

論文題目

セルフスプライシング リボザイムであるグループ I イントロンのグアノシン認識機構

氏名 北村彩

グループ I イントロンは初めて発見されたリボザイムであり、セルフスプライシング反応を行う。グループ I イントロンのセルフスプライシング反応は二段階のエステル転移反応からなる。一段階目の反応は、イントロン中に保存されたグアノシン結合部位 (GBS) に、遊離のグアノシンが結合することにより引き起こされる。このエステル転移反応により、5'スプライス部位の切断が起こる。二段階目の反応は、イントロンの3'末端に保存されたグアノシン残基 (ω G) が前述のグアノシンと置き換わり、GBS に結合することにより引き起こされる。このエステル転移反応により、3'スプライス部位が切断され、5'エキソンと3'エキソンが連結する。二段階目のエステル転移反応は、一段階目の反応の逆反応であることから、両段階の反応を引き起こすグアノシン結合の機構も同じであると考えられる。このグアノシン認識の機構については様々な解析が試みられている。Michel ら (1989) は、基質であるグアノシンが、P7 ヘリックス中の G264•C311 塩基対と相互作用することを示した。また、Golden ら (1998) によりグループ I イントロンの GBS を含む領域の X 線結晶構造解析も試みられているが、原子分解能レベルでのグアノシン結合の機構はまだ明らかになっていない。渡部ら (1996) は、二段階目のエステル転移反応時のグアノシン結合部位を再現するようなモデル RNA (P7/P9.0/G; 図 1A) を構築し、変異体の融解温度の比較からこのモデル RNA がグループ I イントロンと同じ基質特異性を保持していることを確かめた。本研究では、さらに、原子分解能レベルでのグアノシン結合機構の解明を目的とし、NMR 法により適した 22 残基のモデル RNA (GBS/ ω G; 図 1B) を構築し、構造を決定

した。

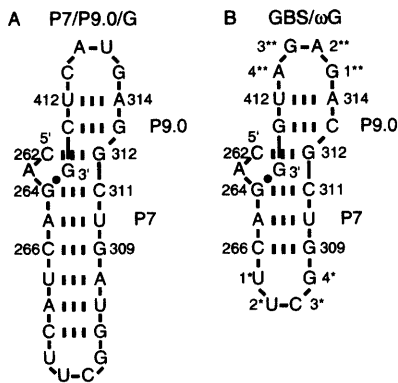


図1 モデルRNAの二次構造

スペクトルから、帰属を行い、構造情報を得た。ωG のイミノプロトンと G264 のイミノプロトンの間の NOE, ωG のイミノプロトンと C311 のアミノプロトンの間の NOE は、ωG と G264•C311 塩基対との三重塩基対の形成を示唆する。

NMR 情報を元に、XPLOR を用いて 400 個の構造を計算し、最もエネルギーの低い 10 個の構造について解析した。全体の構造の収束は良くない (r.m.s.d. = 3.26 Å) が、部分構造については、十分な精度で決定された。P7 ヘリックスと UUCG テトラループ部分の r.m.s.d. は、0.97 Å, P9.0 ヘリックスと GAGA テトラループの r.m.s.d. は、1.20 Å である。本研究の目的である GBS 領域の r.m.s.d. は、1.48 Å である。二つのテトラループの構造は、既に発表されている RNA 分子中の構造と同じであった。

ωG は、G264 との間の二つの水素結合により、G264•C311 塩基対と三重塩基対を形成している (図 2A)。さらに、C262 が ωG にスタッキングし、ωG の結合を安定化している (図 2B)。C262 の H5 レゾナンスの高磁場シフト (4.63 ppm) は、ωG のプリン塩基による環電流効果であると考えられる。バルジである A263 の塩基は、P7 ヘリックスの major groove 側に位置するが、他の残基との相互作用は認められなかった。A263 を挟む二つの塩基対 (C262•G312, G264•C311) 間の twist angle は大きい ($39 \pm 8^\circ$)。この角度により、ωG と G•C 塩基対との間の三重塩基対の形成と、C262 の ωG に対するスタッキングが同時に存在することが可能になっている。我々は、このグアノシン結合部位を BT ポケット (Bulge and Twist pocket) と名付けた。また、P7 ヘ

