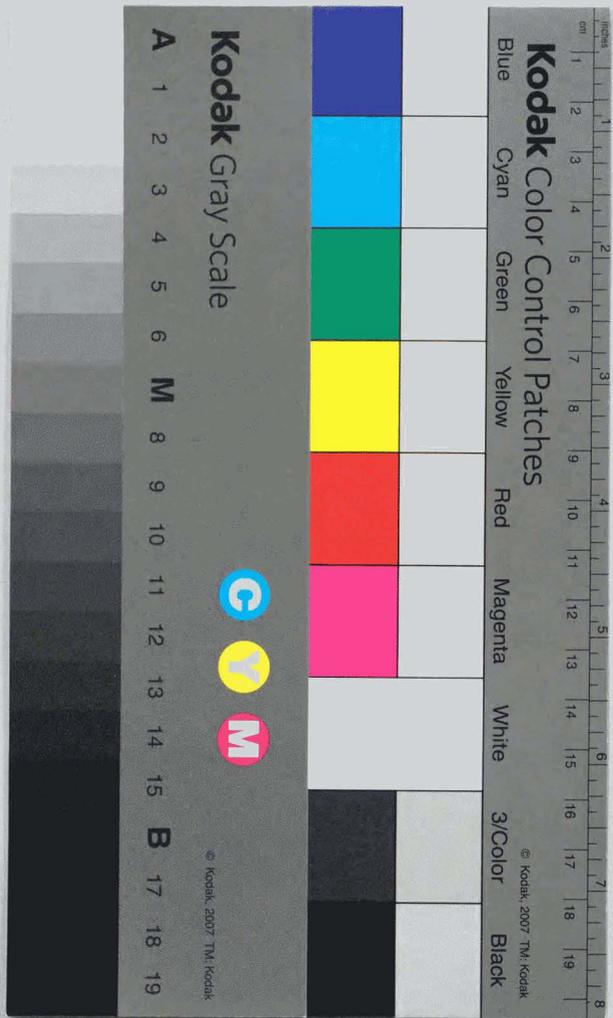


リボザイムの構造と機能の相関について
の分光学的研究

1997年9月

坂本 泰一



①

博士論文

リボザイムの構造と機能の相関について
の分光学的研究

坂本 泰一

1997年9月

目次	2
略語表	4
はじめに	5
第一章 序論	6
1-1 リボザイムについて	6
1-2 ハンマーヘッド型リボザイムについて	9
1-3 HDVリボザイムについて	12
1-4 RNAの構造解析について	14
1-5 本研究の目的および意義	17
第二章 リボザイムのデザイン	18
2-1 ハンマーヘッド型リボザイムのデザイン	18
2-2 ハンマーヘッド型リボザイムのデザインにおける難しさ	20
2-3 HDVリボザイムのデザイン	21
2-4 HDVリボザイムのデザインにおける難しさ	23
第三章 リボザイムの調製	25
3-1 リボザイムの調製法の確立	25
3-2 ハンマーヘッド型リボザイムの調製	27
3-3 HDVリボザイムの調製	27
3-4 結果および考察	28
3-4-1 鋳型DNAの調製法	28
3-4-2 T7 RNAポリメラーゼの調製	29
3-4-3 転写反応条件の検討	30
3-4-4 ハンマーヘッド型リボザイムの調製	32
3-4-5 HDVリボザイムの調製	33
第四章 小型ハンマーヘッド型リボザイムの特性	36
4-1 酵素学的特性およびCDの解析	36
4-2 結果および考察	39
第五章 小型ハンマーヘッド型リボザイムの構造解析	52
5-1 方法	52
5-2 結果および考察	54
5-2-1 Rz 24およびRz 28について	54
5-2-2 Rz 24'および14 merについて	70

第六章 小型HDVリボザイムの特性	73
6-1 酵素学的特性およびCDの解析	73
6-2 結果および考察	74
第七章 結論および今後の展望	84
7-1 結論	84
7-2 総括	85
7-3 今後の展望	88
実験の部	92
参考文献	105
謝辞	113

略語表

RNA	ribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
A	adenine, adenosine, 2'-deoxyadenosine
G	guanine, guanosine, 2'-deoxyguanosine
C	cytosine, cytidine, 2'-deoxycytidine
U	uracil, uridine
T	thymine, 2'-deoxythymidine
N	any bases, any nucleosides
NTP	ribonucleoside triphosphate
NMP	ribonucleoside monophosphate
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
Pu	purine bases, purine nucleosides
Py	pyrimidine bases, pyrimidine nucleosides
nts	nucleotides
bp	base pair
rRNA	ribosomal RNA
tRNA	transfer RNA
mRNA	messenger RNA
HDV	human hepatitis delta virus
RNase	ribonuclease
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
NMR	nuclear magnetic resonance
UV	ultraviolet
CD	circular dichroism
SDS	sodium dodecyl sulfate
NOE	nuclear Overhauser effect
HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence

はじめに

リボザイムはRNAを切断することができるRNA酵素として発見され、現在、抗エイズウイルス剤や抗癌剤等の薬剤としての応用が期待されている。しかし現在、リボザイムの切断反応機構の分子の基盤は明らかになっておらず、リボザイムを薬剤としてデザインするための指標は得られていない。そこで本論文では、酵素学的特性および構造を調べることにより、リボザイムの構造と機能の相関を明らかにすることを目的とした。

本研究では、最も研究が進んでいるハンマーヘッド型リボザイムと、ハンマーヘッド型より大型のヒト肝炎δウイルス型 (HDV) リボザイムを研究対象とした。始めに、第一章で本研究の背景について述べる。そして、本論の概要は以下のとおりである。はじめに、NMRによる構造解析を容易にするために小型化したリボザイムをデザインし (第二章)、調製した (第三章)。次に、小型ハンマーヘッド型リボザイムの酵素学的特性を調べ、デザインの元となったリボザイム (親リボザイム) の特性と比較したところ、 $MgCl_2$ 濃度依存性などが親リボザイムと異なることがわかった (第四章)。そこで、 $MgCl_2$ 滴定によるCD変化を調べ、 $MgCl_2$ 濃度による構造変化および活性変化をカーブフィッティングにより解析する方法を確立した。カーブフィッティングにより解析したところ、 Mg^{2+} イオンは2つ以上結合しているが、結合数は親リボザイムに比べて少ないことが示唆された (第四章)。さらに、安定同位体標識法を用いたNMRによるハンマーヘッド型リボザイムの構造解析を試みたが、試料の調製が困難であった。そこで、酵素部分のみの構造を調べたところ、ワトソンクリック様のG:A塩基対の存在を示唆する結果を得た (第五章)。また、小型HDVリボザイムの酵素学的特性およびCD特性を調べたところ、親リボザイムより簡単なシステムで切断が起きていることが示唆された。さらに、カーブフィッティングより Mg^{2+} イオンは3つ以上結合しているという結果を得た (第六章)。最後に第七章で、本論文の結論を述べ、今後の展望について述べる。

第一章 序論

1-1 リボザイムについて

1981年に、CechらがテトラヒメナのrRNAの研究中、タンパク質酵素の存在しない系でその前駆体RNAのイントロンがRNAの自己切断により切り出されることを発見し、リボザイム (Ribonucleic AcidとEnzymeの合成語) と命名した (Cech et al., 1981)。リボザイムの発見は、RNAは遺伝情報をタンパク質に翻訳する際の仲介物質であり、酵素活性を有するのはタンパク質のみであるという従来の常識をくつがえすものであった。さらに、リボザイムの発見により、生命の起源においてRNAが一番始めの物質であるというRNA起源説が注目され始めた (Joyce, 1989)。それ以来、様々なリボザイムが発見され、多くの研究者によって研究が進められている。

現在までに様々なリボザイムが見つかったが、グループIイントロン (Cech et al., 1981)、グループIIイントロン (van der Veen et al., 1986)、RNase PのM1 RNA (Guerrero-Takada et al., 1983)、ハンマーヘッド型リボザイム (Forster & Symons, 1987)、ヘアピン型リボザイム (Hampel & Triz, 1989)、肝炎δ型ウイルス (HDV) リボザイム (Kuo et al., 1988) およびVS RNA (Guo et al., 1993) がリボザイムとしてあげられる。バクテリオファージT4のRNA前駆体 (p2Sp1 RNA) は、一般的にはリボザイムとして認められていないが非イオン性界面活性剤と一価陽イオンの存在下で自己切断する (Watson et al., 1984)。また*in vitro*で、タンパク質合成を行うリボソームにおいてプロテアーゼ処理およびフェノール処理を行ってもpeptidyl transferase活性があることから、リボソームのRNA成分にpeptidyl transferase活性があることが明らかにされている (Noller et al., 1992)。これもRNAが触媒機能を持っていることから、リボザイムと考えることができる。さらに、近年新しい機能を持つRNAを人工的にスクリーニングする試みがあり、その方法はSELEX法と呼ばれている (第7章参照)。SELEX法により、鉛リボザイム (Pan & Uhlenbeck, 1992)、DNAを切断するリボザイム (Robertson & Joyce, 1990)、色素に結合するリボザイム (Ellington & Szostak, 1990) など、その他多くの機能を持つリボザイムが得られており (Joyce, 1994)、今後も新しい機能を持つリボザイムが見つかることが期待される。SELEX法により自分自身で増殖できるRNAを得ることができれば、生命の起源についての新たな知見が得られるかもしれない。

ここでは、上記の様々なリボザイムについて簡単に説明する (図1-1; Symons, 1994)。グループIイントロンは、主にミトコンドリアや葉緑体などの細胞内小器官のrRNA、mRNA、tRNAなどに見つかっており、Cechらにより発見されたリボザイムはこのタイプである (Cech et al., 1981)。グループIイントロ

ンにおけるセルフスプライシングは、ほぼ中性条件下、グアノシンと二価の陽イオン存在下で進行する。この反応は、グアノシンの3'-OHによる5'スプライス部位でのエステル交換反応と、それに続いて起こる5'エクソンの3'末端Uの3'-OHによる3'スプライス部位でのエステル交換反応の2段階よりなる。また、グループIとは異なる二次構造および反応機構でスプライシング反応を行うイントロンが存在している。このイントロンはグループIIイントロンと呼ばれ、ミトコンドリアや葉緑体などの細胞内小器官に存在する (van der Veen et al., 1986)。グループIIイントロンの反応は2段階のエステル交換反応からなり、2段階目の反応はグループIイントロンと同じである。しかし、第1段階において、グアノシンの代わりにイントロンの3'末端付近に存在するアデノシンの2'-OHが5'スプライス部位に求核攻撃し、2',5'-リン酸ジエステル結合の枝分れ構造 (ラリアット) を形成する。RNase Pは前駆体tRNAの5'側を切断するエンドヌクレアーゼであるが、*in vitro*においてそのRNA成分 (M1 RNA) のみで活性を持つことが明らかになっている (Guerrior-Takada et al., 1983)。以上の3つのタイプのリボザイムは400ヌクレオチド以上の大きいものであり、分子量が大きいのでNMRにより構造解析するのは技術的に困難である。

本研究で取り扱ったハンマーヘッド型リボザイムおよびHDVリボザイムについては、それぞれ1-2および1-3で詳しく述べる。ヘアピン型リボザイムはタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAやアラビシモザイクウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖などで見つかっており (これらのサテライトRNAのプラス鎖にはハンマーヘッド型リボザイムが存在する)、その二次構造はヘアピンの形をしている (Hampel & Triz, 1989)。このリボザイムの切断反応では、 Mg^{2+} 等の二価金属イオン存在下でエステル交換反応により自己切断し、5'水酸基および2',3'-環状リン酸を生ずる。また、VS RNAは164ヌクレオチドのアカパンカピのミトコンドリアのプラスミドの転写物であり、最近このRNAが自己切断と自己連結を起こすことが明らかとなった (Guo et al., 1993)。このリボザイムでも二価金属イオンを必要とする。以上の四つのリボザイムは小型のリボザイムである。

リボザイムは抗エイズウイルス剤や抗癌剤として期待され、臨床応用のための研究が多くされている (図1-2; Barinaga, 1993; Sullenger & Cech, 1993)。ウイルスでは宿主のタンパク質合成系を利用して複製に必要なタンパク質を作って増殖し、癌細胞では細胞本来の機能を阻害するタンパク質を大量発現するので、従来はタンパク質をターゲットとして治療法が研究されてきた。しかし、タンパク質に対する特異的阻害剤を作成することは困難である。リボザイムを使った治療法は、ターゲットRNAを切断することによって遺伝情報源を断ち、病因となる

タンパク質を発現させない方法であり、ターゲットRNAに対して特異性が高く、生体分子をそのまま利用するので副作用が少ないことが予想される。しかし現在、リボザイムの切断反応機構の分子的基盤は明らかになっておらず、リボザイムを薬剤として高機能化するための指標は得られていない。そこで本研究では、リボザイムの立体構造を明らかにし、構造と機能の相関を調べることを研究の目的とした。

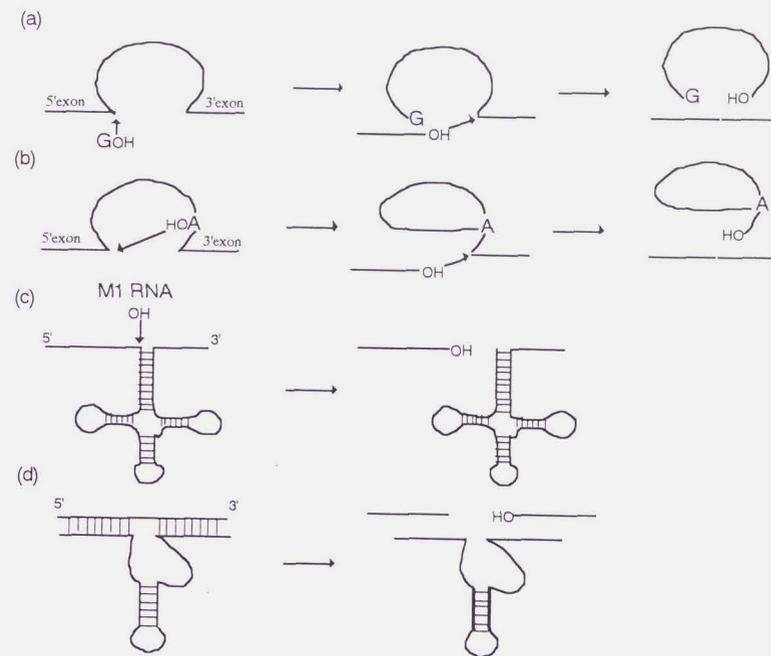


図1-1 様々なリボザイムの反応模式図。(a)グループIイントロン (b)グループIIイントロン (c)RNase PのM1 RNA (d)ハンマーヘッド型リボザイム

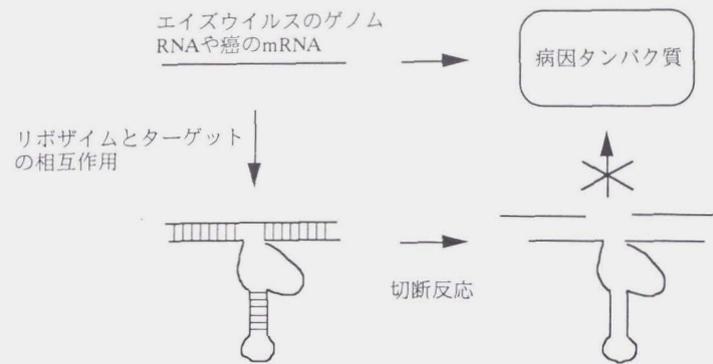


図1-2 リボザイムの薬剤としての利用の概念図

1-2 ハンマーヘッド型リボザイムについて

ハンマーヘッド型リボザイムはウイロイド（例 アボカドサンブロッチウイロイド）、ウイルソイド（例 ルサーントランジェントストリークウイルスのウイルソイド）、サテライトRNA（例 タバコリングスポットウイルスのサテライトRNA）などに存在する（Forster et al., 1990; Symons, 1992; Bratty et al., 1993）。ウイロイドは植物に感染する病原体RNAで、ウイルソイドは植物に感染するウイルスと共存する一本鎖環状RNAであり、ともに250~400ヌクレオチドからなる一本鎖の環状構造を持つ。サテライトRNAは植物ウイルス中に共存する一本鎖直鎖状RNAである。これらのRNAはローリングサークル機構（図1-3）により複製される（Branch & Robertson, 1984）。その機構では、まず植物細胞内（宿主）のRNAポリメラーゼが環状プラス鎖を鋳型としてマイナス鎖のRNA合成を行い、環状RNAの単位がいくつもつながった多量体が作られる。次に、この多量体が特定の部位で自己切断した後、環状化し、マイナス鎖の環状RNAになる。さらに、このマイナス鎖の環状RNAを鋳型にして、プラス鎖の多量体が作られ、自己切断される。ウイロイドとウイルソイドでは、その後環状化する。この機構の中で起こる自己切断反応は Mg^{2+} 等の二価金属イオン存在下で起こり、タンパク質要素を必要としない。

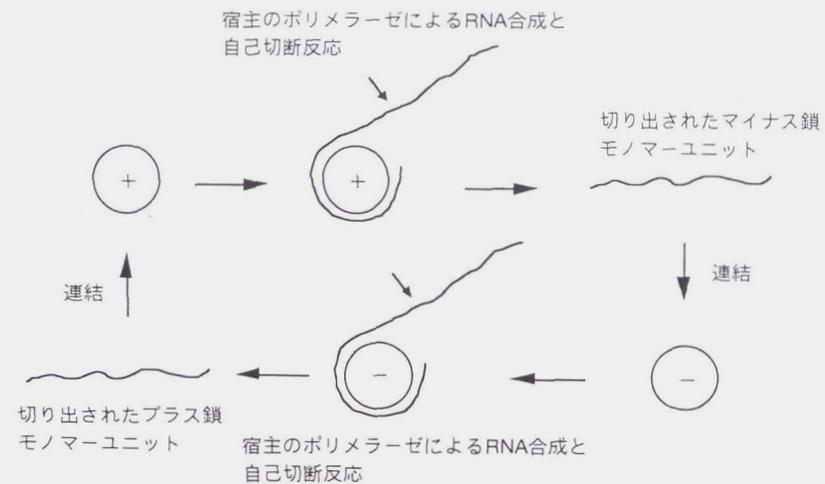


図1-3 ローリングサークルモデルの模式図

ハンマーヘッド型リボザイムは、現在最も小さい系（約40残基）で活性を有し、最も研究が進んでいるリボザイムのひとつである（Uhlenbeck, 1987; Koizumi et al., 1988; Odai et al., 1990; Hertel et al., 1992）。図1-4aに示すように三つのステム（ヘリックスI, II, III）および内部ループ部分を持ち、その形状（二次構造）が金槌の頭に似ているためハンマーヘッド型リボザイムと呼ばれる（ただし、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAおよびアラビシモザイクウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖はヘアピン型リボザイムとなる）。切断は矢印の位置で起こる。臨床応用でリボザイムを用いてターゲットRNAを切断するためには、リボザイムを分子内反応（cis型）から分子間反応（trans型）で扱わなければならない。その場合、ヘリックスIおよびヘリックスIIIを基質認識部位とすることができる（図1-4b）。また、よく保存された残基が内部ループ部分を中心に存在しており、mutagenesisや化学修飾の実験により、これらの保存された残基は活性に重要な残基であることが明らかにされている（Koizumi et al., 1988; Odai et al., 1990A; Fu & McLaughlin, 1992A, B; Fu et al., 1993; Slim & Gait, 1992; Tuschl et al., 1993; Perreault et al., 1990; Perreault et al., 1991; Williams et al., 1992; Yang et al., 1992; Olsen et al., 1991; Buzayan et al., 1990; Ruffner & Uhlenbeck, 1990）。切断反応機構については、 Mg^{2+} イオンが内部ループ部分と結合し、 Mg^{2+} イオンに配位した水酸基が切断部位の2'水酸基のプロト

ンを塩基触媒として引き抜いた後、2'水酸基の酸素原子がリン原子へ求核攻撃することにより、切断反応が起こり、5'水酸基および2',3'-環状リン酸を生ずるといことが、生化学的実験および分子軌道計算から推測されている(図1-5; Taira et al., 1990; Dahm et al., 1993)。また近年、X線解析によりその結晶構造が明らかになった(Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。ヘリックスIIとヘリックスIIIが直線になり、ヘリックスIとヘリックスIIが近接するというwishboneに似た構造(γ に似た構造)である(図1-6)。その報告では、触媒ポケットとして内部ループ部分がウリジンターンを形成し、そこに Mg^{2+} イオンが結合し、この Mg^{2+} イオンが切断を引き起こすと考えられているが、反応機構を完全に明らかにするには至っていない。

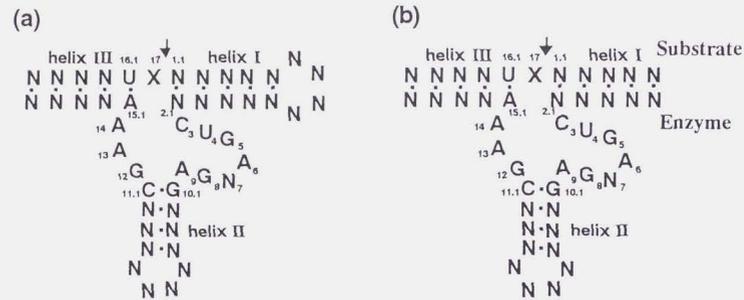


図1-4 ハンマーヘッド型リボザイムの二次構造。矢印は切断部位、XはA、C、Uを示し、NはA、G、C、Uを示す。XおよびN以外の残基は切断活性に重要な残基である。(a) cis型 (b) trans型

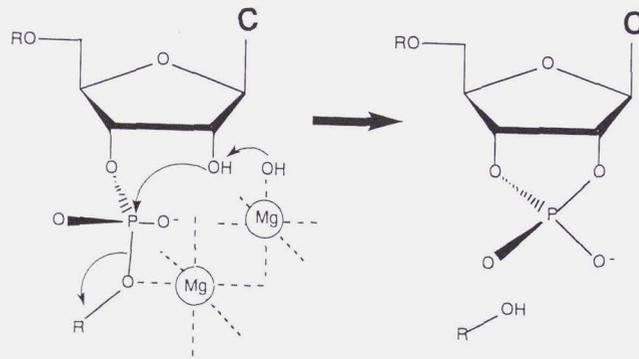
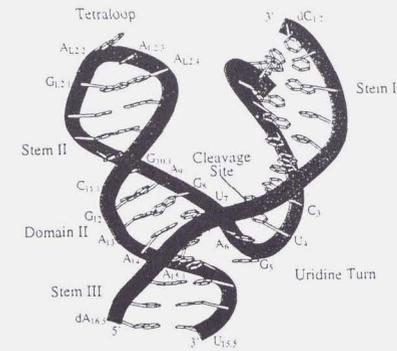


図1-5 ハンマーヘッド型リボザイムの切断反応機構



& Dinter-Gottlieb, 1991; Branch & Robertson, 1991; Thill et al., 1991)、mutagenesisや化学修飾の実験および二次構造特異的なRNaseによる切断実験により、Beenらのpseudoknotモデルが最も有力であると考えられている(図1-7; Rosenstein & Been, 1991; Been et al., 1992; Perrotta & Been, 1993; Perrotta et al., 1993; Kumar et al., 1994)。このモデルでは、HDVリボザイムはステムI, II, IIIおよびIVの四つのステムを持つ。他のモデルと比較すると、ステムIおよびIVの部分は他のモデルでも同様にステムを形成しており、二次構造において共通する部分が多い。生化学的実験や化学修飾の実験はpseudoknotモデルを支持しているが、pseudoknotモデルが正しいという決定的なデータは得られていない。また、切断活性にとって重要な部分を調べるために、mutagenesis (Wu et al., 1992; Wu & Huang, 1992; Wu et al., 1993; Suh et al., 1992; Kumar et al., 1992; Kumar et al., 1993; Smith et al., 1992; Thill et al., 1993; Kawakami et al., 1993; Macnaughton et al., 1993; Tanner et al., 1994)、チオリン酸による置換 (Jeoung et al., 1994) および化学修飾 (Belinsky et al., 1993) の実験が行われており、pseudoknotモデルで表すと切断部位、ステムIとIVの間の部分 (JI/IV)、ステムIIとIVの間の部分 (JII/IV)、ループIIIが重要であることが報告されている(図1-7)。HDVリボザイムでは、その二次構造も明らかになっていない状態であり、その高次構造は明らかにされていないが、pseudoknotモデルをもとにして、mutagenesisや化学修飾の実験などを考慮した立体構造モデルが考えられており、構造と機能の相関を考えるうえで興味深い(図1-8; Tanner et al., 1994)。

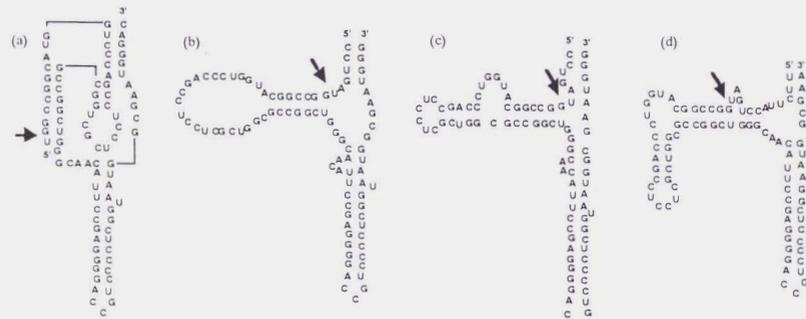


図1-7 HDVリボザイムの予測二次構造 (a)PerrottaとBeenによる (b)BranchとRobertsonによる(c)WuとLaiによる (d)Gottliebらによる

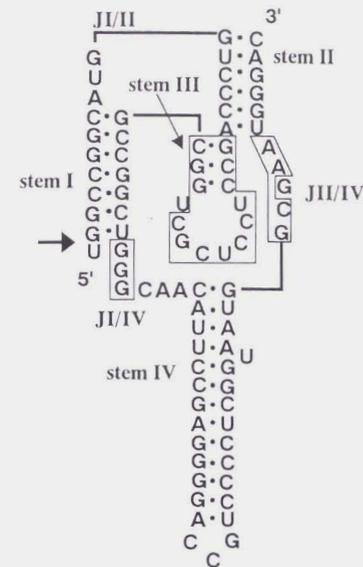


図1-8 HDVリボザイムの切断活性に重要な残基。(□で囲んだ部分)

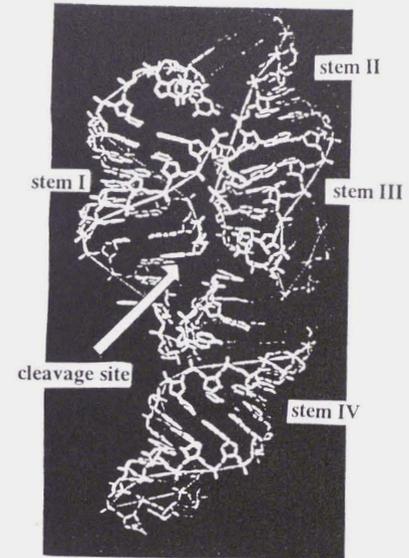


図1-9 HDVリボザイムの立体構造モデル。Tanner, N.K. et al. *Current Biology*, 4, 488-498 (1994).より引用。

1-4 リボザイムの構造解析について

リボザイムの立体構造を明らかにする方法として、X線結晶構造解析およびNMRによる構造解析がある。X線結晶構造解析とNMRによる構造解析を比較すると、X線結晶構造解析に必要な試料の量はNMRに比べて少なく、よい結晶が得られれば、分子量の大きいものに対してNMRより有効な手段となる。近年では、RNAの結晶化の技術が発達し、X線結晶構造解析によるハンマーヘッド型リボザイムの立体構造が明らかとなっているが、いまだ結晶化の条件が試料によって異なり、そこがX線結晶構造解析の難しいところとなっている。さらに、X線結晶構造解析とNMRによる構造解析で異なる大きな点として、NMRは溶液中のダイナミックな構造の解析に有利であることがあげられる。X線結晶構造解析では結晶格子形成のための制限があり、結晶構造と溶液構造は必ずしも一致しない。RNA、特にリボザイムは構造が柔らかく、運動性が高いためNMRによるダイナミックな構造の解析が必要であると思われる。

リボザイムの構造を調べるためにNMRを用いた研究が行われている (Uesugi et al., 1992; Heus et al., 1990; Heus & Pardi, 1991B; Odai et al., 1990A, B;

Pease & Wemmer., 1990; Sarma et al., 1995; Orita et al., 1996; Lee et al., 1993)。
 しかし、それらの研究では、RNAのNMRによる構造解析が困難であるため、立
 体構造を明らかにするまでには至っていない。構造解析が困難である理由として、
 次のようなことがあげられる。まず、核酸は環構造および二重構造が多く、また、
 窒素や酸素、リン原子が多いため、NMRで主に観測する水素原子の比率が低い。
 また、核酸の立体構造の形成に重要な相互作用は塩基対形成とスタッキングであ
 り、残基間で接触する部位は水素原子密度の低い塩基である。そして、核酸は構
 成要素（4種のヌクレオチド）が互いによく似ているため、NMRシグナルの重な
 りが激しく、帰属が困難である。しかし、近年のRNAの安定同位体標識技術の開
 発にともない、NMRによるRNAの構造解析が進むことが期待されている
 (Nikonowicz & Pardi, 1990; Nikonowicz et al., 1992; Batey et al., 1992;
 Simorre et al., 1996; Kubinec et al., 1996)。

安定同位体標識の有用性について説明する。 ^{15}N あるいは ^{13}C による安定同位体
 標識を行うと、 ^{15}N 核あるいは ^{13}C 核の化学シフトにより ^1H シグナルの分離を行う
 ことができる (図1-10a; Nikonowicz & Pardi, 1992; Nikonowicz & Pardi, 1993;
 Legault et al., 1994)。また、 ^1H - ^{15}N 、 ^1H - ^{13}C など直接結合した核スピン間の大
 きなスピン結合を利用して ^1H シグナルの帰属を効率よく行うとともに、スピン結
 合定数Jより二面角の情報を得ることができる (図1-10b; Legault et al., 1995;
 Hines et al., 1994)。さらに、安定同位体標識を選択的に行えば、標識した部分
 に由来するシグナルのみを選択的に観測することができる (Nikonowicz et al.,
 1992)。そこで本研究でも、安定同位体標識法を用いたNMRにより、リボサイ
 ムを構造解析することを試みた。

