NMR による RNA の立体構造解析

坂 本 泰 一

千葉工業大学工学部生命環境科学科 習志野市津田沼 2-17-1 (〒275-0016)

(2006年 3月23日 受理)

NMR Study of RNA Structure

Taiichi SAKAMOTO

Department of Life and Environmental Sciences, Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology,
2-17-1 Tsudanuma, Narashino-shi, Chiba 275-0016

(Received March 23, 2006)

Recently, it has become clear that RNA molecules have important or essential biological functions. In this review, the purpose for the analysis of the RNA structure by using NMR spectroscopy, the basis for the folding of RNA structure, and the methodology for the determination of the structure of RNA were described. Furthermore, our ideas and attempts for further technical developments were described. NMR investigation of RNA molecules will provide the basis of biological functions for many RNA molecules.

Keywords: NMR, RNA, structure

1. はじめに

近年、生命科学分野において RNA 分子が非常に注目されている^{1,2)}。そこで本総説では、何故 RNA が注目されているのか、そして何故 RNA の解析に NMR が有効なのかについて概説する。さらに、RNA の構造について簡単に紹介した後に、実際にどのように RNA の構造解析を行っているのかを説明する。最後に、NMR による RNA の構造解析について今後の展望を述べたいと思う。

RNA が DNA の遺伝情報とタンパク質の配列とを仲介するアダプター因子として発見されたのは、約半世紀前、Watson と Crick が DNA の二重らせん構造を発見したすぐ後のことである。アダプター因子は伝令 RNA (messenger RNA: mRNA) と呼ばれ、さらに転移 RNA (transfer RNA: tRNA)、リボソーム RNA (ribosomal RNA: rRNA) が発見された。やがて、タンパク質合成の際にはリボソーム上に結合した mRNA の遺伝暗号を tRNA が解読するという考えが確立し、タンパク質合成に関わる RNA の研究が始まった。しかし RNA は、その後何十年も、DNA の遺伝情報がタンパク質として発現される際の仲介役として認識されているに過ぎなかった。

70年代後半に真核生物におけるスプライシングが発見

されると、ただの仲介役であるという mRNA のイメージが変わってきた。さらに、1つの mRNA 前駆体から複数の成熟 mRNA が作り出される選択的スプライシングが発見された。また、ほぼ同時期に触媒活性を有する RNA 分子が発見された。その後、自己触媒的に切断反応および連結反応を行う RNA モチーフが複数発見され、触媒活性をもつこれらの RNA はリボザイム (RNA 酵素) と総称されるようになった。また、試験管内人工進化法 (SELEX 法) という、ランダムな RNA プールからある機能を持つ RNA を選択し濃縮する方法が考案され、様々な触媒活性を有するリボザイムが創生されている。このように、スプライシングとリボザイムの研究によって RNA が注目され始めると、生命の起源は RNA であるという RNA 起源説が唱えられるようになった。

近年では、X 線結晶構造解析によってリボソームの立体構造が明らかとなり、タンパク質合成を中心的に担っているのはタンパク質ではなく、RNA であることが明らかになった^{3,4)}。つまり、リボソームもリボザイムであることが明らかになったのである。一方、ヒトゲノムが解読されると、ヒトの遺伝子が約 3 万程度と予想以上に少なく、多様なタンパク質を生み出す mRNA の選択的スプライシングが非常に重要であることが明らかとなった。さら

に、ヒトの全 RNA の約98%がタンパク質をコードしていないという、驚くべき事実が明らかとなった⁵⁾。現在、このような RNA は non-coding RNA と呼ばれ、盛んに研究が進められており、私たちも non-coding RNA の構造解析に取り組んでいる。また、RNA が注目されているのは学術分野だけではなく、新たなテクノロジーを開拓し新産業を創成する可能性を有する機能分子として RNA が期待を集めている。現在、RNA 干渉 (RNAi) という現象を利用した医薬品の開発に期待が寄せられており、一方、人工進化 RNA を利用した医薬品開発も進んでいる^{6,7)}。人工進化 RNA は、2004年にアメリカで医薬品として認可されている。

