

Title	大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造と機能
Author(s)	片柳, 克夫
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3088031
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造と機能

1991

片 柳 克 夫

大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造と機能

1991

片柳克夫

目 次

序 論	1
-----	---

本 論

第1章 大腸菌 RNase H の立体構造

第1節 全体の分子構造	3
第2節 分子内水素結合	14
第3節 トリプトファンの分布	22
第4節 システインの分布	22
第5節 ヒスチジンの分布	23
第6節 2次構造	
① ジョイント予測法、円2色偏光法の結果との比較	24
② ヘリックス	26
③ シート	29
④ リバース・ターン	29
第7節 水分子の分布	31
第8節 結晶のパッキング	35
第9節 活性金属の結合部位	38
第10節 大腸菌 RNase H と 逆転写酵素 RNase H ドメインの活性中心	41

第2章 大腸菌 RNase H の活性部位変異体の立体構造解析

第1節 活性部位変異体 D10N、E48Q、D70N	46
----------------------------	----

第2節	活性部位変異体の立体構造	47
第3節	2つの非同型な結晶中での構造の比較	
	- His 124 近傍のループの柔軟性 -	53
第3章 活性中心と核酸結合部位の同定		
第1節	DNase I との比較	57
第2節	HIV RNase H との比較 (金属結合部位)	61
第3節	静電ポテンシャルの分布	62
第4節	核酸認識部位	65
結 論		71
謝 辞		72
実験の部		
第1章の実験		
第1節	RNase H の結晶	73
第2節	X線回折強度データの測定	74
第3節	重原子同型置換法による位相決定	76
第4節	分子モデルの構築と精密化	82
第5節	Mg ²⁺ 結合部位の同定	90
第2章の実験		92
参考文献		99

序 論

リボヌクレアーゼの立体構造は 今日まで RNase A および RNase T₁ などをはじめとして、いくつかの酵素について研究されている。これらのリボヌクレアーゼが単鎖RNAを基質とするのに対して、この研究の対象であるリボヌクレアーゼHは、DNA/RNA ハイブリッド2重鎖を特異的に認識し、そのRNA鎖のみを切断し、5'リン酸基と3'水酸基を生産する。

この独特な活性は、Stein と Hansen (1969)により、仔ウシの胸腺から発見され、リボヌクレアーゼH (RNase H) と命名された。このHは、DNA/RNA Hybrid に由来している。大腸菌由来の RNase H は、Miller ら (1973) によって単離され、Berkower ら (1973) によってその性状が明らかにされた。この酵素は DNA/RNA ハイブリッド2重鎖のうち、RNA鎖のみをエンドヌクレアーゼ活性により特異的に加水分解し、その結果5'リン酸基が生ずる (Crouchら、1982)。通常のアッセイ系では、この酵素は基質に対し、ピリミジンの隣の開裂部に僅かな特異性を持っている (Crouch ら、1982)。この酵素の活性にはMg²⁺が必須で、活性測定にはこのイオンが加えられる。しかし、場合によってはMg²⁺はMn²⁺に置き換えることが可能である (Berkower ら、1973)。この酵素の遺伝子は、大腸菌クロモソームの中に単一コピーとして存在することが示され (Carlら、1980)、また *dna Q* 遺伝子からは64塩基対 離れて存在することが報告されている (Maki ら、1983)。また、最近、大腸菌から“第2の RNase H (RNase H II)” が単離されたため (Itaya, 1990)、これに対して 今までの *rnh A* 遺伝子からつくられている RNase H は、RNase HI と呼んで区別されることがある。DNAの塩基配列から、この酵素は155個のアミノ酸残基の 単一ポリペプチド鎖からなることが示された (Kanaya ら、1983)。RNase H 活性は原核生物から真核生物にいたるまで広く生物界に存在する。その生理学的

機能については不明な点もあるが、RNase H が、十分に分化された細胞内では酵素活性を促進していることや、*in vitro* での Col E1 プラスミドの複製に関与していること、などの発見(Itoh ら、1980) は、この酵素がDNAの複製に関わっている事を示唆するものである。さらにこの酵素は、DNA複製の開始段階で、複製の分岐点に差し掛かるとき、その選択を調節する上で重要な役割をする事が最近示されている (Dasgupta ら、1987)。

また、Johnson ら (1986) は、ヒト免疫不全ウイルスを含むレトロウイルス由来の逆転写酵素のアミノ酸配列を、コンピュータを用いて解析することによりRNA依存性ポリメラーゼ領域の下流部分に RNase H と相同性の高いセグメントが存在していることを示した。ウイルス由来の RNase H は、ウイルス遺伝子のRNAの切断に重要な役割を担うものと考えられている。事実、DNA/RNA ハイブリッド2重鎖からRNA鎖のみを RNase H によって除去することにより、マイナス鎖RNAは、プラス鎖RNAを合成する際の鋳型と成り得ることが発見された (Varmus ら、1988)。

この論文では、X線結晶構造解析によって 1.48 Å分解能で決定された、大腸菌 RNase H の立体構造 (Katayanagi ら、1990 & 1992) について述べる。さらに、酵素活性に必須な Mg^{2+} 結合部位を同定し、この酵素がDNA/RNA ハイブリッド2重鎖と特異的に結合する認識部位も決定した。NMRによる最近の研究によって、我々が想定した RNase H と DNA/RNA ハイブリッド2重鎖の結合様式が正しいことが裏付けられ、DNA/RNA ハイブリッド2重鎖と酵素の複合体のモデルを構築することができた。また、この酵素の活性アミノ酸残基を置換した3つの変異体についても、X線結晶構造解析を行い、分子構造と機能の関係について考察した。

なお我々とは独立に、Yang ら (1990) も、異なった位相決定法にもとづいて決定した 2.0 Å分解能における RNase H の立体構造を報告したが、両者の立体構造は、本質的には同一であった。

本 論

第1章 大腸菌 RNase H の立体構造

第1節 全体的な分子構造

RNase H 分子全体の模式図を図1-1に、またこの酵素の1次配列を図1-2に示す。RNase H 分子は、155 個のアミノ酸残基からなり、1つのサブユニットで構成される。この分子のサイズは $50 \times 45 \times 40$ Å で、不規則な楕円体である。この分子のドメイン構造を調べるため、 C_{α} 原子間のディスタンスマップ (Nishikawaら、1972) を計算した (図2)。その結果、残基番号で 80 番から100 番目の部分には隣接した構造がなく、独立のドメインを構成していることがわかった。この部分はヘリックス α III からそれに続く約10 残基の長さのループで、当初 minor domain と呼んだが (Katayanagi ら、1990)、逆転写酵素のドメイン構造の議論の際に紛らわしいため、basic protrusion (塩基性の突出部) と呼ぶことにした (Katayanagi ら、1992)。なお、Yang ら (1990) は、この領域を handle region (把手領域) としている。この領域は最近、Davies らにより解析された HIV-1 RNase H ドメインには欠損している部位でこの酵素にユニークな構造であるため α III を除いた部分について図3に示した。

主ドメインは、4つの α ヘリックス (α I、 α II、 α IV、 α V)、および 1枚の大きな β シートから成る。この β シートは、N末端側の3本の逆平行 β 鎖 (β A、 β B、 β C) と2本の平行 β 鎖 (β D、 β E) より構成されている。この β シートは、他の蛋白質の β シート構造と同じようにねじれている。RNase H 分子のコアとなるこの β シートは、2本の α ヘリックス α I と α V に両側から挟まれ、 α V 側の半分は表面に露出している。 α V の C末端側半分は β シートと疎水結合しているが、

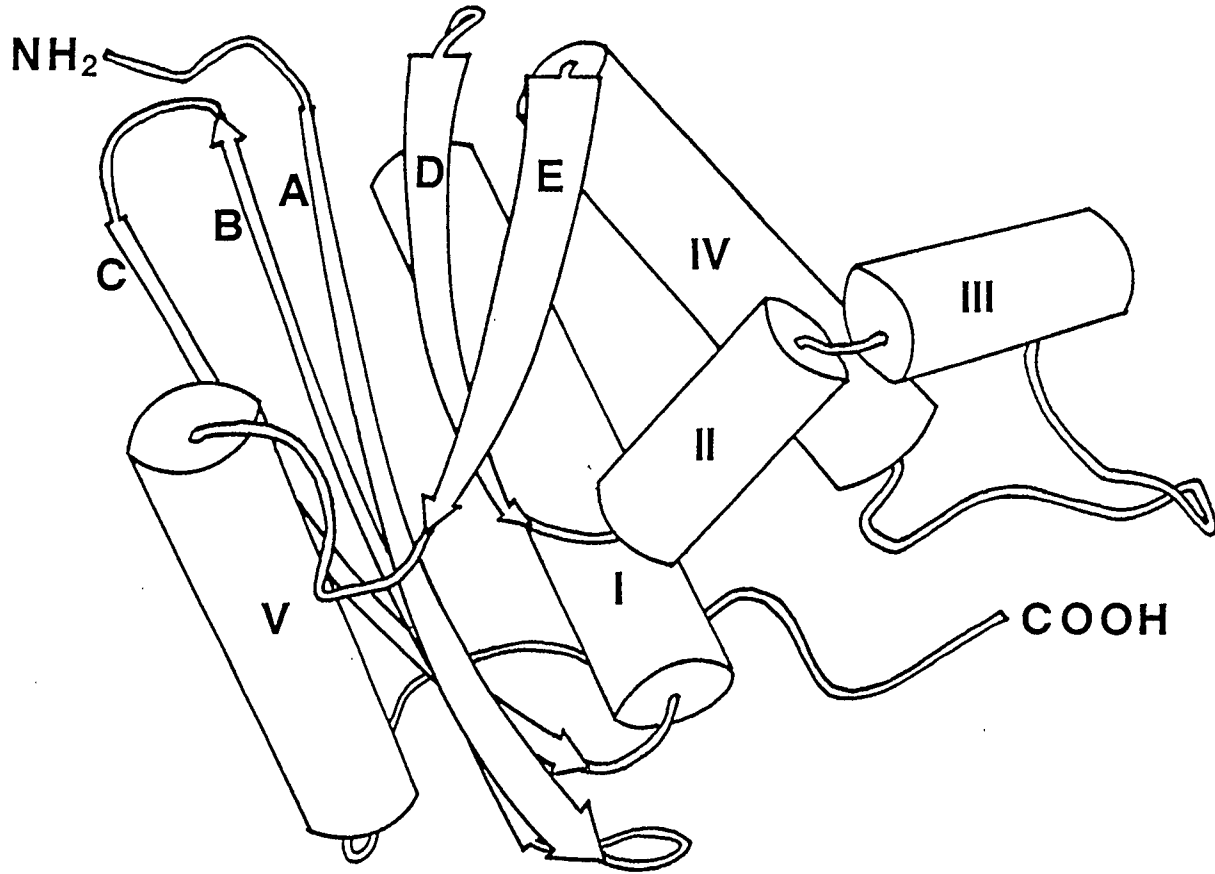


図1-1 大腸菌 RNase H の分子全体の模式図。ヘリックス α IIIからそれに続くループが突きだした形になっている（塩基性の突出部）。

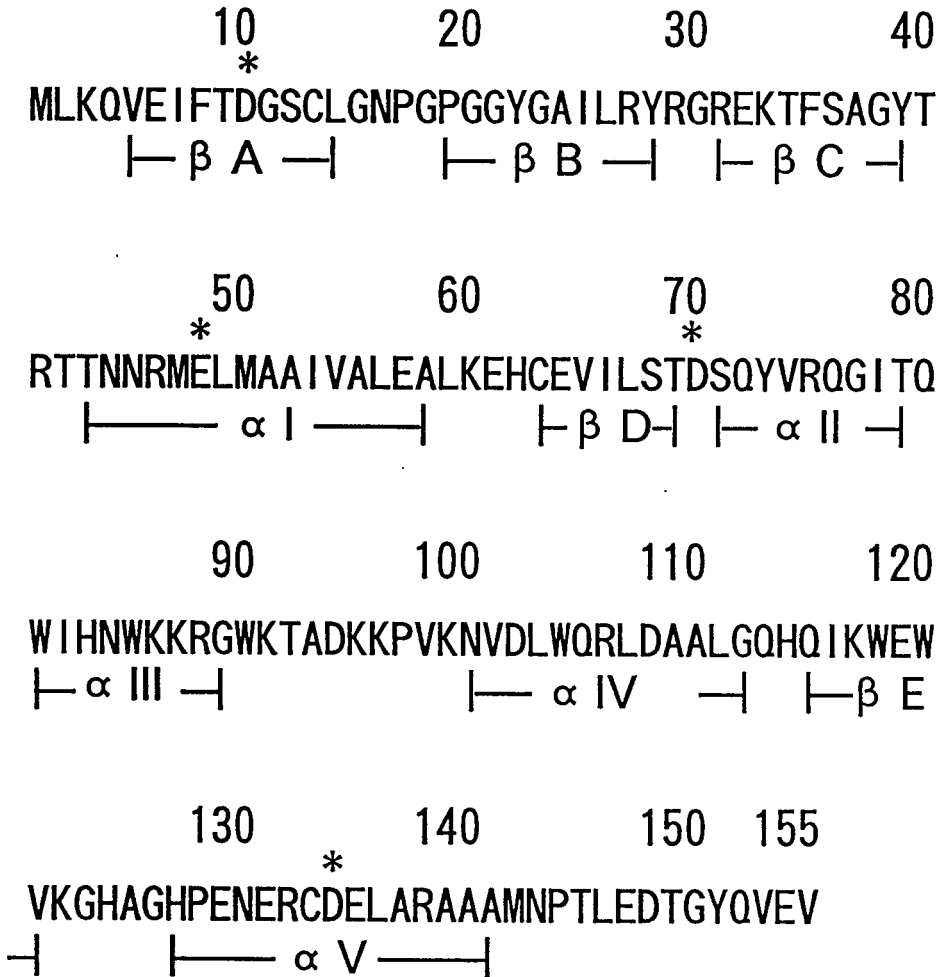


図1-2 大腸菌 RNase H のアミノ酸配列 (Kanaya & Crouch, 1983) にX線構造解析で決定した2次構造を重ねたもの。*印は逆転写酵素のアミノ酸配列で完全に保存されているもの(表5)を示す。残基番号で80から100番の間には塩基性のアミノ酸残基が多く分布している。また残基番号で11から23番まではグリシンが多く分布し、柔軟な構造であることが予想される(第3章第4節)。

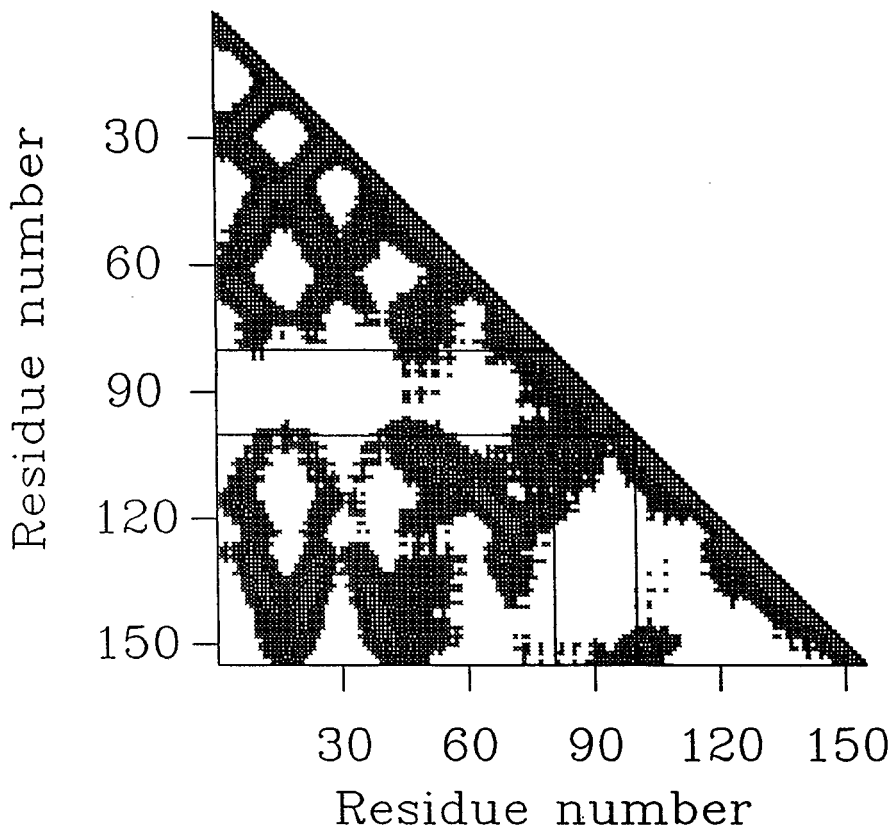


図2 大腸菌 RNase H の C_{α} 原子の座標をもとに計算したディスタンスマップ。縦と横の残基間の関係のうち、 10 \AA 以下の距離のものは口印で、 10 \AA 以上 20 \AA 以下の距離にあるものは \times 印で示した。残基番号が 80 から 100 番の間には 20 \AA 以下の位置関係がほとんど無く、独立した領域であることが明瞭に示される。

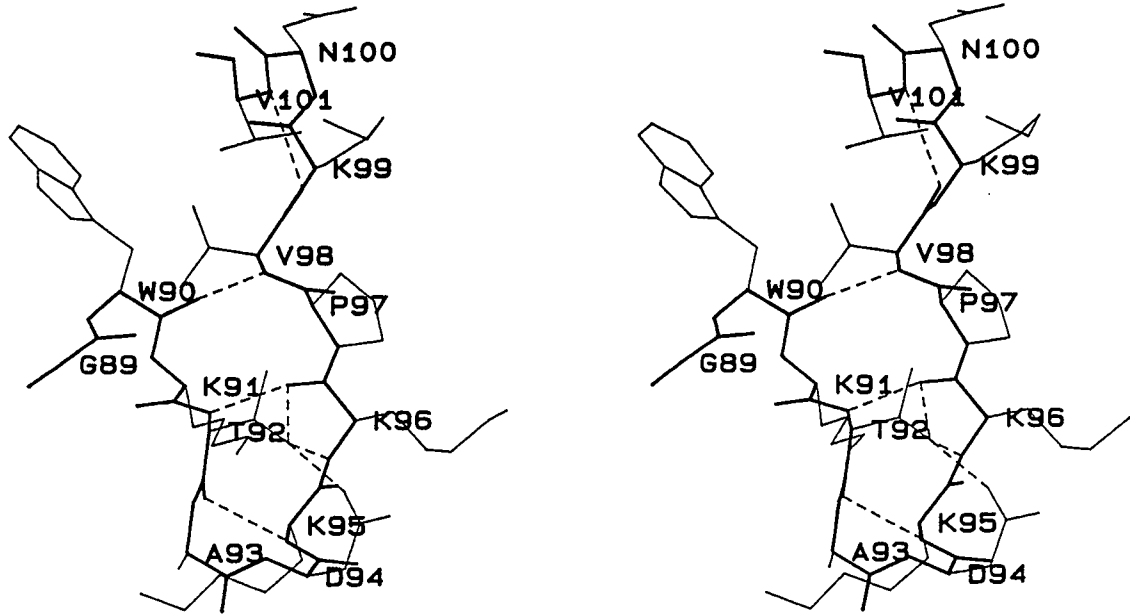


図3 塩基性の突出部のループの立体構造 (α IIIの部分は図10参照)。この部分は、H I V - 1 RNase H ドメインにはない構造である。この鋭いターンははしご状の水素結合で安定化している。このうち、Gly 89、Trp 90、Lys 95、Asn 100 の主鎖の二面角は左巻きヘリックスに近い角度をとっている。

N末端側の数残基は β シート上の残基と水素結合を形成し、あるいは静電的相互作用をしている。 α Iとこの β シートは、顕著な疎水結合を形成している。この β シートの疎水結合面は図4に示すように、 α IIや α IIIと向かい合うことにより、 α Iや α IVのN末端側とともに、大きな疎水結合コアの中心を構成している。その中で、ヘリックス α Iは、これを囲む β シート (α I側)、 α I、 α II、 α III、 α IVで形成される大きな疎水結合の中心を構成している。 α Iと α IVは約 25° の傾きを保ちながら平行に並んでいるが(図5)、この2本のヘリックス間の疎水結合を見ると、5つのロイシン、2つのアラニン、そして1つのトリプトファンが3つ組になっている。すなわちLeu 56(α I)、Ala 110(α IV)とLeu 111(α IV)の組、Ala 52(α I)、Ile53(α I)とLeu 107(α IV)の組、Leu 49(α I)、Leu 103(α IV)とTrp 104(α IV)の組が、顕著な疎水結合を形成している。この構造は、遺伝子の発現に関与するたくさんの転写調節蛋白質中に見いだされる、平行型のロイシンジッパー・モチーフによく似ていて興味深い。ちなみに Leu 49 と Leu 56 は7残基分、また Leu 103 と Leu 111 は8残基分離れている。

RNase H の2次構造の統計値を表1に示す。この分子の主鎖のフォールディングは、厳密には他のどの蛋白質のものとも類似していないが、大局的には Levitt と Chochia (1976) らの分類に従って、 $\alpha + \beta$ 型構造に属すると考えられる。 α IIから α IIIにかけての部分および α IIIから α IVにかけての部分について、*cro* リプレッサーなどで得られている、DNA結合モチーフのヘリックス・ターン・ヘリックス部分と構造比較したところ、r.m.s.d.が4 Å以上と大きく、類似のモチーフとはいえない。したがって、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造はこの分子には存在しないことが、結論される。

副ドメインは、 α ヘリックス (α III) と2つのターンを含む約10残基のループから成っている。RNase H のディスタンスマップからは、 α IIIとそれに続くループは、他の部分からはかけ離れた、小さなドメインを形成していることがわかる。 α IIIは

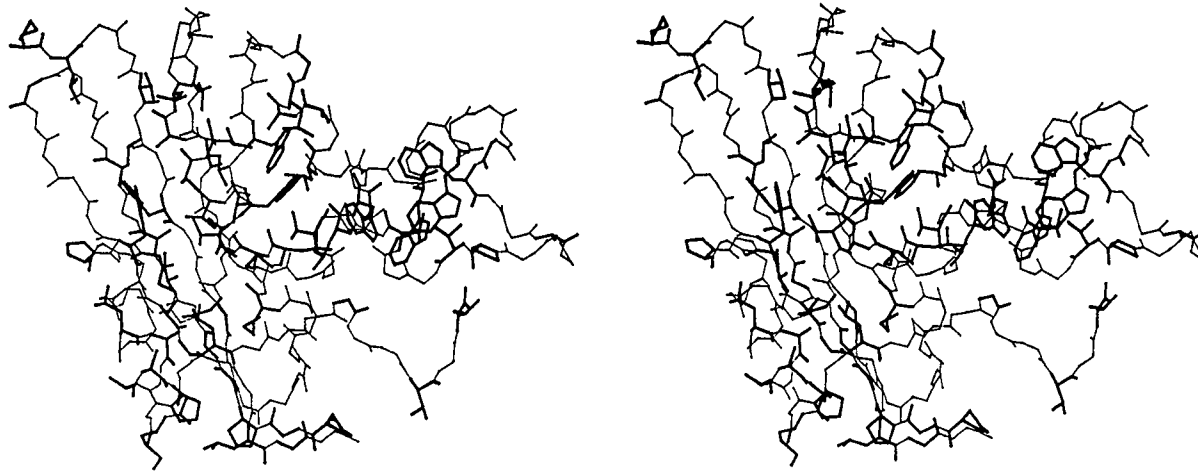


図4 RNase H の疎水結合コア。ペプチド主鎖を細線で示し、疎水性のアミノ酸残基 (Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Met)のみを、太線で表示した。ヘリックス α I を中心とする大きな疎水結合コアと α V のN末端と β シートの下側でつくる小さな疎水結合コアがある。ヘリックス α II と α IIIはこの大きな疎水結合コアを包み込むように折れ曲がっている。C末端の Val 153 と Pro 17 ならびに Val 155 と Pro 97は疎水的相互作用をしていると考えられ、これは隣接分子の β Cと相互作用して安定化しているN末端とは対照的である(表4)。

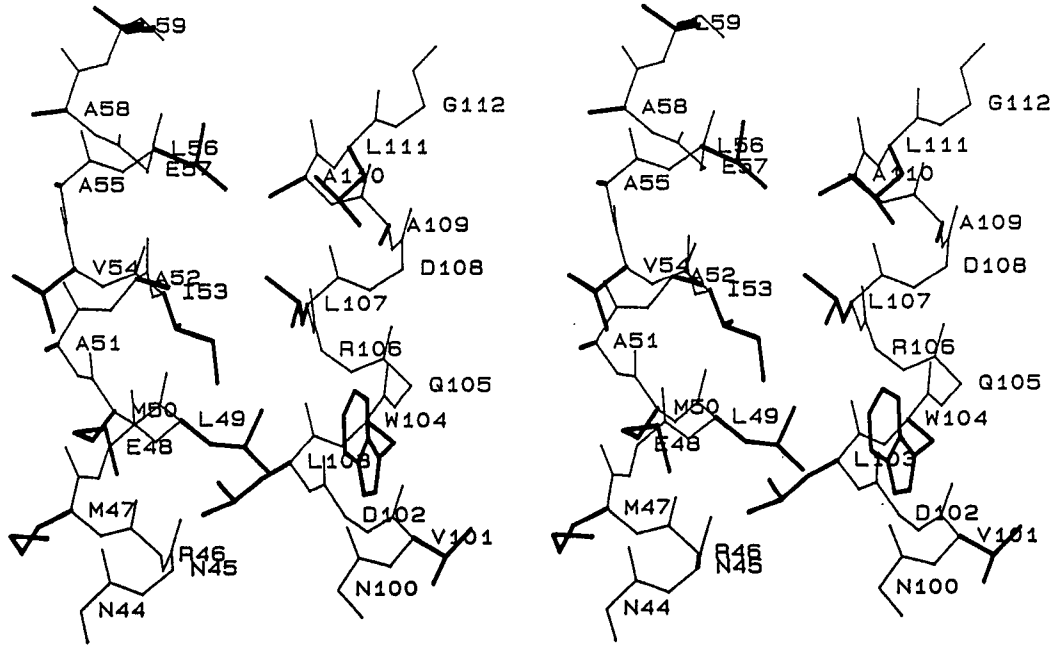


図5 ヘリックス α Iと α IVの疎水的相互作用。このロイシン・ジッパー様の2本のヘリックスは約 25° の傾きを持ちながら平行に走っている。予想される核酸認識部位(第3章第4節)はこれらのN末端側近傍である。

	Residues	$\langle \phi \rangle$	$\langle \psi \rangle$	$\langle \omega \rangle$
α I	43 - 58	-65(5)	-40(10)	180(1)
α II	71 - 79	-64(6)	-44(8)	-179(1)
α III	81 - 89	-73(14)	-28(17)	-179(2)
α IV	100 - 112	-63(8)	-41(5)	179(2)
α V	127 - 141	-62(5)	-42(6)	180(2)
helix overall		-65(8)	-40(10)	180(2)
mean helix from data base*		-62(7)	-41(7)	179(3)
β A	5 - 14	-138(13)	143(9)	179(2)
β B	19 - 28	-132(16)	141(26)	176(4)
β C	31 - 39	-129(21)	140(18)	179(1)
β D	63 - 69	-121(18)	125(13)	180(4)
β E	115 - 121	-107(13)	119(12)	-179(3)
β B & β C		-131(17)	140(22)	178(3)
ideal anti parallel β †		-139	135	178
β D & β E		-115(17)	122(13)	180(3)
ideal parallel β †		-119	113	180
3_{10} I	55 - 59	-69(8)	-27(15)	180(1)
3_{10} II	110 - 114	-74(14)	-17(13)	182(3)
3_{10} III	138 - 143	-67(10)	-29(13)	181(1)
mean 3_{10} from data base*		-71	-18	

Values in parentheses indicate standard deviations.

* D.J.Barlow & J.M.Thornton J. Mol. Biol. 201, 601.(1988).

† G.N.Ramachandran, C.Ramakrishnan, V.Sasisekharan, J. Mol. Biol. 7, 95.(1963).

