

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 15 年度博士課程進学
氏名 竹下 大二郎
指導教員 田之倉 優

論文題目

ヒト Dicer RNase III ドメインと EST1A PIN ドメインの結晶構造解析

RNA代謝に関わるタンパク質のドメイン構造解析

近年、RNA が予想以上に多くの細胞内機能に関与することが明らかにされつつある。RNA 分子が関与する代表的な細胞内現象として、RNA interference (RNAi) とテロメア伸長反応が挙げられる。この二つの細胞内現象では、共通して詳細な機能解明が遺伝子治療法の開発に繋がると期待されている。本研究では、タンパク質の構造と機能の相関解析を行うことを目的とし、二つのドメインの立体構造を明らかにした。

ヒトDicerのRNase IIIヌクレアーゼドメインのX線結晶構造解析

RNAi は、真核生物で保存された遺伝子発現の制御機構である。RNAi の反応過程では、細胞内に導入された二本鎖 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) が RNase III 酵素の一種である Dicer によって約 21 塩基長で 3'側 2 塩基末端をもつ小さな RNA (small interfering RNAs, siRNAs) にプロセッシングされる。生成された siRNAs は RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、siRNA と相補的配列をもつ mRNA を分解する。また、細胞内で発現するヘアピン型の前駆体 microRNAs (miRNAs) も Dicer によって約 21 塩基長の成熟 miRNAs にプロセッシングされる。生成された miRNAs は、RNAi 反応と類似した機構で相補的な配列をもつ mRNA の分解あるいは翻訳阻害を誘導する。Dicer はマルチドメインからなるタンパク質で、C 末端側に二つの RNase III ヌクレアーゼドメイン (RIIIa と RIIIb) と一つの dsRNA binding domain (dsRBD) を含んでいる。これまで、RNase III 酵素についてはバクテリア由来 RNase III の立体構造が報告され、その構造に基づいた機能解析も進められている。真核生物由来 Dicer の RNase III ヌクレアーゼドメインは幾つかの特徴的なアミノ酸配列を保有しているが、これまで Dicer に含まれる RNase III ヌクレアーゼドメインの立体構造は報告されていない。本研究では、ヒト由来 RNase III タンパク質である Dicer の dsRNA 切断メカニズムを詳細に明らかにするため、C 末端 RNase III ヌクレアーゼドメイン RIIIb の X 線結晶構造解析を行った。

ヒトDicerのC末端RIIIbの発現系を構築し、タンパク質を精製し、結晶化を行った。放射光施設Photon Factory (PF) のビームラインPF-AR NW12 で 2.0 Å分解能のX線回折データを収集した。バクテリア由来RNase III (PDB ID: 1JFZ) をサーチモデルとした分子置換法により構造解析を行った。その結果、RIIIbは8つの α ヘリックスと1つの 3_{10} ヘリックスからなり、62%がヘリックスから構成されていることがわかった。RIIIbは、主に疎水的な相互作用によって結合したホモダイマーを形成していた。このRIIIbホモダイマーは、以前に生化学的な解析により提唱されている分子内RIIIa-RIIIbダイマー化モデルと異なった知見である。RIIIbホモダイマーインターフェイスを形成する15残基をアライメント上で調べたところ、DicerのRIIIaドメインにおいても同一のアミノ酸または置換可能なアミノ酸をもつことがわかった。イオン結合によってダイマー形成に参与するアルギニン残基は、Dicerを含むほぼ全てのRNase IIIで保存されていた。このことから、RIIIa-RIIIbダイマーもRIIIbホモダイマーと同様なダイマー形成を行っていることが示唆された。また、RIIIbホモダイマーはネガティブチャージを帯びた溝を形成し、この溝に沿って4つのほぼ直線状に並んだMgイオンが結合していることが明らかになった。両端の二つのMgイオンはバクテリアRNase III構造でも見られていたが、中央の二つのMgイオンはこのRIIIb構造で新たに見出された。Mgイオンの結合に参与する残基の変異タンパク質の解析から、両端のMgイオンの配位に参与する残基が顕著にdsRNA切断活性に影響していることがわかった。RIIIbの切断産物の解析を行ったところ、RNase IIIの切断産物の特徴である3'側2塩基突末端となる産物を生産することがわかった。以上の生化学的な解析結果から、RIIIb、Mgイオン、A-form dsRNAの複合体モデルを構築した。このモデルは、両端のMgイオンがリン酸ジエステル分解に参与するヒドロキシルイオンを生成すると仮定して構築した。この複合体モデルから、中央のMgイオンがRNAの切断サイトの2'OHを認識することが示唆された。中央に見られた二つのMgイオンの配位に参与する残基の一つがDicerのRIIIbドメインのみに保存されているため、中央のMgイオンはDicerのRIIIbドメイン特有の機能を担っている可能性がある。また、DicerのRIIIbドメインに見られるインサート領域中のmotif IIは、アクティブサイトを挟むように構造をとっていた。DicerのRIIIaとRIIIbは、RISCの構成要素であるArgonauteタンパク質と相互作用するため、この相互作用にmotif IIが参与する可能性がある。またはmotif II機能に関する別の可能性として、バクテリア由来RNase IIIの構造でdsRBDがdsRNAと相互作用する空間的位置から推測すると、motif IIがdsRBDと接触してdsRNAのアクティブサイトへの誘導、または切断後のRNAの解離に機能することが考えられた。