このように、現在大変注目されている RNA であるが、立体構造解析はタンパク質に比べて遅れている。国際的な立体構造データベースである Protein Data Bank (PDB) の登録数をみると、RNA の構造については899個であるのに対し、タンパク質の構造については33,850個である (2006年3月)。さらに、RNA 単独の立体構造の登録数をみると、NMR によって決定されたものが264個であるのに対し、X線結晶構造解析によって決定されたものが182個であり、NMR で構造決定されたものの方が多いことがわかる。一方、タンパク質の場合には、NMR が4,459個でX線結晶構造解析の27,795個とくらべて著しく少ない。すなわち、タンパク質の場合にはX線結晶構造解析法は有効であるが、RNA の構造解析のためにはNMR法が有効なのである。これは、RNA の単結晶を作るのが大変難しいことに起因していると思われる。NMR法は、分子が大きくなると、データが複雑になり解析が難しくなるという不利な点があるが、部分的な柔軟性があったとしても、それ以外の部分の構造解析ができることや特定の部位に注目してその部位のデータのみを選択的に得ることができるという利点を持っている。

2. RNA の構造

DNA および RNA は、ヌクレオチドと呼ばれるモノマーユニットの重合体である。ヌクレオチドは、塩基、糖 (リボース) およびリン酸から構成されている (図1)。DNA と RNA の違いは、リボースの2'位がHであるかOHであるかという点である。また、DNA と RNA の塩基は、それぞれ「A (アデニン)、C (シトシン)、G (グアニン) と T (チミン)」または「A, C, G と U (ウラシル)」の4種類である。これらは、「A と U」または「A と T」および「G と C」間で水素結合により、Watson-Crick 型の塩基対を形成する (図2a と b)。RNA は二重結合が多く、窒素、酸素、およびリン原子を含むため、プロトンの密度がタンパク質に比べて低い。このため、¹H-NMR より得られる構造情報の数は、タンパク質の場合より少ない。

図1 RNA の構成単位と化学構造。

図2 RNA においてよくみられる塩基対。(a) A : U 塩基対 (b) G : C 塩基対 (c) G : U 塩基対 (d) G : A 塩基対。図中の丸で囲んだプロトンは軽水中の NMR 測定で観測されるイミノプロトン。

DNA と RNA は、Watson-Crick 型の塩基対を形成し、さらに塩基対がスタッキングすることによって、二重らせん構造を形成する。DNA は主に B 型の二重らせん構造を形成し、さらに A 型および Z 型と呼ばれる二重らせん構造も形成するが、RNA は A 型の二重らせん構造のみを形成する。これは、RNA にはリボースの2'位に OH 基があるので、リボースのコンフォメーションが C3'-endo 形になりやすいことに起因する。二重らせん構造としては、DNA の方が RNA よりも多様な構造を形成できるのである。しかし、前述のように RNA は様々な機能を有している。それは、DNA が主に二重らせん構造なのに対して、RNA がループ構造やバルジアウト構造などを形成することによって、様々な立体構造を形成することができるからである (図3)。さらに、ループ構造などの RNA に特徴的な立体構造の形成においては、多様な非 Watson-Crick

図3 RNAの二次構造および構造モチーフ。点線は塩基対を示す。ヘアピンループとヘアピンループが相互作用するとキッシングループ構造となる。シュードノット（擬結び）構造は、様々な機能性RNAで見つかった構造モチーフである。

型塩基対が構造の安定化に寄与している⁸⁾。例えば、A : U 塩基対については、Watson-Crick 型塩基対の他に4種類の塩基対が見つかった。また、図2cとdに示すようなG : U 塩基対およびG : A 塩基対は多くの機能性RNAに見つかり⁹⁻¹¹⁾、RNA研究者にとっては馴染み深い塩基対である。