表1 RNase H の持つ 2 次構造の 2 面角に対する統計的評価。それぞれの数字はその 2 次構造内の平均値で、() 内の数字はそれぞれの標準偏差を示す。

小さなヘリックス α IIを經由して β Dと接続している。5本鎖からなる β シートと2本のヘリックスの組(α IIと α III)は、 α Iと α IVを底とする大きな裂け目を形成しているが、この裂け目が触媒活性に何らかの形で関与しているか否かは、現在のところわからない。ただし、後に述べるように、この裂け目は酵素の DNA/RNAハイブリッド認識部位とは反対側に存在している。

主ドメインでは、 β シートは2つのヘリックス α Iと α Vに挟まれていて、N末端とその近傍のループ部分を除いては β シートは疎水的環境にある。なお、この β シートは他の蛋白質で見られるのと同様に、左方向にねじれている。

構造精密化の際、主鎖原子の二面角の(ϕ 、 ψ)には束縛条件はかけていない。このようにして得られた二面角の値を用いて Ramachandran plot (Ramachandran、1963)を計算したものを図6に示す。ほとんどの ϕ 角、 ψ 角は許容範囲に収まっている様子がわかる。なお、他のアミノ酸残基より許容範囲の広い13個のグリシンは*印で示してある。この図の中で、左巻きヘリックスに対応する二面角をとっているものは、Trp 90、Lys 95 と Asn 100 であり、それらの値は、それぞれ、(67° 、 40°)、(64° 、 27°)そして(61° 、 31°)である。また、その下部に許容外領域としてプロットされる Arg 29(70° 、 120°)は、続く Gly 30(-115° 、 5°)と組み合わせると、Venkatachalam (1968)の論文で指摘された、典型的なII'型の β ターンで説明される(後出の表3参照)。このように、構造精密化後のモデルでは155個すべてのアミノ酸残基が合理的なコンフォメーションをとっていることが示された。RNase Hには、5つのプロリン残基があるが、そのうち Pro 17だけが、シス型をとっていることがわかった。また、他の残基においては、 ω 角はすべて 180° 近辺におさまっている(r.m.s.d.は 2.8°)。Kabsch & Sander (1983)の定義による β シート部分の ϕ 角、 ψ 角の平均値は、平行型、逆平行型が、それぞれ -115° と 122° 、および -131° と 140° であった。また α ヘリックス部分では、それぞれ -63° と -41° であった。

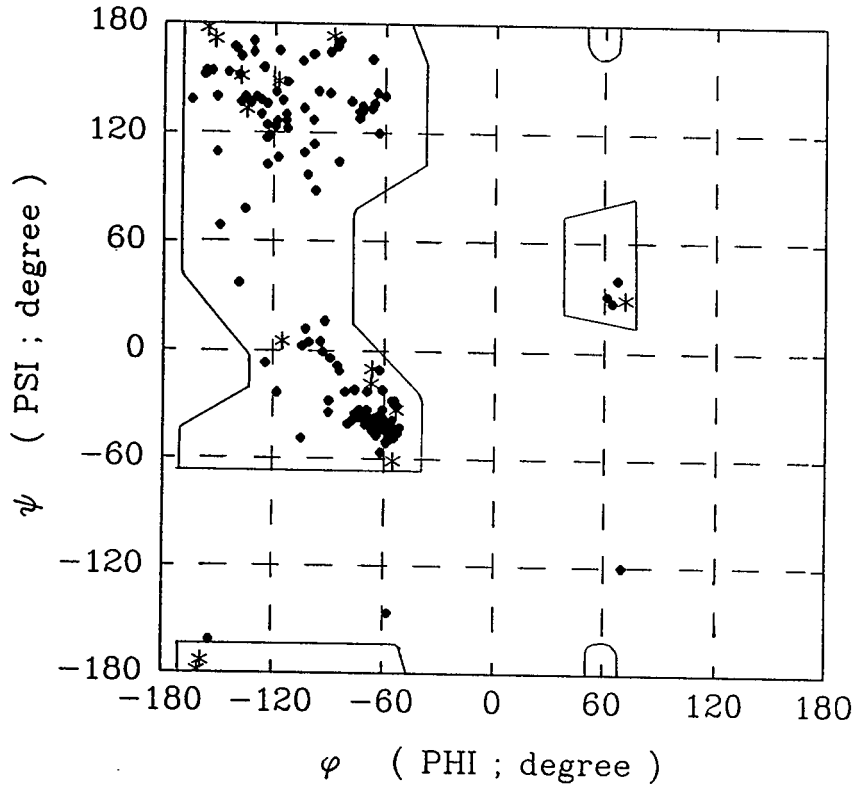


図6 RNase H の精密化後の最終構造の Ramachandran plot。左巻きヘリックスの部分にある4残基は、Gly 89、Trp 90、Lys 95、Asn 100 でいずれも図3で示される塩基性突出部のループ部分に属するものである。また (70°、-120°) の二面角をとるのは Arg 29 で、II' 型のβターンである。*印はグリシン残基を示す。

図7にプロリン残基をのぞいた全アミノ酸残基の χ_1 角の分布を示す。これらは顕著に $\chi_1 = (-60^\circ, 60^\circ, 180^\circ)$ 付近に集中しているが、これは立体化学的に安定な構造を取りやすい二面角のanti-periplanar(180°)あるいは \pm syn-clinal($\pm 60^\circ$)である。分子全体の χ_1 の平均値はそれぞれ($-67^\circ, 64^\circ, -173^\circ$)また標準偏差は($13^\circ, 6^\circ, 16^\circ$)であった。syn-periplanar(0°)や \pm anti-clinal($\pm 120^\circ$)は完全に避けられており、精密化後のモデルには、エネルギー的に好ましくないコンフォメーションが存在していないことが示された。

第2節 分子内水素結合

表2に、RNase H 分子内の水素結合の一覧を示す。大腸菌 RNase H の場合、アルギニン側鎖のつくる水素結合が構造の安定化に寄与している点が目だっている。

まず Arg 46 側鎖の電子密度を図8-1に示す。この残基はヘリックス α I上に存在するが、唯一、分子内に埋もれているアルギニンである。このグアニジノ基は分子のほぼ中央部に存在し、 α IV上の Asn 100、Asp 102 および最後のループの Asp 148 と、3方向すべてに水素結合を形成している。したがって、 α I、 α IV およびC末端ループの3つのドメインを結び付ける働きをもつ。Arg 46 側鎖原子の温度因子も 10 \AA^2 前後と低く、多くの水素結合で支えられた安定した構造を反映している。この分子中央に位置する水素結合のネットワークは、分子全体のコンフォメーションを安定化しているものと考えられる。

また β B上に存在する Arg 27 (図8-2)は、これを囲んでいる3つのグルタミン酸残基、 β A上の Glu 6、 β B上の Glu 32 及び α V上の Glu 130 と水素結合をつくっている。これらの相互作用は3つの β 鎖を更に固くむすびつけているとともに α Vを固定している。 β B上の Glu 32 は、さらに α V上の Arg 132 と水素結合をつくっている。また、 β D上の Ser 68 は、 α V上の Asn 130 と、また β E上の Glu19 は α Vアミノ基側の His 127 と水素結合し、上の相互作用をさ

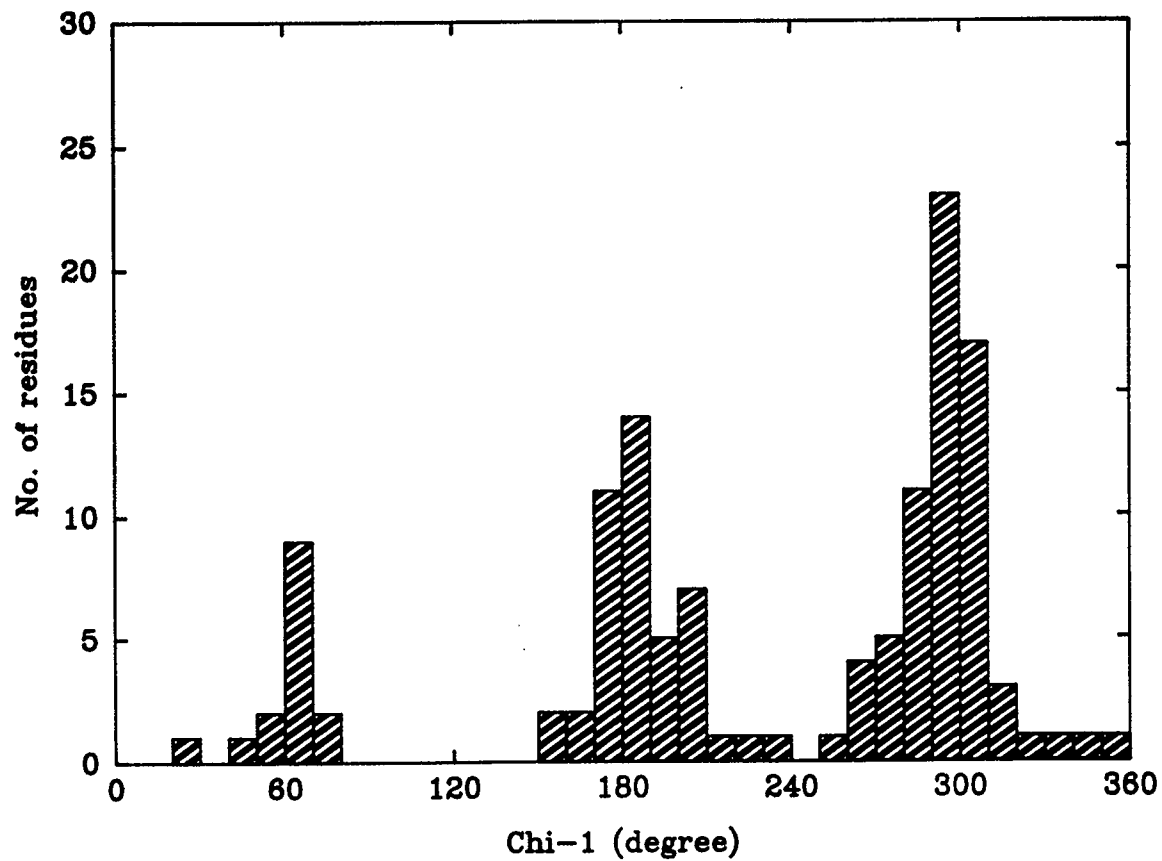


図7 Gly、Ala、Pro を除いた全残基の側鎖の χ_1 角の分布。

Residue	Atom	Residue	Atom	Distance(A)
Gln 4	Oε 2	Lys 117	Nζ	3.15
Glu 6	Oε 2	Arg 27	Nε	3.03
Glu 6	Oε 2	Arg 27	Nη 2	3.07
Thr 9	O	Thr 69	Oγ 1	3.08
Thr 9	Oγ 1	Thr 69	Oγ 1	3.15
Asp 10	Oδ 2	Gly 11	N	2.63
Asp 10	Oδ 2	Gly 11	O	3.23
Cys 13	Sγ	Gly 15	O	3.28
Cys 13	Sγ	Gly 18	O	3.28
Cys 13	Sγ	Thr 42	O	3.38
Cys 13	N	Asn 44	Oδ 1	3.28
Gly 22	O	Ser 36	Oγ	2.92
Arg 27	Nη 1	Glu 32	Oε 2	3.00
Arg 27	Nη 1	Glu 129	Oε 1	3.15
Arg 27	Nη 2	Glu 129	Oε 2	2.57
Tyr 28	Oη	Lys 60	N	3.13
Tyr 28	Oη	Glu 61	Oε 1	3.38
Tyr 28	Oη	Glu 61	Oε 2	2.53
Glu 32	Oε 1	Arg 132	Nη 2	2.71
Thr 42	Oγ 1	Asp 148	Oδ 1	2.53
Asn 44	Nδ 2	Glu 48	Oε 2	2.36 *
Arg 46	Nη 1	Asn 100	Oδ 1	3.02
Arg 46	Nη 1	Asp 102	Oδ 1	2.89
Arg 46	Nη 2	Asp 102	Oδ 2	2.88
Arg 46	Nη 2	Asp 148	Oδ 2	2.63
Arg 46	Nε	Asp 148	Oδ 1	2.52
Arg 46	Nε	Asp 148	Oδ 2	3.28
Glu 48	Oε 1	Ser 71	Oγ	2.60
Glu 57	Oε 1	Arg 106	Nη 2	2.68
Glu 57	Oε 2	Arg 106	Nε	2.87
Glu 61	O	Cys 63	Sγ	3.35
Glu 61	O	His 114	Nε 2	3.18
His 62	Nδ 1	Gln 113	O	2.59

表2 大腸菌 RNase H の 分子内水素結合の一覧（主鎖どうしの水素結合については図12を参照）。残基番号順に並べてある。水分子は含めず、水素結合距離が 3.4 Å以内のもののみ記した。なお*印を付したもの（2つ）については、水素結合距離としてはやや短すぎるが、これは側鎖原子の局所的なディスオーダーのためと考えられる。事実、Asn 44 側鎖の C_γ、O_{δ1}、N_{δ2}や、Asp 94 の O_{δ1}、O_{δ2}は、周囲に存在する原子より高い温度因子を持っている。

Ser 68	O γ	Glu 119	O ϵ 1	2.88
Ser 68	O γ	Asn 130	N δ 2	3.10
Thr 69	O γ 1	Asp 70	N	2.96
Thr 69	O γ 1	Ser 71	N	3.20
Ser 71	O γ	Val 74	N	2.90
Tyr 73	O η	Asn 100	N δ 2	2.98
Tyr 73	O η	Trp 104	N ϵ 1	3.07
Arg 75	O	Thr 79	O γ 1	2.66
Gln 76	N ϵ 2	Gln 80	O ϵ 1	2.93
Thr 79	O γ 1	Gln 80	N	3.24
Gln 80	O	Asn 84	N δ 2	3.15
Lys 86	N ζ	Asp 108	O δ 2	3.40
Thr 92	O γ 1	Asp 94	O δ 2	2.30 *
Thr 92	O γ 1	Lys 96	N	3.12
Thr 92	O γ 1	Lys 96	O	3.25
Ala 110	O	His 114	N δ 1	3.14
Glu 119	O ϵ 1	His 127	N ϵ 2	3.10
His 127	N	Asn 130	O δ 1	2.85
Asp 134	O δ 1	Arg 138	N ϵ	3.16
Asp 148	O δ 2	Gly 150	N	3.34

表2 (前ページの続き)

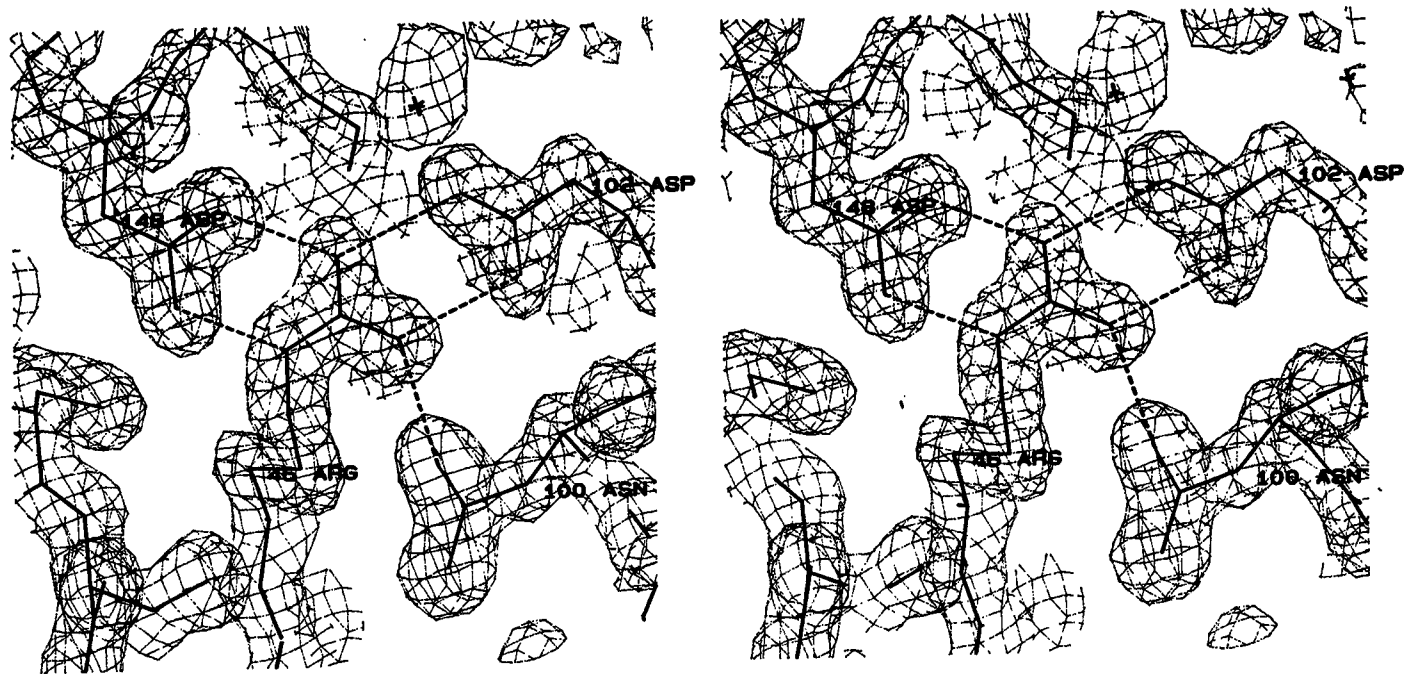


図8-1 α I に存在する Arg 46 近傍の電子密度。等高線は 1σ の高さである。破線は水素結合を意味し、分子中央部のヘリックス α I 上の Arg 46 が、 α IV 上の Asn 100 や Asp 102 および C 末端近傍のループにある Asp 148 と 3 方向へ等方的に水素結合を形成し、分子全体のコンフォメーションを安定化している様子がわかる。Arg 46 側鎖の温度因子はどの原子も 10\AA^2 前後と小さい。

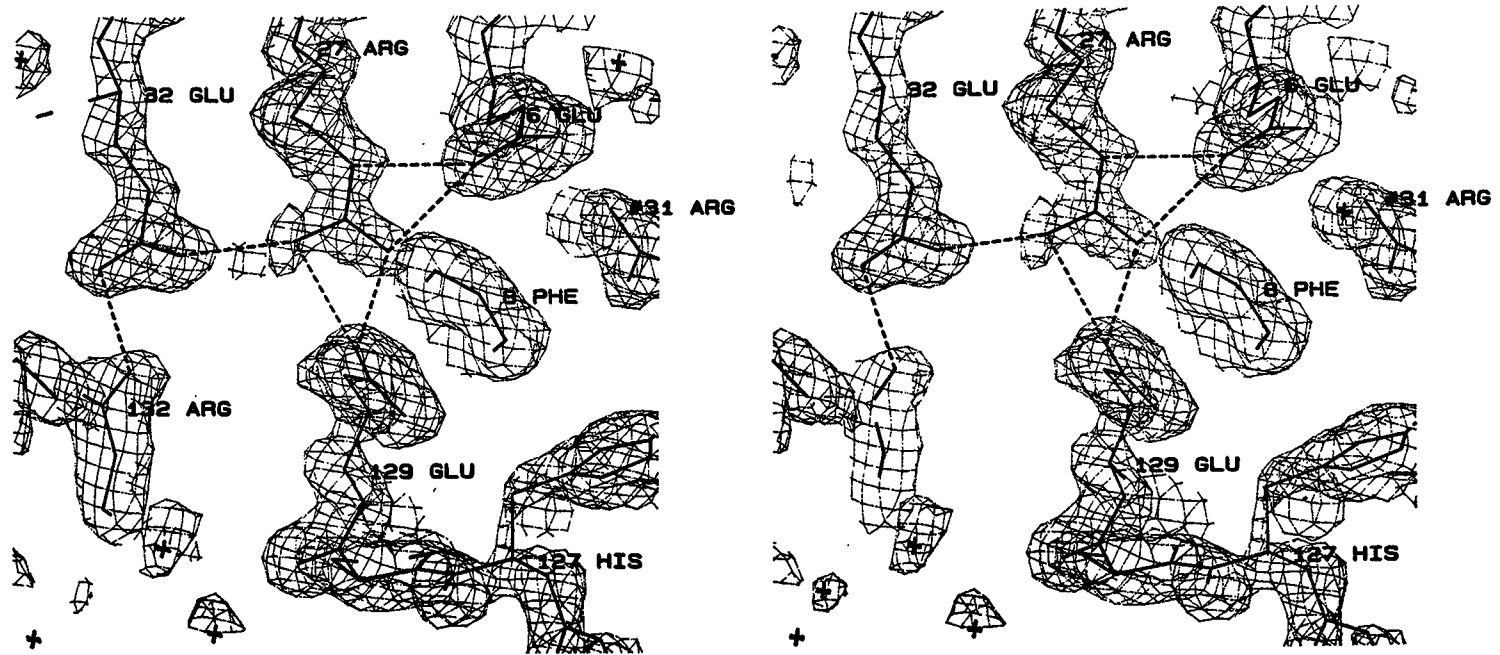


図8-2 β Bに存在する Arg 27 近傍の電子密度。この残基は3つのグルタミン酸、すなわち、 β A上の Glu 6、 β C上の Glu 32、 α V上の Glu 129 に囲まれて相互作用を受けている。図8-1の Arg 46 に比べて、等方的な水素結合ではないため電子密度もそれよりきれいではない。この近傍では、 β シートと α VのN末端側の水素結合として、この図以外に Ser 68-Glu 119、Ser 68-Asn130 がある。

らに強めるように働いている。

Arg 138 の側鎖グアニノ基は、Asp 134 の側鎖を外側に引き出すように水素結合している。Asp 134 は、26種類のレトロウイルス由来の逆転写酵素とその関連蛋白質すべてに共通して保存されている、4つの酸性アミノ酸残基（第1章第9節）のうち、唯一 RNase H 活性に必須とされないものであり、またMg²⁺結合位置から 5.0 Åと最も遠く離れている。しかしながら、大腸菌 RNase H で Arg 138 に相当する残基は、レトロウイルス由来の逆転写酵素には保存されておらず、この1本の水素結合は、大腸菌RNase H にたまたま生じた偶然とも取れる。

第6節②項でも指摘するが、 α IIIは、主鎖原子の温度因子の高いヘリックスであり、これを固定しているのが、Lys 86 と Asp 108 の水素結合1本である。これに比べ、 α IIは Ser 71 が Gln 48 と、また Tyr 73 が Trp 104 と（図8-3）、というように2カ所で水素結合をしており α IIIに比べると安定なものと考えられる。Mg²⁺結合部位の近くにあるこのチロシンは、DNase I では核酸とスタックしている部分に相当していると思われる部分であるが、RNase H の基質なしのものでは構造安定化として働いている。安定化に寄与しているチロシンは、この他に Tyr 28 が Glu 61 と2本の水素結合をして、2つのループ部分を近づけている。

なお、 α IIの溶媒側に3つのグルタミン残基（Gln 72, Gln 76, Gln 80）が1直線に並んでいるのは興味深い。このうち、Gln 76 と Gln 80 は側鎖間で水素結合している。

活性に必須な Glu 48 のカルボキシル基は Ser 71 と Asn 44 に水素結合し固定されている。更に Asn 44 のもう1方は Cys 13 のカルボニル酸素と水素結合している。これに比べて Asp 10、Asp 70 の必須残基は、このような固定を受けていないことは興味深い。一般に、このMg²⁺結合部位近辺は水素結合で固められている。

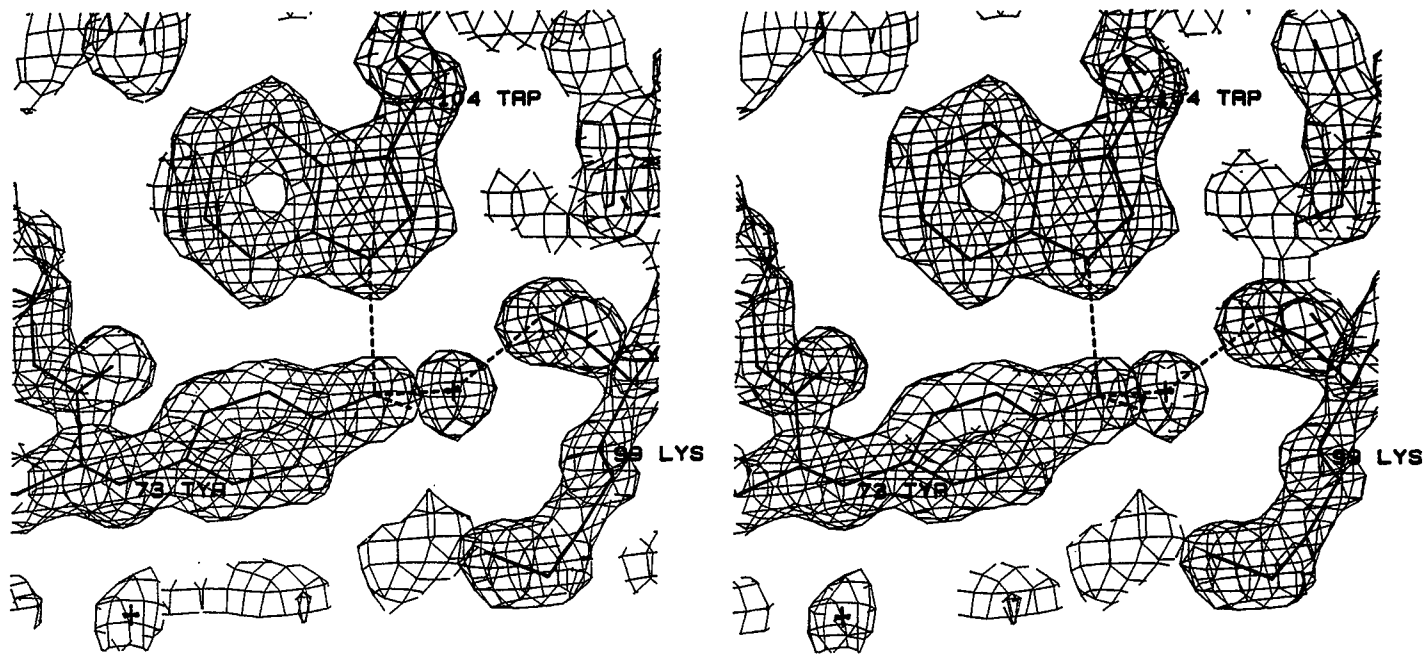


図8-3 α II上の Tyr 73 と α IV上の Trp 104 の相互作用。Tyr 73 はまた、水分子 (WAT205、 $B=30.05 \text{ \AA}^2$) を介して Lys 99 主鎖と水素結合している。また α IV はC末端側では図9に示されるように His 114 と水素結合し、両端が支えられている。

第3節 トリプトファンの分布

前述したように、 β シートと2本のヘリックスの組 (α IIと α III) は、分子中央部に位置する α Iと α IVを底とするように、大きな裂け目を形成している。RNase H 分子がもつ6つのトリプトファン残基すべてが、この裂け目の両側に集中している(後出の図17参照)。この裂け目は疎水結合コアの半分を占めている(図4)。このトリプトファン残基のクラスターは、クレフトの底にある、ヘリックス α Iと α IVの疎水性側と相互作用している。すなわち、いずれのトリプトファン残基も、6員環が疎水結合コアである α Iの方向を向いている。また、2組のトリプトファンがずれながら重なりあい、スタックしている(Trp 81 と Trp 85 の組、および Trp 118 と Trp 120 の組)。特に Trp 81 と Trp 85 は χ_2 角が理想値より 60° ずれており、エネルギー的には不安定であるが、これは α IIと α IIIの折れ曲がりにより、Van der Waals 空間が狭まっているためと考えられる。この2つのトリプトファンの組および WAT238(後出の図13参照)を介した Gln 80 の $O_{\epsilon 1}$ と Trp 81 の $N_{\epsilon 1}$ との水素結合などが、ヘリックス α IIと α IIIの折れ曲がりの方向づけをしているものと考えられる。 α IVのN末端にある Trp 104は、分子内部に埋もれている唯一のトリプトファン残基であるが、 α IIの Tyr 73と側鎖間で水素結合を形成している(図8-3)。この水素結合は、前に述べた疎水結合の他、ヘリックス α IVの Ala 110 と水素結合している His 114 とともに、ヘリックス α IVを両側から構造的に安定化している。

第4節 システインの分布

Bekower ら(1973)により、RNase H は最大の活性を得るためには、スルフヒドリル試薬を要求し、またシステイン残基の化学修飾の典型的試薬であるN-エチルマレイミド(NEM)により阻害されることが報告されており、3つのシステイン残基の分布を考えることは興味深い。このうち Cys 13 と Cys 63 は、それぞれ異

なったループで溶媒部に露出しているが、結晶中においては、Cys 63 は隣接分子に近接しているため、Cys 13 の方がこれらの試薬の影響を受けやすい(図1-1)。最後のCys 133 であるが、これは β Bに直面している α V上にあるため周囲が完全に包囲されており、直接の化学修飾は受けにくいと考えられる。これらの環境の特徴は、RNase H 結晶を水銀化合物に浸漬したときに、システイン残基近傍に現れる Hg^{2+} サイトの占有率との結果(後出の表9参照)とよく一致する。化学修飾と組み合わせた部位特異的変異法による最近の研究では(Kanaya ら、1990a)、これらのシステインの位置に対応した結果が得られているし、NEMによる酵素の不活性化は、チオ基のブロックによるものではなく、立体障害に起因するコンフォメーション変化によるものと考えられる。

第5節 ヒスチジンの分布

すでに立体構造解析されているヌクレアーゼでは、ヒスチジン残基がすべて活性中心に関与している。たとえば、RNase A (Richards & Wyckoff, 1971; Carlisle ら、1974), RNase T1 (Arni ら、1988; Sugio ら、1988), RNase U2 (Matsuzaki ら、私信), barnase (Maugen ら、1982), そして DNase I (Suck & Oefner, 1986; Suck ら、1988) である。したがって、ヒスチジンの位置を議論しておくことは、きわめて重要である。RNase H 分子では His 62 は β Dの入り口、His 83 は塩基性ヘリックス α III上に存在し、いずれも溶媒表面によく露出している。His 114 は、リバー・ターンを構成し、His 127 は α VのN末端側に位置する。この2つは、 Mg^{2+} 結合部位に最も近く、いずれも分子表面に露出しており、基質の DNA/RNA ハイブリッドとの結合に関係するとの推測も可能であるが、部位特異的変異法の結果では、どちらのヒスチジンも RNase H の 活性には必須ではない。しかしながら His 124 の変異体では k_{cat} の値が著しく減少している。これら4つのヒスチジンに対し、His 114 は、 β Eの入り口にあり、5つあるヒスチジンのうち唯一、分子内に埋も

れている。これらの環境は、5つともすべてNMRによる pH 滴定の結果(Yoshida ら、私信)とよく一致している。また、野生型に対する非活性を見るために、5つのヒスチジンをそれぞれ1つずつアラニンに変えたときの結果とも一致している(Kanaya ら、1991a)。

His 62 の N_{δ_1} 原子は、Gln 113 主鎖のカルボニル酸素と水素結合している。また His 127 も Glu 119 と側鎖間で水素結合している。図9に示すように、His 114 側鎖のイミダゾール環にある2個の窒素原子 (N_{δ_1} と N_{ϵ_2}) は、それぞれ主鎖のカルボニル酸素 (Glu 61 の O と Ala 110 の O) と水素結合している。このプロトン化しているという事実は、pH が 9.0 という RNase H の結晶化条件と一見矛盾する。この解釈の1つとして、His 114 は、局部的に負に荷電した環境にあるためと思われる。すなわち、このイミダゾール基は異常に高い pKa 値をもっていると考えられる。事実、His 114 は、Glu 57、Glu 61、Glu 64 と、3つもの酸性アミノ酸のカルボキシル基に囲まれており、また Ala 110 と Glu 61 の主鎖カルボニル酸素に囲まれている。もう1つの解釈としては、中性のイミダゾール環が分子ごとに別々のサイトでプロトン化し、結晶中では同じ様な占有率として N_{δ_1} と N_{ϵ_2} が存在していると考えられるものである。

さらにつけ加えて、His 114 は、Cys 63 とジスルフィド結合を形成し得る距離に存在する。この114番目の位置にシステイン残基を導入した結果、コンフォメーションには大きな変化もなく Cys 63 とジスルフィド結合が形成され、またこの変異体には RNase H 活性が残っていることがわかった (Kanaya ら、私信)。

第6節 二次構造

① ジョイント予測法、円二色偏光法の結果との比較。

決定された立体構造からは、 α ヘリックスに 42 %、 β シートに 28 %のアミノ酸残基が存在することがわかった。これらの二次構造の含有率は、円二色偏光スペ

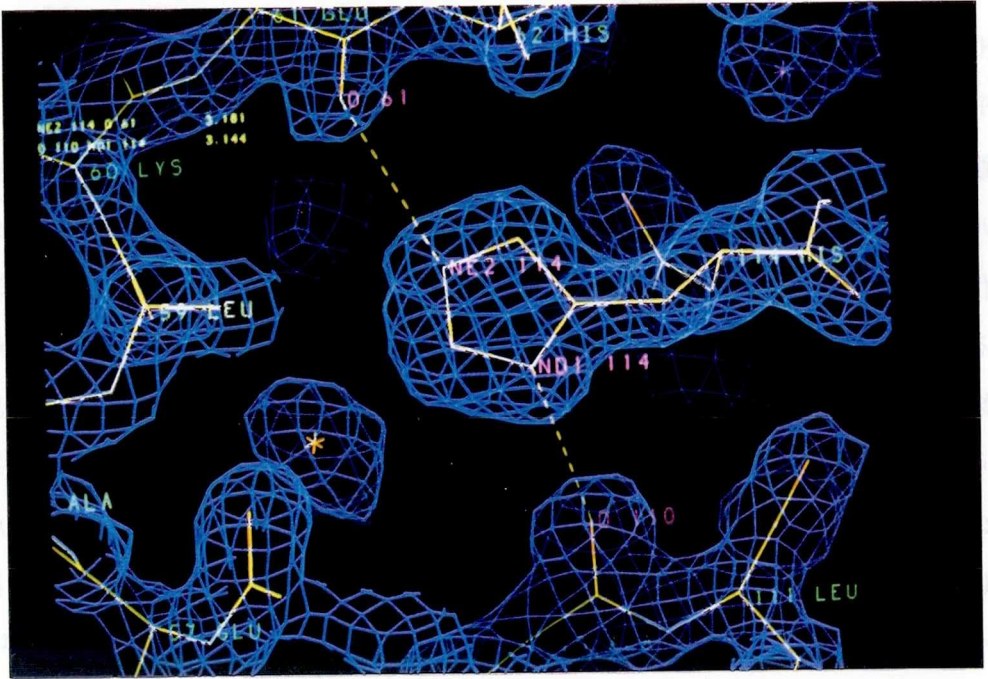


図9 His 114 側鎖の $2F_o - F_c$ 電子密度図。イミダゾール環の2つの窒素原子とも、両側の主鎖カルボニル基 (Glu 61 と Leu 111) と水素結合している。

