

# インターフェロン誘導型リボ核酸分解酵素の全長構造解明 Structural Analysis of the Full-Length Interferon-Induced Antiviral Ribonuclease

梅田知伸<sup>1</sup>, 日下部吉男<sup>1</sup>, 清水伸隆<sup>2</sup>, 田中信忠<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>昭和大学薬学部, 〒142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8

<sup>2</sup>高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

Tomonobu Umeda<sup>1</sup>, Yoshio Kusakabe<sup>1</sup>, Nobutaka Shimizu<sup>2</sup> and Nobutada Tanaka<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8555, Japan

<sup>2</sup>High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki, 028-3694, Japan

## 1 はじめに

本研究で注目しているインターフェロン (IFN) により誘導される抗ウイルス機構は、(1) IFN で誘導される 4 量体 2-5A 合成酵素 (46 kDa x 4) が、2 本鎖 RNA によって活性化され、(2) 活性型 2-5A 合成酵素が、ATP から 2',5'結合オリゴアデニル酸 (2-5A) を合成し、(3) 2-5A が、不活性型リボヌクレアーゼ L (RNase L、単量体、84 kDa) を活性化し、(4) 活性型 RNase L / 2-5A 複合体 (2 量体) が、ウイルス mRNA を分解し、蛋白質合成阻害により、ウイルス増殖を抑制する。このような抗ウイルス機構は「2-5A システム」と呼ばれ、複数の蛋白質・核酸が関与する、カスケード型抗ウイルスシステムである。2-5A システムの主役である RNase L は、ヒト酵素の場合全長 741 アミノ酸残基で、N 末端アンキリンリピートドメイン、中央部キナーゼ類似ドメイン、C 末端 RNase ドメインを構成している (図 1)。2-5A が RNase L の ANK ドメインに結合することにより、2 量体化・活性化が生じると推定されている。

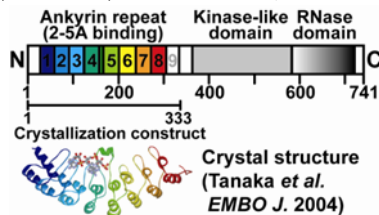


図 1: RNase L のドメイン構造

本研究では、2-5A システムの主役であるリボヌクレアーゼ L (RNase L) に焦点を絞り、

(到達目標 1) : 不活性型単量体ヒト RNase L 全長の溶液構造を決定することにより、2-5A 非存在下における RNase L の自己活性制御の分子機構 (ANK ドメインにより RNase ドメインが覆われて不活性型になっているという仮説) を解明し、

(到達目標 2) : 活性型 2 量体ヒト RNase L 全長の溶液構造を決定することにより、2-5A 結合による RNase L の 2 量体化機構や活性化機構を明らかにし、これらの知見を抗ウイルス薬の合理的デザイン等に役だてることを目的としている。

## 2 実験

我々のグループでは、これまでヒト由来全長 RNase L の大量発現に取り組んできたが、構造研究に十分な量の精製試料を得ることに成功していない。マウスやラット由来酵素に関しても、ヒト酵素の場合と同様に上手く行かなかった。そこで他種由来 RNase L の大量発現に取り組み、ニワトリ由来 RNase L (全長 703 アミノ酸残基) のクローニングに成功し (松山大学薬学部・中西雅之准教授、岐阜大学工学部・北出幸夫教授ら、未発表)、大腸菌を用いた大量発現系構築に成功した。

(1) 発現ホストとして大腸菌 BL21(DE3)株、発現ベクターとして pCold-GST を用い、ニワトリ由来全長 RNase L の大量発現を行った。

(2) 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより、ニワトリ由来全長 RNase L を精製し、限外濾過式遠心濃縮器を用い、3 mg/mL 程度まで濃縮した。

PF BL-10C (波長: 1.488 Å、検出器: R-AXIS VII) において、溶液散乱実験を行った。

## 3 結果および考察

各種条件検討の結果から、DTT の添加が放射線損傷由来する凝集体形成の抑制に有効であることが分かった。しかし、非常に凝集しやすいサンプルであり、凝集体形成を十分に抑制することは困難であった。2-5A 添加をトリガーとする RNase L の 2 量体形成による慣性半径増加が観測されることを期待して 2-5A 非存在化、存在化でデータを測定したが、いずれの場合も慣性半径が 44 Å 程度と見積もられ、期待した変化は観測されなかった。

## 4 まとめ

ニワトリ由来全長 RNase L の溶液構造解析に取り組んだが、未だ良好なデータを得るに至っていない。2014 年第一 4 半期にブタおよびヒト RNase L 全長の結晶構造解析が相次いで報告されてしまった[1, 2]。

## 参考文献

- [1] H. Huang *et al.*, *Mol. Cell* **53**, 221 (2014).  
[2] Y. Han *et al.*, *Science* **343**, 1244 (2014).

\* ntanaka@pharm.showa-u.ac.jp