

## リボヌクレアーゼ P (RNase P) の多様性とその構造基盤

寺本 岳大<sup>1</sup>, 児安 剛志<sup>2</sup>, 角田 佳充<sup>1</sup>

### 1. はじめに

トランスファー RNA (tRNA) は、タンパク質の翻訳に不可欠なノンコーディング RNA であり、mRNA の遺伝暗号とタンパク質のアミノ酸を物理的に結びつけている。tRNA がその機能を発揮するためには、前駆体 tRNA (pre-tRNA) が、5' および 3' 余剰配列の除去、塩基修飾、スプライシング、3' 末端への CCA 配列付加など、一連の成熟化プロセスを経る必要がある。リボヌクレアーゼ P (RNase P) は、この成熟化プロセスの中で、pre-tRNA の 5' 側の余剰配列 (5'-leader 配列) の除去に関わるエンドリボヌクレアーゼである。この RNase P の「P」は前駆体「precursor」の P に由来する。この成熟化プロセスは、あらゆる生命にとって必須であり、RNase P はハウスキーピング遺伝子の一つである。RNase P は、その基質認識サイトと触媒中心が核酸である RNA に存在する「リボザイム型」のみが長らく知られていた。しかし、近年、リボザイム型とはまったく形態の異なる、基質認識サイトと触媒中心がタンパク質に存在する「エンザイム型」RNase P の存在が明らかになった。これら二つの形態の RNase P は同一の基質 (pre-tRNA) を認識し、同一の酵素反応を担っている (図 1)。本稿では、我々が行っているエンザイム型 RNase P の構造解析を中心に、RNase P の多様性とダイナミックな分子進化について紹介する。

### 2. リボザイム型 RNase P

細菌、古細菌、真核生物において、リボザイム型 RNase

P は、一つの RNA 成分といくつかのタンパク質補因子が複合体をとったリボ核タンパク質 (RNP) として存在している。タンパク質補因子の数は、細菌では 1 個、古細菌では 4~5 個、真核生物では 9~10 個であり、それぞれ一つの RNA 成分との複合体として構成される (図 1)。タンパク質補因子は RNA 成分の立体構造形成、立体構造維持、安定化に寄与していると考えられている。

このリボザイム型 RNase P は、1983 年に Sydney Altman のグループによって、細菌の RNase P の触媒中心が、タンパク質ではなく RNA 成分に存在するリボザイムであることが初めて見いだされた<sup>1)</sup>。この Altman の発見と Thomas Cech の RNA の自己スプライシングの発見によって、RNA の触媒機能が明らかになり (リボザイムの発見)、両名は 1989 年にノーベル化学賞を受賞している。またこれらのリボザイムの発見は、「RNA ワールド仮説」の提唱のきっかけの一つになった。

これらのリボザイム型 RNase P の構造解析は、2010 年に細菌の RNase P と tRNA 複合体の X 線結晶構造が決定されたのが最初である<sup>2)</sup> (図 1)。この構造解析により、RNase P RNA の Catalytic-Domain (C ドメイン) に触媒中心が存在することや、Specificity-Domain (S ドメイン) の二つの RNA 塩基が、tRNA のエルボー領域先端の塩基対 (G19-C56) とスタッキングすることによって、基質認識していることが明らかになった (図 2 右)。この tRNA エルボー領域は、多くの tRNA で構造的に保存されており、tRNA の D ループと TΨC ループの塩基が塩基対 (G19-C56) を作ることによって形成される、tRNA に特徴的な構造である。これらのことから、リボザイム型 RNase P は tRNA 特有のエルボー領域から切断位置の距離を測る“分子ものさし”として働き、その機能を発揮していることが明らかになった。さらに 2018 年に酵母とヒトのリボザイム型 RNase P の<sup>3,4)</sup>、2019 年に古細菌のリボザイム型 RNase P の tRNA 複合体構造がクライオ電子顕微鏡 (以下クライオ電顕) によって決定されている<sup>5)</sup> (図 1)。これらの構造から、古細菌、真核生物においても RNase P 活性に重要な触媒中心と基質認識の機能は RNA 上に保持されていることが明らかになった (図 1)。さらにこれらの構造から、細菌 RNase P RNA の RNA 成分の構造形成、構造維持、安定化に寄与していると考えられている領域が、古細菌、真核生物では徐々にタンパク質因子に移行していると推察されている<sup>4)</sup>。

