総説

配列特異的RNA分解酵素の配列認識および分解制御機構

山口良弘 大阪市立大学複合先端研究機構

MazF is an mRNA interferase, which cleaves mRNAs in a sequence-specific manner, resulting in cellular growth arrest. During normal growth conditions, the MazF toxin is inactivated through binding to its cognate antitoxin, MazE. How MazF specifically recognizes its mRNA target and carries out cleavage and how the formation of the MazE-MazF complex inactivates MazF remain unclear. We determined crystal structures of MazF in complex with mRNA substrate and antitoxin MazE in *Bacillus subtilis*. In this review, I present the mechanism of the sequence-specific RNA recognition of MazF and the neutralization of MazF activity by MazE antitoxin.

Toxin-antitoxin system / mRNA interferase / MazF / RNA interference / cell death

1. Toxin-antitoxin system

真核生物ではアポトーシスは恒常性の維持, ストレスで傷ついた細胞や病原菌に感染した細胞の除去に必須である. 驚くことに, ほぼすべての原核生物にも数多くの toxin-antitoxin (TA) system と呼ばれる生育および細胞死を制御するシステムが存在し, 様々なストレス環境下での生存に重要であることが明らかになってきた^{1), 2)}. 一般的に toxin および antitoxin 遺伝子はそれぞれ約 100 アミノ酸残基の小さなタンパク質をコードし, オペロンを形成している. Toxin は, 他の細菌や感染した動物細胞を殺すのではなく, 菌体内で発現し宿主自身に対して毒性を示す. Toxin と対になる antitoxin は菌体内で複合体を形成し, toxin の毒性は通常の生育では中和されている. いくつかの antitoxin には toxin 結合部位とは別に DNA 結合部位が存在しており, 自身のプロモーター部位に TA 複合体として結合することで自身の転写を抑制している (図 1). Antitoxin は菌体内での半減期が短く不安定である一方, toxin は非常に安定なタンパク質である. ストレス下において antitoxin はプロテアーゼにより優先的に分解され, 複合体から toxin が遊離する. その結果, toxin により生育阻害さらには細胞死が引き起こされる. TA system は細菌および古細菌に広く保存されていることから, 自然界での生存に有用であると考えられる. Toxin は, おそらく生育速度の遅延, 生育阻害または部分的な細胞死を引き起こすことで環境変化への適応を促すのかもしれない. 大腸菌 *Escherichia coli* には少なくとも 33 の TA system が

存在する^{1), 2)}. 興味深いことに, 病原菌 *Mycobacterium tuberculosis* では 88 もの TA system が存在するのに対し, 近縁の非病原性細菌 *M. smegmatis* には 2 つの TA system しか存在しない³⁾. このことから, TA system は病原性に関与すると考えられる. さらに toxin は生育を停止させ, 細胞を薬剤のようなストレスに非常に強い耐性を示す休眠状態へ誘導することが示唆されている. よって TA system の研究は, 病原性細菌の多剤薬剤耐性機構の解明に非常に重要である. 一方で, 非病原性 *E. coli* に 33 もの TA system が存在することは非常に興味深い. おそらく TA system は, ストレス下での生存など正の役割に重要なために進化の過程で維持されてきたと考えられる. 個々の TA system および toxin のターゲットの同定, 作用機構および発現制御機構の解明を含む性質解析は, 原核生物のストレス環境下での生存能力, 病原性および進化の理解に必須である.

図 1
TA system モデル.

Sequence Specific RNA Recognition Mechanism of MazF

Yoshihiro YAMAGUCHI

The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology, Osaka City University