3. NMR による RNA 構造の解析方法

NMR による RNA の立体構造解析法については、Wüthrich の本で紹介されており¹²⁾、さらに詳しい総説が書かれている¹³⁻¹⁵⁾。

3.1 RNA 試料の調製

NMR スペクトルの測定のためには、約1mMの試料が約0.2ml必要である。NMR 解析のための試料調製の方法としては、化学合成と酵素合成がある。化学合成のメリットは、短鎖のRNA（30残基ぐらいまで）であれば高収率で合成できる点である。現在、RNAの自動合成機を持っていなくても、受託合成で容易に試料を得ることができる。また化学合成ではRNAを部位特異的に安定同位体標識することができる。一方、酵素合成では、長鎖のRNAを効率よく合成することができる。この場合、鋳型となるDNAを用意し、*in vitro*において転写反応を行う¹⁶⁾。酵素としては、T7 RNAポリメラーゼあるいはSP6 RNAポリメラーゼが用いられることが多い。また、転写反応の際に安定同位体標識したATP、GTP、UTP、およびCTPを用いることによって、比較的安価に、さらに容易にRNAの安定同位体標識を行うことができる。また、RNAの精

製には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いることが多く、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーやゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いることもある。

RNA試料は、RNA分解酵素によって非常に分解されやすいので、実験をRNA専用のきれいな区画で行い、ビニール手袋の着用などの注意が必要である。しかし、分解酵素にさえ気をつければ、タンパク質より溶解度が高く、長期の測定でも沈殿が生じることがほとんどない。

3.2 NMR スペクトルの測定および解析

構造解析が可能なNMRスペクトルを得るためには、温度や溶液の検討が必要である。RNAは溶解度が高く沈殿が生じることが少ないので、様々な条件を検討することができるが、単一のコンフォメーションにすることが容易ではない場合もある。良好なNMRスペクトルが得られれば、構造解析に必要なデータを得るための一連の測定を行う。RNAのNMRスペクトルを測定した時に観測されるプロトンの化学シフトを図4に示す。RNAのNMRスペクトルを測定する際には、一般に軽水中で一連の測定をした後に溶媒を重水に置換してさらに測定を行う。RNAの構造は、ステム部分とループなどの一本鎖部分からなり、軽水中の測定によってステム部分を特定することができる。軽水中でRNAのNMR測定をした際に10~15ppmぐらいに観測されるグアニンとウラシルのイミノプロトンシグナルは、塩基対形成の情報を与える。イミノプロトンシグナルは、水素結合の形成によって水分子のプロトンとの交換が抑えられたときに観測される。A : U 塩基対におけるイミノプロトンは、13.5~15ppmの間に観測されることが多く、G : C 塩基対では12~14ppm、非Watson-Crick型の塩基対はそれより高磁場側に観測されることが多い。NOESYスペクトルを測定することによって、イミノプロトンシグナルを帰属することができる。図5は、29残基のRNAの帰属例である¹⁰⁾。隣り合う塩基対のイミノプロトンの間にはNOEシグナルを観測することができるので、二次構造と比較することによって、シグナルを各イミノプロトンに帰属することができる。また、A : U 塩基対に由来するシグナルは、ウラシルのイミノプロトンとアデニンのH2の間に強いNOEが観測されるので、区別することができる。一方、G : C 塩基対では、グアニンのイミノプロトンとシトシンのアミノプロトンの間に強いNOEが観測される。また、G : U 塩基対では、グアニンのイミノプロトンとウラシルのイミノプロトンの間に強い特徴的なNOEが観測される。

軽水中の測定によってRNAが予想した二次構造を形成していることを確認した後に、重水中の測定を行う。重水中の測定では、非易動性のプロトンの測定を行うが、3.5~5ppm付近はシグナルの重なりが激しく、解析が非常に難しい（図6）。図4に示すように、H2', H3', H4', H5', H5''のシグナルが非常に狭い範囲に観測されるためであ

