

核酸触媒の構造解析
産業技術総合研究所
宮岸 真

1. 成果の概要

実施内容

本研究では、核酸を効果的に切断する新規の亜鉛依存的核酸触媒(DNAzyme)の立体構造解析を行うことで、切断メカニズムを解明することを目的とする。所属機関において、500 MHz NMR 装置(室温プローブ)を用いた予備的な実験を行っており、この新規 DNAzyme が構造形成し、基本的には良好なスペクトルを与えることを確認している。しかし、上記 NMR 装置では、分解能や NOE 数の点で、高精度の立体構造決定を行うには十分とは言えない状況であった。したがって、本課題の申請により、理研 NMR 施設の低温プローブ付属 900MHz 装置を利用し、高磁場・高感度の NMR 装置での測定を行った。

0.4 mM の DNAzyme の試料(1mM の $ZnCl_2$ を含む)について、NOESY、TOCSY、DQF-COSY、 $1H-13C$ HSQC(natural abundance)の測定を行なった。必要に応じて nonlinear sampling 法の適用により、測定時間を短縮した。溶媒消去の効率も良く、全領域でフラット、かつピーク同士の分離も良い高分解能のスペクトルが得られた。

本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較

本課題で得られた良質のスペクトルから、曖昧さが少ないシグナル帰属が得られた。また、立体構造を決定するにあたっての距離情報も、約 550 個(1 ヌクレオチドあたり 21 個、同一塩基内・糖内は除く)と十分な数が得られた。CNS を用いた計算の結果、この DNAzyme は、バルジと想定された領域にも非ワトソン＝クリックタイプの塩基対を形成し、全体として、塩基対が平行に積み重なる B 型 DNA 様の立体構造を有していることが判明した。

NMR による溶液構造(計算に亜鉛イオンを含まない)は、X 線結晶解析を行なった際に分子置換法のテンプレート構造として用いることが可能であった。この結果、亜鉛イオンの結合部位を同定して、逆に、NMR に基づく構造計算に組み入れ、亜鉛イオンを含む溶液構造の決定に成功した。得られた最終的な立体構造は、触媒部分や基質部分のヌクレオチドの役割・性質と共に、亜鉛依存的な切断メカニズムの解明を導いた。

上記のように、本課題の成果は、確実なシグナル帰属と立体構造決定可能な数の距離情報の取得という目的を十分に達成したと言える。

今後の展開、課題

本核酸触媒は、最小の触媒部分を有する新規のモチーフであり、構造もこれまでに見られる核酸触媒と異なる特質を有することから、得られた成果はインパクトの高いものとなると考えている。現在、投稿論文を準備している。

将来的には、この立体構造を基盤として、さらに高機能の DNAzyme のデザインに利用することが期待できる。

2. 利用における感想(改善要望等を含む)

施設利用にあたっては、核酸の NMR 解析に豊富な経験を有する施設ご担当者から、測定・解析を進める上での貴重な情報を提供いただいた。改めて感謝申し上げたい。

また、昨今の液体ヘリウムの供給不安等から、800MHz 以上の高磁場 NMR を導入し、維持・管理を行うことは個々のユーザーでは困難になっている。理研 NMR 施設のような全国レベルの共同利用の取り組みは、今後も極めて重要である。これまでに尽力された関係の皆様方に心より感謝する。

3. 利用周辺環境に関する希望

特になし。

4. 今後の利用予定

本課題に関連しては今後の利用予定はないが、必要に応じて再申請したいと考えている。

5. 今後期待するその他のサービス

継続して運営していただけることを期待する。

6. その他

特になし。

7. 利用実施時期及び期間

2019 年 3 月 5 日 ~ 2019 年 3 月 7 日

当初計画どおり

(追加測定の可能性も想定していたが、結果として行わなかった。)

8. 利用研究基盤

溶液900MHz 2019 年 3 月 5 日 ~ 7 日 (3日間)