

インテリジェント生物素子の創製

片平正人

横浜市立大学・国際総合科学研究科

本さがけ研究においては、まわりのイオン環境を感知して動作する自律的な核酸酵素の創製と、核酸性人工イオンチャネルの創製にチャレンジした。前者に関しては、イオン濃度に依存して核酸酵素の活性をオフからオンにする事に成功した。後者に関しては、核酸がイオンの運び手として機能している事を示唆する結果を得る事ができた。またロングレンジの構造情報を抽出する事によって、マルチドメインからなる生体分子の構造決定に成功した。さらに NMR 法による酵素反応のリアルタイムモニタリングにも成功した。

①まわりのイオン環境を感知して動作する自律的な核酸酵素の創製

d(GGAGGAGGAGGA)(以下 d(GGA)₄)という配列からなる DNA が、カリウムイオン非存在下では 1 本鎖状態で伸びた構造をとるが、カリウムイオン存在下では 4 重鎖構造を形成してコンパクトな構造を形成する事を見出した。酵素を 2 つのサブユニットに分割し、各々を d(GGA)₄ の両端に連結したものを作成する。カリウムイオン非存在下では d(GGA)₄ が伸びた構造をとるので、2 つのサブユニットは離れて存在し、酵素活性は生じない。一方カリウムイオン存在下では d(GGA)₄ がコンパクトな構造をとる為、2 つのサブユニットは近接し、酵素活性が生じるのではないかと考えた(図1)。酵素としては、DNA でありながら基質 RNA を切断する活性を有する分子であるデオキシリボザイムを用いた。デオキシリボザイムを2つに分割するポイント及び d(GGA)₄ とサブユニットの間に挿入するリンカーについて様々試した結果、カリウムイオン非存在下では切断活性を有しないが、カリウムイオンを添加すると切断活性を生じる分子を創製する事に成功した。

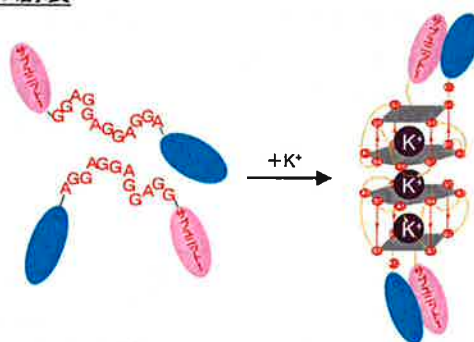


図1 活性のスイッチングの原理
(左:オフ, 右:オン)

d(GGA)₄ の RNA 版である r(GGAGGAGGAGGA)(以下 r(GGA)₄)の構造を NMR 法によって決定した。r(GGA)₄ と d(GGA)₄ とでは構造に違いが見られたが、両者における糖の構造の違いに基づいてそれは合理的に理解できた。一方 d(GGA)₄ と同様に r(GGA)₄ の 5'端と 3'端は近接している事が分かったので、r(GGA)₄ もスイッチング素子として応用できると考えられる。r(GGA)₄ にリボザイム(RNA でありながら酵素活性を有する分子)を連結する事で、本法の応用範囲が大きく広がる。現在この研究を進行させている。また本法をアプタマー(特定の分子に高い親和性を示す DNA ないしは RNA)に適用すれば、活性がスイッチングするアプタマーが創製できる可能性もある。細胞外におけるカリウムイオンの濃度は低く、一方細胞内におけるカリウムイオン濃度は高い。従って本法によって創製された分子は、細胞外においては無用な活性を発現せず、従って副作用を引き起こす事がなく、一方働くべき場である細胞内においては、必要とされる活性を発現すると期待される。働くべき環境を感知して活性を発現する自律的な分子の創製に向けた道筋が、本研究によって示されたと考えられる。

②核酸性人工イオンチャネルの創製

染色体の末端に位置し、老化・癌化との関連が注目されているテロメア DNA の構造を NMR 法によって決定した。そして従来予想されていたものとは異なる新規の 4 重鎖構造を見出した。

4 重鎖構造中においてイオンがトラップされている様子は、タンパク質性のイオンチャネルにおいてイオンがトラップされている様子と酷似している事に気づいた。そしてそれならば 4 重鎖核酸が、核酸性のイオンチャネルとして動作するのではないかと思いついた。リボソームに 4 重鎖核酸を組み込み、核酸を通じたイオンの流れの有無を以下の 2 つの方法によって検証した。(i)細胞に匹敵する大きさであるジャイアントリボソームを調製し、