<sup>1</sup> 九州大学大学院農学研究院 (〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744)

<sup>2</sup> 九州大学大学院生物資源環境科学府 (〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744)

**Diversity of Ribonuclease P and its structural insight**

Takamasa Teramoto<sup>1</sup>, Takeshi Koyasu<sup>2</sup> and Yoshimitsu Kakuta<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Moto-oka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, <sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Moto-oka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930857

© 2021 公益社団法人日本生化学会

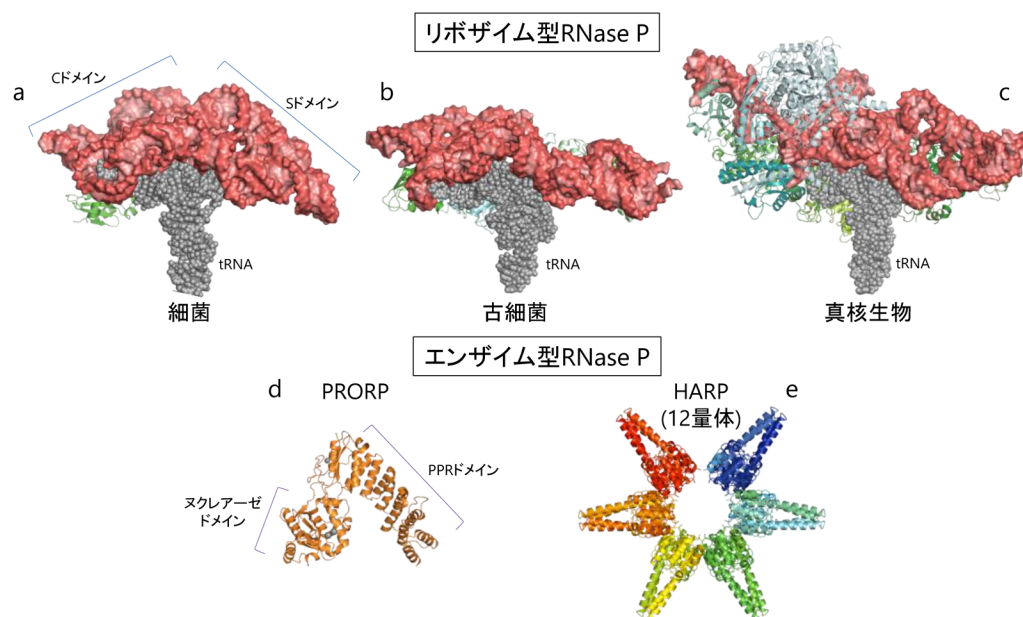


図1 RNase Pの多様な分子形態

(a) 細菌 *Thermotoga maritima* のリボザイム型RNase P-tRNA複合体のX線結晶構造<sup>2)</sup>. PDB ID: 3Q1Q. (b) 古細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* のリボザイム型RNase P-tRNA複合体のクライオ電顕構造<sup>5)</sup>. PDB ID: 6K0B. (c) ヒトのリボザイム型RNase P-tRNA複合体のクライオ電顕構造<sup>4)</sup>. PDB ID: 6AHU. (d) 植物 *Arabidopsis thaliana* のエンザイム型RNase P (PRORP) のX線結晶構造<sup>8)</sup>. PDB ID: 4G24. (e) 細菌 *Aquifex aeolicus* のエンザイム型RNase P (HARP) のX線クライオ電顕構造<sup>13)</sup>. PDB ID: 7F3E. RNase P RNA分子を赤系の表面モデルで, tRNAを灰色の原子球状モデルで, タンパク質分子をリボンモデルで, 表示している。

