

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏名 高橋 一敏
指導教員名 正木 春彦

論文題目

リボヌクレアーゼ型トキシンの構造と機能の研究

生命現象は、構成する因子間の特異的相互作用から成り立っている。こうした相互作用の特異性を決定する仕組みを明らかにすることは、生命の素反応を理解する上で非常に重要である。本研究では、tRNA を特異的に切断するリボヌクレアーゼであるコリシン D、および zymocin の基質認識機構を明らかにすることを目的としている。tRNA は 73-93 塩基からなり、全ての生物種間で配列保存性の高い塩基も存在するが、大部分の配列は全く異なっている。一方、すでに決定されている tRNA の立体構造を比較すると、アンチコドンアームとアミノ酸のアクセプターアームを頂点とする非常に似た L 字構造をとっている。このように、それぞれが「似て非なる」多数の tRNA 分子種の中から、tRNA 特異的リボヌクレアーゼは標的となる tRNA のみを認識し、切断する。

1. コリシン D の基質認識・反応機構の解明に向けた X 線結晶構造解析

コリシン D は、ColD プラスミドにコードされたタンパク質であり、培地に放出されたあと同種のプラスミドを持たない他の大腸菌に侵入し、tRNA^{Arg} を特異的に切断して菌を殺す。ColD プラスミドは、コリシン D に直接結合する特異的インヒビター(ImmD)もコードしている。コリシン D (697 残基)の N 末端領域は膜侵入とレセプター結合に必要なドメインであり、C 末端領域約 100 アミノ酸にリボヌクレアーゼ活性ドメイン(D-CRD: colicin D C-terminal Ribonuclease Domain)が局在する。大腸菌の tRNA^{Arg} にはアイソアクセプター分子が 4 種類存在するが、コリシン D はこれら全ての tRNA 分子のアンチコドンループの 3' 基部分である 38-39 番目の塩基間を切断し、C32, G36, A38 が活性に重要であることが分かって

いる。また D-CRD は、tRNA^{Arg} のアンチコドンアーム相当配列を *in vitro* 転写にて調製した RNA を、特異性を保って切断出来るので、基質情報の大半はアンチコドンアーム内に含まれていると考えられる。

これまでの生化学的実験結果に加え、D-CRD の基質認識・反応機構を立体構造情報に基づいて解釈するために、(1) D-CRD/ImmD 複合体 (2) D-CRD 単体 (3) D-CRD/基質 RNA 複合体 の X 線結晶構造が必要であると考えた (Fig. 1)。我々は、すでに (1) D-CRD/ImmD 複合体の立体構造を 2.3 Å の解像度で明らかにしており、これより ImmD が D-CRD の触媒残基と考えられる His611 に覆いかぶさるように結合し、活性中心を直接マスクすることで活性を阻害することが分かった。また、ImmD は基質 RNA を擬態することで D-CRD と結合していることが考えられた (molecular mimicry)。

そこで、本研究では、まず (2) D-CRD 単体の結晶化を行い、立体構造を 1.8 Å の解像度で明らかにした。D-CRD/ImmD の D-CRD 部分と比較した結果、ImmD の有無により構造はほとんど変化しなかった。D-CRD 単体では、最高で 0.84 Å の反射が得られる程のよい結晶を得ることに成功し、1.2 Å の解像度で立体構造を得たが、R-factor の値が 26% 付近から下がらなかった。現在、クライオプロテクト条件の改善などを検討している。D-CRD 単体の立体構造をもとにし、触媒活性に必須な His611 近傍のアミノ酸に対して変異導入実験を行い、Lys608, Lys610, Arg651, Trp679 が活性に重要であることが分かった。また、D-CRD の tRNA 切断反応の pH 依存性を測定したところ、pH8.5 を最大とし、pH6 から pH10 までのカーブを描いた。得られた触媒残基候補の空間配置や反応の pH 依存性より、His611 (遊離状態で側鎖の pKa=6.04) が一般塩基触媒として、Lys608 (同じく pKa=10.79) が一般酸触媒として働いているモデルが考えられる。これは、もう一つの tRNA 特異的リボヌクレアーゼであるコリシン E5 や、既知の RNase の反応機構とは全く異なるものである。更に、Trp679 は、その疎水性のインドール環が、tRNA の A38 塩基とスタックすることにより、切断部位のヌクレオチドを固定していると考えている。

