

論文内容の要旨

論文題目 ヒト核酸結合タンパク質の結晶構造解析
(Structural analyses of human nucleic acid binding proteins)

氏 名 加藤 めぐみ

遺伝子の情報は、DNA→RNA→タンパク質という流れ（セントラルドグマ）で発現する。この際、DNA や RNA といった核酸は単独では機能せず、核酸結合タンパク質と協調して機能する。核酸結合タンパク質は転写・翻訳の制御など、極めて重要な働きを担っており、生命現象の根幹を担っているといっても過言ではない。一方、細菌やウイルス感染によって生じた外部からの核酸は、自然免疫系によって認識される。細胞内の非自己核酸の認識には、RIG-I や MDA5 といった RNA ヘリケースが関与していることが知られている。このように核酸結合タンパク質は転写・翻訳の制御のみならず、感染防御など生体内で多様な機能に関与している。本研究では、2つの核酸結合タンパク質に着目し、主に X 線結晶構造解析を用いてその構造と機能を解明することを目指した。

TYW5 の X 線結晶構造解析

背景・目的

遺伝情報発現において RNA→タンパク質に変換される翻訳過程では、mRNA 上のコドンと呼ばれる遺伝暗号が L 字型構造をした tRNA を介して適切なアミノ酸に変換される。このアダプターとしての機能を獲得するため、tRNA は DNA から転写された後いくつかのプロセスを経て成熟する。転写された tRNA はまずプロセシングにより適切な長さに加工作られ、続いて様々な塩基修飾を受けることで初めてアダプター分子としての機能を獲得する。特に塩基修飾は、あらゆる種類の RNA に普遍的に存在することが知られており、A, C, G, U の 4 塩基のみからなる RNA が多様な機能を獲得するための戦略と考えられる。tRNA に見出される修飾塩基の役割は、L 字型立体構造の安定化と、コドン-アンチコドン対合の安定化の二つに分類することが出来る。L 字型構造の補強に寄与する修飾塩基は、主に tRNA の L 字の肩の部位に位置する D アームの一部とバリアブルループにあり、一方のコドン・アンチコドン対合の安定化に働く修飾塩基はアンチコドンアームで見つかっている (図 1)。特に、三つの塩基からなるアンチコドンの一番目の塩基である 34 位、及びアンチコドン隣接部位である 37 位は、翻訳の正確性を保証するという重要な役割を持ち、多くの修飾塩基の存在が報告されている。37 位の修飾塩基の中で最も良く研究されている修飾塩基のひとつにワイブトシンがある。

ワイブトシンは真核生物の tRNA^{Phe} のアンチコドン隣接部位である 37 位に存在する三環構造と大きな側鎖を有する高次修飾塩基である (図 1)。この修飾塩基は三環構造により隣接した 36 位の塩基とスタッキング相互作用をすることで、リボソームにおける遺伝暗号読み取りの際のコドン-アンチコドン対合の安定化に寄与し、フレ