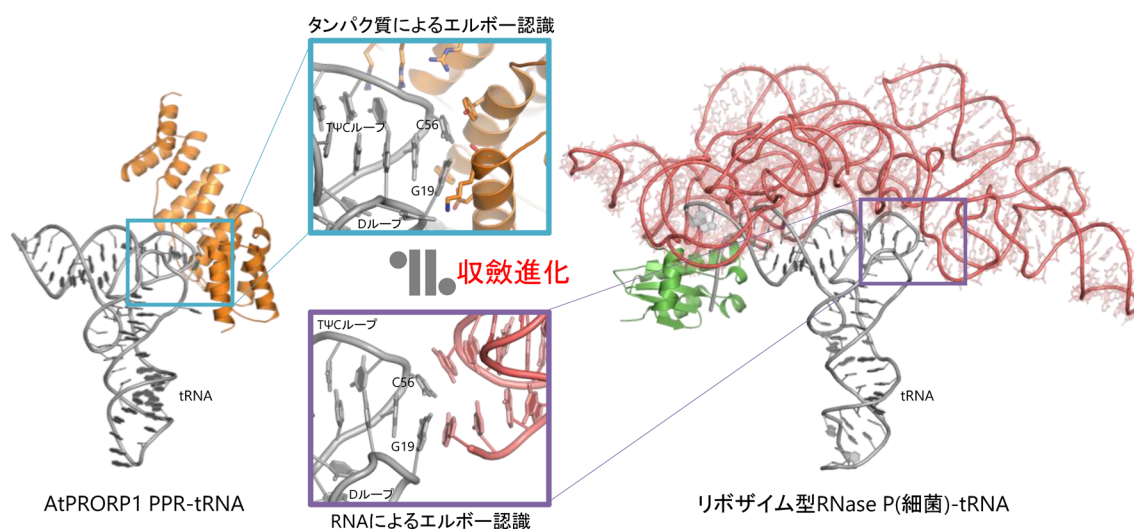


図2 エンザイム型RNase P (PRORP) とリボザイム型RNase Pの基質認識における収斂進化

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) PRORP1 (AtPRORP1) のPPRドメイン-tRNA複合体のX線結晶構造 (PDB ID: 6LVR, 左) と既知のリボザイム型リボヌクレアーゼP (細菌)-tRNA複合体X線結晶構造(右)。エンザイム型もリボザイム型も基質であるtRNAのエルボー領域を同様の方法で基質を認識している (中央)。

### 3. エンザイム型RNase Pの発見

リボザイム型RNase Pの発見の経緯から, RNase Pは, リボザイムを代表する分子であり, リボザイム型のみが存在していると長らく考えられてきた。しかし, 植物の

核, オルガネラや動物のオルガネラで働くRNase Pの存在は30年近く未同定であった。2008年に, ヒトのミトコンドリアで, タンパク質だけから構成される酵素複合体 (mitochondrial RNase P protein: MRPP) がRNase P活性を持つことが同定された<sup>6)</sup>。このMRPP複合体は, 三つ

のMRPP1, MRPP2, MRPP3タンパク質で構成され, それぞれ, methyltransferase, dehydrogenase, ribonucleaseと同一性のあるタンパク質であった. これら三つのタンパク質がヘテロ複合体を形成することによって, RNase P活性を有しており, 活性中心はribonucleaseであるMRPP3に存在している. これら三つのタンパク質は, リボザイム型RNase Pの構成タンパク質とはまったく同一性がなく, 異なる起源を持つタンパク質であると考えられる. さらに2010年にシロイヌナズナで, MRPP3と同一性のあるタンパク質が, 単独でRNase P活性を有することが発見され<sup>7)</sup>, このタンパク質はprotein-only RNase P (PRORP) と命名された. シロイヌナズナでは三つのPRORPアイソフォームが存在し, PRORP1はオルガネラに, PRORP2とPRORP3は核に局在している. その後, PRORPのオーソログは, さまざまな真核生物で同定されている. 真核生物において, リボザイム型RNase PとPRORPの局在は相互に排他的である. つまり, 植物では, 核, ミトコンドリア, 葉緑体のすべてにおいてPRORPのみが機能しているが, 動物では, 核においてはリボザイム型RNase Pのみが, ミトコンドリアにおいてはPRORP (MRPP) のみが働いている.

