供した。RNase Pは、同一の触媒反応をするにもかかわらずさまざまな形態の酵素が存在し、酵素の多様性とダイナミックな分子進化を示している非常に興味深い酵素である。RNase Pの構造学的知見により、「RNAワールド仮説」を考える上で、どのようにRNAの役割がタンパク質へ移行したのか、タンパク質が機能を持つための生命の戦略も考察できるであろう。

研究成果の概要（英文）：Life has generated various enzymes with different functions through evolution. Among them, Ribonuclease P (RNase P) enzymes cleave the 5'-leader region of precursor tRNAs. RNase P exists in two distinct forms: one with RNA molecules catalyzing the reaction and another with protein molecules catalyzing it. Despite this difference, both types carry out the same enzymatic reaction. Therefore, comparison of the two reaction mechanisms of RNase P is highly suitable for studying enzyme diversity and molecular evolution. Thus, we determined the three-dimensional structure of HARP, a protein-type RNase P found in bacteria and archaea, using cryogenic electron microscopy single particle analysis, and elucidate the structural basis of the reaction mechanism of protein-type RNase P at the atomic level.

研究分野：構造生物学

キーワード：リボヌクレアーゼP tRNAプロセシング酵素 クライオ電子顕微鏡単粒子解析 収斂進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移 RNA (tRNA) は、タンパク質翻訳に関わる生命に必須のノンコーディング RNA である。tRNA は、前駆体 tRNA (pre-tRNA) から様々な成熟化過程を経て、最終的な成熟 tRNA となる。正確な成熟化過程は、tRNA の機能に必須である。リボヌクレアーゼ P (RNase P) は、この tRNA 成熟化に関わる生命に必須の触媒分子である。その触媒反応は、pre-tRNA から 5'側の余剰配列を切断する反応である。この RNase P は、「RNA」が触媒機能をもつリボザイムであるという発見以来(Guerrier-Takada C, et al. Cell. 1983.)、長らくリボザイムである RNA 型 RNase P のみ存在すると考えられてきた。しかし、2010 年に「タンパク質」からなるタンパク質型 RNase P (Protein-only RNase P: PRORP) が発見された(Gobert A, et al. Nat Struct Mol Biol. 2010.)。その後 PRORP とは異なるタイプのタンパク質型 RNase P である HARP が同定された。このタンパク質は、アミノ酸配列上、ヌクレアーゼドメインのみと考えられた約 23 kDa の RNase P としては最小サイズの酵素である。これらの発見により、天然に存在する同じ基質に対して同一反応を触媒するリボザイムとエンザイムの比較が可能になった。そこで、酵素反応機構において、タンパク質型と RNA 型 RNase P との類似点と相違点を解明することによって、RNase P の多様性とダイナミックな分子進化を考察できると考えた。

この分子進化を考察するための一つの方法として、酵素反応機構の構造基盤の比較が挙げられる。現在までに、RNA 型の構造解析は、基質 pre-tRNA との複合体構造解析が数多くなされており(Reiter NJ, et al. Nature. 2010., Wu J, et al. Cell. 2018., Lin P, et al. Science. 2018.)、その反応機構の構造基盤の詳細が解明されている。さらに 2 種類あるタンパク質型 RNase P (PRORP と HARP) のうち、PRORP においては、その酵素単独の構造解析によって、触媒中心をもつ Nuclease ドメインに加えて、pre-tRNA 認識を担う PPR ドメインなどが融合した 3 ドメイン構造であることが分かっている(Howard MJ, et al. PNAS. 2012.)。更に、申請者らによって、PRORP の一部 (PPR ドメイン) と tRNA との複合体構造が決定され(Teramoto, T. et al. Nucleic Acids Res. 2020.)、PPR ドメインが tRNA 特有の高次構造領域 (エルボー領域) を構造特異的に認識することが解明されている。一方で、細菌・古細菌のもつタンパク質型 RNase P は、真核生物のもつタンパク質型 RNase P よりも小さいサイズであり、その基質認識や反応機構は未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、X 線結晶構造解析またはクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 単粒子解析によるタンパク質型 RNase P の一つである HARP の構造情報の取得により、HARP の反応機構の詳細な構造基盤を解明する。この決定した構造基盤から、RNA 型 RNase P やもう一つのタンパク質型 RNase P である PRORP と比較することで、酵素の多様性とダイナミックな分子進化に関するユニークな知見を得ることができると期待できる。さらに「RNA ワールド仮説」で提唱されている、原始の RNA ワールドから現在のタンパク質ワールドへの移行の構造的要因を捉え、タンパク質が生命現象を担う中心分子に成り得た要因解明に繋がることも期待される。