クトルの実験から得た比率 (α ヘリックスに 28 %、 β シートに 41 %; Kanayaら、1990b) とは一致しなかった。Joint prediction 法 (Nishikawa & Ooi, 1986) による二次構造予測では、 α ヘリックスの長さや その位置は、比較的的中したが、 β シートはあまり的中しなかった。

② ヘリックス

RNase H 分子には2つのドメインにかけて5つの α ヘリックスが存在する。つまり、塩基性突出部には α IIIが、主ドメインにはほかの4つのヘリックスが存在する。これらの α ヘリックスは、 α Iが 43 から 59 まで、 α IIが 71 から 79 まで、 α IIIが 81 から 89 まで、 α IVが 100 から 112 まで、 α Vが 127 から 141 までと定義される。このほか、球状蛋白質の表面近くによくみられる 3_{10} ヘリックスは、3つの α ヘリックスの出口 (α I、 α IV、 α V) にみられる。

α IIと α IIIは約 35° の角度で折れ曲がっているが(図10)、この接合部はプロリンを含まない数残基であり、データベース解析 (Kabsch & Sander, 1983) によりほかの蛋白質の立体構造と比較したが、類似の折れ曲がりは見いだせなかった。この折れ曲がり、前項で述べた疎水結合コアの中心をなす α Iと α IVを囲むように形作られており、内側が疎水性、外側が親水性なことから、このコアの形成に寄与しているものと考えられる。また、ヘリックス α Iは、ねじれている β シートに沿うように疎水結合しているため、約 5° とわずかながら曲がっている(ヘリックス中央の Glu 48 のNと Ala 52 のOの距離が 3.8\AA で水素結合には長すぎる)。

各原子の温度因子や変位のパラメータから、構造上の安定性や柔軟性がわかる。図11に、主鎖原子の等方性の温度因子を各残基ごとに平均し、残基番号でプロットしたものを示した。興味深いことに、 α IIIの温度因子が 25\AA^2 を越えており、ほかのヘリックスに比べ非常に高い値を示した。そのほかの、ヘリックスや β シートの二次構造部分では温度因子は明らかに小さい。 α IIIには塩基性アミノ酸残基が多く

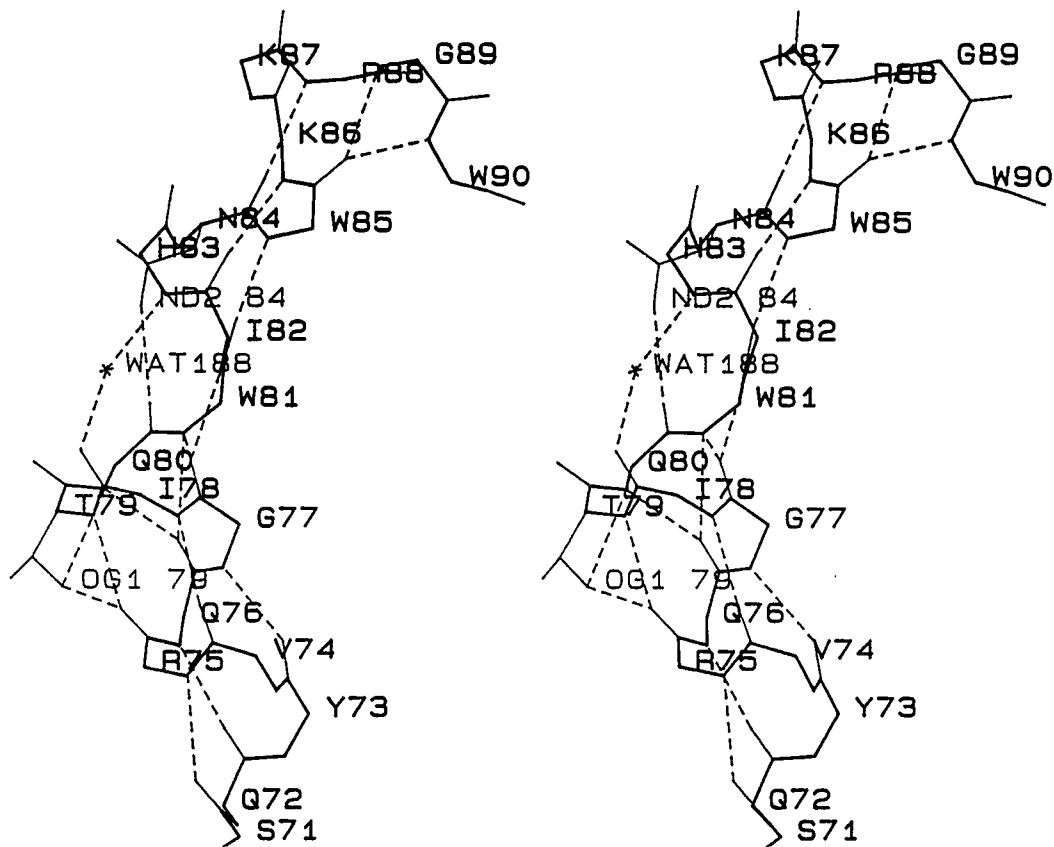


図10 ヘリックス α IIと α IIIの約 35°の折れ曲がり。この折れ曲がりの内側は疎水性残基が並び、疎水性コアの形成に参加している。一方、外側には親水性残基が並び、溶媒領域を向いており、またその1部は核酸結合部位と予想される。Thr 79、Asn 84 の側鎖や、水分子 (WAT188、 $B=25.32\text{\AA}^2$) が この折れ曲がりを補助する水素結合を形成している。

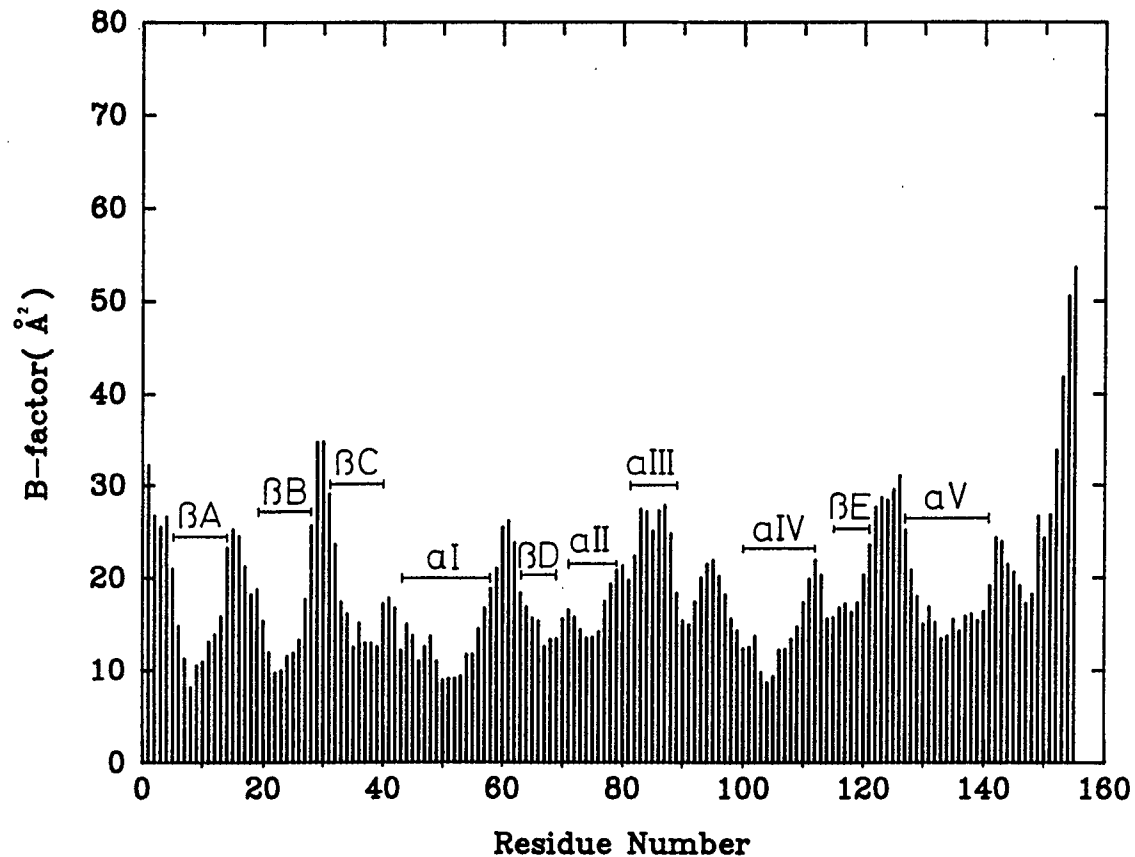


図11 構造精密化後に得られた RNase H 主鎖原子 (C α 、C、N、O) の 等方性温度因子を、各残基ごとに平均し、残基番号でプロットしたもの。二次構造部分の温度因子は小さいが、塩基性突出部のヘリックス α III の部分のみが例外的に大きい。

含まれることから、核酸 2 重鎖との結合に何らかの役割を果たすものと考えられる。

③ β シート

この分子には 5 本の β 鎖より成る 1 枚の β シートがあり、主ドメインのコアになっている。残基番号で 5 から 14、19 から 28、31 から 39、63 から 69、115 から 121が、それぞれ βA から βE と定義され、3 つの平行鎖 (βA 、 βB 、 βC) と 2 本の逆平行鎖 (βD 、 βE) になっている。この β シートの水素結合のダイアグラムを図12に示す。この β シートは通常の蛋白質に含まれる β シートと同じように左方向にねじれている。

この β シートの 特徴は、これをはさんでいる 2 つの α ヘリックス (αI 、 αV) とシートの両側で相互作用していることである。まず、 αI や αIV サイドの例としては、Val 5(βA)-Leu 59(αI)、Leu 26(βB)-leu 59(αI)、Val 65(βD)-Leu 59(αI)、Ile 7(βA)-Leu 56(αI)、Ile 7(βA)-Ala 110(αIV)、Ile 7(βA)-Leu 111(αIV)、Leu 67(βD)-Ala 55(αI)、Trp 118(βE)-Ala 55(αI) などのような疎水結合があげられる。その裏側では、 β シートは αV の N 末端と水素結合を形成したり、静電的な相互作用をしている。ただし αV の N 末端近傍部は溶媒領域に露出している。また αV の C 末端側とはもうひとつの小さな疎水結合コアを形成している。この際の疎水性残基は、 αV 側が Ala 137, Ala 140, Ala 141 で、 β シート側が Gly 20, Gly 21, Gly 38 である。

④ リバース・ターン

球状蛋白質においては、ターンや折れ曲がり は 2 次構造の保持のために重要な要素である。 β ターンは一般に 4 つの連続した残基よりなり、その中の 1 番目と 4 番目の残基が主鎖間で水素結合しており、主鎖の方向を 180° 反転させる。RNase H 分子の β ターンは全部で 5 つ、また β ターンの連続した 3_{10} ヘリックスは 3 つ存在し

ており、それらを表3に示す。なお、これらの分類は Crawford ら (1973) の方法によった。また、ターンの種類は2番目と3番目の残基の2面角 (ϕ 、 ψ) の組み合わせで定義される。

RNase H 分子に見られるすべてのターンはもっぱら分子の表面に存在する。興味深いことに、塩基性突出部のループ部分には2つの β ターン (シーケンスでTADKとVKNV) が存在し、2つのリジン (Lys 95 と Lys 99) が効率的に溶媒部に突出している。同様な状況が β Dと β Cを結ぶターン (YRGR, Arg 29 と Arg 31) にも見られる。

α V入り口のターン付近には、His 124 と His 127 の2つのヒスチジン残基があり、変異体の研究からは、必須ではないが活性に大きな影響を与えていることがわかっている。特に、His 124 は主鎖のコンフォメーション変化を考えれば、 Mg^{2+} 結合部位に十分近づき得るため、このターンの持つ意味は大きい。さらにC末端のループにも 3_{10} ヘリックスと β ターン (DTGY) が存在している。後述するように、これら2つの領域は核酸と相互作用する面に含まれている。

また C末端付近に存在するターンは、好熱菌由来の RNase H (Itaya & Kondo, 1991) では、プロリンが4つも含まれている部分であり、このターンの多い部分が2つの酵素間で相同な役割を持っているのかも知れない。

第7節 水分子の分布

精密化の結果、分子全体で、225 個の水分子が同定された。これらの水分子の分布を図13に示す。ここで温度因子が 30 \AA^2 以下の低いものについては黒丸で表示してある。同定されたすべての水分子のうち 134 個が RNase H 分子と直接に水素結合しており、これらが第1層の水分子であることを示している。これらの水分子のうち、温度因子が 30 \AA^2 以下の低いものは構造の安定化に寄与しているものが多い。他方で、蛋白質分子より 3.4 \AA 以上離れている水分子は、より高い温度因子を持つ

Hydrogen bond	N...O (Å)	ϕ 2	ϕ 2	ϕ 3	ϕ 3	Type§	Sequence	C α 1-C α 4 (Å)
Reverse Turns								
28 O - 31 N	3.04	70	-120	-115	5	RN-II'	Y R G R	5.54
92 O - 95 N	2.95	-56	-28	-92	16	RN-I	T A D K	5.14
98 O - 101 N	3.19	-67	134	61	31	RN-II	V K N V	5.29
122 O - 125 N	2.91	-53	-33	-103	12	RT-I	K G H A	5.05
148 O - 151 N	3.19	-55	-49	-67	-10	RN-I	D T G Y	5.69
3 ₁₀ Helices								
3 ₁₀ -I								
55 O - 58 N	3.23	-65	-46	-63	-11	RN-III	A L E A	5.36
56 O - 59 N	2.98	-63	-11	-81	-23	RN-I	L E A L	5.60
3 ₁₀ -II								
110 O - 113 N	3.31	-61	-33	-67	-18	RN-III	A L G Q	5.72
111 O - 114 N	3.21	-67	-18	-93	-1	RT-I	L G Q H	5.63
3 ₁₀ -III								
138 O - 141 N	3.25	-59	-44	-62	-40	RT-III	R A A A	5.30
139 O - 142 N	3.05	-62	-40	-61	-22	RT-III	A A A M	5.28
140 O - 143 N	2.95	-61	-22	-84	-11	RT-I	A A M N	5.35

§ Classified according to Crawford et al. (1973).

R T , Reverse Turn; R N , Near Reverse Turn; and O , Open Turn.

表3 リバース・ターンと3₁₀ヘリックスの一覧。

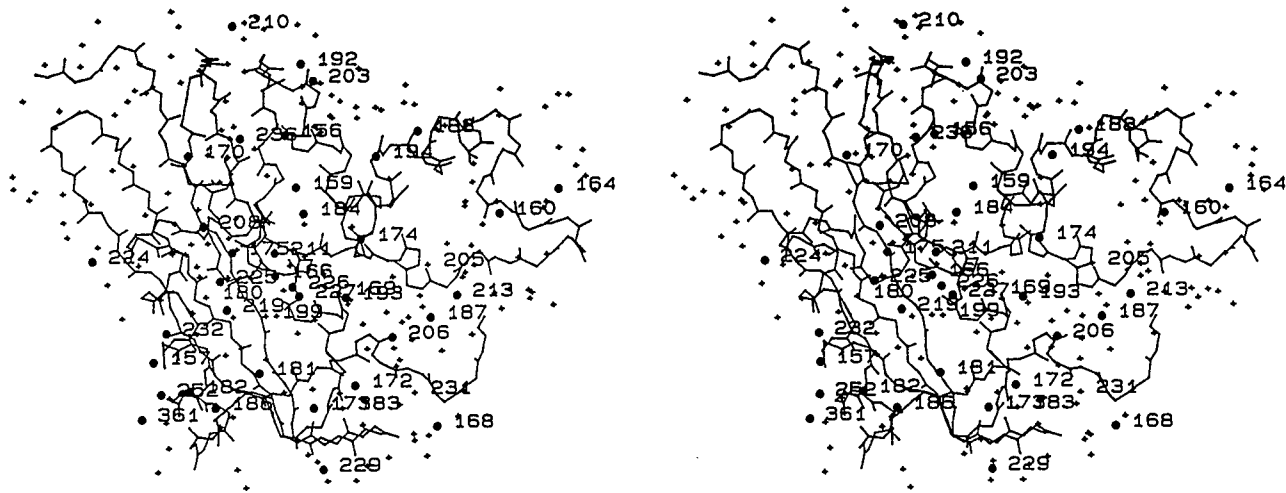


図13 水分子の分布。温度因子が 30 \AA^2 より低いものについては、黒丸で表示し、番号も添えてある。それ以外は+印で示した。この黒丸は、核酸認識部位（第3章第4節）近辺に多く集まっている。

ている。

蛋白質分子内の2つの原子（とくに主鎖原子）を水素結合で結ぶ水分子のほとんどは、温度因子が小さい。これらの水分子は RNase H 分子の フォールディングを安定化している。たとえば 78O-WAT188-83N は、折れ曲がりつつ連続している2つのヘリックス、 α II と α III の間を固定している。同様に、36O₇-WAT157-136O、57O _{ϵ 2}-WAT159-106O、10O _{δ 2}-WAT166-70O _{δ 1}、41O-WAT173-148N、38N-WAT182-145O _{τ 1}、41O-WAT183-148O、73O _{η} -WAT205-99N、43O _{τ 1}-WAT206-100N _{δ 2}、9O _{τ 1}-WAT211-48O などは、2次構造やループを水素結合で結び付ける中間体としての役割をなしている。WAT192 と WAT193 のペアの水分子は、 α IV の C 末端側付近の 3₁₀ヘリックスを安定化させている。

また、4つのチロシンに対して、その水酸基に水素結合している水分子が見いだされている。つまり、219WAT-Tyr 22、199WAT-Tyr 39、205WAT-Tyr 73、および231WAT-Tyr 151 である。

後の章で詳細に述べる RNase H 分子の DNA/RNA ハイブリッド2重鎖との接触面には、より多くの水分子が分布している。温度因子が 30Å²以下の水分子、たとえば WAT166、169、175、180、および 227 などは、4つの重要な酸性アミノ酸残基 Asp 10、Glu 48 Asp 70 と Asp134 で形成される Mg²⁺結合のためのポケット近傍に集中している。これらの水分子は、自身の持つ大きな双極子定数により、このポケットの負電荷を中和するものと思われる。C末端にあるループと α I の N末端側で囲まれる領域にも多くの水分子が存在しており、このC末端ループのフォールディングを助けているものと考えられる。

とくに、Glu 57 付近をはじめとして、 α I と α IV の溶媒側には、 α V の溶媒側より多くの水分子が見られる。これに対し、トリプトファンのクラスターで形成される開列部を含め、この付近の疎水結合コアには、水分子はほとんど見られない。

第8節 結晶のパッキング

RNase H 分子の、空間群 $P2_12_12_1$ の斜方格子におけるパッキングを Z 軸方向から眺めたものを図14に示す。それぞれの酵素分子は、結晶格子中においては9つの分子と接している。RNase H 結晶の V_m は1.94で、Matthews (1968) の式から37%の溶媒水が結晶に含まれると計算される。分子の接触部分は比較的せまく、電子密度分布図には、大きな溶媒領域が明瞭に認識される。更に、分子間の相互作用を表4に示した。

RNase H 分子には、4つの酸性アミノ酸残基が集中している Mg^{2+} 結合部位が1ヶ所ある。また塩基性のアミノ酸残基が集中しているところが、塩基性の突出部と、 $\beta B \rightarrow \beta C$ の折り返し部の2ヶ所ある。Protein Data Bank に登録されている179個の異なる蛋白質の立体構造に対して、Nakamura と Wada の式 (1985) を用いて双極子モーメントを計算したところ、RNase H はその値が非常に高い分子であり、上位10%内に位置づけられることが判明した。すなわち、RNase H 分子の表面は電荷が大きく偏っており、これが結晶化の容易さと関連しているだろうと思われる。実際、結晶中での分子の配列を見ると、ある分子の正電荷の表面が、隣の分子の負電荷の表面に接しており、分子の電荷の偏りを打ち消すように並んでいる。

図14において、分子 (x, y, z) は、隣接分子 $(1/2+x, 1/2-y, 1-z)$ と2つの塩橋、すなわち Asp 10-Lys 87 と Asp 70-Lys 87 を通じて接している。また、 $(1/2+x, 1/2-y, 1-z)$ と $(-x, 1/2+y, 1/2-z)$ に関しては、前者のN末端ループと後者の βC との間に、逆平行 β シート様の水素結合が形成されている。このN末端ループは、実際、MIRマップでもC末端より明瞭に解釈でき、また精密化後の温度因子もC末端側より低く抑えられている。

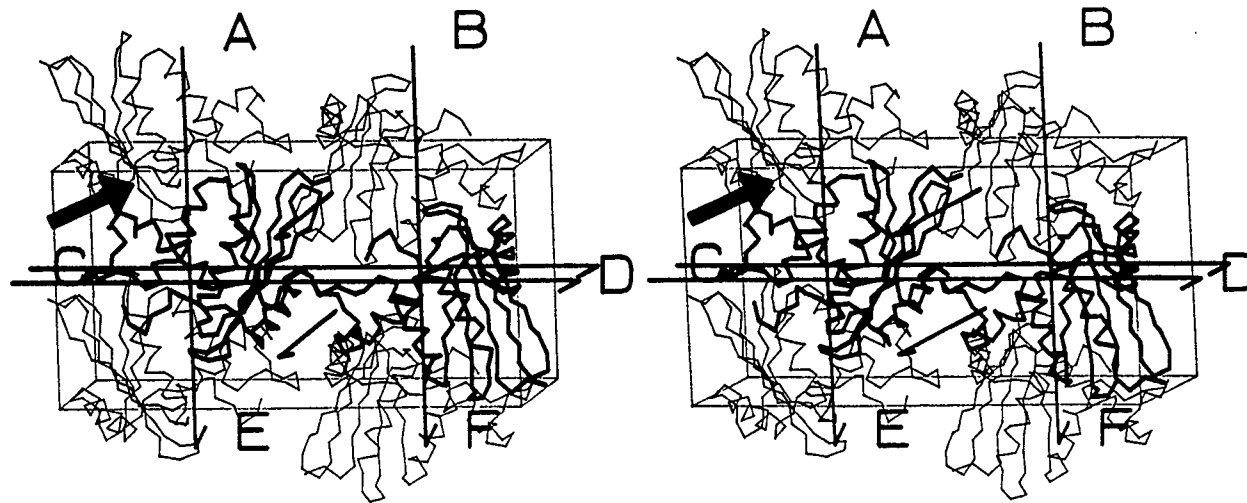


図14 大腸菌 RNase H 結晶の パッキング。直方体のわくは単位格子で、各方向のらせん軸は長い矢印で示した。太く短い矢印の部分は酸性アミノ酸残基の集まっている Mg^{2+} 結合部位に隣接分子の塩基性突出部位が入り込んでいる様子を表す。この噛み合わせは、基質との複合体の結晶化を難しくしている原因の1つと思われる。なお、各分子の位置関係は $A(x,y,z)$ 、 $B(-x,1/2+y,1/2-z)$ 、 $C(1/2+x,1/2-y,1-z)$ 、 $D(1/2-x,1-y,1/2+z)$ で、EとFはそれぞれ、AとBをx方向に単位格子分だけ平行移動したものである。

a) Hydrogen bonds. ($\leq 3.4\text{\AA}$)

Residue	Atom	Residue	Atom	Distance(\AA)	Symmetry Operation
Met 1	N	Tyr 22	O η	3.01	-1/2-X, -Y, 1/2+Z
Met 1	O	Ser 36	N	2.79	-1/2-X, -Y, 1/2+Z
Lys 3	N	Thr 34	O	2.90	-1/2-X, -Y, 1/2+Z
Glu 6	O ϵ 1	Arg 31	N η 1	2.99	-1/2-X, -Y, -1/2+Z
Arg 31	N η 2	Glu 119	O ϵ 1	3.08	-1/2-X, -Y, -1/2+Z
Arg 29	N η 2	Gly 126	O	3.18	-1/2-X, -Y, -1/2+Z
Glu 64	O ϵ 1	Ala 93	N	3.40	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Asp 10	O δ 1	Lys 87	N ζ	2.81	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Asp 70	O δ 1	Lys 87	N ζ	3.31	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Asp 70	O δ 2	Lys 87	N ζ	2.57	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gln 76	N ϵ 2	His 114	O	3.12	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gln 76	N ϵ 2	Gly 112	O	2.63	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gln 80	O ϵ 1	Gly 112	O	3.17	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gln 80	N ϵ 2	Gly 112	O	3.04	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Thr 40	O γ 1	Lys 122	N ζ	3.34	X, Y, 1-Z
Arg 75	N η 1	Glu 147	O ϵ 1	2.98	X, Y, 1+Z
Arg 75	N η 2	Thr 149	O γ 1	3.03	X, Y, 1+Z
His 124	N ϵ 2	Pro 144	O	3.27	X, Y, 1+Z
Lys 91	N ζ	Glu 135	O ϵ 2	2.95	-X, 1/2+Y, 1/2-Z
Asp 94	O	Arg 132	N η 1	2.51	-X, 1/2+Y, 1/2-Z

b) Non-bonded contacts. ($\leq 4.0\text{\AA}$)

Glu 6	O ϵ 2	Arg 31	N η 1	3.65	-1/2-X, -Y, 1/2+Z
Arg 31	N ϵ	Glu 119	O ϵ 1	3.58	-1/2-X, -Y, 1/2+Z
Asp 10	O δ 2	Lys 87	N ζ	3.43	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Asn 44	O δ 1	His 83	N ϵ 2	3.87	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Asn 44	N δ 2	His 83	N ϵ 2	3.65	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gln 76	O ϵ 1	Gly 112	O	3.81	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Trp 85	N ϵ 1	Gln 115	O ϵ 1	3.90	1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gln 4	N ϵ 2	Asp 94	O δ 1	3.82	-1/2+X, 1/2-Y, -Z
His 62	N δ 1	Gln 80	O ϵ 1	3.92	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Glu 64	O ϵ 1	Arg 88	N η 1	3.41	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Glu 64	O ϵ 2	Ala 93	N	3.58	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Lys 86	O	Gly 123	O	3.92	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Lys 86	O	His 124	N δ 1	3.84	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Lys 87	O	His 124	N	3.41	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Gly 89	N	His 124	N δ 1	3.88	-1/2+X, 1/2-Y, 1-Z
Arg 75	N η 2	Glu 147	O ϵ 1	3.99	X, Y, 1+Z
Arg 75	N η 1	Glu 147	O ϵ 2	3.77	X, Y, 1+Z
Lys 91	N ζ	Glu 135	O ϵ 1	3.70	-X, 1/2+Y, 1/2-Z
Asp 94	O	Arg 132	N ϵ	3.59	-X, 1/2+Y, 1/2-Z
Asp 94	O δ 1	Arg 132	N η 1	3.59	-X, 1/2+Y, 1/2-Z

表4 大腸菌 RNase H の結晶学的対称分子間の水素結合。対象となる原子どうしの距離が 3.4 \AA 以内のものを水素結合とみなし、3.4 \AA 以上 4.0 \AA 以下の範囲にあるものは、non-bonded contact とした。

第9節 活性金属の結合部位

RNase H 活性には Mg^{2+} が必須である。その Mg^{2+} の結合する位置を同定するために RNase H 結晶を Mg^{2+} イオンを含む水溶液に浸漬させ、回折強度データを収集した。さらに、 Mg^{2+} はその原子番号が小さいため、原子番号のより大きなアルカリ土類金属、すなわち、 Ca^{2+} や Ba^{2+} についても同様の実験を行い、これらの金属が結合する部位を同定した。

これら3つの2価の金属イオンは、 Mg^{2+} のみならず Ca^{2+} や Ba^{2+} でも、全く同じ位置に結合することが明らかになった。さらに、RNase H 活性に必要な金属は、 Mg^{2+} のみではなく、 Ca^{2+} や Ba^{2+} でも、僅かながらRNAを切断する活性を示すことが、HPLCの実験により示された(Iwaiら、投稿準備中)。 Mg^{2+} にイオン半径が近いという理由で、 Co^{2+} についても浸漬実験を行ったが、 Mg^{2+} 位置からは約 3.5\AA 離れたところにピークが見いだされた(Asp 10 と Asp 70 の側鎖に挟まれたところ)。

また、RNase H 活性は Mg^{2+} の他に Mn^{2+} でも、ある場合には促進されるという事実から浸漬実験や共結晶化を試みたが、浸漬中に沈澱を生じやすく、やむを得ず行った飽和濃度では、差フーリエ図上には Mg^{2+} などの場合のような有意なピークは見出せなかった。この場合、最高のピークは His 62 付近に見出されたが、その理由は現在まで不明である。

図15にそれぞれの金属イオンの結合位置を差フーリエ図を用いて示した。また、精密化した金属の無い RNase H の、これに対応する領域の $2|Fo|-|Fc|$ マップを図16に示し、金属イオンが結合していないときの環境を示した。図から明らかなように、各金属イオンの結合位置は、イオン半径の大きさ(Shannon、1976)に対応して、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の順に、キャビティの内側へシフトしている。 Co^{2+} は、Asp 10 と Asp 70のカルボキシル基に挟まれる位置に存在しているが、O-C-Oの距離は、どれとも 2.4\AA であり、これは、 Co^{2+} が4つのカルボキシル酸素原子に、配位結合している状態である。 Mg^{2+} のピークの位置は、重原子の位置を決定する場

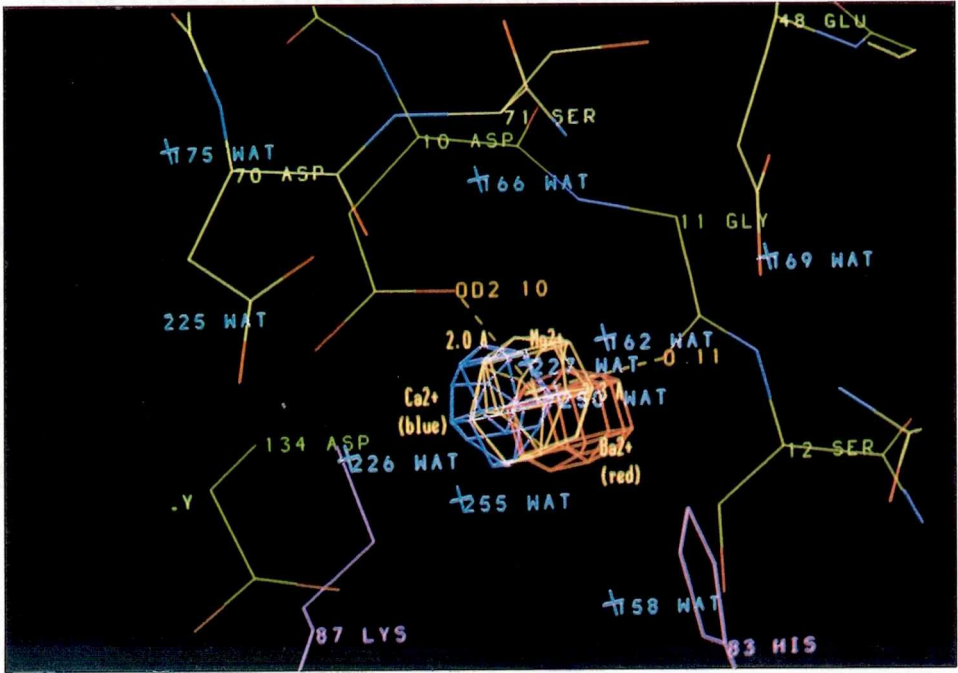


図15 RNase H の金属の結合した結晶と金属のない結晶との差フーリエ図。この図は $(|F_{\text{metal}}| - |F_{\text{free}}|) \exp(i\alpha_{\text{MIR}})$ の式で計算した。残差電子密度の等高面は、黄色が 5.0σ の高さの Mg^{2+} のものを、青色が 4.0σ の高さの Ca^{2+} のものを、また赤色が 14.0σ の高さの Ba^{2+} のものをそれぞれ示す。また、蛋白質側の構造は、金属を含まない野生型の構造（精密化後）を重ね合わせたものであり、紫色の骨格はその対称分子の構造である。

