

古細菌、線虫の核酸結合性蛋白質と非対称性

非対称変異体グループ グループリーダー/技術参事
金井 昭夫

超好熱性古細菌 *P.furiosus* から見出し出した *Pfu* ヘリカーゼ-1 を基軸として DNA の 2 本鎖に内在する非対称性を考察した。また、同古細菌の発現ゲノムライブラリーから核酸への結合を指標に新規の RNA ループ結合蛋白質を同定し、FAU-1 蛋白質と命名した。FAU-1 蛋白質の 1 次構造中には酸性、塩基性のクラスターが存在し、アミノ酸の使用頻度に偏り(非対称性)が見られた。この偏りを有した新規の遺伝子産物を線虫 *C. elegans* のゲノム中に見出し、生化学的な解析をしたところ、RNA 結合蛋白質であることが明らかとなった。

1. はじめに

ゲノム DNA の 2 本鎖はその複製時に一方が連続鎖として、他方が非連続鎖として別々の方法により合成される。DNA 複製前後でゲノムそのものは変化しないと考えられているが、先の意味でゲノム DNA の 2 本鎖は非対称性を含有していることになる。我々は 2 本鎖 DNA の各鎖に対する突然変異率と生物進化の側面から、各々の鎖が相同な運命をたどらないであろうことを理論的および実験的に研究してきた。一方、核酸の代謝には様々な核酸結合蛋白質が重要な役割を演じていることが報告されているが、ゲノム DNA の 2 本鎖のもつ非対称性に着目した研究はほとんど行われていない。そこで、この観点から核酸結合蛋白質の核酸に対する認識機構を解析していくことを目的にした。

また、近年のゲノムプロジェクトの成果により各種のゲノムが次々と明らかにされていることは周知のことである。ポストゲノムを担う解析手法も世界的な規模で開発が競われている。我々はこちらにおいても、広義の非対称性という概念を導入することにより(すなわちゲノムレベルでのアミノ酸の使われ方の偏りを考慮することにより)、新しい切り口からの遺伝子の同定を試みた。本稿では、以上のような考え方を基盤としながら、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* や線虫 *C. elegans* を用いて、実験的に解析した最新の結果について報告する。

2. 超好熱性古細菌由来 *Pfu* ヘリカーゼ-1 の非対称な核酸認識機構の解析

超好熱性古細菌の *P.furiosus* は遺伝子の数が約 2,000 個と少なく、ゲノムレベルの解析に適した生物である。また、同古細菌の遺伝子産物は耐熱性を示し、生化学的な解析に非常に有効

な系を提供する。我々は非対称という観点からのゲノムレベルでの解析を目的として同古細菌の発現ゲノムライブラリーを構築したが(後述)、このライブラリーに存在する遺伝子をランダムに同定していく中で新規のヘリカーゼ遺伝子を見出し、*Pfu* ヘリカーゼ-1 遺伝子と命名した。

Pfu ヘリカーゼ-1 遺伝子は全 720 アミノ酸(分子量 83kDa)の蛋白質をコードしており、その N 末端側 400 アミノ酸残基中にヘリカーゼドメインを持つ。本酵素を大腸菌内で過剰発現させ、一連のカラムクロマトグラフィーにより SDS 存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)上で均一な成分にまで精製した。生化学的な解析から、本酵素は 3'側が突出した 2 本鎖 DNA でヘリカーゼ活性が高く、同反応に ATP の加水分解が必須であることが明らかとなった。この ATPase の活性は 75℃で至適であり、その活性に Mg^{2+} を要求した。本酵素と核酸との結合性をゲルシフト法にて解析すると、1 本鎖 DNA や 2 本鎖の DNA に対するよりも、2 本鎖の末端が開いた、いわゆるフォーク型の DNA と強く結合した。すなわち *Pfu* ヘリカーゼ-1 は DNA の複製フォーク等に見られるような 1 本鎖部分にエンターし、3'→5'に進みながら ATP 依存に 2 本鎖部分を巻き戻していくと考えられる。この時、本ヘリカーゼが移動するのは連続鎖の鋳型となる鎖であり、この意味で *Pfu* ヘリカーゼ-1 は 2 本鎖 DNA の非対称性を区別していることになる。

一方、精製した *Pfu* ヘリカーゼ-1 の非変性条件下のゲル濾過カラムによる解析、化学的な架橋実験、さらには透過型電子顕微鏡により観察することにより、同酵素がオリゴマーとしてリング状の形態をとることを明らかにした。