2. RNA 干渉酵素の発見

ここ 10 年の間に、RNA 干渉は分子生物学の分野で頻繁に用いられる技術となり、micro RNA (miRNA) や short interfering RNA (siRNA) は高等生物で遺伝子調節に重要な役割を果たすことが知られている^{4), 5)}。しかし、RNA 干渉の主要な原理および概念の最初の提唱は 1980 年代に大腸菌におけるアンチセンス RNA による遺伝子発現制御の発見からだったことはあまり知られていない⁶⁾。このアンチセンス RNA は micRNA (mRNA-interfering complementary RNA) と名付けられ、翌年にはアンチセンス RNA を用いて特異的な遺伝子発現制御が可能であることが証明された⁷⁾。この発見から 30 年過ぎた現在、我々はこれまでとは全く異なる RNA 配列特異的分解酵素による RNA 干渉機構を発見した。この RNA 分解酵素は RNA 干渉酵素 (mRNA interferase) と名付けられた。最初に同定された RNA 干渉酵素は *E. coli* の MazE-MazF TA system の toxin である MazF である⁸⁾。大腸菌の MazF が RNA の ACA 配列を特異的に認識し切断する RNA 分解酵素であることが証明されて以来、数多くの MazF homolog が同定され、それぞれ特異的に 3-5 塩基配列を認識する RNA 分解酵素であることが報告されている。しかし、特異的な遺伝子の発現制御には 3-5 塩基を切断する RNA 干渉酵素は RNA の認識配列が短すぎると思われる。その後、死海に生息する超好塩菌 *Haloquadratum walsbyi* の MazF は 7 塩基配列 UUACUCA を認識する RNA 干渉酵素であることが同定された⁹⁾。*H. walsbyi* のゲノム DNA を解析した結果、MazF 切断配列はバクテリオロドプシン転写促進因子や塩の排出ポンプに多く存在することが明らかとなった。本古細菌は膜に存在するバクテリオロドプシンを用い、光エネルギーを利用して ATP を合成し、生育に 3-4 M の NaCl を要求する。菌体内の NaCl 濃度は 1 M 程度であることが示唆されている。興味深いことに *H. walsbyi* MazF 活性は 400 mM 以上の NaCl によって強く阻害されたことから、*H. walsbyi* MazF は通常の生育環境下では不活化状態であると考えられる。本菌は薄いシートのような形態で、塩湖の水面に浮いた状態で生育し、効率的に太陽光からバクテリオロドプシンを介してエネルギーを生産している。この環境では降雨や川からの水の流入によって容易に低浸透圧ストレスが起こるであろう。このストレス環境下で、菌は水面に浮かんでおられず、細胞内の NaCl 濃度が減少する。その結果 *H. walsbyi* MazF が活性化され、ロドプシン転写促進因子や排出ポンプの発現を阻害することで必要のない ATP 生産、塩の排出

ポンプなどの発現を抑制し、低浸透圧ストレス環境下の生存に寄与すると考えられた。理論的に *H. walsbyi* MazF の切断配列は 16384 塩基に 1 つしか存在しない非常に特異性の高い酵素である。本酵素を用いて我々は、*H. walsbyi* MazF が大腸菌内で特定の遺伝子発現を抑制できることを証明した。これは、これまで知られている RNA を介した RNA 干渉とは全く異なる RNA 分解酵素による“タンパク質を介した RNA 干渉”の世界初の発見となった⁹⁾。

3. 枯草菌 *Bacillus subtilis* MazF

MazE-MazF TA system は最もよく研究されている TA system の 1 つである。MazF は一本鎖 RNA のみを配列特異的に切断し、二本鎖 RNA や DNA は切断しない⁸⁾。枯草菌 *Bacillus subtilis* にも MazE-MazF TA system が存在する。フランスの Dr. Condon のグループは、375 塩基の *thrS* RNA (スレオニン tRNA 合成遺伝子) を基質として用い、*B. subtilis* MazF は UAC 配列を切断することを報告した¹⁰⁾。しかし我々は、*B. subtilis* MazF と非常に高い相同性 (62.8% の一致度, 79.3% の相似度) を有する黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の MazF が UACA U 配列を認識することを見出していた¹¹⁾。そこで我々は、3500 塩基の MS2 phage RNA を用いて *B. subtilis* MazF の切断配列を再度解析した。その結果、*B. subtilis* MazF も *S. aureus* 同様に U⁺ACA U を特異的に切断する RNA 分解酵素であることを示した (U⁺; 切断箇所)¹²⁾。このように切断配列や、*E. coli* MazF および *B. subtilis* MazF 単独の構造は明らかになっていたが、MazF がどのように特定の配列を認識するのか、反応機構はどうなっているのか、またどのように MazE-MazF 複合体では MazF 活性が阻害されているのかは長い間不明であった。そこで我々は、*B. subtilis* MazF と切断配列 UACA U を含むが MazF で切断されない一本鎖 RNA 複合体の構造解析に取り組んだ。*B. subtilis* MazF の RNA 認識および切断機構をより詳細に解析するために、得られた構造解析の結果から RNA 認識に重要と考えられたアミノ酸をアラニンに置換した *B. subtilis* MazF 変異体を作成し解析を行った。さらに、MazE-MazF 複合体の構造を解析し MazF-RNA 複合体と比較することでどのように MazE が MazF の活性を阻害しているのかを明らかにした¹³⁾。以下、その詳細について解説する。