PRORPの構造解析は, シロイヌナズナPRORP1の構造解析が2013年に初めて報告された<sup>8)</sup> (図1). その後, シロイヌナズナPRORP2, ヒトMRPP3の構造が決定されている<sup>9, 10)</sup>. その構造は, pentatricopeptide repeat (PPR) ドメインとヌクレアーゼドメインを中間の亜鉛結合ドメインが橋渡しした $\Lambda$  (ラムダ) 状の構造をしている (図1). PPRドメインがpre-tRNA認識を, ヌクレアーゼドメインが5'-leader配列の切断を担っていると考えられている. このPPRドメインとヌクレアーゼドメインとの位置関係はリボザイム型RNase PのSドメインとCドメインの位置関係と類似しており, PRORPもリボザイム型RNase Pと同様に分子ものさしとして働いていることが示唆されている (図1). しかし, その詳細な, 基質認識の構造基盤は不明

であった.

#### 4. PRORPのPPRドメインのtRNA基質認識の構造基盤

我々は, PRORPの詳細な基質認識メカニズムを解明するために, シロイヌナズナPRORP1 (AtPRORP1) と基質pre-tRNAとの複合体のX線構造解析を試みたが, 成功に至らなかった. そこで次にAtPRORP1のPPRドメインの可溶化に成功したため, このPPRドメインと酵母tRNA<sup>Phe</sup>の複合体結晶構造を決定した<sup>11)</sup> (図2左). 複合体構造より, AtPRORP1のPPRドメインは, tRNAのエルボー領域に特異的に結合していることが明らかになった. その結合様式は, PPRドメインが, tRNAエルボー領域先端にあるG19-C56塩基対を, 主に疎水的相互作用で認識しているものだった. さらに二つのアルギニン残基がtRNAエルボー領域の主鎖のリン酸基と相互作用し, 三つ目のアルギニン残基が, tRNAの $\psi$ 55塩基と相互作用していた (図2左). このPPRドメインのtRNAエルボー領域への特異的認識は, リボザイム型RNase Pの二つのRNA塩基によるtRNAエルボー認識に非常に類似した結合様式である. このことは, タンパク質とRNAというまったく異なる分子種が, 同じ基質 (pre-tRNA) を認識するために, 原子レベルで同様の基質認識機構を持った, 収斂 (しゅうれん) 進化の例である (図2). これは, 天然に存在する同一反応を触媒するエンザイムとリボザイムが同じ基質を同様の方法で認識するということを明確に決定した, 我々の知る限り最初の例である.

#### 5. 細菌の持つ新たなエンザイム型PRORPの同定

2017年に超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* で, PRORPとは異なるタイプのエンザイム型RNase PであるAq880が同定された<sup>12)</sup>. このタンパク質は, ヌクレアーゼドメ

