

論文の内容の要旨

論文題目 Structural study of the cleavage and the sequence-specific recognition of the double-stranded DNA substrate by *VMA1*-derived endonuclease
(酵母*VMA1*遺伝子由来エンドヌクレアーゼによる基質二本鎖DNAの特異的認識と切断の機構に関する構造生物学的研究)

氏名 宮元 俊輔

【序】

酵母の *VMA1* (Vacuolar membrane ATPase subunit 1) 遺伝子は、その中間に *VDE* (*VMA1*-derived endonuclease) 遺伝子が内包されている。*VMA1* は1本のポリペプチド鎖の *VMA1* 産物として翻訳され、この *VMA1* はプロテインプライミング反応によってエンドヌクレアーゼ *VDE* と *VMA1* サブユニットを生ずる。*VDE* は自己の遺伝子を欠失した *VMA1ΔVDE* 遺伝子を31塩基長にわたって認識し、互いに4塩基長離れた2か所で切断する。切断された箇所に *VDE* 遺伝子が挿入されることにより、*VDE* は自己の遺伝子を酵母のゲノム中に伝播する。このような自己の遺伝子の伝播機構は、遺伝子ホーミングと呼ばれている。本研究では *VDE* の認識配列を含んだ二本鎖DNAと、*VDE* との複合体の三次元構造をX線構造解析の手法を用いて解析し、*VDE* による遺伝子の配列の特異的な認識と二本鎖DNAの切断の機構を考察した。

【方法・結果】

大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 発現系より調製した *VDE* と、図1に示す34塩基対からなる基質DNAとの複合体を形成させた。複合体の動的光散乱を測定したところ、推定分子量が6万4千

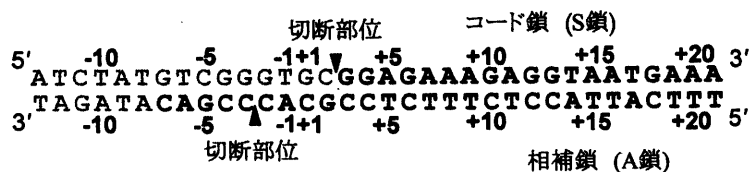


図1. *VDE*の基質DNA配列

濃い字で示した部分は結晶化した複合体の二本鎖DNAの配列を表す。

の単分散を示した。複合体は1分子のVDE(分子量5万1千)に対して1分子の基質DNA(分子量2万1千)が安定な複合体を形成しているものと考えられる。

34塩基対からなる基質DNA, およびその2ヶ所の切断部位の一方のみをあらかじめ切っている2種類の二本鎖DNAが, VDEにより切断されるか否かを, ゲルろ過クロマトグラフィーにより観察した。その結果, コード鎖の+3位と+2位の間をあらかじめ切っておいた二本鎖DNAについてのみ, 二本鎖の切断が生じなかった。したがって, VDEによる二本鎖の切断において, 相補鎖の切断にはコード鎖における切断の有無が強く関与するのに対して, コード鎖の切断には相補鎖の切断の有無は関与しないと考えられる。

VDEにより特異的に認識される塩基配列をもち, 鎖長の異なる49種類の二本鎖DNAを調製し, 切断活性に必須な Mg^{2+} の非存在下で各々とVDEとの複合体を形成させた。図1において太字で示す, 19塩基長からなるDNA鎖(S鎖)と31塩基長からなるDNA鎖(A鎖)が形成する2本鎖のDNAとVDEとの複合体より, ポリエチレングリコール3350を結晶化剤とする蒸気平衡拡散法を用いて, 結晶を析出させた。その結晶学的パラメータを(表1)に示す。

大きさ	$0.15 \times 0.40 \times 0.50 \text{ mm}^3$
空間群	$P 2_1$
格子定数	$a = 98.7 \text{ \AA}, b = 65.5 \text{ \AA},$ $c = 120.9 \text{ \AA}, \beta = 103.2^\circ$
$V_M (f_{\text{solv}})$	$2.86 \text{ \AA}^3/\text{Da} (0.57)$
非対称単位中の分子数	2

分解能	10.0 - 2.5 \AA
反射数 (独立な反射数)	121,575 (50,830)
観測可能な反射数に対する割合	0.97
タンパク質原子数 / DNA原子数	$3,350 \times 2 (782 \times 2)$
水分子数	410
$R (R_{\text{free}})$	0.202 (0.256)

