

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト AUH (AU-binding homologue of enoyl-CoA hydratase)の X 線結晶構造解析

氏名 栗本 一基

遺伝子発現の転写後の制御は、真核細胞の生長・分化に必須である。この制御には、pre-mRNA の核内でのスプライシングやポリアデニル化、成熟 mRNA の核細胞質間輸送、細胞質内での局在、安定化、分解など、mRNA への様々な制御が関わっている。これらの全ての過程で、多くの RNA 結合タンパク質が重要な働きをしている。したがってタンパク質と RNA の相互作用のメカニズムを明らかにすることが、遺伝子発現の多様な制御機構を理解するためには必要不可欠である。

RNA 結合タンパク質の中には、いくつかの保存性の高い RNA 結合ドメインが知られている。これらの RNA 結合ドメインに関しては研究が進んでおり、RNA と相互作用する機構が明らかにされつつある。その一方で、既知の RNA 結合ドメインをもたずに RNA に結合するタンパク質も数多く知られており、タンパク質と RNA の相互作用には、まだ明らかにされていない多様な機構が存在していると考えられる。既知の RNA 結合ドメインをもたないで RNA に結合するタンパク質の中には、RNA の代謝に関わりのない酵素活性を有するものが、主として哺乳類で見いだされている。これらのタンパク質は、human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mammalian thiolase, yeast NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase, rat catalase, human dihydrofolate reductase, bovine glutamate dehydrogenase のように、もともと知られていた酵素活性に加えて新たに RNA 結合能が見いだされたタンパク質と、iron regulatory protein-1, -2 (IRP-1, IRP-2) (mammalian aconitase homologue)や AU-binding homologue of enoyl-CoA hydratase (AUH)のように、ある酵素 (IRP-1, -2 の場合は aconitase, AUH の場合は enoyl-CoA hydratase)のホモログであるタンパク質が知られている。

AUH は、mRNA の AU-rich element に結合する RNA 結合タンパク質として発見された。AUH は、脂肪酸の β 酸化を触媒する酵素 enoyl-CoA hydratase と 32% のアミノ酸配列上の相同性を有しており、弱い活性を持っている。また、欠失変異体の解析から、N 末端付近のリジン残基に富む 20 アミノ酸残基 (R ペプチド) が RNA 結合能を持つことが報告されている。AUH のホモログである enoyl-CoA hydratase には RNA 結合能は見出されていないので、AUH がどのようにして RNA に結合しているのかは非常に興味深い問題である。私は AUH が RNA に結合する機構を立体構造から明らかにするために、ヒト AUH の X 線結晶構造解析をおこなった。

AUH タンパク質は GST との融合タンパク質として大腸菌内で大量発現させ、プロテアーゼをもちいて GST から切り離して調製した。沈殿剤として PEG 8000 をもちいた条件で $0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm}$ の単結晶を得た。AUH と 6 ヌクレオチドの RNA, AUUUAG を混合した試料でのみ良質の結晶が現れたが、後述するように、最終的な電子密度図中にはこの RNA を見出すことはできなかった。この結晶は空間群 $P2_1$ に属し、格子定数は $a = 79.13 \text{ \AA}$, $b = 132.07 \text{ \AA}$, $c = 80.04 \text{ \AA}$, $\beta = 108.14^\circ$ であった。すでに結晶構造の解かれている rat enoyl-CoA hydratase の 6 量体をサーチモデルとした分子置換法によって初期位相を決定した。初期位相から計算した電子密度では、アミノ酸配列の保存性が最も高い、活性部位の周辺に 2 次構造を見出すことができた。非結晶学的対称性にもとづく averaging をおこなった density modification により、電子密度が著しく改善された。最終的に、分解能範囲 $30 - 2.2 \text{ \AA}$ までのデータをもちいて構造を精密化した ($R_{\text{work}} = 20.7\%$, $R_{\text{free}} = 25.3\%$)。しかしながら、結晶化の際に加えた RNA の電子密度を見出すことはできなかった。

AUH の結晶構造を図 1 に示す。AUH は 2 つの 3 量体からなる 6 量体を形成していた。個々のサブユニットの構造は enoyl-CoA hydratase と類似しており、enoyl-CoA hydratase/isomerase superfamily に典型的なフォールドをとっていた。すなわち、N 末端から順に、Spiral ドメイン、Trimerization-1 (T1) ドメイン、Connecting helices、Trimerization-2 (T2) ドメインという 4 つのドメイン構成をしていた (図 2)。R ペプチドの大部分は、Spiral ドメインに属する α -ヘリックス H1 に含まれていた。また、AUH の 3 量体は enoyl-CoA hydratase と同様に、T1 ドメインと T2 ドメインの相互作用により形成されていた。