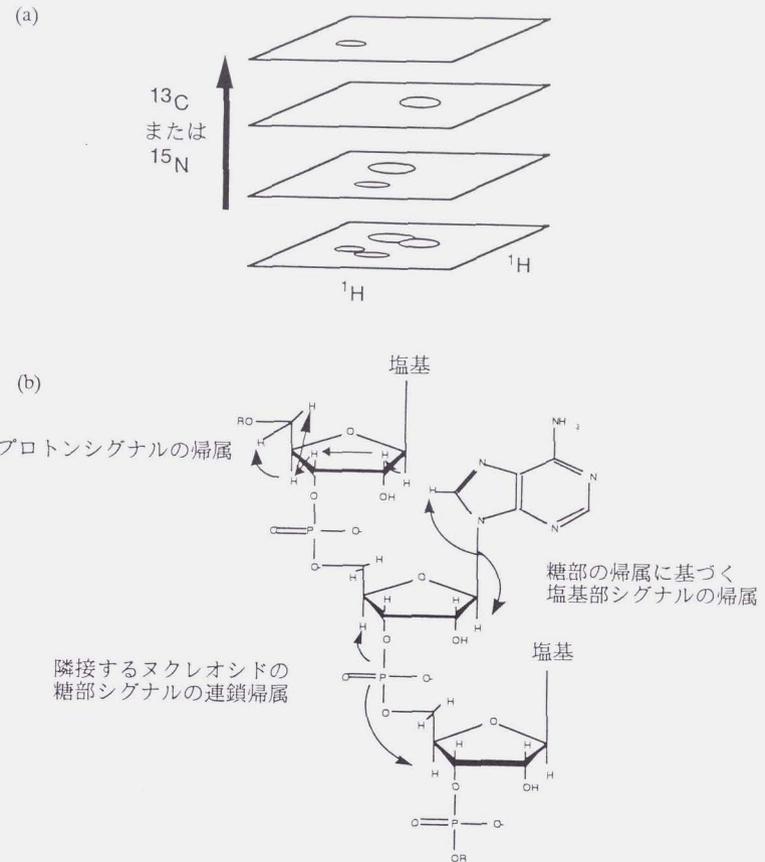


図1-10 RNAのNMRによる構造解析における安定同位体標識の有用性
 (a) ^{15}N 核あるいは ^{13}C 核によるシグナルの分離
 (b) ^1H - ^{15}N 、 ^1H - ^{13}C など直接結合した核スピン間の大きなスピン結合を利用した
 糖部および塩基部の ^1H シグナルの帰属と ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P を利用した連鎖帰属

1-5 本研究の目的および意義

リボザイムは抗エイズウイルス剤や抗癌剤として期待されているが、リボザイムの切断反応機構の分子の基盤は明らかになっておらず、リボザイムを薬剤として高機能化するための指標は得られていない。そこでリボザイムの高機能化には、リボザイムの立体構造を明らかにし、構造と機能の相関を調べる必要があると考えた。本研究ではハンマーヘッド型リボザイムおよびHDVリボザイムの酵素学的特性を調べ、NMRを用いて立体構造を明らかにすることによりリボザイムの構造と機能の相関を調べることを目的とした。

本研究でハンマーヘッド型リボザイムとHDVリボザイムを選んだ理由を述べる。ハンマーヘッド型リボザイムは、リボザイムの中で現在最も研究が進んでおり、その酵素学的特性がほぼ明らかになっている。また、リボザイムの分子量が小さいことから、切断反応機構が単純であることが予想され、さらに、NMRによる構造解析においてシグナルの重なりが少なく、構造解析が比較的容易であることが予想される。HDVリボザイムについては、臨床応用を考えた場合、本来人体で働いているリボザイムであるので薬剤として有効であることが期待される。また、比較的分子量の大きいRNAをNMRにより構造解析する際のひとつの方法を模索するという点でもHDVリボザイムの構造解析は有意義である。さらに、得られた構造をハンマーヘッド型リボザイムの構造と比較することにより、類似する点および相異なる点を明らかにし、そして酵素学的特性と照らし合わせることで、リボザイムの構造と機能の相関について多くの情報が得られることが期待される。

本研究では、リボザイムの構造解析に安定同位体標識法によるNMRを用いたが、RNAの安定同位体標識法は最近開発されたため、その技術を利用してRNAの構造解析を行っている研究室は少ない。そこで、安定同位体標識法を当研究室において確立し、それを用いてリボザイムの構造解析をすることは非常に意義あることである。また、RNAの構造解析はタンパク質に比べると発展途上の領域であり、実際に分子量が大きく、生物活性を持つものについて構造解析された例は極めて少ない。そこで、リボザイムを構造解析することはRNAの機能構造を考えるうえで、そしてRNAの構造解析における方法論を積み重ねていくうえで重要な研究であると思われる。

第二章 リボザイムのデザイン

2-1 ハンマーヘッド型リボザイムのデザイン

リボザイムをNMRを用いて構造解析する際、NMRシグナルの重なりが激しいためにシグナルの帰属が困難であることが予想された。そこで本研究では、リボザイムを小型化することによってNMRシグナルを減らし、安定同位体法を用いることにより、重なったシグナルの分離を試みた。

ハンマーヘッド型リボザイムの小型化の際には、ヘリックスIIに着目した。従来、ハンマーヘッド型リボザイムのヘリックスIIにあるG10.1-C11.1の塩基対に変異を導入すると、切断活性は減少することが知られていたが (Ruffner et al., 1990)、近年ヘリックスIIは必ずしも必要ではなく、ヘリックスIIをループ (McCall et al., 1992; Tuschl & Eckstein, 1993; Long & Uhlenbeck, 1994) または核酸ではないリンカー (Thomson et al., 1993; Benseler et al., 1993) に置換しても活性があることが報告された。そこで本研究では、報告されているヘリックスII欠損変異体の中で活性が高いUUUUによる置換を行った (図2-1)。U残基は4種のスクレオチドの中でも内部ループとの相互作用が比較的少ないと考えられ、これがUUUUの変異体が活性が高い原因のひとつかもしれない。また、本研究ではG:A塩基対の構造を調べることをひとつの目的としており、G残基由来のNMRシグナルを少なくするためにUUUUのテトラループは都合がよいと考えた。

ヘリックスII欠損変異体が切断活性を持つということは、内部ループ部分のみでリボザイムの活性中心を安定化することができ、ヘリックスIIはその安定化の補助的役割をしているということを示唆している。実際に、X線結晶構造解析では内部ループ部分の8:13および9:12で非ワトソンクリック型のG:A塩基対を形成していることが明らかとなっており (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)、NMRによる構造解析でもG:A塩基対の存在は示唆されている。ヘリックスIIからUUUUへの置換がリボザイムの活性中心およびG:A塩基対の構造に及ぼす影響を調べることによってヘリックスIIの役割が明らかになると考え、小型化したリボザイムをデザインした。

本研究で小型化したハンマーヘッド型リボザイム (小型リボザイム、図2-1c) をデザインする際に、大阪大学の上杉研究室で研究されていた三本の鎖からなるリボザイム (親リボザイム、図2-1b; Odai et al., 1990A, B; Odai et al., 1994; Uesugi et al., 1992) を元にした。親リボザイムはタバコリングスポットウイルスのサテライトRNA由来のハンマーヘッド型リボザイムを元にしてデザインされ、基質部分については基質同士あるいはそれ自体で塩基対を形成しにくいようにデザインされている。小型化したリボザイムの系では、基質部分が11-mer (Sub11)、

酵素部分が24-mer (Rz24) となった。親リボザイムでは、酵素学的特性（切断活性に対するMgCl₂濃度、pH、金属イオン種、温度の影響）が調べられており、NMRによる構造解析も行われている。そこで、小型リボザイムの酵素学的特性とNMRによる構造解析の結果を親リボザイムのものと比較することを試みた。

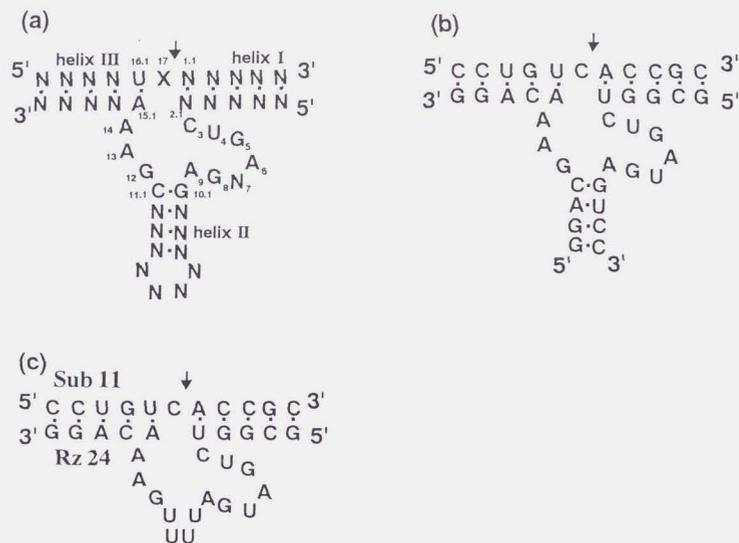


図2-1 ハンマーヘッド型リボザイムの二次構造 (a)よく研究されているタイプのハンマーヘッド型リボザイム（トランス型）。矢印は切断部位、XはA、C、Uを表し、NはA、G、C、Uを表す。それ以外の残基は切断活性に重要な残基である。(b)親リボザイム。(c)小型リボザイム。基質部分をSub11、酵素部分をRz24とする。

2-2 ハンマーヘッド型リボザイムのデザインにおける難しさ

本研究では、Rz24をT7 RNAポリメラーゼによる転写系により調製したが、その収量は低かった（第3章を参照）。これはRz24がヘアピン構造を作ることにより鑄型となってRNAの伸長反応が進むため、4残基長い28-mer (Rz28) が主生成物となることが原因であることが明らかとなった（第5章を参照）。NMRによる構造解析では試料を大量に必要とするため、収量が低いRz24はNMRによる構造解析の試料としては不適當である。そこで、酵素部分24-merがヘアピン構造を作らない様に3'末端から2番目のG残基をCに置換したもの（Rz24'）をデザインした（図2-2）。置換した残基は基質と塩基対を形成する部位にあるので、基質については、5'末端から2番目のC残基をGに置換した（Sub11'）。Rz24'を転写反応により調製したところ、その収量はRz24の約5倍となった。次にRz24'についてNMRを測定したところ、シグナルの数が多く、Rz24'が多形であることが示唆された。そのため、シグナルの帰属が難しく、構造解析が困難であった（第5章を参照）。そこで、方針を変え、Rz28の構造解析を行った後、Rz28のデータを利用してRz24について構造解析した。本論文では、主にRz24の酵素学的特性および構造について述べる。

また、本研究ではハンマーヘッド型リボザイムのG:A塩基対に注目したが、G:A塩基対を含む14-merのNMRシグナルを帰属し、これを利用してRz24のG:A塩基対について構造解析することも試みた（図2-2f）。NMRによる構造解析では、試料の分子量が小さいほどシグナルの数が減るので構造解析が容易になる。しかし、14-merの構造解析を行ったところ、予想していた二次構造（ヘアピン構造）ではなく、二重鎖を形成していた（第5章を参照）。よって、二重鎖を形成した14-merにはG:A塩基対は存在しないため、Rz24の構造解析には利用できなかった。

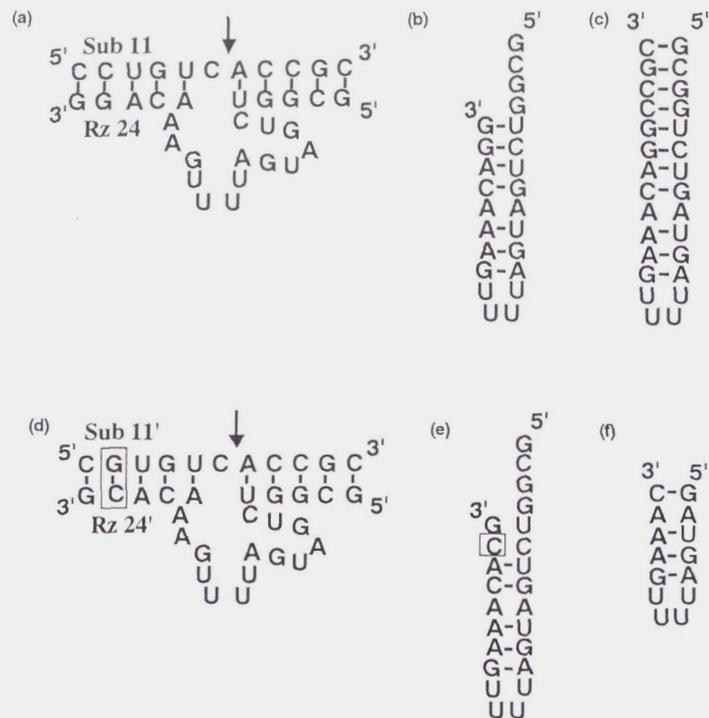


図2-2 本研究でデザインしたハンマーヘッド型リボザイムおよび関連RNA (a)小型リボザイムRz24およびSub11 (b)ヘアピン構造のRz24 (c)Rz24を転写反応により調製したときに得られる主生成物Rz28 (d)酵素部分がヘアピン構造を形成しにくいようにデザインした小型リボザイム (Rz24'およびSub11') (e)ヘアピン構造を形成しにくいRz24' (f)酵素部分Rz24のG:A塩基対を含む部分14-mer

2-3 HDVリボザイムのデザイン

HDVリボザイムについても安定同位体標識法を用いたNMRにより高次構造を明らかにすることを目的として小型化を行った。しかし、小型化してもHDVリボザイムはハンマーヘッド型リボザイムより分子量を小さくできないので、構造解析が困難であることが予想された。そこで、三本鎖からなるHDVリボザイムをデザインした。三本鎖からなるHDVリボザイムのそれぞれの鎖を安定同位体標識することにより、それぞれの鎖由来のシグナルを準選択的に観測することができる

ので、構造解析が容易になると思われる。HDVリボザイムを三本鎖に分ける際には、二本鎖からなるHDVリボザイム(トランス型)を参考にした。二本鎖に分割する方法は二通り報告されており、一方はステムIとIIの間で分けており、もう一方はステムIVの先のループで分けている(図2-3; Been et al., 1992; Perrotta & Been, 1992; Perrotta & Been, 1993; Puttaraju et al., 1993; Wu et al., 1992; Branch & Robertson, 1991)。そこで、この二箇所に分けることによりHDVリボザイムを三本鎖にした。

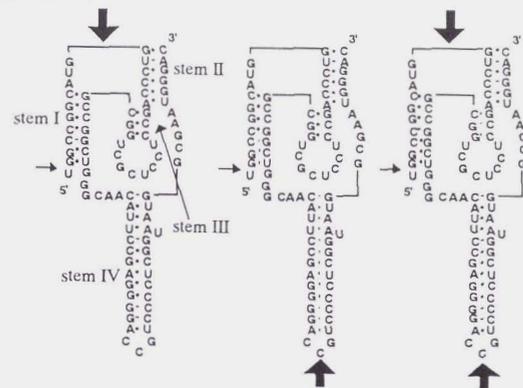


図2-3 HDVリボザイムの分割法。大矢印が分割する位置。ステムIとIIの間で分ける場合、ステムIVの先のループで分ける場合、二箇所に分ける場合。

また、小型化のためには過去に出された報告を参考にし、切断活性の減少が小さくなるようにデザインした。mutagenesis (Wu et al., 1992; Wu & Huang, 1992; Wu et al., 1993; Suh et al., 1992; Kumar et al., 1992; Kumar et al., 1993; Smith et al., 1992; Thill et al., 1993; Kawakami et al., 1993; Macnaughton et al., 1993; Tanner et al., 1994)、チオリン酸による置換 (Jeoung et al., 1994) および化学修飾 (Belinsky et al., 1993) の実験により、切断部位、ステムIとIVの間部分 (JI/IV)、ステムIIとIVの間部分 (JII/IV) およびループIIIが切断活性に重要であることが報告されている。そこで、これらの部分は保存するように小型化した。ステムIVは、活性構造を保持するのに必要であり、直接的に切断反応に関与する残基を持たないので、ステムIVを短くしても切断活性を保持できることが知られている。そこで、小型HDVリボザイムではステムIVを短くした。

Beenらはトランスに働くHDVリボザイムの小型化とゲノム鎖およびアンチゲノム鎖のキメラ化を同時に施し、切断活性の高いリボザイムを作成することに成功している (Been et al., 1992)。そこで、本研究では、Beenらのデザインしたり

ボザイムを三本鎖に分け、さらに小型化したHDVリボザイムを図2-4eのようにデザインした(基質部分8-mer、酵素部分16-merと35-mer)。この小型リボザイムでは、ステムIII、ステムIIの一部、ステムIIとIVの間の部分(JII/IV)がゲノム鎖由来の配列、ステムI、ステムIVの一部、ステムIとIVの間の部分(JI/IV)、ループIIIがアンチゲノム鎖由来の配列となる。

2-4 HDVリボザイムのデザインにおける難しさ

HDVリボザイムを構造解析するためにリボザイムの小型化が必要であるが、現在、HDVリボザイムの構造と機能の相関は明らかになっておらず、小型化のための指針はない。そこで本研究では、小型化したリボザイムについて活性を測定し、高い活性を持つものについて構造解析するという方針で研究を進めた。最終的には2-3で述べたような小型リボザイムをデザインしたが、それまでに二つのリボザイムをデザインした。ここでは、その二つのリボザイムについて報告する。

はじめ、HDVリボザイムのアンチゲノム鎖の配列から、基質部分が13-mer、酵素部分が15-merと34-merの小型リボザイムをデザインした(図2-4c)。この小型リボザイムの切断活性を調べたところ、その切断反応の擬一次反応速度定数 k_{obs} は 0.001min^{-1} 以下であり、非常に低かった。このリボザイムの切断活性が低かった原因として、リボザイムのステム部分の相互作用が弱いために、活性型の構造を形成しにくいということが考えられた。そこで、ステム部分を強化する(G:C塩基対の数を増やす)ために、Beenらのデザインに従って小型リボザイムをゲノム鎖とアンチゲノム鎖のキメラ体にした(基質部分13-mer、酵素部分16-merと35-mer; 図2-4d)。キメラ体にしたところ、その活性(k_{obs})は約10倍(0.008min^{-1})に上昇したが、不十分であると考えた。そこで、この小型リボザイムの切断活性が低い原因を調べるために、それぞれ基質部分および酵素部分の T_m を調べたところ、基質部分13-mer ($5'GGCUUCGGGUCGG3'$) の T_m は非常に高く、 54°C であった。基質13-merは、それ自体で安定な構造を形成し、酵素部分と相互作用しにくいために、切断活性が低いことが示唆された。そこで、2-3で述べたようにBeenらのデザインに従い、基質がそれ自体で安定な構造を形成しないように基質の5'側5残基を削り、基質部分を8-merとしたところ、 k_{obs} は約 0.09min^{-1} となった(第4章参照)。この小型リボザイムの切断活性も十分ではないが、切断反応条件を最適化することによりさらに活性が上昇する可能性もある。そこで、この小型リボザイムの特性を調べるとともに切断反応に最適な条件を検討したので報告する。

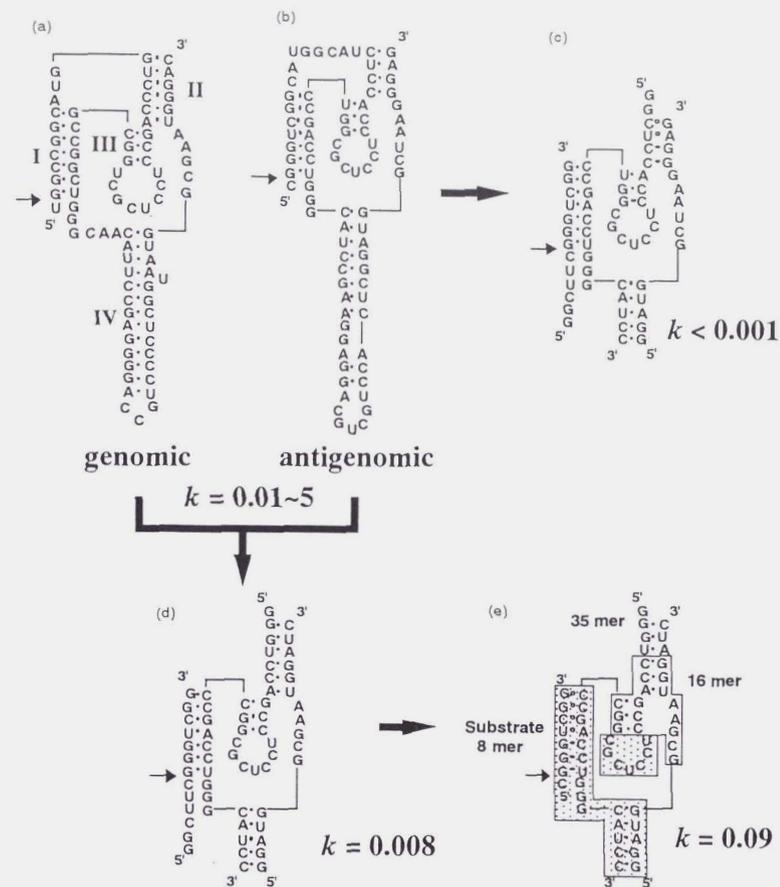


図2-4 本研究でデザインしたHDVリボザイムとその擬一次反応速度定数 (a)ゲノム鎖 矢印は切断部位を示す。(b)アンチゲノム鎖 (c)アンチゲノム鎖からデザインした小型リボザイム (d)ゲノム鎖とアンチゲノム鎖のキメラの小型リボザイム (e)基質を8 merとした小型キメラリボザイム □はゲノム鎖由来の配列、▨はアンチゲノム鎖由来の配列

第三章 リボザイムの調製

3-1 リボザイムの調製法の確立

RNAの調製法としては、化学的に合成する方法 (Odai et al., 1990A,B; Odai et al., 1994) とT7 RNAポリメラーゼを用いて転写する方法 (Milligan et al., 1987; Milligan & Uhlenbeck, 1989) があるが、前者の優れた点は、短鎖のRNAであれば容易に高収率で合成できることである (手動でRNA合成をする際には、1残基伸長するのに約40分を要し、常に反応に従事する必要があるので20残基以上になると大変である)。また、RNA鎖に修飾塩基を導入することも可能である。一方、後者の優れた点は、長鎖 (数百残基) のRNAの調製が可能であることである。RNA合成機を使用すれば、現在100残基近くのRNAを合成することも可能となっているが、原料となるアミダイトが高価なため、コストが高くなる。またT7 RNAポリメラーゼによる転写系では、NMR解析のための安定同位体標識が比較的安価にそして一様にできるという点も優れた点である。そこで本研究では、T7 RNAポリメラーゼによって転写する方法を用いてリボザイムを調製した (図3-1)。リボザイムの調製法を確立するためには、はじめに研究対象としたハンマーヘッド型リボザイムの酵素部分 24-merを用いた。

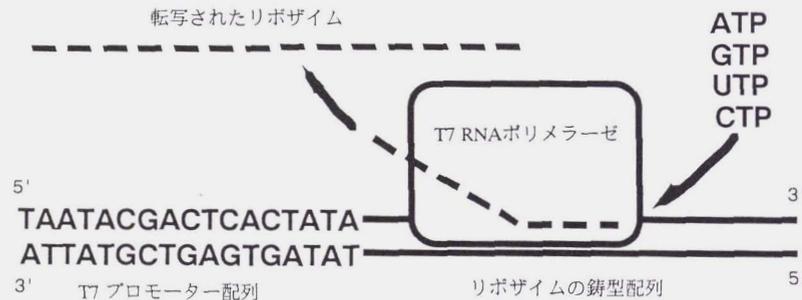


図3-1 T7 RNAポリメラーゼによる転写反応の模式図

T7 RNAポリメラーゼによる転写反応では、目的のRNAに転写される配列 (鋳型部分) の上流にT7プロモーター配列 (17残基: $5'$ TAATACGACTCACTATA $3'$ / $3'$ ATTATGCTGAGTGATAT $5'$) を持つ鋳型DNAを用いた。鋳型DNAの二本鎖のプロモーター領域にT7 RNAポリメラーゼが結合して転写が始まる。転写される領

域は一本鎖 (目的のRNAに相補的な鎖) でもよいことが知られているが、条件検討の結果、転写される領域も含めて全体が二本鎖からなる鋳型DNAを転写反応に用いた。鋳型DNAはDNA合成機により合成したものを脱保護した後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により不純物 (短鎖のものや保護基など) と分離した。さらに、これをゲルから切り出したものを抽出して、エタノール沈殿により精製、脱塩した。

T7 RNAポリメラーゼは市販されているが、市販品ではその濃度が低いため、反応液中の酵素濃度を十分上げられない。短い鋳型DNAを転写に用いる場合、鋳型DNAと酵素との衝突頻度を上げるために、酵素濃度を上げる必要がある。そこで、T7 RNAポリメラーゼは大腸菌を用いた大量発現系により調製した。T7 RNAポリメラーゼの大量発現はZawadzkiら (1991) の方法 (Grobergら (1988) の方法を単純化した方法) に従い、プラスミドpAR1219を導入した大腸菌BL21を用いた (Davanloo et al., 1984)。pAR1219はlacUV5プロモーターの下流にT7 RNAポリメラーゼの遺伝子をもつプラスミドであり、IPTGを培地に加えることによって発現を誘導することができる。また集菌後には、溶菌、塩析、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。

RNAの転写反応条件は基本的にMilliganら (1987) の方法に従った。転写反応には、T7 RNAポリメラーゼ、鋳型DNA、NTPs、MgCl₂、DTT、スベルミジンおよび緩衝液が必要であるが、本研究で調製するRNAは50-mer以下であるため鋳型DNA、T7 RNAポリメラーゼおよびRNAの原料となるNTPsの濃度を高くして衝突頻度を上げることにより、転写効率を上げる必要があると考えた。そこで、反応条件の最適化を行った。20 μlスケールの転写反応液に [α -³²P] CTPを加えることにより、RNAに [α -³²P] CTPを取り込ませ、反応液を変性PAGEによって分離してオートラジオグラフィーを行うことによって、それぞれの反応液の転写物の量を定性的に比較した。

転写条件を確立した後、RNAの転写を200 μlスケールで行い、転写産物を鋳型DNAと同様に变性PAGE (1 mm厚のゲル) により精製した (リボザイムの安定同位体標識の際には、同様の転写条件において原料となるGTPの代わりに¹⁵N-GTPを反応液に加えた)。さらに精製物の塩基配列を確認するため、アルカリリフォスファターゼにより5'リン酸をRNAから除去した後、 [γ -³²P] ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'端を³²Pにより標識し、4種類のRNase、RNase T₁、RNase U₂、RNase *Phy* M、RNase *Bc*により処理した (Kuchino & Nishimura, 1989)。

3-2 ハンマーヘッド型リボザイムの調製

T7 RNAポリメラーゼを用いた転写によりハンマーヘッド型リボザイムを調製することを試みたが、高い転写効率を得るためには5'末端にG残基が必要である。そこで、基質部分については、親リボザイムと同じ11-merの5'末端にG残基をひとつ付加した12-merをT7 RNAポリメラーゼによる転写系で調製した（酵素部分24-merの5'末端はもともGである）。鋳型DNAについては、酵素部分24-merを転写するための鋳型DNAとしてセンス鎖とアンチセンス鎖ともに41-mer、基質部分12-merを転写するための鋳型DNAとしてセンス鎖とアンチセンス鎖ともに29-merを調製し（3-1参照）、転写反応に用いた。

リボザイムを構造解析している最中に切断反応が起こらないように工夫する必要がある。リボザイムが活性型に近い構造を形成しつつ、切断が起こらないようにする方法として、切断部位のC残基の2'-OMe化と2'デオキシ(-H)化が考えられる（Odai et al., 1990A,B; Uesugi et al., 1992）。前者では、本来のリボザイムが有する2'-OH体と比べて空間的に大きくなり、後者では逆に小さくなる。このことがリボザイムの構造にどのように影響するかは明らかになっていないが、Mg²⁺非存在下で2'-OMe体および2'-H体のイミノプロトンスペクトルを2'-OH体のものと比較すると、2'-H体と比べて2'-OMe体のスペクトルの方が2'-OH体のものに似ていることが知られている（Odai et al., 1990A,B; Uesugi et al., 1992）。切断活性には切断部位の2'-OHの酸素原子が非常に重要であると考えられているので、2'-OMe体の方が2'-H体と比べて、その構造が2'-OH体に似ているのかも知れない。そこで本研究では、基質が切断されないように切断部位のC残基を2'-OMe化した基質を化学的に合成した（当研究室博士課程 金美希氏より供与; Inoue et al., 1987）。切れない基質は11-merとした。

3-3 HDVリボザイムの調製

小型HDVリボザイムは三本の鎖からなるが、酵素部分16merおよび35merはT7 RNAポリメラーゼによる転写系を用いて調製し、基質部分8-merについてはGenset社に依頼合成した。基質部分の配列は5'CGGGUCGG3'であり、5'末端がCであるためT7 RNAポリメラーゼによる転写系では調製できない。また、T7 RNAポリメラーゼによる転写を可能にするため、ハンマーヘッド型リボザイムのSub 12のように5'末端にG残基をひとつ付けることを考えたが、付加する位置が切断部位に近く、HDVリボザイムの切断活性を阻害する可能性があるために行わなかった（切断部位の5'側のC残基をGに置換すると活性が低くなることが知られている; Wu & Lai, 1992）。また、ハンマーヘッド型リボザイムと同様に切れない基質を合成した（当研究室修士課程 田中陽一郎氏より供与; Inoue et al.,

1987）。

HDVリボザイムについても、転写反応条件の検討を行ったが、最適条件はハンマーヘッド型リボザイムにおける最適条件とほぼ同じであり、その条件で反応を行い、酵素部分16-merおよび35-merを得た。また、酵素部分16-merを転写するための鋳型DNAとしてセンス鎖とアンチセンス鎖ともに33-mer、酵素部分35-merを転写するための鋳型DNAとしてセンス鎖とアンチセンス鎖ともに52-merを用いた。

3-4 結果および考察

3-4-1 鋳型DNAの調製法

鋳型DNAの調製では、DNA合成機により合成したものを脱保護し（アンモニア処理）、それを変性PAGEおよびcrush and soak法により精製した。DNA合成機による合成では、1残基伸長するときの収率（step yield）が約98%であり、DNA鎖が長くなると最終的な収率（total yield）が低くなり、短鎖のRNAの混在が多くなる（トリチルアッセイの結果、35-merでは約50%である）。鋳型DNAは転写反応に使用するので短鎖のDNAが含まれていると短いRNAが合成されてしまう。そこで、短鎖のDNAを含む成品から高純度のDNAを精製する必要がある。鋳型DNAの精製法については、OPCカートリッジなどのC-18による逆相カラムクロマトグラフィー（DNA合成機上の反応の最後にトリチル基の脱保護を行わないと、目的の長さのDNAのみがトリチル基を持つので、トリチル基の疎水性を利用して精製できる）も検討したが、本研究では変性PAGEによる精製法を用いた。以下にその理由を述べる。変性PAGEによる精製ではUV照射によってDNAのバンドを確認しながらゲルから一本のバンドを切り出しているため、他の方法に比べて純度の高い鋳型DNAを得ることができた（ただし、アクリルアミドの濃度を最適化し、電気泳動を十分行うことによって分解能を高くする必要がある）。アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラムクロマトグラフィーでは高純度の精製ができると思われるが（本研究では、簡単に精製したかったため、この方法は用いなかった）、OPCカートリッジのようにバッチ法を用いると純度は低かった（図3-2）。これは、カラムの洗浄法が悪かったために樹脂にトリチル基のないDNAも吸着したことが原因かもしれない。

収率については、ゲルからcrush and soak法により抽出した場合、約50%であった。ゲルからの抽出効率はDNAの鎖長に依存すると考えられているが、本研究ではほとんど差がなかった。また、electro elution法を用いると、抽出効率は上がると考えられているが、鋳型DNAの精製ではより簡単に短時間で精製できるcrush

and soak法を用いた。crush and soak法により抽出した場合に注意すべき点としては、尿素およびアクリルアミドは転写反応を阻害する可能性があるので十分脱塩を行う必要があると思われる。そこで、本研究ではエタノール沈殿を2回行った。また、改良すべき点としては、本研究では1 mm厚のゲルを用いて一度に約20 A₂₆₀ユニットのDNAを精製したが、さらに大量のDNAを一度に精製できるようにゲルの厚さなどを検討する必要があると思われる。

