

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 cold shock protein の構造機能解析
Structural and functional analysis of cold shock proteins from *Thermus thermophilus* HB8

妻鹿良亮¹, 宮崎敏子², 新海暁男³, 中川紀子^{2,3}, 増井良治^{2,3}, 倉光成紀^{1,2,3}
 Ryosuke Mega¹, Toshiko Miyazaki², Akeo Shinkai³, Noriko Nakagawa^{2,3}, Ryoji Masui^{2,3},
 Seiki Kuramitsu^{1,2,3}

(¹ 阪大・院生命機能, ² 阪大・院理, ³ 理研・播磨研)

(¹Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ³RIKEN Harima Inst.)

e-mail: xmega@bio.sci.osaka-u.ac.jp

生物には様々な環境の変化 (栄養枯渇、低温、高温、高塩など) に適応するようなシステムが存在する。低温適応もその一つであり、低温環境下に置かれることにより、発現レベルが上昇するタンパク質の一つとして大腸菌由来の cold shock protein A (CspA) が最初に同定された。この CspA のホモログはヒトを含めた真核生物にまで広く分布しており、特にバクテリアでは、大腸菌で 9 種類、枯草菌で 3 種類と、1つの生物種に複数種類のホモログが確認されている (図 1)。これらは共通して RNP1, RNP2 という 2 つの RNA 結合モチーフを持ち、CSP family として分類されている。CSP family タンパク質は総じて RNA および DNA に結合することが知られているが、細胞内での詳細な機能については未だに不明な点が多い。また、相同なアミノ酸配列をもつにもかかわらず、個々の CSP family タンパク質の発現のタイミングは異なり、低温条件下で発現レベルが上昇するものだけでなく、常時発現レベルが一定なものもある。このことはそれぞれの Csp の生体内での役割が異なっていることを示唆しており、低温環境への適応だけでなく、通常の生育条件下でも細胞内で重要な役割を果たしていると考えられる。また、これまでの分子機能研究から、Csp は合成された mRNA の二次構造形成を阻害する RNA chaperone として働き、転写非終結を促進し、オペロンを組む遺伝子群の転写促進に寄与している可能性を示唆する報告もされている。

	RNP1	RNP2	
ttCsp1	1 MQ---KGRVKWFNAEKGYGFIERE-GDTDVVFVHYTAINAKG----	FRTLNEGDIIVTFDVEPGRNGKGQPAVNVTVVEPARR--	73
ttCsp2	1 MN---KGIVKWFNAEKGYGFIQEQE-EGPDVVFVHSAIEADG----	FRTLSEGERVEFEVEPGRNGKGQPAARRVRL-----	68
ecCspA	1 MSGKMTGIVKWFNADKGFIFITPDGSKDVFVHFSAIQNDG----	YKSLDEGQKVSFTIESGA--KGPAAGNVTSL-----	70
ecCspB	1 MSNKMTGLVKWFNADKGFIFISPDGSKDVFVHFSAIQNDN----	YRTLFEQKQVTFSESIGA--KGPAANVITD-----	71
ecCspC	1 MA-KIKGQVWFNFKSGFGFITPADGSKDVFVHFSAIQNGN----	FKTLAEGQNVFEFIEQDQG--KGPAANVNTAI-----	69
ecCspD	1 ME---KGTVKWFNNAKGFIFITPDGSKDVFVHFSAIQNDG----	YRTLKAGQSVQFVHQGP--KGNHASVIVPVEVEAAVA	74
ecCspE	1 MS-KIKGNVWFNFKSGFGFITPDGSKDVFVHFSAIQNTG----	FKTLAEGQVFEFIEITNGA--KGPSAANVIAL-----	69
ecCspF	1 MSRKMTGIVKTFDGGKSGKGLITPSDGRIDVQLHVSALNLRD----	AEIITTLGRVFEFCRINGL--RGPSAANVYLS-----	70
ecCspG	1 MSNKMTGLVKWFNADKGFIFITPDGSKDVFVHFSAIQNSNE----	FRTLNNQKVEFSIEQGG--RGPAANVVTLL-----	70
ecCspH	1 MSRKMTGIVKTFDRKSGKGFITPDGSKDVFVHFSAIQNTG----	AEVLIPGLRVEFCRVNGL--RGPAANVYLS-----	70
ecCspI	1 MSNKMTGLVKWFNPEKGFIFITPDGSKDVFVHFSAIQNDN----	FKTLTENQVEFEFGIENG--KGPAANVHVVAL-----	70
bsCspB	1 ML---EGKVKWFNFKSGFGFIEVEGQD-DVVFVHFSAIQEGG----	FKTLEEGQAVSFEIVEGN--RGPAANVTKEA-----	67
bsCspC	1 ME---QGTVKWFNAEKGFIFIERENG-DVVFVHFSAIQSDG----	FKSLDEGQKVSFDVEQGA--RGQAANVQKA-----	66
bsCspD	1 MQ---NGKVKWFNNEKGFIFIEVEGGD-DVVFVHFSAIQEGD----	YKSLDEGQKVSFEIVEGN--RGPAANVVKL-----	66
CSPA Salmonella	1 MSGKMTGIVKWFNADKGFIFITPDGSKDVFVHFSAIQNDG----	YKSLDEGQKVSFTIESGA--KGPAAGNVTSL-----	70
CSPA Mycobacterium	1 MP---QGTVKWFNAEKGFIFIEPADGSDVVFVHYTETIQGTG----	FRTLLENQKVEFEIGHSP--KGPAATGVRSLL-----	67
CSPA Micrococcus	1 MA---VGTVKWFNAEKGYGFIAPEDNSADVFVHFSAIQNGN----	FKELQENDRVFEFTQDGP--KGLQANVTKL-----	67
CSPA Listeria	1 ME---QGTVKWFNAEKGFIFIERENG-DVVFVHFSAIQDGD----	FKSLDEGQAVTFDVEEGQ--RGPAANVQKA-----	66
CSPA Streptococcus	1 MA---QGTVKWFNAEKGFIFITENGQ-DVFAHFSAIQNTG----	FKTLEEGQKVAFDVEEGQ--RGPAANVITKLA-----	67
CSPA Pseudomonas	1 MSNRQNGTVKWFNDAKGFIFITPESGN-DLFVHFSAIQGTG----	FKSLQEGQKVSFVVVNGQ--KGLQADEVQV-----	69
CSPB Yersinia	1 MSNKMTGLVKWFNDAKGFIFITPADGSKDVFVHFSAIQNDN----	YKTLDEGQNVFEFSIEQGG--KGPAANVVAL-----	70
CSPD Haemophilus	1 ME---IGIVKWFNNAKGFIFISAEAGVDADIFAHYSVIEMDG----	YRSLKAGQKQVFEVLHSD--KGSHATKIPIADTQE--	72
YB-1 human	58 ---KVLGTVKWFNVRNGYGFINRNDTKEDVFVHQTAKKNNPRKYLRSVGDGETVEFDVVEGE--	KGAEANVTGP-----	128
DBPA human	90 ---VLGTVKWFNVRNGYGFINRNDTKEDVFVHQTAKKNNPRKYLRSVGDGETVEFDVVEGE--	KGAEANVTGP-----	160
UNR human	185 ---RCQGVVCAK---EAFGFIERGDVVKIEIFHYSEFKGDL-----	ETLQPGDDVEFTIKDRN--GKEVATDVRL-----	248
CRHSP human	62 VY---KGVCKCFCRSGKGFIFITPADGSDVVFVHFSAIQNDG----	VPVEGDEVTYKMCSTPP--KNKQLQAVEVVIT-----	129
LIN-28 C.elegans	52 RY---FGSCKWFNVSKGYGFIIDITGEDLVHQSINLMQG----	FRSLDEGERVSYIYQERSNGKREAYAVSGE-----	120
	* : .. *:: : : *	: : * :	

