

Brome mosaic virus ゲノム RNA 3'-UTR 由来のステムループの立体構造解析

¹千葉工業大学 工学部 生命環境科学科

²東京大学大学院 新領域創成科学研究科

○篠 阿弥宇¹, 三浦 謹一郎², 河合 剛太¹

Structural analysis of a stem loop from 3'-UTR in Brome mosaic virus genomic RNA
(¹Dept. Life Env. Sci., Fac. Eng., Chiba Inst. Tech., ²Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo)

○Amiu Shino¹, Kin-ichiro Miura², Gota Kawai¹

Brome mosaic virus (BMV) genomic RNA carries the tRNA-like structure (TLS) consisting of 155 nucleotide residues in its 3'-untranslated region (3'-UTR). The TLS is thought to be important for the replication of virus RNA. In the present study, we analyzed the tertiary structure of a stem loop of TLS, stem loop C (BMV-SLC), including an internal loop and an AUA trinucleotide loop. By using samples with ¹³C/¹⁵N stable isotopic labeling in nucleotide specific or residue specific manner as well as without labeling, the NMR signals were effectively analyzed. The simulated annealing calculation gave accepted structures with the r.m.s.d. values of 1.98 Å. To improve the convergence of the calculation, RDC values were measured and the structure calculation including RDC is in progress.

序論

RNA ウィルスにおいて、ウィルス RNA の立体構造がウィルスの複製に重要な役割を果たすと考えられている。Brome mosaic virus (BMV) ゲノム RNA の 3'末端には約 160 残基からなる tRNA-like structure (TLS) と呼ばれる構造が存在する (Fig. 1a)。TLS は複製に重要であることが示されているが、機能の詳細とそのメカニズムは明らかとなっていない。TLS の一部分である stem loop C は、内部ループと AUA トリループを持ち、レプリカーゼと相互作用すると考えられている。今回は、この stem loop C から NMR 法による解析を行うために 35 残基のステムループ RNA (BMV-SLC; Fig. 1b) をデザインし、立体構造の解析を行った。

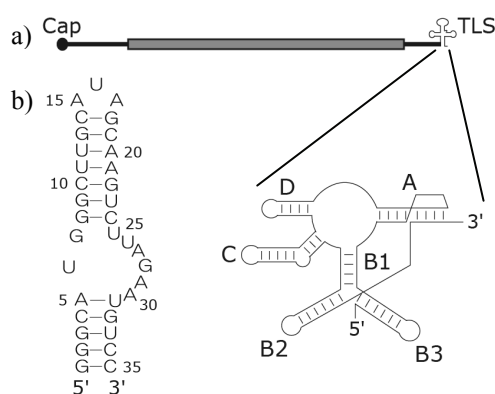


Fig. 1 a) BMV genomic RNA and TLS.
b) Secondary structure of BMV-SLC.

Keywords : RNA, 安定同位体標識, RDC

しの あみう, みうら きんいちろう, かわい ごうた

方法

[標識 RNA による NMR スペクトルの帰属]

塩基特異的標識: AmpliScribe™ T7-Flash Transcription Kit を用いて、試験管内転写合成法により BMV-SLC を調製した。¹³C/¹⁵N 安定同位体標識 NTP (大陽日酸) を用いて、アデノシン (A), ウリジン (U), グアノシン (G), シチジン (C) のそれぞれを標識した塩基特異的標識試料も合わせて調製した。

残基特異的標識: BMV-SLC の内部ループの配列を持つ 28 残基の RNA をデザインし、¹³C/¹⁵N 安定同位体標識アミダイト (大陽日酸) を用いて内部ループの 1 残基だけを標識した残基特異的標識試料を化学合成法により調製した。

NMR スペクトルの測定は、50 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中で、測定温度 293 K で行った。測定には主に 500 MHz および 600 MHz の NMR 分光計 (Bruker) を用いた。高分解能が必要な測定には 800 MHz の NMR 分光計 (CryoProbe 付, Bruker, 理化学研究所所有) を用いた。

[構造情報の抽出と立体構造計算]

NMR データの処理は XWIN-NMR (Bruker) で行った。構造情報の抽出には Felix97 (Accelrys) を用いた。立体構造の計算は、CNSver.1.1¹⁾を用い、Simulated Annealing (SA) 法で行った。

[RDC を用いた立体構造計算]

