

論文の内容の要旨

論文題目

Vasa ヘリケースの inchworm メカニズムによるトランスロケーションの構造的基盤

氏名 仙石 徹

序

ヘリケース (helicase) は、核酸の高次構造を変化させる ATP 駆動の分子モーターである。反応サイクルにおいてヘリケースは ATP の結合と加水分解に伴って構造変化を起こし、それにより核酸のトランスロケーションを行い、核酸の様々な構造変化 (二本鎖や結合タンパク質の解離、ホリデージャンクションの移動など) を触媒する。これによってヘリケースは遺伝暗号の発現と維持に関わる様々な過程において重要な役割を果たしている。

アミノ酸配列を元にした分類によって、ヘリケースは3つのスーパーファミリーと2つのファミリーに分類される。スーパーファミリー2 (SF2) はその中で最大のスーパーファミリーであり、早老症などの原因遺伝子産物を含む RecQ ファミリー、クロマチンリモデリング酵素である Swi2/Snf2 ファミリー、RNA ヘリケースである DEAD-box ファミリーなど、様々なタンパク質が含まれる。Vasa はショウジョウバエの DEAD-box RNA ヘリケースであり、腹部と生殖細胞の分化に必須なタンパク質である。発生において Vasa は胚の後極に局在し、特定の mRNA の翻訳開始を促進すると考えられている。ヒトを含む多くの動物で Vasa は生殖細胞特異的に発現しており、広く保存された生殖細胞の分化メカニズムの存在が示唆されている。

これまでに、SF2 に属する C 型肝炎ウイルス由来 NS3 ヘリケース (NS3) と一本鎖 DNA との複合体が構造解析されており、これが SF2 タンパク質のヘリケースドメインと核酸との複合体構造として唯一の例であった。この構造は ATP やそのアナログを含まない条件で構造決定されており、反応サイクルにおける ATP フリー型構造を表すと考えられる。そこにおいて、SF2 の保存モチーフは二つの RecA-like ドメイン (NTD と CTD) 上に存在し、一本鎖 DNA はこの二つのドメインにまたがって結合していた。ATP 加水分解に関わるとみられる残基は NTD と CTD の間の溝に集まっていたが、これらの残基が

協働して ATP を結合、加水分解するにはドメイン間の溝が広すぎた。SF2 タンパク質が ATP アナログと核酸を結合した構造はいまだに決定されておらず、ATP の結合と加水分解に伴って起こる構造変化は明らかになっていなかった。

本研究では、Vasa と RNA、ATP アナログからなる三重複合体の結晶構造解析を行った。それにより SF2 の ATP 結合型構造を決定し、反応サイクルにおける構造変化を明らかにして反応メカニズムを解明することが目的である。

全体構造

Vasa (アミノ酸配列 200-623) と poly(U) RNA (U₁₀)、AMPPNP (ATP の非水解アナログ) からなる三重複合体の結晶構造を 2.2 Å 分解能で決定した (図 1)。R 因子とフリー-R 因子はそれぞれ 19.7%と 25.0%である。構造モデルは、Vasa のアミノ酸配列 202-621、7ヌクレオチドの RNA、1 個の AMPPNP と Mg²⁺を含む。

これまでに構造解析された SF2 タンパク質と同様に、Vasa は二つの RecA-like ドメイン (NTD; アミノ酸配列 233-459、CTD; アミノ酸配列 460-621) を持ち、それらの折りたたみ構造もよく似ていた。特に、DEAD-box タンパク質である eIF4A と MjDEAD (それぞれ、タンパク質単独で構造解析されている) の対応するドメインとは非常によく似ていた。一方、二つのドメイン間の相対位置はこれらの構造と Vasa 複合体構造の間で大きく異なっていた。NTD と CTD は、eIF4A の構造においては互いに相互作用しておらず、MjDEAD の構造においては一部の領域においてのみ

相互作用していた。それに対して、Vasa の構造において NTD と CTD は密接に相互作用しており、AMPPNP がドメイン間の溝に深くはまりこんで結合していた。また、RNA はドメイン間の溝にほぼ垂直な方向に、二つのドメインにまたがって結合しており、5'側が CTD と、3'側が NTD と相互作用していた。保存されたモチーフのほとんどはドメイン間の溝に面して位置しており、Q モチーフとモチーフ I、II、V、VI が AMPPNP の結合に、GG モチーフとモチーフ Ia、Ib、IV、V が RNA の結合に関与していた。アミノ酸配列 202-232 の領域は、DEAD-box ファミリー内では保存されていないが、Vasa のホモログにおいて保存されている。この領域はドメイン間の溝に沿うように伸び、AMPPNP の結合に関与していた。