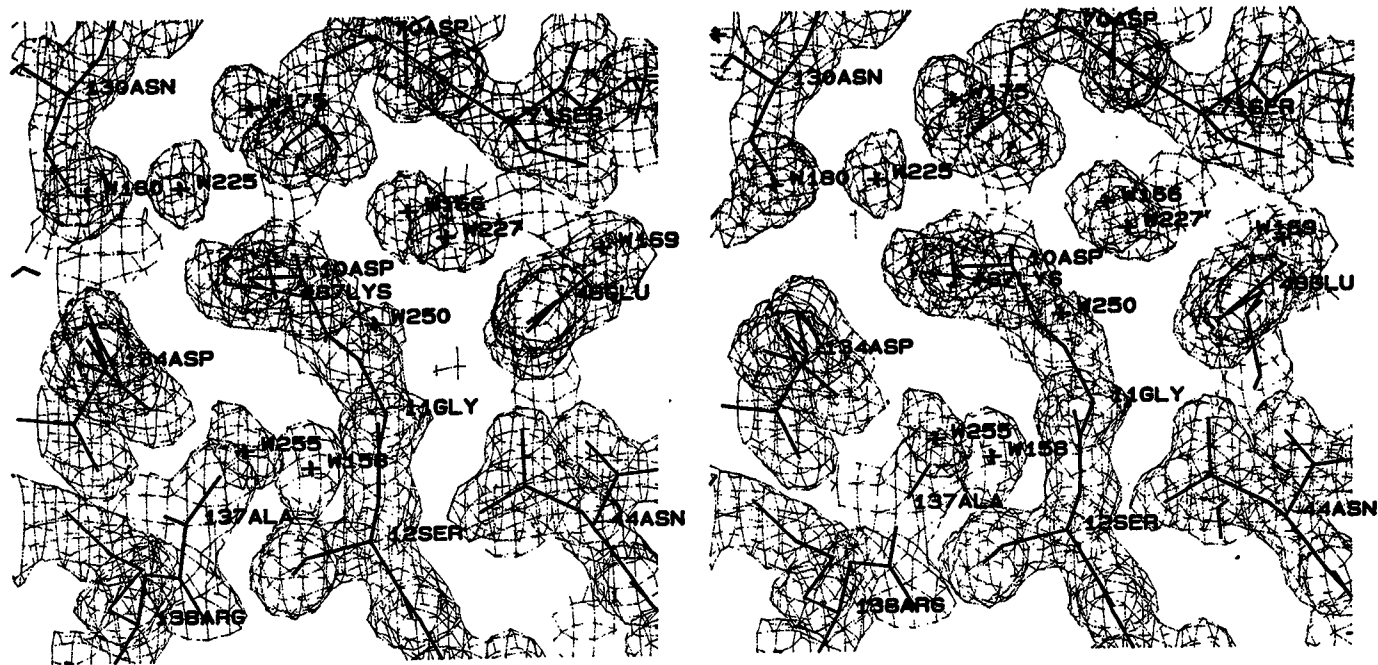


図16 金属を含まない結晶について、精密化後の構造をもとにして計算した、 Mg^{2+} 結合部位付近の $2F_o - F_c$ 電子密度図。水分子である WAT250 付近が金属の結合する位置である。

合と同一の方法によって精密化したもので、標準偏差は0.16Åである。Mg²⁺の、近傍の酸性アミノ酸残基のカルボキシル基からの距離はそれぞれ、Asp 10 から 2.0 Å、Glu 48 から 4.2Å、Asp 70 から 4.5Å、Asp 134 から 5.0Å であった。また、Asp 10 のカルボキシル酸素から 2.0Å、Gly 11 のカルボニル酸素から 2.3Å の距離で、Mg²⁺はこれらの酸素原子に配位していることが示唆される。

第10節 大腸菌 RNase H と逆転写酵素 RNase H ドメインの活性中心

Doolittle ら (1989) は、大腸菌 RNase H と、25 種類の逆転写酵素およびその類縁蛋白質について、アミノ酸配列の類似性を詳しく調べた。その結果、Asp 10、Glu 48、Asp 70 と Asp 134 の4つの酸性アミノ酸残基が、計 26 種類の RNase H 様配列全体にわたって完全に保存されていることが、明らかとなった (表5)。しかしながら、彼らは、これらのアミノ酸残基の保存の意味については、言及できなかった。この論文が発表された時点で、我々はすでに大腸菌 RNase H の初期モデルの構築を終了し、このモデルから、これら4つの酸性アミノ酸残基が、1つの領域に集中して存在していることを見いだしていた。さらにMg²⁺位置を差フーリエ図上で同定したことから、これらの酸性アミノ酸残基が活性に関係する重要なものであることが判明した。図17にこれら4つの酸性アミノ酸残基と、同定されたMg²⁺の、分子全体に対する位置関係を示した。X線解析と平行して、Kanaya ら(1990b)が行った、活性アミノ酸残基を求め一連の部位特異的変異法の実験結果からも、大腸菌 RNase H の場合、前3者の酸性残基については、どの1つをアミノ酸置換しても酵素活性が完全に失われることが裏付けられた (表6)。また我々の結果からは、逆転写酵素の RNaseH 活性部位は、すべておなじ構造を取っている可能性も、同時に示唆される。

なお、これらの酸性アミノ酸残基のほかにも、本章第2節で述べられた分子内相互作用をしている残基は保存されている傾向にある。さらに、本章第1節で述べら

HTLV-I	INTAPCLFSDGS TSRA AYY	LWDKQIL	SGRSFPLPPPH	KS AQRCELLGLLHGLSSARSW	RCLN
HTLV-II	LDTAPCLFSDGS PQKA AYY	LWDQTIL	QQDITPLPSHET	HS QODITPLPSHET	PSLN
BLV	IPAALCLFSDGA TGRG AYC	LWKDHL	DFQAVPAP	ES AQKGLAGLLAGLAAAPP	EPLN
SRV-I	LNNALLVFDDGSSGMA AYT	L ADTTI	KFQTNL	NS AQLVELQALIAVL SAFP	QPLN
IAP-18	LPDGTVVFYDGSKTGLG AYW	Y KDRVI	SKQYNE	TS PQVVECLIVLEVL EAFPG	PLN
MMTV	LEKGIWIFTDGANGRSVYI	QGREPII	KENTQ	NT AQAQEIIVAVITAFEVS	QPFN
HERV-K	LENALTVFTDGSNGKA AYT	GPKERVI	KTPYQ	S AQRDELVAVITVLQDFD	QPIN
RSV	PVPGPTVFYDASSTHK GVV	VWREGPR	WEIKEIAD LG	AS VQLEARAVAMAL LLWPT	TPTN
HIV	IVGAETFYVDGAANRETKL	AGYVTNK	GRQKV VPLTN	TT NQKTELQAIYLALQDS G	LEVN
HIV2	IPGAETFYTDGSCNRQSK	AGYVTR	GKDKV KKLEQ	TT NQAELEAFAMALDTS G	PKVN
VISNA	LVPGPTIYTDGG KKNR GS	LGYIAST	G EK F RIHEE	GT NQOQELRAIEEACKQ G P	EKMN
EIAV	PTSGITIYTDGG KQNGE G	AAVYTSN	GRTKQ KRLGP	VT HQVAERMAIQHALEDTRD	KQVN
MoMLV	PDADHTWYTDGSSLLQEQ	AGAAVTT	ETEVIWAKALDA	GTSQAERELIALTQALKMAEG	KKLN
ECOLI	MLKQEIYFDGSCNLGPGCG	YGAILRY	RGREKTFISAGYT	RITNNRHELMHAAIIVALEAKEH	CEVI
HEPB	RPGLCQVFADATPTGGW LV	MGHQMR	GTFSAPLP	IHTAELLA ACFARSRG	ANI
17.6	FTKKFTLTDASDVALGAVLSQ	DGH PL	SYISRTLNEHEI	NYSTIEKELLAIVWATKTFRHYLLG	RHFE
297	FEKKVLTDDASNLALGAVLSQ	NGH PI	SFISRTLNDHEL	NYSAIEKELLAIVWATKTFRHYLLG	RQFL
412	FSKEFCITDASQACCAVLTQNH	NGHQLPV	AYASRAFTKGES	NKSTTEQLAAIHWAIHF RPYIYG	KHFT
GYPST	FKKPFDLTDASASGICAVLSQ	EGR PI	TMISRTLKQPEQ	NYATNERELLAIVWALGKLNQNF	LYGSRIN
CERV	PNDKLVIEDGSEEFWGGILKAIH	NSHEYIC	RYASGSKAAER	NYHSNEKELLAVIRVIKFFSIYLT	SRFL
CAMV	PEEKLIETDASDDYWGMLKAIKIN	EGTINTELIC	RYASGSKAAEK	NYHSNDKTELAVINTIKKFSIYLT	VHFL
DIRS	PSYDYVLTDDASESGACATLK	KGNK VI	KTSWFQWSTTQS	NHSSNRREMLALLHAYQALCRKLN	SKLK
INGI	PREHYKLVTDGSSVSLGKLGAAAL	LHRNNTLICAPKTGAGELSCSYR		AEVCA LE IGLQRLLKWLPRYRST	PSRLS
I-FAC	LKTHNFIFTDGS KINYTI SFAI	TTETDVL	KYGI LP PYSSVLTSETIAILE	ALE LTK NR R	GKFI
COPD	FENKIIGYVDSOWAGSEIDRKST	TGYLFKMFDFNLICWNTKRQNSV		AASSTEAEMYALFEAVREALWKLE	NPIK
TYEY	PDNKLVAISDASY GNQPYYSQ	IGNIF LLNGKYIGGKSTKASLT		CTSSTEAIEHVSSESI PLLNKK	PIIK

HTLV-I	IFLD SKYLYH YL	RTLALGTF	QGRSSQAP	FQALLPRLSRK VVYLHVRSHNTLPDPISRLNALT	DALLI
HTLV-II	IFLD SKYLK YL	HSLAIGAF	LGTSAHQT	LQAALPPLLOGK TIYLHVRSHNTLPDPIS	TFNEDTSLIL
BLV	IWVD SKYLYS LL	RTLVLGAW	LQPDVPVS	YALLYKSLLRHP AIFVGHVRS	HSSASHPIASLNNYVDQLL
SRV-I	IYTD SAYLAHSIPL	LEITVAQ	IKHISETAKL	FLQCCQQLIYNRSIPFYIGHVRAH	SGLPGPIAHGNQKADLTK
IAP-18	IYSD SSYVNAVNL	LEIAGI	IRSSSRVANIFQ	IKIQAALLNRHFVVFITHVRAH	SGLPGPMSLGNLADKATK
MMTV	LYTD SKYVTG LF	PEIETATL	SPRTKIYTEL	KHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGL	PGPLAOGNAYADSLTR
HERV-K	IISD SAYVVQ AT	RDVETALIKY	SHDDQLNQLFN	LQQTIVRKRNFPPYIYIRAHNTLP	GPLTKANEQADLL
RSV	VVTD SFAVAK ML	LKMGOEGV	PSTAAA F	ILEDALSQRSAMAALVHVRSHSEV	PGFFTEGNDVADSQAT
HIV	IYTD SQYALGIIQ	A QPDK	SESELVNIIEQL	IKKEKYLAWVPAH KGIG	GNEQVDKLVLS
HIV2	IIVD SQYVMGISA	S QPTE	SESKIWNQIIEEM	IKKEAIIYVAWVPAH KGIG	GNEQVDHLVS
VISNA	IYTD SRYAYEFML	RNWDEEV	IRNPIQARIMELV	HNKEKIGVHWVPGH KGIP	QNEEIDRYI
EIAV	IYTD SRYCWNKIT	EGLLEG	PQNPW WPIIQNI	REKEIYVFAWVPGH KGIY	GNLADAEAAK
MoMLV	YITD SRYAFATAHIGHEIYRRRGLL	TSEG	KEIKNKDEILALLKALFLPK	RLSIHICPGHQKHSAAEARGNR	HMADQAAR
ECOLI	LSTD SQYVRQGITQ	WIHNWKRQWKTAD	KPKVKNVDLWQR	LDAAALGQHQIKWVWKGHAGHPE	NERCEDELAR
HEPB	IGTDNSVGLSRKITS	FPWLLGCAANWIL	RGTSFYVPSALNPADDP	SRGRGLLSRPLRPFRTGRTSLRYADSPSV	
17.6	ISSDH QPLS	WLYRMK	DPNSKLTR WRVKL	SEFDFDIKYIKGK	ENCVADALSR
297	IASDH QPLR	WLHNLK	EPGAKLER WRVRL	SEYQFKIDYIKGK	ENSVADALSR
412	VKTDH RPLT	YLFMSV	NPSSKLTR IRLEL	EYNYFVYLYKKG	DNHVADALSR
GYPST	IFTDH QPLT	FAVADR	NTNAKIKR WKSXI	DQHNAKVYFKPGK	ENFVADALSR
CERV	IRTDN KNFT	HFVYNLKGDRK	QGRLVN WQHWL	SQYDFDVEHIAGT	KNYFADFLOE
CAMV	IRTDN THFK	SFVNLNYKGD	SKLGRNIR WQAWL	SHYSFDVEHIKGT	DNHVADFLSR
DIRS	IQTDN TTTLS	YINRGGGQIQDL	SVLFEQLWKQCL	KKKVNLIGEHPGF	FNVKADHLR
INGI	IFSDLSMLT	ALQTPG	LAVTDPIRLRLWHL	LLQVQRKIRIRLQFVFDHCGVK	RNEVCDENAK
I-FAC	ICSDLSAVD	SIQNTN	NNSFY P SRIRSLITQ	HAPKIKIM WIPCHSGIK	GHELADQAAK
COPD	IYEDNQCCIS	IANNPSCHK	RAKHIDIKYHFARE	QVQNNVICLEYIPT	NQLADIFTK
TYEY	GLLTDASRTIS	IKSTNEEKFRN	RFFGTKAMRLRD	EVSGNNLYYYIETK	KNIADVMTK

表5 レトロウイルス由来の逆転写酵素および関連蛋白質25種類と、大腸菌 RNase H とのアミノ酸配列の類似性 (Doolittle ら、1989)。中央の 'ECOLI' の行が、大腸菌RNase H のアミノ酸配列 (Kanaya & Crouch、1983) である。表から明らかのように、*印のついた4つの酸性アミノ酸残基 (大腸菌 RNase H では、Asp 10、Glu 48、Asp 70 および Asp 134) は 26種類全体にわたって完全に保存されている。

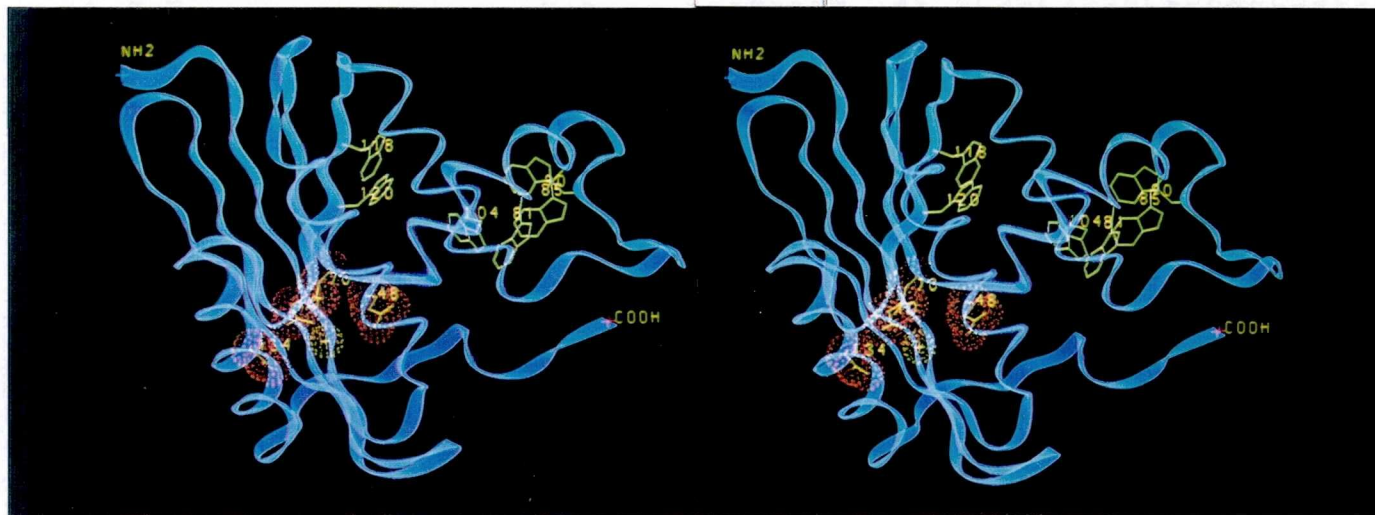


図17 RNase H 分子全体における活性部位の位置。RNase H 分子は水色のリボンモデルで、活性残基は黄色の骨格に赤のドットによる分子表面を付けて示した。また同定された Mg^{2+} 位置は黄色の+印に黄色のドットによる球面を付けて示した。

なお、緑の骨格はトリプトファンで、RNase H の持つ6個のトリプトファンすべてがこのようにほぼ1ヶ所に集まっている（第1章第3節）。

Amino acid residues		Relative activities (%)
Native	Mutant	
Lys-3	Cys-3	103
Ile-7	Cys-7	90
Thr-9	Ala-9	40
Asp-10	Ala-10	< 0.1
Asp-10	Asn-10	< 0.1
Asp-10	Glu-10	5
Thr-9, Ser-12	Ala-9, Ala-12	20
Cys-13	Ser-13	190
Glu-48	Ala-48	< 0.1
Glu-48	Gln-48	< 0.1
Glu-48	Asp-48	1.7
His-62	Ala-62	100
Cys-63	Ser-63	80
Asp-70	Ala-70	< 0.1
Asp-70	Asn-70	< 0.1
Asp-70	Glu-70	< 0.8
Ser-71	Ala-71	100
Tyr-73	Leu-73	100
Ile-78	Thr-78	80
His-83	Ala-83	110
His-114	Ala-114	30
Trp-118	Phe-118	36
Lys-122	Asn-122	25
His-124	Ala-124	2.5
His-127	Ala-127	20
Asn-130	Asp-130	13
Cys-133	Ser-133	50
Asp-134	Asn-134	90
Arg-138	Cys-138	60
Pro-144	Ile-144	20
Asp-148	Asn-148	(< 1.0)

Kanaya et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4615-4621.
etc.

表6 Kanaya ら (1990b) による大腸菌 RNase H のアミノ酸置換による比活性の変化。3つの酸性アミノ酸残基 (Asp 10、Glu 48、Asp70) の変異体は活性が完全に無くなっている。Asp と Glu の置換体は RNase H 欠損株を用いることができないため、<0.1にはならないが、活性はないと考えられる。

れた疎水結合をしている多くの残基が、大腸菌RNase H と逆転写酵素との間で保存されている。

我々がX線解析で決定した 大腸菌 RNase H の立体構造をもとに、これらの逆転写酵素の中から、ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1) と、マウス白血病ウイルス (M u L V) の 2 つを選び、モデルを組み立てた(Nakamura ら、1991b)。この 2 つは大腸菌 RNase H と、アミノ酸配列の類似性が 最も高いものである。興味深いことに、H I V - 1 のモデルでは、DNA/RNA ハイブリッドとの結合に関与していると思われる、塩基性の突出部を欠いている。しかし、M u L V のモデルではそれは保存されており、大腸菌 RNase H とほぼ同じ構造であった。最近、H I V - 1 由来の逆転写酵素の RNase H ドメインの結晶構造が、Davies ら (1991) により発表されたが、その結晶構造は、この予想モデルの構造と本質的には同じであり、大腸菌RNase H の構造とも類似性の高いものであった。また金属結合部位も Doolittle の表に示される完全に保存される 4 つの酸性アミノ酸を中心に構成されており、我々の同定したMg²⁺結合部位が、逆転写酵素の場合にもそのまま当てはまることが明らかとなった。

なお、大腸菌 RNase H と H I V - 1 RNase H ドメインとの構造の比較については、Jacobso-Molina & Arnold (1991) と Davies ら (1991) によっても、詳細な報告がなされている。

第2章 大腸菌 RNase H 活性部位変異体の立体構造解析

第1節 活性部位変異体について

前章では、主として大腸菌 RNase H の立体構造の詳細と、 Mg^{2+} 結合部位の同定について述べた。この章では、活性に関与すると推定される酸性残基を他のアミノ酸に置換した活性部位変異体の立体構造について述べる。Kanaya ら (1989) は、大腸菌 RNase H の大量生産系を構築し、部位特異的変異の研究を可能にした。この結果、様々な変異体蛋白質を比較的大量に精製し、それらの結晶を調達することができるようになった。

さらに、我々の X線解析で決定した Mg^{2+} 結合部位にある3つの酸性アミノ酸残基、Asp 10、Glu 48 と Asp 70 について、Kanaya ら (1990b) は部位特異的変異法により、どの一つを置換した場合でも活性が完全に消失することを示した。 Mg^{2+} 結合部位が事実、触媒作用に関与していることを証明するには、変異導入によって立体構造が全体的には変化せず、変化が Mg^{2+} 結合部位に限定されることを明らかにする必要がある。なお、この際の置換の方法については、①. 側鎖カルボキシル基の電荷を消失させたもの (Asp → Asn または、Glu → Gln の置換)、②. カルボキシル基を持つ他のアミノ酸に置換したもの (Asp → Glu または、Glu → Asp の置換)、③. カルボキシル基をなくしてアラニンに置換したもの、の3つについておこなわれたが、③では官能基の部分が空洞となっていることが予想されるし、②では、側鎖の長さがあわず基質が結合部位にうまくフィットしないと予想される。

しかし①の電荷をなくした場合の構造変化は、予測が困難であり、興味深い。通常、核酸との接触面は塩基性のアミノ酸に富んでいるが、4つもの酸性アミノ酸が、カルボキシル基同志の反発が予想されるわずか4 Å程度の距離を保ちながら、この塩基性の接触面の中に集中的に存在していることは、活性発現機構の観点からも興

味がある。このような環境下で、側鎖の電荷をなくすことがこの構造の均衡にどのような影響を与えるかを調べるため、結晶構造解析を行った。

以上の観点から、 Mg^{2+} 結合部位に存在する3つの酸性残基をそれぞれアミド化した変異体、D10N、E48Q および D70N の3つを構造解析の対象として選定した。

第2節 活性部位変異体の立体構造

この研究で扱った3つの変異体は、分子の骨格構造については、いずれも大きな変化は示さなかった。これは、前節で示したように、変異体と野生型との立体構造を重ね合わせたときのr.m.s.d.の値が小さいことから明らかである。したがって、Asp 10→Asn、Glu 48→Gln、Asp 70→Asn のアミノ酸置換では、分子全体に構造変化を及ぼすことはない結論される。この事実は、前述（第1章、第10節）のアミノ酸置換を行っても酵素の基質に対する K_m 値は変わらなかったという Kanaya ら (1990b) の実験結果をうまく説明するものである。

D10N 変異体では、側鎖の構造変化は、置換導入した Asn 10 近傍のみに見られた。この様子を図18に示す。主鎖原子のみを用いて D10N 変異体と野生型との構造の重ね合わせを行った場合、いちばん変化の大きかった原子は、Asp 10 の O_{δ_1} 原子で2.31Åであった。このカルボキシル基の構造変化により、もう一方の N_{δ_2} 原子も1.53Å移動し Asp 70 の側鎖カルボキシル基の O_{δ_1} 原子（この原子の野生型に対するシフトは0.69Å）に2.86Åの距離に近づいている。すなわち、置換によって新たに導入された Asn 10 の側差のアミド基が Asp 70 のカルボキシル基に引き寄せられて、新たな水素結合が生じたものと考えられる。この水素結合の形成によって、側鎖がゆらいでいることが予想される溶液中の立体構造においては、活性残基である2つの酸性アミノ酸残基、Asp 10 と Asp 70 の自由度に制限が加えられ、さらに基質が接するポケットの形成が妨げられてしまうことが容易に予想される。

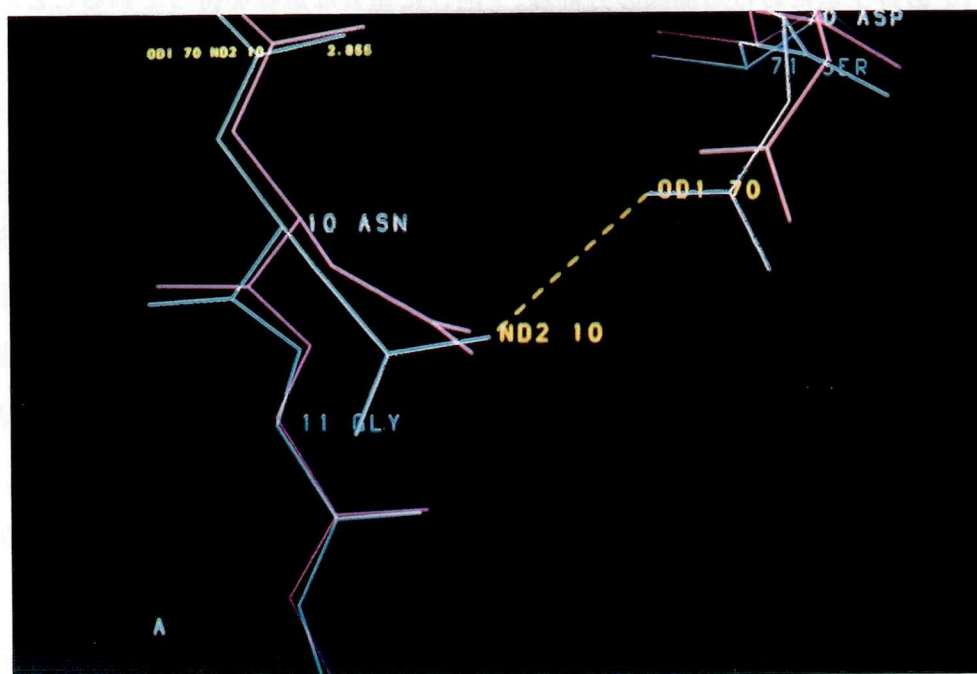


図18 RNase H D10N 変異体の活性部位近傍の構造変化。青色の骨格が D10N 変異体の構造で、赤色が野生型の構造である。置換導入された Asn 10 のアミド基が、Asp 70 のカルボキシル基に近づき、新たな水素結合が形成された。同時に Asp 70 の主鎖も Asp 10 の方に引き寄せられ、 βA と βD の開裂部が狭くなった様子がわかる。

酸性残基である Asp 10 を中性化することにより生じた電荷の均衡の崩れは、立体構造上、前述のような変化として表現された。第1章、第9節で述べたように、Asp 10 のカルボキシル基は Mg^{2+} に直接的に配位しうる距離にある。したがって、Asp 10 の野生型における側鎖の方向は、活性に重要な意味を持っていることが、さらに強く示唆される。

また、RNase H 分子全体のフォールディングからみた場合、Asp 10 と Asp 70 の2つは、それぞれ平行に走る2本の β 鎖、 βA と βD 、のC末端側の開裂部に存在する。今までに β シートと活性部位との位置関係は Rossmann fold により説明されているが、この酵素の場合もその関係はうまく当てはまっている。図18に示される活性部位の構造変化を見た場合、この2つの β 鎖はアミノ酸置換により、僅かに近寄っている。この β シートの開裂部は、DNA/RNA ハイブリッド2重鎖との結合に際し、重要なポケットの1つを構成しているものと推測される。したがって、このアミノ酸置換は、①ポケットの幅を狭め、②新たに形成された水素結合でポケットを埋めてしまった、と解釈される。

このような構造変化は、変異体 D70N の場合でもみられた。変異体 D70N の活性部位近傍の構造変化を図19に示す。D10N の場合と同じように、Asp 10 と Asn 70 の側鎖どうしは近づき、Asp 10 の $O_{\delta 1}$ と Asn 70 の $N_{\delta 2}$ が 2.97\AA の距離に近づき、水素結合を形成した。しかも、2つの β 鎖は僅かながら近づきあっており、変異体 D10N での考察が、そのまま当てはまっていることがわかった。

さらに、変異体 E48Q の活性部位付近の構造変化を図20に示す。グルタミン酸側鎖は、アスパラギン酸側鎖よりメチレン基1個分長いため、変異体導入による構造変化はさらに顕著に現れた。野生型では、Glu 48 側鎖はその両隣に位置する、Asn 44 と Ser 71 の側鎖と水素結合をつくり、固定されていたにもかかわらず、新たに導入された Gln 48 の側鎖アミド基は、その近傍の Asp 10 のカルボキシル基と新たに水素結合を形成した。それにともない、その両隣の Asn 44 や Ser 71

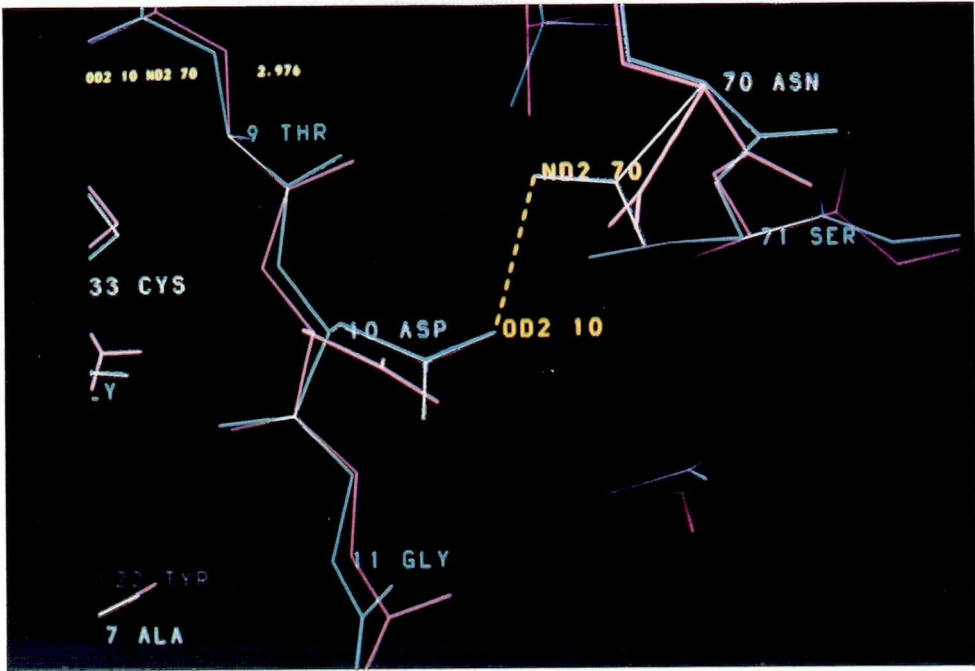


図19 RNase H D70N 変異体の活性部位近傍の構造変化。青色の骨格が D70N 変異体の構造で、赤色が野生型の構造である。置換導入された Asn 70 のアミド基が、Asp 10 のカルボキシル基に近づき、新たな水素結合が形成された。またこの方向からは、 βA と βD のいずれもやや内側にシフトし、開裂部が狭くなった様子がわかる。