100 Kに保持した結晶に波長0.75 \AA のシンクロトロン放射光X線を照射して, 2.5 \AA 分解能までの回折データを収集した。DNAと複合体を形成していない(非複合体)VDEの構造を探索分子とする分子置換法により位相を決定し, プログラムCNSを用いて結晶学的構造精密化を行った(表2)。非対称単位中の2分子における主鎖 $C\alpha$ 原子の根二乗平均差異は0.6 \AA である。差異は結晶中で分子同士が接触する領域に多く生じている。

精密化された複合体の構造において, 二本鎖DNAはA鎖の3'末端より19塩基長にわたって塩基対を形成しており, 塩基対を形成している部分はほぼ直線状のB型DNAの構造をとっている(図2)。19塩基長のDNAの領域は, その表面積の53%にあたる $3,700 \text{ \AA}^2$ の接触面積にわたって, 43ヶ所において, VDEとvan der Waals接触している。また, VDEと二本鎖DNAの空隙には27個の水分子が両者を水素結合で橋渡ししている。VDEのプロテインスプライシング反応の活性残基であるN末端, C末端の両残基は, 二本鎖DNAとは接触していない。



図2. 複合体の全体構造

*位はプロテインスプライシング部位, 括弧中の数字は残基番号, 薄い線で示した部分は仮想的なモデル構造を表す。

複合体中のVDEの構造と非複合体VDEの構造を、ドメインIIを中心に重ね合わせると、複合体中においては非複合体に比べ、ドメインIのDNA認識領域を構成する部分がドメインIIより遠ざかる方向に約5 Å移動している。また、複合体のドメインIにおける52番から72番にかけての残基が形成するループ構造は、非複合体の同じ部分の構造に比べて大きく変化することによって、DNAとの相互作用を形成している。これら非複合体に比べて構造の変化が大きい領域では、VDEのアミノ酸残基は直接DNAとの間に水素結合を形成している。

+3位とグアノシンの塩基部分と+4位のリン酸基は、ドメインIIのアミノ酸残基との間に水素結合を形成している。+5位から+9位のリン酸基骨格部分は、ドメインIとドメインIIのプロテインプライミング領域との間に7本の水素結合を形成している。+15位から+21位のmajor grooveはドメインIIのDNA認識領域の3つのβシートとの間に、7本の水素結合を形成している。

【考察】

複合体の構造中、VDEのドメインにおいてDNAと相互作用を形成している領域のうち、

DNA認識領域はDNAの塩基部分と4本の水素結合を形成しており、基質の塩基配列の認識を行うと考えられる。とくに、+16位、+18位、+19位の3つの塩基対の、いずれかひとつでも別の塩基対に変異させた二本鎖DNAはVDEによって切断されなくなることが知られている。S鎖の+18位のグアニン塩基のO6の原子

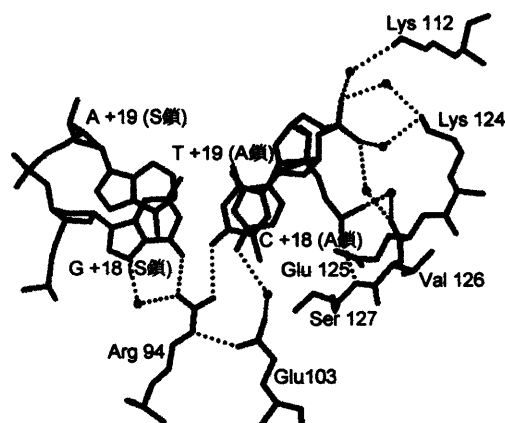


図3. +18, +19位の塩基対の認識 (DNA認識領域)

濃い線はタンパク質、薄い線はDNA、丸は水分子、点線は水素結合を表す。

はArg 94のN η 1と、N7はやはりN η 1と水分子を介しても水素結合を形成している。A鎖の+19位のチミン塩基のO4はArg 94のN η 2と、+18位のシトシン塩基のN4はGlu 103のO ϵ 1と水を介して水素結合を形成している(図3)。Glu 103 O ϵ 2はArg 94 N ϵ と水素結合している。この水素結合はネイティブ体には見られず、塩基との水素結合によって生じる。+16位の塩基対の認識にはArg 90, His 170が寄与している。

ドメインIにおけるプロテインプライミング領域において、VDEはDNAの塩基部分と直接の水素結合を形成していない。したがって、VDEの、+5位から+14位にかけての塩基配列に対する認識の特異性は低いであろう。

S鎖の+3位と+4位の塩基配列は、両方のグアノシンのO6原子とLys 340 N ζ との水素結合により認識されている。この水素結合は、コード鎖の切断部位にあたる+3位のグアノシンのリン酸基をVDEの活性部位に配置している。