一方で、3 量体が 2 量体化する様式は、enoyl-CoA hydratase とは若干異なっていた。3 量体の 2 量体化には、どちらのタンパク質でも、T2 ドメイン同士の

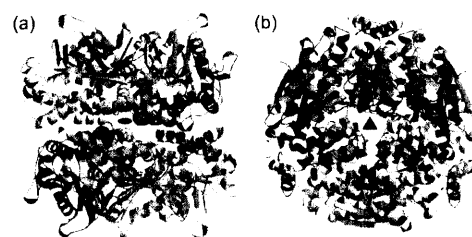


図1 AUHタンパク質の結晶構造。AUHは2つの3量体からなる6量体を形成していた。

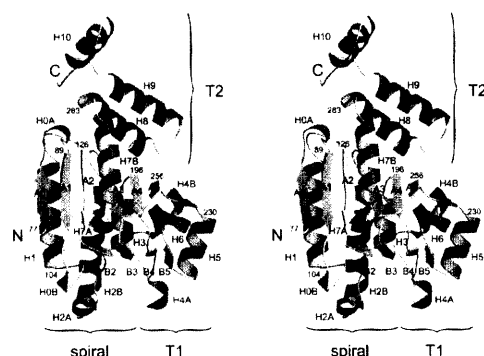


図2 AUHのサブユニットの構造 (ステレオ図)

3 量体間相互作用が大きく寄与していたが, enoyl-CoA hydratase では, それに加えて Spiral ドメインに属する α -ヘリックス H2B が寄与していた. 一方で, AUH の α -ヘリックス H2B は 3 量体の 2 量体化には関わっていなかった. このため AUH の 3 量体同士の間には幅の広い溝が形成されていた (図 3). また, AUH と enoyl-CoA hydratase の表面電荷にも著しい違いがあった. Enoyl-CoA hydratase の 6 量体の表面に負の電荷が分布しているのとは対照的に, AUH の 6 量体の表面には正の電荷が分布していた (図 4).

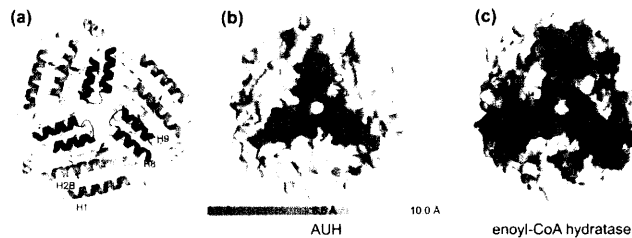


図3 相手側の3量体からの距離 (a) AUHの3量体のリボンモデル. 視点は相手の3量体の側にある. (b) AUHの表面モデル. 相手の3量体からの距離に応じて色づけした. (c) enoyl-CoA hydrataseの表面モデル.

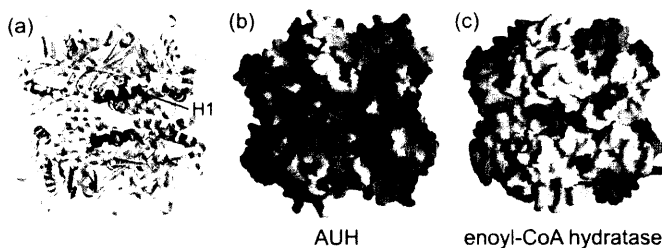


図4 AUHと enoyl-CoA hydrataseの表面電荷 (a) AUHの6量体のリボンモデル. α -ヘリックスH1を黒で示した. (b) AUHの表面モデル. 正の電荷を黒で, 負の電荷を白で示した. (c) enoyl-CoA hydrataseの表面モデル