図4 RNAのプロトンのおおよその化学シフト。上段のイミノプロトンおよびアミノプロトンは、軽水中のNMR測定で観測される。中段は塩基部分のプロトン。下段はリボース部分のプロトン。プロトンの番号については図1を参照。

図5 29残基のRNAの二次構造と2D NOESY スペクトル（軽水中）によるイミノプロトンシグナルの帰属。NOEを解析することによって、隣り合った塩基対によるシグナルを見つけ出し、二次構造と比較することによって、シグナルを各イミノプロトンに帰属する。NOEによる連鎖関係を図中に線で示す。帰属した残基番号を右の1Dスペクトルに示す。図中の*印は、G:U塩基対に特徴的な強いNOEシグナルである。

る。このNMRスペクトルは、600 MHzの分光計で測定したものであるが、800 MHzなどのさらに高磁場のNMR分光計によって測定すれば、もっと高分解能のNMRスペクトルが得られる¹⁷⁾。シグナルの連鎖帰属では、図7の領域を中心に解析を行う（図6に示した2D NOESY スペクトルの一部である）。図7に示した領域には、H8, H6およびH2（横軸）とH1'およびH5（縦軸）との間のNOEが観測される。図8に示すように、RNA

図6 2D NOESY スペクトル（重水中）。図5に示した29残基のRNAのスペクトルである。

図7 29残基のRNAの2D NOESY スペクトル。塩基のプロトンとリボースのH1'との間のNOEが観測される領域を拡大したスペクトル。5'末端から4残基について連鎖帰属の結果を線で表し、残基内のNOEシグナル（図8参照）について残基番号で示した。

はスクレオチドが直鎖状につながった高分子であるので、その化学構造によって残基内のH8/H6とH1'のNOE、そして残基間のH8/H6とH1'のNOEをつないでいくことによって連鎖帰属することができる。

3.3 安定同位体標識

安定同位体標識は、タンパク質の立体構造解析の場合と同様に、重要な方法である。安定同位体標識することにより、 ^1H の化学シフトに加えて、 ^{15}N あるいは ^{13}C の化学シフトを利用して分解能を向上することができる。図9のように、 ^1H - ^{15}N HMQC スペクトルを測定すると、GとUとではイミノ基の ^{15}N 核の化学シフトが大きく異なるのでGとUのイミノプロトンシグナルを区別することが

図8 NOE を利用した塩基とリボースのプロトンの連鎖帰属。実線の矢印は残基内の NOE を表し、点線の矢印は残基間の NOE を表す。

図9 29残基の RNA の ^1H - ^{15}N HMQC スペクトル。a は A : U 塩基対由来のシグナル、b は G : C 塩基対由来のシグナル、c は G : U 塩基対由来のシグナル、d は G : A 塩基対由来のシグナルを示す。

できる。また、図10は ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルである。非易動性のプロトンについても、 ^{13}C 核を利用することによって分解能を上げることができることがわかる。

また、安定同位体標識によって、直接結合した核間での大きなスピン結合を利用することができる。例えば、HCCH-TOCSY スペクトル¹⁸⁾を測定すれば、A の H8 と H2 の相関シグナルを解析して H2 のシグナルを帰属することができる (図11)。また、HNN-COSY スペクトル^{19,20)}のように水素結合を介した磁化の移動を観測すれば、塩基対の形成を確認できる (図12)。RNA の立体構

図10 29残基の RNA の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。

図11 HCCH-TOCSY スペクトルと磁化が移る経路。矢印の核間のカップリング定数を Hz で表す。

造解析において、非 Watson-Crick 型を含めた塩基対の情報は非常に重要である。さらに、HCP スペクトル²¹⁾という核酸に特異的な三重共鳴の測定も可能になる。 ^{31}P のシグナルの分離はよくないが、 ^{31}P のシグナルを帰属できるようになる。

高分子量の RNA の NMR スペクトルはシグナルの重な

図12 HN-COSY スペクトルと磁化が移る経路. 矢印の核間のカップリング定数を Hz で表す.

