

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏名 井上 咲良
指導教官 正木 春彦

論文題目 配列特異的リボヌクレアーゼ、コリン E5 の反応機構

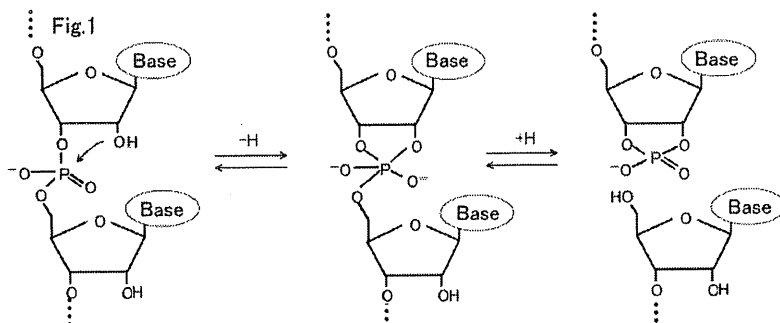
コリンE5はTyr, Asp, His, AsnのtRNAを切断して大腸菌を殺す蛋白質性毒素である。この4種類のtRNAにはアンチコドン1, 2文字目に共通の配列QU(QはGの修飾塩基キューイン)が存在し、QとUの間が切断されるが、未修飾のGU配列をもつtRNAも基質となる。コリンE5の活性ドメインE5-CRDはアミノ酸残基数115のGU配列特異的エンドリボヌクレアーゼであり、1本鎖RNAのGU配列を特異的に認識しその間を切断する。DNAを配列特異的に切断するクラスII制限酵素は多数存在するが、RNAを配列特異的に切断するリボヌクレアーゼはほとんど知られていない。(E5-CRDの塩基配列特異性は基質アナログとのX線結晶構造解析から明らかになっている。)

E5-CRDの反応産物の切断末端は2',3'-環状リン酸と5'-OH基であり、その意味では、E5-CRDはRNase Aのような環状化リン酸ヌクレオチドを生じるリボヌクレアーゼである。しかしながらE5-CRDは、広く既知のリボヌクレアーゼで触媒残基として機能するHis残基を持たないことから、新たな触媒機構を持つリボヌクレアーゼであることが期待された。環状化リボヌクレアーゼでは、蛋白質の配列相同性が低くても立体構造上では重要な活性残基が、基質に対してほぼ同じ位置に存在していることが知られている。しかしこの点でも、E5-CRDの活性中心は既知のリボヌクレアーゼとは全く異なるものであった。本研究はE5-CRDと基質アナログであるdGpdUとの複合体の立体構造情報に基づき、反応機構の解明をめざし、蛋白質工学的的手法と遊離状態のE5-CRDのX線結晶構造解析によりE5-CRDの反応のダイナミクスを構造と機能の両面から明らかにし、E5-CRDの反応機構モデルを提案する。

RNA分子は生物体内の多くの基本的プロセスに不可欠であり、また近年は遺伝子発現におけるRNAの分解制御も注目を集めている。1950年代の前半にRNA鎖の溶液中での自発的な切断

が報告されて以来、分子内リン酸転移反応を介して RNA 鎖が切断される機構の詳細を理解することは、RNA 研究の焦点であり、DNA と比べて RNA の反応性が高い原因を理解する基礎となると同時に、酵素分子がどのように RNA 切断反応を加速させているかを理解することにつながった。この自発的反応は、リボースの 2'-O が隣接したホスホジエステル結合を形成するリン原子を求核攻撃することにより進行し、2', 3'-環状リン酸と 5'-OH を末端にもつ生成物を生じる。

Fig.1 の RNA 切断反応モデルではリン酸基を、中性下でのイオン化状態で示してある。pH7 では 2'-O はヒドロキシル基として存在し、nonbridging phosphate oxygen (NBPO) と 2 重結合の酸素は共鳴構造で 1 つの負電荷を分け合っている。2'-O の求核攻撃によって生じる 5 配位中間体は、2 つの負電荷を持つ。5'-O は負電荷のアルコキシドイオンとして脱離し、プロトン化されてヒドロキシル基となる。この自発的な RNA 切断では、求核体の 2'-O と脱離する 5'-O が、求電子中心のリン原子を真中に挟んで一直線に並び (in-line 配置)、両三角錐型の 5 配位中間体の apical 位にくる。



エステル転移による自発的な RNA 切断の障壁は次の 4 つであり、反応速度を増大させるにはこれらの障壁を下げればよいということになる。(なお OH を塩基触媒として 3. の障壁を下げるのが RNA のアルカリ開裂である。)

1. 5 配位中間体を形成するために原子をふさわしい構造 (in-line) に並べる力の欠如
2. 5 配位中間体の高い負電荷
3. 2'-OH 基の弱い求核性
4. 5'-オキシアニオンの弱い脱離力

1 E5-CRD の活性残基の同定

X線結晶構造解析により、切断されるホスホジエステル結合の近傍に、Lys25, Gln29, Arg33, Lys60, Gln93 が存在した。これらのアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、E5-CRD の触媒活性の解析を行った。Arg33 の側鎖は Ile94 の主鎖のカルボニル基と水素結合を形成していたので、Ile94 にも変異を導入した。