重水溶媒中の塩基特異的標識試料それぞれに Pfl phage (ASLA biotech) を 8~10 mg/ml 共存させて、残余双極子相互作用 (RDC) を計測した。RDC の計測には、non-decoupling SQC, TROSY, ¹H-decoupling SQC 等を用いた。また、RDC を用いた立体構造計算は XPLOR-NIH²⁾を用いて行った。

結果および考察

[標識 RNA による NMR スペクトルの帰属]

塩基特異的標識

非標識試料で重水中の NMR スペクトルを測定した結果、NOESY スペクトルでは H2/H6/H8-H5/H1' 領域でもシグナルの重なりが多く見られた (Fig. 2)。そこで塩基特異的標識試料を調製し、filtered-NOESY スペクトルや 3D HSQC-NOESY スペクトルによりシグナルの分離を図った。これにより多くのシグナルが帰属できた。しかし依然として、内部ループのいくつかの残基では、シグナルがブロードであったり、重なっていたりするために帰属が困難であった。

残基特異的標識

内部ループ部分の帰属を明確なものとし、かつ、NOE の距離情報を得るために、残基特異的標識試料を調製した。化学合成法の合成効率の問題から、BMV-SLC のシステムを切り詰めた 28 残基の短い RNA としたが、イミノプロトンスペクトルの比較から、変異部位の前後以外には化学シフト値の変化がなく内部ループを挟むシステムが BMV-SLC と同様に形成されていることが確認できている。さらに、重水中の NOESY

スペクトルの比較からも変異部位以外のシグナルには基本的に変化がないことを確認している。

A29 と A30 は NOE が非常にブロードで、また、A 同士が隣り合っているために塩基特異的標識試料では残基内のシグナルと残基間のシグナルの区別がつけられなかった。また、NOESY スペクトル上で、U25 の H6-H1' と H6-H5 および U31 の H6-H1' の NOE シグナルが重なっていると考えられた。特に U25 は全てのシグナルが塩基特異的標識試料だけでは帰属できなかった。そこで、A29, U25, U26, U31 を一残基ずつ標識した。U 標識については 0.5~1 mM と高濃度試料の調製に成功し、NOESY スペクトルの測定を行うことができた。各試料で filtered-NOESY を測定した結果、U25 のシグナルと U31 の残基内のシグナルは重なっていることがわかった。また、U26 においては H6-H5 と U25 からの残基間のシグナルが重なっていたことがわかった。一方、A 標識については 15 μ M と低濃度ではあったが、高感度 NMR 装置の利用によって、高分解能な SQC スペクトルが測定でき、 ^1H の化学シフトから帰属を行うことができた。A29 の帰属によって、前後の残基の帰属も行うことができた。

さらに、内部ループとステムの境目である U25 と U31 の標識試料のイミノプロトンスペクトルから、U25 は塩基対を形成しないこと、A5 と U31 が弱い塩基対を形成することがわかり、ステムとループを明確に分けることができた。

二種類の標識方法により、H2/H6/H8-H5/H1' 領域では U25 の前後で連鎖帰属することができ、H2/H6/H8/H5/H1' の間に観測されたほぼ全ての NOE シグナルを帰属できた。

NMR 法による RNA の立体構造解析は、帰属の難しさから、大きいものは分割するなどして 30 残基以下の試料を用いることも多いが、今回のように塩基特異的な標識と残基特異的な標識を併用することで、これまでよりも大きい RNA を一度に解析でき、構造解析のスピードアップが図れると考えられた。