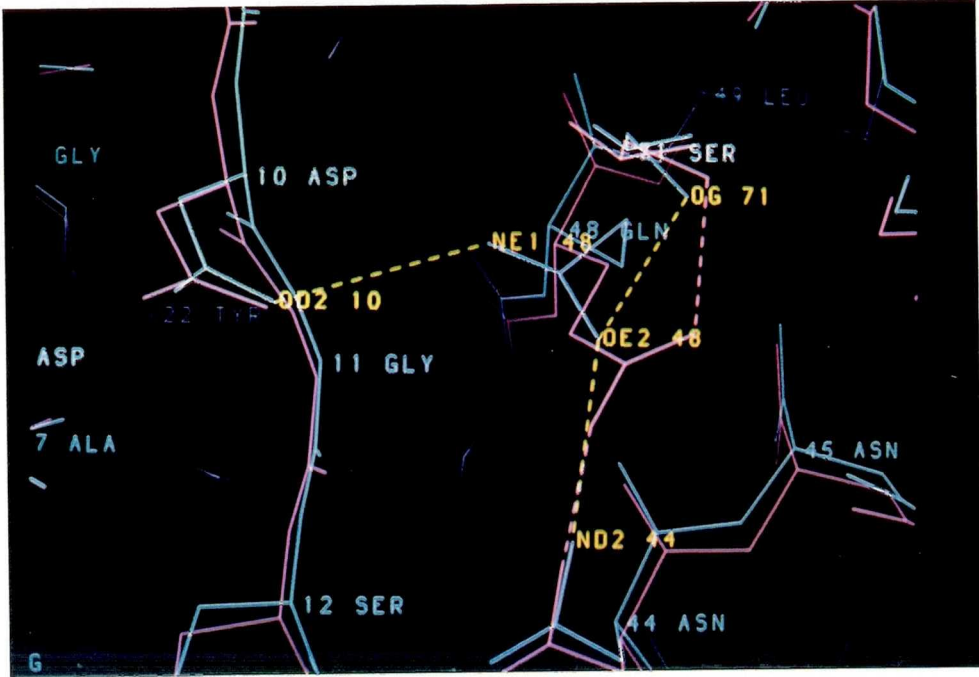


図20 RNase H E48Q 変異体の活性部位近傍の構造変化（我々の得た野生型の構造を初期構造として、北大の田中研究室で解析された結果）。青色の骨格が E48Q 変異体の構造で、赤色が野生型の構造である。置換導入された Gln 48 のアミド基が、Asp 10のカルボキシル基に近づき、新たな水素結合が形成された。双方の主鎖も局所的に内側にシフトしている。また両隣にある Ser 71 や Asn 44 との水素結合の仕方に変化し、Gln 48 では3つの隣接するアミノ酸側鎖に支えられている。

と Glu 48 との水素結合のしかたも変化した。

以上、大腸菌 RNase H の3つの活性部位変異体について、それぞれの立体構造を決定した。それらの構造を見ると、いずれも全体のフォールディングは変わらず、 Mg^{2+} 近傍にあるアミノ酸側鎖のみ、そのコンフォメーションが変化した。置換導入された Gln や Asn の側鎖は Asp 10 のカルボキシル基に近づいており、野生型の大腸菌 RNase H では、反発しあってバランスを保っていた Mg^{2+} 部位近辺のこれらの酸性アミノ酸残基が、その1つの電荷がなくなることで、場のバランスが崩れたものと考えられる。これらの側鎖の構造変化は、 Mg^{2+} と酸性アミノ酸残基の静電的結合力を減少させ、酵素活性を失わせたのだらうと思われる。さらに、これらの結果は、RNase H の機能に対する Mg^{2+} の役割を暗示している。つまり、野生型では、 Mg^{2+} が近づくと、負の電荷が相殺されるため側鎖間の反発力が減少し、側鎖の変位が生ずるものと予想される。もし、前述のアミノ酸変異が導入されれば、このような活性にとって不都合な変位が生ずることが予想される。1つのアミノ酸残基の負電荷が失われると、 Mg^{2+} 結合の際にカルボキシル基のコンフォメーションを、触媒活性に対し、安定な状態から不安定な状態にしてしまうかも知れないからである。

また、3つの場合のいずれも、アミドの導入により、Asp 10 の側鎖が新たな水素結合をつくり、固定されていることがわかった。前章で述べたように Mg^{2+} が導入された際に配位し得るのが Asp 10 のカルボキシル基と Gly 11 の主鎖カルボニルであるが、この Asp 10 側鎖が固定されることは興味がある。つまり、 Mg^{2+} との結合に関連づけて考えると、アミノ酸置換により、酵素- Mg^{2+} -基質の連結が起こりにくい構造になってしまったものとも考えられる。事実、変異体の1つ D70N では Mg^{2+} 結合能が無くなってしまっていることがNMRで確認されている (Oda ら、私信)。

第3節 2つの非同型な結晶中での構造の比較

- His 124 近傍のループの柔軟性 -

前述したように、D70N 変異体の格子定数は野生型のものとは a 軸が 5 % も異なり明らかに非同型な回折パターンが観測された。

前節で述べたように、全体のフォールディングは D70N と野生型では変わらなかった。しかし、もう少し詳細にみると、電子密度の認識しにくい N, C 末端部を別にすれば、唯一明確に構造の異なる部分は Val 121 から Glu 129 までのループである。この構造の差異は、ループ部分の中央部に属する His 124 の側鎖方向が、2 個の構造間でほぼ反対方向を向いていることから明らかである (図 21-1、2、3)。すなわち、野生型の構造では His 124 は分子の外側つまり溶媒側を向いているのに対して、D70N では、この残基は分子内部を向き、 Mg^{2+} 結合部位を形成している残基の 1 つである Asp 70 (この変異体では Asn 70) に、約 4 Å の距離にまで近づいている。さらに興味深いことは、この D70N 変異体と同じ格子定数である Yang ら (1990) の解析した野生型の大腸菌 RNase H の His 124 も、ほぼ同じ構造をとっていることである。したがってこの His 124 付近のループは、結晶内で分子間相互作用の影響を受けやすいという点で柔軟であると言える。

Kanaya ら (1990b) による部位特異的変異法の結果では、この His 124 は、アミノ酸置換すると比活性が 2.5% と小さな値まで落ちるが、しかし完全にはなくなるため、活性必須な残基とはいえなかった。すなわち His124 は、 Mg^{2+} 部位 (内側) を向くと RNase H の活性を補助的に促進させるはたらきをもつが、溶液状態では、内側と外側を向くという、両方の状態を取っており、そういうゆらぎの大きい状態ではいつも促進機能を果たしているとは限らないと考えられる。次章で詳しく述べるが、この His 124 は DNA/RNA ハイブリッド結合モデルにおいては、分子の外側を向くと核酸のリン酸基と作用できる部分にある。したがって、現在までの RNase H の構造解析からは、触媒活性に直接関与しないまでも、基質との結

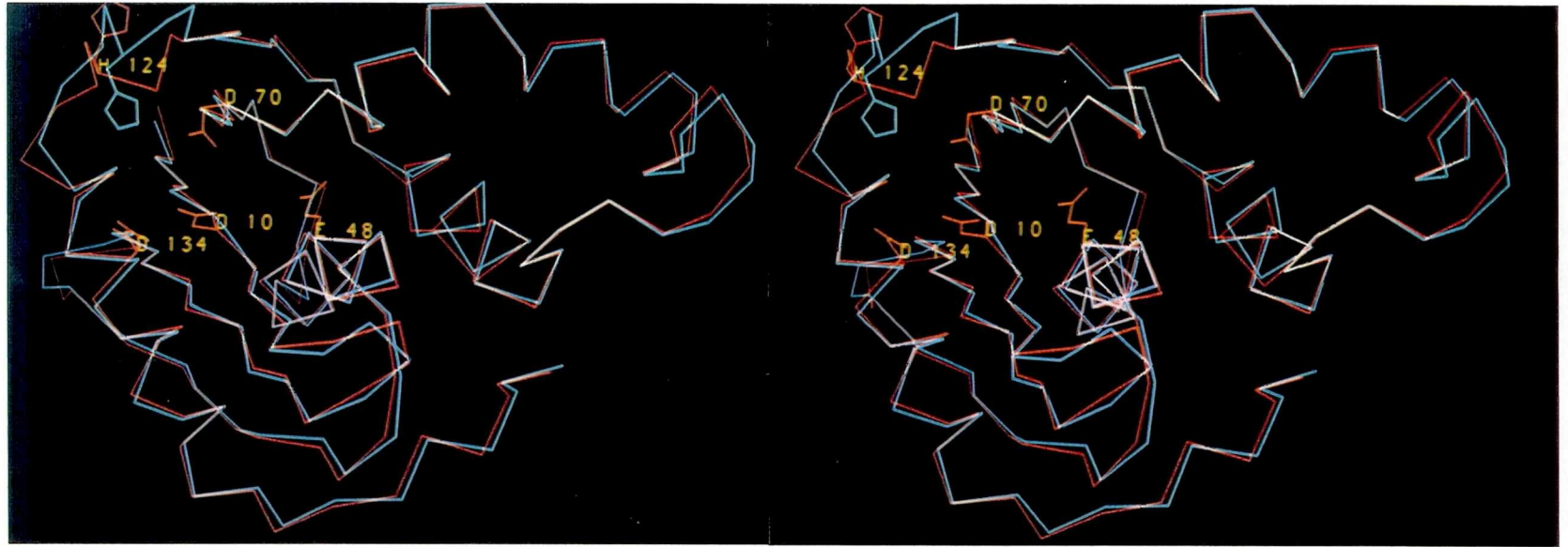


図21-1 RNase H の野生型と D70N 変異体の全体構造の比較。図に示すのはC α 原子のみで、それぞれの主鎖原子を用いて重ね合わせを行った後のものである。青色が D70N 変異体、赤色が野生型である。変異体 D70N で明瞭に認識されないN末端とC末端の残基は比較から省いた。His 124 付近のループ約10残基分に構造の違いがみられる。なお活性中心を示すため、野生型の構造にのみ Asp 10、Glu 48、Asp 70、Asp 134 の4つの酸性アミノ酸残基の側鎖を示した。

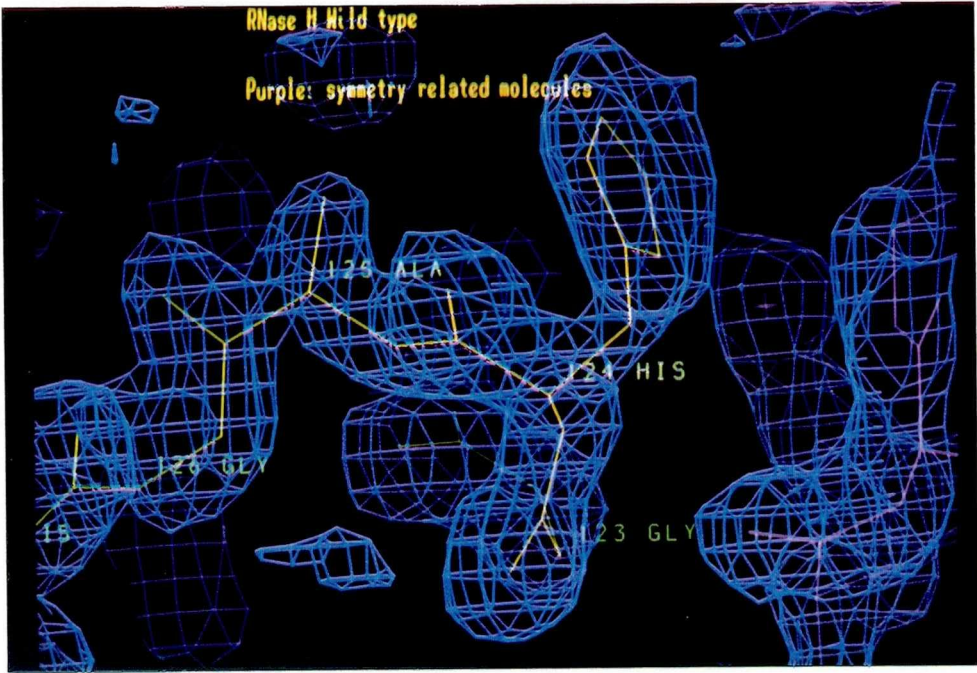


図21-2 野生型 RNase H の His 124 付近のループの電子密度図。MIRより得た初期位相による電子密度図では認識しにくかったが、最終構造による電子密度図では各側鎖とも明瞭に認識できる。紫色の骨格は対称な隣接分子を示す。



図21-3 D70N 変異体の His 124 付近のループの電子密度図。黄色の骨格がD70N 変異体で、赤色の骨格が野生型の構造である。この His 124 の側鎖の位置は、この D70N と同型である Yang ら (1990) の野生型の場合と一致した。

合に 何らかの重要な役割を果たすことは、十分考えられる。なお、Davies ら (1991) により解析された、活性を持たない HIV-1 RNase H ドメインでは、この近辺のループはゆらぎが大きく構造は決められていない。

第3章 活性中心と核酸結合部位の同定

第1節 DNase I との比較

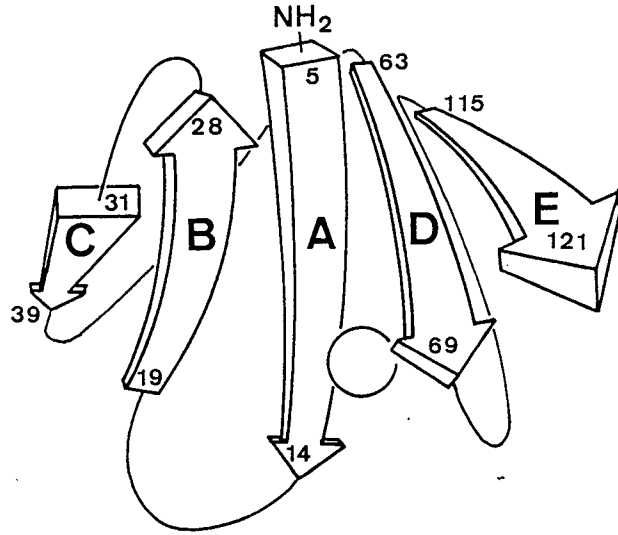
我々は、大腸菌 RNase H の立体構造を、すでに立体構造の解明されているリボヌクレアーゼ、すなわち RNase A や、RNase T₁、barnase および staphylococcal nuclease などとの構造比較を試みたが、類似性を見いだすことができなかった。これらのリボヌクレアーゼは単鎖のRNAを基質としている点で、RNase H の活性とは明確に異なっている。

RNase H が、2重ラセンの核酸を基質としていること、核酸の塩基配列に対しそれほど基質特異性のないこと、活性に金属イオンを必要とすることを考えあわせれば、前述のリボヌクレアーゼよりも、すい臓由来の deoxyribonuclease I (DNase I) との類似性が高く、構造比較により 有用な知見が得られるかも知れない。しかも、DNase I については、基質であるDNA 2重鎖(14-mer)との複合体との結晶構造がわかっている。

DNase I は、257 個のアミノ酸残基からなる、単一ポリペプチド鎖の酵素であるが、立体構造上からは擬対称の2回軸で対応づけられる2個のドメインより構成される分子である。我々は、この酵素と RNase H の立体構造を比較した結果、それぞれの酵素分子のβシート・モチーフと活性金属との位置関係に1つの共通性を見いだすことができた。

図22に RNase H と DNase I のβシートの構造を比較した結果を示す。DNase I は、1つの活性金属であるCa²⁺が、擬対称で関係づけられる2枚のβシートに挟まれる構造になっており、この図ではそのβシートを開いて2段に示した。したがって、上下2段に見られる白丸は1個のCa²⁺を示す球である。RNase H の方の白丸はMg²⁺の位置を示している。なお、DNase I の残基番号の定義は Oefner と Suck

RNase H



DNase I

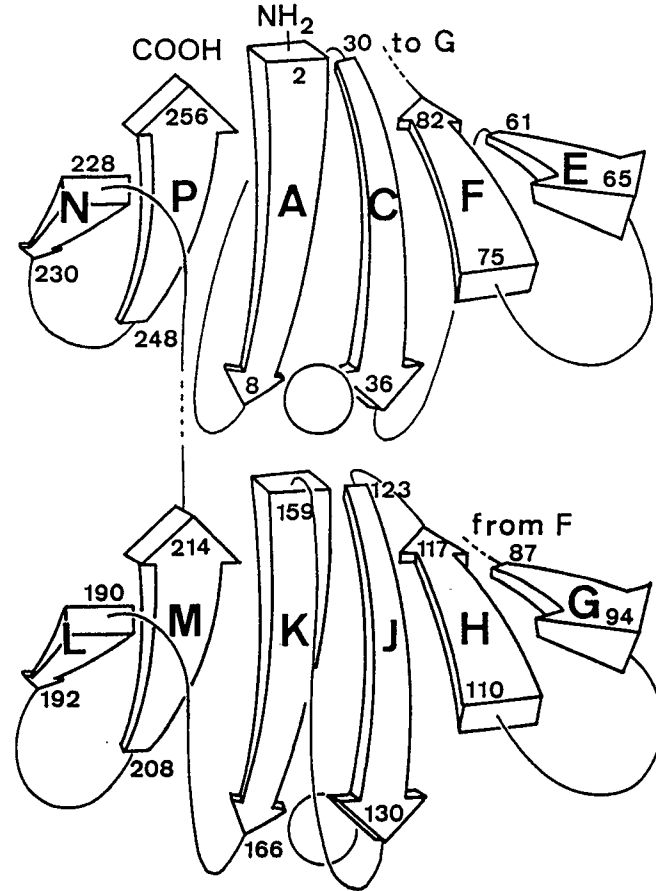


図22 RNase H と DNase I のβシート・モチーフの比較。

(1986) の *J. Mol. Biol.* 605. p616 Fig. 9 によった。

この図において、それぞれ左から1から4番目の β 鎖の方向の順序に注目すると、RNase H の C B A D と、DNase I の N P A C または L M K J の方向の順序が同一である。また、 β シートとしてのねじれの方向も同一である。活性金属と β シートの位置関係については、いずれも左から3番目と4番目の β 鎖のカルボキシル末端側と左から2番目の β 鎖のアミノ末端近傍に位置する。すなわち、RNase H ではA鎖とD鎖のカルボキシル末端側およびB鎖のアミノ末端側であり、DNase I ではA鎖とC鎖、あるいはK鎖とJ鎖のカルボキシル末端側、およびP鎖あるいはM鎖のアミノ末端近傍に活性金属が位置している。またいずれの酵素の場合も、 β 鎖を構成しているアミノ酸残基の数は、おおよそ7から10個である。

DNase I と DNA 2重鎖の複合体の結晶構造では、DNA 2重鎖は β シートにほぼ垂直に結合しており、RNase H の場合も、これと同様な様式で DNA/RNA ハイブリッドと結合するものと予想される。

また Suck ら (1986) によって予想された、DNase I の加水分解反応のメカニズムを図23-1に示した。このモデルは、活性に必須な His 131 によって活性化された水分子が、 Ca^{2+} と結合しているリン酸基を求核攻撃して切断すると、説明している。この機構を われわれの決定した RNase H の立体構造と Mg^{2+} 結合位置に適用したものが、図23-2である。このモデルに現れる3つのカルボキシル側鎖は、活性に必須な Asp 10、Glu 48、Asp 70 のもので、現在の立体構造からは、 Mg^{2+} に直接結合しているのが Asp 10 で、Glu 48 と Asp 70 は求核攻撃する水分子の活性化をするか、電荷リレー系で電子の受容体になるものと考えられる。

RNase H の場合、5個のヒスチジン残基のうち 活性部位に最も近い His 124 でも、 Mg^{2+} 位置から11Åも離れており、またこの残基のアラニン変異体では比活性が2.5%残ることから必須であるとはいえないため、この RNase H の His 124 を、DNase I のモデルのヒスチジンにあてはめることはできない。

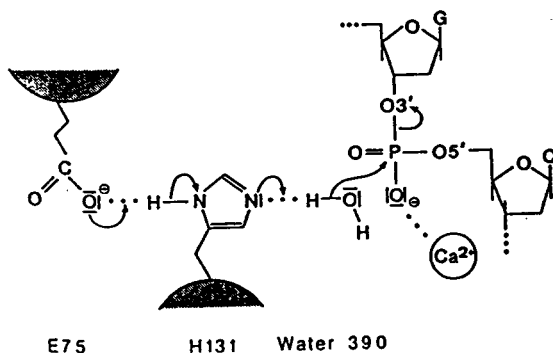


図23-1 Suck ら (1986) により提唱された DNase I の加水分解反応のメカニズム。活性に必須な His 131 に活性化された水分子が、リン酸を求核攻撃する。

Glu 48 or Asp 70

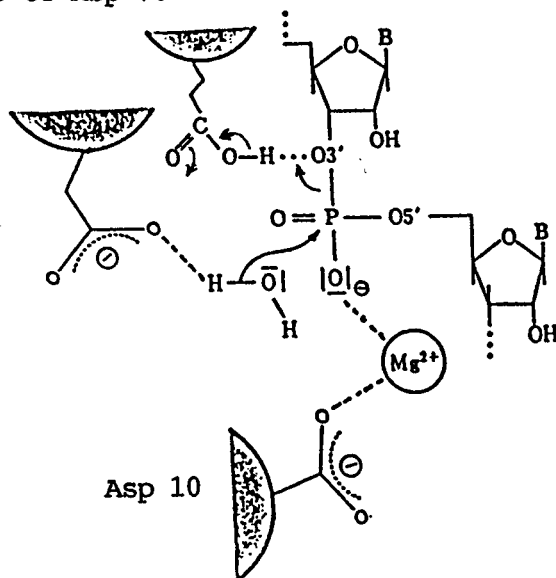


図23-2 我々の得た RNase H の立体構造をもとに推定される RNase H の加水分解反応のメカニズム。Mg²⁺に直接配位するのが Asp 10 で、Glu 48 と Asp 70 が水分子を介してリン酸を切断すると考えられる。His 124 は、H124A の比活性が 2.5 % 残り、活性に重要な影響を与えるが、活性に必須な残基とは言い切れないため、このモデルには入れていない。立体構造上からは、Mg²⁺位置から約11Å離れているが、His 124 が活性に重要な影響が与えられるのは、この残基の属しているループが、結晶のパッキングが変わるとコンフォメーションが変わるくらい柔軟性の高いもので、それによって活性部位に近づき得るためと考えられる。

第2節 HIV-1 RNase H との比較（金属結合部位）

一方では、Yang ら（1990）は、RNase H と DNA polymerase I（Derbyshire ら、1988； Freemont ら、1988）の活性部位の環境の立体構造に基づき、この酵素には、 Mg^{2+} が同時に占有する2つの別々の金属サイトが存在する可能性を強調している。

最近、Davies ら（1991）はHIV-1 逆転写酵素の RNase H ドメインの2.4Å 分解能における結晶構造を発表した。さらに、彼らはその酵素の Mn^{2+} 結合部位も同定しているが、45 mM の $MnCl_2$ 水溶液に浸漬した結晶と native 結晶の回折データから差のフーリエを計算した結果、同じ領域に2つの Mn^{2+} イオンがみられた。彼らは、金属サイトが1つであるという我々の結果との違いについて、両者の結晶のパッキングの違いによって説明されると考えている。我々の結果からは、大腸菌 RNase H の Mg^{2+} 結合部位には、2つの金属イオンが入るだけの十分な空間はある。しかし、彼らの論文によれば、Asp 549（大腸菌 RNase H では Asp 134 に相当）に隣接する第2の金属サイトは、第1の金属サイトに比べてその占有率が小さい。大腸菌 RNase H の場合、最高でも10mM 濃度のアルカリ土類金属のイオンを含む水溶液中で浸漬したのに対し、HIV-1 RNase H の場合は、遷移金属である Mn^{2+} をしかも 45mM という高い濃度条件下で浸漬している。アルカリ土類金属より配位結合を形成する傾向の強い Mn^{2+} を、しかも 45mM という高い濃度で浸漬したことが、この第2の金属サイトを形成させた、とも解釈できる。さらには、大腸菌 RNase H の Asp 134 は、HIV-1 RNase H では 第2の Mn^{2+} 位置に隣接するAsp 549 に相当するが、この大腸菌 RNase H の Asp 134 を、Asn に置換しても大きな活性の減少はみられず、比活性で 90 %も残っている（Kanaya ら 1990b）。このアミノ酸置換により負の電荷が喪失しても、活性にはほとんど影響がないことから、この第2の金属結合部位が活性に必須のものであるとは考えにくい。以上から大腸菌 RNase H の活性には、1分子に対して 1個の Mg^{2+} サイトが必須である、と考えた方が良

さそうである。大腸菌 RNase H に結合した Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} が単一の結合部位しか持たないことは、NMR スペクトル変化の Hill plots から、裏付けられている (Oda ら、1991)。

我々が同定した Mg^{2+} 結合部位は、DNA/RNA ハイブリッドが結合していない状態のものであり、現在の Mg^{2+} 部位近傍の環境は、核酸が存在しているときの影響を必ずしも反映しているわけではない。加水分解の際には、ポリヌクレオチド主鎖のリン酸部が Mg^{2+} の配位に加わるものと、我々は仮定している。しかしながら、核酸のない状態での結晶形では隣接分子の Lys 86、Lys 87、Arg 88 という塩基性に富んだループが酸性アミノ酸残基の集まっている空のサイトにイオン性の相互作用によりはまりこんだ状態になっている (図14)。このような Mg^{2+} 部位と隣の分子の塩基性ループとの接触状態が、ある種の金属を高濃度で導入した際に、約 2 Å の格子定数の変化が起こる理由と考えられる。おそらくこの電荷による結晶内の分子間の相互作用が、Yang ら (1991) が議論している I 型から II 型への結晶の相転移に関係しているものと思われる。

RNase H と DNA/RNA ハイブリッド・合成オリゴマーとの、NMR による結合実験 (Oda ら、私信) から、我々の同定した Mg^{2+} 結合部位は正しいことが裏付けられた。さらに、Kanaya ら (1990b) による、部位特異的変異の実験から、 Mg^{2+} 結合部位近傍の酸性アミノ酸残基のうち、3 つ (Asp 10、Glu 48、Asp 70) が触媒活性に必須であることが示されている。

第3節 静電ポテンシャルの分布

RNase H の基質であり、DNA-A 型に類似した構造を持つ DNA/RNA ハイブリッド 2 重鎖は、酸性のリン酸骨格が表面に露出している。この核酸との結合のためには塩基性の酵素表面が必要であり、さらに金属イオンが活性に関与する場合は、それを仲介して核酸に結合するため、酸性の分子表面も必要となる。

RNase H の場合には、 Mg^{2+} が活性に必要なことから、正負両方の電荷について、それぞれ極在化している部分が必要である。このような予想をもとに、我々のX線構造解析で得た立体構造を用いて、Nakamura & Nishida (1987)の方法により静電ポテンシャルを計算し、それを solvent accessible surface 上に色分けして表示したものを図24に示した。ここで、赤色は $-0.1V$ より低い負の部分を示し、青色は $+0.1V$ より高い正の部分を示す。他の色は、 $-0.1V$ から $0.1V$ までのあいだに属し、赤色から青色へと順次遷移していくように示されている。ここで、中性の $0V$ レベルは黄色で示される。なお、大腸菌 RNase H の示適pHは 8.0 であるため、静電ポテンシャルの計算に際しては、ヒスチジン残基はプロトン化していないものとして計算してある。

RNase H 分子にはDNA-A型の立体構造にうまくフィットするような、円筒形の大きなくぼみがある。図24ではこのくぼみが図の下側から図の前方に上ってくるように表示してある。図からも明瞭なように、このくぼみの下半分には負に帯電した領域が、またこのくぼみの上半分には正に帯電した領域がそれぞれ存在している。これらの領域はそれぞれさきに述べた、 Mg^{2+} 結合領域と塩基性の突出部に相当する。疎水性の残基が分子表面に露出している部分は、ほとんど中性の黄色で示されている。このように、静電ポテンシャルの分布のみからでも、基質であるDNA/RNA 2重鎖と結合する領域は、かなり明瞭に予測することができた。

また、RNase H には、5本の α ヘリックスがあるが、 α ヘリックスは双極子を持ち、そのN末端は正になっている。RNase H では、ヘリックス αI 、 αIV 、 αV のN末端側は、すべて、このくぼみの方を向いている(αII と αIII はくぼみの上にある)。多くの核酸結合蛋白質で、 α ヘリックスの双極子とリン酸基の負の電荷との相互作用が基質との結合の要因になっており、RNase H のヘリックスの構造もこれに適合するものと予測される。

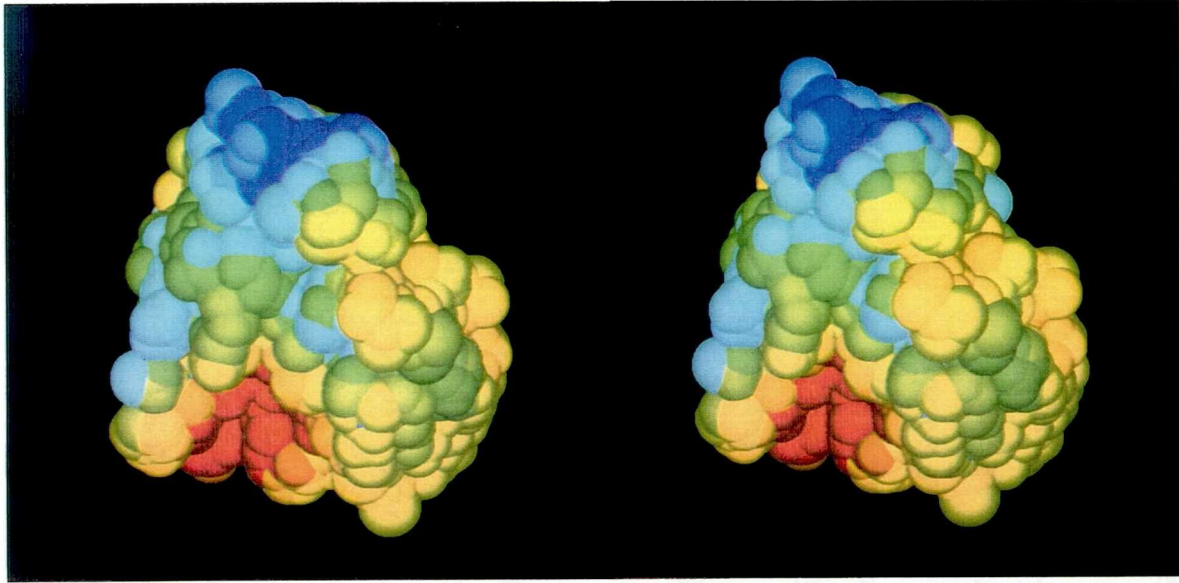


図24 RNase H 分子の solvent accessible surface 上の静電ポテンシャルの分布。
赤色が-0.1V、青色が+0.1V、黄色が中性である。その他は補間して配色した。手
前上部の塩基性突出部と下側の奥のMg²⁺結合部位が明瞭に見える。