R ペプチドの大部分を含む α -ヘリックス H1 は, 3 量体間に形成される溝の外縁部に位置しており, 4つのリジン残基 (Lys¹⁰⁵, Lys¹⁰⁹, Lys¹¹³, Lys¹¹⁹)によって正の電荷を有していた. これらのリジン残基は α -ヘリックス H1 のそれぞれのターンに出現して規則正しく並ぶ特徴的な構造をしていたので, "lysine comb"と命名した (図 5). また, 3 量体間の溝は, RNA の塩基を受け入れるのに十分な空間的余裕を持っていた. これらのことから, AUH は RNA のリン酸基を lysine comb で連続的に認識し, RNA の塩基を 3 量体間の溝の内側で認識するのではないかと考えられた. 実際, lysine comb の3つのリジン残基 (Lys¹⁰⁵, Lys¹⁰⁹, Lys¹¹³)を, enoyl-CoA hydratase において対応するアミノ酸残基 (Asn⁶³, Glu⁶⁷, Gln⁷¹)に置換した変異体は RNA 結合能を失った. 一方で, この変異体は野生型と同程度の酵素活性を保持していた. RNA との結合に必要な lysine comb が 6 量体の周りを取り囲むように位置していることから, RNA は AUH の 6 量体

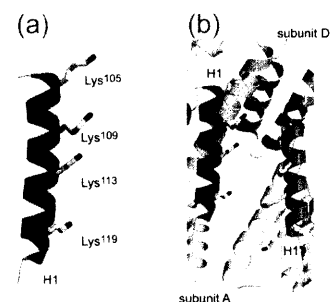


図5 lysine combの構造 (a) lysine combのリジン残基. (b) 3量体間の溝を挟んで向かいあう2つのlysine comb

に巻き付いて結合するのではないかと考えられる。

さらに、AUH の活性ポケットの構造を enoyl-CoA hydratase と比較した。ポケットの構造は全体としては類似しており、保存されている活性残基もよく重ね合わせることができた。一方で、脂肪酸側鎖と直接相互作用しうるポケットの底部の構造は、AUH と enoyl-CoA hydratase で異なっていた。Enoyl-CoA hydratase のポケットの底部は柔軟なループで形成されているのに対して、AUH のポケットの底部はしっかりした構造をもつ α -ヘリックスで形成されていた (図 6)。

活性ポケットの構造の、enoyl-CoA hydratase との類似点と相違点が、どのように酵素活性に反映されているかを調べるために、AUH の酵素活性をより詳細に測定した。まず、脂肪酸側鎖

の最も短い C_4 の enoyl-CoA について K_M と k_{cat} を測定し、enoyl-CoA hydratase と比較した。その結果、 K_M がほぼ同じ値であるのに対し、 k_{cat} は AUH の方がはるかに小さい値であることがわかった。このことから AUH の活性が弱いのは、基質との結合が弱いだけでなく、ポケットに結合した基質の反応を触媒する活性が弱いためであることがわかった。

また、enoyl-CoA hydratase は、 C_4 から C_{16} にわたる多様な長さの enoyl-CoA を基質とすることが知られている。Enoyl-CoA hydratase の活性ポケットは、最も短い C_4 の enoyl-CoA ちょうど収まる大きさをしており、実際に C_4 の enoyl-CoA に対する活性が最も高い。しかし、ポケットの底部が柔軟な構造を持つため、長い脂肪酸側鎖も受け入れることができるのだと考えられている。そこで、長い脂肪酸側鎖をもつ C_{16} の enoyl-CoA に対する AUH の活性を調べたところ、これを基質としないことがわかった。AUH では、ポケットの底部が堅い構造をしているため、長い脂肪酸側鎖をもつ CoA 誘導体を受け入れることができないのだと考えられる。このことから、AUH はわずかな酵素活性しか持っていないにも関わらず、enoyl-CoA hydratase よりも高い基質選択性を有していることが明らかになった。

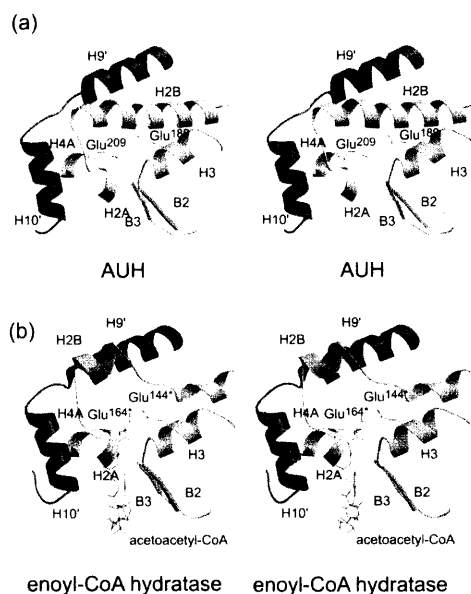


図6 AUHとenoyl-CoA hydrataseの活性部位(ステレオ図)