複合体の構造より、VDEは主として、特異的な認識配列においてS鎖の3'末端側に位置するmajor grooveと、コード鎖が切断される部分の塩基配列を特異的に認識している。

VDEの認識配列は31塩基長にも及ぶが、塩基の構造が特異的に認識される部分は限られている。VDEは認識配列中に配列特異性の低い部分を有するために、基質配列に微小な

変異の入った場合でも切断が妨げられずに遺伝子ホーミングを生じることができると考えられる。

二本鎖 DNA の切断に二価イオンを必要とする *EcoRI* や *EcoRV* では、アスパラギン酸の O ϵ 原子に配位した二価イオンが、求核攻撃をうけるリン酸基の負電荷を安定化すると考えられている。VDE において同様の切断機構を仮定すると、コード鎖の +3 位のグアノシンのリン原子と相補鎖の -3 位のシチジンのリン原子が求核攻撃を受ける。

VDE による二本鎖 DNA の切断機構を考察するために、+2 位から -10 位までの二本鎖 DNA を、直線状の B 型 DNA の構造をとると仮定して、複合体の構造に継ぎ足したモデルを作った。このモデルにおいてコード鎖の +3 位のグアノシンのリン原子は、Asp 326 の O δ 2 原子から 4 Å 離れた位置にあり、このアスパラギン酸がコード鎖の切断反応の活性残基であることを示唆している。一方、相補鎖の -3 位のシチジンのリン原子は、どの酸性のアミノ酸残基の O δ 原子からも 8 Å 以上離れているため、このモデルのコンフォーメーションを保ったまま、切断反応が進行するとは考えにくい。

次にドメイン I に沿うように湾曲した +2 位から -10 位までの二本鎖 DNA を、複合体の構造に継ぎ足したモデルを作った (図 2)。二本鎖 DNA の湾曲を仮定したモデルにおいて、コード鎖の +3 位のグアノシンのリン原子の位置は先のモデルと大きく変化しないが、相補鎖の -3 位のシチジンのリン原子は、Asp 218 の O δ 1 原子から 4.5 Å 離れた場所に位置する。このモデルにおいて相補鎖の -3 位のシチジンのコンフォーメーションが、コード鎖の +3 位のグアノシンのコンフォーメーションに及ぼす影響は小さいと考えられる。

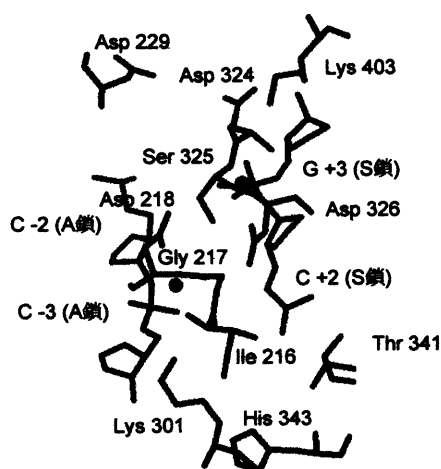


図4. 二本鎖DNA切断部位の周辺モデル構造 (ドメイン I)
2つのMg²⁺、A鎖のDNA、+2位のCおよび、+3位のGのリン酸基は仮想的なモデル構造である。濃い線はタンパク質、薄い線はDNA、丸はMg²⁺を示す。各DNA塩基は表示していない。

さらに Asp 218 の O δ 1, Asp 217 の O, 相補鎖の -3 位のシチジンの O2P のそれぞれから約 2.3 Å 離れた位置に 1 つの Mg²⁺ を、また、Asp 326 の O δ 2, Ser 325 の O, コード鎖の +3 位のグアノシンの O2P のそれぞれから 2.3 Å 離れた位置にもうひとつ Mg²⁺ を DNA の湾曲を仮定したモデルに組み込んだところ、2 つの Mg²⁺ は切断反応の中間体として生じるとされる 5 配位のリン酸基の負電荷を安定化し、配位子の水分子が O3' 原子にプロトンを与える酸として働く水分子を配位することのできる位置を占める (図 4)。このモデルにおいて、求核攻撃を受ける相補鎖のリン原子は Lys 301 の N ζ から 6.4 Å の位置に、コード鎖のリン原子は Lys 403 の N ζ から 7.5 Å の距離に位置する。これら 2 つの Lys 残基が、水分子よりプロトンを引き抜くことでリン原子に対する求核攻撃を開始すると考えられる。