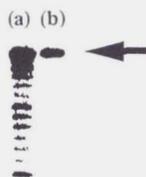


図3-2 精製法の違いによる鋳型DNAの純度の違い。鋳型DNA 41-merをそれぞれC-18によるカラムクロマトグラフィー(a)あるいはPAGE(b)によって精製したものを5'末端標識した後、PAGEにかけてオートラジオグラフィーした図。矢印が41-mer。

3-4-2 T7 RNAポリメラーゼの調製

T7 RNAポリメラーゼの調製は、すでに報告されている方法に従った。1リットルスケールで培養を行ったところ、約8 gの菌体を得ることができた。これを溶菌し、T7 RNAポリメラーゼを精製したところ、約0.1 μmol (分子吸光係数は $1.4 \times 10^5 M^{-1}$ であり、これを用いて計算した)得ることができた。この収量は、報告されている論文の収量と比較すると約10%の収量である。収量が低くなった原因としては、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにおける分離能が低かったこと、さらに、分離能が低いために多くのカラムフラクションを回収したが、そのために酵素濃度が低くなり、塩析で得られる沈殿の量が少なくなったということが考えられる。そこで、塩析の際にセントリコン30により濃縮すると沈殿の量は増え、収量が増えた(増えた収量については定量しなかった)。また、活性測定については、市販の酵素と比較することによって行い、1リットルの培養で約 4×10^6 unitsの酵素が得られた。

3-4-3 転写反応条件の検討

転写反応条件の検討では、40 mM Tris-HCl (pH 8.1 at 37°C)、6 mM MgCl₂、5 mM DTT、1 mM スベルミジン、0.01% Triton X-100、80 mg/ml PEG 8000、1 mM NTPs (each)、0.1 μM 鋳型DNA、0.1 mg/ml T7 RNAポリメラーゼの組成で37°Cで2時間というMilliganら(1987)の方法を元にして最適化を行った。まず、転写量の時間変化を調べたところ、時間とともに転写量は増え、約5時間で最大量に達した(図3-3)。反応液は37°CでpH8.1が最も良いことが知られており、そのためpH 8付近で緩衝能が高いHepes緩衝液を使用している論文もある。そこで、Hepes緩衝液を試したが、転写効率の上昇は見られなかった。NTPsの濃度はMilliganらの論文ではそれぞれ1 mMであるが、Ambion社の高い効率を有する転写キット(Megascript)ではそれぞれ7.5 mMである(反応液の他の組成については不明である)。NTPs濃度が1 mMと7.5 mMの時で転写効率を比較したところ7.5 mMの時の方が転写量が多かった。鋳型DNAおよびT7 RNAポリメラーゼの濃度についてもMegascriptの条件を参考にして条件検討したところ、ほぼ2 μM 鋳型DNAで転写効率は最大に達し、T7 RNAポリメラーゼが20 U/μlの時に転写効率は最大に達した。また、反応3時間後に再び20 U/μlのT7 RNAポリメラーゼを加えたところ、転写量が増えることがわかった。さらに、MgCl₂、DTT、スベルミジンの濃度について検討した。MgCl₂濃度を変えて転写を行ったところ、35 mMの時に最も転写量が多かった(図3-4)。NTPsはMgCl₂と複合体を形成してT7 RNAポリメラーゼに取り込まれるので、NTPsとほぼ等量のMgCl₂が必要であると思われる。さらに、MgCl₂は鋳型DNAおよびRNAの構造を安定化する働きをしていると考えられる。DTTは酵素を安定化するために加えていると考えられ、DTT濃度を変えても転写効率には影響しなかった(図3-5)。スベルミジンについては、その濃度を上げると非特異的な転写が減ったが、転写量も減った(図3-5)。正の電荷を持つスベルミジンは負の電荷を持つ鋳型DNAの構造を安定化して非特異的な転写を減らすと同時に、正の電荷を持つ酵素と負の電荷を持つ鋳型DNAとの相互作用を弱めていると考えることができる。100 mM NaClを加えると非特異的な転写が減るという報告があるが、本研究では転写量が減少した。この原因もスベルミジンの時と同様に考えられる。以上の条件検討により、40 mM Tris-HCl (pH 8.1 at 37°C)、35 mM MgCl₂、5 mM DTT、2 mM スベルミジン、0.01% Triton X-100、80 mg/ml PEG 8000、7.5 mM NTPs (each)、2 μM 鋳型DNA、20 U/μl T7 RNAポリメラーゼの組成で37°Cで3時間反応した後、さらに20 U/μlのT7 RNAポリメラーゼを加えて2時間反応することにした。

また、T7プロモーターの配列のみが二本鎖である鋳型DNAに比べて全体が二本鎖である鋳型DNAを用いて転写を行った場合に収量が多かった(図3-6)。こ

れは、鋳型DNA全体を二本鎖にすることによって、転写反応に必要なT7プロモーターの二本鎖領域が安定化したことが原因のひとつとして考えられる。あるいは、二本鎖では転写を阻害するヘアピン構造等を形成しにくくなるのかもしれない。また、T7プロモーターの二本鎖領域を安定化するためにプロモーターの上流を少し長くすることを考えたが、1塩基対増やしても収量は増えなかった（もっと長くすると転写効率は上昇するという報告もある）。

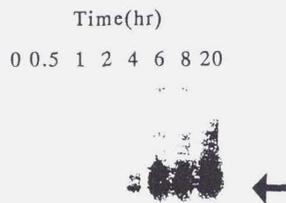


図3-3 転写反応の時間変化。[α - 32 P]CTPをRNAに取り込ませた後、PAGEを行い、オートラジオグラフィーした図。矢印が目的の転写物24-mer。

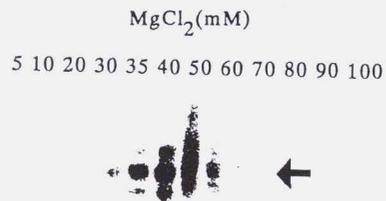


図3-4 転写反応のMgCl₂濃度依存性。矢印が目的の転写物24-mer。

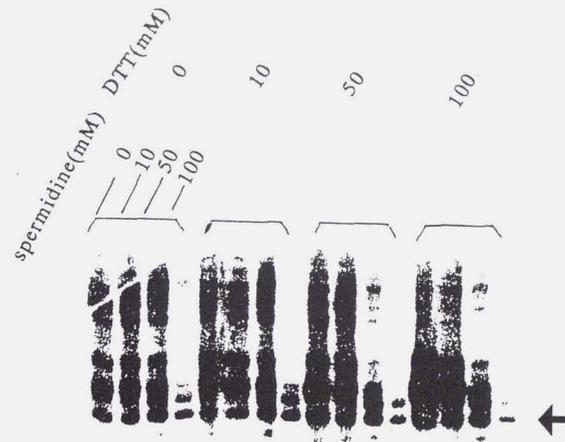


図3-5 転写反応のDTTおよびスベルミジン濃度依存性。矢印が目的の転写物24-mer。

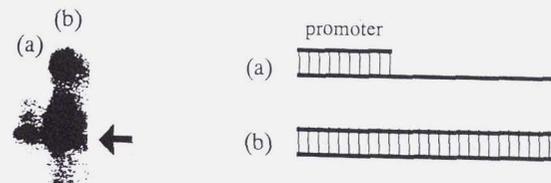


図3-6 鋳型DNAのデザインによる転写量の違い。矢印が目的の転写物16-mer。

3-4-4 ハンマーヘッド型リボザイムの調製

200 μ lスケールで転写を行ったところ、24-merは1 nmol（ターンオーバー数3回、GTPの取り込み効率1%）、12-merは9 nmol（ターンオーバー数30回、GTPの取り込み効率2%）得られ、RNAの収量は多くなかった。T7 RNAポリメラーゼによる転写反応において、目的のものより1残基長い転写産物が得られること

はよく知られている。また、転写反応の途中で酵素が鋳型DNAと解離することがあり、目的のものより短い転写産物も得られる。このような非特異的な転写が24-merおよび12-merの転写反応において多かったことが、収量が少なくなった原因として考えられる。

また、24-merの転写反応を行ったところ、28-mer (5 nmol、ターンオーバー数15回、GTPの取り込み効率5%) が主生成物として得られた。本研究の途中で、転写されたRNAがヘアピン構造を形成し、5'末端がoverhangしていると、そのoverhangしている部分が鋳型となり転写反応が余分に進むということがCazenaveら(1994)によって報告された。そこで、28-merの構造を調べたところ、ヘアピン構造を作り、28-merの5'末端の4残基が鋳型となっていることがわかった。24-merから28-merへの余分な伸長反応が、24-merの収量を少なくしていることがわかった。になることが考えられた。この余分な転写は目的の転写物の転写量を極端に減らすものであり、RNAをデザインする際にヘアピン構造を形成するか否か検討する必要がある。

得られたRNAの塩基配列はアルカリ加水分解および4種類のRNase、RNase T₁、RNase U₂、RNase *Phy* M、RNase *Bc*によって調べた。RNase T₁はG残基の3'側で特異的に切断する酵素で、同様にU₂はAの、*Phy* MはAとUの、*Bc*はCとUの3'側で特異的に切断する酵素である。これらの酵素によって限定分解したものをアルカリ加水分解したものと一緒に変性20%PAGEにより解析したところ、目的のRNAであることがわかった(図3-7)。

3-4-5 HDVリボザイムの調製

200 μlスケールで転写を行ったところ、16-merは5 nmol (ターンオーバー数10回、GTPの取り込み効率1%)、35-merは7.5 nmol (ターンオーバー数15回、GTPの取り込み効率3%) 得られた。また、ハンマーヘッド型リボザイムと同様に、これらのRNAについて配列を確認した(図3-8)。

以上のように本研究で転写したRNAの収量は少なかったが、鉛リボザイム30-merは同じ転写反応条件で約25 nmol得られた(ターンオーバー数50回、GTPの取り込み効率5%)。このRNAは30-merでヘアピン構造を形成し、5'末端と3'末端が揃うことが予想される。このように、5'末端と3'末端が揃っている場合には、余分に転写が進むことはないので収量が多くなると思われる。T7 RNAポリメラーゼによる転写の効率はRNAの配列および構造に大きく依存するので、今後T7 RNAポリメラーゼによる転写メカニズムを明らかにし、工夫する必要があると思われる。

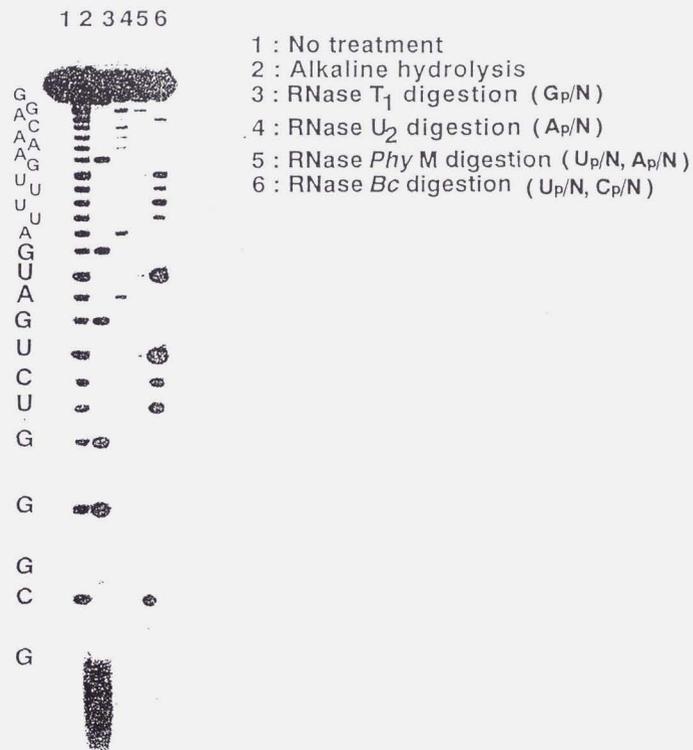
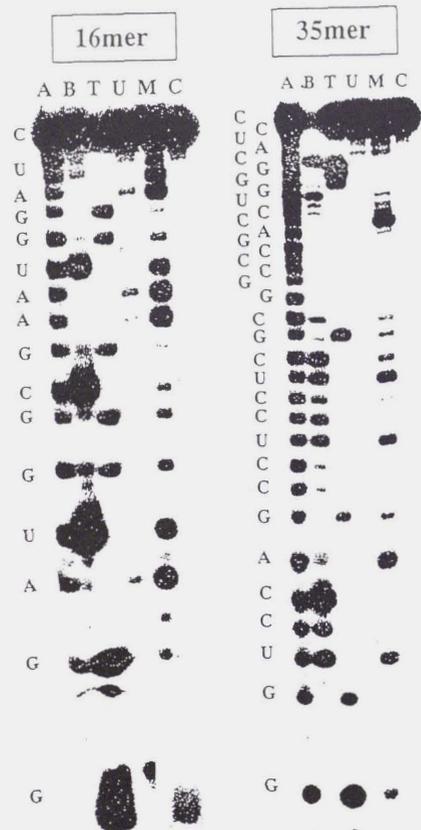


図3-7 Rz24の塩基配列の確認



C: control
 T: RNase T1 (Gp/N)
 U: RNase U2 (Ap/N)
 M: RNase phyM (Up/N, Ap/N)
 B: RNase BC (Up/N, Cp/N)
 A: アルカリ加水分解

図3-7 HDVリボザイムの酵素部分16-merおよび35-merの塩基配列の確認

第四章 小型ハンマーヘッド型リボザイムの特性

4-1 酵素学的特性およびCDの解析

本研究で調製した小型リボザイムの酵素学的特性を調べるために、デザインのもととなったリボザイム（親リボザイム; Odai et al., 1990A,B; Odai et al., 1994; Uesugi et al., 1992）の特性と比較した。実験の手順については、基質の5'末端を³²Pで標識した後、親リボザイムと同様の条件（1 μM基質、1 μM酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM MgCl₂、37°C）で反応し、二倍量の反応停止液（80%ホルムアミド、20 mM EDTA）を加えて反応を止めた。基質は切断されると、5'末端が標識されている7-merと標識されていない5-merになるので、24% PAGEを行った後、バイオイメージアナライザーBAS-1000を使用して定量した（図4-1）。

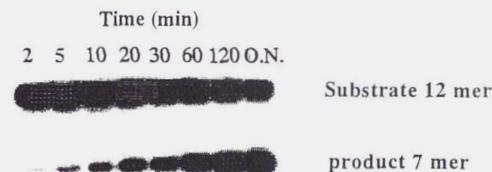


図4-1 切断反応のオートラジオグラフィーの図。1 μM基質、1 μM酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8) および10 mM MgCl₂の組成で37°Cで反応。

酵素学的特性の解析

始めに、切断された基質の割合の時間変化を調べた。さらに、切断活性に対するMgCl₂濃度、温度、pHおよび二価金属イオン種の影響を調べるため、上記の反応液組成でそれぞれひとつの要素を変化させて切断実験を行い、1時間後に切断された基質の割合を調べた。しかし、反応条件を変えた場合に切断反応の時間変化が変わるために、1時間後に切断された基質の割合は正確には切断反応速度を反映していない。例えば、異なる条件において1時間後に切断された基質の割合が共に90%であったとしても、10分後に切断された基質の割合は等しいとは限らず、20%であったり、60%であることがある（図4-2）。そこで、それぞれの条件で酵素学的パラメーター（擬一次反応速度定数 k はリボザイムの切断反応ス

トップにおける速度を表す)を調べることが望ましい。しかし、バイオイメージアナライザーが当研究室になかったため、それぞれの条件において酵素学的パラメーターを調べることは困難であった。また、切断活性に対するMgCl₂濃度、温度、pHおよび二価金属イオン種の影響について親リボザイムのものと比較し、大体の傾向を調べることを目的としたので、本研究では1時間後に切断された基質の割合を調べた。

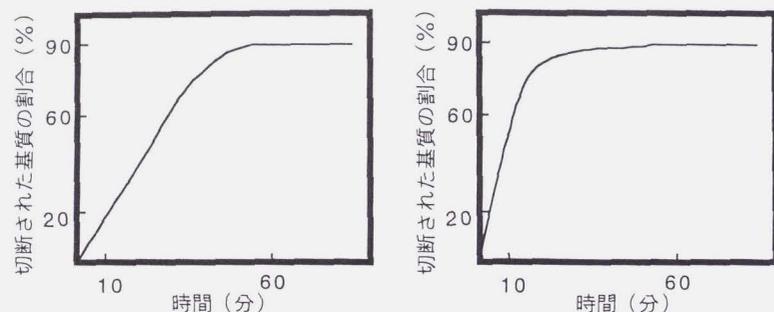


図4-2 切断された基質の割合の時間変化が異なる例

酵素学的パラメーターの測定

酵素過剰の条件では酵素反応は擬一次反応として扱うことができる。ここでは、酵素1 μM、基質1 μMの切断反応および酵素0.6 μM、基質0.1 μMの切断反応を擬一次反応と仮定し、 $P(t) = P_{max} - (P_{max} - P_0) \exp(-k_{obs}t)$ の式を用いて非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行い、擬一次反応速度定数 k_{obs} を求めた (McCall et al., 1992)。

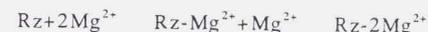
また、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM MgCl₂および100 mM MgCl₂の条件では、酵素学的パラメーター k_{cat} および K_m を調べた。マルチターンオーバーの速度定数(k_{cat})およびミカエリス定数(K_m)を求めるためには、酵素0.1 μMに対して基質過剰の条件で5種類の基質濃度(0.5~10 μM)で切断反応を行い、1分から20時間後までサンプリングし、切断産物の割合(%P)を定量した。次に、各基質濃度[S]において切断産物の割合(%P)を時間(t)に対してプロットし、t=0における接線より初速度(V_0)を求めた。これをEadie-Hofsteeプロットすることにより、 $V_0/[S]$ 対 V_0 はほぼ直線になるので、最小二乗法を用いて直線のフィッティングを行った。その傾きから K_m が求め、y切片から最大速度 V_{max} を求めた。さらに V_{max} より k_{cat} を求めた (Uhlenbeck, 1987)。

CDによる解析

核酸の構造変化にともなう円二色性は変わるので、CDスペクトルの変化を解析することによって核酸の構造変化を調べることができる。本研究では、切断されない基質を用い、Mg²⁺滴定の実験を行った。Mg²⁺滴定による構造変化をCD (実際には265 nmにおける楕円率の変化)でモニターすることによって調べ、活性の変化と比較した。さらに、Hill plotによる解析によりMg²⁺イオンの解離定数(K_d)および協同性(n)を親リボザイムのものと比較した。また、温度変化にともなうCD変化をモニターすることによって、温度変化にともなう構造変化を調べ、熱融解温度(T_m)を求めた。これを、温度変化にともなう活性の変化と比較した。

カーブフィッティングによる解析

本研究では、Mg²⁺滴定によるCD変化およびMgCl₂濃度の活性に対する影響をカーブフィッティングによって解析する方法を確立した。例えば、Mg²⁺が2つ結合していると仮定すると、平衡式は



であるから (Fersht, 1985; Celander & Cech, 1991)、それぞれの解離定数および分子種の割合は

$$K_{d1} = [Rz][Mg^{2+}] / [Rz-Mg^{2+}]$$

$$K_{d2} = [Rz-Mg^{2+}][Mg^{2+}] / [Rz-2Mg^{2+}]$$

$$F_1 = [Rz-Mg^{2+}] / ([Rz] + [Rz-Mg^{2+}] + [Rz-2Mg^{2+}])$$

$$F_2 = [Rz-2Mg^{2+}] / ([Rz] + [Rz-Mg^{2+}] + [Rz-2Mg^{2+}])$$

である。よって、

$$F_1 = 1 / (K_{d1} / [Mg^{2+}] + 1 + [Mg^{2+}] / K_{d2})$$

$$F_2 = 1 / (K_{d1} K_{d2} / [Mg^{2+}]^2 + K_{d2} / [Mg^{2+}] + 1)$$

という式が得られる。ここで $[Mg^{2+}] = K_{d1}$ の時を考えると、 $K_{d2} \gg K_{d1}$ の場合、 F_1 は0.5、 F_2 は0に近い値となり、協同性がほとんどないことを意味する。一方、 $K_{d2} \ll K_{d1}$ の場合、 F_1 は0、 F_2 は1に近い値となり、非常に協同性が大きいことを意味する。

さらにRz-2Mg²⁺に対するRz-Mg²⁺の寄与の比をrとすると、楕円率θのMg²⁺滴定による変化の割合 F_{CD} は

$$F_{CD} = a(rF_1 + F_2)$$

で表すことができる (aは楕円率が上限に達した点の見積りの誤差を補正する項)。この式を用いてCDによるMg²⁺滴定曲線を K_{d1} 、 K_{d2} 、aおよびrを変数としてカーブフィッティングを行った。また、同様に活性(k_{obs})のMgCl₂濃度による変化についてもカーブフィッティングを行うことができる。

4-2 結果および考察

切断反応の経時変化

最初に、1 μ M 基質、1 μ M 酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM $MgCl_2$ という条件で37°Cで反応し、切断された基質の割合の時間変化を調べたところ、図4-3の様になった。切断された基質の割合が経時的に増えていることがわかる。また、一晩後には約60%の基質が切断され、それ以上の切断は起こらなかった（このような点をend pointという）。切断反応は可逆的な反応であると考えられており、親リボザイムでは最終的に約95%の基質が切断される点で平衡に達することが知られている。小型リボザイムでは、この平衡が変わり、end pointが60%になったのかもしれない。

反応が平衡に達した状態で切断割合を比較しても、反応速度を比較することはできない（図4-2）。図4-3より、1時間後に切断された基質の割合は増えているので、その割合を比較することによって大体の反応速度を比較できる。そこで本研究では、1時間後の切断された基質の量を比較することによって、 $MgCl_2$ 濃度、温度、pHおよび二価金属イオン種の影響を調べたことにした。

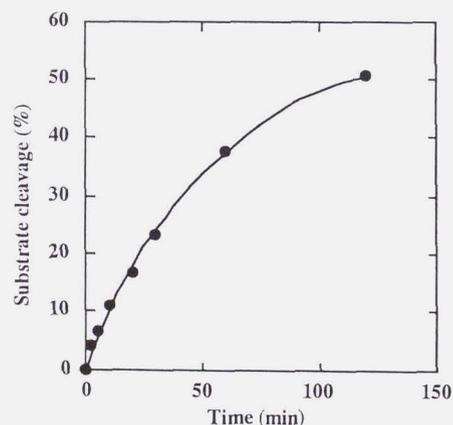


図4-3 小型リボザイムの切断反応の経時変化。図4-1のデータを定量した結果。1 μ M 基質、1 μ M 酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8) および10 mM $MgCl_2$ の組成で37°Cで反応。

切断活性に対する $MgCl_2$ 濃度の影響

切断活性に対する $MgCl_2$ 濃度の影響を調べるため、1時間後に切断された基質の

割合を $MgCl_2$ 濃度に対してプロットしたところ、切断された基質の割合は $MgCl_2$ 濃度の増加とともに増え、約60 mMでほぼplateauに達した（図4-4）。しかし、100 mM $MgCl_2$ (1 μ M 基質、1 μ M 酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、37°C) における切断された基質の割合の時間変化を調べたところ、30分後に切断反応は平衡に達した（図4-5）。よって高 $MgCl_2$ 濃度において、1時間後に観測したのでは反応速度を比較できないことがわかった。実際、Hendryら（1995）が擬一次反応速度定数 (k_{obs}) で比較した場合、ヘリックスII欠損変異体の k_{obs} は、 $MgCl_2$ 濃度が60 mMでもplateauにならず、さらに $MgCl_2$ 濃度を上げると k_{obs} が大きくなることを報告している。以上のことから、図4-4では $MgCl_2$ 濃度が60 mM以上で見かけ上切断活性がplateauに達していると考えられる。

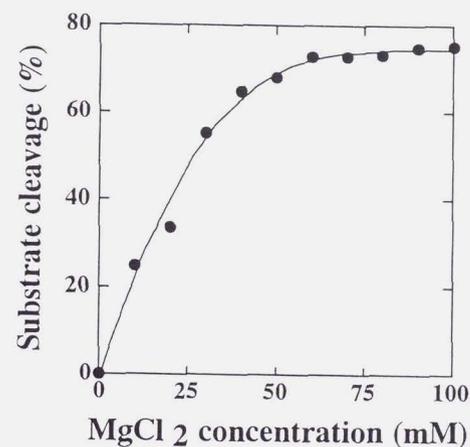


図4-4 小型リボザイムの切断活性に対する $MgCl_2$ 濃度の影響。1 μ M 酵素、1 μ M 基質、50 mM Tris-HCl (pH 8)、37°C、1時間。

親リボザイムでは、本研究と同様に切断活性に対する $MgCl_2$ 濃度の影響を観測するために30分後に切断された基質の割合を調べており、 $MgCl_2$ 濃度が約3 mMの時にplateauに達したと報告している（Odai et al., 1994）。小型リボザイムでは親リボザイムより長い1時間後に観測しているのに、図4-4のようにplateauに達する $MgCl_2$ 濃度が高い。このことより、小型リボザイムが高い活性を示すためには親リボザイムに比べて高濃度の Mg^{2+} イオンを必要とすることがわかる。これは Mg^{2+} 結合親和性が低くなったことに起因すると考えられる。

次に、切断反応の経時変化を親リボザイムのものと直接比較した。小型リボザイムでは、10 mM MgCl₂のとき、2分後および20分後にはそれぞれ基質の約4%および17%が切断されている(図4-3)。さらに、MgCl₂濃度を100 mMとした時には、2分後および20分後にはそれぞれ基質の約16%および56%が切断されている(図4-5)。一方、親リボザイムでは10 mM MgCl₂において2分後および20分後にはそれぞれ基質の約30%および89%が切断されたという報告がある(Odai et al., 1994)。これらの2分後および20分後の切断された基質の割合を比較すると、小型リボザイムの切断活性はMgCl₂濃度を高くすることによって、親リボザイムの切断活性に非常に近くなることがわかった。

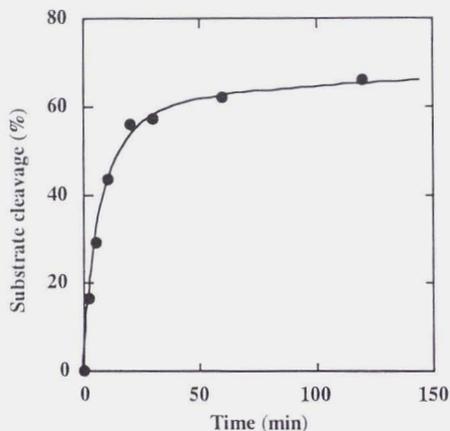


図4-5 MgCl₂濃度が100 mMの時の小型リボザイムの切断反応の経時変化。1 μM基質、1 μM酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8) および100 mM MgCl₂の組成で37°Cで反応。

シングルターンオーバーの切断実験

図4-3および図4-5の反応をシングルターンオーバーと仮定して、擬一次反応速度の式 ($P(t) = P_{max} - (P_{max} - P_0) \exp(-k_{obs}t)$) によりカーブフィッティングを行い、反応速度定数 k_{obs} を求めた。小型リボザイムの k_{obs} は10 mM MgCl₂の時には0.013 min⁻¹で、100 mM MgCl₂の時には0.089 min⁻¹であった。親リボザイムでは10 mM MgCl₂の時に0.13 min⁻¹である(Odai et al., 1994)。酵素を過剰にして切断実験したときにも同様な k_{obs} が得られた(基質0.1 μM、酵素0.6 μM)。このことから、小型リボザイムの切断活性 (k_{obs}) はMgCl₂濃度を10 mMから100 mMにする

ことによって、親リボザイムの活性とほぼ同等になることがわかった。

マルチターンオーバーの切断実験

さらに、マルチターンオーバーの切断実験を行った。Eadie-Hoffsteeプロット(図4-6)を用いてMgCl₂濃度が10 mMと100 mMの時のミカエリス定数 K_m および反応速度定数 k_{cat} を調べたところ、10 mM MgCl₂の時の K_m および k_{cat} はそれぞれ0.6 μMと0.04 min⁻¹であり、100 mM MgCl₂の時の K_m および k_{cat} はそれぞれ0.2 μMと0.2 min⁻¹であった。

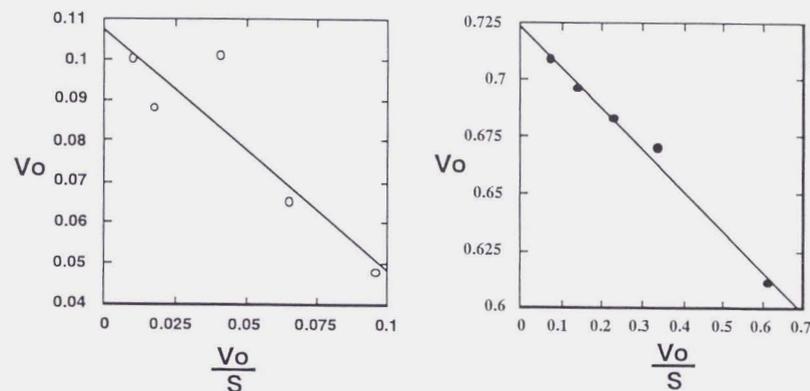


図4-6 小型リボザイムの切断反応のEadie-Hoffsteeプロット。左図が10 mM MgCl₂の時、右図が100 mM MgCl₂の時。0.1 μM酵素に対して、0.5、1、2.5、5、10 μMの基質。50 mM Tris-HCl (pH 8)、37°C。

親リボザイムの10 mM MgCl₂の時の K_m および k_{cat} はそれぞれ1 μMと0.4 min⁻¹であることが報告されている(Odai et al., 1994)。まず K_m について考察すると、10 mM MgCl₂における小型リボザイムの K_m は親リボザイムの約1/2であることから、小型リボザイムでは基質と酵素の相互作用が親リボザイムに比べて強いことがわかった。ヘリックスII欠損変異体は K_m が小さいという報告はTuschl & Eckstein (1993) も報告しており、ヘリックスIIをループに置換したことによって酵素部分が柔らかい構造になり、基質部分と相互作用しやすくなったことが原因として考えられている。さらに、本研究では K_m が小さくなった原因として以下の2つも原因として考えている。親リボザイムが三本鎖からなり、小型リボザイムが二本鎖からなること、および小型リボザイムでは親リボザイムより1残基

長い12-merを用いていることである。また100 mM MgCl₂では、K_mはさらに小さくなった。これは、基質と酵素の相互作用が強くなったことを示唆するが、Mg²⁺イオンが基質と酵素の複合体を安定化していると考えられる。

次にk_{cat}について考察すると、10 mM MgCl₂の時は親リボザイムの約1/10であり、100 mM MgCl₂にすると親リボザイムの約1/2まで活性が上昇した。MgCl₂濃度を高くすることにより活性が親リボザイムに近づくことから、小型リボザイムのMg²⁺イオン結合親和性が低いことが予想される。

切断活性に対するpHの影響

切断活性に対するpHの影響を調べたところ、切断活性はpHの上昇とともに上昇した(図4-7)。リボザイムの切断では、Mg²⁺イオンに配位した水酸基の1つが塩基として働いて、切断部位の2'水酸基のプロトンを引き抜くことにより反応が始まると考えられている。本研究で得られた結果はこの仮説を支持している。親リボザイムおよび他のハンマーヘッド型リボザイムについても同様の結果が報告されている(Odai et al., 1994; Dahm et al., 1993; Hendry et al., 1995)。