りが激しいので, 選択的標識が必要となる. 30残基程度の RNA であれば, 前述のように化学合成によって部位選択的に安定同位体標識することができる. しかし, 大きい RNA の場合には, 各ヌクレオチドを選択的に標識したり, 標識部分と非標識部分に相当する RNA 試料をそれぞれ調製し, それらを酵素による連結反応によって連結させることによって, 部位特異的に選択標識する必要がある²²⁾.

3.4 立体構造計算

NOESY スペクトルからプロトン間の距離を, DQF-COSY スペクトル, HP-COSY スペクトル²³⁾, HCP スペクトル²¹⁾から化学結合のまわりのねじれ角の情報を抽出する. DQF-COSY スペクトルからは, リボースのコンフォメーションの情報を得ることができ²⁴⁾, HP-COSY スペクトルおよび HCP スペクトルからは O5'-C5'の間のねじれ角 (β) と C3'-O3'の間のねじれ角 (ϵ) の情報が得られる.

最後に, 得られた距離およびねじれ角の情報を導入して, simulated annealing (SA) 法による計算を行うことによって, 立体構造を決定する. 構造計算では, 100回程度の計算を行い, その結果, 距離および角度の情報を満たす構造が相当数得られ, なおかつそれらが互いによく似ている場合に, 計算が収束したと判断する. 情報が十分でないために計算が収束しない場合でも, 部分的には構造が収束していることがある. 私たちは, 得られた計算構造をグループ化することによって解析し, 効率よく構造解析するための手法の開発も行っている^{25,26)}.

図13 磁場によって配向した液晶分子によって RNA が磁場 B_0 に対して平均的にわずかに配向している模式図. 配向している液晶分子の間で, 生体高分子が速く, しかし異方的に運動する.

3.5 残余双極子相互作用

従来の NMR による立体構造解析では, 前述のように主に NOE を解析して構造決定を行っている. NOE による立体構造解析では, 局所的な構造情報の積み重ねによって全体構造を決定しているために, 構造情報の誤差も積み重ねられてしまう. 特に RNA のように細長い分子の場合には, 構造決定は特に難しくなる. そこで, 近年, 生体高分子を磁場に対して配向させることによって, 異方的な磁気相互作用から遠距離間の情報を抽出し, それを構造決定に用いることができるようになった. 異方的な磁気相互作用として注目されているのが, 残余双極子相互作用 (residual dipolar coupling; RDC) である²⁷⁻³⁰⁾. 生体高分子を配向させるためには, 極性を持った液晶を用いる. 液晶は, 棒状の分子群が互いに異方的な力を及ぼしあって長軸の方向に分子が配向している点を除けば, 液体と同じ性質を持っている. この液晶中に生体高分子を溶かすと, 生体高分子は液晶中でも速く運動しているが, 近くにある配向した液晶分子と相互作用することによって, 平均的にはわずかに配向することになる (図13). 配向した生体高分子における i 核と j 核の双極子相互作用は次式で表すことができる.

$$D_{ij}(\theta, \phi) = -\frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_i \gamma_j h S [A_a (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} A_r \sin^2 \theta \cos 2\phi] / 4\pi^2 r_{ij}^3$$

A_a および A_r はそれぞれ生体高分子の配向テンソルの軸対称成分および斜方成分である。S は ij ベクトルの内部運動を表すオーダーパラメーター、 θ および ϕ は分子配向テンソルの主軸系における ij ベクトルの傾きを表す球座標の角度、 γ_i および γ_j はそれぞれ i 核および j 核の磁気回転比、 r_{ij} は i 核と j 核の距離、 μ_0 および h はそれぞれ真空