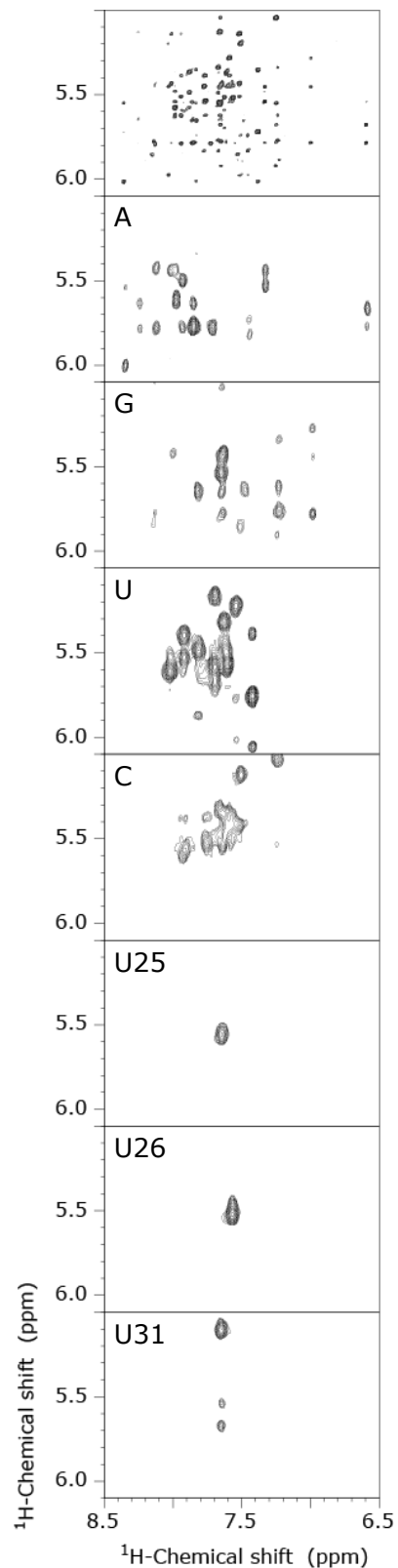


Fig. 2 2D NOESY spectra. H2/H6/H8-H5/H1' region was shown. Stable isotopic labeled nucleotide/residue was indicate each panel.

[構造情報の抽出と立体構造計算]

H2/H6/H8-H5/H1'領域以外の領域についても同様に帰属を行い、NOE から距離情報を抽出した。残基特異的に標識した3つのUについては、NOESY 上では重なっていたが、filtered-NOESY で分離して観測された NOE シグナルについては、距離情報として立体構造計算の拘束に入れることができた。また、HOHAHA スペクトルで H1'-H2'のシグナルが観測されていない残基はリボースのパッカリングを C3'-endo とし、強いシグナルが観測された残基は C2'-endo として、二面角情報を加えた。その他、イミノプロトンスペクトルの帰属結果から A 型らせんであることが推定できる領域については、水素結合や塩基対平面情報を加え、さらにステム部分に A 型らせんとグリコシド結合のまわりのコンホメーションの情報を拘束条件として加えて、立体構造計算を行った。

立体構造計算の結果、現在までに Fig. 3 の暫定構造が得られている。計算に用いた拘束条件を全て満たした構造のうち、エネルギーの低い10個の構造を重ね合わせたときの RMSD は 1.98 Åであった。

AUA トリループの構造は、12 残基のステムループの立体構造としてすでに報告されているが³⁾、今回得られた構造はそれとは異なるものであった。この違いは、A17 と G18 との間の NOE の帰属の違いによるものと考えられる。これは、特異的な標識による帰属と、高分解能な NMR スペクトルの必要性を示す結果であるといえるだろう。

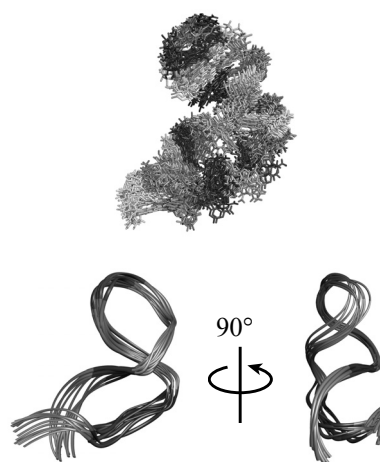


Fig. 3 Superposition of the 10 structures.

[RDC を用いた立体構造計算]

SA 法で得られた構造を片方のステムで重ね合わせると、内部ループの折れ曲がりによって各構造がずれていた。NOE の短距離情報のみでは、これ以上構造を収束させるのは難しいと考えられた。そこで、RDC を用いた計算を行った。RDC は、塩基特異的標識試料を用い、Pfl phase による配向を用いて計測した。塩基特異的標識試料を用いたためシグナルの重なりも少なく、全標識試料を用いる場合よりも多くの RDC を計測できた。現在、RDC を用いた立体構造計算を進めている。

- 1) Brunger, A. T., et al., *Acta Cryst.* **D54**, 905-921 (1998).
- 2) Schwieters, C. D., et al., *J. Magn. Reson.* **160**, 65-73 (2003).
- 3) Kim, C.-H., et al., *Nature Struct. Biol.* **7**, 415-423 (2000).