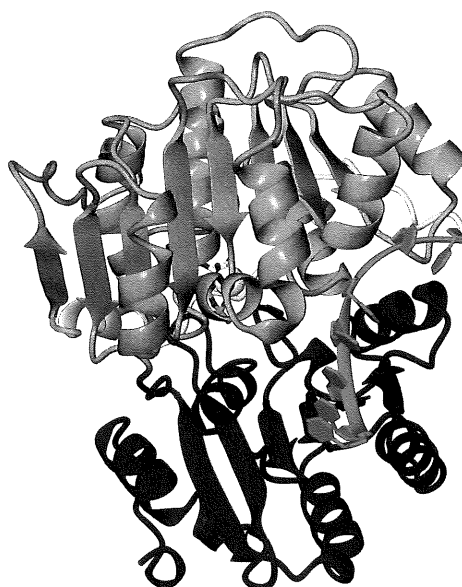


図1 Vasa複合体の全体構造
NTD、CTD、N末端伸長領域をそれぞれ
青、赤、黄で示す。

ATP の結合と加水分解

ATPase 部位は NTD と CTD の間に形成されており、3 リン酸部分はモチーフ I、II (NTD)、VI (CTD) によって認識されていた (図 2)。すなわち ATPase 部位において NTD と CTD は AMPPNP の 3 リン酸部分を介して間接的に相互作用している。さらに、加水分解反応において求核攻撃を行うであろう水分子が同定された (図 2、矢印)。この水分子は攻撃を受けるリン原子から 3.25 Å の距離にあり、インライン攻撃に理想的な位置に存在する。この水分子は Glu400 (モチーフ II)、His575 (VI)、Arg579 (VI) と相互作用しているが、これらに相当する残基に変異が導入された eIF4A は ATPase 活性とヘリケース活性が低下することが示されている。よって、本構造は SF2 の反応サイクルにおける機能的な ATP 結合型状態を表すと考えられる。

モチーフ VI からは 2 つの Arg 残基 (Arg579、Arg582) が 3 リン酸部分の結合に関与している。これらの残基は ATPase 反応の際に負電荷を帯びた中間体を安定化するとともに、 γ -リン酸の状態を感知してドメインの相対位置変化を起こすセンサーとしても働いているであろう。

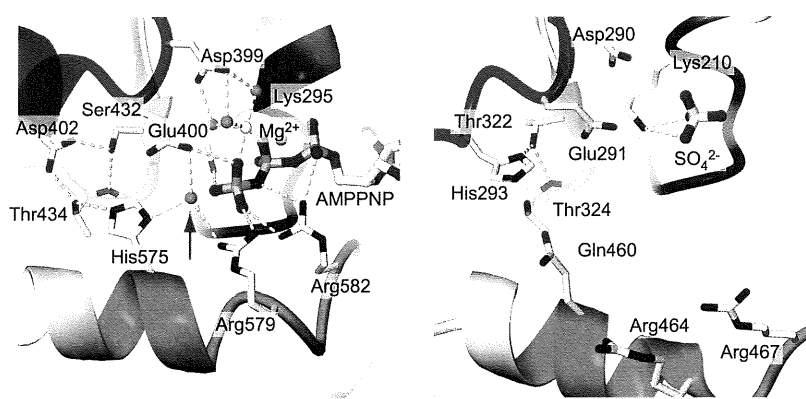


図2 左: VasaのATPase部位. 右: NS3のATPase部位.

モチーフ III に変異が導入された eIF4A は、RNA 結合活性や ATPase 活性は大きく低下しないにもかかわらず helicase が完全に失われることが報告されている。すなわち、モチーフ III はこれらの活性を共役させる機能がある。Vasa 複合体構造において、モチーフ III の Thr434 は ATPase 反応に重要な二つの残基である Asp402 (モチーフ II) と His575 の両方と相互作用していた。おそらくモチーフ III はこのようなドメイン間相互作用を介して活性残基である His575 を固定することにより、NTD と CTD が完全に収縮してトランスロケーションを起こすときにだけ ATP が分解されるようにしているのであろう。

RNA 結合部位

Vasa と RNA との相互作用はほとんどが糖リン酸骨格を介したものであった (図 3)。4 個の 2'-水酸基が認識されており、DEAD-box タンパク質が DNA より RNA に対して働く事実と一致する。RNA の塩基部分はほとんど