の透磁率およびプランク定数である。生体高分子において、 ^{15}N - ^1H などの結合と分子配向テンソルの主軸系とのなす角度 θ および ϕ を解析することによって、NOE からは得られない遠距離間の構造情報が得られる。

RNA を配向させる場合、緑膿菌に感染する Pf1 phage を使うことが多い。RNA 分子はリン酸基を主鎖に持つために負電荷を帯びており、Pf1 phage も負電荷を帯びているために両者が結合することはないからである。Pf1 phage を約 10 mg/ml になるように加えて、 ^{15}N デカップルを行わない ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルあるいは ^{13}C デカップルを行わない ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定する。さらに、Pf1 phage 非存在下においても同じ測定を行って Pf1 phage 存在下の場合とシグナルの分裂幅を比較することによって、それぞれ ^1H - ^{15}N RDC あるいは ^1H - ^{13}C RDC の値を求める。RDC の情報を拘束条件として構造計算に加えるためには、分子の配向テンソルの成分の値をおおよそ決定しておく必要がある。このためには、RDC を加えないで計算した立体構造のうち、比較的低エネルギーの低い構造を用いて、プログラム PALES によって grid search を行い、RDC を fitting することで配向テンソルの成分を求める^{31,32}。図14に示すように、RDC は RNA の立体構造解析において非常に有効である¹⁶。RDC の情報を加えない場合にはバルジをはさんだステム間の角度が大きく動いているが、RDC の情報を加えることによってステム間の角度がほぼ一定となり、構造計算がよく収束する。

4. 今後の展開

現在 NMR による大きな RNA の立体構造解析の報告としては、Puglisi らのグループによる C 型肝炎ウイルス由来の 77 残基の RNA がある²²。私たちの研究室でも、HIV 由来の 78 残基の RNA 二量体の立体構造が明らかにしている³³。このように大きな RNA 分子の立体構造を決定するためには、まず解析可能な大きさに分割してそれぞれの立体構造を決定し、それらを組み合わせることによって全体構造を構築する方法（部分分割法）が有効である。Summers らのグループは、このような部分分割法を利用して、マウス白血病ウイルス由来の 101 残基の大きな RNA の立体構造モデルを構築している³⁴。なお、部分分割法と部位選択的標識法を組み合わせることによって、ループ部分を全体構造から切り出したときに構造が変わらないことを確認できる。今後は、さらに高分子量 RNA の立体構造を解析する必要がある。既知の機能性 non-coding RNA のほとんどは、300~400 残基の大きさである。この大きさの RNA の NMR による構造解析は非常に難しいが、これを 200 残基程度以下のドメインに分割することが可能である。したがって、100~200 残基程度の RNA（分子量 5 万~10 万）の立体構造を決定することができれば、RNA の機能を考えるために必要な情報を得ることができる。ま

図14 RNA の立体構造解析における RDC の効果。(a)30 残基のモデル RNA の二次構造。(b) RDC の情報を導入して計算した場合の立体構造。(c) RDC の情報を導入しないで計算した場合の立体構造。(文献14より改変して転載)

た、これらのドメイン構造を融合させることによって、大きな構造体のモデルを得ることができると考えている。

私たちは実際に、二種類の約150残基のRNAの立体構造解析を試みている。これらのRNAはそれぞれタンパク質および低分子の基質と相互作用することが知られている。まず、二次構造およびループ間の相互作用による塩基対の形成について解析する。さらに、RDCの解析によりステム間の相対的位置を明らかにする。塩基対の形成については比較的短期間で解析することができ、これらの解析によってRNAの全体構造の概略を把握することは、その機能発現メカニズムを解明するうえで重要である。次のステップでは、部分分割法によって各ループ構造を詳細に解析するとともに、部位選択的標識法によって全体構造の形成に重要なステムやループ間の相互作用を解析する。RNAのステムは基本的にA型二重らせん構造であるので、ループ部分の構造を決定し、ステムの相対的な位置を決定すれば、全体構造を決定できる。私たちの研究室では、部分分割法を効率よく行うために、高精度の二次構造予測システムの開発も行っている³⁵⁾。

