

## 学位論文題名

## ヘアピン型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

1980年代に触媒的に作用するRNAが発見され、それらは、RNA酵素という意味からリボザイムと呼ばれ、現在では反応様式および必要配列から幾つかに分類されている。この中で、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAの(-)鎖の自己切断活性の中心部位として見いだされたリボザイムとしてヘアピン型リボザイムがある。ヘアピン型リボザイムは50塩基からなり、4つのhelixと2つの大きな内部ループをもつ。特に内部ループの配列は、切断活性に必須であり、このリボザイムの切断活性の本質を担うと考えられている。筆者は、このヘアピン型リボザイムの構造と活性の相関性について研究を行ない、さらに構造に関して得られた知見から、新しいヘアピン型リボザイムを構築したことを報告する。

### 1. ヘアピン型リボザイムのヘアピンループでの分割とリボザイムによるRNAの連結反応

まず、ヘアピン型リボザイム(E50)をヘアピンループ部位で分けても切断活性示すかどうかを調べた。ヘアピンループで(G30-U31の間)E50を2つのフラグメント(E30とE21)に分割し、切断活性を調べた。その結果、天然型よりも若干活性が低下するものの、ヘアピンループでリボザイムを分割できることを明らかにした。

サテライトRNA全鎖長では連結活性が存在しているが、切断活性の最小配列部位(E50)と、ヘアピンループで2つのフラグメントに分けたE30-21が連結活性をもつかどうかは明かではなかった。そこで、これらのリボザイムの連結活性について調べた。その結果、E50とE30-21ともに連結活性を示したが、切断活性の低い2つのフラグメントからなるE30-21の方が、1本鎖のE50よりも高い連結活性をもつことを明らかにした。そこで高い連結活性をもつE30-21によって、基質RNAの3'側フラグメントを長さの異なる別のフラグメントで組換える反応が可能であるかどうかを調べた。その結果、本来の基質の3'側切断断片が切り出され、リボザイムによって異なるRNAフラグメントが連結したRNAが生成され、リボザイムによるRNAの組換え反応の可能性を示した。

## 2. ヘアピン型リボザイムのベント構造の解析

ヘアピン型リボザイムは、2つのステムループドメインからなると考えることができる。各ドメインの内部ループが切断及び連結活性に必須であることより、ヘアピン型リボザイムは折れ曲がった構造（ベント構造）をとっていると考え、以下の実験を行なった。

2つのステム間にバルジが存在すると、バルジアウトする塩基の種類によって、ベントの度合いが異なることがある。そこでそのような影響がないように、塩基部位を含まないリボースの誘導体としてプロバンジオールフォスフェイト（PPL）を合成し、ベントのジャンクション部位と思われるS1とE50の3'末端の間に数を変えて導入した。反応の結果、リンカーを全く含まないものは切断されず、多くのリンカーを含むリボザイムほど高い切断率が確認された。この結果は、ヘアピン型リボザイムの活性な構造がベント構造であることを示している。

## 3. ヒンジ部位での分割—ヘアピン型リボザイムの異なった分割様式

ヘアピン型リボザイムのベント構造のヒンジに相当する部位には、構造的なストレスが生じていると考えられる。そこで、このヒンジ部位でリボザイムを分け、代わりにヒンジの向かい側に相当する部位をリンカーでつなげた分子でも切断活性を示すかどうかを調べた。シチジンリンカーによって連結した3種類の基質RNAを合成し、切断活性を調べたところ、ヒンジ部位でリボザイムを分割したタイプでも切断反応が生じることが明かとなった。しかしながら、ヒンジ部位で本来存在しない塩基対を形成する場合は、切断反応が生じなかった。これは、新たに形成された塩基対によって活性なベント構造を形成できなくなったためであると思われる。

