

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	神庭 圭佑
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)		
(論文内容の要旨)			
<p>生物が有する酵素は、非常に高い触媒活性を有しており、バイオマスからバイオエネルギー及び化学製品の原料を効率的に取り出すのに有用である。酵素反応を分子・原子の分解能でリアルタイムでモニタリングすることができれば、酵素反応を理解し、その知見に基づいて酵素を有効に活用するのに役立つ。本論文は、酵素反応を NMR シグナルを用いてリアルタイムでモニタリングする方法論を開発し、同法を抗 HIV 活性を有する APOBEC3G タンパク質 (A3G) による核酸塩基の脱アミノ化機構の解明に応用した結果をまとめたもので、7 章からなっている。</p> <p>第 1 章は序論で、生物が有する酵素が非常に高性能の触媒であり、その反応をリアルタイムで追跡することができれば、反応に関する理解が深まり、酵素を活用する上で有益な情報が得られることを指摘している。研究対象の酵素である A3G が、脱アミノ化反応によって HIV の遺伝情報を破壊し、抗 HIV 活性を示すことを説明している。その上で A3G の脱アミノ化反応に関し、NMR シグナルを用いてリアルタイムで追跡することで、反応機構に関する新たな知見を得るという本論文の目的を述べている。</p> <p>第 2 章では、A3G による脱アミノ化反応を、NMR シグナルを用いてリアルタイムでモニタリングする手法を説明している。A3G とその基質である 1 本鎖 DNA を NMR 試料管に入れ、NMR スペクトルを連続的に測定すると、基質のシグナル強度の減少及び反応産物のシグナル強度の増大に基づいて、酵素反応をリアルタイムでモニタリングできることを示している。本法により A3G は、1 本鎖 DNA 中において C が 3 つ連なった CCC 配列における 3 番目の C を、優先的に脱アミノ化して U に変換することを示した。</p> <p>第 3 章では、1 本鎖 DNA 中の各デオキシヌクレオチドを、1 残基ずつリボヌクレオチドないしは塩基を欠出したデオキシヌクレオチドに置換したキメラ DNA を基質として用いて、A3G による酵素反応を本法によって解析した。その結果、A3G は CCC 配列とその前後の各 1 残基からなる計 5 残基の部位と相互作用して酵素反応を生じることを明らかにした。また、イオン強度を系統的に変化させた際の反応速度を本法によって解析することによって DNA のリン酸基の負電荷と A3G の正電荷の間の静電相互作用が関与していることを明らかにした。これは、これまでに示唆されている A3G は DNA 上をスライディングしながら標的の C を見出して反応に至る機構を支持するものである。</p> <p>第 4 章では、pH を系統的に変化させた際の反応速度を本法によって解析することによ</p>			

て、静電相互作用が関与するスライディング機構に関するさらなる知見を得た。

第 5 章では、ヒト細胞において A3G を無効化する HIV 由来のタンパク質である Vif を NMR 試料管内に共存させて、A3G による脱アミノ化反応を本法によって解析した結果、Vif が脱アミノ化反応を阻害することを見出した。Vif による阻害は、Vif が DNA 上の A3G 結合部位をマスクすることと、Vif が A3G に結合して酵素活性を直接抑制することの両者によって生じている可能性を指摘した。Vif は、これまで言われていた A3G をユビキチン化して分解することに加え、A3G による酵素反応を阻害することによっても、A3G を無効化することを見出した。

第 6 章では、遺伝子の発現を後天的に調節する機能を有する修飾塩基である 5-メチルシトシン(5mC)を、A3G が脱アミノ化してチミン(T)に変換することを本法によって初めて見出した。生じた T は、ミスマッチ塩基対の修復酵素群によって、5-メチル基が消失した通常の C に置き換わることが提唱されている。従って今回得られた結果は、A3G は 5mC から C への回帰を促進することで、遺伝子の後天的な調節にも関与していることを示唆した。

第 7 章では、A3G の反応機構に関して本論文で得られた成果を要約して結論を述べた上で、本法が他の酵素の反応解析にも有用であることを指摘し、本法の更なる活用に向けた展望を論じた。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生物が有する酵素は、非常に高い触媒活性を有しており、バイオマスからバイオエネルギー及び化学製品の原料を効率的に取り出すのに有用である。酵素反応を分子・原子の分解能でリアルタイムでモニタリングすることができれば、酵素反応を理解し、その知見に基づいて酵素を有効に活用するのに役立つ。本論文は、酵素反応を NMR シグナルを用いてリアルタイムでモニタリングする方法論を開発し、同方法を抗 HIV 活性を有する APOBEC3G タンパク質(A3G)による核酸塩基の脱アミノ化機構の解明に応用した結果をまとめたもので、得られた主な成果は次のとおりである。

1. A3G が核酸塩基シトシン(C)を脱アミノ化してウラシル(U)に変換する反応を、NMR シグナルを用いてリアルタイムでモニタリングする手法を開発した。A3G とその基質である 1 本鎖 DNA の NMR スペクトルを連続的に測定し、反応産物及び基質シグナル強度の増減に基づいて、酵素反応をリアルタイムでモニタリングすることにより、塩基置換反応の速度定数を得た。本法によって、A3G は 1 本鎖 DNA 中において C が 3 つ連続した CCC 配列における 3 番目の C を、優先的に脱アミノ化して U に変換することを示した。
2. 1 本鎖 DNA 中のデオキシリボース残基をリボース残基や塩基を欠出した残基に置換したキメラ DNA の脱アミノ化反応を本法によって解析した。その結果、A3G は CCC 配列とその前後の各 1 残基からなる計 5 残基と相互作用して酵素反応することを明らかにした。
3. A3G 反応溶液のイオン強度及び pH を系統的に変化させた際の反応速度を解析することによって、DNA のリン酸基の負電荷と A3G の正電荷の間の静電相互作用が関与した DNA 上のスライディングを行いながら、標的の C を見出して反応に至る機構を明らかにした。
4. ヒト細胞において A3G を無効化する HIV 由来のタンパク質である Vif が、これまで言われていた A3G をユビキチン化して分解することに加え、A3G による脱アミノ化反応を阻害することを明らかにした。
5. 遺伝子の発現を後天的に調節する機能を有する修飾塩基 5-メチルシトシン(5mC)を、A3G が脱アミノ化してチミン(T)に変換することを本法によって初めて見出した。これにより A3G は遺伝子の後天的な調節にも関与していることを示唆した。

以上本論文は、NMR 法を用いて酵素反応をリアルタイムでモニタリングする手法を開発し、これを応用することで A3G の脱アミノ化反応機構に関する新たな知見を示した。本法は、バイオマス分解酵素等の他の酵素にも応用が可能であり、エネルギー科学の研究に寄与するところ大である。よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 28 年 4 月 27 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2017年5月28日以降