今後の課題のもう一つは、ハイスループット化である。現在、私たちの研究室では20残基程度のRNAの立体構造を3ヶ月程度で決定することができるが、同程度の長さのRNAであっても配列によっては、構造決定のために1年あるいはそれ以上の期間を要する場合がある。解析に適したヌクレオチド配列や測定条件を見つけるために、大量の試料を調製し、それぞれについてNMRスペクトルを測定して判断しているため、多くの時間が必要となるのである。ヌクレオチド配列の選択については、特定の配列を常に用いることによって、常に類似したNMRシグナルを得ることができれば、解析が著しく容易になると考えられる。また、ステム部分のヌクレオチドの偏りが少ないことも必要である。ループ部分については、構造多形にならないヌクレオチド配列を選択することが重要である。ただし、構造解析する変異体が生物学的機能を失わないことが必須条件であるので、効率よく変異体の活性を調べていく必要がある。ループ構造の柔軟性が生物学的機能に重要な場合、立体構造解析に適した配列が得られても、活性を失うかもしれないので注意が必要である。

部位特異的安定同位体標識を系統的に導入することによって、NMRスペクトルの解析が著しく容易に、また正確になることが期待できる。さらに、タンパク質の場合と同様にコンピュータによる自動解析システムの構築が可能になると思われる。また、コンピュータによる自動解析のためには、NOEを用いてNMRシグナルの帰属を進めるのではなく、タンパク質の場合と同様にスピン結合を利用した連鎖帰属を行う必要がある。HCPスペクトル²¹⁾はリン原子とその前後のリボースのC4'の相関シグナルを与えるため、リン酸骨格の連鎖帰属に利用が可能であるが、

H4', C4'およびPのシグナルは重なりが激しく、解析が困難である。この重なりを解消するために、H1'まで磁化を移動させるPCCH-TOCSY³⁷⁾の手法が報告されているが、感度が低いのが実情である。リン酸骨格の連鎖帰属を行うための高感度の測定手法を開発する必要がある。

RNAは基本的に4種類のヌクレオチドのみから構成されているので、機能性RNAの立体構造を構成するフォールドの数はタンパク質より少ないと考えられる。今後、多くの機能性RNAの立体構造が明らかになれば、それらの立体構造を構成する基本的フォールドを体系化することができ、フォールドの組み合わせ方を解くだけで機能性RNAの立体構造を明らかにできるようになるかもしれない。

謝辞

本総説を執筆するにあたり、多くのご指導と激励をいただいた千葉工業大学の河合剛太教授とブルカー・バイオスピンの佐藤一氏に感謝します。

参考文献

- 1) J. Couzin: *Science* **298**, 2296 (2002).
- 2) 中村義一編: *RNAがわかる* (羊土社, 東京, 2003).
- 3) P. Nissen, N. Ban, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz: *Science* **289**, 920 (2000).
- 4) B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan: *Nature* **407**, 327 (2000).
- 5) J. S. Mattick: *Bioessays* **25**, 930 (2003).
- 6) T. Sakamoto, A. Oguro, G. Kawai, T. Ohtsu, and Y. Nakamura: *Nucleic Acids Res.* **33**, 745 (2005).
- 7) A. Matsugami, S. Kobayashi, K. Ouhashi, S. Uesugi, R. Yamamoto, K. Taira, S. Nishikawa, P. K. R. Kumar, and M. Katahira: *Structure* **11**, 533 (2003).
- 8) U. Nagaswamy, N. Voss, Z. Zhang, and G. E. Fox: *Nucleic Acids Res.* **28**, 375 (2000).
- 9) S. Baba, M. Kajikawa, N. Okada, and G. Kawai: *RNA* **10**, 1380 (2004).
- 10) T. Sakamoto, S. Morita, K. Tabata, K. Nakamura, and G. Kawai: *J. Biochem.* **132**, 177 (2002).
- 11) M. Katahira, M. Kanagawa, H. Sato, S. Uesugi, S. Fujii, T. Kohno, and T. Maeda: *Nucleic Acids Res.* **22**, 2752 (1994).
- 12) K. Wuthrich: *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (Wiley, New York, 1986).
- 13) G. Varani, F. Aboul-ela, and F. H.-T. Allain: *Progress in NMR spectroscopy* **29**, 51 (1996).
- 14) S. S. Wijmenga and B. N. M. van Buuren: *Progress in NMR spectroscopy* **32**, 287 (1998).
- 15) B. Furtig, C. Richter, J. Wohnert, and H. Schwalbe: *ChemBioChem* **4**, 936 (2003).
- 16) 馬場清喜, 清宮恭子, 木村友美, 富士原和也, 染谷龍彦, 坂本泰一, 河合剛太: *分光研究* **53**, 171 (2004).
- 17) 河合剛太: *分光研究* **52**, 241 (2003).
- 18) P. Legault, B. T. II Farmer, L. Mueller, and A. Pardi: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2203 (1994).

