

細菌 RNA 結合到新様式

福井 健二
Fukui Kenji

1. はじめに

細胞の中では、DNA から転写された RNA が様々な働きを担っている。RNA は単に遺伝情報を運ぶだけでなく、その量や働きが精密に制御されることで、細胞の状態や環境応答が調節されている。この制御に重要な役割を果たしているのが、RNA に結合するタンパク質（RNA 結合タンパク質）である。細菌においても RNA 結合タンパク質は重要であり、これまでに Hfq, CsrA, ProQ 等のタンパク質が広く研究されてきた^{1,2)}。これらは多数の RNA に結合し、翻訳や RNA の安定性を調節することで細胞内の遺伝子発現を広範囲に制御する（図 1）。そのためグローバル RNA 結合タンパク質と呼ばれている。

近年、このグローバル RNA 結合タンパク質の仲間として、新たに KhpB というタンパク質が同定された。KhpB は多くの細菌に保存されており、細胞形態の制御や病原性遺伝子の発現調節に関与することが報告されている³⁾。特に、大腸癌や乳癌組織に局在し、それらの転移能獲得に影響する *Fusobacterium nucleatum*⁴⁾ において、KhpB が主要なグローバル RNA 結合タンパク質であることから注目されている⁵⁾。

KhpB は、RNA や DNA に結合することが知られている 2 種類のドメイン、KH ドメインと R3H ドメインを有する。両ドメインは RNA/DNA 結合タンパク質に頻繁にみられるドメインであるが、両ドメインが 1 つのタンパク質に共存する例は KhpB 以外には知られていない。

そこで筆者らは、KhpB がどのように RNA を認

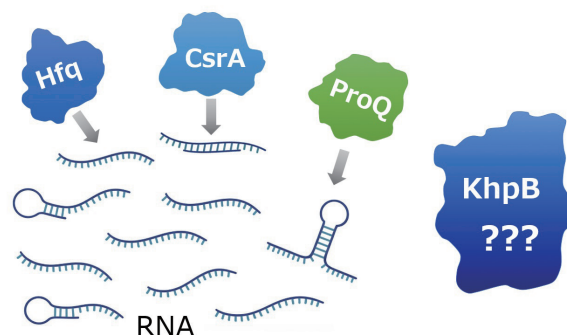


図 1 グローバル RNA 結合タンパク質

グローバル RNA 結合タンパク質は細胞内の幅広い RNA に結合し、病原性の発現等を含めた細胞の応答を制御する。これまでに知られていた Hfq, CsrA, ProQ 等は、その RNA 結合様式が知られていたが、新しく見つかった KhpB の結合様式は不明であった。

識するのかを理解するため、X 線結晶構造解析による研究を行った。

2. 研究手法

タンパク質の作用機序を理解するためには、その立体構造を原子分解能で明らかにすることが重要である。本研究では、X 線結晶構造解析を用いて KhpB の立体構造を解明した。解析には、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の KhpB タンパク質を用いた。*T. thermophilus* HB8 由来タンパク質は熱に安定で物理化学的解析に適しており、X 線結晶構造解析のためのモデル分子としてよく利用されている。この KhpB タンパク質を精製し結晶化を行い、得られた結晶について大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った。その結果、RNA が結合していない状態の KhpB の構造を約 3.0 Å 分解能で決

