

テロメラーゼの立体構造

テロメラーゼは言わずと知れた、ガン細胞で高発現し、細胞が寿命で分裂できなくなるのを防いでいる酵素である。我々ヒトの通常の体細胞では、テロメラーゼは発現しておらず、分裂の度にテロメア反復配列は短くなっていく。テロメア反復配列がある閾値よりも短くなると分裂できなくなる。テロメア反復配列が老化のバロメータと言われる所以である。一方、生殖細胞や幹細胞ではテロメラーゼが発現し、テロメア反復配列が伸長されることで細胞は分裂を繰り返すことができる。テロメラーゼは2つのサブユニットから構成されている。一つはテロメア反復配列の鋳型となるテロメラーゼ RNA(telomerase RNA, TER)、もう一つは、酵素活性を担うテロメラーゼ逆転写酵素(telomerase reverse transcriptase, TERT)である。この TERT は逆転写活性を持ち、TER の配列を逆転写してテロメア反復配列として染色体末端に付加する。

TERT はアミノ酸配列上、4つのドメインに分けられる。最も N 末側は、telomerase essential N-terminal domain (TEN)が位置し、GQ モチーフと呼ばれる保存性の低いモチーフが含まれている。TEN は DNA、RNA との結合能を持つ。しかし、昆虫で見つかった TERT ではどれもこの TEN に相当する領域は含まれていない。続く領域は telomerase RNA-binding domain (TRBD)と呼ばれ、保存モチーフとして、CP、QFP、T と呼ばれる 3つのモチーフが含まれている。この領域は TER と結合する。中央部は逆転写酵素(RT)ドメインで、レトロウイルスをはじめとするレトロエレメントがコードする逆転写酵素と相同である。RT 内のモチーフは N 末側から、1、2、A、B'、C、D、E と呼ばれる。レトロウイルスと比べるとそれぞれのモチーフの間隔が広いのが特徴である。A と B'の間は特に長く、insertion in fingers domain (IFD)と呼ばれる。最も C 末には carboxy-terminal extension (CTE)と呼ばれるドメインが位置し、その位置から他の逆転写酵素の thumb 領域に相当すると考えられている。RT を含む DNA/RNA polymerase の構造は手に喩えられ、fingers、palm、thumb と呼ばれる。fingers はモチーフ 1、2 を含み、palm は A から E までを含んでいる。

最初に構造が決定されたドメインは TEN であった (Jacobs et al. 2006)。彼らは繊毛虫の一種 *Tetrahymena thermophila* の TERT の N 末領域の蛋白質を発現、精製し、2.22 Å の結晶構造を決定した。TEN ドメインは $\alpha\beta$ 構造をとり、既知のどのドメインとも類似性の低い新規のドメイン構造をとっていた。結晶では三量体になったが、サイズ分画の結果から、溶液中では単量体で存在することが示唆された。TEN ドメインで保存されている 3カ所のアミノ酸、G144、Q168、G171 の内、グリシン 2つは構造上大きく屈曲する位置にあり、グリシンだけが可能な極端な屈曲の維持に役立っていることがわかった。一方、Q168 は TEN ド

メイン表面に露出し、TERT の活性に重要であった。ちなみに保存された G2 つと Q1 つは「GQ モチーフ」の名称の由来となっている。他の保存アミノ酸は表面に分布していた。著者らは続いて保存アミノ酸に変異を加えて活性を解析しているが、本稿では省略する。

次に構造が決められたのは TRBD である (Rouda and Skordalakes 2007)。彼らは、*T. thermophila* の TERT の TRBD だけを発現、精製し、1.71 Å の解像度の X 線結晶構造を明らかにした。TRBD も溶液中では単量体で存在していた。TRBD は 12 本の α ヘリックスと短い 2 本の β シート、それらをつなぐループから構成され、ブーメランのような構造をとっていた。ブーメランの一方の羽根は 9 本の α ヘリックスから構成され、もう一方は 3 本からなっていた。特筆すべきことは、2 枚の羽根の間に β ヘアピンが位置し、ブーメランの羽根の間に突き出た構造をとっていたことである。TRBD の全体の構造は既知のものとは異なっており、新しい構造の RNA 結合ドメインであることがわかった。保存された 3 つのモチーフの内、保存性の高い CP と T はブーメランの 2 枚の羽根の間に位置した。T モチーフは、 β ヘアピンと α ヘリックスの一部に相当し、半分が疎水性、半分が正の電荷を持つポケット (T pocket) を作っていた。一方、CP モチーフは α ヘリックスとループに相当し、T モチーフに続く形で正の電荷を持ったポケット (CP pocket) を構成していた。一方、保存性の低い QFP モチーフは大きい側の羽根の内部に位置し、疎水性のアミノ酸が多いことから、大きい羽根の構造を保つための保存性であることが示唆された。

既存の変異体の、RNA 結合能とテロメラーゼ活性が大きく低下する変異は、T モチーフの RNA と直接相互作用するであろう領域に集まっていた。また、それほど低下しない変異は、直接は相互作用せず、おそらくは変異により構造に若干の変化を起こすことが期待された。TRBD は TER と相互作用することが生化学的解析からわかっており、おそらくは T モチーフと CP モチーフの位置する、ブーメランの 2 枚の羽根の付け根部分に TER が結合すると考えられる。おそらく、T モチーフの疎水性領域は TER の一本鎖 RNA 部分の塩基と、T モチーフの残りと CP モチーフの正電荷領域は二本鎖 RNA 部分のバックボーンと相互作用するのであろう。