第4節 核酸認識部位

前節で述べたように、RNase H の分子表面には、DNA/RNA ハイブリッド 2 重鎖の外径にうまくフィットするようなくぼみがあり、このくぼみの両端に Mg^{2+} 結合部位と塩基性の突出部位とが存在する。全体的にはまっすぐな円筒形の DNA/RNA ハイブリッドが、この2つを結ぶ線に沿って結合するものと思われる。この推定は、RNase H 分子表面上の静電ポテンシャルの分布と、一連の部位特異的変異体の実験結果から導かれる。このようにして、予想された認識部位をもとに構築した大腸菌 RNase H と DNA/RNA ハイブリッド 2 重鎖との結合モデルの模式図を図25に示す。この仮想的な結合様式は、すでに立体構造解析された すい臓の DNase I と DNA 2 重鎖複合体の結合様式と類似性がある (Suck ら、1984; Suck & Oefner、1986; Oefner & Suck、1986; Suck ら、1988)。さらに2つのヌクレアーゼ間の β シートモチーフの構造、とくに金属結合部位との関係には類似性がある。

図26に RNase H と 21-mer の DNA/RNA ハイブリッド 2 重鎖とで構築した複合体モデルをグラフィックス上で示した。ここで DNA/RNA 2 重鎖の構造として Arnott ら (1986) により、X線繊維回折の結果から導かれたものを用いている。まず、大腸菌 RNase H と DNA/RNA ハイブリッド、それぞれの単独な構造をグラフィックス上で操作しながら噛み合わせる。ついで、それらの主鎖原子を固定し、プログラム AMBER (Weiner ら、1986) による力場計算を用いて、接触の良くない側鎖のコンフォメーションをエネルギー最小化により適合させた。現在の複合体モデルでは DNA 鎖は C2'-endo-puckered furanose 環に、RNA 鎖は C3'-endo-puckered furanose 環に、それぞれなっている。なお、溶液の状態と塩基配列によっては、DNA 鎖も RNA 鎖も、C3'-endo-puckered furanose 環をとっているという報告もある (Wang ら、1982)。また、ハイブリッド 2 重鎖として、A型 DNA の構造を用いても複合体モデルを構築したが、以下に述べる認識部位の詳細な特徴は、本質的には変わらない。

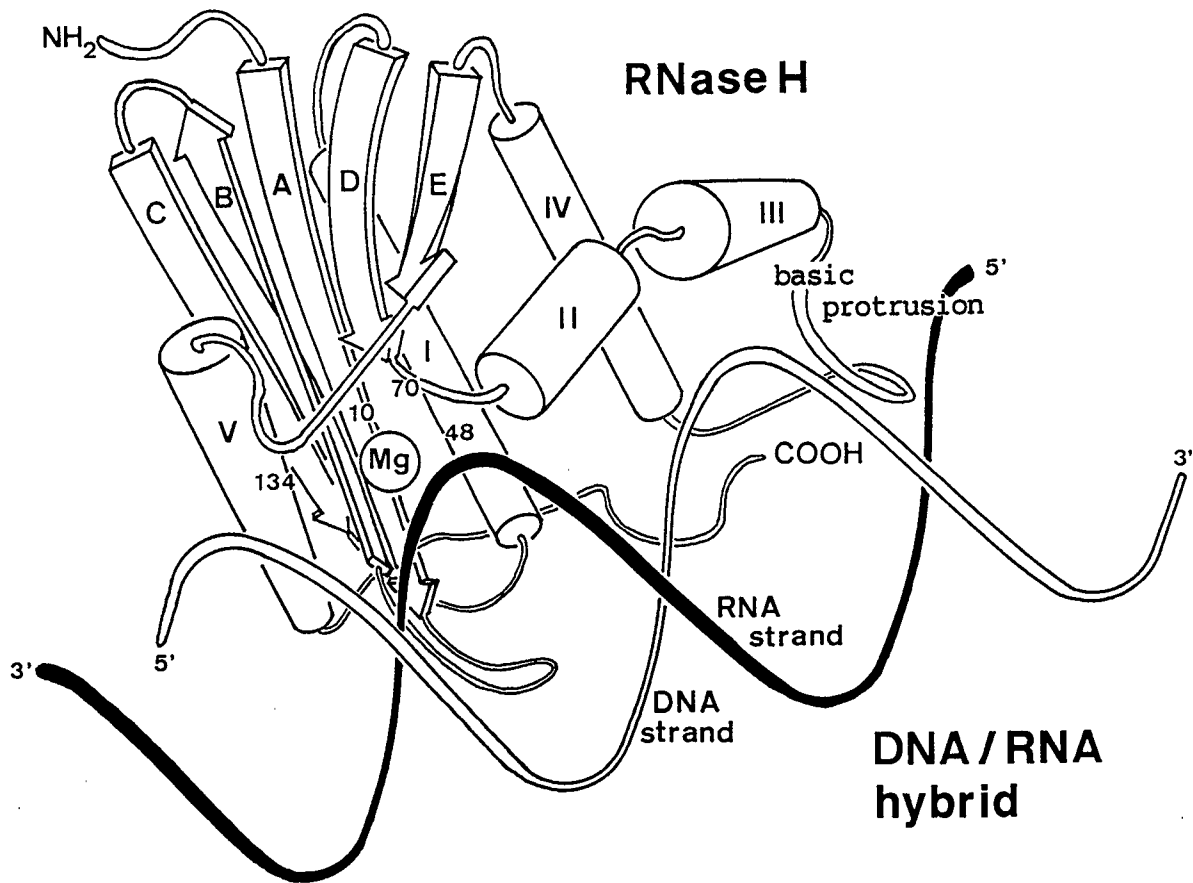


図25 RNase H と DNA/RNA ハイブリッドの結合を予想した模式図。核酸の方向を逆にした場合、2重鎖を大きく歪ませないとうまくドッキングできない。NMRの核酸結合の実験からは、この図にみられる接触面に多くの化学シフトが観測された (Nakamuraら、1991b)。

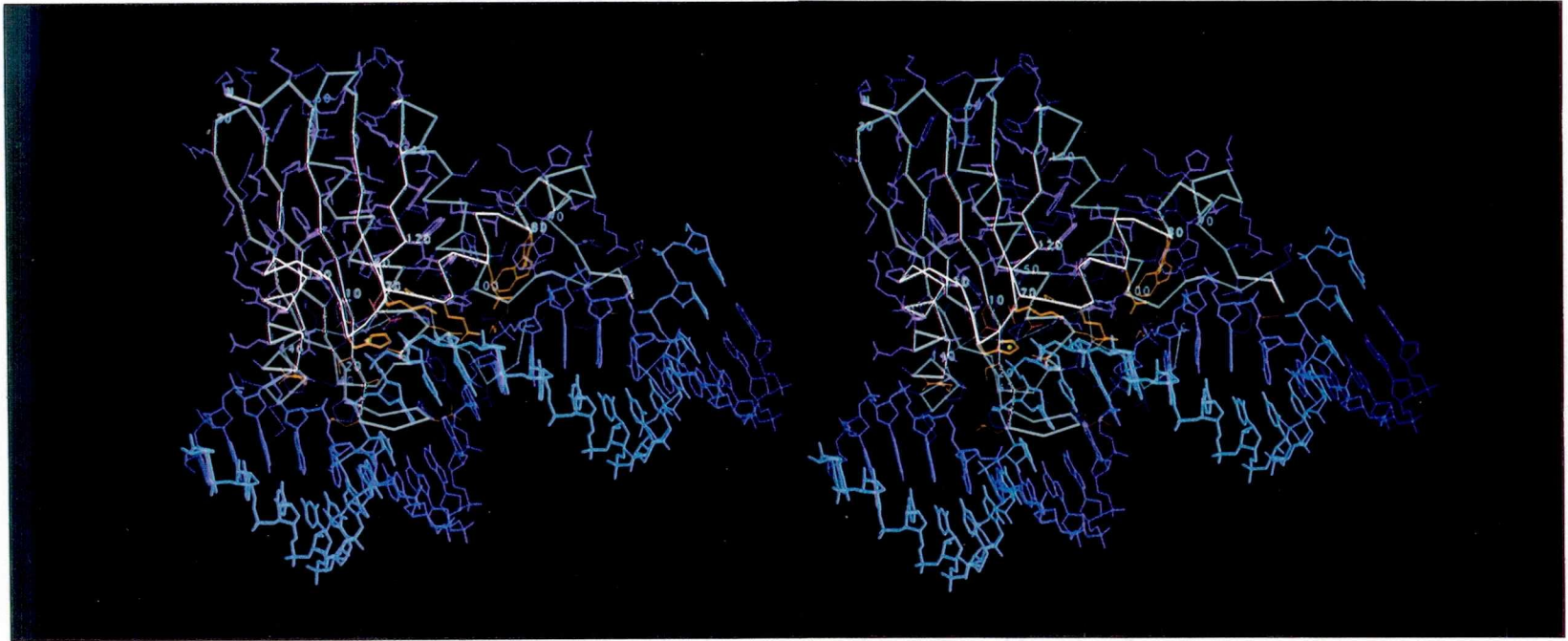


図26 RNase H と DNA/RNA ハイブリッド21-mer との結合予想図。この2つの構造のドッキングの際、RNase H の側鎖は衝突を避けるようエネルギー的に最適化されている(Nakamuraら、1991b)。活性残基の側鎖は赤色で、本文中で議論されている側鎖は橙色で、その他の側鎖は紫色で示した。

この仮想的な複合体モデルに基づく核酸認識部位の正しさは、最近、 ^1N と ^{15}N を用いたNMRの実験から裏付けられた。この実験は、RNase H 水溶液中に DNA/RNA ハイブリッド（合成オリゴマー）を混合させ、化学シフトの変化を調べたもので（Nakamura ら、1991b）、化学シフトの大きなアミノ酸残基が、この結合モデルの周囲に集中して観測された。また、Yang ら（1990）も我々とは独立に、この酵素と核酸のドッキングモデルを発表しているが、いずれの結合様式も本質的には同じである。

現在の1.48Å分解能で精密化された立体構造では、酵素と DNA/RNA ハイブリッドとの結合について、さらに詳細に考察することができる。まず、 Mg^{2+} 結合部位近傍には、グリシンに非常に富んだ領域がある。この領域のアミノ鎖配列は、G11-S12-C13-L14-G15-N16-P17-G18-P19-G20-G21-Y22-G23 であり、 βA と βB との間の長い、柔軟なループを形成している。このループが DNA/RNA ハイブリッドとの結合に関与していることはNMRの測定結果から裏付けられている。現在の精密化された立体構造においては、このループは、その内側にある Cys 13 の S_γH が Gly 15 と Gly 18 の主鎖カルボニル酸素と水素結合を形成することによって、構造が安定化されている。Kanaya ら（1991b）は、我々の立体構造をもとにジスルフィドの導入可能な残基を探索し、Cys 13 近傍に存在している Asn 44 をシステイン残基に置換した変異体をつくり、その結果、人工的なジスルフィド結合が導入された。新たなジスルフィド基の形成により酵素活性は大きく減少したが、これはこのループの僅かなコンフォメーション変化が起きたり、あるいはこのループの柔軟性が失われたため、DNA/RNA ハイブリッドとの結合が妨害されたものと考えられる。また、Walker ら（1982）は多くの核酸結合蛋白質にグリシンの豊富な領域があることを見いだしており、この事実は RNase H にも適用されるかもしれない。

複合体モデルを構築する際、まず、RNA鎖骨格の切断結合を Mg^{2+} 結合部位に固定した。RNA鎖上で切断部位から5'側へ隣にあるリン酸は、 αII のN末端側に

ある Ser 71 と Gln 72 の主鎖原子に接近している。また RNA 鎖上で切断部位から 5' 側へ 2 ヌクレオチド分離れたリン酸は、Lys 122 のアミノ基と Asn 44 のアミド基に近い。さらに 3' 側では、切断部位の 3' 側の近傍にある RNA 骨格は、グリシンの豊富な柔軟ループ (Gly 11-Gly 23) 上に存在する、Ser 12、Cys 13、Leu 14 および Gly 15 に近づいている。

この複合体モデルにおいては塩基性の突出部は主に RNA 鎖と相互作用している。切断部位から 5' 側に 10 ヌクレオチド分だけ離れた RNA 鎖のリン酸は、Asp 94 主鎖のイミノ基に面している。また、いくつかの塩基性のアミノ酸側鎖は、静電的に RNA 骨格と作用でき得る位置に存在する。

一方、DNA 鎖のほうであるが、まず切断部位と塩基対をつくっている部分は、グリシン豊富な領域にある Asn 16 や、 α I の Asn 45、および塩基性の突出部の末端部の Lys 99 に近づいている。また、そのさらに 3' 側で、DNA 鎖は α II と α III の間の折れ曲がり付近にある Gln 76、Gln 80、および Trp 81 の側鎖と相互作用している。Lys 122 の近傍の His 124 は、主溝側から DNA 骨格に近づき、また α V 上の Arg 138 は、その His 124 と作用しているリン酸から 5' 側へ 2 ヌクレオチド分離れたリン酸と作用している。以上の様に、ヘリックス α V から塩基性の突出部までの認識部位を完全にカバーするには、DNA/RNA ハイブリッド 2 重鎖の長さは、約 2 巻き分が必要である。

Cys 13、Asn 16、Asn 44、Asn 45 および Gln72 を、それぞれアラニンにアミノ酸置換すると、基質に対する親和性が低下している (Nakamuraら、1991b)。さらに、Lys 122 を Asn に、His 124 を Ala に、Arg 138 を Cys にアミノ酸置換すると、野生型に対する比活性は、それぞれ、25 %、2.5 %、60 %に低下した (Kanaya ら、未発表)。これらの実験事実は、この複合体モデルの正当性を裏付けている。

我々は現在まで、さまざまなオリゴヌクレオチドを用いて、浸漬法や共結晶化法を行い、差フーリエ図上で、直接、結合した基質の電子密度を求めようとしてきた。

しかしながら、現在のところこれらの実験はうまく行かず、基質の確実な電子密度は同定されていない。(d)のところで述べたように、 Mg^{2+} 結合部位が隣接分子の塩基性の突出部に埋められていることが、オリゴヌクレオチドの Mg^{2+} 部位に近づくのを妨げているようである。もう1つの問題として、導入しようとしているオリゴヌクレオチドの RNase H の認識部位に対する親和性は、かなり小さいことが予想される。この予想は、溶液状態でオリゴヌクレオチドの酵素に対する親和性が小さいことを示す NMR の実験結果と一致する。複合体の形成のためには、先述したようにかなり長い DNA/RNA ハイブリッド 2 重鎖が必要なものと思われる。

結 論

1. 大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造をX線構造解析により決定し、1.48 Å分解能の精密な立体構造を得た。この構造決定は、RNase H の機能および性質を改変するための基礎的な知見を与えた。
2. この酵素の触媒活性に必須な Mg^{2+} の結合部位を同定した。これにより、触媒活性に関与するアミノ酸残基の位置関係が明らかにされた。また、これらの残基が逆転写酵素 RNase H 様ドメインにおいて、1次構造上 完全に保存されている生物学的意義が明らかとなった。
3. 活性アミノ酸残基 (Asp 10、Glu 48、Asp 70) を置換した3種類の変異体について、それぞれの立体構造を決定し、それらの機能と構造の関係について論じた。

謝 辞

本研究を始める機会を賜り、終始励まして頂いた大阪大学薬学部 池原森男 名誉教授に感謝いたします。また本研究に際し終始一貫して有益なご討論やご助言を賜りました、蛋白工学研究所 森川耿右 第一研究部部長に感謝いたします。

研究に際し有益なご助言を賜りました、蛋白工学研究所 松島正明 第一研究部主席研究員、Arno Pähler博士（現 大正製薬）、ならびに 三菱化成総合研究所 松崎尹雄 部長研究員に感謝いたします。

大腸菌RNase H の試料を提供して頂いた、蛋白工学研究所 金谷茂則 第四研究部主席研究員、モデリングやコンピュータグラフィックスでご討論頂いた、中村春木 第二研究部部長に感謝いたします。また、結晶化をして頂いた、第一研究部・宮川麻由子（現 三菱化成）、石川桃代、有吉真理子、奥村美香の各研究員、FASTの使用に際し便宜を図って頂いた第一研究部・団野真紀研究員、ディスタンスマップを求めて頂いた第五研究部・藤博幸博士、NMRのデータをもとにご討論頂いた第二研究部・小田康司博士、プログラムの使用に際し便宜を図って頂いた第一研究部・清水敏之研究員に感謝いたします。

研究に際し、ご助言、ご助力、ご支援して下さいました蛋白工学研究所第一研究部のみなさまに感謝いたします。

最後に、本論文をまとめるにあたり、有益なご討論を賜りました、大阪大学薬学部 富田研一 教授に感謝いたします。

実験の部

第1章の実験

第1節 RNase H の結晶

大腸菌 RNase H の至適 pH は 8.0 であるが、pH 9.0 以上で溶解度が急激に下がる性質があり、これを利用して結晶化された (Kanayaら、1989)。20 °Cにおいて、pH 9.0 のトリス緩衝液中より生じた微結晶を連続的に seed することにより、大きさが $0.7 \times 0.7 \times 0.4 \text{mm}$ の正

方両錐形の結晶が、比較的容易に得られる。4軸型回折計CAD4 (Enraf-Nonius) により決定した結晶学的データを表7に示す。また Matthews (1968) の式により得られる V_m は 1.94 であり、蛋白質結晶に含まれる溶媒水の割合は 37% で、また非対称単位に 1分子をふくむ。この結晶は 1.5Å 分解能を越える範囲までX線を回折し、高分解能の解析に適した結晶であった。

なお、第2章でも触れるが、Yang ら (1990) が解析に用いた RNase H の結晶は、我々が解析に用いたものより a軸の格子定数が、約 2Å 短いものであった (表14)。彼らの結晶化条件は我々と異なり、結晶化の際の沈澱剤として硫酸アンモニウムを用いたため、非同型の結晶が得られたものと考えられる。また、我々の条件でも、重原子置換体の探索の際や、変異体の結晶化の際には彼らの格子定数と同型の結晶が得られている。結局、大腸菌 RNase H の安定な結晶形は、2種類あることがわ

表7. 大腸菌 RNase H の結晶学的データ

Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
a (Å)	44.06
b (Å)	86.85
c (Å)	35.47
V (Å ³)	135,730
Z	4
V _m (Å ³ /dalton)	1.94

かったが、彼らの結晶が 1.7Å 分解能までしか観測されなかったことや、彼らと同形な結晶は高分解能側で回折データが少なかったことから、我々の結晶の方が規則性がよく、分解能が高い、より精密な構造決定ができたものとする。

第 2 節 X 線回折強度データの測定

RNase H 結晶の回折強度データの測定には、以下の 2 つの装置を用いた。

まず、native 結晶 および重原子誘導体結晶の測定のためには、4 軸型回折計 CAD 4 (Enraf-Nonius) を使用し、回折強度データの処理および補正計算には低分子解析プログラム SDP (Structure Determination Package, Enraf-Nonius) を用いた。

この際用いた X 線源は封入管式の Cu 管球で出力は 50 kV, 40 mA、またグラフィートモノクロメータにより、単色化した。回折強度は ω -scan 法で測定し、走査速度は 1-3° / 分であった。結晶と検出器の間の距離は 368 mm、測定温度は 15°C であった。結晶の X 線損傷による強度の減衰補正を行うため 1.5 時間おきに、各軸方向の標準反射を測定した。強度減衰の許容値は、強度値で測定開始時の約 20 % までとした。1 個の結晶に対し X 線照射時間は 35 から 45 時間であった。North ら (1968) の方法で吸収補正を行うため、回転軸方向の 5 個の反射についてそれぞれ ψ 角を 10° ずつ変えた反射を測定し、360° にわたる補間曲線を求めた。図 27 に吸収補正曲線の一例を示す。それぞれの結晶間のスケージングは構造解析用プログラム PROTEIN (Steigemann, 1974) を用いて行った。このためのデータとして各分解能の境界付近の約 300 個の反射を重複して測定したほか、比較的強度の大きな 4.1-3.8Å 分解能内の約 300 個の反射を共通に測定した。

native 結晶に対しては精密化を行うことを考慮して、なるべく良質の強度データを得るよう努力した。すなわち、1.48Å 分解能までの反射を 6 個の結晶を用いて強度測定をした。これらをスケージングした際の、結晶間の回折データの R_{merge}

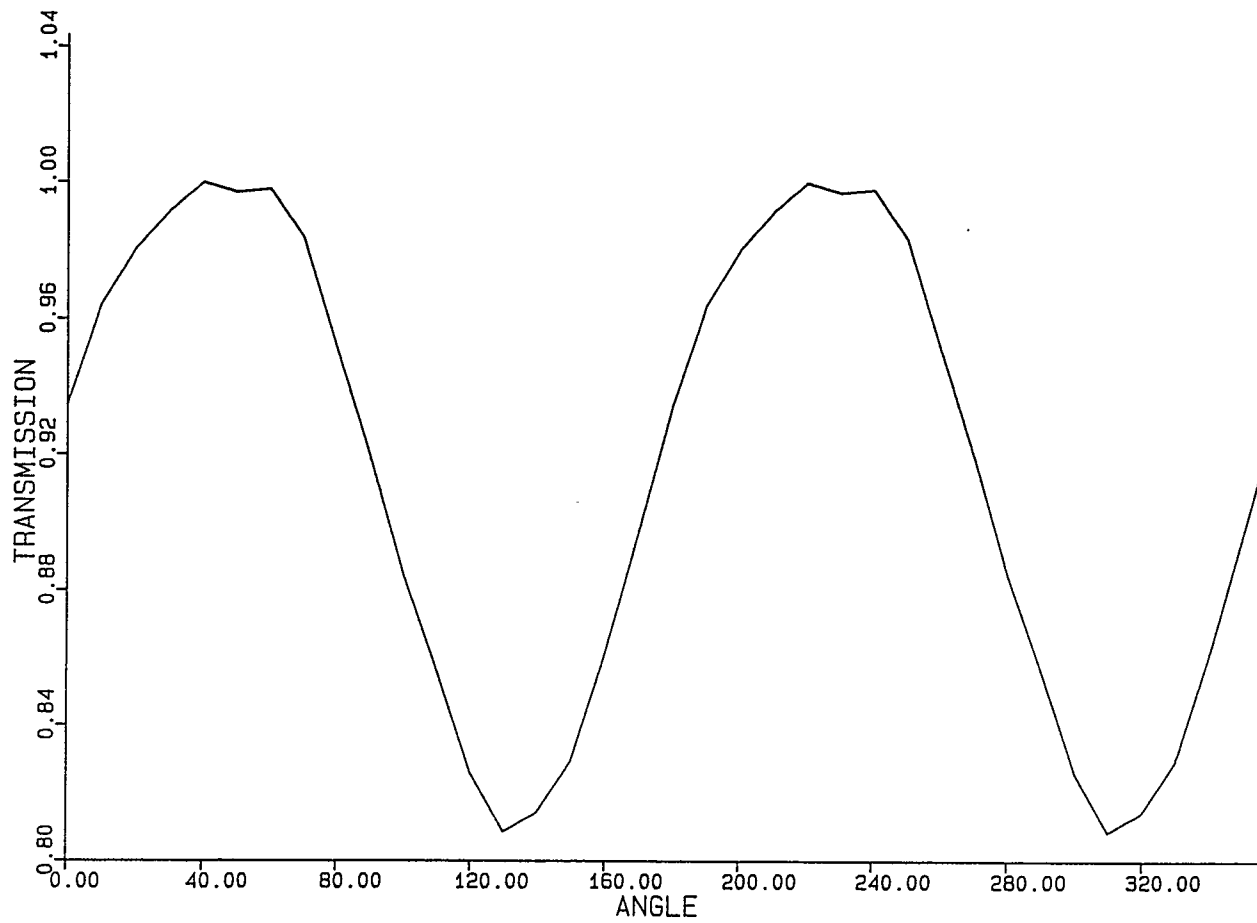


図27 吸収補正曲線の一例

は、5.76%であった。1.48 Å分解能では、測定反射数の理論値(23,254個)にたいする割合は 84.1%($F > 1\sigma(F)$), 78.0%($F > 2\sigma(F)$), 70.6%($F > 3\sigma(F)$) であった。良好な重原子誘導体を探索するために、native 結晶との isomorphous difference $\{ \Sigma (|F_{nati}| - |F_{deri}|) / \Sigma |F_{nati}| \}$ の大きいものに着目し、試験的に 6 Å分解能での差のパターソン図を描くことにより、主要な重原子位置を決定した。その中から良好なものとして選ばれた重原子誘導体結晶に対し、2.5 Å分解能の回折データを測定した。

また 1.8 Å分解能での精密化用のデータとして、2次元検出器 F A S T (Enraf-Nonius) を用いて測定した回折強度データも用いた。X線源としては Eliott 社の回転対陰極型X線発生装置 G X 2 1 を用い、45kV、65mAの線源で測定を行った。さらに、F A S T の制御とデータ処理には、プログラム M A D N E S (Messerschmidt & Pflugrath、1987) を用いた。この装置の機構の上からは、1.8 Åが測定できる分解能の限界であった。結晶と検出器のあいだの距離は45mmで、検出器は入射X線方向に対して 45°傾斜させて測定した。走査時の回転軸は1つのみであり、また当時は auto indexのプログラムは無かったため、blind region を補う必要があり、それぞれa*軸とb*軸とを立てた2つの結晶のデータを測定し、それらを併合したものを解析に用いた。この時の R_{merge} は 6.33%であった。走査速度は、1回の走査に対し0.2°を75secで行い、走査した角度範囲は、1個目が100°、2個目が70°であった。1.8 Å分解能までの測定した反射数は、総数で 30,561個、独立な反射にして 10,018 個であり、理論値に対し 75.1%の回折データが観測された。なお、その後の解析で用いた C A D 4 によるデータでは、おなじ分解能で87.4%の回折データが観測されている。

第3節 重原子同型置換法による位相決定

RNase H の初期構造を得るための位相は、重原子多重同型置換法 (M I R ;

Multiple Isomorphous Replacement) により決定した。

RNase H に重原子を導入する場合、大部分の水銀化合物や白金化合物が結晶を変成させたり、格子定数を大きく変化させ、良好な重原子置換体を得ることは容易ではなかった。そこで、水銀化合物に対し適量の 2-メルカプトエタノールを加えることにより、重原子が特別強く反応する-SH 基にだけ結合するように制御し、この問題を克服した。図28に良好な例として、5-クロロマーキュリウリジン誘導体の native 結晶との差のパターソン図と、異常分散効果による F_+ 、 F_- 間の差のパターソン図を示した。これらの差パターソン図のハーカー面上には明瞭なピークが見られ、異常分散によるピークとよく一致していた。約100 種類の誘導体を探索し、それらの中から良好な誘導体として、EMTS (ethyl mercury thiosalicylate)、 $HgCl_2$ 、および5-クロロマーキュリウリジンを選定した。これらの重原子誘導体結晶のデータについては表8に示す。

重原子位置は、差のパターソン図のハーカー面から拾い、さらにクロス・ベクトルの存在も確認した。それらをもとに、プログラム PROTEIN (Steigemann, 1974) を用いて初期位相を精密化した。重原子の副サイトを求めるためにクロスの差のフーリエ図も併用した。この手順を繰り返すことにより、解析の進度の指標である figure of merit が 0.57 になった。さらに、異常分散データおよび $BaCl_2$ 誘導体を加えて精密化を続けた結果、figure of merit の最終値は 0.71 になった。この時の重原子パラメータを表9に示す。また、各分解能ごとの phasing power (位相決定力; 重原子の構造因子と lack of closure error との比, $\sum f_H / \sum E$) と figure of merit の分布を図29に示す。

最初の電子密度図は、これらの誘導体の 2.5Å 分解能の反射データを用いて計算した。さらに $BaCl_2$ 誘導体の 3.5Å データ、および $HgCl_2$ 誘導体と5-クロロマーキュリウリジン誘導体の異常分散効果をとり入れた解析により、このMIRマップはさらに改善された。ことに、重原子サイト近傍である N 末端付近の Met 1 から

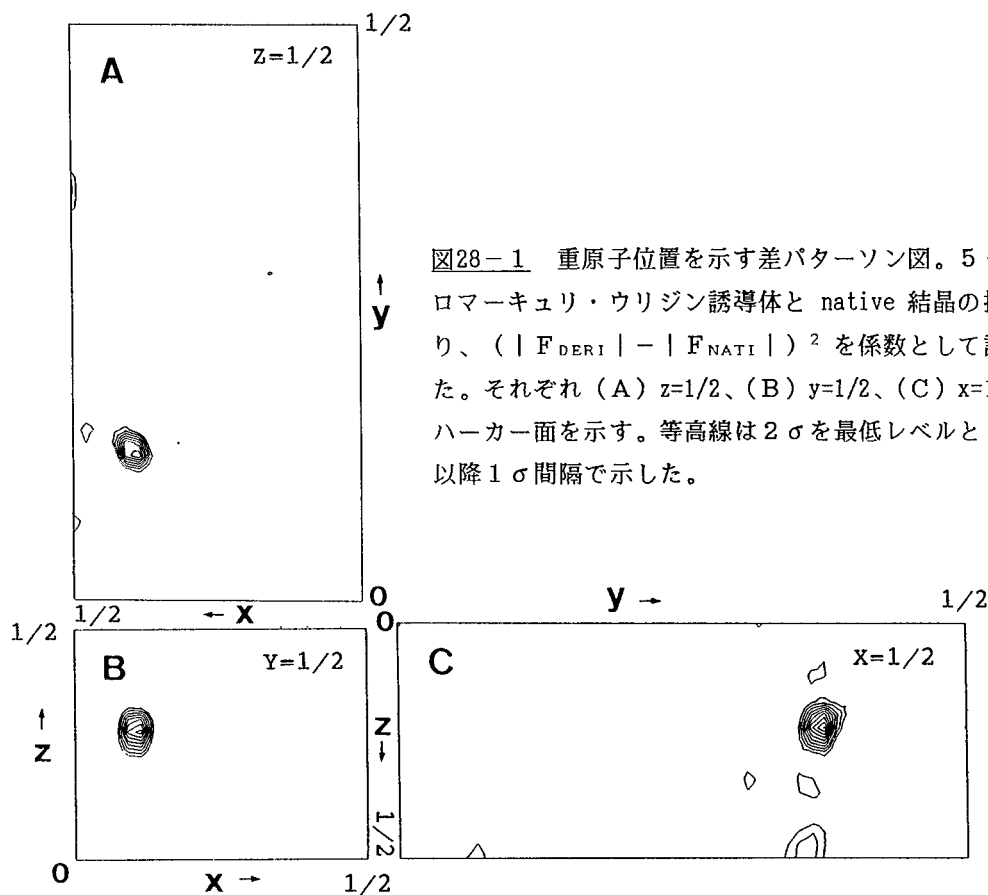


図28-1 重原子位置を示す差パターン図。5-クロロマーキュリ・ウリジン誘導体と native 結晶の振幅より、 $(|F_{\text{DERI}}| - |F_{\text{NATI}}|)^2$ を係数として計算した。それぞれ (A) $z=1/2$ 、(B) $y=1/2$ 、(C) $x=1/2$ のハーカー面を示す。等高線は 2σ を最低レベルとして、以降 1σ 間隔で示した。