各種変異型 E5-CRD (K25Q, Q29A, R33Q, K60Q, Q93A, I94A) を作製し、イオン交換カラムを用いて精製した。各変異体の比活性は、野生型と比較すると、K25Q, Q29A, K60Q, I94A は 10^{-3} 倍低下し、R33Q、および K25 と K60 の二重変異体 (K25Q/K60Q) は 10^{-6} 倍低下した。Q93A は、野生型 E5-CRD の 50% の活性を保持したので反応には重要ではないと判断した。ジヌクレオチド GpUp を用いた反応速度論的解析の結果、K25Q、K60Q の K_m は野生型とほとんど変わらず、 k_{cat} が大きく

低下した。K25とK60は、ES複合体形成ではなく遷移状態以降の反応段階に関わっていると考えられる。E5-CRDの触媒反応に関与するアミノ酸残基は、Lys25, Gln29, Arg33, Lys60, Ile94である。

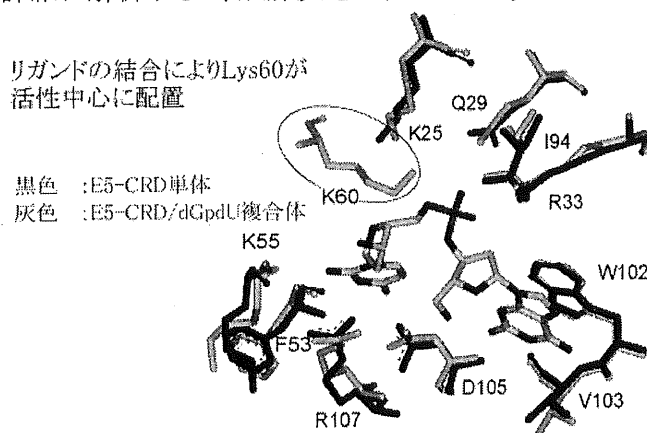
一般に酵素活性のpH依存性は、活性残基のpKaに依存している。E5-CRDの酵素活性はpHの増加に伴ってpH9.5まで増大した。環状化リボヌクレアーゼの場合は、プロトンの授受を行う一般酸塩基触媒となる残基を変異させた酵素はpH依存性パターンが大きく変化する。変異型E5-CRDのpH依存性を解析したところ、どの変異体も野生型よりも活性は様々な程度に低下するものの、pH依存性のパターンは変化しなかった。つまり、これらのアミノ酸残基は酵素の触媒反応に重要ではあるが、一般酸塩基触媒ではない。本酵素反応には金属イオンも不要であり、リボースの2'-OHからプロトンを引き抜く塩基触媒として働くのは、水分子に由来するOH⁻であると考えられる。すなわちE5-CRDは、RNAのアルカリ開裂反応そのものを(部位特異的に)促進している可能性が極めて高い。

野生型E5-CRDのGpUに対する切断効率はGpUpの10⁻³程度しかない。つまりE5-CRDは反応を加速するために3'リン酸との相互作用を利用している。変異型E5-CRDのGpU切断活性を調べると、K60Qは野生型と同程度にGpUを切断した。逆に見れば、野生型E5-CRDがGpUを切断する際には、Lys60による反応促進効果がない。すなわちE5-CRDのLys60は、GpUpの3'リン酸と相互作用することによって切断を促進している。

2 E5-CRD単体のX線結晶構造解析

空間群はP3₁2₁、格子定数はa=b=64.8Å, c=101.0Å, α=β=90°, γ=120°と求められた。位相計算はdGpdUとE5-CRDの複合体をサーチモデルとした分子置換法によって行った。E5-CRD単体の最終モデルは2.3Åの分解能、R値が24%、R_{free}値が28.3%となった。E5-CRD単体の全体構造は複合体の全体構造とほぼ同じであったが、触媒反応に関与するLys60を含むLys60からArg68のアミノ酸残基がdisorderしており、単体の場合はこの部分のflexibilityが非常に高いことが分かった。

リガンドが結合したE5-CRDとE5-CRD単体の構造比較に基づき、活性残基と基質結合残基を詳細に解析すると、触媒反応に関与するLys25, Gln29, Arg33, Ile94、およびグアニンと結合する



3 環状化リボヌクレアーゼの新しい反応機構の提案

下に示したモデルでは切断されるホスホジエステル結合をP1、ウリジン3'リン酸をP2とした。Arg33, Gln29はP1と相互作用していることから、Arg33, Gln29はRNA切断に必要なin-line構造に基質を配向すると考えられる。5配位中間体は2価の負電荷を持つので、Lys25とArg33の2つの陽電荷が安定化していると考えられる。Ile94の主鎖はArg33の位置を固定しており、Arg33の位置取りが酵素反応において決定的に重要である。Lys60はウリジンの3'リン酸と相互作用することによって生成物を安定化し、5'オキシアニオンの弱い脱離力を補っている。以上のことから、リボースの2'-OHからプロトンを引き抜く塩基触媒として機能するのはヒドロキシルイオンであり、E5-CRDの活性残基は、in-line構造の形成、遷移状態の安定化、生成物の安定化によって反応を触媒するという極めて単純でユニークな反応機構を取っていることを明らかにすることが出来た。