## 4. 新しいヘアピン型リボザイムの構築

ヘアピン型リボザイムがベントしている場合、E30の5'末端とヘアピンループは、3次構造上は接近していると考えられる。そこでE30の3'末端（G30）とヘアピンループを接続し、ヒンジ部位で分断したドメイン変換型ヘアピン型リボザイムを構築した。このとき、2つのドメイン間の距離が重要であると考え、3～18個のシチジンリンカーを導入したRNA（RC<sub>n</sub>、n=3、6、9、12、18）を合成し、E19をあわせて、基質RNAを切断できるかどうか調べた。反応の結果、このドメイン変換型リボザイムは、天然型と同じ部位でS1を切断し、シチジンリンカーの数が多いほど切断活性が高くなることが明かとなった。興味深いことに、9個以上のシチジンリンカーをもつものは、天然型よりも切断のステップ（k<sub>2</sub>）が速いことが明かとなった。この新しいドメイン変換型リボザイムは、天然型と同じ切断活性に必要な配列の傾向を示したことから、ドメイン変換型リボザイムは、活性に必要な高次構造を保存し、天然型と同じ反応機構でRNAの切断を行なう可能性が示された。

## 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

## ヘアピン型リボザイムの構造活性相関に関する研究

申請者はヘアピン型と呼ばれるRNA自己切断酵素（リボザイム）の構造と機能について研究を行って来たが、今回、高次構造と活性との相関を明かにした。

ヘアピン型リボザイムは、4つのhelixと2つの大きな内部ループおよびヘアピンループをもつ。内部ループの配列は、切断活性に必須であり、このリボザイムの切断活性の本質を担うと考えられている。基質となるRNAと塩基対を形成するようにリボザイム側を設計すれば、若干の配列上の制約はあるものの、希望するRNAの切断を行うことが基本的に可能である。申請者は、このヘアピン型リボザイムの構造と活性の相関性について研究を行い、さらに構造に関して得られた知見から、新しいヘアピン型リボザイムを構築した。まず、ヘアピン型リボザイムをヘアピンループ部位で分けても切断活性を示すかどうか調べた。E50のG30-U31間でヘアピン型リボザイムを2つのフラグメント（E30とE21）に分け、2つのフラグメントをアニーリングして切断活性を調べた。その結果、天然型よりも活性は若干低下するものの、切断活性を示すことを明かにした。また、この実験によってこのリボザイムは、予想されていた様なヘアピン構造をとっている可能性が高くなった。

次にサテライトRNAでは確認されている連結活性が、切断活

性の最小配列部位 (E50) とヘアピンループで2つのフラグメントに分けられたE30-21にもそなわっているかどうかを調べた。その結果、E50、E30-21ともに連結活性を有し、さらに2つのフラグメントからなるE30-20の方がE50よりも高い連結活性を示すことを明かにした。そこで高い連結活性をもつE30-21について、2種類の基質が存在する場合切断反応後に交差の連結反応が生じるかどうか、また、基質のRNAの3'側フラグメントを長さの異なる別のフラグメントで組換える反応が、リボザイムで可能であるかどうかを、連結活性の高いリボザイムについて調べた。その結果、交差、組換え反応ともに目的の生成物が得られた。

次に申請者はヘアピン型リボザイムのベント構造の解析を行うために塩基部位を含まないリボースの類縁体としてプロパンジオールフォスフェイト (PPL)、リンカーとして、S1とE50の3'末端の間に数を変えて導入した。その結果、リンカーを全く含まないものは切断されず、4個以上のリンカーを含むものから顕著な切断が確認され、リンカーの数が多いほうが高い切断活性を示した。これらの結果は、リボザイムがリンカーの数が増すにつれ活性なベント構造をとれるようになったことを反映し、さらには、ヘアピン型リボザイムの活性なコンフォメーションが予想したとおりのベント構造であることを強く示した。

次に、この結果を基に新しいヘアピン型リボザイムの構築を計画した。3次構造を保存するような1次構造上の変換を目的にして、本来E50の5'末端とヘアピンループのG30に接続してヒンジ部位で分断した、ドメイン変換型ヘアピン型リボザイムを構築した。このとき、G30と5'末端のAとの距離が活性発現のためには重要であると考え、3~18個のシチジンリンカーを導入したRNA (RC<sub>n</sub>, n=3, 6, 9, 12, 18) を合成した。このドメイン変換型リボザイム (以下リバースリボザイム) はS1を天然型と同じ部位で切断し、その活性、シチジンリンカーの数が多いほど高くなることが明らかとなった。

ここに得られた新しいドメイン変換型リボザイムは予測された3次構造を保存し、予想以上に高い切断活性を示すことが明らかとなった。ここで得られた結果は、ヘアピン型リボザイムがベント

していることの大きな証拠であり，リボザイムの応用にも役立つ知見である。

以上の研究は博士（薬学）の学位を受けるのに充分値するものと認めた。