

配列認識の構造基盤 : L1, TRAS1, R1Bm

non-LTR retrotransposon (LINE)のコードするエンドヌクレアーゼには2つのタイプがある。一つは、DNA 修復系の酵素である apurinic/apyrimidinic endonuclease (AP endonuclease)に近いタイプ。もう一つは、II 型制限酵素と活性残基が共通するタイプである。non-LTR retrotransposon はエンドヌクレアーゼが切断した位置に挿入されるので、エンドヌクレアーゼは標的の最終的な決定者であると言える。non-LTR retrotransposon は変異源であり、ゲノム進化の原動力でもあるので、標的をどのように認識しているのかを知ることには意義がある。

さて、標的の認識は究極的にはエンドヌクレアーゼと標的 DNA との相互作用というレベルで理解されなければならない。制限酵素に似たエンドヌクレアーゼの構造はまだ決定されていないが、AP endonuclease に似たエンドヌクレアーゼについては、3 種類の non-LTR retrotransposon でその結晶構造が報告されている。AP endonuclease は塩基が失われた DNA を認識して切断する酵素であり、原核生物から真核生物まで普遍的に分布している。AP endonuclease には exonuclease 活性や 3' phosphodiesterase 活性、RNase H 活性もあり、その活性の相対的な強さは種ごとに異なる。non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼもこれらの活性を持っていると考えられているが、主な活性は DNA の切断、すなわちエンドヌクレアーゼ活性である。non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼはまず、下側の DNA 鎖を切断し、その後上側の DNA 鎖を切断することが知られている。この場合の下側とは挿入後にタンパク質をコードしない cDNA の鎖の側であり、上側がタンパク質をコードする側を意味する。

ヒトの L1 のエンドヌクレアーゼの結晶構造は Weichenrieder らによって 2004 年 6 月に発表された (Weichenrieder et al. 2004)。解像度は 1.8 Å。non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼが属する DNase I-fold superfamily の内、これ以前に結晶構造が報告されていたのは、ウシの DNase I (deoxyribonuclease I)、ヒトの APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1)、大腸菌の ExoIII (exonuclease III)、出芽酵母の IPP5 (inositol polyphosphate-5-phosphatase)の 4 つであったが、DALI による構造比較では、APE1 及び ExoIII に最も近いことが示された。もちろん、これは一次配列レベルでの類似性と一致する。また、この結晶における 115 番目のチロシン (Y115) は non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼと AP endonuclease に共通して存在するが、DNase I や IPP5 ではヒスチジンになっている点も類似性と一致する。構造は 2 層の α/β サンドイッチ構造が重複して回転対称になっており、触媒活性に関わるアミノ酸の位置も AP endonuclease とよく似ている。著者らは AP endonuclease と比較して L1 の標的認識機構を詳細に議論しているが、図を見ずに理解するのは困難なのでここでは省略したい。ただ、

彼らの論文が non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼの結晶構造を最初に決めた論文であることは強調しておかねばなるまい。

カイコの TRAS1 のエンドヌクレアーゼの結晶構造は Weichenrieder らにわずかに遅れて 2004 年 9 月に論文が出版されている (Maita et al. 2004)。解像度は 2.4 Å と少し悪い。TRAS1 のエンドヌクレアーゼは昆虫のテロメア反復配列 (TTAGG)_n を特異的に切断する活性があることが報告されており (Anzai et al. 2001)、その特異性が何に基づいているのかは興味を持たれるところであった。この論文では、まず、TRAS1 のエンドヌクレアーゼがヒトタイプのテロメア反復配列 (TTAGGG)_n をも特異的に切断できることをしめし、以前の報告と併せて、GGTT|AGG が認識される標的であることを明らかにしている。続いて、結晶構造が AP endonuclease と同じ 4 層 α/β サンドイッチ構造であることを示し、AP endonuclease 及び DNase I との構造比較を行っている。TRAS1 のエンドヌクレアーゼは、AP endonuclease に比べると、DNA に接触する側に存在する 3 つのループの内、2 つが小さくなっており、残り 1 つは長さこそ違いが無いものの DNA 側に食い込むように形が変わっていることがわかった。このループは β ヘアピンと呼ばれている。続く生化学的解析では、この β ヘアピンを取り除くとエンドヌクレアーゼの配列特異性が無くなりテロメア反復配列以外の DNA (この場合には 28S rDNA の配列) をも切断するようになることが示されている。また、D130 を A に変えた場合にも配列特異性が失われる。この D130 は短くなっているループの一つの根元に位置し、DNase I と DNA との共結晶に基づくモデルでは、 β ヘアピンと D130 とが標的 DNA を挟む形で認識することが想定される。

カイコの R1Bm は TRAS1 と比較的近縁な non-LTR retrotransposon であり、28S rDNA の特定の位置に挿入される性質を持つ。前述の TRAS1 のエンドヌクレアーゼの変異体が切断した 28S rDNA の配列とは、この R1Bm が特異的に切断する配列である。この R1Bm のエンドヌクレアーゼの結晶構造が報告された (Maita et al. 2007)。解像度は 2.0 Å。

