

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			
論文名	Structural basis for the RNA activation by ribonuclease P protein Rpp38 in the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 (超好熱性アーキア <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 リボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 <i>PhoRpp38</i> の RNA 活性化における構造基盤)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	木村 誠
	副査	九州大学	教授	久原 哲
	副査	九州大学	教授	角田 佳充

## 論文審査の結果の要旨

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見出されている。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顕現する。構成タンパク質である *PhoRpp38* は、RNase P の最適活性温度の上昇に関与し、*PhopRNA* の 2 本のステムループ (SL12 と SL16) に結合することが推定されている。本論文は、*PhoRpp38* による超好熱性アーキア RNase P の安定化機構の構造基盤について論じたものである。

まず、*PhoRpp38* と *PhopRNA* の相互作用を等温滴定カロリメトリー (ITC) により検討した。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 ( $\Delta$ SL12 と  $\Delta$ SL16)、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解り、*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、*PhoRpp38* と SL12 断片 (SL12M) 複合体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、*PhoRpp38* の  $\alpha 2$ - $\beta 1$  領域のアミノ酸が SL12M のステム構造に相互作用し、 $\beta 4$ - $\alpha 4$  領域のアミノ酸が SL12M のターン構造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置換した 3 種の変異体を調製し、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により検討した。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、SL12 との結合に関与する *PhoRpp38* のアミノ酸が、SL16 との結合にも関与していることが示唆され、*PhoRpp38* と *PhopRNA* の結合比は 1:1 ではなく、2 分子の *PhoRpp38* がそれぞれ *PhopRNA* の 2 本のステムループ構造に結合することが推定された。このことを確認するために、*PhopRNA* と His-タグ付きの *PhoRpp38* (*PhoRpp38*-His) と His-タグ無しの *PhoRpp38* を混合後、*PhoRpp38*-His を用いたプルダウンアッセイにより検討した。その結果、*PhoRpp38*-His と *PhoRpp38* が検出されたことから、2 分子の *PhoRpp38* がそれぞれ *PhopRNA* の SL12 と SL16 に結合していることが強く示唆された。

最後に、今回の結果とこれまでに報告されている複合体 (*PhopRNA*-*PhoPop5*-*PhoRpp30*) を基に、*PhopRNA*-*PhoPop5*-*PhoRpp30*-*PhoRpp38* の複合体モデルを構築した。この結果、*PhoRpp38* の *PhopRNA* への結合が *PhoPop5*-*PhoRpp30* 複合体の *PhopRNA* への結合を安定化することにより、超好熱性アーキア RNase P の最適活性温度の上昇をもたらしていることが示唆された。

以上要するに、本研究は超好熱性アーキア RNase P 構成タンパク質 *PhoRpp38* をモデルとして、RNA 結合タンパク質の RNA 活性化の構造基盤を明らかにしたものであり、生物化学および構造生物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。