

新規 tRNA アンチコドンヌクレアーゼの立体構造解析による特異性認識機構の解明

Characterization of a novel ribonuclease targeting a specific group of tRNAs by protein crystallography

研究代表者 東京農業大学 応用生物科学部バイオサイエンス学科

講師 矢嶋俊介

Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture

Assistant professor, Shunsuke YAJIMA

Crystal structure of the ribonuclease domain (CRD) of colicin E5 complexed with its specific inhibitor (Imm) was determined at resolution of 1.9 Å. Although CRD does not show any homologies in the primary sequence with other proteins, its structure shared a common folding feature with well-known ribonucleases, such as RNase A, or T1. On the other hand, only two proteinaceous ribonuclease inhibitors have known with their structures. Imm had an antiparallel β -sheet as a main motif, which is distinguished from other two inhibitors composing of parallel β -sheets. Further, the binding mode of Imm with CRD suggests that Imm may mimic a tRNA anticodon loop that CRD targets specifically.

1. 研究目的

大腸菌が生産する殺菌性タンパク質のコリシンは感受性菌への侵入経路、活性の発現形態によりいくつかのファミリーに分類されている。また、生産菌は発現したコリシンによる自殺を防ぐために阻害タンパク質も同時に発現し、コリシンは複合体を形成している。このファミリーの一つであるコリシン E5 は、タンパク質合成を阻害し殺菌活性を示す。その阻害機構はアンチコドンの一文字目と二文字目間の切断であり、しかも標的となるのは一文字目に G の修飾塩基である Q をもつ Asn, Asp, His, Tyr の tRNA のみである。このように、E5 は非常に特異的な RNase 活性を持つが、一方でその一次構造上には通常ヌクレアーゼ活性に必須と考えられている His 残基

が存在しない。

そこで本研究では、X 線結晶構造解析によりコリシン E5 と阻害タンパク質との複合体の立体構造を明らかにし、1) Q 特異的な tRNA 分子認識機構の解明、2) His 非依存性ヌクレアーゼ活性発現機構の解明、3) 阻害タンパク質との蛋白質間特異的分子認識機構の解明、を目指した。

2. 研究経過

2-1. 方法

タンパク質の発現と精製

RNase 活性が局在するコリシン E5 の C 末端領域 (CRD) と、阻害タンパク質 (Imm) を大腸菌中に大量発現させた。CRD は 115 残基、Imm は 108 残基で構成されている。

大腸菌菌体を超音波破碎後、上清から Phenyl-Toyopearl (10 mM potassium phosphate, pH 7.0), DEAE-Toyopearl (20 mM TrisCl, pH 8.5)の各カラムクロマト操作により CRD-Imm の複合体精製標品を得た。これを、Centricon により濃縮を行い次の結晶化に用いた。

タンパク質の結晶化

ハンギングドロップ蒸気拡散法を用い、20°C において以下の条件下で約 0.1x0.1x0.3 mm の柱状結晶を得た。

バッファー 20 mM TrisCl, pH 8.0

沈殿剤 2 M Ammonium sulfate

強度データの収集

上記の方法で得られた結晶を用い、回折強度データの収集を行った。データ収集には DIP-2030 (マックサイエンス社)を用いた。その後、Denzo, Scalepack の各ソフトウェアによりデータの処理を行った。

重原子同型置換体結晶の作製

コリシンは、データベース上に類似タンパク質が存在しないため、構造解析のためには位相問題の解決が必要となる。そのために、重原子同型置換体結晶の作製を行った。10 mM メルサリル酸に6日間、あるいは13 mM K_2PtCl_6 に11日間結晶を浸せきした。

位相決定と構造の精密化

重原子置換体結晶の回折強度データを元に、ソフトウェア CCP4 suite の mlphare により初期位相の決定を行った。その後、dm による位相改良を行い、Quanta により電子密度図へのモデルの組立を行った。得られたモデルは X-PLOR により精密化を行った。

2-2. 結果と考察

得られた回折データを元に、2.0Å 分解能で初期位相の決定を行い、モデルの組立を行っ

た。その後、X-PLOR により構造の精密化計算を行い、102 個の水分子を含み、1.9Å 分解能で R 因子が 17.2%まで収束した。その結果得られた CRD-Imm 複合体の構造を Figure 1 に示した。また、精密化の統計的データは Table I に示した。得られた構造において、その2面角が理論値とどの程度一致しているかを示す Ramachandran plot において、92.2%が most favored region, 7.2%が additional allowed region にあり、1 残基のみが generously allowed region に存在した。

CRD の構造

CRD の立体構造は5本鎖からなる逆平行β-sheet とその背中に位置する2本のα-helix からなっていた。2本のβ-strand が長く伸びることで C 末端のループ部分と共にポケットを形成していた。CRD の一次配列はデータベース上のどのタンパク質とも相同性が得られないが、この構造は RNase A や T1 などの一般的な RNase に見られるα+β folding であることが明らかとなった。α+β folding

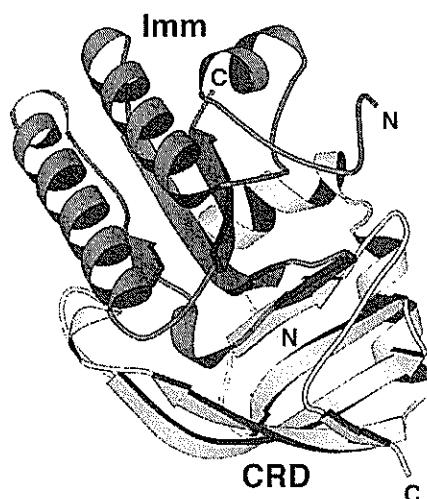


Figure 1. Ribbon diagram of the CRD-Imm complex structure.