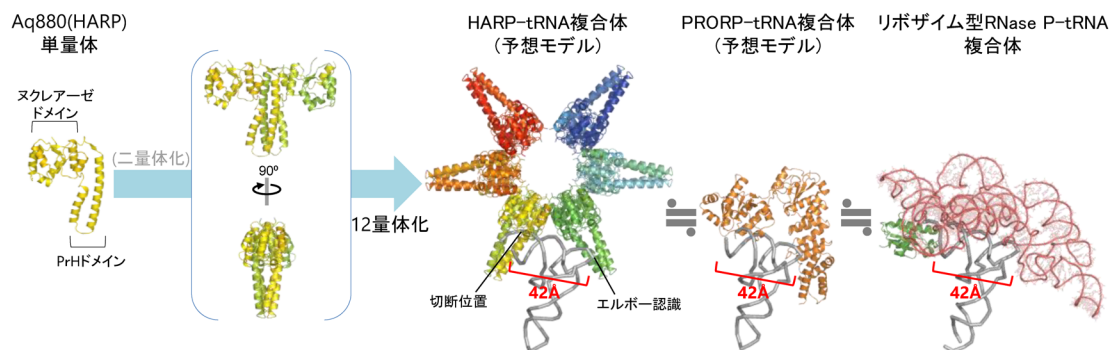


図3 最小サイズのエンザイム型RNase P (HARP) の多量体化とRNase Pの“分子ものさし”としての共通性  
RNase Pは, どの分子形態でもtRNAのエルボー領域から切断部位までの距離 (約42 Å) をみることで, 特異的な切断を行う. HARP-tRNA複合体モデルは, tRNAを1分子だけ結合させたモデルだが, 最大10分子結合可能だと考えられる.



ンのみと考えられた約23kDaの酵素である。この *Aquifex* RNase P のホモログは、いくつかの細菌や古細菌でも発見され、HARP (homolog of *Aquifex* RNase P) ファミリーと命名された。この最小サイズのエンザイム型 RNase P である HARP が pre-tRNA をどのように認識して切断するのかを明らかにするために、我々は、Aq880 のクライオ電顕単粒子構造解析によって、立体構造を決定した<sup>13)</sup>。決定した構造から、Aq880 は、スクレアーゼドメインと、予想外にも突出した  $\alpha$ -helix (PrH) ドメインから構成されていることが明らかになった (図3)。Aq880 単量体は、PrH ドメインを介して二量体を形成し、さらに六つの二量体が、左巻きのらせん構造を持つユニークな六つの角が突き出た六芒星形(☆)の12量体を形成していた。この12量体形成は、HARP ファミリー共通の特徴であると考えられるため、我々は HARP を hexagram-like assembly proteinaceous RNase P の略に言い換えることを提案している。pre-tRNA のドッキングモデルにより、Aq880 の pre-tRNA の特異的切断は、12量体中の隣接する二つの二量体によって達成されると予想した (図3)。一つの二量体が切断触媒を担い、もう一方の二量体の PrH ドメインが pre-tRNA のエルボー認識を担っており、12量体中に最大10分子の pre-tRNA を結合することができると考えられる。これらのことは、HARP も PRORP やリボザイム型 RNase P と同様に tRNA 特有のエルボー領域から5'切断位置の距離を測る“分子ものさし”として働き、機能していることを示唆している (図3)。小さなタンパク質である HARP が多量体化によって機能を持つことは、コンパクトなゲノムを持つゆえの *A. aeolicus* の戦略と考えられる。

## 6. おわりに

我々の、PRORP や HARP の構造解析によって、PRORP はスクレアーゼドメインに tRNA エルボー認識モジュールとして PPR ドメインを融合することによって、HARP は多量体化することによって、巨大リボ核タンパク質複合体であるリボザイム型 RNase P と同じように tRNA 特有のエルボー領域を認識して、tRNA 前駆体の特異的切断を達成していることが明らかになった (図3)。これらは、「RNA ワールド仮説」を考える上で、RNA の役割がタンパク質へ移行する過程で、タンパク質でも機能を持つための生命の戦略と考えることができる。これは、生命の起源の解明にも貢献するものとして注目される。RNase P は、まったく同一の触媒反応をするにもかかわらずさまざまな形態の酵素が存在し、酵素の多様性とダイナミックな分子進化を示している。

## 謝辞

本研究を推進するにあたり、多くのご助言を賜りました。九州大学大学院農学研究院の木村誠名誉教授、中村崇裕教授、沼田倫征准教授に深く感謝いたします。また、本研究を始める機会を提供していただき、多くのご助言を賜りました。米国立衛生研究所の Traci Hall 博士に心より感謝いたします。さらに、単粒子構造解析についてご協力いただきました高エネルギー加速器研究機構千田俊哉教授、安達成彦特任准教授、川崎政人准教授、守屋俊夫特任准教授に心より感謝いたします。

