

・論文題目

Development of real-time NMR monitoring method and elucidation of the deamination mechanism of APOBEC3G (リアルタイム NMR モニタリング法の開発及び APOBEC3G の脱アミノ化機構の解明)

・氏名

神庭圭佑

・論文内容の要約

ヒト APOBEC3G タンパク質 (A3G) は一本鎖 DNA 中のシトシン(C)をウラシル(U)に変換する脱アミノ化酵素である。この脱アミノ化活性により A3G は HIV-1 のゲノムに変異を導入し無力化する抗ウイルス因子として機能する。A3G の脱アミノ化反応は配列選択性が高く、CC 配列を CU に脱アミノ化する。特にシトシントリプレット (CCC) 配列の3番目のシトシンに対し強い活性を示す。標的配列が複数ある場合、A3G は 5'端に近い標的配列ほどより強く脱アミノ化する (3'→5' polarity)。本研究では脱アミノ化反応を NMR 法で実時間計測する「リアルタイム NMR モニタリング法」を用いて、A3G の作用機序を明らかにすることを目的とした。さらに、リアルタイム NMR モニタリング法を複数分子が関与し得る複雑な系や、シトシンの誘導体に応用した。

第2章では、リアルタイム NMR モニタリング法を用いて A3G の脱アミノ化反応を実時間追跡する例を示した。シトシンのシグナル強度、ウラシルのシグナル強度の経時変化から、この反応を1次反応とみなし、速度定数を A3G の脱アミノ化活性の指標とした。1つの CCC 配列を含む 10-mer の DNA を基質としたとき、それぞれのシトシンに対する脱アミノ化活性を評価したところ、1番目のシトシンは全く脱アミノ化されず、3番目のシトシンは2番目のシトシンの約 30 倍脱アミノ化されやすいことを示した。

A3G と ssDNA の相互作用は高度に動的なうえ、互いの結合が弱い (解離定数 100 μ M~1 mM 程度) ため、いくつかのグループにより A3G 単体の構造が決定されているにも関わらず、A3G による CCC 配列の認識機構及びスライディング時における A3G-ssDNA 相互作用機構については、未だ明らかとなっていなかった。第3章ではリアルタイム NMR モニタリング法を用いて脱アミノ化の際に A3G が DNA のどの部分と相互作用するのかを明らかにした。CCC 配列を1つ含む一本鎖 DNA に関し、一残基ずつ系統的に RNA に置換して脱アミノ化活性を比較したところ、CCC とその前後1つを置換した際に顕著な活性の低下がみられた。これにより A3G は連続した5ヌクレオチドを認識することが明らかになった。二つの CCC をリンカーでつないだ一本鎖 DNA を基質として、3'→5' polarity に関する解析を行った。リンカー配列を RNA あるいは abasic DNA に置換しても、3'→5' polarity に変化は見られなかった。この結果は A3G の塩基認識とスライディングが独立な相互作用であることを示唆している。次に、1~500 mM の様々な NaCl 濃度で脱アミノ化活性を評価したところ、

脱アミノ化活性は NaCl 濃度が 30 mM 前後で極大となった。塩濃度が低いほど A3G-DNA 複合体の安定性及びスライディングの継続時間が増大する一方で、スライディング速度及びターンオーバーが減少すると考えられる。これらの 4 つの効果のかけ合わせによって、脱アミノ化活性が塩濃度に対してベル型の曲線となると解釈できる。また 3'→5' polarity は塩濃度が低いほど高い値を示した。以上の結果は、高塩濃度ではリン酸基が関与した静電相互作用が弱まり A3G が DNA から容易に脱落してスライディングが中断されてしまうが、低塩濃度では静電相互作用が強まりスライディングが有効に機能し、この結果高い 3'→5' polarity がもたらされたと解釈される。

第 4 章では脱アミノ化活性及び 3'→5' polarity に対する pH の効果を評価し、スライディングを含む A3G-ssDNA 相互作用機構の解明を試みた。pH2.5 から pH12.7 の範囲で CD スペクトルを測定したところ、pH4.0 から 10.5 の範囲で A3G は天然構造を持つことが明らかとなった。pH6.5 以上の pH において、脱アミノ化活性、及び 3'→5' polarity をリアルタイム NMR モニタリング法により評価したところ、pH の低下に伴い脱アミノ化活性、3'→5' polarity は増大した。この結果は pH 低下に伴い A3G と DNA の静電相互作用が強くなり、スライディングの効率が増大することを示唆している。また一見活性が消失している pH11.5 付近の高 pH についても A3G は 3'→5' polarity を保持していた。この結果は高 pH においても A3G がスライディングする能力を有していること、またスライディングには複数の塩基性アミノ酸が関与することを示唆している。

HIV-1 は A3G に対する防御機構を有しており、HIV-1 の有する Vif タンパク質が A3G を無力化する因子だということがわかっている。Vif はヒト E3 ライゲースと複合体を形成する (Vif 複合体)。Vif は A3G と直接結合し、A3G を Vif 複合体に取り込むことにより、A3G をユビキチン化し破壊する。第 5 章では Vif との相互作用に関与している領域を含まない A3G を用いて、この Vif 複合体の存在下で脱アミノ化活性をリアルタイム NMR モニタリング法により評価した。その結果 Vif 複合体が A3G の脱アミノ化活性及びスライディングを阻害することが示された。

近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる修飾塩基 (5-メチルシチジン ; 5mC、5-ヒドロキシメチルシチジン ; 5hmC) も A3G の基質となることが示唆されている。第 6 章では、A3G がこれらの修飾塩基を脱アミノ化するかどうかをリアルタイム NMR モニタリング法により検証した。その結果 A3G が 5mC を脱アミノ化することを世界で初めて検出できた。一方 5hmC は脱アミノ化されない事も分かった。リアルタイム NMR モニタリング法は A3G のみならず酵素反応一般についても有効と考えられる。