4. *B. subtilis* MazF の配列特異的 RNA 認識機構

前述のように ACA 配列特異的に切断する *E. coli* MazF

図 2
MazF-RNA 複合体構造。ピンクおよびシアンは MazF 二量体をイエローは RNA を表す。矢印は MazF による RNA の切断部位を示す。

の発見以来、数多くの 3, 5, さらに 7 塩基配列を特異的に切断する MazF homolog が発見された²⁾。しかし、MazF の特異的な RNA 配列認識機構および切断機構は不明であった。我々は *B. subtilis* MazF の配列特異的な RNA 認識機構を解明するために UACAU 配列を含む RNA と結合した MazF の構造を解析した¹³⁾。MazF-RNA の複合体において 5 塩基 (UACAU) 配列を含む RNA の塩基部位が MazF タンパク質と非常に強固に結合しており、phosphate backbone はタンパク質の反対側 (外側) を向いていることが明らかとなった (図 2)。よって MazF は主に RNA の塩基部位と結合し、特異的な配列を認識すると考えられた。*B. subtilis* MazF の配列と同様に他の MazF homolog でも RNA 基質は二量体の境界部位に結合し、重要なアミノ酸残基はベータ 1 と 2 および 3 と 4 の間に形成される 2 つのループ部位に存在すると考えられる (図 2)。

5. MazF 活性中心および RNA 切断機構

MazF-RNA 複合体の構造からこれまで不明であった活性中心の位置が同定された。MazF によって切断される RNA の dU3 および A4 間のリン酸エステル結合は Arg25 さらに別方向から伸びる Thr28 と Asn50 の側鎖によって覆われており、それぞれと水素結合を形成している。特に Arg25 または Thr48 は MazF homolog 間で高度に保存されており、これらアミノ酸残基の Ala 置換は MazF 活性を消失させたことから RNA 切断に重要な役割を果たしていると考えられる。*E. coli*

MazF の切断部位は 2'3'-cyclic phosphate および 5'-OH を生じる⁸⁾。この結果から、MazF の RNA 切断機構は RNase A や RNase T1 と類似しており、酸塩基触媒であることが示唆されてきた。しかし、RNase A とは異なり、*B. subtilis* MazF は活性中心部位にヒスチジン残基のペアが存在せず、変異体を用いた実験から *B. subtilis* MazF では His59 と Gln78 が酸塩基触媒として機能していることが示唆された。

6. MazE-MazF の構造

MazF および MazE はそれぞれ二量体を形成し、MazE-MazF 複合体は $\text{MazF}_2\text{-MazE}_2\text{-MazF}_2$ のヘテロヘキサマーである点では *E. coli* および *B. subtilis* の MazE-MazF 複合体は類似しているが、その四次構造および MazE の構造は全く異なっている (図 3)^{13), 14)}。*B. subtilis* MazE は N 末端に Ribbon-Helix-Helix (RHH) モチーフ (DNA 結合部位) を有し、C 末端側のヘリックス構造を介して MazF と結合している。一方、*E. coli* MazE は N 末端にベータパレルのコアを有し、MazF とは C 末端に位置する酸性アミノ酸残基を多く含む長いループ部位を介して結合している。両 MazF は二次構造および三次構造の相同性を有している。しかし両種間の MazE アミノ酸配列および構造は全く異なることから、antitoxin