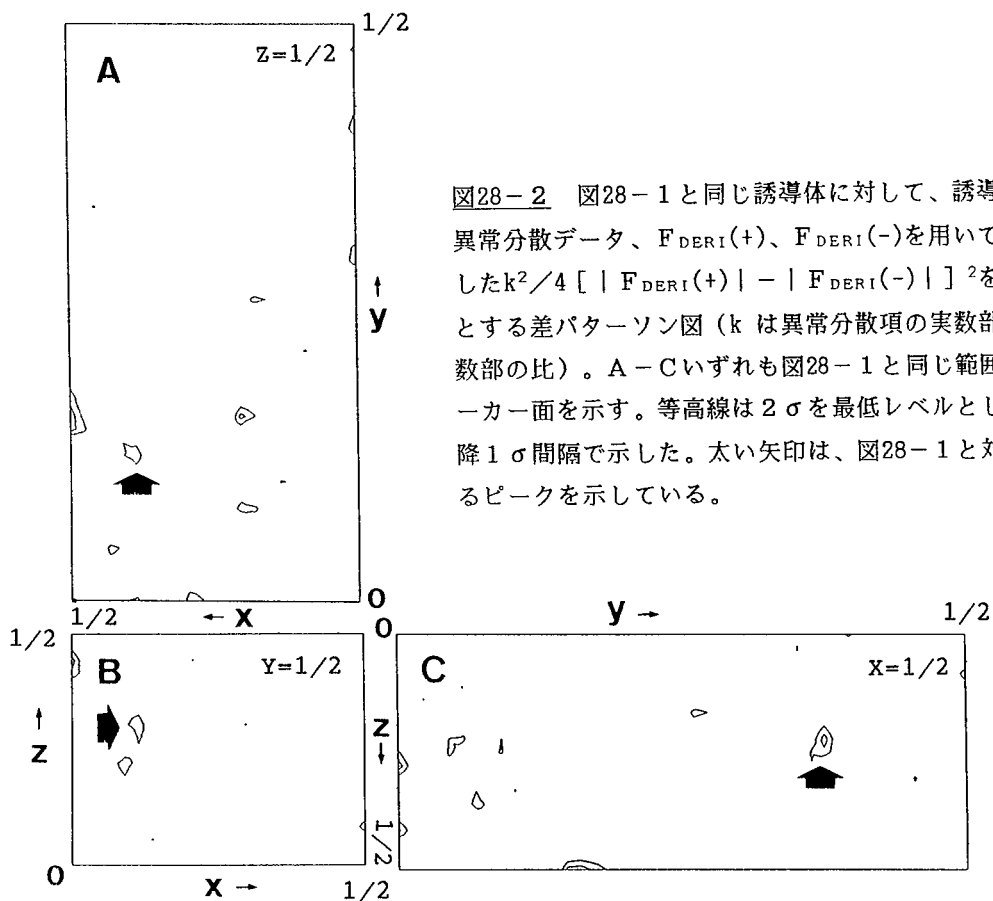


図28-2 図28-1と同じ誘導体に対して、誘導体の異常分散データ、 $F_{\text{DERI}}(+)$ 、 $F_{\text{DERI}}(-)$ を用いて計算した $k^2/4 [|F_{\text{DERI}}(+)| - |F_{\text{DERI}}(-)|]^2$ を係数とする差パターン図 (k は異常分散項の実数部と虚数部の比)。A-Cいずれも図28-1と同じ範囲のハーカー面を示す。等高線は 2σ を最低レベルとして以降 1σ 間隔で示した。太い矢印は、図28-1と対応するピークを示している。

data set	resolution	number of independent reflections	number of crystals	R merge	average isomorphous difference	phasing power	R -Cullis		
CAD4 (for M.I.R.)									
native	2.5Å	5,000	1	\$	—	—	—		
EMTS	2.5Å	4,586*	4	5.00 %	12.3 %	2.72	0.47		
# HgCl ₂	2.6Å	4,325	2	6.13 %	11.3 %	3.59	0.41		
# 5HgCl-uridine(1)	2.5Å	4,825	3	6.21 %	20.5 %	3.12	0.44		
# 5HgCl-uridine(2)	2.5Å	4,759*	4	5.36 %	17.3 %	2.58	0.55		
BaCl ₂	3.5Å	1,889	1	\$	10.9 %	0.88	0.81		
FAST (for refinements)									
native	1.8Å	10,018	2	6.33 %	—	—	—		
Resolution (Å)	14.81	8.70	6.15	4.76	3.88	3.28	2.84	2.50	total
No. of reflections	33	112	241	411	630	890	1192	1491	5000
Figure of merit	0.97	0.96	0.92	0.88	0.81	0.75	0.63	0.60	0.71

* Bijvoet pairs were collected for anomalous dispersion data

soaked with 2-mercaptoethanol

$$R \text{ merge} = \frac{\sum_j \sum_h |I_{h,j} - \langle I_h \rangle|}{\sum_h \langle I_h \rangle}$$

表8 位相決定に用いた重原子誘導体結晶。

Derivative	Site	x	y	z	Relative occupancy	B
EMTS	1	0.0522	0.4330	0.6286	0.608	34.16
HgCl ₂	1	0.0589	0.4376	0.6045	0.324	30.65
	2	0.0435	0.4288	0.6909	0.224	29.81
	3	0.0454	0.4361	0.6447	0.148	32.96
	4	0.0407	0.4440	0.5527	0.070	26.14
	5	0.0335	0.4263	0.1868	0.020	11.05
5HgCl-uridine(1)	1	0.2673	0.1763	0.2521	0.574	44.48
	2	0.0458	0.4331	0.6308	0.448	36.25
	3	0.0569	0.4365	0.6116	0.440	30.32
	4	0.0461	0.4403	0.5819	0.250	33.41
	5	0.0258	0.4278	0.2006	0.034	19.23
	6	0.0472	0.4519	0.8963	0.028	24.38
5HgCl-uridine(2)	1	0.0507	0.4354	0.6124	0.486	24.06
	2	0.2720	0.1762	0.2480	0.054	7.96
	3	0.0499	0.4515	0.5256	0.036	38.64
BaCl ₂	1	0.3588	0.8689	0.8956	0.464	37.91

表9 最終の重原子パラメータ。

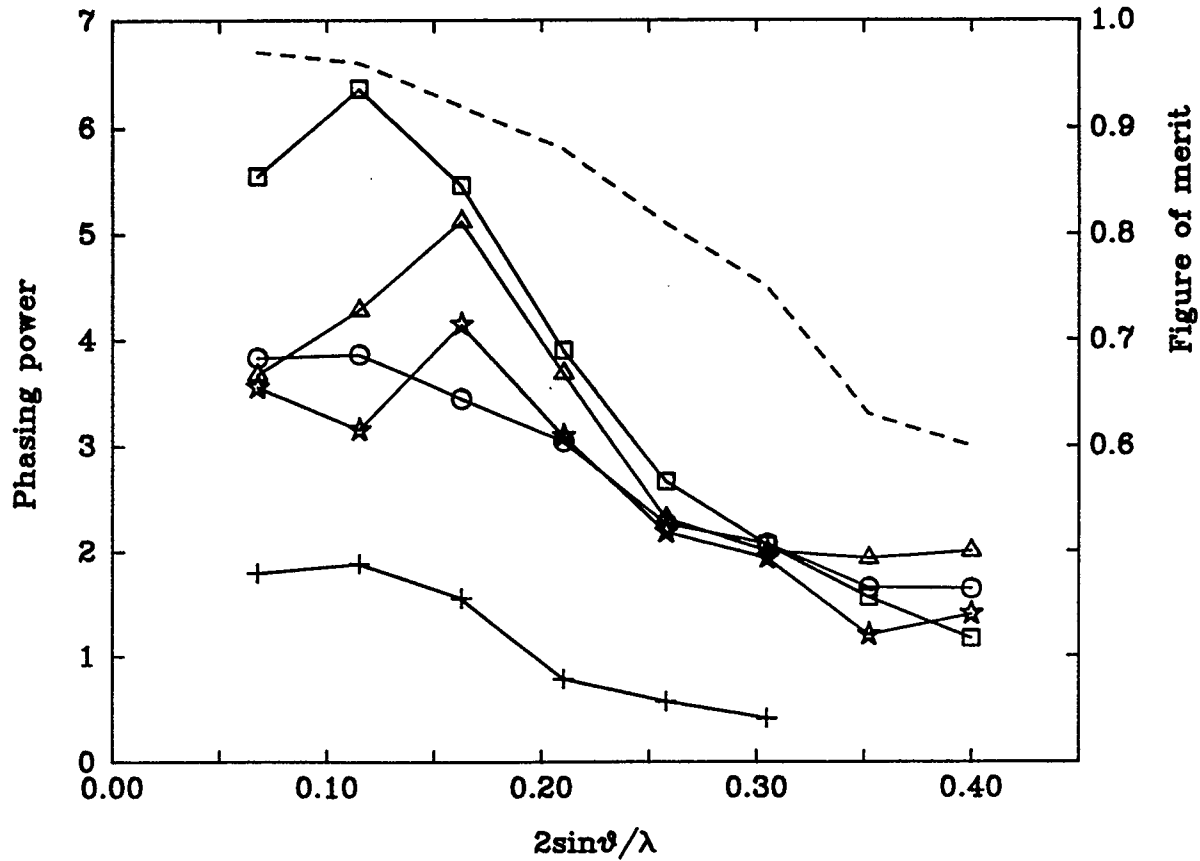


図29 各分解能に対する phasing power (実線) と figure of merit (破線、目盛りは右端) の変化。□はHgCl₂、△は、5-クロロマーキュリウリジン(1)、☆は5-クロロマーキュリウリジン(2)、○はEMTS、+はBaCl₂誘導体をそれぞれ示す。なお、☆と○は異常分散データを含めて計算したものである。△と☆の違いについては表8を参照。

Val 4 までを明瞭に認識することができた。このマップでは、分子領域と溶媒領域の境界が明瞭に現れており、電子密度の断面を透明なプラスチックシート上に描き、1 Å分ごとに重ねて作成したミニマップでは、すべての α ヘリックスと β シートを容易に同定する事ができた。また、ほとんどの側鎖、とくに芳香環を側鎖として持つものについては、明瞭に認識することができた。揺動しやすい1つの領域 (His 124 近辺のループ) を除き、主鎖の途切れるところはまったくなく、迷うことなく主鎖のトレースができた。N末端やC末端の数残基を除き、すべてのアミノ酸残基はミニマップ上の電子密度にうまくあてはめることができた。なお、初期モデルを構築 (次節) した結果、占有率の特に大きな2個の重原子サイトは、主サイトが、Cys 63 やN末端近傍に、また 副サイトが Cys 13 近傍に存在していることがわかった。

第4節 分子モデルの構築と精密化

グラフィックス上で電子密度に適合する RNase H の分子モデルを構築した。この際、装置としては三次元ディスプレイ PS390 (Evans & Sutherland) を使用し、対話型のコンピュータプログラム FRODO (Jones、1978) を用いて、モデルを電子密度に適合させた。最初のモデルは重原子同型置換法より得た figure of merit が 0.71 の 2.5 Å 分解能の電子密度図を用いて、それに適合させるようにして構築した。さらに FRODO の最適化ルーチンを用いて逐次、モデルの改良をした。この操作を何度も繰り返すことで、初期の R 因子として、10 - 2.5 Å 分解能で 39 % の値を得た。

さらに、束縛条件下の最小2乗法プログラム PROLSQ (Hendrickson & Konnert、1980) を用いて 構造の精密化を行った。表10に、精密化計算の全過程のうち主な部分をまとめた。また、この表のそれぞれのサイクルにおける R 因子の収束する様子を図30にグラフで示した。精密化計算の際には、富士通のスーパーコン

Table 1 Refinement Survey

Stage No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
D-map No.	1	2		3			4	6	9	11	12	15	16	31	33	93	106	
lower resol. range (Å)	5	5	10	10	10	10	10	10	6	6	6	6	6	6	10	5	6	6
higher resol. range (Å)	2.5	2.5	2.2	2.0	2.5	2.3	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8	2.0	1.8	1.8	1.8	1.48	1.48
No. of cycles	6	6	11	9	9	4	12	22	17	8	15	8	9	12	4	38	22	8
No. of parameters	3716	3716	3716	3716	3716	3716	3716	3716	3716	4953	3716	4953	3746	4993	4004	5337	5357	5853
No. of atoms	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238	1238
No. of solvent atoms	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	96	96	101	225
over all B factors (Å ²)	13.01	15.61	12.96	17.68	10.88	10.80	13.00	14.20	16.20	-	13.20	-	16.00	-	17.20	-	-	-
rmsd of 1-2 bond length(Å)	0.008	0.007	0.010	0.013	0.008	0.009	0.009	0.019	0.013	0.011	0.012	0.011	0.011	0.010	0.013	0.014	0.015	0.017
No. of F-data	3212	3212	5487	7467	3590	4741	7467	7467	9147	9147	9147	9147	6846*	8244*	9931\$	9478\$	16851	16851
F-data cutoff	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	3σ	1σ	1σ
< Fo - Fc >	22.51	22.01	19.86	17.68	22.25	20.40	17.01	15.78	13.43	11.39	13.20	11.12	14.13	11.37	14.02	9.21	26.95*	24.63*
R (initial)	39.1	35.1	35.4	33.7	32.8	31.8	34.2	36.5	31.6	25.0	32.0	24.3	24.2	25.9	26.3	25.6	27.5	20.0
R (final)	30.8	30.1	31.4	31.3	29.6	29.9	30.7	28.5	27.9	23.6	27.5	23.1	24.8	21.8	25.8	17.6	21.5	19.6

表10 精密化のプロセスの要所のみを示す。PROLSQの各段階の最終パラメータを示す。また、構造の修正を行うために作成した電子密度図の番号を、2段目の D-map No. に示した。D-map No.33 まではFASTデータを用いて精密化を行った。#印はFoの絶対値が15以下のものを弱い反射として計算の際に除いたことを示す。これ以外はFoの絶対値が5以下のもののみを除いている。また Stage1 から14までは反射データの処理の際に、等価な反射どうしの平均よりかけ離れている反射 ($I < I > / < I > \geq 0.3$) を除いたが、\$で示される stage 15 と 16 ではこれも含めた。stage 16 と 17 の間で本文に記されたように分解能を順次上げていったがこの表では省略した。また D-map No.34 以降はCAD4データを用いた。したがって、*印を付した stage 17 と 18 の $< |Fo| - |Fc| >$ の値は他のものと尺度が異なる。

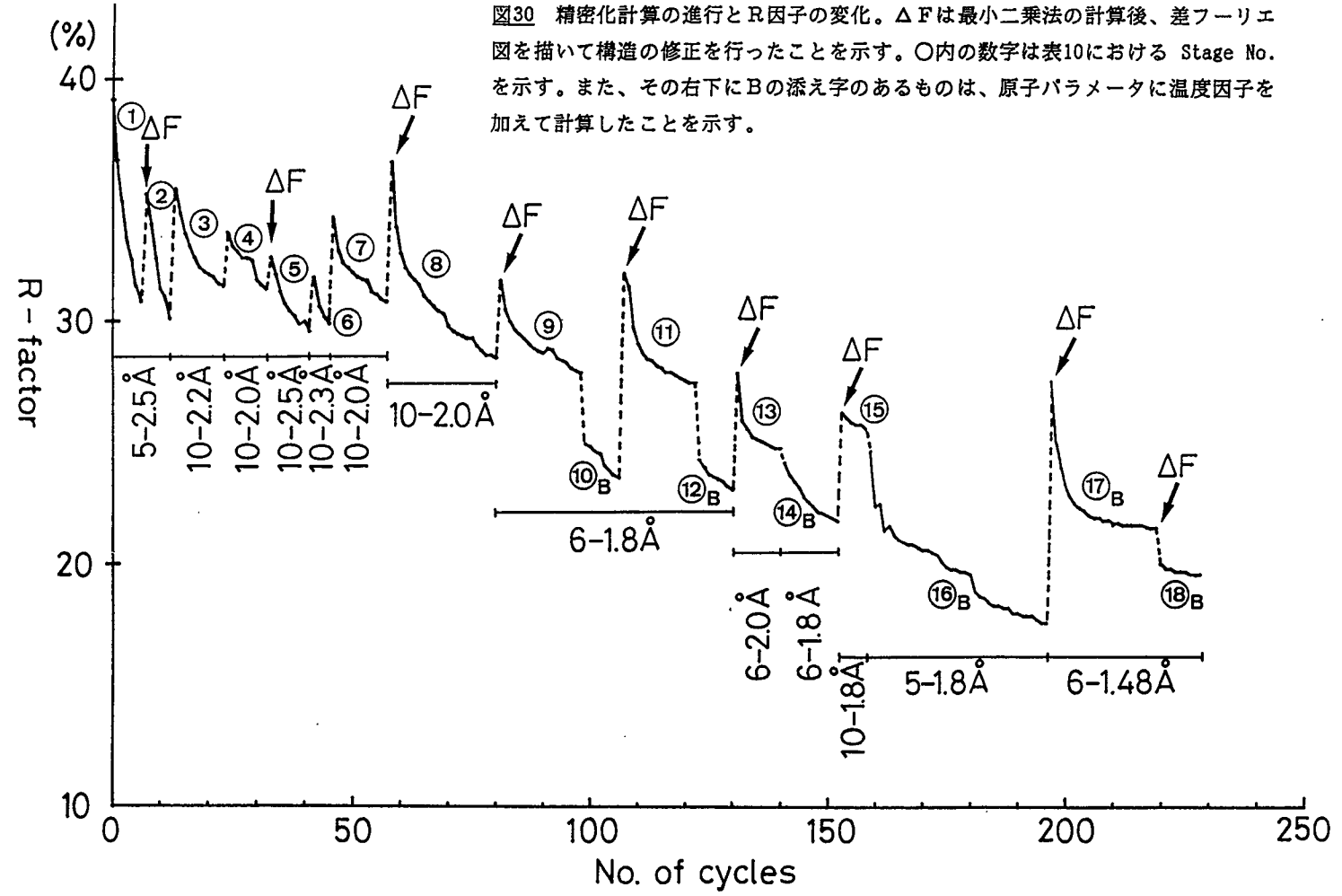


図30 精密化計算の進行とR因子の変化。 ΔF は最小二乗法の計算後、差フーリエ図を描いて構造の修正を行ったことを示す。○内の数字は表10における Stage No. を示す。また、その右下にBの添え字のあるものは、原子パラメータに温度因子を加えて計算したことを示す。

ピュータVP400Eを用いた。精密化の初期にはFASTで測定した1.8Å分解能のデータのうち、5-2.5Å分解能のデータのみを用い、個々の原子の温度因子は 15.0\AA^2 に固定して精密化した。構造が収束するごとにその最終座標をもとに、 $(|F_o| - |F_c|)\exp(i\alpha_c)$ と、 $(|F_o| - |F_c|)\exp(i\alpha_c)$ を係数とする差フーリエ図を計算し、FRODOを用いて三次元グラフィックス上でモデルの修正を行った。また、電子密度の明瞭でない部分に関しては、必要に応じオミットマップも計算した。これらの操作を繰り返し行い、さらに用いる回折データの数、2.2、2.0、1.8Å分解能へと、逐次増やしていった。R因子が28%になったところで、水素原子を除いた全原子の個々の温度因子をパラメータに加えて、精密化を続行した。1.8Å分解能のFASTデータによる精密化では、最終のR因子は17.6%に収束した。さらにこの構造を初期値として、高分解能の精密化をするため、CAD4データによる1.48Å分解能のデータを用いた精密化を続行した。分解能は、2.5、2.2、2.0、1.8、1.7、1.6、1.48Åと、逐次ふやしていった。精密化の最終段階において、モデルに水分子を加えたが、温度因子が 70\AA^2 より大きくなるものはモデルより取り除いた。精密化終了後のR因子は、6-1.48Å分解能に分布する16,851個の回折強度データに対し19.6%となった。このようにして得た最終構造のデータを表11に示した。また、精密化に用いた初期構造と、得られた最終構造を重ね合わせたものを図31に $C\alpha$ モデルで示した。さらに、各分解能領域における解析の統計を表12に示す。なおこの際、 $F < 1\sigma(F)$ の弱い回折データはノイズとみなし、精密化の計算には用いなかった。

また解析で用いた精密化プログラムは、低分子で用いられる完全マトリックス型のものではないため、精密化の際の束縛条件として用いた重みのバランス、および得られた最終構造の、理想モデルからの平均2乗変位(r.m.s.d.)については、表13に示す。また、原子パラメータの個々の標準偏差もこのプログラムでは得られないため、Luzzati (1952)の方法により原子座標の平均標準偏差を求めた(図32)。各

Number of atoms	1,238
Number of solvent atoms	225
Number of parameters	5,853
Resolution range for refinement (Å)	6.0-1.48
Final overall average B value (Å ²)	23.8
Total number of crystals for data collection	6
Number of observed reflections (∞-1.48Å)	17,254
Data used for refinement (6-1.48Å)	16,851
Reflection cutoff criterion	$F_o > 1\sigma(F_o)$
$\langle F_o - F_c \rangle$	24.63
R-factor [†] (final)	0.196

$$\dagger R\text{-factor} = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$$

表11 精密化計算の際のパラメータ。

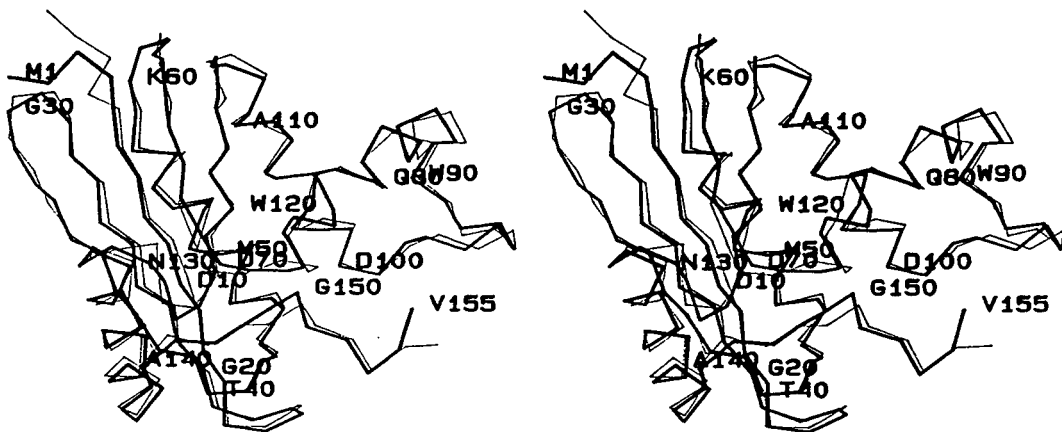


図31 大腸菌 RNase H の、精密化前の初期構造(細線)と精密化終了後の最終構造(太線)をC_αモデルで示したもの。残基番号はN末端から10番ごとに付した。

Resolution Shell (Å)	Observed-reflections Number	completeness (%) §	SigF(used)	<Fo-Fc>	Shell R*	Sphere R*
6.00-3.00	2,515	97.3	21.67	40.52	0.129	0.129
3.00-2.40	2,512	92.4	18.89	29.05	0.184	0.147
2.40-2.10	2,405	88.9	17.14	23.64	0.200	0.157
2.10-1.90	2,320	80.9	15.80	21.35	0.230	0.167
1.90-1.75	2,149	69.9	14.60	18.35	0.263	0.174
1.75-1.60	2,544	59.1	13.37	18.09	0.312	0.185
1.60-1.48	2,400	50.3	12.09	20.20	0.379	0.196
6.00-1.48	16,851	73.2		24.63	—	0.196

§ Completeness of measured to possible reflections.

$$* R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} F_{obs}(hkl)}$$

表12 各分解能における測定された反射データの割合、重みのかけかた、および最終構造の各分解能におけるR因子の分布。

Restraints	r.m.s. deviation ‡	σ †	No. of parameters
Distance (total)			3423
Bond length	0.017	0.020	1266
(1-2 neighbour) (Å)			
Angle related	0.036	0.030	1712
(1-3 neighbour) (Å)			
Planar	0.048	0.050	445
(1-4 neighbour) (Å)			
Planar groups (Å ²)	0.014	0.020	1099 *
Chiral volumes (Å ³)	0.164	0.150	179
Non-bonded contacts			812
(Total)			(12908) §
Single torsion (Å)	0.189	0.300	412
Multiple torsion (Å)	0.206	0.300	282
Possible H-bond (Å)	0.270	0.300	107
Torsion angles			414
(Total)			(772) ¶
Peptide plane (ω)	2.8	3.0	164
Staggered (± 60 or 180°)	18.6	15.0	232
Orthonormal ($\pm 90^\circ$)	30.5	20.0	18
Isotropic thermal factors			
Main-chain bond	1.445	1.500	639
(1-2 neighbour) (Å ²)			
Main-chain angle	2.183	2.000	807
(1-3 neighbour) (Å ²)			
Side-chain bond (Å ²)	2.409	2.000	627
Side-chain angle (Å ²)	3.410	2.500	905

† The weight for each restraint was $1/\sigma^2$.

‡ r.m.s.deviation from ideality.

§ 890 actual out of 12908 possible contacts were restrained.

¶ 414 out of 772 conformational changes were restrained.

* The total number of planar groups was 217.

表13 精密化計算の際の、ジオメトリーごとの重みのかけかた (†印) と、最終構造の各ジオメトリーごとの理想モデルに対する最小2乗偏差 (‡印)。

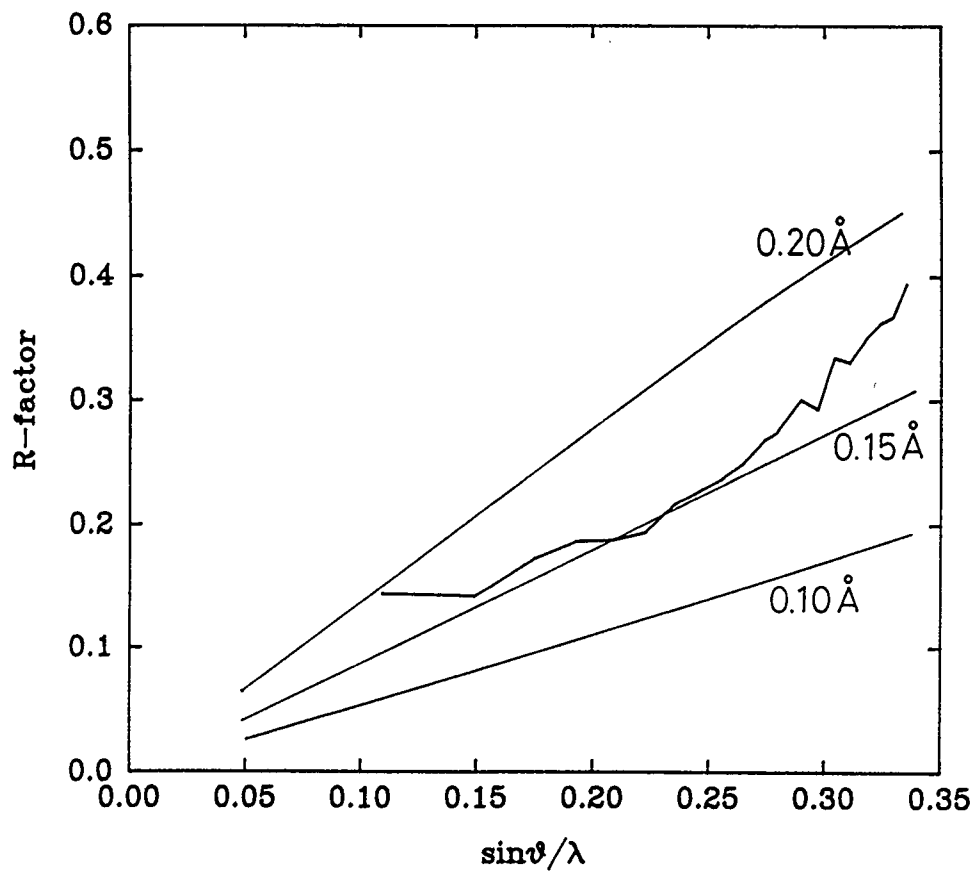


図32 Luzzati plot (1952) による大腸菌 RNase H 最終構造の精度の評価。

分解能の殻(shell)ごとに求めたR因子は、平均誤差(Δr)が 0.14 Åと0.19 Åの理論曲線の間分布していることから、全体的には原子の標準偏差は約0.16 Åと見積もられる。

精密化後の最終構造をもとに ($2|F_o| - |F_c|$) を係数として計算した電子密度図の一部を、図33に示す。図に示されるように、得られた電子密度は鮮明であり、個々の原子が分離して現れるという、1.5 Å分解能レベルの解析の条件を良く満たした質の高いものである。

第5節 Mg²⁺結合部位の同定

RNase H 活性に必須とされるMg²⁺結合部位を同定するため、RNase H 結晶を 200 mM の Tris-HCl (pH9.0)、15 %ポリエチレングリコール、および結合すると予想される金属イオン (Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Co²⁺) とを様々の濃度で混ぜた溶液に浸漬 (soaking) した。ただし、Mn²⁺を含む溶液はアルカリ側でかなりの量の沈澱が生じるため、浸漬はMn²⁺の飽和溶液を用いて行った。

重原子同型置換法で得た位相をもとに、金属無しの結晶と金属を含む結晶との差フーリエ図 ($\{|F_{\text{metal}}| - |F_{\text{free}}|\} \exp\{i\alpha_{\text{MIR}}\}$) を計算した。その結果、Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺のアルカリ土類金属イオンでは、共通の位置に単一の明瞭なピークを得た。このうちMg²⁺の場合については、さらに精密化後の金属なしの結晶によるモデルより計算したオミットマップを計算した。このマップでも、前者の差のフーリエ図で得た位置と同じ位置に明瞭なピークを確認できた。Mn²⁺、Co²⁺の遷移金属イオンでは明瞭なピークは得られなかった。

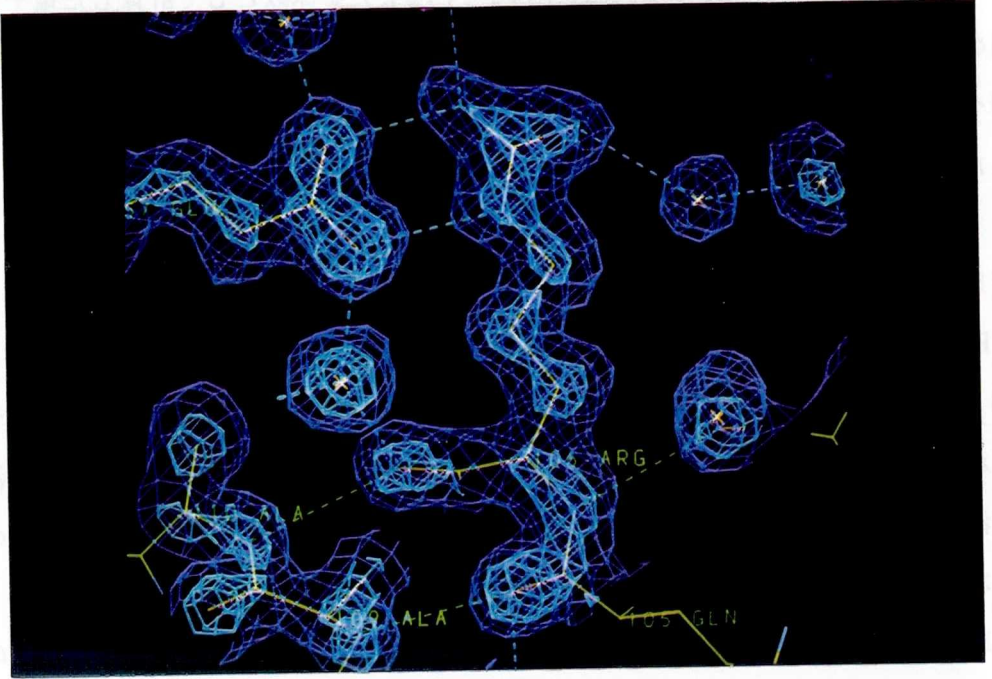


図33 最終構造に基づいて計算された $2F_o - F_c$ を係数とする電子密度図。電子密度の中心を示すため、2種類の等高線で示し、それぞれ青が 1σ 、水色が 3σ の高さである。破線は水素結合を意味する。この図に示されるように、各原子が明瞭に分離しており、 1.5\AA 分解能のレベルを満たした解析であることがわかる。

