

***Thermus thermophilus* HB8 を用いた生物界に普遍的な新規 RNA 分解システムの探求**
Research for a universal RNA degradation system using *Thermus thermophilus* HB8

石川大仁¹, 中川紀子^{1,2}, 増井良治^{1,2}, 倉光成紀^{1,2}

Hirohito Ishikawa¹, Noriko Nakagawa^{1,2}, Ryoji Masui^{1,2} and Seiki Kuramitsu^{1,2}

(¹ 阪大院理・生物科学, ² 理研・播磨研)

(¹Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ²RIKEN SPring-8 Center)

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

生物は、細胞周期を正しく進めるためや生理条件・環境条件の変化に応答するために、時間・状況に応じて遺伝子の発現量を正しく調節する必要がある。遺伝子の発現量の調節機構としては、mRNA の転写の調節などが上げられるが、特に遺伝子の発現を OFF にするときは、mRNA が無くならない限りタンパク質が作られ続けてしまうため、mRNA の分解が重要になる。また、遺伝子の発現量を決める要因である mRNA の量は、その mRNA の転写と分解の速度のバランスによって決まっているため、RNA の分解というのは、遺伝子発現の調節に重要で、全ての生物において必須のシステムである。RNA の分解には、複数の RNase や RNA ヘリカーゼなどの酵素が関与している。例えば、大腸菌での mRNA の分解は、まず RppH という酵素が mRNA の 5' 末端の triphosphate を monophosphate に変え、必須遺伝子である RNase E を中心とした degradosome と呼ばれるタンパク質複合体が endonuclease 活性で mRNA をいくつかの断片にし、PNPase, RNase II, oligoribonuclease といった 3'-to-5' exonuclease が 3' 末端から mRNA 断片を mononucleotide に分解する (図 1)。大腸菌ではこのようなシステムが明らかになっているが、大腸菌近縁種である β -, γ -proteobacteria を除くと、ほとんどの生物には RNase E のホモログがないため、多くの生物では mRNA の分解システムは謎となっている。我々は大腸菌の RNase E に代わる、多くの生物で重要な RNase として、 β -CASP ファミリーと呼ばれる、ほとんどの生物で保存されている新しい核酸分解ファミリーを見出した (表 1)。 β -CASP ファミリータンパク質は、その分布から RNase E と重ならないため RNase E の機能ホモログである可能性が示唆された。その後、*Bacillus subtilis* において β -CASP ファミリーのタンパク質が RNase E と同様に PNPase や enolase と複合体を形成している可能性が示唆された。また β -CASP ファミリーは、バクテリアで見つかった初の 5'-to-3' exoribonuclease であり、生体内では rRNA のプロセッシングや全体的な RNA の分解に関係していることが判明した。

Thermus thermophilus HB8 には TTHA0252 と TTHA1140 という 2 種類の β -CASP ファミリータンパク質があり、本研究ではまず TTHA0252 の構造・機能を明らかにすることを目標としている。TTHA0252 は様々なオリゴヌクレオチドに対して endonuclease 活性も示すが、主として 5'-to-3' exonuclease 活性を示し、DNA よりも RNA を効率的に分解する。また、 β -CASP ファミリーの蛋白質として初めて決定した

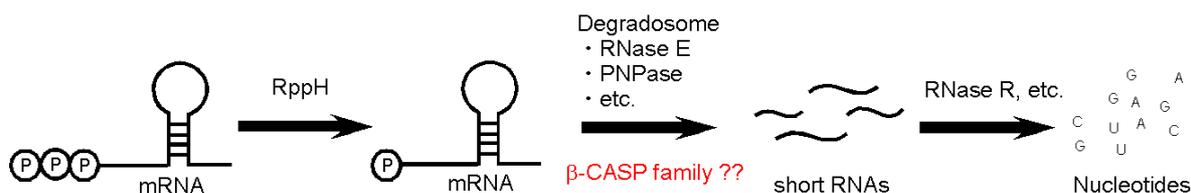


図 1. mRNA 分解システムの概念図

TTHA0252 の X 線結晶構造では、活性部位中の 7 つの保存された残基が 2 個の Zn^{2+} に配位した構造をとっている (図 2A, B) [1]。 Zn^{2+} やそれに配位する各残基の触媒機構における働きを推定するため、変異体解析を行った。その結果、Glu63 が触媒残基であること、また、一方の Zn^{2+} は活性にほとんど影響を及ぼさないが、もう一方は基質との結合に関与することが分かった (図 2C)。次に、変異体について X 線結晶構造解析を行った。そのうち、endonuclease 活性のみを示す H380A 変異体では、発現菌体由来と思われる RNA との複合体構造が得られた。このことは TTHA0252 が生体内で RNA を基質としている可能性を強く示唆した。さらに、野生型酵素と RNA アナログとの複合体の構造解析にも成功した。その構造から、Tyr341 がスタッキングによって基質の 5'末端の塩基を認識していることや、Arg256 が 2'-OH を認識して DNA と RNA を区別していることなどが明らかになった。現在、遺伝子破壊株についての解析などをさらに進めている。

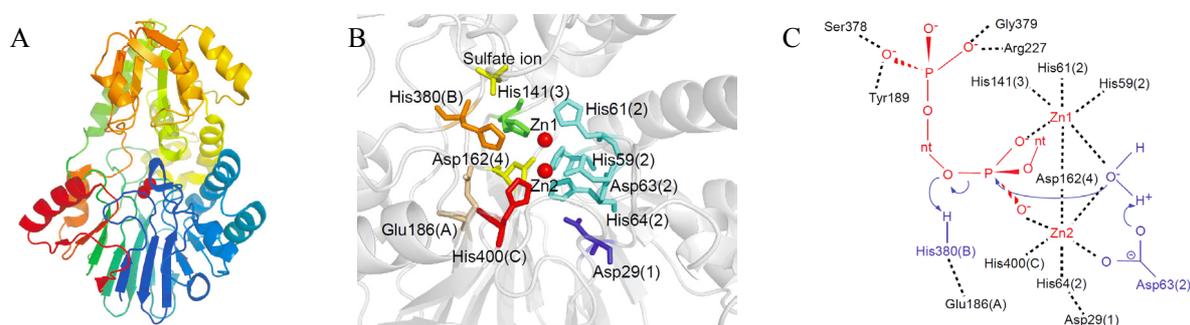


図 2. TTHA0252 の立体構造と予測される反応機構。A. 全体構造。B. 活性部位の構造。C. 予測される反応機構。

表 1. RNase E と β -CASP ファミリーの分布図。○は 90% 以上、×は 10% 以下の生物種で保存されていることを示す。

	RNase E	β -CASP
Actinobacteria	×	○
Aquificae	×	△
Bacteroidetes/Chlorobi	×	△
Chlamydiae/Verrucomicrobia	×	×
Chloroflexi	×	○
Cyanobacteria	×	○
Deinococcus-Thermus	×	○
Fibrobacteres/Acidobacteria	×	○
Firmicutes	×	○
Fusobacteria	×	○
Nitrospirae	×	○
Planctomycetes	×	○
Proteobacteria		
α	×	○
β	○	×
γ	○	×
δ	×	△
ε	×	○
Spirochaetes	×	×
Thermotogae	×	○

	RNase E	β -CASP
Euryarchaeota	×	○
Crenarchaeota	×	○

	RNase E	β -CASP
Alveolata	×	○
Euglenozoa	×	○
Fungi/Metazoa group	×	×
Viridiplantae	×	○

Reference

[1] Ishikawa H., Nakagawa N., Kuramitsu S. and Masui R. (2006) *J. Biochem.* **140**(4), 535-542