さらに、(3) D-CRD/基質 RNA 複合体の結晶化を試みた。野生型 D-CRD は基質 tRNA を切断してしまうため、安定な複合体を形成させるために、酵素活性を失わせた D-CRD、もしくは切断を受けない基質アナログの使用を検討した。そこで、数種類の D-CRD 点変異体、基質 RNA への変異導入や切断部位である A38 の 2'-OH を修飾した RNA を作製し共結晶化を行ったが、現時点で結晶は得られていない。

2. CRD と tRNA のドッキングモデル

Lys608 が一般酸触媒、His611 が一般塩基触媒、Trp679 が塩基認識に関わることを前提として、既知の tRNA の立体構造と D-CRD の立体構造を Swiss - PdbViewer を用いてマニュアルドッキングさせた。ドッキングに際しては、tRNA の切断部位である A38 の 2'-OH を挟んで、活性残基である Lys608 のアミノ基と His611 のインドール環をインラインに配置し、Trp679 が A38 の塩基とスタックするように配置した (Fig. 2)。このドッキングデータをもと

に、分子動力学法を用いて安定性の評価を行った結果、上記のモデルは無理のないものである事がわかった。また、ImmD は、基質 RNA が D-CRD に認識される機構を擬態して D-CRD と結合しているという我々の仮説と矛盾しなかった¹⁾。なお、分子動力学法は、AMBER バージョン 8 の sander モジュールを用いて行った。

3. 酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産するキラートキシシン zymocin についての解析

本研究の遂行中、酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産して *Saccharomyces cerevisiae* を殺すキラートキシシン zymocin が、 mcm^5s^2 UUC (mcm^5s^2 U: 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine) をアンチコドンとする tRNA^{Glu} の 34-35 番目の塩基間 (mcm^5s^2 U と U の間) で特異的に切断する tRNase であることが報告された。zymocin が、コリシン D やコリシン E5 と似た作用を持ち、真核生物で初めての tRNA 特異的リボヌクレアーゼであることから、zymocin の酵素学的諸性質を明らかにし、tRNA 特異的リボヌクレアーゼの基質認識・反応機構について更に知見を得たいと考えた。そこで、まず X 線結晶構造解析を試みた。*K. lactis* が持つ pGKL1 プラスミドから、zymocin の活性ドメイン (γ -サブユニット) をコードする遺伝子が大腸菌発現ベクターにクローニングし、大腸菌の稀少コドン tRNA の供給を行う事で大腸菌内での発現、精製に成功した。後述する酵母 *Pichia inositovora* が生産するキラートキシシンとの相同性を参考にした変異導入実験、および精製した γ -サブユニットを用いた生化学的実験により、Arg168 が活性に必須であること、および pH7.5 付近で最大活性を示す事が分かった。その後、 γ -サブユニット単体の結晶化に取り組んでいるが、現在までに結晶は得られていない。そこで γ -サブユニットとインヒビターとの共結晶構造を得ることを目指した。なお、キラープラスミド上に zymocin の殺菌活性を免れる免疫性 (immunity) 遺伝子は同定されているものの、実際にこれがヌクレアーゼ型コリシンのように、 γ -サブユニットに対するインヒビターを作っている実験証拠はなかった。そこで、 γ -サブユニット遺伝子と immunity 遺伝子とをそれぞれ大腸菌内で発現し、タンパク質を精製した後、非変性ゲル電気泳動による結合性と、 γ -サブユニット活性に対する阻害活性を確認し、免疫性の正体が、 γ -サブユニットに対するインヒビタータンパク質であることを実証した。現在、複合体での結晶化を試みている。

