1L1615

HIV Tat タンパク質に対する RNA アプタマーによる分子捕捉のメカニズム

○松上 明正¹、小林 伸一郎¹、大橋 爾¹、上杉 晴一¹、山本利香²、西川 諭²、多比良 和誠³、クマール ペンメチャ²、片平 正人¹ (¹横浜国大・工、²王技院・生命研、³東大院・工)

HIV の Tat タンパク質は、HIV の TAR RNA に特異的に結合し、HIV の mRNA の合成レベルを上昇させる。天然の TAR RNA に比べ Tat を 100 倍強く結合する RNA 分子 (RNA アプタマー) が、試験管内分子進化法により得られた。この RNA アプタマーを用いて Tat を捕捉してしまう事により、エイズの遺伝子治療を行える可能性がある。Tat のモデル化合物として、アルギニンアミド、及び Tat のアルギニンリッチモチーフを含む 2 種の部分ペプチドを用い、この RNA アプタマーとの複合体の立体構造解析を行った。

どのモデル化合物を用いた場合にも、複合体形成に伴って RNA アプタマーには構造変化が生じ、U:A:U のベーストリプルが 2 個誘起された。ベーストリプルの形成は、水素結合を検出する NMR 法により直接的に実証された。アルギニンアミドとの複合体においては、二つのアルギニンアミド分子が RNA アプタマーに結合した。この複合体の構造決定を行った結果、二つの各ベーストリプルに隣接した G 残基とアルギニンアミドが主溝において水素結合を形成している事がわかった。ベーストリプルの形成は主溝を大きく広げ、アルギニンアミドが入り込む空間を確保するのに役立っていた。アルギニンアミドとベーストリプルを形成した U とのスタッキング相互作用によって、結合はさらに安定化されていた。一方部分ペプチドとの複合体においては、1 分子のペプチドが RNA アプタマーに結合した。ペプチドが結合する際には、ペプチド中の異なる 2 つのアルギニン残基が、アプタマー上の異なる部位で同時に RNA と相互作用している事を示唆する。塩基やリン酸基の化学修飾実験の結果ともあわせて、RNA アプタマーによる Tat 分子捕捉のメカニズムを考察する。

Akimasa Matsugami, Shin-ichiro Kobayashi, Kiyoshi Ohashi, Seichi Uesugi, Rika Yamamoto, Satoshi Nishikawa, Kazumari Taira, Penmetcha Kumar and Masato Katahira : Mechanism of molecular trapping by RNA aptamer for HIV Tat protein

1L1645

リン脂質と 2 価金属イオン (Mg²⁺、Ca²⁺) によって誘発される DNA 分子の高次構造変化

○佐藤 祐子¹、熊沢 紀之²、久留主 泰朗¹ (¹茨城大・院農・資源生物科学、²茨城大・工)

蛍光顕微鏡を用いた DNA 単分子の観察から、正電荷を有する界面活性剤との相互作用により、DNA 分子が伸びたコイル状態から縮んだグロビュル状態へと高次構造変化を起こすことが吉川らによって報告されている。本研究では生体膜成分であるリン脂質 PC[phosphatidylcholine] PS[phosphatidylserine] と DNA 分子との相互作用を単分子観察により検討した。PC あるいは PS をそれぞれ単独で添加しても、DNA 分子はコイル状態のまま変化しなかった。しかし、Mg²⁺あるいは Ca²⁺ が共存すると、PC あるいは PS の添加により DNA 分子はコイル状態からグロビュル状態へと変化した。この時、PC の方が PS より DNA を縮める効果が大きかった。Mg²⁺あるいは Ca²⁺のみを添加した場合には、DNA 分子の高次構造に変化は見られなかった。また、Mg²⁺あるいは Ca²⁺の濃度が高くなるに従って、DNA 分子のリボソームまたはキャスト膜への吸着率が高くなった。PC はリン酸基に負電荷を有しコリン基に正電荷を持つため、中性分子である。また、PS はリン酸基に負電荷を持ちセリン基に正と負の電荷を有するため、負に帯電している。DNA は負電荷を有する高分子であるため、これらのリン脂質は単独では DNA 分子と相互作用できない。Mg²⁺、Ca²⁺ は DNA 分子とリン脂質分子双方の負電荷に静電的に作用し、リン脂質分子の DNA 分子への吸着を可能にする。脂質分子が吸着した DNA 鎖は、脂質分子間の疎水相互作用により、コイル状態からグロビュル状態へと変化するものと考えられる。本研究は、DNA の膜透過機構を解明するための基礎的知見となりうる。

