

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	RNA スプライシング酵素の基質認識および触媒反応メカニズムの解明				
研究テーマ (欧文) AZ	Elucidation of the substrate recognition and catalytic reaction mechanism of RNA splicing enzyme				
研究氏 代表 者	カナ CC	姓)ヒラタ	名)アキラ	研究期間 B	2010 ~ 2011 年
	漢字 CB	平田	章	報告年度 YR	2011 年
	ローマ字 CZ	Hirata	Akira	研究機関名	愛媛大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	平田 章 愛媛大学 大学院 理工学研究科 物質生命工学専攻 助教				
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)	<p>古細菌 (アーキア) の前駆体 tRNA 中のイントロンは、真核生物に類似した RNA スプライシングエンドヌクレアーゼ (EndA) によって切断される。アーキアの EndA は、サブユニット組成の違いから、ホモダイマー型 (α_2)、ホモテトラマー型 (α_4)、ヘテロテトラマー型 ($\alpha_2\beta_2$) の 3 種類に分類されており、ホモ型はユーリアーキアに、ヘテロ型はクレンアーキアおよびナノアーキアに保存されている。ユーリアーキアでは、多くのイントロンが真核生物と同様に前駆体 tRNA のアンチコドンループの 37/38 番目の部位に挿入され、ホモ型 EndA によるイントロンの切断認識として BHB (bulge-helix-bulge) モチーフが存在している。ホモ型 EndA は、前駆体 tRNA の全体構造を含む BHL (bulge-helix-loop) モチーフも認識して、イントロンを切断するが、前駆体 tRNA の全体構造を含まない BHL や HBh' は認識できない。一方、クレンアーキアおよびナノアーキアでは、tRNA のアンチコドンループ以外にも D-ループや T-ループといった変則的な場所にもイントロンを含む BHB、HBh'、BHL モチーフが見られる。また、そのような変則的な場所に複数のイントロンを持つ前駆体 tRNA がクレンアーキアに存在するだけでなく、前駆体 mRNA および前駆体 rRNA にもイントロンが存在している。したがって、ヘテロ型 EndA は、前駆体 RNA の種類、前駆体 tRNA の全体構造、イントロンの挿入部位に依存せず、BHB、HBh'、BHL モチーフのいずれも認識してイントロンを切断できるといったブロードな基質特異性を有している。現在までに、3 種類 (α_2、α_4、$\alpha_2\beta_2$) すべての EndA の X 線結晶構造解析がなされ、詳細な触媒反応メカニズムおよび基質認識機構が解明されてきたが、未でに、ヘテロ型 EndA のブロードな基質特異性のメカニズムは明白ではなかった。</p> <p>そこで、申請者は超好熱性クレンアーキア <i>Aeropyrum pernix</i> (APE) ヘテロ型 EndA の X 線結晶構造解析を行い、APE-EndA の X 線結晶構造と今までに報告されている EndA の X 線結晶構造を詳細に比較検討した。その結果、クレンアーキアのヘテロ型 EndA のみに保存された特異的ループ (CSL) が、EndA のブロードな基質特異性の決定に関与していることが示唆された。そして CSL を超好熱性ユーリアーキア <i>Archaeoglobus fulgidus</i> (AFU) ホモダイマー型 EndA に導入したところ、そのキメラ体 (AFU-CSL) の基質特異性は APE-EndA のように変換した。次に、CSL 上のどのアミノ酸残基が基質特異性に寄与しているかを調べるために、保存された二つの塩基性アミノ酸である APE-EndA の Lys44 と Arg46 を Ala に置換した変異体 K44A および R46A を構築した。K44A の酵素活性は、ほとんどなくなったのに対して、R46A は、野生型 APE-EndA とほぼ同様の酵素活性および基質特異性を保持していた。また、キメラ体 AFU-CSL の X 線結晶構造解析を決定したところ、その活性部位に近いところに APE-EndA のように CSL が導入されており、Lys44 と Arg46 に由来する正電荷が表面に分布していた。さらに、AFU-CSL と RNA の複合体構造のモデルから、Lys179 (APE-EndA では Lys44 に相当する) が触媒部位に近い RNA のリン酸骨格と相互作用し、RNA の認識部位として機能していることが考えられた。そして、AFU-CSL の Lys179 を Ala に置換したところ、K179A 変異体は BHB モチーフを持つイントロンを切断したが、BHL モチーフを持つイントロンは切断することができなかった。以上の結果から、CSL の保存された Lys が基質認識部位として機能するため、クレンアーキア由来 EndA はブロードな基質特異性を有していることが明らかになった。</p>				
キーワード FA	スプライシング	エンドヌクレアーゼ	イントロン	アーキア	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA							
研究機関番号 AC					シート番号							

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Cleavage of intron from the standard or non-standard position of the precursor tRNA by the splicing endonuclease of <i>Aeropyrum pernix</i> , a hyper-thermophilic Crenarchaeon involves a novel RNA recognition site in the Crenarchaeaspecific loop							
	著者名 ^{GA}	Akira Hirata, Kitajima Tsubasa and Hiroyuki Hori	雑誌名 ^{GC}	<i>Nucleic Acids Research</i>					
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}	2	0	1	1	巻号 ^{GD}	出版中
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

RNA splicing endonucleases, which remove introns from precursor (pre)-tRNA, are classified according to the sequences and positions of their targets in the pre-tRNA. We have determined the crystal structure of heterotetrameric RNA splicing endonuclease from *Aeropyrum pernix* (APE-EndA), which belongs to a class of endonucleases with broadest substrate specificity. Structural comparisons suggested a specific loop region in the wild type APE-EndA that was located outside its catalytic site, and was missing in other classes of endonucleases. When this loop region, so-called “Crenarchaea specific loop (CSL)”, was introduced into Euryarchaeal EndA, it conferred broad substrate specificity to the resulting chimeric protein. Further biochemical and crystallographic analysis of the chimeric EndA demonstrated that the CSL region is responsible for cleavage of the non-canonical substrate RNA with the bulge-helix-loop motif as well as the canonical substrate with the bulge-helix-bulge. Mutagenesis study in CSL revealed that Ala-substitution of Lys44 in both chimeric and APE EndAs diminished the cleaving activities for non-canonical substrate RNA, suggesting that Lys44 functions as the RNA recognition site. Taken together, our findings provide the first evidence for the mechanism underlying the broad substrate specificity of Crenarchaeal EndA.