- 19) K. Pervushin, A. Ono, C. Fernandez, T. Szyperski, M. Kainosho, and K. Wuthrich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **120**, 8293 (1998).
- 20) A. J. Dingley and S. Grzesiek: *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 14147 (1998).
- 21) G. Varani, F. Aboul-ela, F. Allain, and C. C. Gubser: *J. Biomol. NMR* **5**, 315 (1995).
- 22) P. J. Lukavsky, I. Kim, G. A. Otto, and J. D. Puglisi: *Nat. Struct. Biol.* **10**, 1033 (2003).
- 23) V. Sklenar, H. Miyashiro, G. Zon, H. T. Miles, and A. Bax: *FEBS Lett.* **208**, 94 (1986).
- 24) C. Altona and M. Sundaralingam: *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2333 (1973).
- 25) A. Takasu, K. Watanabe, and G. Kawai: *J. Biochem.* **132**, 211 (2002).
- 26) T. Someya, T. Sakamoto, A. Takasu, and G. Kawai: *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **23**, 691 (2004).
- 27) N. Tjandra and A. Bax: *Science* **278**, 1111 (1997).
- 28) M. R. Hansen, L. Mueller, and A. Pardi, *Nature Struct. Biol.* **5**, 1065 (1998).
- 29) M. R. Hansen, P. Hanson, and A. Pardi: *Methods Enzymol.* **317**, 220 (2000).
- 30) 坂本泰一, 染谷龍彦: *分光研究* **49**, 257 (2000).
- 31) M. Zweckstetter and A. Bax: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3791 (2000).
- 32) 菊池 淳: *分光研究* **51**, 182 (2002).
- 33) S. Baba, K. Takahashi, S. Noguchi, H. Takaku, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, and G. Kawai: *J. Biochem.* **138**, 583 (2005).
- 34) V. D'Souza, A. Dey, D. Habib, and M. F. Summers: *J. Mol. Biol.* **337**, 427 (2004).
- 35) W. Dawson, K. Fujiwara, G. Kawai, Y. Futamura, and K. Yamamoto: *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **25**, 171 (2006).
- 36) S. S. Wijmenga, H. A. Heus, H. A. Leeuw, H. Hoppe, M. van der Graaf, and C. W. Hilbers: *J. Biomol. NMR* **5**, 82 (1995).

PROFILE

坂本泰一 千葉工業大学工学部生命環境科学科
講師 工学博士

〔略歴〕1990年横浜国立大学工学部卒業, 1997年
横浜国立大学大学院工学研究科博士課程単位取得
後退学, 同年三菱化学生命科学研究所特別研究員,
1998年千葉工業大学博士研究員, 2002年東京大
学医科学研究所産学官連携研究員を経て, 2004
年より現職。〔専門〕RNA の構造生物学