3. RNA 結合蛋白質 FAU-1 と蛋白質のもつアミノ酸の偏り

蛋白質のアミノ酸配列のもつノンランダム性(ゲノム情報の偏りにもとづく概念)を実験的に検証することを目的に、プロテオームレベルからの蛋白質の機能の分類を試みた。すなわち、前述の *P. furiosus* ゲノム DNA 発現ライブラリーを用いて、蛋白質の機能を指標に、言い換えればアミノ酸配列のもつノンランダム性が具現化された形でのスクリーニングを行った。プローブに系統的にデザインしたオリゴヌクレオチドを用いて、高温下で核酸に結合する古細菌由来の活性をゲルシフト法により求めたところ、約 30 種の DNA/RNA 結合活性が得られた。このうち一番強く rArU(A と U の繰り返しの 20 mer)に結合する活性を有したクローンを単離し、同活性を有する分子を FAU-1 と命名した(*P. furiosus* AU RNA Binding Protein-1)。

FAU-1 蛋白質の分子としての実体を明らかにするために、同活性を有する古細菌ゲノム DNA (3.1kb)を大腸菌にて強制発現させた後、組換え体 FAU-1 蛋白質を SDS-PAGE 上ほぼ均一な成分にまで精製し、N 末端からのアミノ酸配列を決定した。次に、結合活性と対応する遺伝子の塩基配列を決定し、全一次構造を明らかにした。FAU-1 蛋白質は全 472 個のアミノ酸より構成され(分子量 54kDa)、植物の RNaseE と弱い相同性(28%)があった。また、FAU-1 蛋白質上には RNaseE 関連蛋白質(ヒト ard-1 や NIPP-1 など AU 配列に結合する)に特徴的な塩基性、酸性のアミノ酸のクラスターが存在していた。本分子は前述のようにゲノム情報の偏りにもとづく概念を実験的に解釈し、分子クローニングにより同定したのであるが、その 1 次構造上に塩基性、酸性のアミノ酸のクラスターからなる偏りが存在していた。すなわち、蛋白質のもつアミノ酸の偏りをたどっていけば、その蛋白質のもつ何らかの機能との相関が明かとなる可能性がある。

次に、FAU-1 蛋白質の本来の標的 RNA を同定することを目的に RNA Binding Site Selection 法を試みた。その結果、FAU-1 蛋白質が認識する RNA は特徴的なステム及びループより構成される 2 次構造を有することが明らかとなった(結合常数: 7×10^{-8} M)。この標的 RNA を用いて FAU-1 蛋白質の結合部位を RNase フットプリント法により求めたところ、2 次構造上のル

ープ部分で AU 配列を含んだ領域が FAU-1 蛋白質の結合領域として同定された。

4. 線虫 *C. elegans* の新規 RNA 結合蛋白質

古細菌の研究から考案した塩基性、酸性のアミノ酸のクラスターといった概念を軸として、多細胞生物としては初めてゲノム配列が解明された線虫 *C. elegans* のプロテオームをコンピュータによりサーチした結果、同様の特徴を有した新規の蛋白質(C32E8.5)を見出した。同蛋白質は全 299 アミノ酸より構成され、特にアルギニン残基が、その N 末端側の 130 アミノ酸中 40 個にも及んでいた。この遺伝子産物を *C. elegans* のアルギニン残基(R)に富んだ蛋白質ということで、以下 CR 蛋白質と呼ぶことにする。

大腸菌にて産生した組換え体 CR 蛋白質を SDS-PAGE 上で均一な成分にまで精製し、ゲルシフト法により解析すると、期待した通り RNA に結合した。しかもその結合は GC に富んだ RNA に特異的であった。また、本蛋白質は試験管内でカゼインキナーゼ II によりリン酸化され、リン酸化型 CR 蛋白質は非リン酸化型 CR 蛋白質の数倍の強さで GC に富んだ RNA に結合することが明らかになった。以上は CR 蛋白質がリン酸化を介した情報伝達系によってその機能が制御されている RNA 結合蛋白質であることを示唆している。

5. おわりに

今回、古細菌の RNA 結合蛋白質 FAU-1 を通して検証した法則---ゲノム情報におけるアミノ酸の偏りは特定の機能と相関する(ゲノム情報の非対称性/ノンランダムな使われ方)---は、線虫のゲノム上に見出した同様の特徴を有した CR 蛋白質が RNA 結合蛋白質であったことより、種を超えて適応されることが明らかになった。これは、非対称性に基づく理論がゲノム解析において有効なツールであることを表している。さらに言えば、かく同定した核酸結合蛋白質の結合様式を *Pfu* ヘリカーゼ-1 の解析を介して我々が試みたように、ゲノム DNA の持つ非対称性と関連させていくことで、これまでにない新しい生物学が展開していくように思われる。