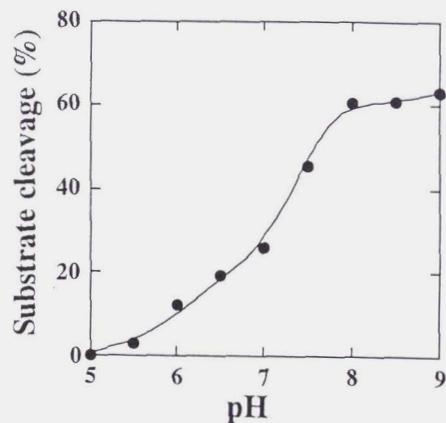


図4-7 小型リボザイムの切断活性に対するpHの影響。1 μM酵素、1 μM基質、50 mM MgCl₂、37°C、1時間。pH 5-6.5は50 mM MES、pH 7-9は50 mM Tris-HCl。

切断活性に対する金属イオン種の影響

切断活性に対する金属イオン種の影響を調べたところ、MgCl₂およびMnCl₂の存

在下では高い活性を示し、ほぼ同等の活性を示した。CaCl₂存在下では切断活性は約1/10に減少し、CoCl₂存在下では約1/2に減少した(表4-1)。親リボザイムや他のハンマーヘッド型リボザイムにおいても同様の結果が得られている(Odai et al., 1994; Uhlenbeck, 1987; Dahm et al., 1993; Sawata et al., 1993; Hendry et al., 1995)。小型化しても金属イオンに対する特異性は親リボザイムと変わらなかった。金属イオンに対する特異性は金属に配位した水分子のpK_aおよび金属の大きさによって決まると考えられている。小型化によりMg²⁺結合親和性が減少したが、金属イオンに対する特異性は変わらなかったため、金属結合部位の構造変化はあまり大きなものではないのかもしれない。あるいは、金属イオンに対する特異性に金属イオンの大きさはあまり影響しないのかもしれない。

表4-1 切断活性に対する金属イオン種の影響

金属イオン種	小型リボザイムの切断活性	親リボザイムの切断活性
Mg ²⁺	100	100
Mn ²⁺	91	100
Ca ²⁺	6	26
Co ²⁺	43	50

それぞれのリボザイムについてMg²⁺存在下で切断された基質の割合を100とした。小型リボザイムの反応条件は1 μM酵素、1 μM基質、50 mM Tris-HCl (pH 7)、50 mMの金属イオン、37°C、1時間。親リボザイムについては、10 mM金属イオン以外は同じ条件。

切断活性に対する温度の影響

切断活性に対する温度の影響を調べたところ、35-40°Cで最も切断活性が高いことがわかった(図4-8)。そこで、MgCl₂の非存在下および50 mM存在下で、265 nmにおける楕円率をモニターすることにより、CD熱融解曲線を調べた(図4-9)。MgCl₂が存在しない時のT_mは約22°Cであったが、50 mM MgCl₂存在下では、約24°Cと約46°CにT_mが観測された。約46°CのT_mはヘリックスIおよびIII由来のもので、Mg²⁺イオンにより安定化しそのT_mが約24°Cから約46°Cに上昇したと考えることができる。よって、切断反応の最適温度が35-40°Cであることを考えると、小型リボザイムは部分的に融解した状態で最も切断活性が高いと考えられる。このような傾向は親リボザイムおよび他のハンマーヘッド型リボザイムで

も報告されている (Odai et al., 1994; Yang et al., 1990; Koizumi et al., 1989; Hendry et al., 1995)。また、 Mg^{2+} イオンの存在により新たに現れた T_m (約 $24^{\circ}C$) は内部ループ部分由来のものであると考えることができる。X線結晶構造解析の結果、内部ループ部分には非ワトソクリック型のG:A塩基対が存在することが明らかとなっている (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。この部分の T_m が $24^{\circ}C$ の T_m として現れたのかもしれない。

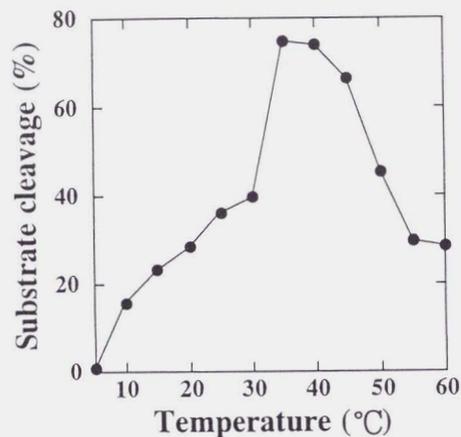


図4-8 小型リボザイムの切断活性に対する温度の影響。1 μM 基質、1 μM 酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、50 mM $MgCl_2$ 、1時間。

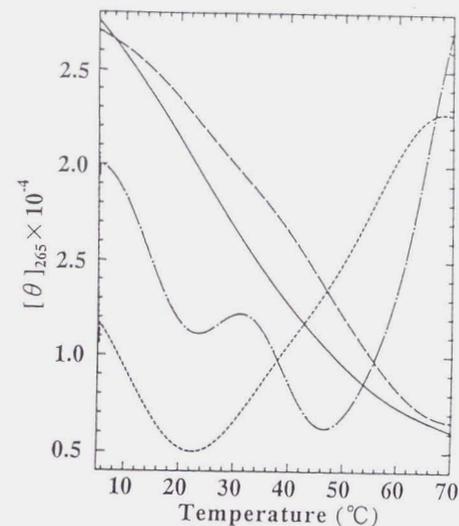


図4-9 小型リボザイムのCD熱融解曲線。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl、試料濃度8.8 μM 。—— は $MgCl_2$ が存在しない時、---- はその微分曲線、- - - は50 mM $MgCl_2$ が存在する時、..... はその微分曲線を示す。

Mg^{2+} 滴定によるCDの変化

小型リボザイムの Mg^{2+} イオン結合親和性を調べるために、切断されない基質を用いて様々な $MgCl_2$ 濃度でCDスペクトルを測定したところ、 $MgCl_2$ 濃度の上昇にともなって λ_{max} は短波長側にわずかにシフトし、265 nmにおける楕円率は増加した (図4-10)。 $MgCl_2$ 濃度の上昇にともなうCDスペクトルの変化は、 Mg^{2+} イオンの結合によるリボザイムの構造変化に起因すると考えられる (Willick & Kay, 1971; Koizumi & Ohtsuka, 1991)。図4-11に265 nmにおける楕円率の変化率 (F) をモニターした小型リボザイムの Mg^{2+} 滴定曲線を示す。滴定曲線は約150 mM $MgCl_2$ の時にほぼplateauに達しており、リボザイムの半分に Mg^{2+} イオンが結合する $MgCl_2$ 濃度 ($[Mg^{2+}]_{1/2}$) は約19 mMである。親リボザイムの $[Mg^{2+}]_{1/2}$ は1 mMであるので、約20倍 Mg^{2+} 結合親和性が低くなったと考えられる (Odai et al., 1994)。ステムIIは Mg^{2+} イオンの結合部位の安定化に寄与していると考えられる。

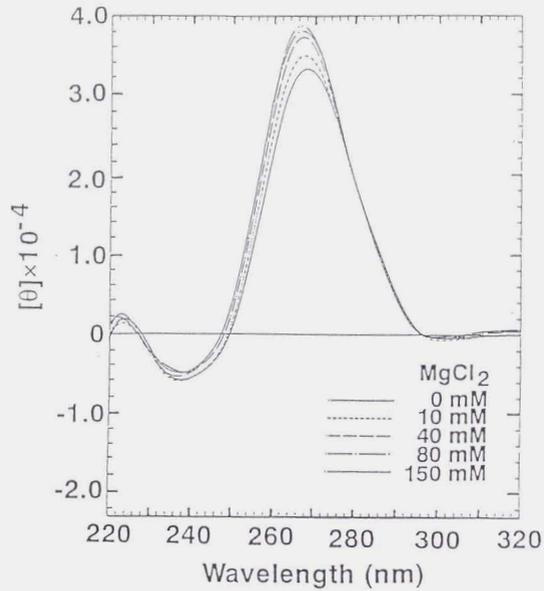


図4-10 Mg^{2+} 滴定による小型リボザイムのCDスペクトル変化。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、100 mM NaCl、5°C、試料濃度8.8 μ M。

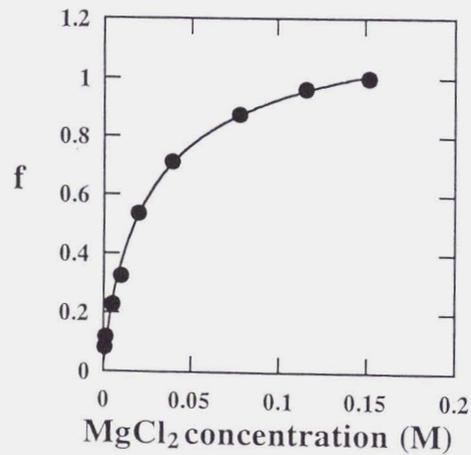


図4-11 小型リボザイムのCD変化をモニターした Mg^{2+} 滴定曲線

図4-11のCDのデータと図4-4の活性のデータを比較すると、活性の $[Mg^{2+}]_{1/2}$ はCDのデータとほぼ同じ18 mMである(親リボザイムの活性の $[Mg^{2+}]_{1/2}$ は1 mMである)。図4-4で示した切断された基質の割合は、 $MgCl_2$ 濃度が低い領域を除いて切断速度をあまり反映していないので、CDのデータと活性のデータの $[Mg^{2+}]_{1/2}$ が一致したのは偶然である。しかし、リボザイムの小型化によりCDと活性の $[Mg^{2+}]_{1/2}$ が親リボザイムに比べて同様に大きくなったことから、小型リボザイムの活性の減少が Mg^{2+} 結合親和性の減少によるものであると考えることができる。さらに、CDの変化に寄与する Mg^{2+} と活性の変化に寄与する Mg^{2+} が同一のものであることを示唆している。

楕円率の変化が Mg^{2+} の結合によるリボザイムの構造変化に起因し、その構造変化が単純な二系のモデルであると仮定すると、図4-11のデータのHill plotを行うことにより、ヒル係数 $n=1.16$ ($[Mg^{2+}]_{1/2}=16$ mM)と求めることができた(図4-12)。親リボザイムのヒル係数 n は1.46 ($[Mg^{2+}]_{1/2}=1$ mM)である。これらのヒル係数が1より大きいことから、 Mg^{2+} イオンは2つ以上結合し、それらは協同的(正)に結合することが示唆される。さらに、小型リボザイムでは親リボザイムに比べて協同性が小さいことがわかる。

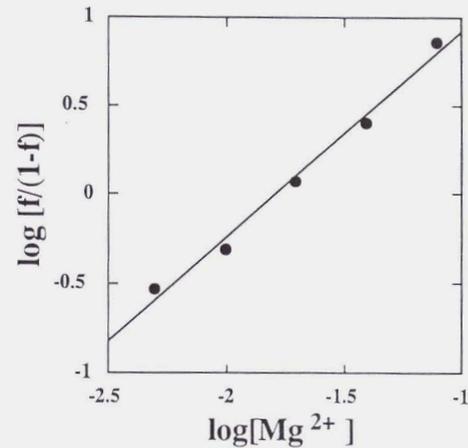
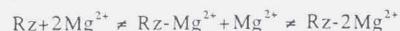


図4-12 小型リボザイムの Mg^{2+} 滴定データのHill plot

カーブフィッティングによる解析

Mg²⁺が2つ結合していると仮定すると、平衡式は



であり、Mg²⁺滴定による楕円率の変化率F_{CD}および切断の反応速度定数はそれぞれ

$$F_{CD} = a(rF_1 + F_2)$$

$$F_1 = 1 / (K_{d1} / [Mg^{2+}] + 1 + [Mg^{2+}] / K_{d2})$$

$$F_2 = 1 / (K_{d1} K_{d2} / [Mg^{2+}]^2 + K_{d2} / [Mg^{2+}] + 1)$$

で表せる。また、Rz·Mg²⁺あるいはRz·2Mg²⁺が切断活性を示すと考えると切断の反応速度定数も

$$k_{obs} = a'(r'F_1 + F_2)$$

で表せる。リボザイムに対してMg²⁺は過剰に加えるので[Mg]=[Mg]_{total}とし、変数をa、r、K_{d1}、K_{d2}として非線形最小二乗法によりカーブフィッティングを行ったところ、r=0.1、K_{d1}=0.39 mM、K_{d2}=33 mM、a=1.20のときにベストフィットカーブが得られることがわかった。実際には、変数aまたはrをどのような値に固定してもフィッティングカーブはよくフィットし、様々なK_{d1}、K_{d2}のセットが得られることがわかった。例えば、rを0から1まで0.1刻みで増加させてカーブフィッティングを行った場合、表4-2のようなパラメーターのセットが得られた。このように様々なr値でもフィッティングカーブが得られるのは、データが実験誤差を含んでいる上、データポイント数が少ないのに変数が多いことが原因であると考えた。

そこで、リボザイムの切断にはMg²⁺が2つ必要であり(Mg²⁺はそれぞれ酸または塩基として働くと考えられている)、Rz·Mg²⁺は活性がほとんどないと仮定して(r'=0)、

$$k_{obs}(100 \text{ mM MgCl}_2) / k_{obs}(10 \text{ mM MgCl}_2) = F_2(100 \text{ mM MgCl}_2) / F_2(10 \text{ mM MgCl}_2)$$

という式を導入した。k_{obs}の比は6.8であるので(図4-3および4-5より算出)、rを0から1まで増やして、F₂の比が6.8に近くなるフィッティングカーブ(F₂の比は6.9)を選んだところ、r=0.4の時にK_{d1}=7.3 mM、K_{d2}=59 mM、a=1.23というパラメーターのセットが得られた(表4-2; 図4-11)。

表4-2 小型リボザイムのMg²⁺滴定実験データに対するカーブフィッティングによる解析結果。rを0から1まで0.1刻みで増加させたときのK_{d1}、K_{d2}、aおよびF₂(100 mM MgCl₂)/F₂(10 mM MgCl₂)の値、標準偏差σおよび相関係数R。

r	K _{d1} (mM)	K _{d2} (mM)	a	F ₂ の比	σ	R
0	-0.37	23	1.15	2.6	0.018	0.999
0.1	0.39	33	1.20	3.3	0.015	0.999
0.2	2.1	42	1.22	4.3	0.024	0.998
0.3	4.7	49	1.22	5.4	0.027	0.997
0.4	7.3	59	1.23	6.9	0.029	0.996
0.5	10	76	1.24	8.8	0.030	0.996
0.6	13	110	1.25	12	0.030	0.996
0.7	16	180	1.27	15	0.031	0.996
0.8	19	290	1.24	19	0.031	0.996
0.9	21	530	1.19	22	0.032	0.996
1	22	5800	1.14	26	0.032	0.995

さらに、親リボザイム(Odai et al., 1994)についてもMg²⁺が2つ結合すると仮定して、Mg²⁺滴定のCDデータをカーブフィッティングしたところ、K_{d1}=1.9 mM、K_{d2}=1.0 mM、r=1.0、a=1.0というパラメーターで最もフィットするカーブが得られたが(標準偏差0.0094、相関係数0.999)、それらのパラメーターあるいはその他のよくフィットするパラメーターを用いても活性のデータ(k_{obs}(10 mM MgCl₂)/k_{obs}(1 mM MgCl₂)=8.7)を満足しなかった。親リボザイムでは、Mg²⁺が2つ結合しているという仮定で、活性およびCDのデータを説明できるパラメーターのセットは得られなかったため、親リボザイムでは3つ以上のMg²⁺が切断活性に寄与していると考えられる。親リボザイムについては活性のデータを説明できるパラメーターのセットは得られなかったが、小型リボザイムより解離定数が小さいことが予想される。小型リボザイムのMg²⁺結合親和性が低くなったのは、主にK_{d2}が大きくなったことによると考えられる。

以上の結果からヘリックスIIはMg²⁺結合部位の安定化に重要であることが示唆される。このことは、ハンマーヘッド型リボザイムのX線結晶構造解析の結果か

らも支持される (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。Scottらが明らかにした結晶構造ではMg²⁺結合部位は5個であり、その1つはヘリックスIIおよびそれに隣接する残基であるG10.1のN7原子およびA9のPro-R_pにある。この部位のMg²⁺は切断反応には直接関わらず、リボザイムの活性構造の安定化に寄与していると考えられている。ヘリックスIIのG10.1がMg²⁺結合部位のひとつであるために、小型リボザイムでは活性部位のMg²⁺結合親和性が弱くなったと考えることができる。

1つのMg²⁺に水分子が配位して、それが塩基として働いて切断部位の2'水酸基をのプロトンを引き抜き、もう1つのMg²⁺が、切断によって生じた5'水酸基に直接あるいは間接的に配位して安定化するという2つのMg²⁺が切断反応に関与しているモデルが分子軌道計算から考えられている (Taira et al., 1990)。また、切断反応の酵素学的解析により、2つMg²⁺が切断反応に直接関与していると考えられており (Dahm & Uhlenbeck, 1991; Sawata et al., 1995)、本研究においても同様のことが示唆された。また、Hendryらはリボザイムの切断活性のMgCl₂濃度依存性を調べて、活性の上昇が2段階で起こることを報告している (Hendry et al., 1995; Hendry & McCall, 1995)。これは、3つ以上のMg²⁺がリボザイムに結合することにより、活性を大きく上昇させることを示唆している。

小型リボザイムはMg²⁺結合親和性が弱い、高いMgCl₂濃度において十分な活性を持つことから、小型リボザイムの活性中心の構造は親リボザイムのもので変わらないことが予想される。よって、この小型リボザイムを用いてNMRによる構造解析を行うことを計画した。

第五章 小型ハンマーヘッド型リボザイムの構造解析

5-1 方法

リボザイムの立体構造を明らかにする方法として、X線結晶構造解析およびNMRによる構造解析がある。NMRは溶液中のダイナミックな構造の解析に有利であり、従来はハンマーヘッド型リボザイムの構造を調べるためにNMRを用いた研究が行われていた (Uesugi et al., 1992; Heus et al., 1990; Heus & Pardi, 1991B; Odai et al., 1990A, B; Pease & Wemmer., 1990; Sarma et al., 1995; Orita et al., 1996)。しかし、それらの研究ではNMRシグナルの重なりが激しいために解析が困難であり、立体構造を明らかにするまでには至らなかった。ところが、近年のRNAの安定同位体標識技術の開発により (Nikonowicz & Pardi, 1990; Nikonowicz et al., 1992; Batey et al., 1992; Simorre et al., 1996; Kubinec et al., 1996)、リボザイムのNMRによる構造解析が進むことが期待されている。そこで我々は、ハンマーヘッド型リボザイムの安定同位体標識を行い、NMRによる構造解析を試みた。安定同位体標識には、T7 RNAポリメラーゼによる転写系を用い、イミノプロトンの帰属のためにG残基のみを準選択的に¹⁵N核により標識した。

本研究ではRz24の調製が困難であったため、ハンマーヘッド型リボザイムヘリックスII欠損変異体の酵素部分(Rz24)の構造を調べ、ハンマーヘッド型リボザイムの構造解析に役立つデータを得ることを目的とした。そこで、¹⁵N核によりG残基を標識したRz24を作成した。窒素原子は核酸の塩基部分にあり、¹⁵N標識することによりイミノプロトンおよびアミノプロトン (アミノプロトンは一般に水との交換が非常に速いため、普通は観測されない) の帰属に役立つ。本研究においても、イミノプロトンの帰属を行い、Rz24における非ワトソクリック型G:A塩基対の構造について調べた後、従来報告されている二重鎖中のG:A塩基対の構造および他のハンマーヘッド型リボザイム中のG:A塩基対の構造と比較した。

リボザイムの調製

構造解析のための試料として、リボザイム酵素部分 (Rz24) については第2章で述べたようにT7 RNAポリメラーゼを用いて転写した。また、¹⁵N核によりG残基を標識したリボザイムを作成するためには、転写反応の際に原料としてGTPの代わりに[¹⁵N]-GTPを反応に用いた。PAGEによる精製は第2章で述べたとおりであるが、¹⁵N標識したRNAは貴重であるので抽出効率のよいエレクトロエリクション法を用いてゲルから抽出した。また、構造解析のための試料は大量に必要であるので、一度に大量のゲルから抽出可能なエレクトロエリクション法は有効である。抽出後、セントリコン (分画分子量3000、amicon) を用いて脱塩し、これ

を緩衝液に溶解した後、NMR測定を行った。

Rz24およびRz28の構造解析

Rz24を調製する際に、Rz28が主生成物として得られた(第2章参照)。そこでRz28が、Rz24のoverhangしている5'端部分を鋳型として転写が余分に進んだものであり、ヘアピン構造を持つこと(Cazenave et al., 1994)を確認するため、試料濃度1 μMおよび10 μMでCD熱融解曲線を調べた。さらに、二本鎖に特異的なRNase V₁および一本鎖に特異的なmung been nucleaseを用いて二次構造解析を行った(Knapp, 1989)。また、Rz28の切断活性を調べるために、1 μM基質、1 μM酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM MgCl₂という組成および100 mM MgCl₂の他は同様の組成で37°Cで反応し、切断された基質の割合の時間変化を調べた。NMR測定については、リボザイムを10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、100 mM NaClの溶液(5%重水)に溶かし、濃度を0.2-1 mMとした。標識したりボザイムについては、同液に濃度が0.04-0.2 mMになるように溶解した。NMRはBruker社のAM-400およびAMX-500を用いて、5-60°Cの間で、jump and return パルス(Oting et al., 1987)を用いて測定した。HMQC(Shaka et al., 1985)、1D-NOE(Johnston & Redfield, 1981)およびNOESY(Marion et al., 1989)の手法を用いることにより、Rz28(図5-1)のイミノプロトンの帰属を行った。さらに、基質との相互作用についても調べた。そして、Rz28のシグナルの帰属を利用してRz24のシグナルの帰属を行った。

Rz24'の構造解析

本研究では、Rz24およびRz28についてNMRを測定したが、T7 RNAポリメラーゼの系で調製したところ、Rz24の収量が少なかったため、新しくRz24'をデザインして収量を上げることも試みた。そこで、Rz24の1残基を置換することにより、ヘアピン構造を形成しにくいRz24'(図2-2e)をデザインした。Rz24'についてもT7 RNAポリメラーゼの系で調製した。さらに、1残基長い転写物も得られるので、これを過ヨウ素酸酸化することによって3'末端の1残基を削除した後、Rz24'と合わせてNMRを測定した。

G:A塩基対を含む14-merの構造解析

また、Rz24のG:A塩基対の帰属に役立つ情報を得るために、G:A塩基対を含む14-mer(図2-2f)を調製し、NMRを測定した。この14-merにはG残基が3つあり、2つがG:A塩基対を形成していることが予想されたので、G:A塩基対の帰属が容易であると考えた。14-merの調製にはT7 RNAポリメラーゼの系を用い、PAGEにより精製した。

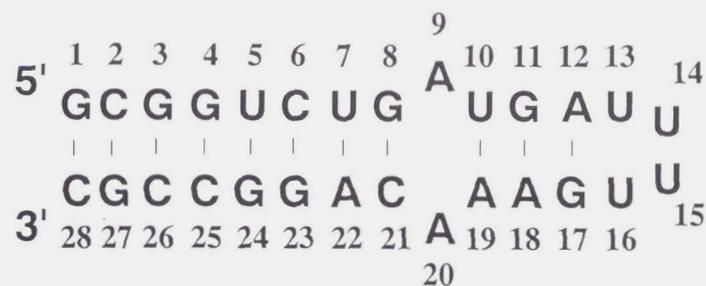


図5-1 Rz28の配列および残基番号

5-2 結果および考察

5-2-1 Rz24およびRz28について

転写反応の後、エレクトロエーレーション法によりゲルから抽出したところ、収率が約15%上昇し、200 μlスケールの転写で24-merは約1 nmol(ターンオーバー数3回、GTPの取り込み効率1%)、28-merは約6 nmol(ターンオーバー数18回、GTPの取り込み効率6%)得られた。

CDおよびRNaseによる構造解析

最初に、Rz28の構造を調べた。CD熱融解曲線を測定し、試料濃度が1 μMの時と10 μMの時でT_mを比較したところ、どちらの条件でもT_mは約40°Cと約70°Cに観測された。T_mに濃度依存性がないことからRz28は分子内で安定な構造を形成していることがわかった(図5-2)。さらに、二本鎖に特異的なRNase V₁および一本鎖に特異的なmung been nucleaseを用いてRz28を切断したところ、図5-3aのような切断パターンが得られた。この切断パターンから、Rz28がヘアピン構造を形成しており、図5-3bのようにステム部分でRNase V₁による切断が起こり、図5-3c(アニーリングして20°Cで12時間放置後mung been nucleaseにより処理)のようにループ部分でmung been nucleaseによる切断が起きていることを確認できた。

また、アニーリング直後にmung been nucleaseにより処理した場合(図5-3aのレーン5)、図5-3cの様に切断が起らなかったが、これはアニーリング後に徐々に構造変化が起きたと考えることができる。アニーリング直後にmung been nucleaseにより処理した場合には、9番目のA残基の部位で強い切断が観測され、このA残基がflip outしていることが示唆される。この結果は、NOEの実験でG8とU10の間にNOEが観測されたことと一致する(図5-6および図5-7)。また、第3章ではRz24と基質の複合体のT_mを調べ、22°Cであることがわかった。さら

に、50 mM MgCl₂の時にも複合体のT_mは24°Cと46°Cであり、Rz28はRz24と基質の複合体に比べて非常に安定な構造を持つことがわかった。さらに、Rz28におけるG:A塩基対の部分のT_mが約40°Cであると考えられる。塩基対の形成によりイミノプロトンシグナルは観測されやすくなるので、40°Cより十分低い5°Cでシグナルの帰属を行えば、G:A塩基対のシグナルが観測される可能性が高い。

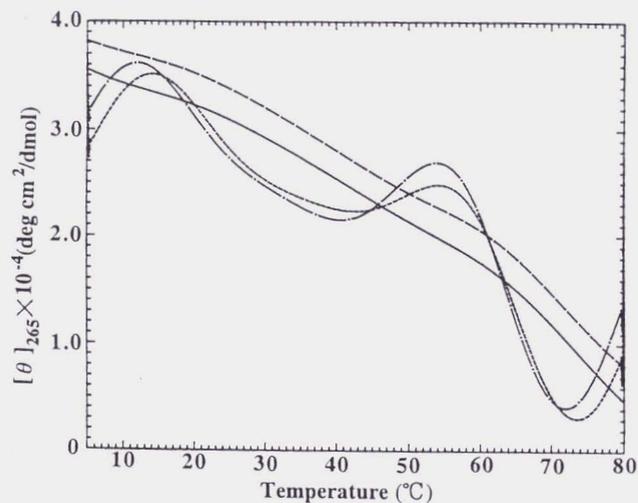


図5-2 Rz28のCD熱融解曲線。1 μMの時が実線、10 μMの時が破線。10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl。

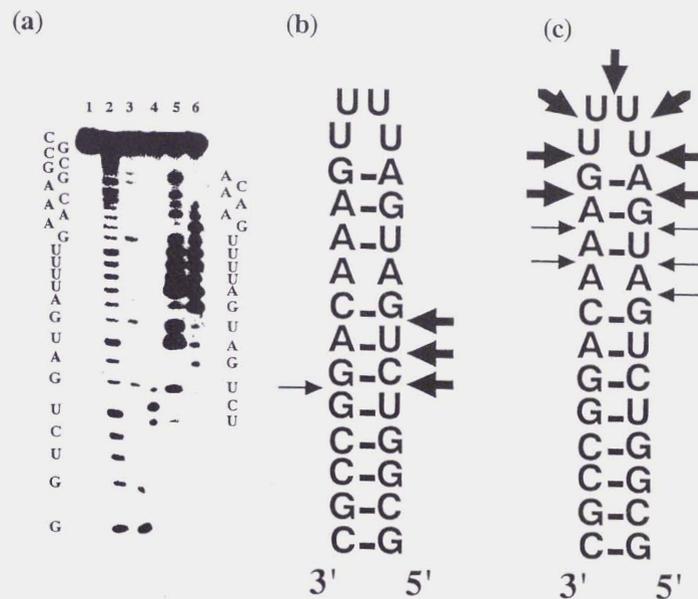


図5-3 Rz28のRNase限定加水分解による二次構造解析。(a) 切断パターン。レーン1：未処理、レーン2：アルカリ加水分解、レーン3：変性条件下におけるRNase T₁消化、レーン4：RNase V₁消化、レーン5：mung bean nuclease 消化（アニーリング直後）、レーン6：mung bean nuclease 消化（アニーリングして20°Cで12時間放置後）。(b) RNase V₁による切断箇所、(c) mung bean nucleaseによる切断箇所（レーン6より）。切断効率の高い場所は太い矢印で、切断効率の低い場所は細い矢印で示した。

Rz28の切断活性

Rz28の切断活性を調べるため、1 μ M基質、1 μ M酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM MgCl₂の組成で37°Cで反応したところ、20分後に約10%の基質が切断された(定量していないので、バンドの濃さから判断した)(図5-4)。さらに、100 mM MgCl₂の場合についても同様に解析すると、20分後に約40%の基質が切断された。Rz24では、10 mM MgCl₂の条件で20分後に基質の約17%が切断され、MgCl₂濃度を100 mMとした時には、20分後に基質の約56%が切断された。よって、Rz28は、Rz24のものより低い、切断活性を持つことがわかった。また、その切断活性はRz24と同様に、100 mM MgCl₂にすると急激に大きくなることがわかった。Rz28自体のT_mが約70°Cであるにもかかわらず、37°Cで切断活性を持つことから、反応液中のRz28の一部は基質と複合体を形成していると考えられる。また、Rz28が切断活性を持ち、そのMgCl₂濃度依存性がRz24のものと似ていることから、そのRz28が基質を切断している構造(活性型の構造)はRz24と同様であると思われる。

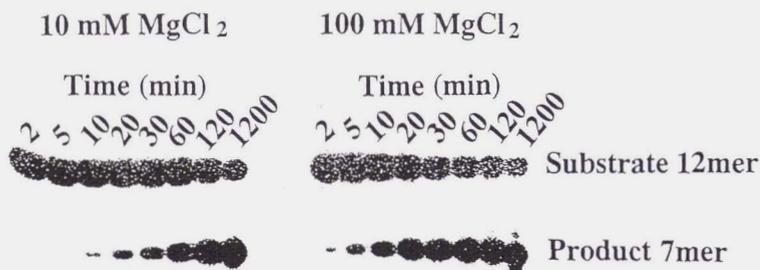


図5-4 Rz28の切断活性。1 μ M基質、1 μ M酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、37°C。

Rz28のイミノプロトンシグナルの帰属

Rz28がヘアピン構造を形成していると考えて、NMRシグナルの帰属を行った。図5-5にG残基のみを選択的に¹⁵N標識したRz28の1Dのイミノプロトンスペクトル、¹⁵N核をデカップルしたスペクトル(標識していない試料の1Dのイミノプロトンスペクトルと同じである。それぞれのシグナルにaからlまで印をつけた。また、シグナル強度の小さいものについては、マイナーな構造由来のものと考えられるので、印を付けなかった。)および¹⁵N核のフィルターをかけたスペクトル