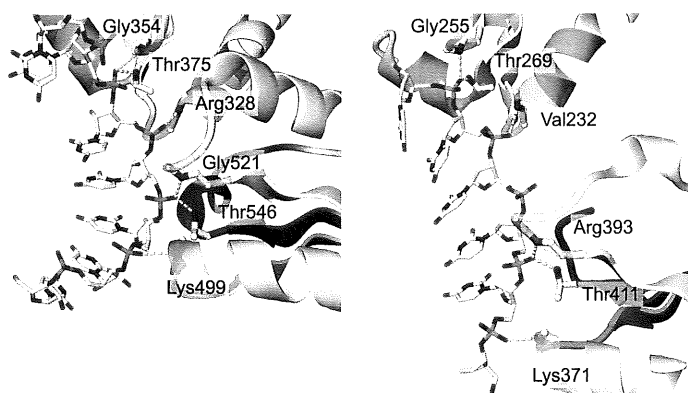


図3 左: VasaによるRNAの結合. 右: NS3によるDNAの結合.

認識されておらず、ヘリケースドメインは RNA の配列特異性の決定に関与しないと考えられる。

NTD と CTD による RNA の結合様式には対称性が見られた。すなわち、NTD の Thr375 (モチーフ Ib) と CTD の Thr546 (V) は二つの RecA-like ドメイン上の同じ位置にあるだけでなく、それぞれ U6 と U4 のリン酸基を同じように結合していた。同様に、NTD の Gly354 (GG モチーフ) と CTD の Gly521 ($\beta 11$ - $\alpha 13$ ループ) がそれぞれ U6 と U4 のリン酸基を、NTD の Arg328 (モチーフ Ia) と CTD の Lys499 (IV) がそれぞれ U5 と U3 のリン酸基を、同じように結合していた。NTD と CTD による対称的な核酸結合は、NS3•DNA 複合体構造においても見出されており、SF2 に共通の核酸結合様式であると考えられる。

NS3•一本鎖 DNA 複合体との構造比較

ATP の結合と加水分解に伴う構造変化を明らかにするために、NS3•一本鎖 DNA 複合体 (ヌクレオチドフリー型) との構造比較を行った。それぞれの NTD を重ね合わせたところ、Vasa の構造において CTD がより NTD に近づいており、ドメイン間の溝が狭くなっていることが明らかになった。ATPase 部位を比較すると、NS3 においては CTD 上のモチーフ VI を含む α ヘリックスが NTD から離れる方向に約 3 Å 動いていた (図 2)。この構造変化は AMPPNP の 3 リン酸部分を介したドメイン間相互作用が失われたことによって起こり、それが全体のドメイン運動を引き起こすのであろう。

そのようなドメイン運動の結果、核酸の結合様式にも変化が起こった (図 3)。Vasa において NTD と CTD は上に挙げたような対称的相互作用によって連続する 4 個のリン酸基 (NTD が U6 と U5、CTD が U4 と U3) を結合していた。それに対して、NS3 において NTD は dU6 と dU5 リン酸基を、CTD は dU3 と dU2 のリン酸基と対称的相互作用を形成しており、1 ヌクレオチドだけ長い核酸配列を結合するようになっていた。

これらの観察は、SF2 の「inchworm (尺取虫) メカニズム」による核酸のトランスロケーションを強く示唆するものである。すなわち、SF2 タンパク質は ATP を結合すると収縮型構造 (Vasa 複合体) を、ATP の加水分解後には伸長型構造 (NS3 複合体) をとる。それに伴って、NTD と CTD にある核酸結合部位が互いの距離を変化させて、トランスロケーションを行うと考えられる (図 4)。

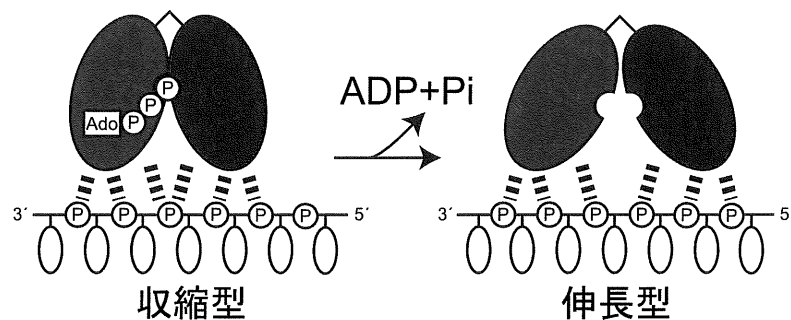


図4 inchwormメカニズム