博士（薬　学）　川　上　純　司

学位論文題名

ヒトδ型肝炎ウイルスリボザイムの構造活性相関に関する研究

学位論文内容の要旨

序論

ヒトδ型肝炎ウイルス（HDV）は一本鎖環状RNAを遺伝子に持ち、ローリングサークル様式での複製の際、ゲノム鎖およびアンチゲノム鎖の双方に存在する自己切断活性により1ユニット毎に切り出される。HDVは天然においてヒト細胞中で働くリボザイムとして存在するため、他の起源を有するリボザイムと比較して人体での応用に有利なものである可能性が高い。しかし、このHDVリボザイムは他に知られているリボザイムとは一次あるいは二次構造上に共通性が見出されていない。

本研究ではHDVリボザイムの構造と機能の解明を目的とし、(1) HDVリボザイムの活性な二次構造の確定と、活性発現に関与すると考えられる3箇所の一本鎖領域に存在する塩基の重要性の評価　(2) 分子間反応を触媒するトランス化HDVリボザイムの作成　(3) トランス化HDVリボザイムを利用した切断における速度論的解析　(4) トランス化HDVリボザイムの高機能化　の4項目を中心に、ゲノム鎖由来リボザイム配列を用いて検討を行った。

HDVリボザイムの機能性二次構造の検討

HDVリボザイムの二次構造に関しては、複数のグループよりモデルが提出されているものの何れも決定的な情報を欠いている。著者らのグループでは各二次構造モデルに特有のステム領域に変異を導入し、二次構造を決定する試みを行なっているが、著者は逆に全ての二次構造モデルにおいてほぼ同一の領域が一本鎖として存在することに着目し、それぞれをSingle Stranded Region、すなわちSSrA, B, Cと名付け、塩基置換が活性にどのような影響を与えるかを調べた。

SSrA, Bに関しては、site directed mutagenesisの手法を用いて変異型HDVリボザイムを作成した。その結果、SsrAに存在するG726とSsrBに存在するC763 の2つの残基に関して重要性が示された。共同研究者による金属の配位を調べた実験結果と考え併せ、これら2つの残基は塩基対形成以外の相互

作用、恐らくは金属等との相互作用に関与し、反応のchemical stepに直接的な影響を及ぼす残基であるものと考えられた。

またSSrCの必須残基探索には、*in vitro* selection法を用いた。*in vitro* selection法は数多くの異なる分子の集合体より目的の分子のみを選択し、増幅する手法であるが、著者は簡便な*in vitro* selection法を開発し、重要な残基に変異が導入された不活化変異体を選択した。

その結果、90%以上の活性を失った変異体HDVリボザイム21種が得られたが、この内19種まではU708またはC709に対する変異を含んでおり、この2つの残基の重要性が示唆された。点変異の影響を調べた結果、特にC709の重要性が確認された。

SSrCの機能に関しては、SSrC領域への変異の導入によって分子の構造安定性が変化する現象が観察されたことなどから、著者はSSrCが主に活性中心の構造保持に寄与する領域であると結論した。

著者は以上より得られた結果より各残基の水素結合に対する関与の有無を検討し、二次構造としてBeen等の提出したpseudoknotモデルが妥当であることを示した。

HDVリボザイムによるターゲットRNA鎖の切断

リボザイムを「酵素」として利用するため、著者等はpseudoknotモデルをもとに、分子内反応性のゲノム鎖由来HDVリボザイムを様々な組み合わせで基質鎖と酵素鎖に分割した。その結果、唯一つの分割パターンが有意な切断活性を示すことを明らかにした。

二次反応の条件下では、アンチゲノム鎖由来のトランス化HDVリボザイムによる基質切断の律速段階は、切断生成物のリボザイムからの解離であることが報告されている。そこで、活性中心における切断速度を直接観測することが可能な擬一次反応の条件で実験を行なった。しかし著者の得たデータは通常の擬一次反応の速度論に従わなかったため、活性複合体と不活性複合体の存在を仮定した活性評価系を構築した。この活性評価系を用いることでHDVリボザイムによる基質鎖切断の速度論的解析を行なうことが可能となった。

HDVリボザイムによるRNA鎖切断反応様式の解析

著者等の作成したゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムの切断反応機構を解析する目的で、切断部位にチオリン酸結合を有する基質RNAを合成した。基質切断反応の解析の結果、*pro-R*酸素を硫黄原子に置き換えたチオリン酸化基質は非常に切断を受けにくいという結果を得たが、各基質について求められた速度定数を比較すると、全ての基質について切断の律速段階は変化していないことが明らかとなった。すなわち、切断部位のチオリン酸化

で変化するのは活性複合体の量であり、速度ではないことが示された。この反応の律速段階が求核反応に始まるリン酸ジエステル結合の開裂の段階であるか否かについては、反応速度のpH依存性によって判断した。反応速度はpHに殆ど依存せず、従って律速段階は基質の切断に先立つ、恐らくは活性中心の微細な構造変化であるものと考えられた。

さらに、金属濃度の変化が活性複合体量と反応速度の双方に影響を及ぼすことを確認した。これによって、反応開始時に速やかに起こる活性複合体の形成と触媒反応の律速段階である構造変化という、少なくとも2つの段階に金属が関与していることが明らかとなった。活性複合体の形成には金属イオンとリン酸の酸素原子（特に*pro-R*酸素）が共に関与していることが示されたが、直接の配位であるか否かの結論は得ていない。