図 3
B. subtilis および *E. coli* MazE-MazF 複合体構造。

はそれぞれの MazF に対して独立して進化したと考えられる。この推測は *E. coli* MazE が *B. subtilis* の MazF 活性を中和できない結果からも支持される。

7. MazE による MazF 活性阻害機構

MazF-RNA 複合体および MazE-MazF 複合体中の MazF 構造を重ねあわせた結果、なぜ MazE-MazF 複合体では MazF の RNA 分解活性が阻害されるかが判明した (図 4)。重ねあわせた構造から A4-A9 部位の RNA 残基と MazE のヘリックス部位が重なっていることが明らかとなった。MazE タンパク質と MazF タンパク質間の結合面 ($2,843 \text{ \AA}^2$) は MazF-RNA 間の結合面 ($2,153 \text{ \AA}^2$) より広いことから、MazF は RNA よりも MazE に対してより高い親和性を有すると考えられる。*B. subtilis* MazE-MazF 複合体で MazE は RNA 結合部位である MazF 二量体の境界面に沿って結合し、加えて、RNA 結合に関与するベータ 1-2 間に存在するループの位置を変化させることで MazF の RNA 結合を阻害すると考えられた (図 4)。このように、1 つの MazE が 1 つの MazF 二量体の RNA 結合および切断活性を阻害することが示された。また拮抗阻害の結果からも、MazF は RNA よりも MazE に対して高い親和

図 4 MazF (グリーン)-RNA 複合体および MazF (オレンジ)-MazE 複合体の重ねあわせ像。パープルは MazE、イエローは RNA を表す。MazF-RNA のベータ 1-2 間のループ (レッドの実線) 部位は MazE-MazF 複合体 (レッドの点線) では RNA とは離れていることが分かる。

性を有することが示された。このように、MazE の存在下では MazF は RNA と結合することができず、活性も阻害されていることが示された。

以上、TA system の 1 つである MazE-MazF について最新の知見を解説したが、TA system はまだまだ不明な点が多い。今後、さらに興味深い結果が出てくると考えている。

文 献

- 1) Yamaguchi, Y. *et al.* (2012) Nat. Rev. Microbiol. **19**, 779-790. DOI: 10.1038/nrmicro2651.
- 2) Yamaguchi, Y. *et al.* (2011) Annu. Rev. Genet. **45**, 61-79. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132412.
- 3) Pandey, D. P., Gerdes, K. (2005) Nucleic Acids Res. **33**, 966-976. DOI: 10.1093/nar/gki201.
- 4) Ambros, V. (2001) Cell **107**, 823-826. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00616-X.
- 5) Billy, E. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 14428-14433. DOI: 10.1073/pnas.261562698.
- 6) Mizuno, T. *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1966-1970.
- 7) Coleman, J. *et al.* (1985) Nature **315**, 601-603.
- 8) Zhang, Y. *et al.* (2003) Mol. Cell. **12**, 913-923. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00402-7.
- 9) Yamaguchi, Y. *et al.* (2012) Nat. Commun. **3**, 607. DOI: 10.1038/ncomms1621.
- 10) Pellegrini, O. *et al.* (2005) Mol. Microbiol. **56**, 1139-1148. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04606.x.
- 11) Zhu, L. *et al.* (2009) J. Bacteriol. **191**, 3248-3255. DOI: 10.1128/JB.01815-08.
- 12) Park, J. *et al.* (2011) FEBS Lett. **585**, 2526-2532. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.07.008.
- 13) Shimanshu, D. K. *et al.* (2013) Mol. Cell **52**, 447-458. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.09.006.
- 14) Kamada, K. *et al.* (2003) Mol. Cell **11**, 875-884. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00097-2.

山口良弘

山口良弘 (やまぐち よしひろ)

テニュアトラック特任准教授
東北大学大学院農学研究科博士課程後期修了。農学博士。2006 年ラトガース大学博士研究員、10 年ラトガース大学 research teaching specialist III を経て 14 年より現職。

研究内容: TA system の生理的役割の解明および toxin を用いたアプリケーションの開発
連絡先: 〒 558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138
E-mail: yamaguchi@ocarina.osaka-cu.ac.jp
URL: <http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/site/yamaguchiWelcome.html>