をとる RNase は微生物由来の RNase T1 (*Aspergillus oryzae*) や barnase (*Bacillus amyloliquefaciens*), 脊椎動物由来の RNase A (bovine pancreas) の 2 群にさらに分類される。それぞれの構造的特徴としては、短い β -sheet と一本の α -helix からなる微生物由来の RNase に対し、脊椎動物由来の RNase には長くカーブした β -sheet と 3 本の α -helix が見られる。興味深いことに、CRD には 5 本の β -strand のうち 2 本は長く伸び大きくカーブしていた。また、 β -sheet の裏側には 2 本の α -helix が存在した。今回の解析では CRD の N 末端 14 アミノ酸に関して電子密度図が得られなかったため、さらにその中に α -helix が存在する可能性も否定できない。このように、CRD は大腸菌由来の RNase で有りながら、その構造的特徴は脊椎動物に近いことが

明らかとなった。Figure 2 に RNase A, RNase T1 との構造の比較を示した。

活性部位

CRD は RNase 活性を持つが、その一次構造上には通常の RNase で触媒残基である His が存在しない。このことから、CRD が通常の RNase 触媒機構とは別の反応機構を持つ可能性が考えられる。CRD の表面電荷を解析したところ、長くカーブした 2 本の β -strand と C 末端のループが作るポケットの上部に Arg, Lys 残基のクラスターが存在した。また、CRD にはこのポケット領域以外に基質が入り込む可能性がある cavity が見られないため、この部分が活性部位で有る可能性が高いと考えられる。具体的なメカニズムの解明には更なる、生化学的、分子生物学的解析を含めた研究が必要である。



Figure 2. Structure comparison among RNase T1 (left), CRD (center) and RNase A (right) by ribbon diagram.

Imm の構造

現在までに RNase 阻害タンパク質として構造が明らかになっているものは 2 種類しかない。それは *B. amyloliquefaciens* 由来の barstar と porcine pancreas 由来の ribonuclease inhibitor である。それらは、RNase の場合とは異なり、その起源の違いにより大きさや全体の構造が大きく異なって

いる。しかしながら、その中に共通してみられる特徴が、平行 β -sheet を持ち α -helix を背中に背負うような形を取っている点である。これに対し Imm は、大きさでは barstar に近いものの逆平行 β -sheet を主たるモチーフとする点で、前 2 者と大きな違いが見られた。一方、その sheet の片面に helix を背負う形には共通点が見られた。

Data collection	Native	K ₂ PtCl ₆	Mersaryl acid
Space group	<i>I</i> 222		
Resolution (Å)	1.86	2.4	1.86
Redundancy	6.1	8.2	7.4
Completeness (%)	92.7	93.5	97.9
R _{merge}	0.040	0.059	0.076
R _{csmls}		0.51	0.68
Phasing power		1.4	0.9
Figure of merit (3.1Å)	0.48		
Resolution range (Å)	20-1.9		
R	0.172		
R _{free}	0.211		

Table I. Summary of x-ray data collection and refinement statistics.

阻害タンパク質と RNase との阻害形式を見てもみると、porcine inhibitor がβ-strand の端とそれにつながるループ部分で RNase の活性部位に結合し、barstar はα-helix の端からそれにつながるループ部分で結合する。Imm の場合、CRD の活性部位がまだ明らかになっていないが、先に述べたように塩基性残基が集まっているポケットが、活性部位である可能性が高いと考えられる。その場合、Imm は strand の端とループ、あるいは helix の端とループの部分のを会して活性部位と結合していることになる。さらに Imm の場合、CRD のポケットにはまりこむように、比較的長いループ（短い strand と helix を含み）が存在している。これは、ちょうど CRD の基質である tRNA のアンチコドンループがこの位置に結合する可能性を示唆していると考えられる。もし、実際にアンチコドンループが結合する場合、Imm は tRNA のループを分子擬態していると言えるであろう。近年、タンパク質が核酸の構造を分子擬態する例がいくつか報告されている。特に、ウラシル DNA グリコシダーゼの阻害タンパク質の場合、DNA 二重鎖を正確に擬態することで活性中心のポケットに結合することが示されている。おそらく Imm の場合も CRD の基質である tRNA を擬態することで阻害活性を発現して

いると予想された。

3. 研究成果

X線結晶構造解析によりコリシン E5 の CRD と Imm の立体構造を初めて明らかにした。その結果、CRD は一次配列の相同性は無いものの一般の RNase と構造的に類似性が見られた。また、その構造が微生物由来の RNase より脊椎動物由来のそれに近いという興味深い結果が明らかとなった。阻害タンパク質の Imm は今までに知られている2種類の RNase 阻害タンパク質とはモチーフの違いが見られ、新規の構造と考えられた。また、tRNA のアンチコドンループを分子擬態し活性を阻害している可能性が高いと考えられた。

4. 今後の課題と発展

今回の結果では、CRD の活性中心を正確に同定することは困難であった。今後は基質やその類似体との共結晶を得ること、また変異体の作製などにより、活性のメカニズムを解明したい。Q 修飾された tRNA は細胞のガン化や分化においてその発現量が変わることが知られており、コリシン E5 を用いた診断薬等の開発の可能性も探っていきたい。

5. 発表論文リスト

本報告にまとめた内容を投稿準備中である。