

Structural basis for the RNA activation by
ribonuclease P protein Rpp38 in the
hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus
horikoshii* OT3

大嶋, 浩介

<https://hdl.handle.net/2324/1654960>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 大嶋 浩介

論文題目 : Structural basis for the RNA activation by ribonuclease P protein Rpp38
in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3
(超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3 リボヌクレアーゼ P 構成
タンパク質 *PhoRpp38* の RNA 活性化における構造基盤)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA (pre-tRNA) の 5' 末端余剰配列を切断するリボザイムで、真正細菌、アーキア、真核生物の全ての進化系統ドメインに存在するエンドヌクレアーゼである。超好熱性アーキア (*Pyrococcus horikoshii*) OT3 RNase P は、RNA (*PhopRNA*) と 5 種のタンパク質 (*PhoPop5*、*PhoRpp21*、*PhoRpp29*、*PhoRpp30*、*PhoRpp38*) から構成され、*PhopRNA* のみでは触媒活性を示さず、タンパク質と相互作用することによりその触媒活性が活性化される。*PhoRpp38* は rRNA によく見られる K-ターン (kink-turn) モチーフを認識するリボソームタンパク質 L7Ae ファミリーの RNA 結合タンパク質に分類され、これまでの生化学的研究より、*PhopRNA* の 2 本のステムループ構造 (SL12 と SL16) に結合し、最適反応温度の上昇に関与している事が推定されている。本研究では、*PhoRpp38* による超好熱性アーキア RNase P の構造安定化機構の構造基盤について検討した。

まず、*PhoRpp38* と *PhopRNA* の相互作用を等温滴定カロリーメトリー (ITC) により検討した。この測定では、*PhoRpp38* 溶液をセルに入れ、*PhopRNA* 溶液を滴下することにより *PhoRpp38* と *PhopRNA* の相互作用を 40°C で測定した。その結果、*PhoRpp38* と *PhopRNA* の結合は RNA の塩基間スタッキング増加の際に見られるエンタルピー駆動で、結合定数 (K_a) は $1.56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、結合比は 1:1 であった。続いて、*PhopRNA* の SL12 もしくは SL16 を欠失した変異体 (ΔSL12 と ΔSL16)、および SL12 断片と SL16 断片を調製し、それらの *PhoRpp38* への結合を ITC により測定した。この結果より、*PhoRpp38* は *PhopRNA* の両ステムループ構造 (SL12 と SL16) とほぼ同程度の親和性で結合することが分かり、*PhoRpp38* は SL12 と SL16 に対する 2 つの結合部位を持つことが示唆された。

次に、*PhoRpp38* による *PhopRNA* の活性化機構を構造学的観点から解明するために、*PhopRNA* 全長及び SL12 を含む RNA 断片を複数作成し結晶化したところ、SL12 の断片 (U131-A182) と *PhoRpp38* 複合体において複数の結晶が得られた。この RNA をもとに複数の変異体を作成し結晶化および結晶化条件の最適化を行ったところ、SL12 の塩基配列に GAAA テトラループとそのレセプター配列 (11 ヌクレオチド) を導入した変異体 SL12M と *PhoRpp38* 複合体において最も良い結晶が得られた。そこで、*PhoRpp38* の結晶構造および既知の K-ターンの結晶構造をモデルとした分子置換法により、その結晶構造を最大分解能 3.4 Å で決定した。*PhoRpp38*-SL12M 複合体の結晶構造では、L7Ae ファミリータンパク質と同様に、*PhoRpp38* の $\alpha 2$ - $\beta 1$ 領域のアミノ酸 (Asn38、Arg39、Lys42) が SL12M のステム構造 (G20、G22、G33) に相互作用し、 $\beta 4$ - $\alpha 4$ 間ループ領域のアミノ酸 (Ile93、Glu94、Val95) が SL12M のターン構造 (G19、G20、G35) と相互作用していた。そこで、*PhoRpp38* のこれらのアミノ酸残基をアラニンに変異させた 3 種の変異体 (N38A/E39A/K42A、I93A/E94A/V95A および N38A/E39A/K42A/I93A/E94A/V95A) を調製し、それらと SL12 および SL16 との相互作用をゲルシフトアッセイで確認した。その結果、3 種の変異体とも SL12 に対する結合能を消失するとともに、SL16

に対する結合能も低下していた。この結果より、*PhoRpp38* は *PhopRNA* の 2 本のステムループ構造と同時に結合するのではなく、SL12 もしくは SL16 と結合していることが強く示唆された。

最後に、N38A/E39A/K42A を含む再構成酵素の pre-tRNA 切断活性の最適反応温度を検討した結果、この変異体を含む再構成酵素の最適反応温度は野生型 *PhoRpp38* を含む再構成酵素と同様に 75～80℃付近であった。以上の結果から、超好熱性アーキア RNase P の最適反応温度の上昇には、*PhoRpp38* が *PhopRNA* の 2 本のステムループ構造 (SL12 と SL16) に同時に結合することは不要で、少なくともどちらかに結合することにより *PhopRNA* の塩基間スタッキングを増加することにより構造安定化し、超好熱性アーキア RNase P の最適反応温度の上昇をもたらしていることが分かった。