TERT 全長の構造は、昆虫のコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の TERT で初めて決定された (Gills et al. 2008)。これにより RT ドメインと CTE ドメインの構造が新たに決定されたことになる。彼らは TERT を発現、精製し、2.71 Å の解像度で構造決定した。結晶では二量体であったが、溶液中では単量体で存在していることは明らかであった。TERT は構造上も 3 つのドメインに区分でき、それぞれが TRBD、RT、CTE に対応した。TRBD ドメインの構造は前述の *T. thermophila* のものに良く似ており、構造上良く保存されたドメインであること

が確認された。RT ドメインは fingers と palm の 2 つのサブドメインに分割できる構造をとっており、構造の決定されている蛋白質の中ではエイズウイルス HIV の逆転写酵素と最も良く似ていた。他にもウイルスの RNA ポリメラーゼや B ファミリーの DNA ポリメラーゼと類似性が認められた。TERT には、HIV の RT には無い IFD モチーフが、モチーフ A と B' の間にある。IFD モチーフは 2 本の α ヘリックスとして TERT の外側に位置していた。CTE ドメインは長いヘリックスとそれをつなぐ長いループから構成されており、既知の構造とは異なる、新しいフォールドをとっていた。しかしながら、TERT を他のポリメラーゼと比較すると、CTE ドメインの位置は他のポリメラーゼの thumb ドメインの位置に相当し、類似の機能を果たしていることが推察できる。

TERT は全体としてみるとドーナツ状・環状の構造をとっており、N 末側の TRBD と C 末側の CTE とは疎水性相互作用でくっついていた。ドーナツ中央の穴は 26 Å の幅 21 Å の深さがあり、7-8bp の二本鎖 RNA が入ることが出来、生化学的な解析の結果と矛盾しない。

TERT は細胞中で、TER 及びテロメア反復配列と結合するはずである。残念ながらコクヌストモドキで TER は同定されていない。テロメア反復配列の DNA とは共結晶化したことが書かれているが TERT と結合した状態での結晶化はできなかったようである。そこで著者らは HIV の逆転写酵素を参考にして TERT と TER(RNA)、テロメア反復配列(DNA)の結合モデルを作成している。以後、TERT 特有の構造、アミノ酸についてのみ記述する。IFD モチーフはモチーフ 2 と A の間に位置するヘリックス $\alpha 10$ と相互作用し、 $\alpha 10$ の K210 が DNA のバックボーンと相互作用するように配置している。同じくバックボーンと相互作用するアミノ酸は CTE ドメインの K406、K416、K418、N423 で、特に K406 は DNA プライマーのバックボーンと結合し、安定化させる役割があると考えられる。これら 4 残基に対応する位置の残基は他の生物の TERT でも極性のあるアミノ酸になっている。CTE ドメイン中のヘリックス $\alpha 19$ は核酸のマイナーグループに入り込む。

TERT の結晶はヌクレオチドもマグネシウムも含んでいなかったが、構造を HIV と比較したり、生化学的な研究結果を利用することで、ある程度それらの位置を予測することが出来る。TERT の活性部位の構造は HIV の逆転写酵素と良く似ていた。モチーフ A と C にある 3 つの不変アルパラギン酸 D251(モチーフ A)、D343(モチーフ C)、D344(モチーフ C)が活性を担う。また、モチーフ 1、2、A、B'、C、D の保存アミノ酸が fingers と palm の両サブドメインの間にあるヌクレオチド結合ポケットを構成している。活性残基の上に位置する疎水性ポケットは、Y256(モチーフ A)と V342(モチーフ C)が形成している。Q308(モチーフ

フ B'), K372(モチーフ D)、K189(モチーフ 1)、R192(モチーフ 2)がヌクレオチド 3 リン酸の結合に関わる。

TRBD ドメインの β ヘアピンはドーナツの内部に突出するように位置している。 β ヘアピンは CTE ドメインのループ領域と RT ドメインのモチーフ 1、2 と相互作用する。この相互作用は TRBD の T と CP モチーフからなるポケットを活性部位から遠ざける作用をしている。著者らはこの β ヘアピンが鋳型となる RNA を活性部位に対して最適な位置に配置する役割を果たしているのではないかと推測している。そしてその RNA が DNA と塩基対形成することでテロメア反復配列が付加されるのではないかと。

TERT の全ドメインの構造が決定されたことで、ガン細胞の増殖を抑制するような阻害剤の開発が進行することだろう。また、HIV とは系統的に遠く離れたタイプの逆転写酵素の構造が明らかになったことで、他のレトロエレメントの逆転写酵素の性質についても理解が深まるだろう。しかし、DNA や RNA との共結晶構造が決定されなかったため、TERT 独特の活性である、鋳型 RNA をスリップさせながら同じ配列を繰り返し合成する、という機能を担う構造は残念ながら明らかにはならなかった。また、昆虫の TERT には TEN がないため、環状の TERT に TEN がどのように配置され、DNA、RNA と結合し活性を制御するのかも不明である。このような課題もこれ以降は構造を基にして研究されていくことになるだろう。

Jacobs SA, Podell ER, Cech TR.

Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase.

Nat Struct Mol Biol. 2006 Mar;13(3):218-25. Epub 2006 Feb 5.

Erratum in: Nat Struct Mol Biol. 2007 Oct;14(10):984.

Rouda S, Skordalakes E.

Structure of the RNA-binding domain of telomerase: implications for RNA recognition and binding.

Structure. 2007 Nov;15(11):1403-12.

Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E.

Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT.

Nature. 2008 Oct 2;455(7213):633-7. Epub 2008 Aug 31.

2008/12/22

小島 健司 著

禁 無断複写転載