

疾病関連タンパク質、機能性核酸及びバイオマスの構造生物学

片平正人

京都大学エネルギー理工学研究所

私は主に NMR 法を用いた構造生物学的な研究を行っています。今回は抗 HIV 活性を有するヒトのタンパク質及びプリオンタンパク質を捕捉する RNA アプタマーに関する最近の成果をご紹介します。またバイオマス研究への NMR 法の応用に関しても触れたいと思います。

私はこれまでに学生として三つの大学、ポスドクとして一つの大学、大学教員として三つの大学を経験してきました。色々な大学を経験するに至った経緯や、研究室が変わる事のメリット・デメリット等に関しても少し話したいと思います。

①抗 HIV 活性を有する A3G タンパク質の酵素活性の NMR シグナルを用いたリアルタイムモニタリング -DNA 上の極性を有したタンパク質のスライディング-HIV はヒトに感染後、自らのゲノム RNA を鋳型にマイナス鎖 DNA を合成し、その後これを 2 本鎖 DNA としヒトのゲノムに組み込む。ヒトの APOBEC3G(A3G)タンパク質は HIV のマイナス鎖 DNA に作用し、シトシンをデアミネーションする事でウラシルに変換する酵素である。塩基の変換により HIV のゲノム情報を破壊する事で、A3G は抗 HIV 活性を発揮する。我々は A3G の立体構造及び 1 本鎖 DNA との相互作用様式を、NMR 法によって決定した。さらに NMR シグナルを用いる事で、デアミネーション反応をリアルタイムでモニタリングできる事を初めて示した(EMBO J., 2009)。

この手法はこれまで用いられていた生化学的手法に比べ、デアミネーションが生じている箇所をより高い空間分解能で特定でき、またリアルタイムでのモニタリングである為、反応過程を時間分解で追跡できるという優位性を有している。酵素反応を生じさせる際の温度、基質と酵素の濃度や比率等を調整する事で、反応速度をモニタリングに適した速度にする事ができる。これによって解析可能な対象過程を広げ、反応の動的メカニズムにより踏み込む事ができる。今回この手法を応用し、A3G の反応機構の本質を理解する事を目指した結果について報告する。

A3G によるデアミネーション反応の基質となる配列を 2 つ有した 1 本鎖 DNA を調製した。これに A3G を作用させデアミネーションによるシトシンからウラシルへの変換反応を、シトシン及びウラシルの NMR シグナルの強度をモニターする事によって追跡した。その結果、5'端寄りの基質配列中のシトシンのピークの強度がより早く減衰・消失し、それに対応してウラシルのピークがより早く出現・増大する事が分かった。即ち DNA の 5'端寄りに配置された基質配列中のシトシンの方が、同 3'端寄りに配置された基質配列中のシトシンよりも、早くデアミネーションされる事が分かった。この結果は、A3G が 1 本

鎖 DNA 上で 3'→5'の極性を有してスライディングしながらデアミネーション反応を起こす、確率論的に 5'端寄りの基質配列においてより高い頻度で塩基の変換が生じたのだと考える事で、合理的に解釈される。このような極性を有したスライディングは、HIV のゲノムにより多くの変異を入れて不活化する上で、有利に働くと考えられる。

②プリオンタンパク質を捕捉する RNA 分子(RNA アプタマー)の立体構造とプリオンタンパク質との相互作用の解析-プリオンタンパク質を捕捉するメカニズムの解明-

r(GGAGGAGGAGGA) (以下 R12)という RNA 分子は、プリオンタンパク質を高い親和性で捕捉する。我々は R12 の立体構造を決定した。構造は非常に特異なものであった。グアニン塩基 4 個が一平面上に並び、互いに水素結合のネットワークで連結された構造体(テトラッド)と、グアニン塩基 4 個とアデニン塩基 2 個の合計 6 個の塩基が一平面上に並び、互いに水素結合で連結された構造体(ヘキサッド)が、RNA アプタマー分子中に見出された。また RNA の主鎖のトポロジーから見ると、平行型の 4 重鎖構造が形成されている事も分かった。さらに溶液中において、2つの RNA アプタマー分子が tail-to-tail で結合してダイマーを形成している事も判明した。次にプリオンタンパク質のどの部位が結合に関与するのかを調べたところ、2つの結合部位が見出された。立体構造決定とこの結果より高い親和性は、(i)静電相互作用、(ii)トリプトファンと塩基とのスタッキング相互作用、(iii)2か所での同時結合、によってもたらされている事が判明した(Nucleic Acids Res., 2009)。この RNA アプタマーのプリオン病及びアルツハイマー病の治療への応用の可能性について言及する。