本研究によって明らかになったヒトDicerのRIIIbドメインの結晶構造はDicerタンパク質として初めての立体構造であり、幾つかの新たな知見を得ることができた。哺乳細胞において特定遺伝子のRNAiを誘導する際にsiRNAを用いるが、Dicerはin vitroで長いdsRNAからsiRNAを調製する目的で利用されている。明らかになった立体構造を基に、よりsiRNA生産効率が高いDicerを設計することが可能になると期待できる。

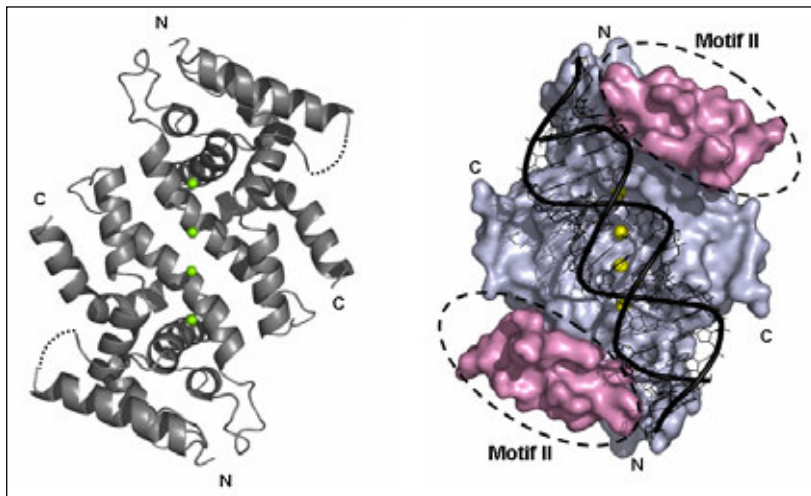


図1 .Dicer の RIIIb ドメインの結晶構造(左) RIIIb-dsRNA 複合体モデル(右)

ヒトEST1AのPINドメインのX線結晶構造解析

テロメアは、真核生物の線状染色体末端に存在し、『末端複製問題』を解決するため特殊な構造を持っている。テロメア DNA の伸長を担うテロメラーゼの逆転写活性は、ガン細胞、生殖細胞、幹細胞で顕著に高く観察される。ヒトテロメラーゼは、逆転写活性部位をもつ hTERT (human telomere reverse transcriptase)、逆転写の鋳型として働く hTR (human template RNA) がコア分子として働く。最近、ヒト EST1A、EST1B (ever shorter telomeres) がテロメラーゼホロ酵素に含まれることがわかった。これらのタンパク質の酵母ホモログである Est1p は、より詳細に調べられておりテロメア伸長に必須な因子である。また EST1A と EST1B は、それぞれ SMG6、SMG5 と呼ばれ NMD (nonsense-mediated mRNA decay: ナンセンス変異が入った mRNA を除去する機構) において必須な分子である。線虫ホモログ Ce-SMG6、Ce-SMG5 については、RNAi に関与することが示されている。PIN ドメインはヒト EST1A (SMG6) と EST1B (SMG5) の C 末端側に保存されたおよそ 180 残基からなるアミノ酸領域である。EST1 タンパク質における PIN ドメインの詳細な機能は明らかになっていないが、SMG5 の PIN ドメインの欠損変異体と点変異体は UPF1 の脱リン酸化を誘導し、NMD 機能を欠損させることが示されている。これまで、好熱菌由来 PIN ドメインの結晶構造とそのヌクレアーゼ活性は報告されているが、真核生物由来 PIN ドメインについて立体構造は得られていない。ヒト由来 PIN ドメインは、好熱菌由来 PIN ドメインとの相同性が低くインサート領域が含まれるため、PIN ドメインの機能と構造が保存されているか不明である。ヒト PIN ドメインの機能を理解するため、ヒト EST1A の PIN ドメイン発現系を構築し X 線結晶構造解析を行った。