## 文 献

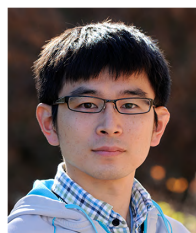
- 1) Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., & Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849–857.
- 2) Reiter, N.J., Osterman, A., Torres-Larios, A., Swinger, K.K., Pan, T., & Mondragon, A. (2010) Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*, **468**, 784–789.
- 3) Lan, P., Tan, M., Zhang, Y., Niu, S., Chen, J., Shi, S., Qiu, S., Wang, X., Peng, X., Cai, G., et al. (2018) Structural insight into precursor tRNA processing by yeast ribonuclease P. *Science*, **362**, eaat6678.
- 4) Wu, J., Niu, S., Tan, M., Huang, C., Li, M., Song, Y., Wang, Q., Chen, J., Shi, S., Lan, P., et al. (2018) Cryo-EM Structure of the Human Ribonuclease P Holoenzyme. *Cell*, **175**, 1393–1404.e11.
- 5) Wan, F., Wang, Q., Tan, J., Tan, M., Chen, J., Shi, S., Lan, P., Wu, J., & Lei, M. (2019) Cryo-electron microscopy structure of an archaeal ribonuclease P holoenzyme. *Nat. Commun.*, **10**, 2617–2617.
- 6) Holzmam, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C., & Rossmann, W. (2008) RNase P without RNA: Identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*, **135**, 462–474.
- 7) Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gössringer, M., Holzmam, J., Hartmann, R.K., Rossmann, W., & Giegé, P. (2010) A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 740–744.
- 8) Howard, M.J., Lim, W.H., Fierke, C.A., & Koutmos, M. (2013) Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16149–16154.
- 9) Pinker, F., Schelcher, C., Fernandez-Millan, P., Gobert, A., Birck, C., Thureau, A., Roblin, P., Giegé, P., & Sauter, C. (2017) Biophysical analysis of Arabidopsis protein-only RNase P alone and in complex with tRNA provides a refined model of tRNA binding. *J. Biol. Chem.*, **292**, 13904–13913.
- 10) Reinhard, L., Sridhara, S., & Hallberg, B.M. (2015) Structure of the nuclease subunit of human mitochondrial RNase P. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5664–5672.
- 11) Teramoto, T., Kaitany, K.J., Kakuta, Y., Kimura, M., Fierke, C.A., & Hall, T.M.T. (2020) Pentatricopeptide repeats of protein-only RNase P use a distinct mode to recognize conserved bases and structural elements of pre-tRNA. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 11815–11826.

12) Nickel, A.I., Wäber, N.B., Gößringer, M., Lechner, M., Linne, U., Toth, U., Rossmann, W., & Hartmann, R.K. (2017) Minimal and RNA-free RNase P in *Aquifex aeolicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11121–11126.

13) Teramoto, T., Koyasu, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Numata, T., Senda, T., & Kakuta, Y. (2021) Minimal protein-only RNase P structure reveals insights into tRNA precursor recognition and catalysis. *J. Biol. Chem.*, **297**, 101028.

## 著者寸描

### ●寺本 岳大 (てらもと たかまさ)



九州大学大学院農学研究院助教。博士 (システム生命科学)。

■略歴 2009年九州大学大学院システム生命科学府博士課程修了, その後アメリカ国立環境衛生科学研究所 (NIEHS/NIH) などでの研究員を経て, 19年より現職。

■研究テーマと抱負 RNA結合タンパク質の特異的RNA結合様式の構造基盤の

解明。

■ウェブサイト <http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/lab/biophys/>

■趣味 スポーツ観戦。

### ●児安 剛志 (こやす たけし)

九州大学大学院生物資源環境科学府修士課程。学士 (農学)。

■略歴 2021年3月九州大学農学部生物資源環境科卒業, 同年4月より同大学院修士課程。

■研究テーマと抱負 エンザイム型RNase Pによる pre-tRNA プロセシングの構造基盤の解明。学部からの初めての研究テーマですが, 先生方のご指導によりここまで順調に進めることが出来たので, 完遂を目指していきたいです。

■ウェブサイト <http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/lab/biophys/>

■趣味 読書 (小説・コミック), アニメ・映画鑑賞。