2',5'-結合オリゴアデニル酸は リボヌクレアーゼLの N末端ドメインに結合する

昭和大学薬学部 田中信忠

1. はじめに

生体防御システムである「免疫」には、大きく分けて「自然免疫」と「獲得免疫」という2つのシステムがあり、「自然免疫」の切り札の1つとして「インターフェロン (IFN)」というタンパク質がある¹⁾。我々がウイルスに感染すると、体内の細胞がIFNを合成し細胞外へ分泌する。IFNが周辺の細胞に到達すると、IFN受容体の細胞外ドメインへ結合する。その結果、細胞内にシグナルが伝わり、細胞はウイルス感染を防御できる状態となる。IFN誘導型抗ウイルス機構として、「2-5A システム」²⁾、「PKR」³⁾、「Mx proteins」⁴⁾の3つの系が知られている。

我々が注目している「2-5A システム」(Fig. 1)は、(1) IFNにより誘導される2',5'-結合オリゴアデニル酸(2-5A)合成酵素(2-5OAS)がウイルス由来2本鎖RNA(dsRNA)により活性化され、(2) 活性型2-5OASがATPから2-5Aを合成し、(3) 2-5Aが不活性型単量体リボヌクレアー

ゼL(RNase L)⁵⁾を活性化し、(4) 活性型RNase L/2-5A複合体(2量体)がウイルスのmRNAを分解し、タンパク質合成の阻害によりウイルスの増殖を抑制するという仕組みになっている。ヒト由来RNase Lは、全長741アミノ酸残基から成るタンパク質で、N末端アンキリンリピート⁶⁾ドメイン、中央部キナーゼ類似ドメイン、C末端RNaseドメインという3つのドメインにより構成されている(Fig. 2a)⁵⁾。2-5Aは、非常にユニークな構造をしている(Fig. 2b)。通常のDNAやRNAでは、おのおののヌクレオチドは3',5'-ホスホジエステル結合により連なっているが、2-5Aの場合、その名の通り2',5'-ホスホジエステル結合により連なっている⁶⁾。

生体内で安定でかつ高いRNase L活性化能を有する2-5A類似体は新しいタイプの抗ウイルス薬と成り得るため、各種2-5A誘導体の合成が盛んに行われている²⁾。我々は、RNase Lに対する2-5Aの結合様式や結合によるRNase Lの活性化機構を解明し新規抗ウイルス薬のデザインに役立てるため、ヒトRNase Lの立体構造解析を進めている。本稿では、ヒトRNase LのN末端アンキリンリピートドメイン(ANK)による2-5A認識機構に関し、その特徴を紹介する。

2. アンキリンリピートドメインの立体構造

我々は数年間の試行錯誤の末、ヒトRNase LのANK(残基番号1-333)と2-5Aとの複合体の結晶化に成功し、その立体構造を1.8 Å分解能で決定した⁷⁾。結晶構造解析の結果(Fig. 2c)、ANKは8回繰り返しアンキリンリピートから成り、リピート4と5の間に挿入ヘリックス α Iが存在し、2-5Aはリピート2から4の範囲に結合していた。ANKの立体構造に基づく繰り返し配列のアラインメントをFig. 3に示す。 α Iの挿入とリピート

Fig. 1 The 2-5A system.

The 2',5'-Linked Oligoadenylate Binds to the N-Terminal Domain of Ribonuclease L

Nobutada TANAKA

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University

Fig. 2 Crystal structure of ANK complexed with 2-5A. (a) Structural and functional domains of RNase L. (b) Structure of the predominant trimeric species of 2-5A. (c) Ribbon representations of the ANK/2-5A complex. The bound 2-5A molecule is shown as a ball-and-stick model.