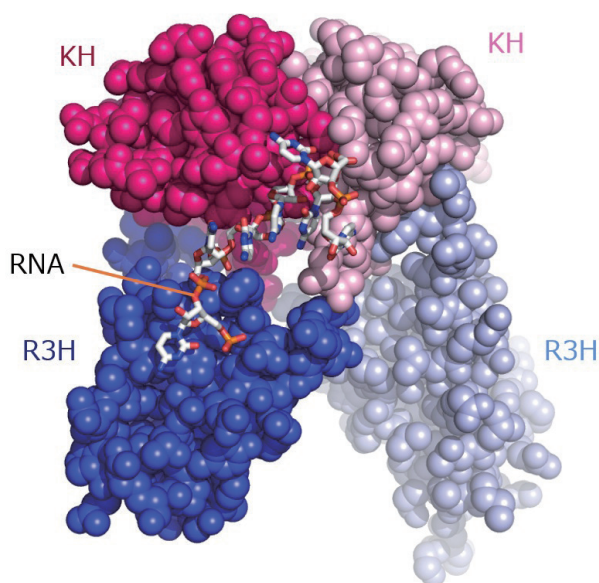


図2 RNA 結合型 KhpB の構造

KhpB タンパク質を球状モデルで、RNA を棒状モデルで表示した

定することに成功した⁶⁾。

続いて、KhpB による RNA 認識機構を明らかにするために、RNA が結合した状態での結晶を作製したが、得られた結晶は非常に小さく、回折の質も良くなかった。通常の X 線源では十分な回折データを得ることは困難な状況であったが、SPring-8 のビームライン BL38B1 における高輝度かつ高品質な X 線、及び高性能検出器と自動データ収集システムを活用することで、回折能の低い結晶からも良質な回折データを取得することに成功した。最終的に、KhpB と RNA との複合体構造を約 2.7 Å 分解能で決定することができた⁶⁾。

3. 研究結果

X 線結晶構造解析で決定された構造を溶液中での実験結果と照らし合わせた結果、KhpB は二量体を形成していることが分かった。この二量体の中央部分に RNA が結合する構造をとっていた (図 2)。特に興味深いのは、RNA が KH ドメインと R3H ドメインによって協調的に認識されていたことである。RNA の 5' 側は R3H ドメインによって結合し、3' 側は KH ドメインによって保持されていた。つまり、2 つの異なる RNA 結合ドメインが協力して 1 本の RNA 分子を捕捉するという、これまで知られていなかった新しい RNA 結合様式が明らかになった。

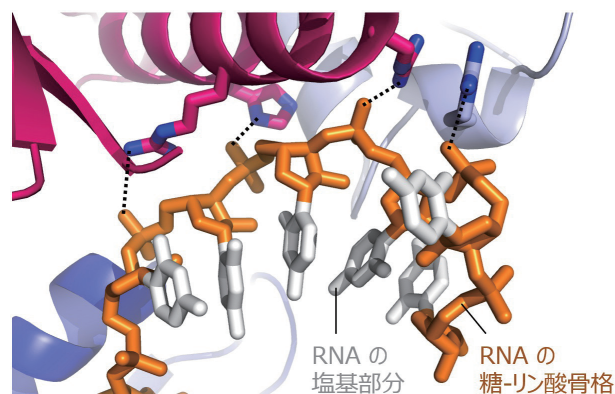


図3 KhpB と RNA の相互作用

KhpB をリボンモデルで、RNA を棒状モデルで表示した。KhpB と RNA の間に形成された水素結合及び塩橋を破線で示した

更に、この結合には RNA が少なくとも 7 塩基以上の長さを持つことが必要であることも分かった。これは RNA が 2 つのドメインの間を橋渡しするように結合するためである。この結果は、溶液中での RNA 結合実験の結果ともよく一致していた。このような協調的認識は、単一ドメインによる結合に比べて RNA に対する結合親和性を高めると共に、特異性の幅を広げている可能性がある。すなわち、グローバル RNA 結合タンパク質が多様な RNA 基質に柔軟に対応するための分子基盤を提供するものと考えられる。

また、KhpB は RNA の塩基配列よりも糖-リン酸骨格との相互作用を主としていることも明らかになった (図 3)。RNA の塩基部分の多くは溶媒側に露出しており、特定の塩基配列に依存しない結合様式であると考えられる。実際、溶液中での RNA 結合能解析実験により、異なる配列の RNA に対してほぼ同程度の強さで結合することが確認された。KhpB は塩基配列ではなく、RNA の高次構造を識別するのかもしれない。この可能性の検証が今後の課題のひとつである。

更に興味深いことに、RNA が結合すると KhpB の構造が変化することも明らかとなった。KH ドメインと R3H ドメインが協調的に RNA を認識することにより、両ドメイン間の溝が閉じる方向に動き、RNA を包み込むような構造へと変化していた (図 4)。このようなドメイン間の協調的結合によって誘起される構造変化は、RNA 結合の安定化に寄与するだけでなく、KhpB 二量体における RNA 結合に正の協同性をもたらし、一方のサブユニットへの RNA