(1D-HMQCスペクトル)を示す。1D-HMQCスペクトルを測定することによってG残基由来のシグナルを選択的に観測することができ、¹⁵N核をデカップルしたスペクトルと1D-HMQCスペクトルを比較することによってU残基由来のシグナルが明らかになる。本研究では、a、iおよびlのシグナルがU残基由来で、bのシグナルにはG残基由来のシグナルとU残基由来のシグナルが重なっていることが明らかとなった。つぎに、Rz28について、イミノプロトンの帰属を行うために1D-NOE(図5-6)および2D-NOESY(図5-7)の実験を行った。aおよびbのシグナルからH2領域への強いNOEが観測され、これらはA:U塩基対由来であることがわかった(図5-8a)。また、iとkの間に強いNOEが観測され、これらはG:U塩基対由来のシグナルであることがわかった(図5-8b)。このG:U塩基対由来のシグナルから連鎖的に帰属を行った(図5-9、表5-1)。g(G8由来)とa(U10由来)のシグナルの間にはNOEが観測され、A9残基はflip outしていることが示唆された。さらに、a(U10由来)とc(G11由来)のシグナルの間に、さらにc(G11由来)とh(G17由来)のシグナルの間にNOEが観測され、cおよびhのシグナルがG:A塩基対由来であると考えられた。

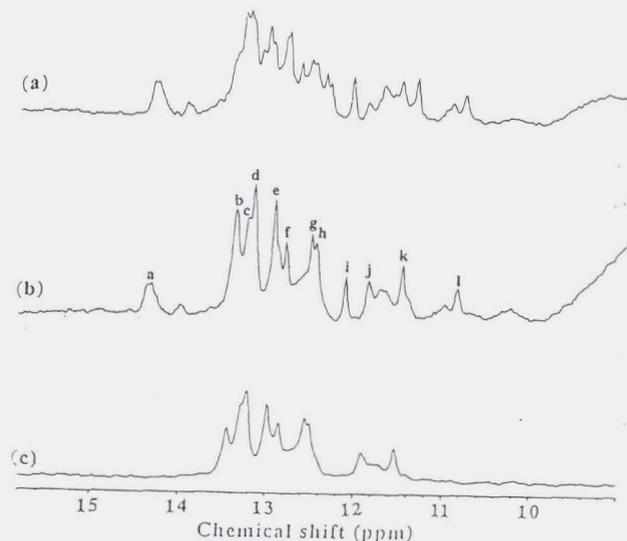


図5-5 Rz28(G残基を¹⁵Nにより標識したもの)の1D-NMRスペクトル。イミノプロトン領域、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、100 mM NaCl(5%重水)、試料濃度0.2 mM、10°C (a)プロトンのスペクトル (b)¹⁵Nをデカップルしたスペクトル (c)1D-HMQCスペクトル

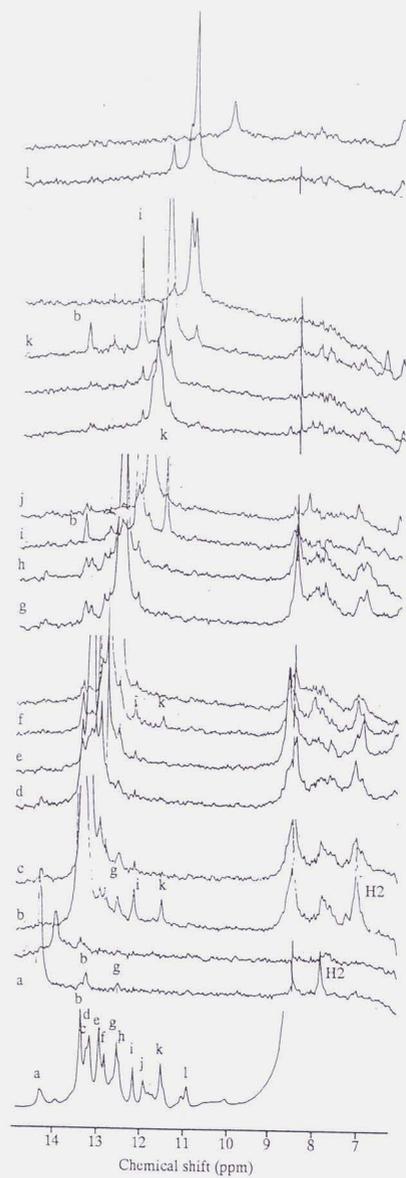


図5-6 Rz28の1D-NOE差スペクトル。イミノプロトン領域、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl (5%重水)、試料濃度1 mM、10°C。

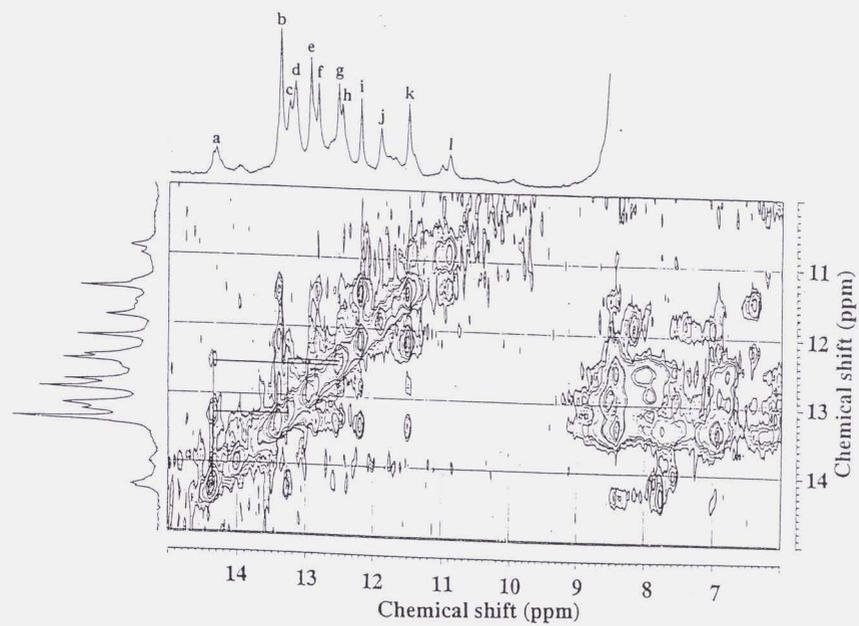


図5-7 Rz28の2D-NOESYスペクトル。10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl (5%重水)、試料濃度1 mM、10°C。

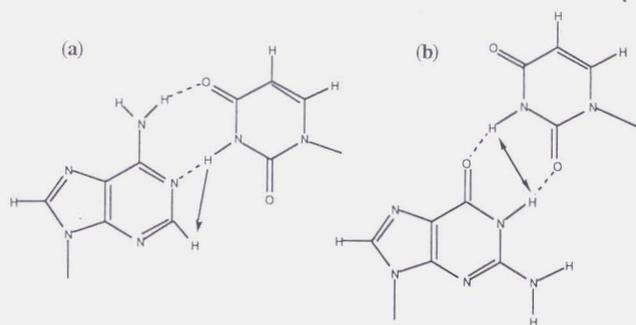


図5-8 A:U塩基対 (a) およびG:U塩基対 (b)。観測されるNOEを矢印で示す。

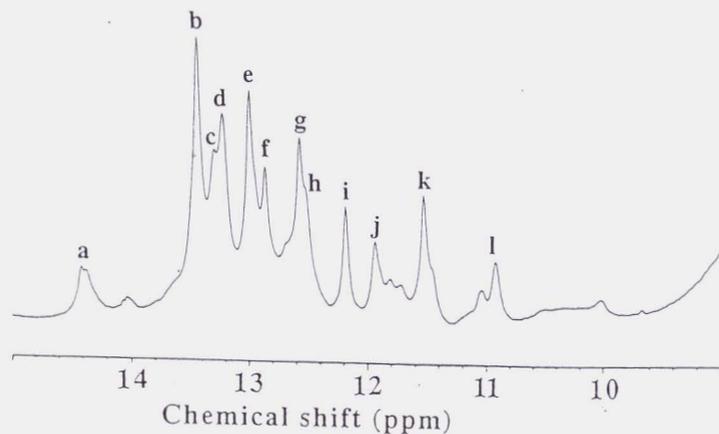
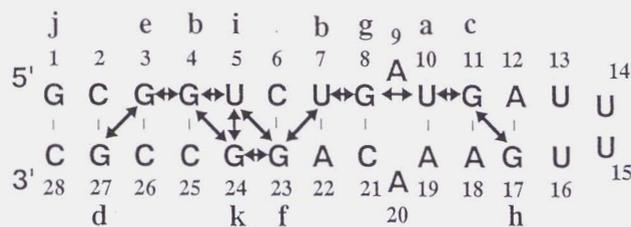


図5-9 Rz28のイミノプロトンの帰属。矢印はNOEが観測されたことを示す。

表5-1 Rz28のイミノプロトンの帰属

シグナル	ケミカルシフト (ppm)	帰属	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
a	14.20	U10			○				○					
b	13.44	G4, U7					○	○	○		○		○	
c	13.29	G11	○							○				
d	13.22	G27					○							
e	12.99	G3		○		○								
f	12.86	G23		○							○		○	
g	12.56	G8	○	○										
h	12.50	G17			○									
i	12.18	U5		○				○					○	
j	11.91	G1												
k	11.49	G24		○				○			○			
l	10.89	-												

NOEが観測されたところを○で示した。

G:A塩基対について

G:A塩基対を含む二重鎖とヘアピン構造の研究はDNAおよびRNAについて行われている。それらのG:A塩基対の水素結合様式は様々であり、head to head型のもの (図5-10a; Kan et al., 1983; Prive et al., 1987; Carbonnaux et al., 1991; Brown et al., 1989; Gao & Ptel, 1988; Katahira et al., 1994A) とsheared型のもの (図5-10b; Li et al., 1991A,B; Chou et al., 1992; Cheng et al., 1992; Maltseva et al., 1993; Katahira et al., 1993; Katahira et al., 1994B,C; Maskos et al., 1993; Hirao et al., 1994; Greene et al., 1994; Orita et al., 1993; Heus & Pardi, 1991A; SantaLucia et al., 1992; SantaLucia & Turner, 1993; Wimberly et al., 1993) が構造解析により報告されている。head to head型のG:A塩基対のイミノプロトンは12-14 ppmの間に観測されており、sheared型ではイミノプロトンが水素結合に関与していないため10 ppm付近に観測されている。また、図5-10c (G(anti):A(syn))の型のG:A塩基対の報告は見つけられなかった。図5-10d (G(anti):A(syn))の型のG:A塩基対については、X線結晶構造解析による

報告 (Brown et al., 1986; Webster et al., 1990) があるが、NMRによる構造解析の報告は見つからなかった。図5-10e (G(syn):A(anti)) の型のG:A塩基対はpHが低い(5以下)ときにhead to head型から構造変化すること(10 ppm付近に観測)が報告されている (Gao & Ptel, 1988; Carbonnaux et al., 1991)。cおよびhのシグナルは12-14 ppmの間にあるので、Rz28に存在するG:A塩基対のイミノプロトンは水素結合していると考えられる。よって、sheared型(b)、(c)および(e)ではなく、head to head型(a)または(d)であると考えられる。また、塩基のH8とリボースのH1'の間のNOEはCH5とCH6の間のNOEより弱いようであることから、anti型の構造を形成していると推測している。よって、恐らくG:A塩基対の構造はhead to head型であると考えられる。

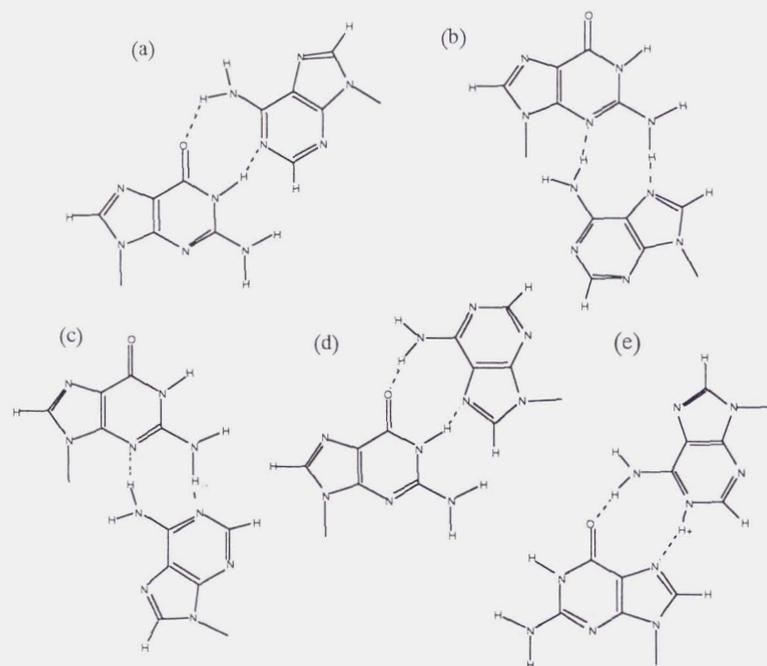


図5-10 G:A塩基対の結合様式。(a) head to head型 (b) sheared型 (c) (d) (e)その他の型

Rz28のイミノプロトンスペクトルの温度変化

温度変化によるRz28の構造変化を調べるため、イミノプロトンスペクトルの温度変化を調べた(図5-11)。塩基対が壊れると、一般にイミノプロトンシグナルが消失するので、RNAが変性していく様子を温度変化の実験により調べることができる。また、Rz28のCD熱融解曲線を調べ、T_mが約40°Cと約70°Cに観測されたが、これはイミノプロトンスペクトルの温度変化に対応すると考えられる。この実験ではAMX-500より感度の低いAM-400を用いたので、1のシグナルはほとんど観測されなかった。60°Cで全てのイミノプロトンシグナルが消えたが、まず、30°Cでjのシグナルが消え、末端にあるG1の塩基対が壊れた(前述のNOEの実験で、jのシグナルと他のシグナルの間でNOEが観測されなかったが、これはG1は末端に位置するため、G1のイミノプロトンと水との交換が速いことが原因と考えられる)。また、G:A塩基対を含む8~12および17~21の部分が約40°CのT_mに相当すると考えたが、イミノプロトンスペクトルの温度変化においても、40°Cでa(U10由来)のシグナルが消え、これらの結果は一致した。また、他のシグナルと重なっているため、スペクトルから判断できなかったが、G:A塩基対由来のシグナルcおよびhも消失したと考えられる。さらに、e(G3由来)またはf(G23由来)のシグナルとG:U塩基対由来の特徴的なシグナルiおよびkは50°Cで消え、この温度で残っているシグナルはb(G4またはU7由来)、d(G27由来)およびg(G8由来)であると考えられる。ここで、b(G4またはU7由来)およびd(G27由来)のシグナルが50°Cで観測されるにもかかわらず、G4:C25とG27:C2の間にある塩基対G3:C26由来のシグナルが消失していることは異常であり、現在のところ説明できない。温度変化に伴う構造変化が原因で、10°Cと50°Cではシグナルのケミカルシフトが大きく異なるのかもしれない。高い温度でもNOEを観測する実験を行ったが、NOEは観測されなかったので、50°Cでのシグナルの帰属は明らかではない。

Rz28と基質との相互作用

酵素Rz28と基質11-mer OMe体の複合体の構造を調べるため、酵素に対する基質の滴定実験を行ったところ、イミノプロトンスペクトルの変化は観測されず、G:U塩基対は壊れなかった(図5-12)。基質部分は、それ自体ではステム構造にならないので、基質のみではイミノプロトンシグナルは観測されず、酵素部分とステムを形成した場合に、そのシグナルが観測される。よって、基質と酵素が相互作用しなければ、イミノプロトンシグナルは変化しない。滴定実験より、酵素Rz28と基質11-mer OMe体の大部分は複合体を形成していないことが明らかとなった。これは、Rz28が非常に安定なヘアピン構造を形成するために、基質と塩基対を形成しにくいことが原因と考えられる。しかし、Rz28に切断活性があ

ることから、一部分は基質と相互作用していると考えられる。Rz28の切断活性はRz24のものより低かったが、これはRz28がRz24に比べて基質と相互作用しにくいことが原因として考えられる。NMRスペクトルから判断すると、Rz28は基質とほとんど相互作用していないと考えられるが、オートラジオグラフの写真から、その切断活性はRz24の約50%はあるように思える（図4-1と図5-4参照）。これは、切断反応の溶液とNMR測定の試料溶液の組成が異なることに起因するかもしれない（ハンマーヘッド型リボザイムの酵素部分が非常に安定なヘアピン構造を作り、 Mg^{2+} イオン非存在下では基質と相互作用しにくかったが、 Mg^{2+} イオン存在下では基質と相互作用したとOritaらにより報告されている；1996）。また、切断反応には大きく分けて基質と酵素の会合ステップ、切断反応ステップおよび基質と酵素の解離ステップの三つのステップがあるが、このうち切断反応ステップが他のステップより非常に遅いと、切断反応ステップが全体の反応の律速段階になり、反応速度が基質と酵素の相互作用の強さに依存しなくなると考えることもできる。

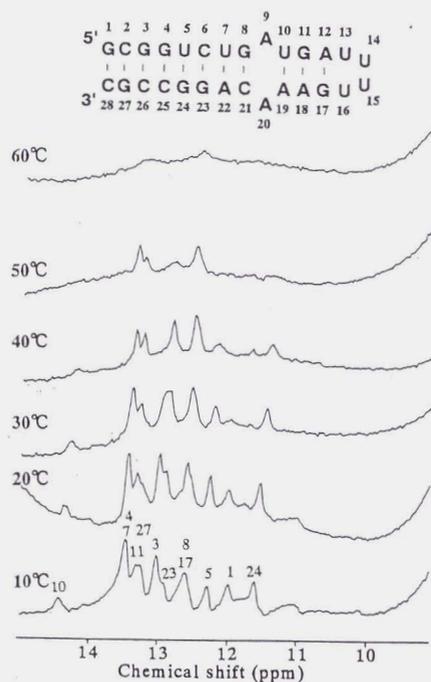
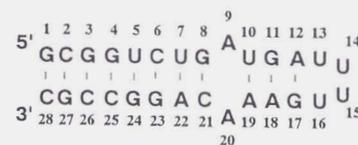


図5-11 Rz28のイミノプロトンスペクトルの温度変化。10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl (5%重水)、試料濃度0.5 mM。



Enzyme : Substrate

1 : 0.7

1 : 0.5

1 : 0

Chemical shift (ppm)

図5-12 基質滴定実験によるイミノプロトンスペクトルの変化。10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl (5%重水)、試料濃度0.5 mM、10°C。

Rz24のNMR解析

Rz28の2D-HMQCスペクトル (図5-13a) とRz24の2D-HMQCスペクトル (図5-13b) を比較することによって、Rz24のG残基のイミノプロトンシグナルの帰属を行った (表5-2)。Rz28の2D-HMQCスペクトルでは9個のシグナルが観測され、Rz24の2D-HMQCスペクトルでは5個のシグナルが観測された。Rz24がヘアピン構造を形成していると仮定すると、Rz28に比べてG:C塩基対が4つ減るのでシグナルは9個から5個に減るが、消えたシグナル (b, d, e, j) がその4つのG:C塩基対 (G1, G3, G4, G27) に相当すると考えられる。Rz24の2D-HMQCスペクトルにはc, f, g, hおよびkのシグナルがあり、f (G23由来) およびk (G24由来) のシグナルについては4残基短いことで3'末端になることによりわずかにシフトしたと考えられる。c, g, hのシグナルについては、Rz24とRz28のスペクトルでケミカルシフトが一致しており (これらのシグナルがRz28とRz24で一致することからNOEによる連鎖帰属が正しいことが確かめられた)、それらのシグナルに相当するG残基の構造はRz24とRz28で変わらないことが予想される。よって、cおよびhのシグナルに相当するG:A塩基対の構造はRz28と同様にhead to head型であると考えられる。

二本鎖中におけるG:A塩基対の研究が多数行われており、G:A塩基対が二つ並び、 ${}^5\text{PyGA}^3 / {}^3\text{PuAG}^5$ という配列であれば塩基のスタッキングがよいためにsheared型を形成しやすく、G:A塩基対が一つであったり ${}^5\text{PuGAPy}^3 / {}^3\text{PyAGPu}^5$ の様な配列であるとhead to head型を形成しやすいと考えられている (Katahira et al., 1993; Katahira et al., 1994A, B, C)。Rz24では ${}^5\text{PyGA}^3 / {}^3\text{PuAG}^5$ という配列になるのでsheared型を形成しやすいと考えられるが、実際にはhead to head型を形成した。その原因としてG:A塩基対に隣接してUUUUのループがあるため、柔軟な構造をしているということが考えられる。tightな二重らせん構造の中ではそれぞれの鎖間の距離が広がりにくいいため、G:A塩基対はsheared型を形成しやすいが、ヘリックスII欠損変異体ではG:A塩基対のとなりにループがあることによりG残基とA残基のバックボーンは離れることができ、ワトソクリック様のhead to head型のG:A塩基対を形成しやすくなったと考えることができる。さらに、二本鎖の中では ${}^5\text{PyGAPu}^3 / {}^3\text{PuAGPy}^5$ という配列と ${}^5\text{PyGAPy}^3 / {}^3\text{PuAGPu}^5$ という配列は両者ともsheared型のG:A塩基対を形成するが、後者に比べて前者はG:A塩基対の前後のスタッキングがよいためsheared型を安定化するという報告がある (Katahira et al., 1993; Katahira et al., 1994A, B, C)。ヘリックスIIがある場合 ${}^5\text{UGAG}^3 / {}^3\text{AAGC}^5$ であり、 ${}^5\text{PyGAPu}^3 / {}^3\text{PuAGPy}^5$ になるが、UUUUに置換している場合は ${}^5\text{PyGAPy}^3 / {}^3\text{PuAGPy}^5$ であることも、head to head型のG:A塩基対を形成しやすくする要因の一つかもしれない。Rz24における

head to head型のG:A塩基対は従来報告されているG:A塩基対の中では特異な例であり、それぞれの型のG:A塩基対の形成に必要な因子を調べるうえで重要なデータが得られたと思われる。

表5-2 Rz28およびRz24のシグナルのケミカルシフトの比較

	G4	G11	G27	G3	G23	G8	G17	G1	G24
Rz28	13.44	13.29	13.22	12.99	12.86	12.56	12.50	12.18	11.49
Rz24		13.28			13.01	12.62	12.52		11.73

ケミカルシフトはppmで示した。

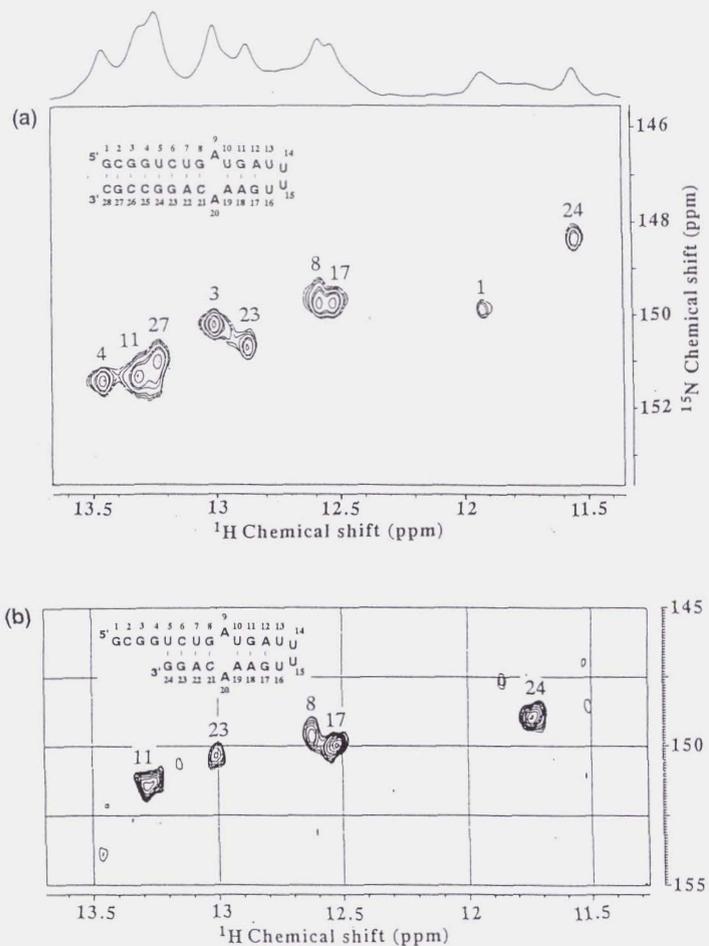


図5-13 Rz28およびRz24の2D-HMQCスペクトル。(a) Rz28; 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl (5% 重水)、試料濃度0.2 mM、5°C。(b) Rz24; 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaCl (5% 重水)、試料濃度0.04 mM、5°C。

本論文ではRz24のみでhead to head型のG:A塩基対を形成することが示唆されたが、X線結晶構造解析により明らかになったヘリックスIIを有するリボザイムのG:A塩基対の構造はsheared型である (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。そこで今後、Rz24に切れない基質およびMg²⁺を加えることにより、Rz24のG:A塩基対の構造がhead to head型からsheared型に変化するかどうか調べる必要があると思われる。しかしRz24のG:A塩基対が、隣接するループの柔軟性によりhead to head型を形成しやすくなったと考え、仮に基質およびMg²⁺との相互作用でsheared型を形成したとしても、そのsheared型のG:A塩基対はヘリックスIIを有するリボザイムのもの比べて不安定である可能性が高いと思われる。

Rz24の切断活性は、10 mM MgCl₂という条件でヘリックスIIを有する親リボザイムのもの (K_mが約1 μMで、k_{cat}が0.4 min⁻¹である) に比べて低く、K_mが約0.6 μMでk_{cat}が0.04 min⁻¹である。活性が低い原因として、変異体のMg²⁺結合親和性が親リボザイムのもの比べて低いことが示唆された (第4章参照)。また、ヘリックスIIを有するリボザイムのX線結晶構造では、G:A塩基対およびそれらに隣接するヘリックスIIの一部にひとつのMg²⁺が結合している (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。そこで、ヘリックスII欠損変異体のMg²⁺結合親和性が下がったのは、ヘリックスIIのUUUUによる置換のためにG:A塩基対がsheared型の構造を形成しにくくなり、Mg²⁺と結合部位の官能基の相互作用が弱くなったことが原因かもしれない (基質およびMg²⁺の存在下でRz24の構造解析を行う必要がある)。

ハンマーヘッド型リボザイムの内部ループ部分のGおよびA残基はmutagenesisおよび化学修飾の実験から切断活性に重要な残基であることが報告されている (Buzayan et al., 1990; Ruffer & Uhlenbeck, 1990; Slim & Gait, 1992)。またX線の結晶構造においては、G:A塩基対は切断部位とは離れたところに位置しているので切断反応には直接関与せず、リボザイムの活性構造の形成に関与していると考えられている (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。現時点では、X線の結晶構造により反応機構を完全に説明することができないので、ハンマーヘッド型リボザイムの活性構造におけるG:A塩基対の役割を明らかにする必要があると思われる。

6-2-2 Rz24'および14-merについて

Rz24'および14-merをT7 RNAポリメラーゼによって転写したところ、200 μlスケールの転写でRz24'は約5 nmol (ターンオーバー数13回、GTPの取り込み効率3%)、14-merは約10 nmol (ターンオーバー数20回、GTPの取り込み効率4%) 得られた。

Rz24'の切断活性を調べたところ、表5-3に示すようにRz24とほぼ同等の活性を示した。そこで、構造解析に適した試料であると考えて、イミノプロトン領域のNMRスペクトルを測定したところ、非常に多くのシグナルが観測された(図5-14)。このように予想以上にシグナルの数が多くなったことから、このRz24'は多形を取っていると考えられる。さらに、Rz24'に対して基質を加えると、わずかにスペクトルが変化するが、同様に多形を取っていることがわかった。この試料について1D-HMQCの実験(図5-14)および1D-NOEの実験を行ったが、シグナルの数が多いために解析が不可能であった。Rz24'が多形になったのは、そのヘアピン構造が不安定なためであると思われる。

表5-3 切断活性の比較

		Rz24	Rz24'	parent
10 mM MgCl ₂	K_m (μ M)	0.6	2.4	1
10 mM MgCl ₂	k_{cat} (min^{-1})	0.04	0.03	0.4
100 mM MgCl ₂	K_m (μ M)	0.3	1.6	
100 mM MgCl ₂	k_{cat} (min^{-1})	0.2	0.2	

50 mM Tris-HCl (pH 8)、37°C。

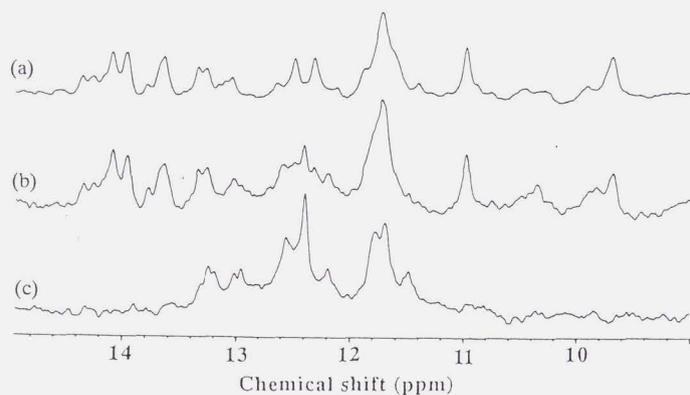


図5-14 Rz24' (G残基を¹⁵Nにより標識したもの)の1D-NMRスペクトル。イミノプロトン領域、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、100 mM NaCl (5%重水)、試料濃度0.5 mM、10°C。(a)プロトンのスペクトル (b)¹⁵Nをデカップルしたスペクトル (c)1D-HMQCスペクトル (イミノプロトン領域)

また、14-merについてイミノプロトン領域のNMRスペクトルを測定したところ、4本のシャープなシグナルが観測された。そこで、1D-NOEの実験(図5-15)を行ったところ、14-merは予想したヘアピン構造ではなく二重鎖を形成していることが予想される(図5-16)。よってG:A塩基対を形成しないため、解析には利用できなかった。

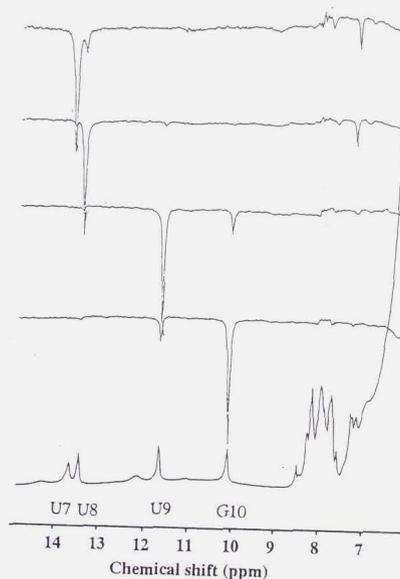


図5-15 14-merの1D-NOE差スペクトル。10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、100 mM NaCl (5%重水)、試料濃度0.5 mM、10°C。

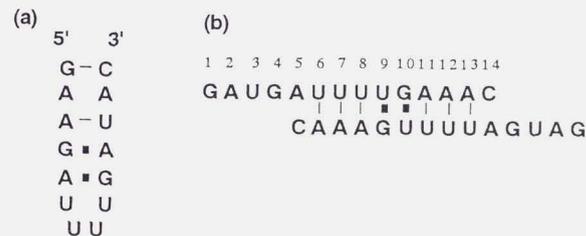


図5-16 14-merの配列から予想した構造(a)およびNMRスペクトルから考えられる構造(b)

第六章 小型HDVリボザイムの特性

6-1 酵素学的特性およびCDの解析

小型HDVリボザイムの酵素学的特性を調べるために、 $MgCl_2$ 濃度、温度、pHおよび二価金属イオンの種類を変えて切断実験を行った。そしてその特性を、従来報告されているHDVリボザイムの特性と比較した (Wu & Lai, 1990; Suh et al., 1993; Rosenstein & Been, 1990; Belinsky & Dinter-Gottlieb, 1991; Thill et al., 1991; Thill et al., 1993; Perrotta & Been, 1992; Smith et al., 1992; Smith & Dinter-Gottlieb, 1991)。従来報告されているHDVリボザイムには、様々なデザインのものがあり、その切断活性および酵素学的特性も様々である (本論文では、従来報告されているリボザイムを親リボザイムと呼ぶ)。例えば、親リボザイムの切断活性は、デザインによって約 $0.01 \sim 5 \text{ min}^{-1}$ と大きく異なる (Wu et al., 1992; Been & Perrotta, 1996)。