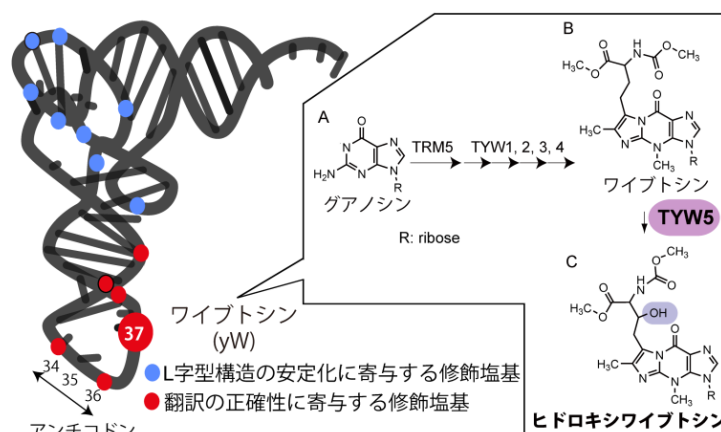


図 1 tRNA における修飾塩基の位置及びワイブトシン合成経路

ームシフトによる誤翻訳を防いでいる。近年の研究により、酵母におけるワイブトシン合成経路は Trm5 によるグアノシンのメチル化から始まり、続いて TYW1~4 によって触媒される多段階反応であることが明らかになった (図 1, Noma *et al.*, *EMBO J.*, 2006)。さらに、ヒトを含む多くの真核生物には、ワイブトシンの β 位がヒドロキシル化されるという、より高度な修飾をうけたヒドロキシワイブトシン (図 1) の存在が知られていたが、詳しい反応機構はもとより、その反応を担う酵素、および水酸基を供与するドナーについても長らく未解明のままであった。2010 年に、当研究室と共同研究先の東京大学工学系研究科鈴木研究室により鉄イオンと 2-オキシグルタル酸 (2-OG) 依存的にヒドロキシワイブトシンを合成する新規酵素 TYW5 が発見された (Noma *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010)。TYW5 はアミノ酸配列から、jumonji C (jmc) ドメインを有する非ヘムヒドロキシラーゼに類似していると予想された。jmc ドメインは、ヒストン修飾酵素等にしばしば見られる重要な構造で近年注目を集めている。しかし、今まで発見された jmc ドメインを有するタンパク質がヌクレオチド鎖の認識に関わる報告はなく、TYW5 はこの種のタンパク質でヌクレオチド鎖に結合する初めての酵素と予想された。そこで本研究では、TYW5 によるヒドロキシル化反応機構及び tRNA との結合様式の構造的基盤の解明を目的とし、ヒト由来 TYW5 の結晶構造解析及び構造に基づいた変異体解析を行った。

結果

ヒト由来 TYW5 (hTYW5) 全長を大腸菌内で大量発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、高純度で精製することに成功した。この精製した hTYW5 を用いて結晶化スクリーニングを行い、分解能 2.8 Å の良質な結晶を得ることに成功した。次に位相決定のためのセレンメチオニン置換体 hTYW5 を調製し、新たな結晶化スクリーニングを通じてセレンメチオニン置換体結晶を得た。これらの結晶を用いた多波長異常分散法により位相を決定し、hTYW5 の構造を決定することに成功した (図 2A)。hTYW5 は、C 末端側のヘリックスバンドルを介して二量

体を形成し, 通常 8 本の逆並行 β バレルからなる β ジェリーロールコア領域をもつ 2-OG 依存性的なオキシゲナーゼに特徴的な構造を持っているこ

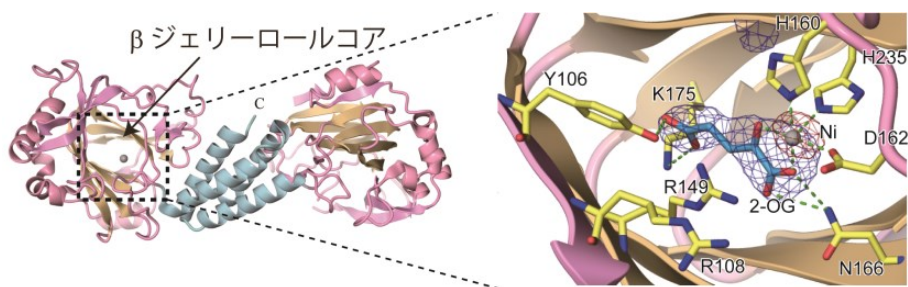


図 2 (A) 全体構造

(B) 活性部位

とが明らかとなった. さらに, 得られた結晶に対し 2-OG と鉄イオンの代わりに阻害剤としてニッケルイオンを結晶に浸潤させ, 活性部位における補因子結合様式を明らかにした. 活性部位は, His160, His235, Asp162 がニッケルイオンを配位しており, 2-OG がニッケルイオンのうち二配位を占めている. また 2-OG は Lys175 および Tyr106 と水素結合, Val237 と疎水性相互作用を形成することで安定化している事が明らかになった (図 2B).

活性部位を, 最も相同性の高いヒドロキシラーゼである FIIH と比較すると, 非常によく保存されているが, TYW5 のみに特徴的な二つのアルギニン残基 (Arg108 および Arg149) が存在することが明らかとなった. その触媒活性における役割を検証するため, これらのアルギニン残基をアラニンに置換した点変異体を作製し, 東京大学鈴木博士との共同研究で LC/MS を用いた変異体解析を行った. 機能解析の結果, どちらの変異体も活性を全く持たないことが明らかになった. またゲルシフトアッセイにより tRNA との結合能を検証すると tRNA との結合性も低下していた. これらの結果から, これらのアルギニン残基は tRNA との結合に重要な働きを示しており, その結果, ヒドロキシル化活性が著しく低下したものと考えられる. また, 表面電荷分布から活性部位及び C 末端ヘリックスバンドルに正に帯電した領域が存在する事が明らかになった. これらの領域が tRNA との結合表面を形成していると考え, C 末端のヘリックスバンドルを欠失した変異体を調製し, 同様の機能解析を行った. この変異体もヒドロキシル化活性, 及び tRNA の結合能が著しく低下していた. これらの構造生物学的な考察, 及び生化学的な解析により, 図 3 のように TYW5 による tRNA 認識機構を提唱した (図 3).