図 1 CSP family タンパク質のアミノ酸配列比較。

tt: *Thermus thermophilus*, ec: *Escherichia coli*, bs: *Bacillus subtilis*

Thermus thermophilus HB8 にも TTHA0175 (ttCsp1) と TTHA0359 (ttCsp2) の 2 種類の Csp が存在する。大腸菌や枯草菌などと比べてその数が少ないことから、*T. thermophilus* HB8 は異なるタイプの Csp の機能解析に適していると考えられる。そこで、本研究ではトランスクリプトーム解析やX線結晶構造解析などの手法を用いて、ttCsp1 と ttCsp2 の構造機能解析を行った。

GeneChip を用いて mRNA の発現量を解析したところ、ttCsp1 は低温培養でもその発現量が増加せず、比較的恒常的に発現しているのに対し、ttCsp2 は低温条件での発現量の上昇が見られ、低温ストレス応答に直接関与していることが示された。これらのことから、ttCsp1 は低温適応のみにとどまらず、通常の生育条件下でも細胞内で重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、ttCsp1 の立体構造を分子置換法により決定したところ (図2)、既知のCspと同様、ttCsp1 もオリゴヌクレオチド結合タンパク質に共通に見られる OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) を形成していた。低温で発現が誘導されないタイプの Csp の構造決定は今回が初めての例である。ttCsp2 の立体構造はホモロジーモデリングによって予測した。次に、Csp の蛍光を利用して、様々な塩基配列及び二次構造を持つオリゴヌクレオチドに対する ttCsp1 および ttCsp2 の解離定数を求めた。その結果、ttCsp1, ttCsp2 とともにプリンよりピリミジン塩基に対して親和性が高いことが分かった。しかし、全体的に ttCsp2 の方が ttCsp1 よりもオリゴヌクレオチドに対する親和性は弱かった。観察された親和性の違いを、得られた立体構造に基づいて考察した。

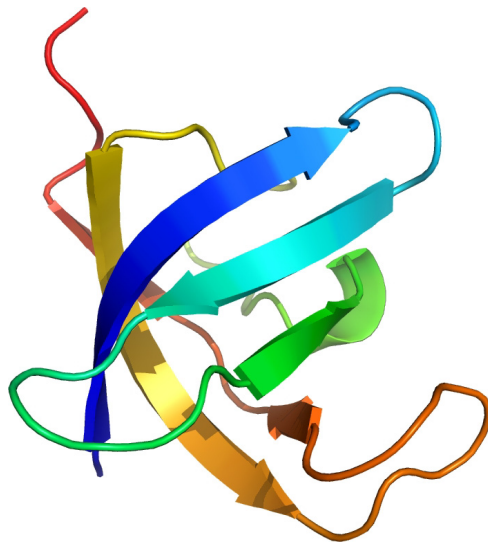


図2 ttCsp1 の立体構造