この R1Bm の配列特異性は Feng らによって既に解析がなされており、挿入位置を反映した“正しい”切断位置に加えて、いくつかより弱い切断位置があることが知られていた (Feng et al. 1998)。著者らはまず、R1Bm のエンドヌクレアーゼを精製し、28S rDNA の配列のオリゴヌクレオチドを基質として切断実験を行い、DNA に変異が入った場合の切断活性と切断位置の変化を調べた。この実験結果から、下側の鎖の切断位置の 5' 側 5 塩基と 3' 側 3 塩基が切断に重要なことを示している。この長さは、TRAS1 のエンドヌクレアーゼの場合とほぼ一致する。続いて上側の鎖の切断に必要な配列を調べたところ、興味深いことに、下側の鎖を切断できないオリゴヌクレオチドを用いた場合にも上側の鎖の切断が観察された。すなわち、上側の鎖の切断は下側の鎖の切断とは独立に起こり

うる。また、上側の鎖の切断についても切断位置の 5'側 5 塩基と 3'側 3 塩基が認識に重要であることが示されている。ここからは、R1Bm のエンドヌクレアーゼの DNA 切断は上側も下側も同じ配列認識に依存していることが示唆される。下側の鎖の切断実験では、切断位置の近くに変異を入れた場合には切断位置そのものが移動する例もあった。切断位置の移動、マイナーな切断位置、そして上側と下側の鎖の正確な切断位置の配列を比較することで、Maita らは R1Bm のエンドヌクレアーゼが認識する配列は 5'-A(G/C)(A/T)|(G/A)T-3'であると主張している。ちなみに下側の鎖の切断位置は ACA|GT、上側の切断位置は ACT|AT である。

R1Bm のエンドヌクレアーゼの結晶構造は TRAS1 とかなりよく似ており、C α (アミノ酸の側鎖が結合する炭素原子) 原子の root mean square difference (RMSD, 距離の平均自乗偏差) はたった 0.68 Å しかない。結晶構造に基づいて DNA と相互作用することが想定されるアミノ酸に変異導入したところ、E18, D19, H54, S206 の変異体では、下側の鎖の切断活性が半分以下になるにも関わらず上側の鎖の切断活性は野生型の 80% 以上と高い水準を示した。これらのアミノ酸は上側の鎖の切断に際してのみ配列認識に重要なのであろう。Y98 をアラニンに置換したエンドヌクレアーゼは意外な挙動を示した。Y98A 変異体はオリゴヌクレオチドを野生型 (ACA|GT) と 2 塩基違う位置 (AGT|GG) で切断した。また、マイナーな 3 つの切断位置のうち、2 つ (TAG|AT, ATA|GT) の切断は弱くなり、1 つ (AGT|AG) は強くなった。前述したコンセンサス配列では、+2 の位置はチミンであるが、Y98A 変異体は+2 の位置にグアニンをより好むと言える。エンドヌクレアーゼのアラインメントでは、この Y98 は TRAS1 の D130 の 1 アミノ酸上流に位置するのでこの領域のアミノ酸が配列特異性に重要なかもしれない。

エンドヌクレアーゼの標的認識は多数のアミノ酸が関与し、非常に複雑であり、配列特異性をアミノ酸レベルで理解することは至難である。更に、non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼの配列の多様性は、AP endonuclease のそれをはるかに凌ぐ。従って、3 種の non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼの結晶構造の決定は、ごく近縁なエンドヌクレアーゼの解析には有用であるが、離れたエンドヌクレアーゼの解析にはあまり寄与できていない。かといって、様々な non-LTR retrotransposon のエンドヌクレアーゼの結晶構造をやみくもに決定していくのは合理的ではない。まずは、結晶構造の決まったエンドヌクレアーゼについて構造上の理解を深めることから始めるべきであろう。

Weichenrieder O, Repanas K, Perrakis A.

Crystal structure of the targeting endonuclease of the human LINE-1 retrotransposon.

Structure. 2004 Jun;12(6):975-86.

Maita N, Anzai T, Aoyagi H, Mizuno H, Fujiwara H.

Crystal structure of the endonuclease domain encoded by the telomere-specific long interspersed nuclear element, TRAS1.

J Biol Chem. 2004 Sep 24;279(39):41067-76.

Anzai T, Takahashi H, Fujiwara H.

Sequence-specific recognition and cleavage of telomeric repeat (TTAGG)(n) by endonuclease of non-long terminal repeat retrotransposon TRAS1.

Mol Cell Biol. 2001 Jan;21(1):100-8.

Maita N, Aoyagi H, Osanai M, Shirakawa M, Fujiwara H.

Characterization of the sequence specificity of the R1Bm endonuclease domain by structural and biochemical studies.

Nucleic Acids Res. 2007 Jun 1;35(12):3918-3927.

Feng Q, Schumann G, Boeke JD.

Retrotransposon R1Bm endonuclease cleaves the target sequence.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2083-8.

2007/07/18

小島 健司 著

禁 無断複写転載