第2章の実験

大腸菌 RNase H の 3つの活性部位変異体 D10N、E48Q、D70N は、野生型の酵素とほぼ同じ条件で結晶化された。得られた結晶はいずれも空間群が $P2_12_12_1$ の斜方晶系に属し、野生型のものと同じである。また格子定数については、D10N と、E48Q については、野生型と同一であるが、D70N については、a軸が約2 Åだけ小さい。興味深いことに、この D70N の格子定数は、Yang ら (1990) が解析した大腸菌 RNase H のそれに近いが、これについては第2章第3節で、もう少し詳しく述べる。これらの変異体結晶の結晶学的データ、回折強度データの測定範囲、および最終の R 因子を表14に示す。

変異体 D10N については、4軸型回折計 CAD 4 (Enraf Nonius) により、10 - 2.02 Å分解能の反射 7,130 個を測定した。構造解析のために、野生型の RNase H の構造を初期座標として用いた。この際まず、rigid body refinement の計算を行ったが、この計算には野生型の座標をもとに、プログラム TRAREF (Huber & Schneider, 1985) を適用した。この、rigid body refinement は、蛋白質分子全体を1つの剛体として、微小な角度の回転や微量の並進を行い、回折強度に最もうまく適合するモデルの位置を、結晶学的精密化を行う前の時点で決めるものである。特に、格子定数の変化が、非同型とまでは行かない1%以下の僅かな場合などには、次の精密化をうまく進める上で有効である。ついでプログラム PROLSQ (Hendrickson & Konnert, 1980) を用いて束縛条件下の最小2乗法による精密化を行った結果、最終の R 因子は19.9%に収束した。また、野生型の立体構造と比較するために、主鎖原子どうしが平均的に最もよく重なる場合の最小2乗変位 r.m.s.d. $\{\sum (r_i - r_j)^2\}^{1/2}$ は0.30 Å、また全原子(水素原子を除く)で重ね合わせると0.46 Åと小さな値であった。

変異体 D70N については、4軸型回折計 CAD 4 (Enraf Nonius) により、10 -

各変異体の比較

	a(Å)	b(Å)	c(Å)	Resolution	R-factor
wild-type	44.06	86.85	35.47	6-1.48Å	19.6%
mutant D10N	44.17	87.23	35.27	10-2.02Å	19.9%
E48Q §	44.0	86.5	35.8	10-1.9 Å	21.0%
D70N	42.01	86.42	35.95	10-2.0 Å	27.5% ¶
wild-type (Yang et al.)	41.79	86.34	36.31	10-2.0 Å	19.8%

§ 北大・理（田中研究室）との共同研究 ¶ 温度因子はまだ精密化していない。

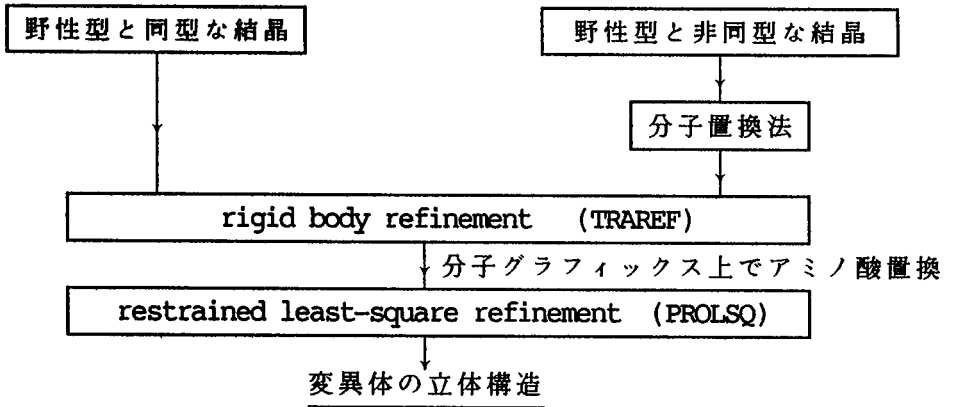
表14 この研究で用いた 3つの大腸菌 RNase H 活性部位変異体の、格子定数の比較。D70N変異体は Yang ら（1990）が解析に用いた結晶と同型である。さらに、それぞれについて解析に使用した反射データの分解能と現時点での最終のR因子を示した。

2.0 Å分解能の反射 5,972 個を測定した。この分解能における野生型と D70N 変異体との isomorphous difference ($\sum |F_{\text{nat1}}| - |F_{\text{D70N}}| / \sum |F_{\text{nat1}}|$) は平均で、50.1%もあり、さらに、前述したように a 軸方向の格子が 2 Å (約 5 % 分) 短いため、野生型とは明らかに非同型の結晶であると判断され、野生型の座標はそのままでは解析の初期構造に適用することが不可能であった。そこでまず、分子置換法を用いて初期構造の決定を行った。なお、この過程の詳細については図 34 に示した。

この際、回転関数の計算にはプログラム PROTEIN (Steigemann, 1974) を、また並進関数の計算には、Crowther & Blow (1967) の理論を計算する E. Lattmann のプログラムをそれぞれ用いた。

野生型の構造をモデルとして、それを、80 Å × 80 Å × 80 Å の空間群 P1 の仮想格子中に置き、RNase H 1 分子を構成する 1,238 原子の座標から分子の重心を求め、それを回転の中心として回転関数を計算した。その結果、Huber の定義による回転角で $(\psi, \theta, \phi) = (1.9^\circ, 5.4^\circ, -3.8^\circ)$ のところに、顕著な第 1 のピーク (図 35) を得た。この回転角を採用して、さらに並進関数を計算した。その結果を図 36 に示すが、X, Y, Z の各方向の並進関数ともそれぞれハーカー面上に、第 2 ピーク (ハーカー面以外にある一般のピークも含む) より 2 倍以上高い第 1 ピークを得た。この時点で、結晶のパッキングを見たところ衝突はなく、また電子密度マップを計算したところ、ほとんどのアミノ酸残基のモデルが電子密度にうまくフィットしたため、このようにして得られた回転・並進関数の解を正解とした。しかし、これらの解は、パターンソン関数をもとに計算したもので、解の精度が、回転関数で 0.2° 程度までに限定されるため、さらに、プログラム TRAREF (Huber & Schneider, 1985) を用いて、rigid body refinement を行い、解をさらに精度良いものにした。そののちモデルの電子密度へのフィッティングとプログラム PROLSQ による束縛条件下の最小 2 乗法を繰り返し、R 因子を 27.5 % まで収束させ

変異体蛋白質結晶の X 線構造解析



分子置換法

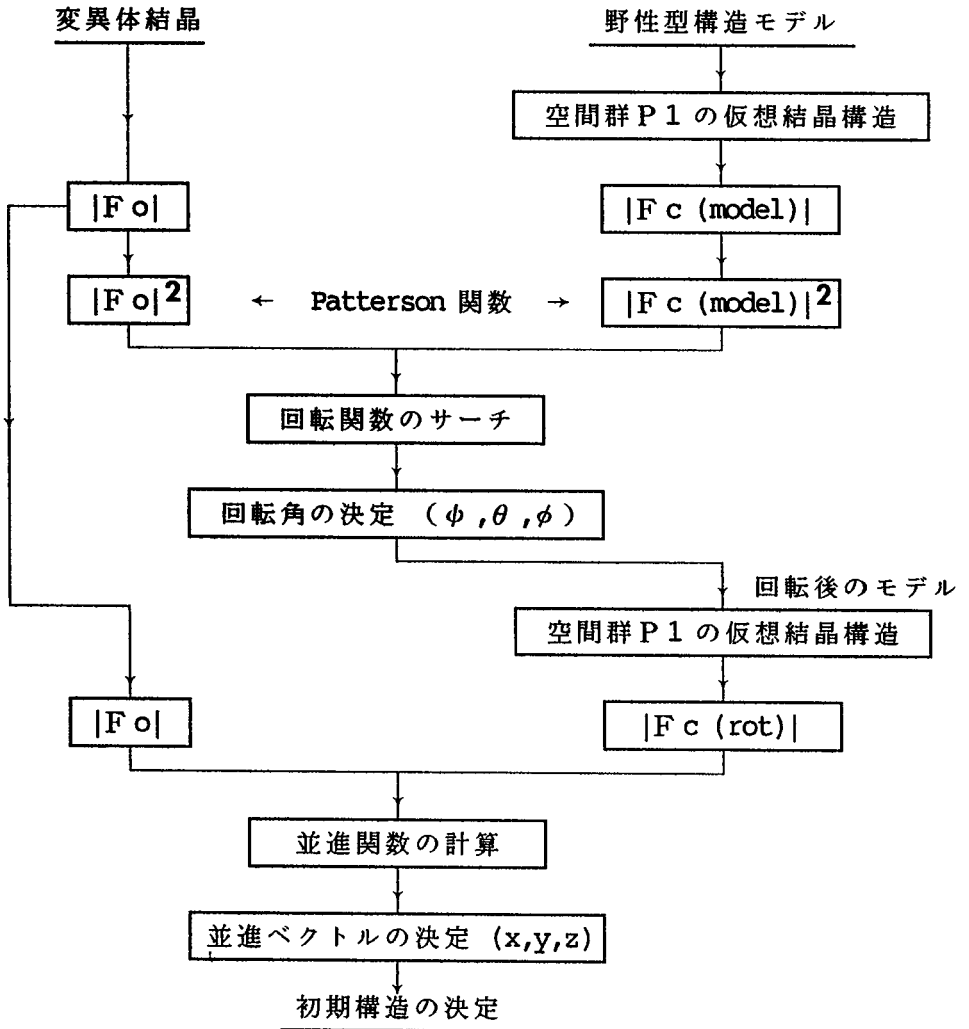


図34 変異体結晶の構造解析の流れ図。

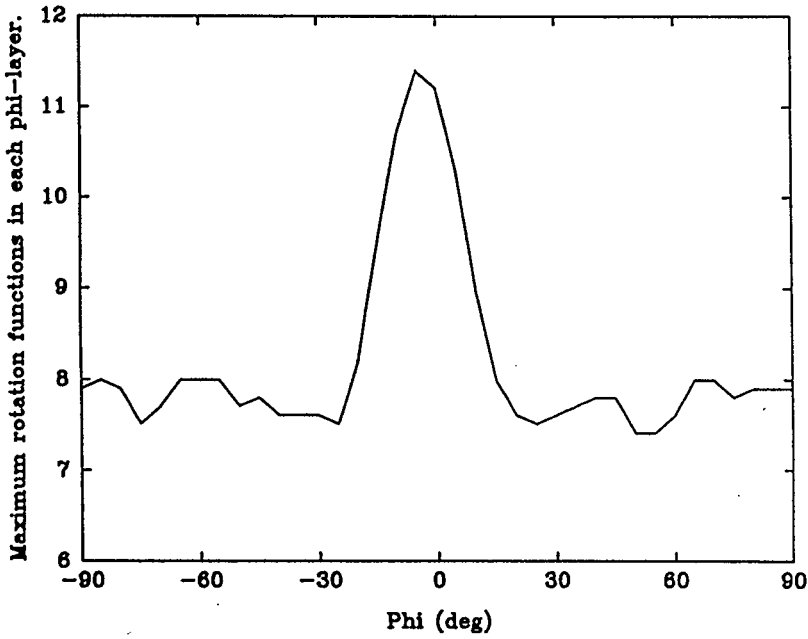


図35-1 回転関数の結果(1)。 ψ 、 θ 、 ϕ を 5° 刻みでサーチしたときの各 ϕ 層における回転関数の最大値をプロットしたもの。なお、この計算で全体の回転関数の平均値は4.7であった。

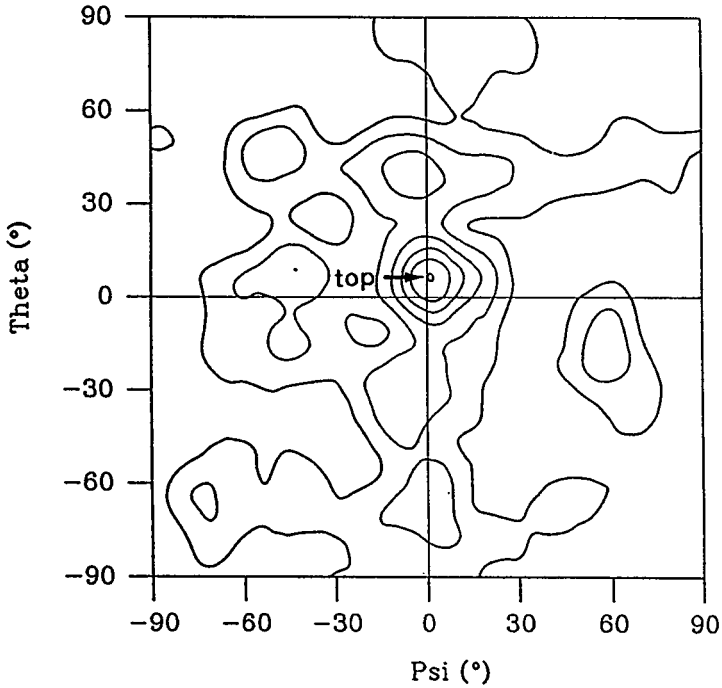


図35-2 回転関数の結果(2)。最終の 0.2° 刻みでの計算で得た回転関数の最大値の ϕ 角 -3.8° に対し、 ψ 、 θ を変えたときの回転関数の分布を示したもの。図35-1とあわせ、トップのピークが顕著なものであることを示す。なお、等高線の間隔は任意である。ただし、この層の平均の高さを0として太線で示し、それ以上の高さのもののみを示した。

Translation Function (10-2.5Å resolution)

1. x, y, z
2. $1/2-x, -y, 1/2+z$
3. $1/2+x, 1/2-y, -z$
4. $-x, 1/2+y, 1/2-z$

A. trans 1.→2. (standard deviation = 192.9)

	peak	X	Y	Z
1st	1976.6	0.314	0.343	0.500
2nd	845.5	0.798	0.645	0.000

B. trans 1.→3. (standard deviation = 264.0)

	peak	X	Y	Z
1st	3478.6	0.500	0.849	0.611
2nd	1248.1	0.000	0.150	0.462

C. trans 1.→4. (standard deviation = 207.6)

	peak	X	Y	Z
1st	2002.0	0.815	0.500	0.108
2nd	866.3	0.878	0.000	0.592

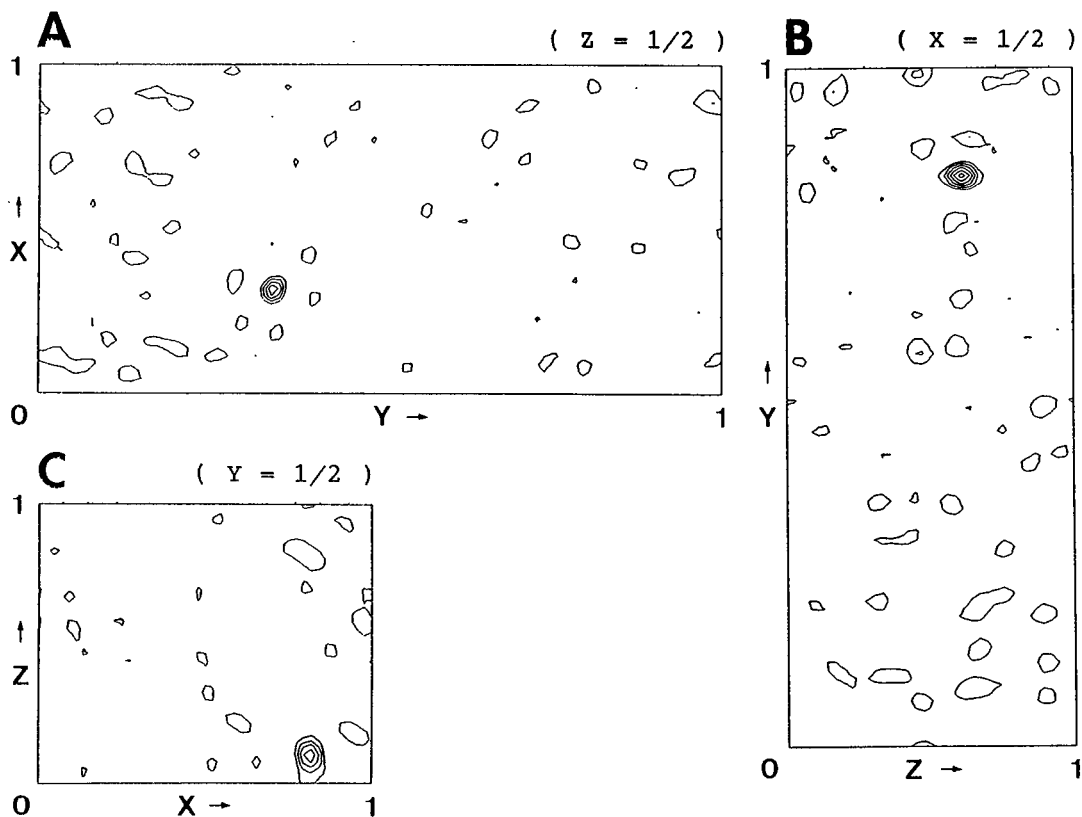


図36 並進関数の結果。上段は各並進操作における並進関数の最大値とその位置。比較のため第2ピークも示した。A, B, C各操作における並進関数のハーカー一面を下段に示した。等高線は 2σ おきに引いてある。各操作において、2つの対称操作の差のベクトルとピーク位置を比較することにより、並進ベクトルの解として、 $(x, y, z) = (-0.093, 0.173, -0.195)$ を得る。

た。なお、まだ個々の原子の温度因子はパラメータに加えていない。また、野生型の立体構造と比較した結果、主鎖原子どうしで重ね合わせた場合r.m.s.d.は0.61Å、側鎖原子を含めると1.33Åで、D10N よりやや大きな値であった。これは、野生型と非同型な結晶なので、分子表面の残基がパッキングの影響を受けたためr.m.s.d.が大きくなったと考えられる。なおこの際には、電子密度が認識しにくかったN末端の Met 1 から Arg 3、C末端の Val 153 から Val 155、および野生型とループ構造の異なる Val 121 から Glu 129 までの計15残基分（約1割程度）を重ね合わせの計算から省いた。

変異体 E48Q の結晶構造解析は、北大の田中 勲 助教授との共同研究であり、データ測定と解析計算は、田中助教授の研究室でおこなわれた。現在の解析状況は、1.9 Å分解能でR因子が21%である。本論文では、構造の比較に必要なため、第2章・第2節ではその解析結果を引用した。

参 考 文 献

- Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R. & Saenger, W. (1988). Three-dimensional Structure of the Ribonuclease T₁*2'-GMP Complex at 1.9-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* 263, 15358-15368.
- Arnott, S., Chandrasekaran, R., Millane, R.P. & Park, H.-S. (1986). DNA-RNA Hybrid Secondary Structure, *J. Mol. Biol.*, 188, 631-640.
- Barlow, D. J. & Thornton, J. M. (1988). Helix Geometry in Proteins. *J. Mol. Biol.* 201, 601-619.
- Berkower, I., Leis, J. & Hurwitz, J. (1973). Isolation and Characterization of an Endonuclease from *Escherichia coli* Specific for Ribonucleic Acid in Ribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybrid Structures. *J. Biol. Chem.* 248, 5914-5921.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. E. J., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tsumi, M. (1977). The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535-542.
- Carl, P. L., Bloom, L. & Crouch, R. J. (1980). Isolation and Mapping of a Mutation in *Escherichia coli* with Altered Levels of Ribonuclease H. *J. Bacteriol.* 144, 28-35.
- Carlisle, H. C., Palmer, R. A., Mazmudar, K. S., Gorinsky, B. A. & Yeates, D. G. R. (1974). The Structure of Ribonuclease at 2.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 85, 1-18.
- Crawford, J. L., Lipscomb, W. N. & Schellman C. G. (1973). The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 70, 538-542.

- Crouch, R. J. (1990). RIBONUCLEASE H: FROM DISCOVERY TO 3D STRUCTURE. *The New Biologist* 2, 771-777.
- Crouch, R. J. & Dirksen, M. -L. (1982). Ribonuclease H. In 'Nuclease' (Linn, S. M. & Roberts, R. J., eds), pp. 211-241. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Crowther, R. A. & Blow, D. M. (1967). A Method of Positioning a Known Molecule in an Unknown Crystal Structure. *Acta Crystallogr.* 23, 544-548.
- Dasgupta, S., Masukata, H. & Tomizawa, J. -I. (1987). Multiple Mechanisms for initiation of ColE1 DNA replication: DNA synthesis in the presence and absence of ribonuclease H. *Cell* 51, 1113-1122.
- Davies, II, J.F., Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, S.R. & Matthews, D. (1991). Crystal Structure of the Ribonuclease H Domain of HIV-I Reverse Transcriptase. *Science* 252, 88-95.
- Derbyshire, V., Freemont, P. S., Sanderson, M. R., Beese, L., Friedman J. M., Joyce, C. M. & Steitz, T. A. (1988). Genetic and Crystallographic Studies of the 3',5'-Exonucleolytic Site of DNA Polymerase I. *Science* 240, 199-201.
- Doolittle, R. F., Feng, D. -F., Johnson, M. S. & McClure, M. A. (1989). ORIGINS AND EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS OF RETROVIRUSES. *Quart. Rev. Biol.* 64, 1-30.
- Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L. S., Sanderson, M. R. & Steitz, T. A. (1988). Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8924-8928.
- Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K. (1990). DNA RECOGNITION BY PROTEINS WITH THE HELIX-TURN-HELIX MOTIF. *Annu. Rev. Biochem.* 59. 933-969.

- Hendrickson, W. A. & Konnert, J. H. (1980). INCORPORATION OF STEREOCHEMICAL INFORMATION INTO CRYSTALLOGRAPHIC REFINEMENT. In '*Computing in Crystallography*' (Diamond, R., Ramaseshan, S. & Venkatesan, K., eds), pp 13.01-13.23, Indian Academy of Science. Int. Union of Crystallography, Bangalore.
- Hol, W. G. J. & Wierenga. R. K. (1984). *X-ray crystallography and drug action*. (Horn, A. S. & DeRanter, C. J., eds), pp 151-168, Clarendon Press, Oxford.
- Itaya, M. (1990). Isolation and characterization of a second RNase H (RNase HII) of *Escherichia coli* K-12 encoded by the *rnhB* gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8587-8591.
- Itaya, M. & Kondo, K. (1991). Molecular cloning of a ribonuclease H (RNase HI) gene from an extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8: a thermostable RNase H can functionally replace the *Escherichia coli* enzyme *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 19, 4443-4449.
- Itoh, T. & Tomizawa, J.-I. (1980). Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2450-2454.
- Jacobo-Molina, A & Arnold, E. (1991). HIV reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry* 30, 6351-6361.
- Johnson, M. S., McClure, M. A., Feng, D. F. Gray, J. & Doolittle, R. F. (1986). Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7648-7652.
- Jones, T. A. (1978). A Graphics Model Building and Refinement System for Macro-molecules. *J. Appl. Crystallogr.* 11, 268-272.

- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kanaya, S. & Crouch, R. J. (1983). DNA Sequence of the Gene Coding for *Escherichia coli* Ribonuclease H. *J. Biol. Chem.* 258, 1276-1281.
- Kanaya, S., Kohara, A., Miyagawa, M., Matsuzaki, T., Morikawa, K. & Ikehara, M. (1989). Overproduction and Preliminary Crystallographic Study of Ribonuclease H from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264, 11546-11549.
- Kanaya, S., Kimura, S., Katsuda, C. & Ikehara, M. (1990a). Role of cysteine residues in ribonuclease H from *Escherichia coli*: site directed mutagenesis and chemical modification. *Biochem. J.* 271, 59-66.
- Kanaya, S., Kohara, A., Miura, Y., Sekiguchi, A., Iwai, S., Inoue, H., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1990b). Identification of the Amino Acid Residues Involved in an Active Site of *Escherichia coli* Ribonuclease H by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 265, 4615-4621.
- Kanaya, S., Katayanagi, K., Morikawa, K., Inoue, H., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1991a). Effect of mutagenesis at each of five histidine residues on enzymatic activity and stability of ribonuclease H from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 198, 437-440.
- Kanaya, S., Katsuda, C., Kimura, S., Nakai, T., Kitakuni, E., Nakamura, H., Katayanagi, K., Morikawa, K. & Ikehara, M. (1991b). Stabilization of *Escherichia coli* Ribonuclease H by Introduction of an Artificial Disulfide Bond. *J. Biol. Chem.* 266, 6038-6044.

- Katayanagi, K., Miyagawa, M., Ishikawa, M., Matsushima, M., Kanaya, S., Ikehara, M., Matsuzaki, T. & Morikawa, K. (1990). Three-dimensional structure of ribonuclease H from *E. coli*. *Nature (London)* 347, 306-309.
- Katayanagi, K., Miyagawa, M., Matsushima, M., Ishikawa, M., Kanaya, S., Nakamura, H., Ikehara, M., Matsuzaki, T. & Morikawa, K. (1992). Structural details of ribonuclease H from *Escherichia coli* refined to an atomic resolution. *J. Mol. Biol.* In press.
- Landschulz, W. H., Johnson P. F. & McKnight, S. L. (1988). The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Levitt, M. & Chothia C. (1976). Structural patterns in globular proteins. *Nature (London)* 261, 552-557.
- Luzzati, V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la determination des structures cristallines. *Acta Crystallogr.* 5, 802-810.
- Maki, H., Horiuchi, T. & Sekiguchi, M. (1983). Structure and expression of the *dnaQ* mutator and the RNase H genes of *Escherichia coli*: Overlap of the promoter regions. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 7137-7141.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- Mauguen, Y., Hartley, R.W., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Bricogne, G., Chothia, C. & Jack, A. (1982). Molecular structure of a new family of ribonucleases. *Nature (London)* 297, 162-164.
- Messerschmidt, A. & Pfligrath, J. W. (1987). Crystal orientation and X-ray pattern prediction routines for area-detector diffractometer systems in macromolecular crystallography. *J.*

- Appl. Crystallogr.* 20, 306-315.
- Miller, H. I., Riggs, A. D. & Gill, G. N. (1973). Ribonuclease H (Hybrid) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248, 2621-2624.
- Nakamura, H. & Wada, A. (1985). Nature of the Charge distribution in Proteins. III. Electron Multipole Structures *J. Phys. Soc. Jpn.* 54, 4047-4052.
- Nakamura, H. & Nishida, S. (1987). Numerical Calculations of Electrostatic Potentials of Protein-Solvent Systems by the Self Consistent Boundary Method. *J. Phys. Soc. Japan.* 56, 1609-1622.
- Nakamura, H., Katayanagi, K., Morikawa, K. & Ikehara, M. (1991a). Structural models of ribonuclease H domains in reverse transcriptases from retroviruses. *Nucl. Acids Res.* 19, 1817-1823.
- Nakamura, H., Oda, Y., Iwai, S., Inoue, H., Ohtsuka, E., Kanaya, S., Kimura, S., Katsuda, C., Katayanagi, K., Morikawa, K., Miyashiro, H. & Ikehara, M. (1991b). How does Ribonuclease H recognize a DNA/RNA hybrid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88, 11535-11539.
- Nishikawa, K. & Ooi, T. (1986). Amino acid sequence homology applied to the prediction of protein secondary structures, and joint prediction with existing methods. *Biochim. Biophys. Acta* 871, 45-54.
- Nishikawa, K., Ooi, T., Isogi, Y. & Saito, N. (1972). Tertiary Structure of Proteins. I. Representation and Computation of the Conformations. *J. Phys. Soc. Jpn.* 32, 1331-1337.
- North, A. C. T., Phillips, D. C. & Matthews, F. S. (1968). A Semi-Empirical Method of Absorption Correction. *Acta Crystallogr. sect. A*, 24, 351-359.

- Oas, T. G., McIntosh, L. P., O'Shea, E. K., Dahlquist, F. W. & Kim, P. S. (1990). Secondary Structure of a Leucine Zipper Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 29, 2891-2894.
- Oda, Y., Nakamura, H., Kanaya, S. & Ikehara, M. (1991). Binding of metal ions to *E. coli* RNase HI observed by ^1H - ^{15}N hetero-nuclear 2D NMR. *J. Biomolec. NMR*, 1, 247-255.
- Oefner, C. & Suck, D. (1986). Crystallographic Refinement and Structure of DNase I at 2A resolution. *J. Mol. Biol.* 192, 605-623.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 7, 95-99.
- Richards, F. M. & Wyckoff, H. W. (1971). Bovine Pancreatic Ribonuclease. In 'The Enzymes' Vol.4 (Boyer, P. D., ed.), pp. 647-806, Academic Press, New York.
- Shannon, R. D. (1976). Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallogr. sect. A*, 32 751-767.
- Steigemann, W. (1974). Die Entwicklung und Anwendung von Rechenverfahren und Rechenprogrammen zur Strukturanalyse von Proteinen am Beispiel des Trypsin-Trypsininhibitor Komplexes, des freien Inhibitors und der L-Asparaginase. *Ph. D. thesis, Technical University of Munich, F.R.G.*
- Stein, H. & Hausen, P. (1969). Enzyme from calf thymus degrading the RNA moiety of DNA:RNA hybrids: Effect on DNA dependent RNA polymerase. *Science* 166, 393-395.
- Suck, D., Oefner, C. & Kabsch, W. (1984). Three-dimensional structure of bovine pancreatic DNase I at 2.5A resolution.

- EMBO J.* 3, 2423-2430.
- Suck, D. & Oefner, C. (1986). Structure of DNase I at 2.0A resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature (London)* 321, 620-625.
- Suck, D., Lahm, A. & Oefner, C. (1988). Structure refined of a nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. *Nature (London)* 332, 464-468.
- Sugio, S., Amisaki, T., Onishi, H. & Tomita K.-I. (1988). Refined X-Ray Structure of the Low pH Form of Ribonuclease T₁-2'-Guanylic Acid Complex at 1.9 A Resolution. *J. Biochem.* 103, 354-366.
- Varmus, H. (1988). Retroviruses. *Science* 240, 1427-1435.
- Venkatachalam, C. M. (1968). Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V. Conformation of a System of Three Linked Peptide Units. *Biopolymers* 6, 1425-1436.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B. & McKnight, S.L. (1989). Scissors-Grip model for DNA Recognition by a Family of Leucine Zipper Proteins. *Science* 246, 911-916.
- Wada, A. (1963). THE α -HELIX AS AN ELECTRIC MACRO-DIPOLE. *Adv. Biophys.* 9, 1-63.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951.
- Wang, A. H.-J., Fujii, S., van Boom, J. H., van der Marel, G. A., van Boeckel, S. A., & Rich, A. (1982). Molecular Structure of r(GCG)d(TATACGC): a DNA-RNA Hybrid Helix Joined to Double Helical DNA. *Nature (London)* 299, 601-604.
- Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T. & Case, D. A. (1986).

An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. *J. Comput. Chem.* 7, 230-252.

Yamazaki, T., Yoshida, M., Kanaya, S., Nakamura, H. & Nagayama, K. (1991). Assignments of Backbone ^1H , ^{13}C , and ^{15}N Resonances and Secondary Structure of Ribonuclease H from *Escherichia coli* by Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy. *Biochemistry* 30, 6036-6047.

Yang, W., Hendrickson, W. A., Crouch, R. J. & Satow, Y. (1990). Structure of Ribonuclease H Phased at 2 Å Resolution by MAD Analysis of the Selenomethionyl Protein. *Science* 249, 1398-1405.