Y.Sato,N.Kumazawa,Y.Kurusu : Change of the high order structure of the DNA molecule induced phospholipid and bivalent metal ion

1L1630

DNA 高次構造と制限酵素に対する感受性の相関

○小穴 英廣¹、湊元 幹太²、吉川 祐子³ (¹京大院・理、²名大院・人間情報、³名文理・食物栄養)

spermidine によって凝縮させた lambda DNA (48502 bp) を制限酵素 Pvu I, EcoRI によってそれぞれ消化させ、消化の度合いをアガロースゲル電気泳動によって調べた。これまでに、DNA 溶液中の spermidine 濃度を増加させていくと、ある濃度を境に DNA 分子の形態がランダムコイル状態から非常にコンパクトな凝縮状態に一次相転移することが明らかとなっている。今回の我々の実験により、この DNA 分子の凝縮転移に対応して、DNA が急激に制限酵素の消化を受けにくくなることが明らかとなった。また、lambda DNA 分子の中央付近の制限酵素切断部位は、端に近い切断部位に比べて制限酵素の消化を受けにくいことが分かった。

H. Oana, K. Tsumoto, Y. Yoshikawa : Correlation between higher-order structure of DNA and the sensitivity to restriction endonucleases

1L1700

蛋白質・DNA 認識における塩基置換効果の予測 (V) Cro リプレッサーと核酸の特異的相互作用の解析

○大畠 玄久¹、王 翼飛²、河野 秀俊³、皿井 明倫² (¹名城大・理工、²理研・筑波研、³Dept. Chem., Univ. Pennsylvania)

我々は蛋白質と核酸の複合体の X 線構造解析とこの複合体の結合エネルギーが知られている λ リプレッサーを蛋白質と塩基間の特異的相互作用を調べるために解析してきた (1)。本研究では、Cro リプレッサーをターゲットとして選んだ。Cro リプレッサーの二量体は 17 個の塩基対から成り立っているオペレータ配列に違った強さで結合する。一方、オペレータの塩基配列を他の 3 種類の塩基で置換した一塩基置換 DNA と Cro リプレッサーの結合エネルギー変化 $\Delta \Delta G$ が明らかになっている。蛋白質と塩基間の相互作用エンタルピーを通常の分子力場のエネルギー (Amber 3.0A) から求めた。次に、複合体と水との接触表面積を使うことによって鎖のエントロピーと水和エネルギーを計算した (2)。この両者のエネルギーをたしあわせ、複合体を形成していない状態のエネルギーから差し引く事によって複合体形成の結合エネルギー ΔG を求めた。X 線の構造をもとに、塩基配列を他の 3 種類の塩基で置換した一塩基置換 DNA をモデリングし、その DNA と Cro リプレッサーの複合体の相互作用エネルギーの最小化の計算を行い構造を最適化した。この構造のエネルギーと実験値から得られる $\Delta \Delta G$ の塩基依存性をエネルギーの成分に分けて解析した。 λ リプレッサーの場合、 $\Delta \Delta G$ はクーロン相互作用並びに水素結合と相関していたが (1)、Cro リプレッサーの場合は異なった傾向がみられた。即ち、両蛋白質は共通の motif を持つ二量体であるが特異的に認識する相互作用は異なることがわかった。(1) 生物物理年会予稿集 Vol. 36 S67 (1996), Vol. 37 S34 (1997), Vol. 38 S165 (1998), Vol. 39 S168 (1999).(2) M. Oobatake and T. Ooi Prog. Biophys. Molec. Biol. 59. 237 (1993).

M. Oobatake, Y. Wang, H. Kono, A. Sarai : Anatomy of specific interactions between Cro repressor and operator DNA