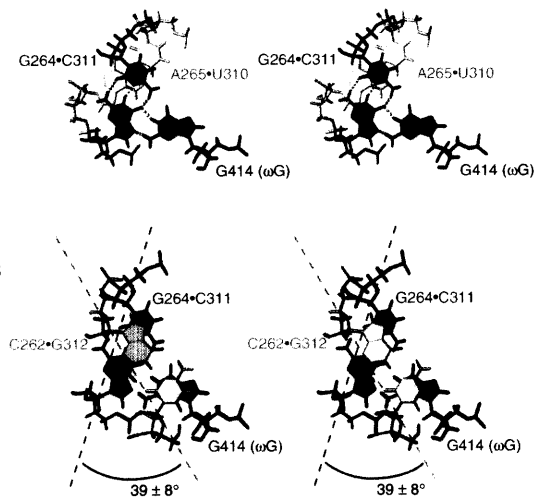


図2 GBS/ωGの三次元構造

リックスと P9.0 ヘリックスの間にある二つの塩基対 (G413•C313, C262•G312) 間の twist angle も大きく ($46 \pm 9^\circ$), この結果, P7 と P9.0 の間でヘリックスの軸が曲がっていた. これらの GBS 領域の構造の特色は, グループ I イントロンの変異体解析や, 低分解能での X 線結晶構造解析の結果と一致する. このことは GBS/ ω G が, グループ I イントロン中の GBS と同じ構造を保っていることを示す. 本研究は, GBS/ ω G の構造を決定することにより, グループ I イントロンのグアノシン認識機構を原子分解能レベルで決定し, 様々な生化学的な実験結果の構造的基盤を明らかにした.

A265•U311 塩基対を G265•U311 塩基対に置換した変異体は, 基質としてグアノシンよりも 2,6 ジアミノプリン (2,6-DAP) を好むという実験結果が, Yarus らによって発表されている. Yarus らは, この実験結果から, 基質グアノシンと A265 との相互作用を提案した. しかしながら, GBS/ ω G では, ω G と A265•U311 塩基対との間の相互作用は見られない. そこで, 上記の Yarus らによる実験結果を検証するために, GBS/ ω G の構造を基に, *in silico* でこの変異体のモデルを構築した. このモデル体から, 2,6-DAP は, A265G 変異体に対して結合し得るが, その結合の機構は, GBS に対するグアノシンの結合とは違うということを示した.

グループ I イントロン中の GBS はグアノシンのグアニジノ基に結合するが, 同様にグアニジノ基を持つアルギニンにも結合する (図 3). HIV TAR RNA も tat タンパク質中のアルギニン残基を結合する. GBS と同じく TAR RNA も, G•C 塩基対がグアニジノ基と水素結合を組むことでアルギニンを認識する. 結合する基質は違うものの, TAR RNA のアルギニン結合ポケットも, GBS の BT ポケットと共通の構造をとる. さらに, 16S rRNA 中にも BT ポケット様の構造がある. そこではシチジン残基 (C1200) が, 同一分子内の離れた部分にある BT ポケットに結合している. この BT ポケット中で, C1200 は, C•(A•U) 三重塩基対を組むことにより認識されている. このことは, BT ポケットが, 三重塩基対の多様性を用いて, 他種類の基質を認識し得ることを示している. 23S rRNA 内のアデノシン残基 (A2612) も, 同一分子内にある BT ポケットと結合している. その際, A2612 は A•(A•U) 三重塩基対を組む. このように, BT ポケットは, グループ I イントロンのように遊離の基質を結合するだけでなく, RNA のフォールディングにも用いられている. まだ構造が決定されていない RNA 分子内にも, BT ポケットが存在し, 多様な役割を果たしている可能性がある.

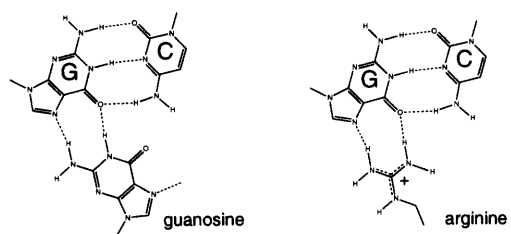


図3 GBSに対する基質の結合の模式図