ヒト EST1A の C 末端に存在する PIN ドメインの発現系を構築し、タンパク質を精製、結晶化した。放射光施設 PF のビームライン PF-AR NW12 で 1.8 Å 分解能の X 線回折データを収集した。セレノメチオニン置換体タンパク質結晶を用いて単波長異常分散法で構造解析を行った。結晶構造では隣接する分子と強固な相互作用はなくモノマーで存在していることが示唆され、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた溶液中における分子量の解析結

果と一致していた。全体構造は8つの α ヘリックスと7つの β ストランドから構成され、 α/β スタック構造であることがわかった。全体構造から、ヒト PIN ドメインは好熱菌 PIN ドメインと同様に低いアミノ酸相同性であるが 5'ヌクレアーゼファミリーに属することが明らかになった。EST1A ファミリーの PIN ドメイン中で高く保存された残基をタンパク質表面上で解析したところ、ヘリックス端で形成される推定活性部位のパッチに集中していることがわかった。この EST1A の PIN ドメインで見られた推定活性部位は、好熱菌由来 PIN ドメインの推定活性部位と一致していた。ヒト PIN ドメインの推定活性部位は、アスパラギン酸、グルタミン酸が構成する酸性残基クラスターを形成していた。また、5'ヌクレアーゼファミリーで活性に重要であると示されている S/TxD モチーフを構成する残基も保存されて空間配置していることがわかった。これらの酸性残基クラスターによって、Mg イオンまたは Mn イオンが結合してヌクレアーゼ活性を発現すると考えられる。好熱菌由来 PIN ドメインでは、Mg イオン、Mn イオン依存性のヌクレアーゼ活性が報告されている。そこで、構造解析を行ったヒト PIN ドメインを *in vitro* で生化学的に解析したが、ヌクレアーゼ活性およびヌクレオチド結合活性を検出することはできなかった。推定活性部位を構成する残基はヒト EST1A の PIN ドメインにおいても保存されているため、他のタンパク質領域との協調が活性発現に必要であると推測している。

本研究で明らかになったヒト EST1A の PIN ドメインの結晶構造は、テロメラーゼホロ酵素の中で初めての立体構造である。低い相同性ではあるが、全体構造から 5'ヌクレアーゼファミリーに属することを示し、推定活性部位も空間的に保存されていることがわかった。テロメラーゼは、ガン細胞の異常な細胞分裂を抑制する際の標的因子として考えられており、その阻害剤研究が進められている。明らかになった EST1A の PIN ドメインの立体構造を基に、テロメラーゼ活性を抑制する低分子薬剤の設計が可能になると期待できる。

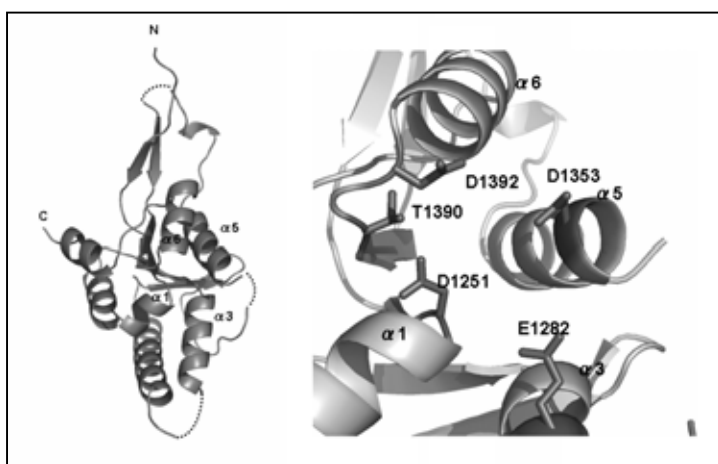


図2 . EST1A の PIN ドメインの結晶構造 (左) その推定活性部位 (右)

本研究のまとめ

本研究で立体構造が解明された二つのタンパク質ドメインは、RNA 分子を基質とするが基質との複合体構造はまだ得られていない。今後の展望として、基質との複合体構造を明らかにして酵素反応機構の理解をさらに深め、応用化研究に繋げる必要がある。