擬一次反応速度定数の測定

本研究では、はじめに小型リボザイムの擬一次反応速度定数 (k_{obs}) を求めるため、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM $MgCl_2$ という組成で、 $0.1 \mu\text{M}$ 基質に対して、 $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲で酵素濃度を変えて 37°C で切断実験を行った。1分から24時間後まで切断反応の経時変化を調べた。切断された基質の割合を定量するためには、二倍量の反応停止液 (20 mM EDTA) を加え、TLCを行った後 (図6-1)、バイオイメージアナライザーBAS-2000を使用した (ホルムアミド等の変性剤は、HDVリボザイムの切断活性を上昇させるという報告があるので、反応停止液には加えなかった)。反応時間 t に対して基質の切断率 P (%) をプロットし、これを擬一次反応速度式 (McCall et al., 1992) を用いて非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行うことにより、擬一次反応速度定数 (k_{obs}) を求めた。

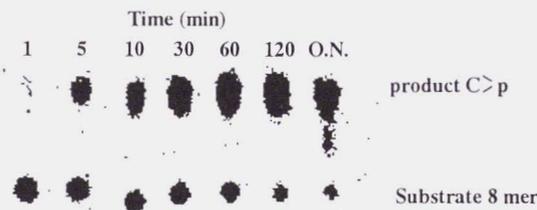


図6-1 切断反応のTLCによる解析

酵素学的特性の解析

さらに、切断活性に対する $MgCl_2$ 濃度、温度、pHおよび二価金属イオン種の影響を調べるため、50 mM Tris-HCl (pH 8)、 $0.1 \mu\text{M}$ 基質、 $1 \mu\text{M}$ 酵素、10 mM $MgCl_2$ で 37°C という条件を基本として (6-2 で述べるが、最も活性が高い基質と酵素の濃度比)、それぞれの条件を変えて切断実験を行い、5分後の切断された基質の割合を調べた。さらに、親リボザイムの特性と比較し、考察した。

CDによる解析

切断部位を2'-OMe化した切断されない基質を用い、 Mg^{2+} 滴定の実験を行った。 $MgCl_2$ 濃度変化にともなうCDスペクトルの変化をモニターすることによって、 $MgCl_2$ 濃度変化にともなう構造変化を調べた。

カーブフィッティングによる解析

ハンマーヘッド型リボザイムの場合と同様に、 $MgCl_2$ 濃度の違いによるCDおよび活性の変化をカーブフィッティングにより解析した。

6-2 結果および考察

小型リボザイムの擬一次反応速度定数を求めるために、基質 $0.1 \mu\text{M}$ に対して酵素濃度を変えて切断実験を行ったところ、酵素濃度が $1 \mu\text{M}$ の時に最も高い切断活性を示し、その時の k_{obs} は 0.09 min^{-1} であった (図6-2)。 k_{obs} を求めるためには、一般に酵素大過剰の条件を用いるが、小型リボザイムでは酵素部分を $1 \mu\text{M}$ 以上加えると切断活性が低下した。これは本研究の小型HDVリボザイムに特異な現象である。酵素部分を高濃度にする、酵素部分16 merおよび35 merが不活性型の構造を形成し、そこに基質が結合することにより、切断活性が下がるのかもしれない (例えば、35 merが二量体を形成するなど)。今回デザインの元としたBeenらの二本鎖の系ではステムIIあるいはステムIVが安定なテトラループにより閉じられており、それらの系では酵素濃度の上昇にともなって切断活性は上昇し、酵素大過剰の状態で切断活性がplateauに達する (k_{obs} は $0.5 \sim 1.3 \text{ min}^{-1}$; Been et al., 1992)。酵素部分を二本の鎖に分けることによって、ステムIIおよびステムIVの安定性が低くなり、これが不活性型構造の形成の原因になっているのかもしれない。そこで、ステムIIおよびステムIVを長くするなど、ステム部分の安定化によって切断活性は上昇するかもしれない。しかし本研究では、 $0.1 \mu\text{M}$ 基質、 $1 \mu\text{M}$ 酵素という条件で、 $MgCl_2$ 濃度、温度、pHおよび二価金属イオン種をそれぞれ変えて切断実験を行った。

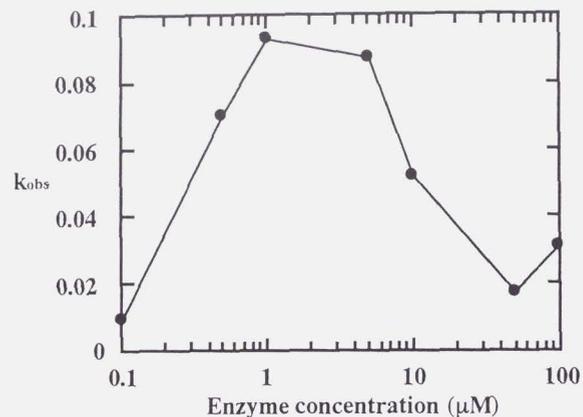


図6-2 基質一定濃度で酵素濃度を変えたシングルターンオーバーの切断実験。0.1 μM基質、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM MgCl₂、37°C。

切断活性に対するMgCl₂濃度の影響

MgCl₂濃度の影響を調べたところ、小型リボザイムの k_{obs} はMgCl₂濃度の上昇とともに上昇した(図6-3)。WuとLai (1990) はゲノム鎖87 merを用いて切断活性(30分後の切断された基質の割合)に対するMgCl₂濃度の影響を調べているが、12 mM MgCl₂の時に最も切断活性が高いことを報告している。小型リボザイムでは、30分後の切断された基質の割合を調べると、10~50 mM MgCl₂の時にplateauに達したので、小型リボザイムの切断活性に対するMgCl₂濃度の影響はWuとLaiがデザインした親リボザイムとほぼ同じかもしれない。しかし、RosensteinとBeenがデザインした親リボザイムとは異なる。RosensteinとBeenはゲノム鎖135 merを用いて切断活性に対するMgCl₂濃度の影響を調べているが、0.05~0.1 mM MgCl₂の時に最も切断活性が高く、それ以上のMgCl₂濃度の時には切断活性が低くなることを報告している。さらに、5 M Ureaの変性剤を加えると0.5~1 mM MgCl₂の時に最も切断活性が高くなることを報告している。Mg²⁺イオンはリボザイムの切断反応における実質上の触媒として働くと同時にリボザイムの構造を安定化する効果があると考えられる。よって、親リボザイム135 merでは過剰のMg²⁺イオンによりその構造を安定化されると切断活性が下がると考えられる。親リボザイム135 merでは、そのほとんどが不活性型の構造をしており、Mg²⁺イオンは不活性型構造を安定化し、活性型への構造変化を阻害す

るために、ある濃度以上のMgCl₂は切断活性を下げる働きをされると考えられている。小型リボザイムでは、MgCl₂濃度を上げてても切断活性は低下しないので、活性型が安定な構造となっていると考えられる。

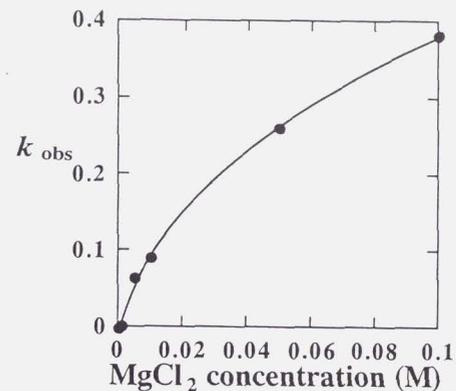


図6-3 小型リボザイムの切断活性に対するMgCl₂濃度の影響。0.1 μM基質、1 μM酵素、50 mM Tris-HCl (pH 8)、37°C、5分間。

切断活性に対するpHの影響

pHの影響を調べたところ、pHの上昇にともない活性は上昇した(図6-4)。これはハンマーヘッド型リボザイムが示す傾向と同じである(Dahm & Uhlenbeck, 1991)。Mg²⁺イオンに結合した水酸基が塩基として働き、2'水酸基からプロトンを引き抜くという切断反応機構が推測されており、pHの上昇にともなって水酸基の塩基性が強くなるために切断活性が上昇すると考えられている。一方、WuとLai (1990) はゲノム鎖87 merを用いて切断活性に対するpHの影響を調べているが、pH 7.1~9.1では活性が低く、pH 5あるいは6では高い切断活性を示すことを報告している。この論文ではpH 5あるいは6では高い切断活性を示すことについて、あるシチジン残基がプロトネーションすることによってリボザイムに構造変化が起こり、切断活性が上昇すると考えている。この考察が正しいとすると、今回の小型化を施したことにより、pH変化にともなう構造変化はなくなり、切断活性に対するpHの影響は切断部位のプロトンを引き抜く塩基の強さのみに依存するという単純な切断反応機構で考えられるようになった。

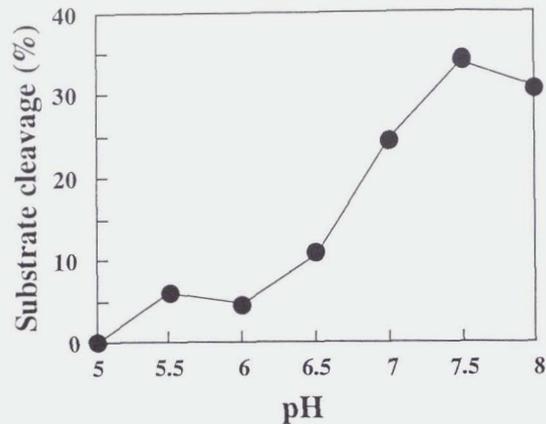


図 6-4 小型リボザイムの切断活性に対するpHの影響。0.1 μM 基質、1 μM 酵素、10 mM MgCl_2 、37°C、5分間。pH 5-6.5は50 mM MES、pH 7-8は50 mM Tris-HCl。

切断活性に対する金属イオン種の影響

金属イオン種の影響を調べたところ、 MgCl_2 、 MnCl_2 および CaCl_2 の存在下では高い活性を示し、 CoCl_2 および ZnCl_2 存在下ではほとんど切断活性を示さなかった(表6-1)。Suhら(1993)は、ゲノム鎖88 merと87 merのHDVリボザイムを用いて同様な実験を行っているが、ほぼ同じ結果を報告している。リボザイムの切断反応では、金属イオンが実質上の触媒であると考えられている。よって、金属に配位した水分子の塩基性の違いと水分子が配位した金属イオンの大きさの違いによってリボザイムの切断活性に違いが生ずると考えられる。よって、本研究のようにリボザイムを小型化しても金属イオンの結合部位の大きさは変わらず、親リボザイムと同じように金属イオンはリボザイムに結合し、塩基として働いて切断反応が起こると考えられる。

表6-1 切断活性に対する金属イオン種の影響

	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}
Substrate cleavage (%)	22	56	66	3	2

0.1 μM 基質、1 μM 酵素、50 mM Tris-HCl (pH 7)、10 mM 金属イオン、37°C、5分間。

切断活性に対する温度の影響

温度の影響を調べたところ、30-40°Cで最も切断活性が高かった(図6-5)。親リボザイムでは50°C以上という高い温度で最も切断活性が高いことが知られている(Wu & Lai, 1990; Rosenstein & Been, 1990; Belinsky & Dinter-Gottlieb, 1991; Thill et al., 1991; Thill et al., 1993)。さらに、変性剤を加えることにより、切断活性が上昇するという報告もある(Wu & Lai, 1990; Rosenstein & Been, 1990; Belinsky & Dinter-Gottlieb, 1991; Smith et al., 1992; Smith & Dinter-Gottlieb, 1991)。これらの報告の中では、不活性型の構造が熱力学的に安定であり、温度を上げたり、変性剤を加えることにより、活性型と不活性型の間の平衡が変わり、切断活性が上昇すると考えられている。HDVリボザイムは様々な二次構造モデルが考えられているが、そのひとつが活性型の構造であると考えると、温度を変えることによりこれらのモデルの中の不活性型のものから活性型のものへ構造変化しているのかもしれない。小型リボザイムの切断反応における至適温度は親リボザイムのものに比べて低い。また、変性剤(5 M Urea)を加えることにより、切断活性は減少した。よって、小型リボザイムでは安定な構造が活性型の構造であると思われる。構造解析を行う場合、リボザイムの大部分が活性型の構造をしている必要がある。本研究で小型化したリボザイムは親リボザイムに比べて低い温度で高い切断活性を示すので、活性型構造を形成しやすくなっていることが期待される。

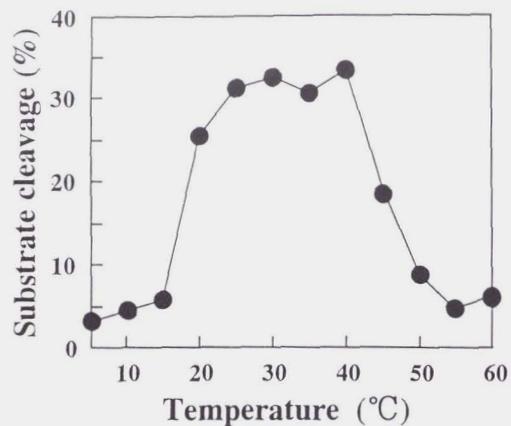


図6-5 小型リボザイムの切断活性に対する温度の影響。0.1 μ M基質、1 μ M酵素、10 mM $MgCl_2$ 、50 mM Tris-HCl (pH 8)、5分間。

カーブフィッティングによる解析

HDVリボザイムについても、ハンマーヘッド型リボザイムの場合と同様にCDを用いて Mg^{2+} 滴定の実験を行った。小型リボザイムの Mg^{2+} イオン結合親和性を調べるために、切断されない基質を用いて様々な $MgCl_2$ 濃度でCDスペクトルを測定したところ、 $MgCl_2$ 濃度の上昇にともなって λ_{max} は短波長側にわずかにシフトし、265 nmにおける楕円率は増加した(図6-6)。 $MgCl_2$ 濃度の上昇にともなうCDスペクトルの変化は、 Mg^{2+} イオンの結合によるリボザイムの構造変化に起因すると考えられる(Willick & Kay, 1971; Koizumi & Ohtsuka, 1991)。

ハンマーヘッド型リボザイムの場合と同様に Mg^{2+} が2つ結合していると仮定して、CDによる Mg^{2+} 滴定の結果についてカーブフィッティングを行ったところ、ベストフィットのカーブから $K_{d1}=0.74$ mM、 $K_{d2}=10$ mM、 $a=1$ 、 $r=0.68$ という値が得られた(図6-7a)。ここで、切断活性に関わる Mg^{2+} がCDスペクトルに影響を及ぼす Mg^{2+} と同一であると仮定して、求められた解離定数($K_{d1}=0.74$ mM、 $K_{d2}=10$ mM)を用いて $MgCl_2$ 濃度の活性(k_{obs})に対する影響を調べた結果(図6-3参照)についてカーブフィッティングを行った。しかし、図6-7bに示すようによいフィッティングカーブは得られなかった。次に活性のデータを、解離定数を固定せずに4つの変数を用いてカーブフィッティングしたところ、 $K_{d1}=9.7$ mM、 $K_{d2}=160$ mM、 $a=0.8$ 、 $r=0.17$ という値が得られた(図6-7c)。このように、CD

のデータのフィッティングにより求めた解離定数が活性のデータのフィッティングにより求めたものより小さくなったのは、CDのデータは低い $MgCl_2$ 濃度において楕円率の急激な変化が起こるのに対して、切断活性の $MgCl_2$ 濃度による上昇は緩やかであることに起因する。よって、 Mg^{2+} は3つ以上結合していると考えer必要がある。

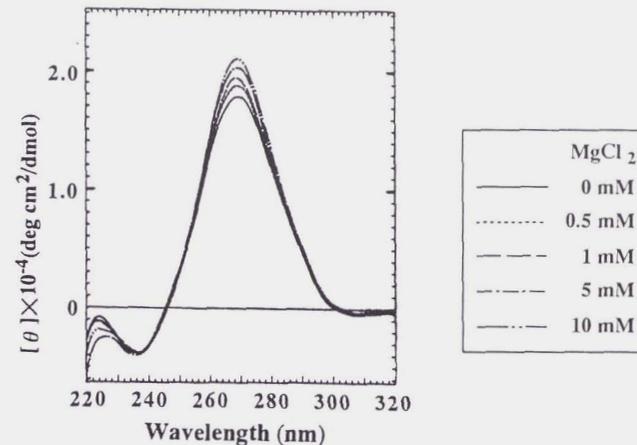


図6-6 Mg^{2+} 滴定による小型リボザイムのCDスペクトル変化。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7)、37°C、試料濃度1 μ M。

そこで、 Mg^{2+} が3つ結合していると仮定して、カーブフィッティングによる解析を行った。式は次のように表せる(第四章参照)。

$$F_{CD} = a(r_1F_1 + r_2F_2 + F_3)$$

$$k_{obs} = a'(r_1'F_1 + r_2'F_2 + F_3)$$

$$F_1 = 1/(K_{d1}/[Mg^{2+}] + [Mg^{2+}]/K_{d2} + [Mg^{2+}]^2/K_{d2}K_{d3} + 1)$$

$$F_2 = 1/(K_{d1}K_{d2}/[Mg^{2+}]^2 + K_{d2}/[Mg^{2+}] + [Mg^{2+}]/K_{d3} + 1)$$

$$F_3 = 1/(K_{d1}K_{d2}K_{d3}/[Mg^{2+}]^3 + K_{d2}K_{d3}/[Mg^{2+}]^2 + K_{d3}/[Mg^{2+}] + 1)$$

そこで、この式を用いてCDのデータのフィッティングを行ったところ、 $K_{d1}=0.7$ mM、 $K_{d2}=8$ mM、 $K_{d3}=160$ mM、 $a=1$ 、 $r_1=0.65$ 、 $r_2=0.97$ という値が得られた(図6-8a)。さらに、これらの解離定数を用いて活性のデータのフィッティングを行ったところ、よくフィットし、 $a=0.8$ 、 $r_1=0$ 、 $r_2=0.17$ となった(図6-8b)。 Mg^{2+} が3つ結合していると仮定して得られた解離定数のうち K_{d1} および K_{d2} は、 Mg^{2+} が2つ結合していると仮定してCDのデータについてフィッティングを行った際の解離定数と同様の値である。 $r_2=0.97$ ということは、3つ目の Mg^{2+} は

CDスペクトルの変化にほとんど寄与していないことを意味している。また、 Mg^{2+} が3つ結合していると仮定して得られた解離定数のうち K_{d2} および K_{d3} は、 Mg^{2+} が2つ結合していると仮定して活性のデータについてフィッティングした際の解離定数に相当する。 $r_1=0$ ということは、1つ目の Mg^{2+} は活性にほとんど寄与していないことを意味している。さらに $r_2=0.17$ ということから、2つ目の Mg^{2+} の結合により活性は現れるが、3つ目の結合によってさらに約6倍の活性を示すようになるということが示唆された。以上のことから、小型HDVリボザイムには3つ以上の Mg^{2+} が結合し、活性を示すには2つ以上の Mg^{2+} が必要であると思われる。

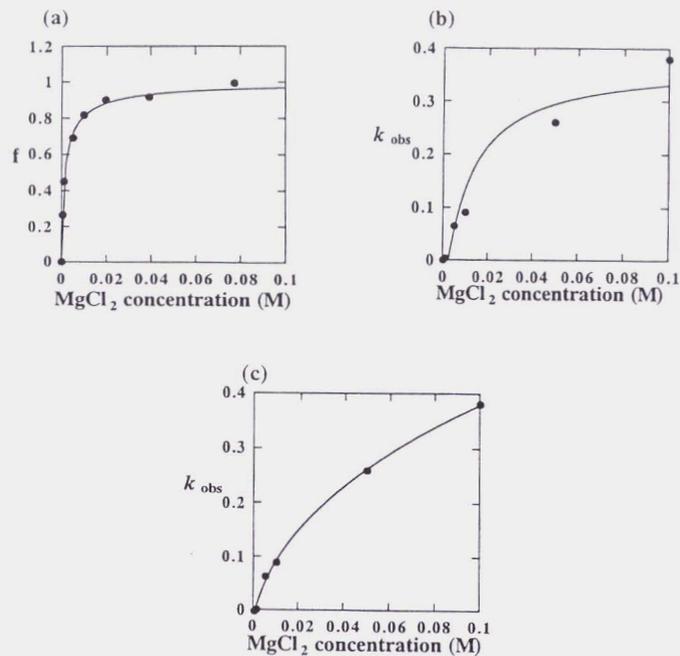


図6-7 Mg^{2+} が2つ結合していると仮定したときのカーブフィッティングによる解析。(a)CDのデータに対するフィッティング(標準偏差 $\sigma=0.032$ 、相関係数 $R=0.994$)。(b)変数を a 、 r とし、(a)で得られた解離定数を用いたときの活性のデータに対するフィッティング($\sigma=0.037$ 、 $R=0.971$)。(c)変数を K_{d1} 、 K_{d2} 、 a 、 r としたときの活性のデータに対するフィッティング($\sigma=0.0063$ 、 $R=0.999$)。

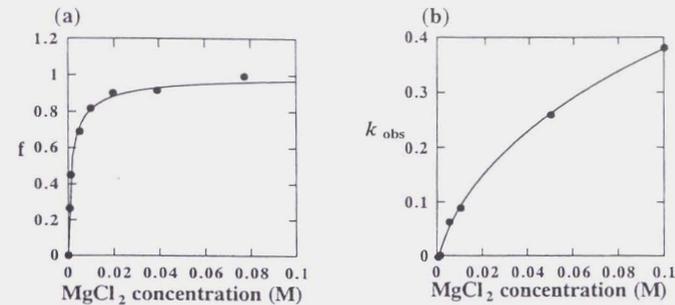


図6-8 Mg^{2+} が3つ結合していると仮定したときのカーブフィッティングによる解析。(a)CDのデータに対するフィッティング($\sigma=0.032$ 、 $R=0.994$)。(b)変数を a 、 r_1 、 r_2 とし、(a)で得られた解離定数を用いたときの活性のデータに対するフィッティング($\sigma=0.0063$ 、 $R=0.999$)。

本研究の小型リボザイム(59 mer)は今までに報告されたHDVリボザイムの中では最小であり、その切断活性は低くはない。さらに、酵素学的特性を考えると、小型化したHDVリボザイムは従来報告されているリボザイムとはその性質が異なる。pHの上昇にともなって活性が上昇することから、金属イオンに配位した水分子が塩基として働くという現在考えられている切断反応機構(Taira et al., 1990; Dahm & Uhlenbeck, 1991; Sawata et al., 1995)に一致する特性を持つと考えられる。さらに、親リボザイムは不活性型になりやすいが、小型リボザイムは低い温度で活性型の構造を形成しやすいと考えることができる。よって、本研究の小型リボザイムは構造解析に適したものであることが期待される。

温度、pHなどの条件を変えた結果、小型リボザイムでは切断反応に必要な部分だけを保持していることが期待されるが、酵素濃度を上げると活性が減少することから、高濃度では不活性型の構造を形成しやすくなる可能性がある。HDVリボザイムはその配列の中に相同性の高い配列を複数持っており、リボザイムを三本の鎖から構成することにより不活性型の塩基対の形成を促すのかもしれない(図6-9)。従って、構造解析を行う高濃度の条件では、酵素過剰ではないが不活性型の構造を形成する可能性がある。これを解決する方法として、ステム部分を長くしたり、ステム部分の配列を変えることが考えられるが、現在HDVリボザイムについて得られている知見が少ないため試行錯誤が必要であると思われる。

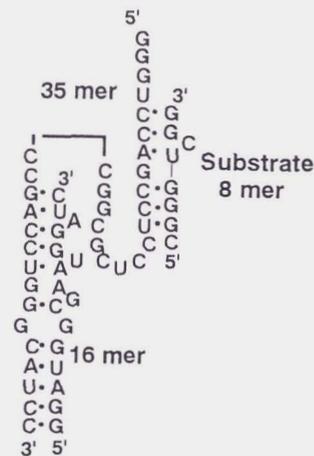


図6-9 予想される不活性型の塩基対の形成の例

第七章 結論および今後の展望

7-1 結論

小型リボザイムのデザイン

本論文では、ハンマーヘッド型リボザイムとHDVリボザイムの構造と機能の相関を明らかにすることを目的とし、はじめに、NMRによる構造解析を容易にするために小型化したリボザイムをデザインした。ハンマーヘッド型リボザイムの小型化のためには、ステムIIをUUUUからなるループに置換した。また、HDVリボザイムの小型化には、ステムIVを短くするとともに3本の鎖から構成し、さらに、ゲノム鎖およびアンチゲノム鎖のキメラ体にした。このHDVリボザイムは現在報告されている中では最小の系である。

RNAの構造は予想が難しく、構造解析に適したリボザイムをデザインする最良の方法はないため、デザイン、調製、活性測定および構造解析を行った後、そのデザインが構造解析に適したものであるか判明するというような試行錯誤を繰り返した。

小型リボザイムの調製

小型リボザイムは、主にT7 RNAポリメラーゼによる転写系により作成した。本研究では、T7 RNAポリメラーゼによる転写系を確立した。転写できない配列および修飾RNAについては、化学合成した。

小型ハンマーヘッド型リボザイムの特性

小型ハンマーヘッド型リボザイムの酵素学的特性を調べるため、 $MgCl_2$ 濃度、温度、pHおよび二価金属イオンの種類を変えて切断実験を行い、デザインの元となった親リボザイムの特性と比較したところ、 $MgCl_2$ 濃度依存性が親リボザイムと異なることがわかった。小型リボザイムは切断活性が低いと考えられていたが、高濃度の $MgCl_2$ を加えると親リボザイムと同等の活性に復活することがわかった。次に $MgCl_2$ 滴定によるCD変化を調べ、 $MgCl_2$ 濃度による構造変化および活性変化をカーブフィッティングにより解析する方法を確立した。カーブフィッティングにより解析したところ、 Mg^{2+} イオンは2つ以上結合しているが、結合数は親リボザイムに比べて少なく、 Mg^{2+} の解離定数が大きいことが示唆された。ステムIIは、 Mg^{2+} が結合する触媒中心の安定化に寄与していると考えられる。

小型ハンマーヘッド型リボザイムのNMRによる解析

安定同位体標識法を用いたNMRによるハンマーヘッド型リボザイムの構造解析を試みたが、試料の調製が困難であった。そこで、酵素部分のみでNMRを測定したところ、ワトソクリック様 (head to head型) のG:A塩基対の存在を示唆する結果を得た。小型リボザイムではG:A塩基対に隣接して柔軟なループがあるためにhead to head型を形成していると考えられる。

小型HDVリボザイムの特性

MgCl₂濃度、pHおよび温度の切断反応に対する影響は親リボザイムのものと異なり、単純な系で説明できるようになった。親リボザイムでは、最も安定な状態では不活性型の構造をしており、温度を変えたり、変性剤を加えることによって活性型への構造変化が起こると考えられているが、小型リボザイムでは、構造変化が起こって高い活性を示すようになるという現象は観測されなかった。HDVを小型化することによって、活性型を形成しやすくなったと考えられ、構造解析が容易になることが期待される。

またCDを測定し、カーブフィッティングしたところ、小型ハンマーヘッド型リボザイムと同様に2つ以上のMg²⁺が結合していることが示唆された。さらに、活性のデータをフィッティングしたところ、3つ以上のMg²⁺が結合しており、切断活性を示すには3つ以上のMg²⁺が必要であることが示唆された。

7-2 総括

本研究では、リボザイムの高次構造解析により構造と機能の相関を明らかにすることを目的としたが、その高次構造を明らかにするには至らなかった。RNAの構造解析を困難にしている大きな原因のひとつとして、NMRシグナルの分離が難しいことが一般に知られている。しかし本研究では、それ以前にリボザイムのデザインが問題点となった。リボザイムの構造は柔軟性が高いため、多形になりやすく、構造を予測してデザインすることが難しかった。

小型ハンマーヘッド型リボザイムの酵素部分のみで構造を調べたところ、G:A塩基対が予想されたsheared型ではなく、head to head型であることが示唆された。X線結晶構造解析によって明らかになったハンマーヘッド型リボザイムのG:A塩基対の構造はsheared型であり、小型リボザイムのMg²⁺結合親和性の低下とG:A塩基対の構造が関係しているかもしれない。今後、基質およびMg²⁺存在下でのNMR測定を行う必要がある。

最後に、CDを用いたMg²⁺滴定実験あるいはMgCl₂濃度を変えた切断実験の結果をカーブフィッティングすることによって、Mg²⁺の結合数および解離定数を推定する方法を確立した。エネルギー計算などにより、リボザイムの切断活性には2つのMg²⁺が働いているという仮説がたてられていたが、カーブフィッティングによってその仮説を支持する結果を得た。

ハンマーヘッド型リボザイムのX線結晶構造解析の結果では、Mg²⁺は図7-1および表7-1の5箇所に結合している (Scott et al., 1995)。X線の結晶構造においてステムIIおよびその近傍にMg²⁺が結合しているので、ステムIIを除くことによってMg²⁺の結合数が少なくなったり、結合親和性が小さくなったと思われる。また、

ステムIIが無くてもMg²⁺が結合することから内部ループにおいて安定な活性中心を形成できると考えられるが、G:A塩基対が活性部位の安定化に大きく寄与している可能性は高いと思われる。

X線解析により明らかになった構造で切断反応機構を説明することはできていない (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995)。またPAGEの泳動度による解析により、MgCl₂濃度が1 mM以上ではX線の結果で報告されたwishborn構造 (ステムIとステムIIが近い) であるが、1 mM以下ではステムIとステムIIIが近い構造であることが報告されている (Bassi et al., 1995)。今後は、NMRによるダイナミックな構造を明らかにする必要があると思われる。

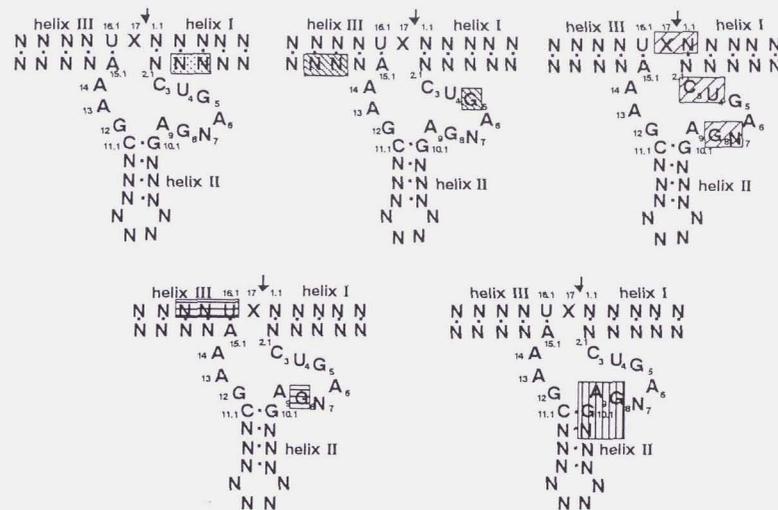


図7-1 ハンマーヘッド型リボザイムの結晶構造中に見つかった5つのMg²⁺結合部位 (Scott et al., 1995)。四角で囲んだ部分は3次元的には近接しており、Mg²⁺が結合している。