		$\beta 1$	Inner helix ($\alpha 1$)	Outer helix ($\alpha 2$)	$\beta 2$				
Consensus	No	1	10	20	30				
Consensus	Sq	. G . T . L . A		 LL . - GA . N . .	33				
R1 Human	27	---	HLLIKAVON	---EDVD	---	LVOQLLEG	GADVNFQEEF	-----	57
R1 Mouse	27	---	SSLIKAVOK	---GDVV	---	RVQOLLEK	GADANACDET	-----	57
R1 Rat	27	---	LLIEAVNK	---GDAD	---	RVQOLLEQ	GADANVCES	-----	57
R2 Human	58	---	GGWTPPLHNAVOM	---SRED	---	IVELLRLRH	GADPVLRRKK	-----	90
R2 Mouse	58	---	GCWTPLHNVAOVA	---GRVD	---	IVNLLLSH	GADPHRRKK	-----	90
R2 Rat	58	---	GCWTPLHNAVQS	---GRVD	---	IVNLLLLRY	GADPHRRRK	-----	90
R3 Human	91	---	NGATPFILAAIA	---GSVK	---	LLKFLFSK	GADVNECDF	-----	123
R3 Mouse	91	---	NGATPPFIITAGIO	---GDKV	---	LLLEILLS	GADVNECDE	-----	123
R3 Rat	91	---	NGATPPFIVAGIC	---GDVS	---	LLQIFLSR	GAINNERDM	-----	123
R4 Human	124	---	YGFTAFMEAAVY	---GKVY	---	ALKFLYKR	GADVNLRRKTTEKDQERLRK	-----	166
R4 Mouse	124	---	NCFATFMEAAPER	---GNAE	---	ALRFLEAK	GADVNLRRQTETTKDKRRLKQ	-----	166
R4 Rat	124	---	YGFTAFMEAAEY	---GNVE	---	ALKFLFAE	GADVNLRRRETTEDDRRLKQ	-----	166
R5 Human	167	---	GGATALMDAAEK	---GHVE	---	VLIKILLDEM	GADVNVACDN	-----	200
R5 Mouse	167	---	GGATALMSAAEK	---GHLE	---	VRILLINDMKA	EVDARDN	-----	200
R5 Rat	167	---	GGATALMSAEN	---GHPE	---	VVRILLDEMKA	EADARDN	-----	200
R6 Human	201	---	MGRNALIHALLSSDSDSVEA	---TTHLLDH	---	GADVNVRGF	-----	237	
R6 Mouse	201	---	MGRNALIRTLTNWDCCNVEE	---TTSILIOH	---	GADVNVRGF	-----	237	
R6 Rat	201	---	MGRNALIRSLNRDCNVEEIHVEE	---TTSVLIOY	---	GADVINVGE	-----	241	
R7 Human	238	---	RGKTPPLILAVER	---KHLG	---	LVORLLEOEHI	EINDTDS	-----	271
R7 Mouse	238	---	RGKTPPLIIAAVER	---KHKG	---	LVQMILLSREG	INKIDARDN	-----	271
R7 Rat	242	---	GKPTPLISAVKR	---KHKG	---	LVQMLLSQEG	IKINDRDS	-----	275
R8 Human	272	---	DGKTALLLADEL	---KLKK	---	IAELLLCKR	GASTDCGDLV	305	
R8 Mouse	272	---	BGKTALLLIAVDK	---OLKE	---	IVOLLLEK	GAD-KCDDLV	304	
R8 Rat	276	---	EKGTALOIAYEL	---KLKE	---	IVRLLLEK	GADTKCGDLV	309	

Fig. 3 Structure-based sequence alignment of the eight ankyrin repeats (R1 to R8) of human, mouse, and rat RNase Ls. Secondary structural elements, consensus sequence numbers, and consensus sequences are shown on top. The 2-5A binding motifs (#) are boxed in gray.

6内の挿入を除くと、ANKは、他のタンパク中に見られるアンキリンリピートと同様のコンセンサス配列をもつ33残基の繰返しから成っていることがわかる。 α I部分は、リピート2と3および3と4の間の β -ヘアピン構造と共に、2-5Aが結合するプラットフォームを形成している (**Fig. 2c**)。一方、リピート6内の挿入の役割は不明である。リピート全体の顕著な湾曲 (**Fig. 2c**)

は、2-5A の結合と関連している。すなわち、2-5A 非存在下で ANK の構造はこれほど湾曲しておらず、2-5A の結合により構造変化が起こることを示唆するデータが共同研究者によって得られている⁸⁾。しかし、2-5A 非存在下では結晶が得られていないため、2-5A 存在下・非存在下の両者の構造比較はまだまだできていない。

3. 2-5Aの認識

今日、多種多様なタンパク質中にアンキリンリピートドメインが存在することが知られている。しかし、そのほとんどは分子内あるいは分子間のタンパク質-タンパク質相互作用によって機能制御に関与しており、核酸と直接相互作用するアンキリンリピートドメインは、著者の知る限り RNase L の ANK だけである。