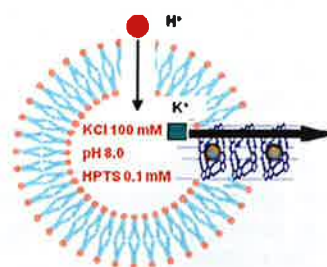


図2 核酸 4 重鎖がイオンチャネルとして動作するかの検証法

リポソーム内に特定のイオンとその蛍光指示薬を内封した。これを蛍光顕微鏡で時間を追って観察する事で、核酸を通じたイオンの流れの有無を検証した。(ii)外液に比べてカリウムイオン濃度とpHが高い溶液を、蛍光性pH指示薬と共にリポソームに内封する。ここにプロトンイオンフォアを添加する。核酸を通じた内側から外側へのカリウムイオンの流出とそれに共役した外側から内側へのプロトンの流入が生じれば、内液のpHが低下すると予想される(図2)。蛍光強度を時間を追って測定する事で、核酸を通じたイオンの流れの有無を検証した。(i)、(ii)いずれの方法においても、核酸を通じたイオンの流れを示唆する結果が得られた。

③ロングレンジの構造情報を用いたマルチドメインからなる生体分子の構造決定

自律的な核酸酵素の創製には、立体構造に関する情報が必要となる。核酸酵素は通常マルチドメインから成っている。NMR法による通常の構造決定においては、NOEから求められる上限5Å程度の距離情報が用いられるが、これでは各ドメインの相対配置を決める事はできない。2つのドメインからなるMusashiタンパク質とその標的RNAの複合体をモデルケースに、この様な系の構造決定を行った。

S-S結合を介してタンパク質中のシステイン残基とMTSLを結合して、NOラジカルを導入した。ラジカル電子による常磁性緩和促進(PRE)に基づいて、上限30Å程度の距離情報が抽出できた。また複合体をポリアクリルアミドゲルによって配向させ、残余双極子結合(RDC)を測定した。複合体中のNHないしはCHベクトルがある共通のフレーム(配向テンソル)に対してどの様な角度をなしているのかが、RDCから分かる。従ってこれも原理的にロングレンジの構造情報である。これらの情報に基づいて複合体の構造決定を行なった。その結果、十分な精度でマルチドメインからなる生体分子の立体構造を決定できる事が分かった。

④NMRシグナルを用いた酵素反応のリアルタイムモニタリング

酵素反応をNMR試料管内で生じさせ、それをNMRシグナルを用いてモニターする事を試みた。モデルケースとして、抗HIV活性を有する宿主タンパク質であるAPOBEC3Gが標的1本鎖DNA(HIVのマイナス鎖DNA)の中のシチジンをデアミネーションしてウリジンに変換する酵素反応を取り上げた。

ウリジン(及びシチジン)の5位の水素及び炭素のシグナルをモニターする事で、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見出した。APOBEC3Gは、シチジンが複数個連続した配列を標的とする。シチジンが3つ連続している場合、3'端に位置するシチジンが早い段階でデアミネーションされ、その後かなり遅れて中央に位置するシチジンがデアミネーションされる事が、今回分かった。5'端に位置するシチジンは全くデアミネーションされない事も分かった。この様にデアミネーションは、3'→5'の厳密な順番をもって進行する事が分かった。APOBEC3Gは、DNA上を3'→5'の方向にスライディングしながらデアミネーション反応を行なう事が提唱されているが、今回得られた結果はこれと関係があると考えられる。本法はAPOBEC3Gによるデアミネーション反応の解析はもとより、今後様々なタンパク質の酵素反応のメカニズムの解明に応用できる。

発表論文

1. Gopinath, S.C.B., Matsugami, A., Katahira, M. and Kumar, P. K. R. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4874-4881. "Human vault-associated non-coding RNAs bind to mitoxantrone, a chemotherapeutic compound"
2. Matsugami, M., Xu, Y., Noguchi, Y., Sugiyama, H. and Katahira, M. (2007) *FEBS J.*, **274**, 3545-3556. "Structure of human telomeric DNA under physiological ionic conditions stabilized by proper incorporation of 8-bromoguanosines, as determined by NMR"
3. Matsugami, A., Ohyama, T., Inada, M., Inoue, N., Minakawa, N., Matsuda, A., Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1805-1812. "Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, revealed by NMR, and the implications as to the mechanism of nuclease-resistance"
4. Nagata, T., Takada, Y., Ono, A., Nagata, K., Konishi, Y., Nukina, T., Ono, M., Matsugami, A., Furukawa, A., Fujimoto, N., Fukuda, H., Nakagama, H. and Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6816-6824. "Elucidation of the mode of interaction in the UP1-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity"
5. Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2008) *EMBO J.*, in press. "Structure, interaction, and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G"