

28L-pm05

リガンドアナログを用いる c-di-AMP リボスイッチの構造活性相関解析

○古川 和寛¹, 児島 貴美子¹, 南川 典昭¹ (¹徳島大薬)

【目的】リボスイッチとは、mRNA の 5'-非翻訳領域に存在する配列であり、低分子代謝物の結合を引き金とする構造変化により下流の遺伝子の発現を制御するものである。ごく最近になって、細菌のセカンドメッセンジャーである cyclic-di-AMP (c-di-AMP; AMP の環状ジヌクレオチド体) を感知するリボスイッチが発見され、これが細胞壁形成やイオン輸送など、病原性細菌の多くの生命活動に関与することが分かった¹⁾。そこで今回種々の c-di-AMP アナログを用い、それらの c-di-AMP リボスイッチに対する解離定数 (K_D) を求めることで、リガンドにおけるいずれの部位がリボスイッチとの相互作用に重要であるかを網羅的に解析することを目的とした。

【方法と結果】c-di-AMP アナログ 11 種 (塩基部修飾体 4 種、糖部修飾体 5 種、リン酸部修飾体 2 種) を調整した。また、*Bacillus subtilis* の *ydaO* 遺伝子の 5'-非翻訳領域に存在する 165 残基のリボスイッチ配列を酵素合成し、in-line probing 法によって各アナログに対する解離乗数を測定した。

糖部およびリン酸部修飾体については比較的強い結合を維持したが、塩基部修飾体は著しい結合強度の低下がみられた。特に、塩基をアデニンからイノシンに変換した c-di-IMP については、1 mM 以上の K_D 値を示し、天然のリガンドである c-di-AMP ($K_D = \sim 500$ pM) と比べて 10^6 倍以上のアフィニティーの低下がみられた。このことから、c-di-AMP と c-di-AMP リボスイッチの相互作用には、塩基部 (特に 1 位窒素原子と 6 位アミノ基) が重要な役割を担っていることが示唆された。

1) Nelson J.W., Sudarsan N., Furukawa K., Weinberg Z., Wang J.X. & Breaker R.R., *Nat. Chem. Biol.*, **2013**, *9*, 834-839