③木質バイオマスの有効活用法の開発を志向した構造生物学的なアプローチ

本来固体である木材を、溶液の NMR 法によって研究できる事が分かってきた。この事を利用して、木質バイオマスの有効活用法の開発を目指した最近の我々の研究を簡単に紹介する。

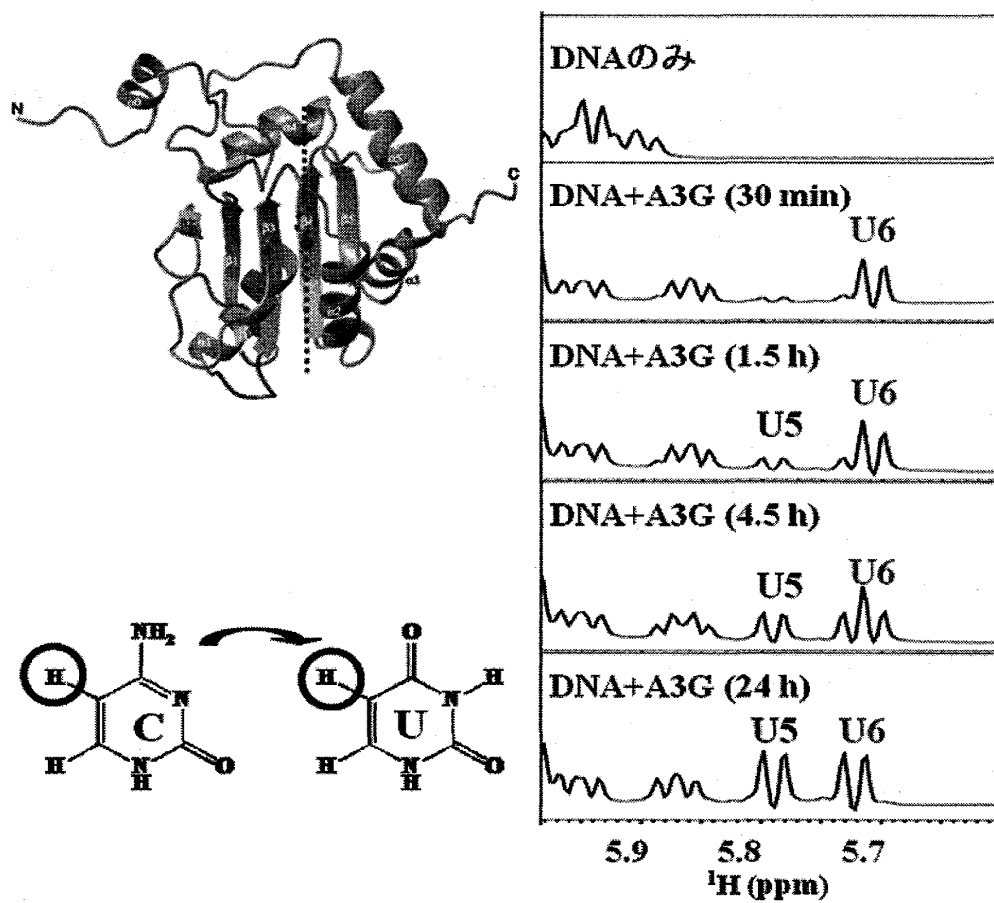


図 (左上)A3G タンパク質の立体構造、(左下)脱アミノ基によるシトシンからウラシルへの塩基変換、(右)塩基変換反応のリアルタイムモニタリング。