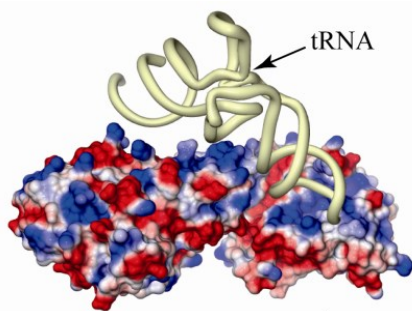


図 3 tRNA 認識モデル

DDX41 の結晶構造解析

背景・目的

生体にとって, 外部からの細菌やウイルスの侵入は大きな脅威である. そこで生体では, 免疫系を活性化することで, 病原菌の侵入を防いできた. 免疫系は大きく獲得免疫系と自然免疫系の 2 つに分類することができる. 特に自然免疫系では, 病原体関連分子パターン

(pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識することで細菌の感染をいち早く感知する。近年, cyclic-diGMP (c-diGMP) という環状小分子が PAMPs として認識されていることが明らかになった。c-diGMP はヌクレオチドが 2 つのリン酸ジエステル結合により結合した環状構造をとる小分子で、もともとはセルロース合成の活性化因子として同定され、その後の研究により、細菌でセカンドメッセンジャーとして機能することが明らかになった (Hengge, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009)。昨年, DEAD-box 型ヘリケースである DDX41 が細菌感染によって生じた c-diGMP を直接認識し、ER 上に存在する受容体 STING 依存的な経路を活性化し、I 型インターフェロンの産生に関与することが明らかになった (図 4, Parvatiyar *et al.*, *Nat. Immunol.* 2012)。さらに, DDX41 は細胞内 DNA の感知に関与する可能性も示唆されている (Zhang *et al.*, *Nat. Immunol.* 2011)。しかし, DDX41 による詳細な c-diGMP 認識機構およびシグナル伝達機構に関しては不明な点が多い。そこで本研究では X 線結晶構造解析を用いて, DDX41 による c-diGMP 認識及びシグナル伝達反応機構の解明を目指した。

結果

現在までにヒト由来 DDX41 コンストラクションの改変及び発現・精製系の確立を行った。ヒト由来 DDX41 DEAD ドメインを大腸菌内で大量発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、高純度で精製することに成功した。この精製したヒト由来 DDX41 DEAD ドメインのタンパク質と c-diGMP を用いて DDX41・c-diGMP 複合体の結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化を行ったところ、分解能 3 Å を超えるデータセットを与える結晶を得た (図 5)。

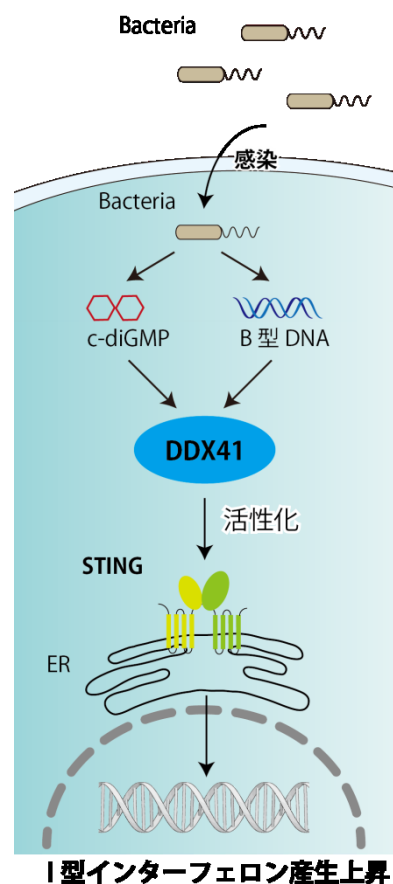


図 4 DDX41 反応機構モデル

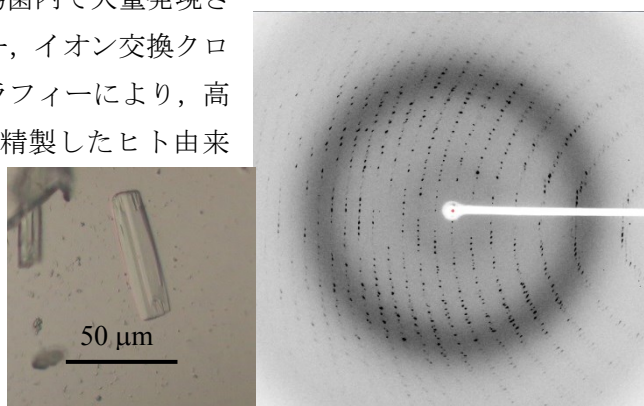


図 5 DDX41 の結晶及び回折像