表7-1 ハンマーヘッド型リボザイムの結晶構造中に見つかった5つのMg²⁺結合部位 (Scott et al., 1995)

Site 1	G 2.2	N7
	G 2.3	N7 O6
Site 2	G 5	O2P
	U 15.3	O3'
	C 15.4	O1P
Site 3	A 1.1	N6
	C 3	N4
	U 4	O4
	U 7	OP1
		OP2
	G 8	O2P
	C 17	N4
Site 4	G 8	O6
	U 16.1	O4
	G 16.2	N7
	A 16.3	O6 N7 O2P
Site 5	G 8	O2'
	A 9	O1P
	G 10.1	N7
	G 12	N2

HDVリボザイムのMg²⁺結合部位は、Pb²⁺による切断実験によって調べられている(図7-2; Rogers et al., 1996)。その結合部位と考えられている残基はモデル上では空間的に近接することができ、さらに切断部位に近づくことが可能である。しかし、それらの残基にいくつのMg²⁺が結合しているかは明らかになっていない。本研究のカーブフィッティングによる解析では、3つ以上のMg²⁺が結合していることが示唆されたが、今後X線結晶構造解析あるいはNMRによる構造解析によって、図7-2で示したMg²⁺結合部位にどのようにMg²⁺が結合しているかが明らかになることが期待される。

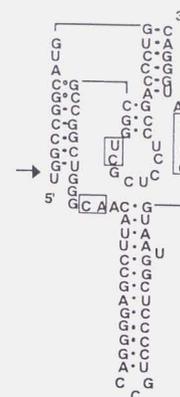


図7-2 HDVリボザイムのMg²⁺結合部位。□で示した。

7-3 今後の展望

近年、リボザイムの研究は急速に進んでおり、その反応機構は明らかになりつつある。ハンマーヘッド型リボザイムについては、そのX線結晶構造が明らかになり、その構造と機能の相関が明らかになりつつある。しかし、その構造から反応機構を説明できるほどのよい結果が得られたわけではない。リボザイムの反応機構を解明し、自由にリボザイムをデザインすることができるようになれば、リボザイムの薬剤としての応用は可能になると思われる。ここでは、リボザイムを薬剤として応用されるまで、今後必要であると思われる研究について述べる。

SELEX法による新機能リボザイムのスクリーニング

SELEX法(図7-3; Joyce, 1994; Beaudry & Joyce, 1992)とは、RNAにランダムに変異を導入し、ここからある条件を満たすものを選択する方法である(DNAのSELEXもある)。はじめに、鋳型DNAをDNA合成機を用いて作成する際に、四種類のアミダイトを混ぜて合成することによりランダム変異を導入する。次に、鋳型DNAをPCRにより増幅する。この時にPCRの反応を変異が起こりやすいような条件で行い、さらに変異を導入するのが一般的である。この鋳型DNAを用いて転写反応を行うと、転写されたRNAはランダムな配列を持つことになる。これらのランダムな配列を持つRNA分子集団から目的のRNA分子をスクリーニングする。このスクリーニングの方法は目的によって異なり、最も重要なポイントのひとつである。例えば、ある物質に結合するRNAをスクリーニングするためには、その物質をカラム担体につけ、そのカラムを通すことにより、RNA分子集団からその物質に結合するRNA分子をスクリーニングすることができる。スクリーニン

グされたRNA分子は逆転写酵素によって再びDNAに戻し、これをPCRで増幅する。一般には、このような操作を数回繰り返すとともに、淘汰圧を強くする（例えば、ある物質に結合するRNAをスクリーニングする場合、弱い結合のものは除かれるような条件にする）ことによって目的のRNAをスクリーニングする。第一章でも述べたが、SELEX法により鉛リボザイム（Pan & Uhlenbeck, 1992）、DNAを切断するリボザイム（Robertson & Joyce, 1990）、色素に結合するリボザイム（Ellington & Szostak, 1990）等、その他多くの機能を持つリボザイムが発見されている。近年では細胞内で効率的にターゲットRNAを切断するリボザイムをスクリーニングするための*in vivo* SELEXが試みられている（Koguma et al., 1995）。また、SELEX法によりRNAを複製するリボザイムを発見できれば、RNAのみで自己増殖できる生命体に近いものができるかもしれない。本研究では、構造解析に適したリボザイムを見つけるために試行錯誤を繰り返したが、構造解析に適したリボザイムをSELEX法によりスクリーニングする方法が開発され、リボザイムの構造解析は大きく進むかもしれない。

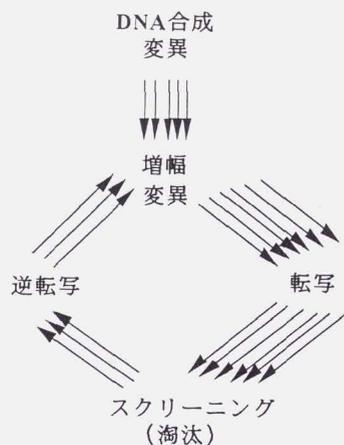


図7-3 SELEX法の原理

リボザイムの構造解析

近年、ハンマーヘッド型リボザイムのX線結晶構造が明らかになり、その構造と機能の相関が明らかになりつつある（Pley et al., 1994; Scott et al., 1995）。しかし、その構造から反応機構を説明できるほどのよい結果が得られたわけではない。この原因は、結晶構造が活性型の構造ではない点にあると思われる。リボザイムの活性部位は一本鎖の部分にあるので、運動性が高く、非常に多形になりやすい。そこで、結晶化によりひとつの構造に固定するのではなく、ダイナミックな構造を調べるNMRは有効な手段であると思われる。しかし、従来のタンパク質の構造解析に用いられてきた方法だけでは、構造解析が難しく、リボザイムの構造は決まらないと思われる。RNAは柔軟な構造をしているので、その運動性を測定し、構造モデルを構築する際にその運動性を上手に表記する方法が必要であると思われる。構造の柔軟性は、リボザイムの構造と機能の相関を考えるうえで重要な因子になると思われる。

近年のRNAの安定同位体標識法の発達により、RNAのNMRによる構造解析、リボザイムの構造解析が進むことが期待された（Nikonowicz & Pardi, 1990; Nikonowicz et al., 1992; Batey et al., 1992; Simorre et al., 1996; Kubinec et al., 1996）。様々なRNAの構造解析は進んでいるが、リボザイムの構造解析はあまり進んでいない。これは、上述のようにリボザイムの柔軟な構造を測定することが難しいことが原因のひとつである。さらに、RNAの構造を予測することが難しいという点も原因のひとつであると思われる。RNAのモデリングの研究が進むことにより、構造解析に適したデザインが得られることが期待される。

リボザイムの薬剤としての応用

リボザイムは抗エイズウイルス剤や抗癌剤として期待され、臨床応用のための研究が多くされている（Barinaga, 1993; Sullenger & Cech, 1993）。リボザイムを使った治療法は、特異的な水素結合により結合しターゲットRNAを切断することによって遺伝情報源を断ち、病因となるタンパク質を発現させないという方法であり、ターゲットRNAに対して特異性が高く、生体分子をそのまま利用するので副作用が少ないことが予想され、大変期待されている。

しかし、生体内でリボザイムを働かせる場合、まだいくつかの問題がある。まず、効率的にリボザイムが薬として働くためには、標的となる細胞に特異的に取り込まれることが望ましい。細胞に効率よく取り込ませるためには、リボソームを使う方法やウイルスベクターを用いる方法などが考えられている（Sullenger & Cech, 1993）。ウイルスベクターは、ウイルスがある細胞に特異的に取り込まれることを利用したものである。また、リボザイムが標的細胞に取り込まれた場合に、その細胞内で比較的長時間安定に存在することが必要である。生体内のヌ

クレーゼに分解されないように、リボザイムを化学修飾する方法が考えられている (Paolella et al., 1992; Pieken et al., 1991)。さらに、リボザイムを生体内で働かせる場合、標的部位の選択は重要な問題になってくる。リボザイムが効率よく作用できる変異の少ない部位を標的とし、さらに標的部位以外とは相互作用しない配列を選択する必要がある。

本研究ではリボザイムの立体構造を明らかにし、構造と機能の相関を調べることを目的としたが、リボザイムの切断反応機構の分子の基盤が明らかになれば、リボザイムを薬剤として高機能化するための指標が得られると思う。今後、薬として応用するための研究が進むにつれて原子レベルでの反応機構の解明が必要になると思われる。

実験の部

試薬および材料

尿素、トリス (ヒドロキシルメチル) アミノメタン、アクリルアミドなど試薬は基本的に和光純薬の特級あるいは生化学実験用ものを用いた。以下に、それ以外の試薬および主に用いた材料や重要な材料を記載する。

DNA合成機用試薬およびカラム	Applied Biosystems Inc. (ABI)
放射性同位体標識化合物	
[γ - 32 P] ATPおよび[α - 32 P] CTP	AmershamおよびICN
培地	
バクトトリプトン	Difco
nuclease free 水	日本ジーン
X線フィルムおよび現像液	富士フィルム
濾紙 (3MM Chr)	Whatman
フィルター	
ウルトラフリーC3HV	日本ミリポア
セントリコン3	Amicon
TLCプレート	
PEI-Cellulose F	Merck
陽イオン交換樹脂	
S-Sepharose FF	Pharmacia
NMRチューブ	シゲミ
NMR用内部標準物質 (DSS)	Sigma
NMR用重水	Isotec Inc.
RNAの依頼合成	
HDV基質8mer	Genset
Electro elution kit	
BIOTRAP BT 1000	Schleicher & Schuell
電気泳動槽	Bio-CraftおよびBio-Rad

[酵素]

酵素は、その活性が低下しないように温度および取り扱いに注意した。

T7 RNAポリメラーゼ	宝酒造
アルカリフォスファターゼ	宝酒造
T4 ポリヌクレオチドキナーゼ	宝酒造および東洋紡績
RNA sequencing kit	
RNase T ₁ 、RNase U ₂	
RNase P _{hy} M、RNase Bc	Pharmacia

RNase、V₁
mung bean RNase
T7転写反応キット
MEGAscript

Pharmacia
フナコシ薬品

Ambion

[実験機器]

DNA/RNA合成機
UV分光光度計
CD分光計
pHメーター
NMR分光計
バイオイメージアナライザー
フラクションコレクター
泳動用パワーサプライ

ABI 392型DNA/RNA合成機
島津 UV-2100型分光光度計
日本分光 J-720型CD分光計
Horiba pHメーターF-11およびB-112
Bruker AM-400およびAMX-500
富士フィルム BAS-1000およびBAS-2000
Bio-Rad 2110型フラクションコレクター
Pharmacia EPS 350型パワーサプライ

実験方法

本研究ではヌクレアーゼによるRNAの分解を防ぐために、実験操作はnucleaseによる汚染が起こらないように注意した。実験操作中は基本的に使い捨ての手袋(サニメント手袋)を使用し、試薬および器具についてはnuclease freeのものを必要に応じて用いた。実験器具をnuclease freeにするためには、乾燥機中180°Cで2時間加熱することにより、nucleaseを分解する操作をした(乾熱滅菌処理)。また、180°Cで2時間加熱できない器具については15%過酸化水素水に一晩浸けることによりnucleaseを失活させた(過酸化水素処理)。実験に用いる水および試薬についてはdiethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理を行うことによりnucleaseを失活させた。ただし、Tris-HCl緩衝液などのDEPC処理が不可能な場合および非常に貴重な試料を扱う場合は、市販されているnuclease freeの試薬を使用したり、極力nucleaseによる汚染が起きないようにした。DEPC処理については、溶液に0.1% (v/v) になるようにDEPCを加えて37°Cで一晩置いた後、DEPCを分解するために120°Cで4時間オートクレーブ処理した。

[核酸の定量および保存]

核酸の定量にはUVを用いた。真空乾燥した核酸を水またはTE緩衝液に溶解し、その一部を希釈して260 nmにおけるUV吸収(光路長1 cm)を測定した。また、それぞれのヌクレチド鎖のモル吸光係数は

$$\text{RNA鎖の吸光係数} (\epsilon_{260}) \times 10^{-3} = 15.0 \times A + 7.4 \times C + 11.4 \times G + 9.9 \times U$$

$$\text{DNA鎖の吸光係数} (\epsilon_{260}) \times 10^{-3} = 15.7 \times A + 8.1 \times C + 12.8 \times G + 8.4 \times T$$

の式より求め、これよりモル数を計算した。

ほとんどの場合は-20°Cで保存した。核酸の保存は長期保存するものについては、真空乾燥した後、-80°Cで保存した。また、ヌクレアーゼによる汚染が心配の場合はフェノール・クロロホルム処理およびエーテル処理をした後、-80°Cで保存した。

[変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(変性PAGE)]

DNAおよびRNAの精製および解析に変性PAGEを用いた。この方法の利点としては、非常に分離能が高いこと、ヌクレオチドの長さによって泳動度が異なるので試料の同定が容易であること、泳動度がヌクレオチド配列にあまり依存しないため精製条件の検討がほとんど必要ないこと、操作が容易であることなどがあげられる。ゲルは、表A-1に示すような組成で試薬を溶解した後(尿素、アクリルアミド、TBEを加えて純水でfill upした後、APSを溶解し、最後にTEMEDを加えた)、ゲルが固まる前にゲル板の間に流し込み(予めゲル板を磨き、スパーサーおよびクリップなどを使用して組み立てた)、サンプルコームを挿し込んで静置した(約20分)。ゲルが固まったら、泳動槽にセットして(泳動緩衝液にはTBEを用いた)、ゲルに含まれている汚れを除いたり、ゲルの温度(約55°C)を上げるために予備泳動した(約30分)。試料に等量の2×loading buffer(表A-2)を加えた後、90°Cで3分間熱することによりヌクレオチドを変性してゲルにのせ、泳動した。プロモフェノールブルー(BPB)およびキシレンシアノールFF(XC)のバンドを目安に泳動を止めた。

アクリルアミドの濃度は核酸の鎖長によって適宜変えた。本研究では、8~18merでは20%、24~52merでは10%とした(ただし、本研究では問題なかったが、DNAとRNAでは同じ鎖長でも泳動度は異なるので注意を要する)。また、ゲルのサイズも用途によって変えた。精製用には幅20 cm、高さ40 cm、厚さ1または3 mmのゲルを用い、解析用には厚さが0.5 mmのものを用いた。さらに、簡単な純度のチェックなどではミニスラブゲルを用いた。よって、泳動時間はアクリルアミド濃度およびゲルのサイズによって異なった。泳動の条件については、ミニスラブゲルでは200 V定電圧で行い、精製用のゲルでは60 W定電力で、解析用のゲルでは80 W定電力で行った。

表A-1 20%ポリアクリルアミドゲル 100 ml中の組成

尿素	42 g
40% アクリルアミド (29:1) *	50 ml
10×TBE **	10 ml
過硫酸アンモニウム (APS)	0.1 g
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)	30 μl

*) アクリルアミド380 g、N,N-メチレンビスアクリルアミド19 gを超純水に溶解して、1 lとした後、フィルターで不溶物を取り除いた。

**) 0.9 M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、0.9 M ホウ酸、0.04 M EDTA-三ナトリウム

表A-2 2×loading buffer 100 ml中の組成

尿素	42 g
キシレンシアノールFF	0.25 g
プロモフェノールブルー	0.25 g

[エタノール沈殿]

エタノール沈殿は、非常に簡単な核酸の脱塩および濃縮法である(ただし、この方法は7残基以下の短い核酸では収率が低い)。試料に、濃度が0.3 Mになるように酢酸ナトリウム溶液(pH 7)を加え、さらに2.5倍容量のエタノールを加えてよく混ぜた後、-20°Cで2時間冷やした。以上の操作で核酸は白色の沈殿になった。これを4°Cで12k×g、20分遠心して上清を除去し、沈殿(核酸)を回収した。また、試料中の塩濃度が非常に高い場合には同じ操作をもう一度行い、塩を極力除きたい場合には適当量の70%エタノールを加えて沈殿を洗浄し、1分遠心して沈殿を回収した。最後に、得られた沈殿を真空乾燥または放置することにより、エタノールを除去した。

[フェノール・クロロフォルム処理およびエーテル処理]

この方法は、核酸とタンパク質の混合溶液のタンパク質を失活させ、核酸のみを抽出するときに使う。まず、タンパク質を変性、抽出するために、TE緩衝液(pH8)で飽和したフェノール・クロロフォルム混液(1:1)を試料に対して等容量加えた後、よく攪拌した。さらに、室温で5分間遠心(12k rpm)した後、上層(核酸の入った水層)と下層(有機層)に分れるので、注意深く上層を採取する。この操作を適宜回数繰り返した(最低3回)。また、得られた水層に混入しているフェノールを抽出するために等容量のクロロフォルムを加えてよく攪拌した。さらに、室温で5分間遠心(12k rpm)した後、上層(有機層)と下層(核酸の入った水層)に分れるので、注意深く上層を除去した。この操作を3回以上繰り返した。最後に、核酸の入った溶液を真空乾燥した。

[BAP処理]

核酸の5'末端を³²Pで標識する際の前処理など、核酸の5'リン酸基を除くときに行う。まず、酵素に添付されている緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM MgCl₂)に試料を溶かし、核酸約3.4 nmol(24 merでは約1 A₂₆₀ユニット)に対してアルカリフォスファターゼ(BAP)を0.18 U加えた後、37°Cで1時間反応した。反応後、酵素を失活させるためにフェノール・クロロフォルム処理を行った。

[5'末端標識]

本研究では、リボザイムの活性測定において5'末端を³²Pで標識した基質を用いるなど、核酸を放射性同位体である³²Pで標識する操作を行った。酵素に添付されている緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM spermine)に試料を溶かし、核酸約1 nmolに対してT4ポリヌクレオチドキナーゼを5 U加えた後、37°Cで1時間反応した。さらに、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、切り出し、抽出、エタノール沈殿により、5'末端を³²Pで標識した核酸を得た。

[DNAの合成および精製(鋳型DNAの調製)]

鋳型DNAの合成にはDNA合成機を用いた。鋳型となる配列およびT7 RNAポリメラー

ゼのプロモーター配列を合成機に入力し、trityl-off(5'-OHの保護基であるトリチル基を自動的に脱保護する設定)で0.2 μmoleまたは1 μmoleスケールで合成した。アンモニア水溶液により自動的にバイアルに切り出されたDNAをアンモニア水溶液中55°Cで8時間処理することにより、脱保護を行った(アンモニア処理)。さらに、DNAを真空ポンプによって乾燥した後、約20 OD₂₆₀のDNAを100 μlの水に溶かし、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(高さ40 cm×幅20 cm×厚さ0.1 cm)により精製した。泳動後、暗室でUVを照射することにより黒く影となる部分を切り出した。切り出したゲル片からcrush and soak法によってDNAを抽出した後、遠心してDNA溶液を採取した。さらに、凍結乾燥により液量を300 μlにした後、ゲル片をフィルター(ウルトラフリー-C3HV)濾過した。最後に、濾液に含まれているDNAをエタノール沈殿により脱塩した。

[T7 RNAポリメラーゼによるRNAの転写]

T7 RNAポリメラーゼはプロモーター配列に対する特異性が高く、効率よく簡単に転写できることから、長鎖RNAを調製する際によく使われている。そこで本研究では、T7 RNAポリメラーゼによる転写系を利用してリボザイムを調製した。転写反応は基本的に200 μlスケールで行い、2本分の反応液を変性ポリアクリルアミドゲル(高さ40 cm×幅20 cm×厚さ0.1 cm)を1枚用いて精製した。まず、鋳型DNAを一度変性させるために90°Cで3分間加熱した後、アニールさせるために室温まで徐冷した。これに反応液を加え、最後にT7 RNAポリメラーゼを加えた後(表A-3)、ゆるやかに攪拌し、37°Cで5時間反応した。この時、反応を開始して3時間後、T7 RNAポリメラーゼをさらに加えた。

RNAを調製する場合、T7 RNAポリメラーゼを用いる転写反応系は広く用いられているが、本研究のように短鎖のRNAを調製している例は少なく、すでに報告されている条件より酵素、鋳型DNAおよびNTPsなどの衝突頻度を上げるような条件に変える必要があった。そこで本研究では、始めに条件検討を行い、転写反応条件を確立した。

表A-3 転写反応液の組成

2 μM	template DNA (鎖濃度)
40 mM	Tris-HCl (pH 8.1 at 37°C)
35 mM	MgCl ₂
7.5 mM	NTPs (each)
5 mM	DTT
2 mM	spermidine
0.01%	Triton X-100
80 mg/ml	PEG 8000
20 U/μl+20 U/μl	T7 RNA polymerase *
5%	glycerol **
10mM	NaCl **

*) 反応を開始する際に20 U/ μ l 加え、3時間後にさらに20 U/ μ l 加えた。

**) T7 RNAポリメラーゼの保存液からの持ち込み。

[PAGEからの核酸の抽出]

PAGEからの核酸の抽出法としてCrush and Soak法および大量のゲルから高収率で精製する場合にElectroelution法を用いた。Crush and Soak法では、ゲル片を細かく砕いた後、約0.3 cm³のゲルに対して1 mlの0.3 M酢酸ナトリウム溶液 (pH 7) を加えて、室温で6時間振盪した。上清を回収し、フィルターによりゲル片を除いた後、エタノール沈殿により脱塩した。Electroelution法では、BIO-TRAPを用いた。泳動槽にBT1膜 (分画分子量約2000) およびBT2膜をセットして泳動用緩衝液としてTBE緩衝液を入れた。さらに、その泳動槽のTBE緩衝液に浸るようにゲル片を入れ、水で冷やしながら200 Vで2時間泳動した。泳動後、膜に付いている核酸をはがすために逆方向に同電圧で20秒間泳動して、膜の間にトラップされた溶液を回収した。最後に回収した溶液をセントリコンを用いて脱塩濃縮した。

[RNAの塩基配列決定]

本研究では、RNAの塩基配列を決定するために、4種類のRNase、RNase T₁、RNase U₂、RNase *Phy M*、RNase *Bc*を用いた。まずRNAの5'末端を³²Pで標識して、これをアルカリ加水分解および4種類のRNaseによる限定分解に用いた。反応スケールはすべて10 μ lとした。アルカリ加水分解では、標識したRNAおよび5 μ gのキャリアRNA (本研究では、リボソームRNA) を50 mM炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 9) に溶かし、90°Cで15分間反応した。反応後は水で急冷することにより反応を止めた。また、RNaseによる限定分解では、標識したRNAおよび5 μ gのキャリアRNAを限定分解用の緩衝液 (*Bc*以外のRNaseでは20 mMクエン酸ナトリウムおよび7 M尿素の溶液 (pH 5)、*Bc*では20 mMクエン酸ナトリウムの溶液) に溶かし、50°Cで5分間置いた後 (ブレインキュベーション)、水で急冷した。さらに、それぞれRNase T₁ (1U)、U₂ (2U)、*Phy M* (3U)、*Bc* (2U) を加えて、15分間50°Cで反応した。反応後、水で急冷することにより反応を止めた。RNase *Bc*の反応については、さらに等容量の7 M尿素を加えることにより反応を止めた。反応物について変性20% PAGEを行い、オートラジオグラフィーにより解析した。

[RNaseを用いたRNAの二次構造解析]

本研究では、RNAの二次構造を解析するために、二本鎖に特異的なRNase V₁および一本鎖に特異的なmung bean RNaseを用いた。まずRNAの5'末端を³²Pで標識して、これをアルカリ加水分解および3種類のRNase (塩基配列と照らし合わせるためRNase T₁も用いた) による限定分解に用いた。反応スケールはすべて10 μ lとし、それぞれの緩衝液に標識したRNAおよび5 μ gのキャリアRNAを溶かし、アニーリング (90°Cで3分間置いた後、室温まで徐冷) を行った (ただし、RNAの分解を防ぐために二価金属イオンであるMgCl₂およびZnCl₂はアニーリング後に加えた)。さらに、37°Cで5分間ブレインキュベ

ーションした後、RNase V₁ (0.02 U/ μ l) あるいはmung bean RNase (0.2 U/ μ l) を加え、37°Cで15分反応した。反応後、すぐにローディング緩衝液を加え、変性20% PAGEを行い、オートラジオグラフィーにより解析した。

RNase V ₁ 用緩衝液	mung bean RNase用緩衝液
20 mM Tris-HCl (pH 7)	30 mM sodium acetate (pH 7)
0.2 M NaCl	50 mM NaCl
10 mM MgCl ₂	1 mM ZnCl ₂

[T7 RNAポリメラーゼの調製]

T7 RNAポリメラーゼは市販されているが、保存液中における酵素濃度が低いために、転写反応において酵素濃度を高くすることが難しく、そのために高い転写効率を得ることは難しい。さらに、高価なものであるため経済性を考えて、本研究ではT7 RNAポリメラーゼの調製を行った。T7 RNAポリメラーゼの大腸菌による大量発現法および精製法は確立されており、本研究では、その報告で使用されている大腸菌株およびプラスミドを用い、報告されている調製法に従った。大腸菌の培養の際には、必要に応じてクリーンベンチを使用し、滅菌操作をした。

始めに、pAR1219 (*lacUV5*プロモーターの下流にT7 RNAポリメラーゼの遺伝子をもつプラスミド) を導入した大腸菌 BL21のovernight cultureからM9 TB培地に植菌し、37°Cで培養した。OD₆₀₀が0.4~0.6になった時に0.5 mMになるようにIPTGを加えることによって発現を誘導し、4時間37°Cで培養した。培養後、冷却遠心 (10k \times g、4°C、10分) し、上清を除去することにより集菌した。さらに、洗浄用緩衝液に懸濁した後、冷却遠心 (10k \times g、4°C、10分) した。さらにもう一度洗浄した後、-80°Cに保存した。

M9 TB培地 1リットルの組成

TB (trypton 10 g、NaCl 5 g)	878 ml
10 \times M9 salts *	100 ml
20 % glucose	20 ml
1 M MgSO ₄	1 ml
50 mg/ml ampicillin	1 ml

TB、10 \times M9 salts、1 M MgSO₄ はそれぞれオートクレーブ (120°C、20分) により滅菌、20 % glucoseおよび50 mg/ml ampicillinはフィルター滅菌した。

*) 10 \times M9 saltsはNa₂HPO₄ \cdot 7H₂O 64 g、KH₂PO₄ 15 g、NaCl 2.5 g、NH₄Cl 5 gを純水に溶かし、1リットルにして調製した。

洗浄用緩衝液の組成

20 mM Tris-HCl (pH 8.1)
20 mM NaCl
2 mM EDTA-Na ₃

つぎに、溶菌およびT7 RNAポリメラーゼの精製について述べる。これからの操作はすべて氷上あるいは低温室(0~4°C)で行った。上記の1リットル培養により約8gの菌体を得られるが、これに24mlの冷やした緩衝液LBを加えてよく懸濁した後、1.5mg/mlのリゾチムを6ml加えて20分間ゆっくり攪拌することにより溶菌した。また同時に、プロテアーゼインヒビターとして20mg/mlのPMSFを50μl、10mg/mlのbacitracinを30μl、0.1Mのbenzamidineを30μl加えることによりタンパク質の分解を抑えた。この溶菌操作により試料の粘度が増す。さらに、0.8% sodium deoxycholateを2.5ml加えて20分間ゆっくり攪拌した後、超音波(15秒間を4回)により完全に溶菌した(粘性が減ったことを確認)。さらに、2Mの硫酸アンモニウムを5ml加え、緩衝液LBを加えて全量を50mlとした後、ゆっくり攪拌しながら10% Polymin P (pH 8)を5ml加えて、20分間ゆっくり攪拌した。次に、遠心(39k×g、15分)して上清を回収し、さらに、その上清に0.82等容量の飽和硫酸アンモニウム(pH 7)を加えて15分間ゆっくり攪拌した後、遠心(12k×g、10分)して沈殿を回収した。得られた沈殿に15mlの緩衝液C(100mM NaClを含む)を加えて溶解し、外液として1lの緩衝液C(100mM NaClを含む)に一晩透析した。透析後、遠心(12k×g、10分)して上清を回収し、等量の緩衝液C(NaClなし)を加えた後、陽イオン交換クロマトグラフィー(樹脂としてS-Sepharose FFを使用)によって精製した。得られた分画のうちT7 RNAポリメラーゼが含まれている分画をSDS-PAGEによって調べ、その分画を回収して15時間以上の透析(外液:10mM NaClを含む500mlの緩衝液C)を二回行った。透析後、T7 RNAポリメラーゼが白濁するので、これを遠心(12k×g、5分)して回収し、10mlの緩衝液C(100mM NaClを含む)に溶かした。最後に、保存液に置換するために透析(外液:50%グリセロールおよび100mM NaClを含む900mlの緩衝液C)し、これを-20°Cで保存した。

緩衝液LBの組成

50 mM Tris-HCl (pH 8.1)
20 mM NaCl
2 mM EDTA-Na₂
1 mM dithiothreitol (DTT)

緩衝液Cの組成

20 mM sodium phosphate (pH 7.7)
1 mM EDTA-Na₂
1 mM DTT
5% glycerol

[陽イオン交換カラムクロマトグラフィー (S-Sepharose FF)]

本研究ではT7 RNAポリメラーゼの精製の際にS-Sepharose FF (Pharmacia 社製)を用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。カラムサイズは内径17mm、高さ115mmで、容量は約25mlとした。始めに、S-Sepharose FFをスラリーの状態に緩衝液を

置換した後、2~3回デカンテーションし、これをカラムに充填した。次に、流速を1分に3~4滴とした後、緩衝液C(50mM NaClを含む)を一晩流すことによってカラムの平衡化を行った。さらに、試料をカラムにチャージした後、カラム容量の4倍量の緩衝液C(50mM NaClを含む)で洗浄し、緩衝液C(200mM NaClを含む)で溶出した。これをフラクションコレクターを用いて約2~3mlずつ採取した。

[SDS-PAGE]

SDS-PAGEはタンパク質の分子量の解析および純度の分析などに広く利用される方法であり、本研究ではT7 RNAポリメラーゼのカラム分画を調べる際に用いた。陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)はタンパク質に高い親和性を示し、大量に結合して変性を引き起こす。よって結合したSDSの電荷によって泳動が起こり、分子量によって分離される。ゲルはミニスラブゲルを使用し、二層からなるゲルの分離用ゲル(本研究では100kDaのT7 RNAポリメラーゼを分析するため、アクリルアミド濃度を10%とした)を固めた後、スタッキング用ゲルを重層した。試料は1/4容量の5×SDSローディング緩衝液と混合して100°Cで3分間加熱することにより変性させた後、予め30分間予備泳動したゲルにチャージした。泳動用緩衝液にはTris-glycine緩衝液を用い、40mA定電流で、BPBが流れきる直前まで泳動した。さらに、泳動したゲルを染色液で約20分染色し、脱色液で約30分脱染してT7 RNAポリメラーゼのバンドを確認した。

分離用ゲル(10ml)の組成

30% acrylamide (29:1) 3.3 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml
10% SDS 0.1 ml
H₂O 4 ml
10% APS 0.1 ml
TEMED 4 μl

スタッキング用ゲル(3ml)の組成

30% acrylamide (29:1) 0.5 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml
10% SDS 0.1 ml
H₂O 4 ml
10% APS 0.1 ml
TEMED 4 μl

5×SDSローディング緩衝液の組成

250 mM Tris-HCl (pH 6.8)
500 mM DTT
10% SDS
0.1% BPB
10% glycerol

5×Tris-glycine緩衝液(100ml)の組成

Tris 1.51 g
glycine 9.4 g
SDS 0.5 g

染色液(1リットル)の組成

coomassie brilliant blue 2.5 g
methanol 450 ml
glycerol 90 ml
acetic acid 10 ml

脱染液(1リットル)の組成

methanol 300 ml
acetic acid 100 ml

[切断反応実験]