4. 酵母 *Pihica inositovora* が生産するキラートキシシンは RNase 活性を有する

zymocin が tRNase であるという報告を受け、酵母キラーの中に、コリシン D や E5 のような、tRNA 特異的リボヌクレアーゼファミリーが広がっている可能性を考え、まず *Pichia inositovora* が生産するキラートキシシンに着目した。このキラートキシシンは、*S. cerevisiae* に対して弱い致死作用を示し、zymocin の γ -サブユニットとアミノ酸レベルで 12.5% の低い相同性を示すドメインを持つ。酵母 total RNA に対する切断活性を測定するために、この対応遺伝子が大腸菌発現ベクターにクローニングし、大腸菌での発現を試みたところ明らかな生育阻害を示し、この大腸菌より調製した total RNA はスメア状になっていた。この発現系でわずかに発現したキラートキシシンを精製し、酵母から抽出した total RNA と反応させ

たところ、total RNA 全体をスメア状に切断する活性を持つことを確認できた。さらに、zymocin の Arg168 に対応する *P. inositovora* 由来キラートキシンの Arg163 を変異させると RNase 活性がなくなるという類似性を示した。一方、酵母野生株と、mcm⁵s² U 修飾酵素を欠失した Δ ELP3 株から抽出した total RNA を基質とし、tRNA^{Glu}UUC に対するプローブでノザン解析したところ、tRNA^{Glu}UUC のアンチコドン 1 文字目の修飾がなくなることで zymocin は切断活性を著しく低下させるのに対して、*P. inositovora* 由来キラートキシンは切断活性を上昇させるという点で相違が見られた。このキラートキシンの立体構造を解析することで、両者の酵素学的諸性質の相違の由来について明らかに出来ると期待される。新規 tRNase zymocin, 新規 RNase *P. inositovora* トキシンが見つかった事により、酵母の生存戦略として RNA を標的としたトキシンが広く普及していることが考えられる。

まとめ

本研究では、立体構造と生化学的データを元に、コリシン D の反応機構として Lys608 が一般酸触媒、His611 が一般塩基触媒、Trp679 が基質認識に関わるという、新規モデルを提唱した。また、分子動力学法によるモデリングは、ImmD が基質 RNA を擬態するという仮説を支持した。また酵母 *K. lactis* のキラートキシン zymocin との類似性から酵母 *P. inositovora* のキラートキシンが新規リボヌクレアーゼ型トキシンであることを見出した。活性に重要な Arg の存在、直鎖状プラスミドにコードされているという点で酷似しているが、認識における修飾塩基の必要性や比活性に相違が見られる。今後立体構造を明らかにすれば、これらの類似性・相違性が生じる理由を解明するための大きな知見が得られるだろう。

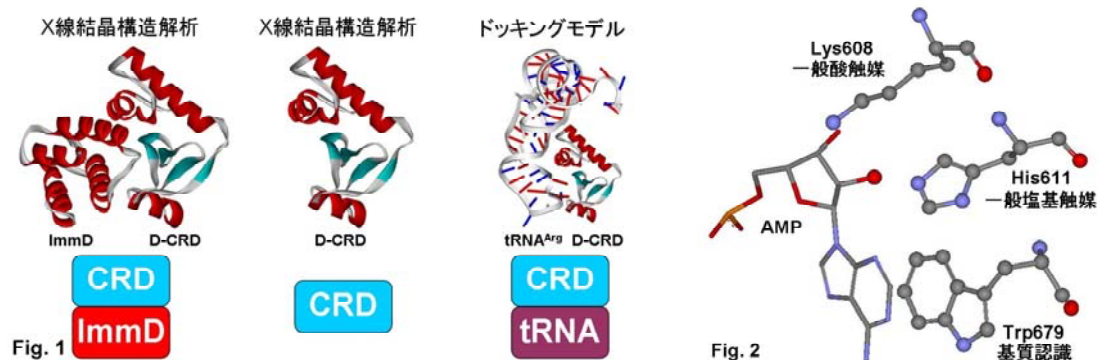


Fig. 1 : 結晶構造解析、および、ドッキングモデルから得られた構造

Fig. 2 : D-CRD の活性中心構造。AMP は反応機構から予想される位置に配置した（赤丸が AMP の 2'-OH を表す）

参考文献

- 1) Yajima, S., Nakanishi, K., Takahashi, T et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 966-73 (2004).
- 2) Takahashi, T et al. *Acta Crystallographica Section F.* **62**, 29-31 (2006).