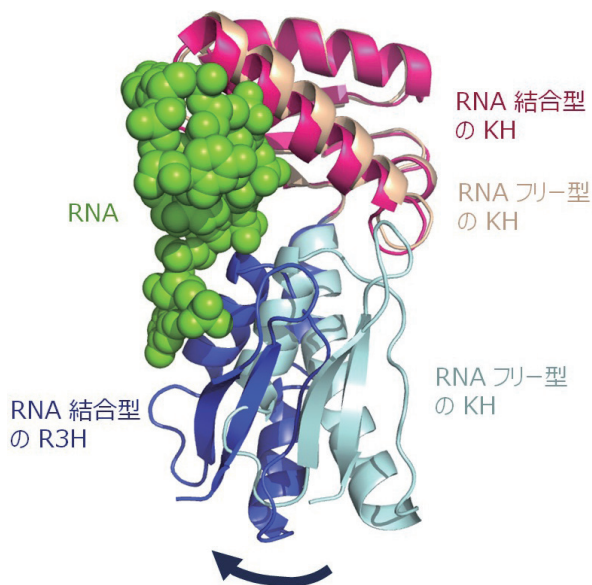


図4 RNA 結合に伴う KhpB の構造変化

RNA 結合型の構造に RNA フリー型の構造を重ね合わせた。KhpB タンパク質をリボンモデルで、RNA を球状モデルで表示した。簡略化のため、KhpB 二量体のうち、片方のサブユニットのみを表示した。KH 及び R3H ドメインの間の溝に RNA が結合することにより、溝が閉じる方向に構造が変化する

結合が他方のサブユニットでの結合を促進することが分かった。すなわち、正の協同性を成立させるためにはこの構造変化が不可欠であり、その構造変化は二つのドメインの協調的な結合によって初めて実現される。この仕組みにより、一定の条件を超えた際に RNA 結合が急激に進行することが可能となり、細胞の迅速な応答を支える分子基盤となっていると考えられる。

4. おわりに

KhpB は、*Fusobacterium nucleatum* を含む多様な病原性細菌に存在し、細胞形態や病原性の制御に関与することが知られている。そのため、本研究で得ら

れた KhpB の RNA 認識機構に関する知見は、細菌の遺伝子発現制御機構の理解を深めるだけでなく、新しい抗菌薬開発につながる可能性もある。

本研究は、大型放射光施設 SPring-8 の高輝度・高品質な X 線と最適化されたデータ取得系を基盤として初めて実現されたものである。放射光を用いた X 線結晶構造解析は、生命現象を分子レベルで解明する上で極めて有効な手法である。一方で、クライオ電子顕微鏡法による構造解析技術も近年著しい発展を遂げており、結晶化を必要としないという利点から、巨大複合体や膜タンパク質等の構造解析において大きな威力を発揮している。しかし、クライオ電子顕微鏡は小型タンパク質の解析には制約があり、本研究で対象とした KhpB のような小型のタンパク質に対しては X 線結晶構造解析が不可欠である。

本研究は、村川武志准教授（大阪医科薬科大学）、馬場清喜主幹研究員（高輝度光科学研究センター）、熊坂崇室長（高輝度光科学研究センター）、矢野貴人教授（大阪医科薬科大学）らとの共同研究として行われました。共同研究者の皆さまのご協力に感謝いたします。

参考文献

- 1) Holmqvist *et al.*, *EMBO J.*, **35**, 991-1011 (2016)
- 2) Melamed *et al.*, *Mol. Cell*, **77**, 411-425 (2020)
- 3) Michaux *et al.*, *Microlife*, **4**, uqac027 (2023)
- 4) Chen *et al.*, *Chem*, **10**, 1783-1803 (2024)
- 5) Zhu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **52**, 3950-3970 (2024)
- 6) Fukui, K., *et al.*, *Nat. Commun.*, **16**, 8028 (2025)

（奈良女子大学大学院生活環境科学系食物栄養学領域、大阪医科薬科大学医学部生化学教室）