リボザイムの酵素学的特性を調べるため切断反応の実験を様々な条件で行ったが、基本的な反応条件としては、5'末端標識した基質 (1 μMあるいは0.1 μM) および酵素部分 (1 μM) を50 mM Tris-HCl (pH8) に溶解し、一度変性させるために90°Cで3分間熱した後、アニールするために37°Cまで徐冷した。さらに、10 mMになるように MgCl₂ を加え、反応を開始した。反応は37°Cのエアインキュベーターで行い、時間を計測し、その時間ごとに一部を採取して、2倍量の反応停止液 (40 mM EDTA, 9 M Urea) に加えて反応を止めた。さらに、これをハンマーヘッド型リボザイムでは24%変性PAGEにより、未反応の基質 (12 mer) と切断産物 (7 mer) との分離を行い、HDVリボザイムではPEI-celluloseのTLCにより分離した (8 merとシチジン-2',3'環状リン酸)。電気泳動は2000 Vで約30分行い、さらにゲルをゲル乾燥器によって乾燥した後 (80°Cで3時間)、X線フィルムを用いてオートラジオグラフィを行った。TLCについては、反応後の溶液をスポットした後、一度水で展開することによって反応液中の塩を除き (これを行うことによって美しく展開される)、これをドライヤーで乾かした後1 M LiClで展開し、オートラジオグラフィを行った。最後に、切断効率の定量のためには、イメージングプレートに感光した後、BAS-1000あるいはBAS-2000を用いた。

擬一次反応速度定数 (k_{cat}) を求めるためには、酵素過剰の条件で切断反応を行うことによって反応を一次反応 (S→P) と見なし、次式を用いて最小二乗法のカーブフィッティングを行った (マッキントッシュのカレイダグラフを使用)。

$$\%P = \%P_{\infty} - C \exp(-k_{cat}t)$$

%Pはt分後の切断産物の割合で、Cは %P_∞ - %P₀である。

マルチターンオーバーの速度定数 (k_{cat}) およびミカエリス定数 (K_m) を求めるためには、基質過剰の条件で基質濃度を5種類変えて切断反応を行った (S+E SE→P+Eという反応になり、 $K_m = [E][S] / [ES]$, $v = V_{max}[S]_0 / ([S]_0 + K_m)$ と表せる)。まず、各基質濃度[S]において切断産物の割合 (%P) を時間 (t) に対してプロットし、t=0における接線より初速度 (V_0) を求めた。これをEadie-Hofsteeプロットすることにより、 $V_0/[S]$ 対 V_0 はほぼ直線 (次式で表せる) になり、最小二乗法により直線を引くとその傾きから K_m が求まり、y切片から最大速度 V_{max} が求まる。

$$-V_0 = (V_0/[S]) + V_{max}, \quad k_{cat} = V_{max}/[E_T]$$

[E_T]は酵素濃度である。

[CD測定]

核酸は円二色性を示し、構造変化にともなって円二色性は変わるので、CDスペクトルの変化を解析することによって核酸の構造変化を調べることができる。本研究では温度変化にともなうCDスペクトルの変化 (実際には265 nmにおける楕円率の変化) をモニ

ターすることによって、温度変化にともなう構造変化を調べ、熱融解温度 (T_m) を求めた。また、Mg²⁺滴定の実験を行った。Mg²⁺を加えることによって起こる構造変化をCDスペクトルの変化をモニターすることによって調べ、Mg²⁺結合部位の数およびMg²⁺結合定数を求めた。

まず、測定試料として100 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 7.5) にリボザイムを溶かし、アニーリングを行った。試料は、光路長 10 mmのセルを使用するときは3 ml、光路長 1 mmのセルを使用するときは0.3 mlとした。試料の入ったセルをセルホルダーに入れ、約5分間待つことによって定常状態にした後、測定を行った。また、同条件でセル内に緩衝液だけを入れて測定することにより、緩衝液のベースライン補正を行った。ベースライン補正を行った後、フィルターをかけることによりノイズリダクションを行った。測定は、基本的にバンド幅 1 nm、感度 50 mdeg、レスポンス 4秒、波長レンジ 200-320 nm、ステップ分解能 0.1 nm/data、スキャンスピード 10 nm/min、積算回数 4回とし、約40分の測定となった。

[CD熱融解曲線の測定]

CD熱融解曲線の測定には、日本分光社製の温度コントローラーシステムと温度スキヤニングプログラムを使用した。試料が1 μMの時は、光路長 10 mmのセルを使用し、10 μMの時は、1 mm厚のセルを使用した。測定は、温度レンジ 5-80°C、ステップ分解能 0.1°C、測定波長 265 nm (ほぼ極大点)、温度スロープ 50°C/hrとした。測定後、ベースライン補正およびノイズリダクションを行った。T_mを求めるためには、一次微分を行い、その微分曲線の極小点の温度を求めた。

[CDのMg²⁺滴定実験]

Mg²⁺滴定実験は5°Cで行い、1 mm厚のセル (液量 0.3 ml) を使用した。滴定するMgCl₂ は0.5 mMから最終的に約220 mMになるまで加え、試料の濃度変化を5%以下に抑えるために、滴定する原液のMgCl₂濃度は100 mM、1 M、4 Mとした。CDスペクトルを測定後、リボザイムを含まない試料について同じ条件で測定し、ベースライン補正した。さらに、滴定による濃度変化を計算して補正し、265 nmにおける楕円率の変化をモニターした。これからMg²⁺濃度 ([Mg²⁺]) に対して265 nmにおける楕円率のMg²⁺による変化の割合 (F: 変化の最大値を1とした) をプロットした後、Hillプロットを行った。リボザイム (R) とMg²⁺イオンとの相互作用に中間体が存在しないと仮定すると、



という反応式で表すことができ、この場合の結合定数 (k_s) は

$$k_s = [RMg_n^{2+}] / ([R][Mg^{2+}]^n)$$

で表される。この式を対数で表し、Fがn個のMg²⁺が結合したリボザイムの割合 ($[RMg_n^{2+}] / ([R] + [RMg_n^{2+}])$) に相当すると考えると、

$$\log(F/(1-F)) = \log k_s + n \log [Mg^{2+}]$$

となり、log [Mg²⁺]に対してlog (F/(1-F))をプロットすることにより、その傾きからヒル係数nと切片よりlog k_sが求められた。

[NMR測定]

NMRは生体分子の構造を調べる際に有効な手段となる。本研究では、イミノプロトンシグナルの帰属を行った。まず、リボザイムを10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5)、100 mM NaClの溶液 (5% D₂O) に溶かし、濃度を1 mMとした (液量180 μl、予め15%過酸化水素により処理したマイクロチューブを使用)。標識したリボザイムについては、同液に濃度が0.2 mMになるように溶解した。NMRはBruker社のAM-400およびAMX-500を用いて、5-60°Cの間で測定した。¹Hのケミカルシフトは内部標準物質としてDSSを用いて決めた。¹⁵Nのケミカルシフトは、外部標準物質として飽和NH₄Clのシグナルを27.34 ppmとして決めた。

1D-NOEの実験では、照射強度60 dB below 5 W、照射時間1 sで、16 K pointsのFIDを測定した。¹Hのスペクトル幅は30 ppmとした。10 Hzの指数関数的減衰関数を乗じた後、フーリエ変換した。2D-NOESYの実験は、States-TPPI法による位相敏感モードで、2 K pointsのFIDを256個測定した。積算回数は704回であった。両方向に90度位相シフトしたsin関数を乗じ、F1方向については2倍のゼロ付加を行った後、フーリエ変換した。混合時間は150 msであった。¹⁵Nのデカップリングは、90度パルス幅が250 μsの強度でgarp系列によって行った。1Dおよび2DのHMQCの実験は、J_{HN}の展開時間を4 msとして行った。2D-HMQCでは、4 K pointsのFIDを512個測定した。積算回数は64回であった。¹⁵N(F1)のスペクトル幅は100 ppmとした。両方向に90度位相シフトしたsin関数を乗じ、F1方向については2倍のゼロ付加を行った後、フーリエ変換した。以上の測定において¹Hのパルスはすべて待ち時間50 μsのjump-and-returnパルスを用いた。

[¹⁵N-NTPの調製]

¹⁵NH₄Clを窒素源として培養した大腸菌 (300 g、120リットル培養分) をフェノール処理およびエタノール沈殿することにより、核酸を抽出した。これを500 mlの1M NaCl水溶液に溶解した後、7k rpm. で30分遠心することにより、rRNAを沈殿させることにより分画した (これをもう一度繰り返した、上清にはtRNAやDNAが溶けている)。次に、100%エタノールでリンスした後、乾燥し、30 mlのP1緩衝液 (50 mM酢酸ナトリウム、100 mM塩化亜鉛、pH 5.5) および100 μgのヌクレアーゼP1を加えて37°Cで一晩反応した。PEI-celluloseのTLCを用いてrRNAがモノマーまで分解されていることを確認し、90°Cで5分間加熱した。さらに、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (Dowex AG-1×4、カラムサイズ1.6×50 cm、流速1ml/min、溶出液A(0.01N HCl)で反応液を2倍希釈してチャージした後、溶出液A 400 mlおよび溶出液B(0.01N HCl、1M NaCl) 200 mlによる濃度勾配による溶出) により、A、G、U、Cを分離し、これをDEAE-Sephadex A-25により脱塩した (試料を20 mM TEAB溶液(A)で10倍希釈してカラムにチャージした後、溶液Aでカラムの十倍量洗う。2M TEAB溶液で溶出した後、エバポレートすることによりTEABを除く)。最後に酵素を用いてNMPをNTPにした後 (反応液5 ml、80 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM KCl、20 mM MgCl₂、1 mM DTT、20 μmol 各ヌクレオチド、50 μmol posphoenol pyrvate、0.2 μmol ATP、25 units pyruvate kinase、0.4 units nucleoside

monophosphate kinase for U、0.2 units guanylate kinase for G、20 units adenylate kinase for A、40 units adenylate kinase for A、37°C、一晩) TLCで確認してエタノール沈殿を行った。

[過ヨウ素酸酸化]

3.4 nmolのRNAを水45 μlに溶かし、0.1 M 過ヨウ素酸を2 μl加えて、暗所で0°C、40分反応した。これに、1 Mラムノースを0.5 μl加えて0°C、30分反応した後、2 Mリジン塩酸塩(pH 9)を47.5 μl加えて40°C、90分反応した。さらに、エタノール沈殿、BAP処理、フェノールクロロホルム処理を行い、最後にエタノール沈殿をして乾燥した。

参考文献

- Barinaga, M. (1993) *Science* **262**, 1512-1514.
- Bassi, G.S., Mollegaard, N.-E., Murchie, A.I.H., von Kitzing, E., & Lilley, D.M.J. (1995) *Structural biology* **2**, 45-55.
- Batey, R.T., Inada, M., Kujawinski, E., Puglisi, J.D., & Williamson, J.R. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4515-4523.
- Beaudry, A.A. & Joyce, G.F. (1992) *Science* **257**, 635-641.
- Been, M.D., Perrotta, A.T., & Rosenstein, S.P. (1992) *Biochemistry* **31**, 11843-11852.
- Been, M.D. & Perrotta, A.T. (1995) *RNA* **1**, 1061-1070.
- Belinsky, M. & Dinter-Gottlieb, G. (1991) *Nucleic Acid Res.* **19**, 559-564.
- Belinsky, M.G., Britton, E., & Dinter-Gottlieb, G. (1993) *FASEB J.* **7**, 130-136.
- Benseler, F., Fu, D.J., Ludwig, J., & McLaughlin, L.W. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8483-8484.
- Branch, A.D. & Robertson, H.D. (1984) *Science* **223**, 450-455.
- Branch, A. & Robertson, H.D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 10163-10167.
- Bratty, J., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Cedergren, R. (1993) *Biochimica et Biophysica Acta* **1216**, 345-359.
- Brown, T., Hunter, W.N., Kneale, G. & Kennard, O. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2402-2406.
- Brown, T., Leonard, G.A., Booth, E.D. & Chambers, J. (1989) *J. Mol. Biol.*, **207**, 455-457.
- Buzayan, J.M., Van Tol, H., Feldstein, P.A., & Bruening, G. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 4447-4451.
- Carbonnaux, C., van der Marel, G.A., van Boom J.H., Guschlbauer, W. & Fazakerley, G.V. (1991) *Biochemistry*, **30**, 5449-5458.
- Cazenave, C. & Uhlenbeck, O.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6972-6976.
- Cech, T.R., Zang, A.J., & Grabowski, P.J. (1981) *Cell* **27**, 487-496.
- Celander, D.W. & Cech, T.R. (1991) *Science* **251**, 401-407.
- Cheng, J.W., Chou, S.H. & Reid, B.R. (1992) *J. Mol. Biol.*, **228**, 1037-1041.
- Chou, S.H., Cheng, J.W. & Reid, B.R. (1992) *J. Mol. Biol.*, **228**, 138-155.
- Dahm, S.C. & Uhlenbeck, O.C. (1991) *Biochemistry* **30**, 9464-9469.
- Dahm, S.C., Derrick, W.B., & Uhlenbeck, O.C. (1993) *Biochemistry* **32**, 13040-13045.
- Davanloo, P., Rosenburg, A.H., Dunn, J.J., & Studier, F.W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 2035-2039.
- Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) *Nature* **346**, 818-822.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, 263-292.
- Forster, A.C. & Symons, R.H. (1987) *Cell* **49**, 211-220.
- Forster, A.C., Davis, C., Hutchins, C.J., & Symons, R.H. (1990) *Methods in Enzymol.* **181**, 583-607.
- Fu, D.J. & McLaughlin, L.W. (1992A) *Biochemistry* **31**, 10941-10949.
- Fu, D.J. & McLaughlin, L.W. (1992B) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3985-3989.
- Fu, D.J., Rajur, S.B., & McLaughlin, L.W. (1993) *Biochemistry* **32**, 10629-10937.
- Gao, X. & Patel, D.J. (1988) *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5178-5182.
- Greene, K.L., Jones, R.L., Li, Y., Robinson, H., Wang, A.H.J., Zon, G. & Wilson, W.D. (1994) *Biochemistry*, **33**, 1053-1062.
- Grodberg, J. & Dunn, J.J. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 1245-1253.
- Guerrior-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., & Altman, S. (1983) *Cell* **35**, 849-857.
- Guo, H.C.T., De Abreu, D.M., Tillier, E.R.M., Saville, B.J., Olive, J.E., & Collins, R.A. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 351-361.
- Hampel, A. & Triz, R. (1989) *Biochemistry* **28**, 4929-4933.
- Hendry, P., McCall, M.J., Santiago, F.S., & Jennings, P.A. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 3922-3927.
- Hendry, P. & McCall, M.J. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 3928-3936.
- Hertel, K.J., Pardi, A., Uhlenbeck, O.C., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W.L., Hodgson, R., & Symons, R.H. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3252.
- Heus, H.A. & Pardi, A. (1991A) *Science*, **253**, 191-194.
- Heus, H.A. & Pardi, A. (1991B) *J. Mol. Biol.*, **217**, 113-124.
- Heus, H.A., Uhlenbeck, O.C., & Pardi, A. (1991) *Nucleic Acids Res.* **18**, 1103-1108.
- Hines, J.V., Landry, S.M., Varani, G., & Tinoco Jr., I. (1993) *J. Am. Chem.*

- Soc.* **116**, 5823-5831.
- Hirao, I., Kawai, G., Yoshizawa, S., Nishimura, Y., Ishido, Y., Watanabe, K. & Miura, K. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 576-582.
- Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., & Ohtsuka, E. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 6131-6148.
- Jeoung, Y.-H., Kumar, P.K.R., Suh, Y.-A., Taira, K., & Nishikawa, S. (1994) *Nucleic Acid Res.* **22**, 3722-3727.
- Johnston, P.D. & Redfield, A.G. (1981) *Biochemistry* **20**, 1147-1156.
- Joyce, G.F. (1989) *Nature* **338**, 217-224.
- Joyce, G.F. (1994) *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 331-336.
- Kan, L.S., Chandrasegaran, S., Pulford, S.M. & Miller, P.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4263-4265.
- Katahira, M., Sato, H., Mishima, K., Uesugi, S. & Fujii, S. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5418-5424.
- Katahira, M., Kanagawa, M. & Uesugi, S. (1994A) *Nucleosides and Nucleotides*, **13**, 1507-1515.
- Katahira, M., Kanagawa, M., Sato, H., Uesugi, S., Fujii, S., Kohno, T., & Maeda, T. (1994B) *Nucleic Acids Res.* **22**, 2752-2759.
- Katahira, M., Saeki, J., Kanagawa, M., Nagaoka, M. & Uesugi, S. (1994C) *Nucleosides and Nucleotides*, **15**, 585-598.
- Kawakami, J., Kumar, P.K.R., Suh, Y.-A., Nishikawa, F., Kawakami, K., Taira, K., Ohtsuka, E., & Nishikawa, S. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217**, 29-36.
- Knapp, G. (1989) *Methods in Enzymol.* **180**, 192-212.
- Koizumi, M., Iwai, S., & Ohtsuka, E. (1988) *FEBS Lett.* **228**, 228-230.
- Koizumi, M., Hayase, Y., Iwai, S., Kamiya, H., Inoue, H., & Ohtsuka, E. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 7059-7071.
- Koizumi, M. & Ohtsuka, E. (1991) *Biochemistry* **30**, 5145-5150.
- Koguma, T., Ohkawa, J., Mori, K., Fujita, S., Nishikawa, S., Iwakura, M., & Taira, K. (1995) *Nucleic Acids Symp. Seri. No.34*, 221-222.
- Kubinec, M.G., Culf, A.S., Cho, H., Lee, D.C., Burkham, J., Morimoto, M., Williams, P.G., & Wemmer, D.E. (1996) *J. Biomol. NMR* **7**, 236-246.
- Kuchino, Y. & Nishimura, S. (1989) *Methods in Enzymol.* **180**, 154-163.
- Kumar, P.K.R., Suh, Y.-A., Miyashiro, H., Nishikawa, F., Kawakami, J., Taira, K., & Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acid Res.* **20**, 3919-3924.

- Kumar, P.K.R., Suh, Y.-A., Taira, K., & Nishikawa, S. (1993) *FASEB J.* **7**, 124-129.
- Kumar, P.K.R., Taira, K., & Nishikawa, S. (1994) *Biochemistry* **33**, 583-592.
- Kuo, M.Y.-P., Sharman, L., Dinter-Gottlieb, G., & Taylor, J. (1988) *J. Virol.* **62**, 4439-4444.
- Lai, M.M.C. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 259-286.
- Lee, B.-S., Wu, H.-N., & Huang, T.-H. (1993) *FEBS Lett.* **324**, 296-300.
- Legault, P., Farmer II, B.T., Mueller, L., & Pardi, A. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2203-2204.
- Legault, P. & Pardi, A. (1994) *J. Magn. Reson.* **B103**, 82-86.
- Legault, P., Jucker, F.M., & Pardi, A. (1995) *FEBS Lett.* **362**, 156-160.
- Li, Y., Zon, G. & Wilson, W.D. (1991A) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 26-30.
- Li, Y., Zon, G. & Wilson, W.D. (1991B) *Biochemistry*, **30**, 7566-7572.
- Long, D.M. & Uhlenbeck, O.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6977-6981.
- Macnaughton, T.B., Wang, Y.-J., & Lai, M.M.C. (1993) *J. Virol.* **67**, 2228-2234.
- Maltseva, T., Sandstrom, A., Ivanova, I.M., Sergeev, D.S., Zarytova, V.F. & Chattopadhyaya, L. (1993) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **26**, 173-236.
- Marion, D., Ikura, F., Tschudin, R., & Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* **85**, 393-399.
- Maskos, K., Gunn, B.M., LeBlanc, D.A. & Morden, K.M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 3583-3595.
- McCall, M.J., Hendry, P., & Jennings, P.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5710-5714.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783-8798.
- Milligan, J.F. & Uhlenbeck, O.C. (1989) *Methods in Enzymol.* **180**, 51-62.
- Nikonowicz, E.P. & Pardi, A. (1990) *Nature* **355**, 184-186.
- Nikonowicz, E.P. & Pardi, A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9202-9203.
- Nikonowicz, E.P., Sirr, A., Legault, P., Jucker, F.M., Baer, L.M. & Pardi, A. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4507-4513.
- Nikonowicz, E.P. & Pardi, A. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 1141-1156.
- Noller, H.F., Hoffarth, V., & Zimniak, L. (1992) *Science* **256**, 1416-1419.

- Odai, O., Hiroaki, H., Sakata, T., Tanaka, T., & Uesugi, S. (1990A) *FEBS Lett.* **267**, 150-152.
- Odai, O., Kodama, H., Hiroaki, H., Sakata, T., Tanaka, T., & Uesugi, S. (1990B) *Nucleic Acids Res.* **18**, 5955-5960.
- Odai, O., Hiroaki, H., Tanaka, T., & Uesugi, S. (1994) *Nucleosides and Nucleotides* **13**, 1569-1579.
- Olsen, D.B., Benseler, F., Aurup, H., Pieken, W.A., & Eckstein, F. (1991) *Biochemistry* **30**, 9735-9741.
- Orita, M., Nishikawa, F., Shimayama, T., Taira, K., Endo, Y. & Nishikawa, S. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5670-5678.
- Orita, M., Vinayak, R., Andrus, A., Warashina, M., Chiba, A., Kaniwa, H., Nishikawa, F., Nishikawa, S., & Taira, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9447-9454.
- Otting, G., Grutter, R., Leupin, W., Gait, M.J., & Wuthrich, K. (1987) *Eur. J. Biochem.* **116**, 215-220.
- Pan, T. & Uhlenbeck, O.C. (1992) *Nature* **358**, 560-563.
- Paoletta, G., Sproat, B.S., & Lamond, A.L. (1992) *EMBO J.* **11**, 1913-1919.
- Pease, A.C. & Wemmer, D.E. (1990) *Biochemistry* **29**, 9039-9046.
- Perreault, J.P., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K.K., & Cedergren, R. (1990) *Nature* **344**, 565-567.
- Perreault, J.P., Labuda, D., Usman, N., Yang, J.H., & Cedergren, R. (1991) *Biochemistry* **30**, 4020-4025.
- Perrotta, A.T. & Been, M.D. (1991) *Nature* **350**, 434-436.
- Perrotta, A.T. & Been, M.D. (1992) *Biochemistry* **31**, 16-21.
- Perrotta, A.T. & Been, M.D. (1993) *Nucleic Acid Res.* **21**, 3959-3965.
- Perrotta, A.T., Rosenstein, S.P., & Been, M.D. (1993) *Prog. Clin. Biol. Res.* **382**, 69-77.
- Pieken, W.A., Olsen, D.B., Benseler, F., Aurup, H., & Eckstein, F. (1991) *Science* **253**, 314-317.
- Pley, H.W., Flaherty, K.M., & McKay, D.B. (1994) *Nature* **372**, 68-74.
- Prive, V.I., Heinemann, U., Chandrasegaran, S., Kan, L.S., Kopka, M.L. & Dickerson, R.E. (1987) *Science*, **238**, 498-504.
- Puttaraju, M., Perrotta, A.T., & Been, M.D. (1993) *Nucleic Acid Res.* **21**, 4253-4258.
- Robertson, D.L. & Joyce, G.F. (1990) *Nature* **344**, 467-468.

- Rogers, J., Chang, A.H., von Ahsen, U., Schroeder, R., & Davis, J. (1996) *J. Mol. Biol.* **259**, 916-925.
- Rosenstein, S.P. & Been, M.D. (1990) *Biochemistry* **29**, 8011-8016.
- Rosenstein, S.P. & Been, M.D. (1991) *Nucleic Acid Res.* **19**, 5409-5416.
- Ruffner, D.E. & Uhlenbeck, O.C. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 6025-6029.
- Ruffner, D.E., Dahm, S.C., & Uhlenbeck, O.C. (1990) *Biochemistry* **29**, 10695-10702.
- SantaLucia, J., Jr., Kierzek, R. & Turner, D.H. (1992) *Science*, **256**, 217-219.
- SantaLucia, J., Jr. & Turner, D. (1993) *Biochemistry*, **32**, 12612-12623.
- Sarma, R.H., Sarma, M.H., Rein, R., Shibata, M., Setlik, R.S., Ornstein, R.L., Latif Kazim, A., Cairo, A., & Tomasi, T.B. (1995) *FEBS Lett.* **357**, 317-323.
- Sawata, S., Shimayama, T., Komiyama, M., Kumar, P.K.R., Nishikawa, S., & Taira, K. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 5656-5660.
- Sawata, S., Komiyama, M., & Taira, K. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2357-2358.
- Scott, W.G., Finch, J.T., & Klug, A. (1995) *Cell* **81**, 991-1002.
- Shaka, A.J., Barker, P.B., & Freeman, R. (1985) *J. Magn. Reson.* **64**, 547-552.
- Sharmeen, L., kuo, M.Y.P., Dinter-Gottlieb, G., & Taylor, J. (1988) *J. Virol.* **62**, 2674-2679.
- Simorre, J.-P., Zimmermann, G.R., Mueller, L., & Pardi, A. (1996) *J. Biomol. NMR* **7**, 153-156.
- Slim, G. & Gait, M.J. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 605-609.
- Smith, J.B. & Dinter-Gottlieb, G. (1991) *Nucleic Acid Res.* **19**, 1285-1289.
- Smith, J.B., Gottlieb, P.A., & Dinter-Gottlieb, G. (1992) *Biochemistry* **31**, 9629-9635.
- Suh, Y.-A., Kumar, P.K.R., Nishikawa, F., Kayano, E., Nakai, S., Odai, O., Uesugi, S., Taira, K., & Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acid Res.* **20**, 747-753.
- Suh, Y.-A., Kumar, P.K.R., Taira, K., & Nishikawa, S. (1993) *Nucleic Acid Res.* **21**, 3277-3280.
- Sullenger, B.A. & Cech, T.R. (1993) *Science* **262**, 1566-1569.
- Symons, R.H. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 641-671.

- Symons, R.H. (1994) *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 322-330.
- Taira, K., Uebayashi, M., Maeda, H., & Furukawa, K. (1990) *Protein Engng.* **3**, 691-701.
- Tanner, N.K., Schaff, S., Thill, G., Petit-Koskas, E., Crain-Denoyelle, A.-M., & Westhof, E. (1994) *Current Biology* **4**, 488-498.
- Thill, G., Blumenfeld, M., Lescure, F., & Vasseur, M. (1991) *Nucleic Acid Res.* **19**, 6519-6525.
- Thill, G., Vasseur, M., & Tanner, N.K. (1993) *Biochemistry* **32**, 4254-4262.
- Thomson, J.B., Tuschl, T., & Eckstein, F. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 5600-5603.
- Tuschl, T., Ng, M.M.P., Pieken, W., Benseler, F., & Eckstein, F. (1993) *Biochemistry* **32**, 11658-11668.
- Tuschl, T. & Eckstein, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6991-6994.
- Uesugi, S., Odai, O., Kodama, H., Hiroaki, H., Sakata, T., & Tanaka, T. (1992) *Structure and Function* **2**, 143-158.
- Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nature* **328**, 596-600.
- van der Veen, R., Arnberg, A.C., van der horst, G., Bonen, L., Tabak, H.F., & Grivell, L.A. (1986) *Cell* **44**, 225-234.
- Watson, N., Gurevitz, M., Ford, J., & Apirion, D. (1984) *J. Mol. Biol.* **172**, 301-323.
- Webster, G.D., Sanderson, M.R., Skelly, J.V., Neidle, S., Swann, P.F., Li, B.F., & Tickle, I.J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6693-6697.
- Williams, D.M., Pieken, W.A., & Eckstein, F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 918-921.
- Willick, G.E. & Kay, C.M. (1971) *Biochemistry* **10**, 2216-2222.
- Wimberly, B., Varani, G. & Tinoco, I., Jr. (1993) *Biochemistry*, **32**, 1078-1087.
- Wu, H.-N., Lin, Y.-J., Lin, F.-P., Makino, S., Chang, M.-F., & Lai, M.M.C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1831-1835.
- Wu, H.-N. & Lai, M.M.C. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5575-5579.
- Wu, H.-N. & Huang, Z.-S. (1992) *Nucleic Acid Res.* **20**, 5937-5941.
- Wu, H.-N., Wang, Y.-J., Hung, C.-F., Lee, H.-J., & Lai, M.M.C. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 233-245.
- Wu, H.-N., Lee, J.-Y., Huang, H.-W., Huang, Y.-S., & Hsueh, T.-G. (1993)

- Nucleic Acid Res.* **21**, 4193-4199.
- Yang, J.H., Perreault, J.P., Labuda, D., Usman, N., & Cedergren, R. (1990) *Biochemistry* **29**, 11156-11160.
- Yang, J.H., Usman, N., Chartrand, P., & Cedergren, R. (1992) *Biochemistry* **31**, 5005-5009.
- Zawadzki, V. & Gross, H.J. (1991) *Nucleic Acid Res.* **19**, 1948.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始暖かく見守っていただき、御指導をいただきました上杉晴一教授に深く感謝いたします。研究室の立ち上げなどで本当に忙しい中、私のために時間をさいていただき、有難うございました。常に適切な御助言をいただき、御指導をいただきました片平正人助教授に感謝いたします。エネルギーシミュレーションに研究を進めていく片平先生を見習いたいと思います。常に熱心な御指導をいただき、公私にわたり暖かい激励をいただきました栗原靖之助手に感謝いたします。栗原先生には、研究内容が全く違うにも関わらず、研究のことから生活のことまで、惜しみない御力を貸していただき、有難うございました。

安定同位体標識を用いたNMRによる研究を行うにあたり、様々な便宜をはかって下さいました東京大学理学部の横山茂之教授、東京大学工学部の渡辺公綱教授に深く感謝いたします。安定同位体標識およびNMR解析を行うにあたり、非常に熱心な御指導をいただき、暖かく励まして下さいました東京大学工学部の河合剛太助手に感謝いたします。河合先生には、本当に様々な局面で適切な御助言をいただき、感謝しております。安定同位体標識を行うにあたり、様々な御助言をいただきました東京大学理学部の渡辺暁博士（現 理化学研究所）に感謝いたします。

リボザイムの調製の際に、様々な御助言をいただいた西川諭博士、児玉高志氏、大槻高史氏に感謝します。NMR測定装置を使用させていただいた阿久津秀雄教授、河野俊之博士に感謝します。バイオイメージアナライザーを使用させていただいた富士写真フィルム株式会社の佐藤茂氏およびバイオイメージング機器システムの皆様に感謝します。廣明秀一博士、折田正弥氏には、様々な助言をいただき、有難うございました。

本研究を行うにあたり、ともに頑張ってくれた野口智明氏、古澤真由美氏、金美希氏、佐々木伸之氏、田中卓氏、桑原知子氏、長岡正司氏、田中陽一郎氏に感謝します。皆さんの御協力のおかげで、私の研究が進みました。有難うございました。また、研究室の立ち上げからともに苦勞をしてきた堀内正隆氏、研究室のレクリエーションの活性化のためにともに頑張った樋渡亜土氏をはじめ上杉・片平研究室の皆さん、有意義な研究生活を送らせていただき、有難うございました。

私が博士課程に在学中、常に暖かく見守り、そして支えてくれた両親、妻、兄弟、息子、そして家族、友人に心から感謝します。皆さんの生活面での御協力のおかげで研究生活を送ることができました。本当に有難うございます。

最後に、私を研究の道に導いて下さいました故宮澤辰雄先生に感謝するとともに御冥福をお祈りします。