分子間反応を触媒するHDVリボザイムの高機能化

著者等の分割形式はBeen等が作成したアンチゲノム鎖由来のトランス型HDVリボザイムと同じものであったが、切断速度は約10^{-2}と遅かった。

ゲノム鎖とアンチゲノム鎖のリボザイム活性に大きな差があるとは考えにくいため、活性への影響が考えられた末端配列を変更したゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムを作成し、切断反応速度を解析した。

その結果、種々の変異体のうちステムIIの塩基対数を増加させたものについて高い切断活性が観測され、アンチゲノム鎖由来のものと同等の値を得ることができた。

高活性化したゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムによる基質切断の律速段階も切断反応に先立つ構造変化である可能性が高く、一層の高機能化の余地を残していると考えられる。

結論

1. ヒトδ型肝炎ウイルス（HDV）ゲノム鎖由来のリボザイムにおいて、pseudoknot型の二次構造が活性構造であることを支持した。
2. 活性中心において切断反応に直接関与すると考えられる一本鎖領域の塩基の重要性を評価し、G726, C763, C709が活性発現に中心的な役割を有している可能性を示した。SSrA, Bは直接の触媒作用に、SSrCは構造保持に関与することが示唆された。
3. HDVゲノム鎖由来のリボザイムを様々に分割し、唯一つの分割様式でのみ有意な切断活性が発現することを示した。またHDVリボザイムによる基質切断反応の活性評価系を構築した。
4. HDVリボザイムによる基質切断には、切断されるリン酸ジエステル結合の*pro-R*酸素原子と、金属イオンが共に要求される。金属イオンは少

なくとも2つの段階で関与し、律速段階は求核攻撃に先立つ金属依存の構造変化であると考えられた。

5. ステムII領域を安定化することで、ゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムの活性を2桁増強することに成功した。高活性化の理由はステムIIの安定化が基質切断の際の律速段階である構造変化を加速することであるが、高活性化した変異体においてもなお律速段階は構造変化である可能性が高く、さらなる高活性化の余地を残しているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　大　塚　栄　子
副　査　教　授　松　田　　彰
副　査　助教授　井　上　英　夫
副　査　助教授　周　東　　智

学位論文題名

ヒトδ型肝炎ウイルスリボザイムの構造活性相関に関する研究

申請者はヒトδ型肝炎ウイルス（HDV）リボザイムの構造活性相関の研究を行って来たが、今回以下のような結果を得た。

HDVは一本鎖環状RNAを遺伝子に持ち、ローリングサークル様式での複製の際、ゲノム鎖およびアンチゲノム鎖の双方に存在する自己切断活性により1ユニット毎に切り出される。HDVは天然においてヒト細胞中で働くリボザイムとして存在するため、他の起源を有するリボザイムと比較して人体での応用に有利なものである可能性が高い。しかし、このHDVリボザイムは他に知られているリボザイムとは一次あるいは二次構造上に共通性が見出されていない。

申請者はまずHDVリボザイムの機能性二次構造について検討した。

HDVリボザイムの二次構造に関しては、複数のグループよりモデルが提出されているものの何れも決定的な情報を欠いている。申請者は全ての二次構造モデルにおいてほぼ同一の領域が一本鎖として存在することに着目し、それぞれをSingle Stranded Region、すなわちSSrA, B, Cと名付

け、塩基置換が活性にどのような影響を与えるかを調べた。SSrA, Bに関しては、site directed mutagenesisの手法を用いて変異型HDVリボザイムを作成した。その結果、SsrAに存在するG726とSsrBに存在するC763 の2つの残基に関して重要性が示された。

またSSrCの必須残基探索には、*in vitro* selection法を用いた。*in vitro* selection法は数多くの異なる分子の集合体より目的の分子のみを選択し、増幅する手法であるが、申請者は簡便な*in vitro* selection法を開発し、重要な残基に変異が導入された不活化変異体を選択した。その結果、90%以上の活性を失った変異体HDVリボザイム21種が得られたが、この内19種まではU708またはC709に対する変異を含んでおり、この2つの残基の重要性が示唆された。点変異の影響を調べた結果、特にC709の重要性が確認された。

次に、リボザイムを「酵素」として利用するため、pseudoknotモデルをもとに、分子内反応性のゲノム鎖由来HDVリボザイムを様々な組み合わせで基質鎖と酵素鎖に分割した。その結果、唯一つの分割パターンが有意な切断活性を示すことを明らかにした。

さらに、HDVリボザイムによるRNA鎖切断反応様式の解析を行った。切断部位にチオリン酸結合を有する基質RNAを合成し、基質切断反応の解析の結果、*pro-R*酸素を硫黄原子に置き換えたチオリン酸化基質は非常に切断を受けにくいという結果を得たが、各基質について求められた速度定数を比較し、全ての基質について切断の律速段階は変化していないことを明らかとした。

HDVリボザイムによる基質切断には、切断されるリン酸ジエステル結合のpro-R酸素原子と、金属イオンが共に要求されることを示した。更に、金属イオンが少なくとも2つの段階で関与し、律速段階は求核攻撃に先立つ金属依存の構造変化であることを見出した。

また、ステムII領域を安定化することで、ゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムの活性を2桁増強することに成功した。高活性化の理由はステムIIの安定化が基質切断の際の律速段階である構造変化を加速することであるが、高活性化した変異体においてもなお律速段階は構造変化であることを明かにした。

以上の研究は博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。