

RDC、PRE 及び PCS に基づいた Musashi-RNA 複合体と プリオンタンパク質に対する RNA アプタマーの構造とダイ ナミクス

¹横浜市立大学, ²理研, ³慶應大学, ⁴産総研, ⁵JST・PRESTO
大山貴子^{1,2}, 松上明正¹, 古川亜矢子¹, 真嶋司¹,
杉山孝司¹, 今井貴雄³, 岡野栄之³, 西川富美子⁴,
西川諭⁴, 山崎俊夫², 永田崇¹, ○片平正人^{1,4}

Structure and dynamics of Musashi-RNA complex and RNA aptamer for prion protein with RDC, PRE and PCS

Ohyama, T.^{1,2}, Matsugami, A.¹, Furukawa, A.¹, Mashima, T.¹, Sugiyama, T.¹, Imai, T.³, Okano,
H.³, Nishikawa, F.⁴, Nishikawa, S.⁴, Yamazaki, T.², Nagata, T.¹ and Katahira, M.^{1,4}

¹Yokohama City Univ., ²RIKEN, ³Keio Univ., ⁴AIST and ⁵JST・PRESTO

Structure of a Musashi protein, composed of two RNA-binding domains, in complex with the target RNA was successfully determined with the combination of short- and long-range structural information derived from NOE, RDC and PRE. The change in the arrangement of two RNA-binding domains upon complex formation with RNA was also sensitively detected with PRE. RNA aptamers for a prion protein obtained with *in vitro* selection turned out to frequently contain an r(GGAGGAGGAGGA) (RNA 12-mer) sequence. The structure of RNA 12-mer was determined. One RNA 12-mer molecule formed a quadruplex with G:G:G:G tetrad and G:A:G:G:A:G hexad planes, and a dimer is formed through hexad-hexad stacking. Comparison of the obtained structure with the previously determined structure of d(GGAGGAGGAGGA) revealed several interesting differences between RNA and DNA.

[NMR 試料管内における APOBEC3G タンパク質によるデアミネーションの実時間モニタ リング]

ヒトの APOBEC3G タンパク質は、逆転写で生成されたウィルスのマイナス鎖 DNA のシトシンをデアミネーションしてウラシルに変換する事で、ウィルス遺伝子を不活化する。こうして APOBEC3G タンパク質は、HIV 等のレトロウィルスによる感染に対する防御機構として機能している。今回、APOBEC3G のデアミネースドメインの構造決定、基質 DNA との相互作用様式の解析、及び酵素反応の実時間モニタリングに関して報告する(千葉工大・高久教授等との共同研究)。

今回研究対象とした天然型 APOBEC3G の構造は、溶解度を上げる為に 5 箇所に変異が導入された変異型 APOBEC3G の構造(Chen *et al.*, Nature (2008))と基本的に同一であった。但し天然型には、N 末側に α ヘリックス様のエレメントが余分に 1 つ存在していた。基質 DNA との相互作用様式を、ケミカルシフトパートバージョン法によって解析した。天然型と変異型とで同様なパートバージョンが見られる部位に加え、天然型でのみパートバージョンが見られる部位が存在する事が分かった。さらに、シトシンからウラシルへのデアミネーションを、NMR 試料管内において実時間でモニタリングできる事を見出した。このモニタリングの結果、基質 DNA 中の連続したシトシン残基に関して、まず 3'側のシトシンがデアミネーションされてウラシルに変換され、続いて 5'側のシトシンがデアミネーションされる事が分かった。

常磁性緩和促進, 擬コンタクトシフト, 残余双極子結合, RNA アプタマー,
RNA 結合タンパク質

おおやまたかこ, まつがみあきまさ, ふるかわあやこ, ましまつかさ,
すぎやまたかし, いまいたかお, おかのひでゆき, にしかわふみこ,
にしかわさとし, やまざきとしお, ながたたかし, かたひらまさと

[Musashi タンパク質-RNA 複合体の構造決定]

Musashi タンパク質は、2つの RNA 結合ドメインが協同して標的遺伝子の mRNA に結合することでその遺伝子の翻訳を抑制し、神経幹細胞の分化・未分化を制御している。Musashi-RNA 複合体におけるタンパク質部分の構造決定を行なった。NOE に基づいた短距離情報を用いた場合、2つの RNA 結合ドメイン各々の構造を決定する事はできたが、ドメイン間をまたがる距離情報の欠如の為、2つのドメインの相対配置を決定する事はできなかった。これに RDC(残余双極子結合)に基づいた配向情報を加味する事で、2つのドメインの相対配向は決定できたが、並進の自由度が依然残ってしまった。さらに PRE(常磁性緩和促進)に基づいた長距離情報を加える事で、2つのドメインの相対配置まで決定する事ができた。

常磁性中心はシステイン残基に MTSL を結合させる事で導入したが、その際システイン残基を1つだけ有する変異体を調製する必要がある。どのような変異体を調製した際に良好な結果が得られたのかについて、報告する。常磁性緩和速度 Γ_2 の取得に際しては、1タイムポイント法と、2タイムポイント法の2つを試したので、両方の長所・短所について報告する。また Γ_2 の値を距離に変換してから構造計算した場合と、 Γ_2 の値を直接用いて構造計算した場合の両方を試したので、それについても報告する。さらに、RNA の結合に伴う2つの RNA 結合ドメインの相対配置の変化を、PREによって敏感に検出する事ができたので、それについても報告する。

[プリオンタンパク質に対する RNA アプタマーの構造決定]

プリオンタンパク質は哺乳類全般で広く確認されており、狂牛病の原因となるタンパク質である。現在狂牛病に対する有効な治療方法は確立されていない。試験管内分子進化法によって、プリオンタンパク質に高い親和性を示す RNA 分子(RNA アプタマー)が得られた(西川他)。得られた RNA アプタマーの多くには、r(GGAGGAGGAGGA) (以下 RNA 12-mer)配列が含まれていた。そしてこの配列に変異を導入すると、RNA アプタマーのプリオンタンパク質に対する親和性が落ちる事も分かった。即ちプリオンタンパク質との結合に際して、RNA 12-mer が重要な役割を担っている。そこで今回、RNA 12-mer の構造を決定した。我々は以前今回の配列の DNA 版である d(GGAGGAGGAGGA) (以下 DNA 12-mer)の構造決定を行なっているので、それとの比較も行なった。

RNA 12-mer は生理的なイオン条件下で、4重鎖構造を形成する事が分かった。1つの RNA 12-mer 分子は、G:G:G:G テトラッド平面と G:A:G:G:A:G ヘキサッド平面からなる4重鎖を形成し、さらにヘキサッド平面同志のスタッキングによりダイマー構造をとる事がわかった。以前構造を決定した DNA 12-mer では、G:G:G:G テトラッド平面と G:A:G:A:G:A:G ヘプタッド平面からなる4重鎖がダイマーを形成していたが、RNA 版においては、A 残基の参画が1つ少ないヘキサッド平面が形成されている点に違いがあった。またダイマー中の2つのモノマーを関係づける2回軸の位置も、DNA 12-mer と RNA 12-mer とでは90°ずれている事が分かった。これはモノマー間のインターフェイスがヘプタッド(7角形)からヘキサッド(6角形)に変わった為に、最大のスタッキングを達成する為の配置が変わったとして、合理的に解釈できた。