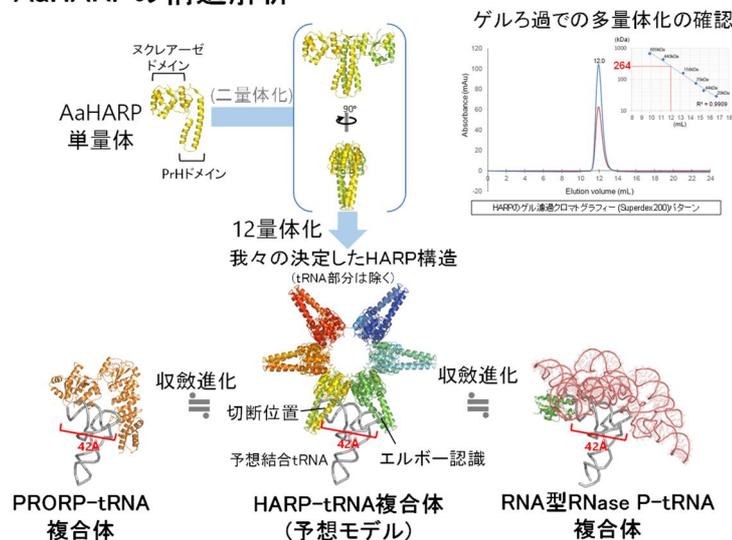
3. 研究の方法

本申請研究では、タンパク質型 RNase P の一つである HARP の構造と機能の全容を、Cryo-EM 単粒子解析、生化学的解析などにより解明した。

4. 研究成果

超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の HARP (AaHARP) をターゲットにした我々の行った構造解析から、AaHARP は、アミノ酸配列から予想できなかったヌクレアーゼドメインから突出した2つの α -helix の存在を明らかにした。この領域を Protruding Helices (PrH) ドメインと命名している。AaHARP 単量体は、PrH ドメインを介して二量体を形成し、さらに六つの二量体が、左巻きのらせん構造を持つユニークな六つの角が突き出た六芒星形(☆)の12量体を形成していた(図)。この12量体形成は、HARP ファミリー共通の特徴であると考えられる。pre-tRNA のドッキングモデルにより、HARP の pre-tRNA の特異的切断は、12量体中の隣接する二つの二量体によって達成されると予想した。一つの二量体が切断触媒を担い、もう一方の二量体の PrH ドメインが pre-tRNA のエルボー認識を担っていると考えられた。これらのことは、HARP も PRORP や RNA 型 RNase P と同様に tRNA 特有のエルボー領域から 5' 切断位置までの距離を測る“分子ものさし”として働き、機能していることを示唆している(図)。我々の AaHARP の構造解析によって、PRORP はヌクレアーゼドメインに tRNA エルボー認識モジュールとして PPR ドメインを融合することによって、HARP は多量体化することによって、巨大な RNA 型 RNase P と同じように分子ものさしとして働き、pre-tRNA の特異的切断を達成していることが明らかになった(図)。これらのことは、タンパク質と RNA というまったく異なる分子種が、同じ基質 (pre-tRNA) を認識するために、原子レベルで類似の基質認識機構を持つことに至った収斂(しゅうれん)進化の例と考えられる(図)。

図 AaHARPの構造解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Teramoto Takasasa, Koyasu Takeshi, Adachi Naruhiko, Kawasaki Masato, Moriya Toshio, Numata Tomoyuki, Senda Toshiya, Kakuta Yoshimitsu	4. 巻 297
2. 論文標題 Minimal protein-only RNase P structure reveals insights into tRNA precursor recognition and catalysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101028 ~ 101028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 寺本 岳大、児安 剛志、角田 佳充	4. 巻 93
2. 論文標題 リボヌクレアーゼP (RNase P) の多様性とその構造基盤	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 857 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930857	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺本岳大
2. 発表標題 エンザイム型リボヌクレアーゼPの構造解析
3. 学会等名 第44回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺本岳大, 児安剛志, 角田佳充, Traci MT Hall
2. 発表標題 tRNA 成熟化に関わるPRORP の基質認識機構の解明
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児安剛志, 寺本岳大, 西本悦子, 角田佳充
2. 発表標題 tRNA 成熟化に関わる単細胞藻 <i>Ostreococcus tauri</i> PRORPのX線結晶構造解析
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児安剛志, 寺本岳大, 安達成彦, 川崎政人, 守屋俊夫, 沼田倫征, 千田俊哉, 角田佳充
2. 発表標題 細菌の持つ最小タンパク質型RNase Pのクライオ電子顕微鏡解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺本岳大
2. 発表標題 エンザイム型リボヌクレアーゼPの構造解析
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会西日本支部例会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺本岳大, 児安剛志, 横川隆志, 安達成彦, 真柳浩太, 千田俊哉, 角田佳充
2. 発表標題 細菌のもつ最小タンパク質型リボヌクレアーゼPの構造解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺本岳大
2. 発表標題 多量体化によるタンパク質型リボヌクレアーゼPの機能獲得と分子進化
3. 学会等名 第48回 生命の起原および進化学会学術講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RNAからタンパク質へ機能の移行 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/647

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------