Fig. 4a に示したように、我々は2-5AとANKとの相互作用を原子レベルで詳細に明らかにした。立体構造を決定するまでは、ANKの2-5A結合部位には、他の核酸結合タンパク質に見られるように2-5Aのリン酸基を認識するための正電荷をもつアミノ酸のクラスターが存在するのではないかと考えられていた。しかし、その推測は見事に否定され、ANKの分子表面に正電荷のクラスターは存在しなかった。ANKは、主として2-5Aの塩基側を認識していたのである (Fig. 4a)。その認識機構に注目すると、2-5Aの1番目 (Fig. 4b) と3番目 (Fig. 4c) の AMP 部位 (2-5Aは、2',5'-結合による5'-AMPの3量体とみなせる) が、ANKのリピート4とリピート2によって、まったく等価な結合様式で認識されていた。すなわち、塩基性側鎖 (Arg155, Lys89) がリン酸基 (Phos1, Phos3) と相互作用し、芳香族側鎖 (Phe126, Trp60) がアデニン環 (Ade1, Ade3) とスタッキングし、親水性側鎖 (Glu131, Asn65) がアデニン環 (Ade1, Ade3) と水素結合していた。さらに、Ade1 および Ade3 は、それぞれ、4重 (Arg155-Phe126-Ade1-Ade2) および3重 (Lys89-Trp60-Ade3) のスタッキング相互作用によりそのコンホメーションが固定されていた。

大変興味深いことに、これらの残基はANKの繰り返し配列上で等価な場所に位置するアミノ酸 (Fig. 3, #印) であり、かつ、コンセンサス配列ではない。つまり、コンセンサス配列はアンキリンリピートの構造形成に重要な役割を果たし、保存されていない側鎖が、多種多様な結合パートナーを選択しているのである。また、これらの残基がヒト、マウス、ラット間で完全に保存されていることから、ANKによる2-5Aの1番目と3番目のAMP部位の認識が重要であると考えられる。実際、2番目のAMP部位とANKとの間の直接の相互

Fig. 4

Fig. 4 Recognition of 2-5A by ANK. (a) The mode of 2-5A binding to ANK. Possible hydrogen bonds or salt bridges are indicated by dashed lines, and distances (in Å) are given. The refined model is superimposed on the $|F_o| - |F_c|$ omit map of 2-5A (4.0σ), calculated at 1.8 Å resolution. Bound water molecules are shown as spheres. (b), (c) Recognition of the first and third AMP moieties of 2-5A by repeats 4 and 2, respectively, of ANK.

作用は, Tyr131 (マウスではArgとなり, 保存されていない) との間の1本の水素結合しかない (Fig. 3, 4a). また, これまでに蓄積されている各種2-5A誘導体の構造機能相関データも, 1番目と3番目のAMP部位が必須骨格であり, その部位への官能基導入は活性を低下させるが, 2番目のAMP部位への官能基導入はそれほど悪影響を及ぼさないという結果を示している²⁾. 「なぜ2-5Aは, 3',5'-ではなく, 2',5'-ホスホジエステル結合を採択しているのか?」という疑問に関しては, モデリングの結果から, Fig. 4aに示した結合様式を成し遂げるためには, 2-5A中の2箇所のホスホジエステル結合の両方が2',5'-結合でなければならないことがわかった.

4. おわりに

本研究のセールスポイントは, ANK/2-5A複合体の立体構造解析により両者の結合様式を解明し, 必須の相互作用部位と修飾可能な相互作用部位を同定したことである. その結果に基づき, 生体内で安定でかつ高いRNase L活性化能を有する2-5A類似体 (IFNのシグナル伝達経路を介さずRNase Lを直接活性化するという作用機構) を得ることを目指し, 新規2-5A誘導体のデザイン及び合成が共同研究者によって進められている. し

かし, RNase Lの(1)2-5Aの結合による2量体化機構, (2)活性化機構, (3)RNA切断機構に関しては, 多くの謎が残されている. 今後, RNase L全長の立体構造解析に取り組み, これらの点を解明したい.

本稿で紹介した研究は, 岐阜大学工学部の北出幸夫教授, 中西雅之博士, 後藤芳邦院生, 昭和大学薬学部の中村和郎教授, 日下部吉男助手らとともに行われたものである.

文 献

- 1) Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silvermann, R. H. and Schreiber, R. D. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227-264.
- 2) Player, M. R. and Torrence, P. F. (1998) *Pharmacol. Ther.* **78**, 55-113.
- 3) Williams, B. R. (1995) *Semin. Virol.* **6**, 191-202.
- 4) Pavlovic, J. and Staeheli, P. (1991) *J. Interferon Res.* **11**, 215-219.
- 5) Zhou, A., Hassel, B. A. and Silvermann, R. H. (1993) *Cell* **72**, 753-765.
- 6) Kerr, I. M. and Brown, R. E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 256-260.
- 7) Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y., Goto, Y., Kitade, Y. and Nakamura, K. T. (2004) *EMBO J.* **23**, 3929-3938.
- 8) Nakanishi, M., Goto, Y. and Kitade, Y. (2005) *Proteins* **60**, 131-138.

田中信忠（たなか のふただ）
昭和大学薬学部薬品物理化学教室講師
連絡先：〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8
E-mail: ntanaka@pharm.showa-u.ac.jp