

学位論文題名

分子内に DNA・RNA 二本鎖部位を持つ

三種の核酸の溶液中の構造決定

学位論文内容の要旨

RNAとDNAの相補的二本鎖であるDNA・RNA hybrid duplexはDNAの messenger RNA, transfer RNA, ribosomal RNAへの翻訳過程やvirusのRNAをDNAに逆転写するとき生成する。またDNAの複製過程で用いられる岡崎フラグメントもDNA・RNA hybrid duplexであり、RNA鎖の3'側にDNAの伸長が行われていく。このような生化学的重要性からその構造に興味を持たれてきた。また当研究室ではDNA・RNA hybrid duplexを基質特異的に認識し、RNA鎖を切断する大腸菌由来のRNase HI (以下RNase Hと略す)の研究を進めてきた。

5'd(GG)r(agau)d(GAC)3'/5'd(GTCATCTCC)3'(DHD), 5'd(GGAGA)r(UGAC)3'/5'd(GTCATCTCC)3'(DDH), 5'r(ggagaugac)3'/5'GmUmCmd(ATCT)CmCm3'(2Me)のDNA二本鎖またはRNAと2'-O-methyl RNAのhybrid duplexの二本鎖の間にDNA・RNA hybrid duplexを挿入した9塩基対の三種の核酸でRNase Hによる反応を行うと、RNA鎖の切断部位はDNA・RNA hybrid duplexの周辺の変化により変化する。これよりRNase Hは基質となる二本鎖のなんらかの構造パターンを認識するのではないかと予想され、切断パターンの違いから、これら三種の二本鎖核酸は、全く同じ塩基配列を持ちながらも異なる全体構造を取っていることを予測した。本研究では、上記三種の核酸の溶液中の構造をNMRにより解析し、どの様な構造的特徴が観察されるかを比較した。

これら三種の核酸をNMRを用いて構造決定したところ、DDHは三つのうち比較的典型的B型に近く、DHDではA型に近いAとBの中間の構造で、2Meは三つのうちで最も典型的A型に近い構造を持っていることが分かった。構造を詳細に観察すると、二面角においては、DHD, DDHではDNA二本鎖の部分は典型的B型に近い値を示しているのに対し、DNA・RNA hybrid duplexの部分は大きく典型的A型の値に近くなり、分子内で不均一な構造を有していることが観察された。これに対して2Meでは、全体的に典型的A型に近い値を示した。

また三者のらせん構造は接合部によって共通の構造的特徴を表した。局所的な軸に対しての塩基対のずれを表すパラメーター類であるtilt, roll, slide等が

DHD, DDHにおいては5'RNA-3'DNA接合部(HD接合部)、2Meにおいては5'(2'-O-methyl RNA)-3'DNA接合部(mD接合部)のみ値が大きく変化しており、HD, mD接合部でのベント様の構造を示していた。

これと比較して5'DNA-3'RNA接合部(DH接合部)、5'DNA-3'(2'-O-methyl RNA)接合部(Dm接合部)はなめらかならせん構造が保たれていた。これより、DNA残基の5'側にRNA, 2'-O-methyl RNA等の2'位に大きな置換基を持つ残基が存在する場合、らせんの構造に歪みが出来る事が示された。

フラノース環のコンフォメーションでも三者の構造的特徴がはっきりと現れていた。DNA残基のコンフォメーションでは、DHD, DDHのDNA-RNA hybrid duplexの部分のDNA残基はC2'-endoとC3'-endoの中間のコンフォメーションにばらついているのに対し、2MeにおいてはDNA残基は全てC3'-endo付近のコンフォメーションを示し、C4'-exoであるのは14Tのみであった。また、NMRから得られた $J_{1,2'}$, $J_{1,2''}$ の結果もこれを支持した。このことは、DNA-RNA hybrid duplexの部分のDNA残基は、相補鎖側の性質に影響を受けるのみでなく、らせんの全体構造に大きな影響を受けることを示していると思われる。

一方でRNA残基のコンフォメーションは5'側の残基の種類によって大きく変化することを見いだした。RNA残基の3'側にDNA残基がある場合はRNA残基は一般的なC3'-endoのコンフォメーションを保っているのに対して、RNA残基の5'側にDNA残基がある場合では、RNA残基は、C3'-endoとC2'-endoの中間のコンフォメーションを示した。

2'-O-methyl RNA残基のフラノース環のコンフォメーションは、全てC3'-endoであることが判明し、NMRから得られているカップリング定数もそれを支持した。またその性質はDm, mD両接合部で変わらず、2'-O-methyl RNA残基のコンフォメーションはRNA残基よりさらにC3'-endoが優勢であると考えられた。

実際のRNase Hの認識部位であるDNA-RNA hybrid duplexの構造は、これまでにNMRより決められている構造に基づいて、副溝側から見たリン酸残基の距離(minor groove width)が、9-10 Åであることを酵素が認識し、基質特異性を示すと推測されてきた。ところがRNase Hは、DHD, DDH, 2Meを基質として認識し切断するが、minor groove widthは切断部位において共通しないことが分かった。DHD, 2Meは共に切断箇所が一箇所のみに限定されているが、その場所のminor groove widthは11.5-12 Åで、今までに考えられていた最適なminor groove widthとは異なることが観察された。これより、RNase Hは、溶液中の核酸の構造そのものを認識して基質特異性を示しているのではなく、別の機構で基質特異性を示しているか、もしくは基質の構造変化を引き起こしている可能性があると考えられた。

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 周 東 智

副 査 助教授 井 上 英 夫

学 位 論 文 題 名

分子内に DNA・RNA 二本鎖部位を持つ

三種の核酸の溶液中の構造決定

申請者は RNA と DNA の相補的二本鎖である DNA・RNA 二本鎖の構造に関する研究を進めてきたが、今回 NMR を用いて解析を行った。

1) 3 種の二本鎖ハイブリッドの合成と構造解析

5'd(GG)r(agau)d(GAC)3'/5'd(GTCATCTCC)3'(DHD),
5'd(GGAGA)r(UGAC)3'/5'd(GTCATCTCC)3'(DDH),
5'r(ggagaugac)3' / 5'GmUmCmd(ATCT)CmCm3' (2Me)

上記の DNA 二本鎖または RNA と 2'-O-methyl RNA の hybrid duplex の二本鎖の間に DNA・RNA hybrid duplex を挿入した 9 塩基対の三種の核酸を合成し、溶液中の構造を NMR により解析し、どの様な構造的特徴が観察されるかを比較した。

これら三種の核酸を NMR を用いて構造決定したところ、DDH は三つのうち比較的典型的 B 型に近く、DHD では A 型に近い A と B の中間の構造で、2Me は三つのうちで最も典型的 A 型に近い構造を持っていることが分かった。また三者のらせん構造は接合部によって共通の構造的特徴を表した。局所的な軸に対しての塩基対のずれを表すパラメーター類である tilt, roll, slide 等が DHD, DDH においては 5'RNA-3'DNA 接合部 (HD 接

合部)、2Meにおいては5'(2'-O-methyl RNA)-3' DNA接合部(mD接合部)のみ値が大きく変化しており、HD, mD接合部でのベント様の構造を示していた。

これと比較して5' DNA-3' RNA接合部(DH接合部), 5' DNA-3'(2'-O-methyl RNA)接合部(Dm接合部)はなめらかならせん構造が保たれていた。これより、DNA残基の5'側にRNA, 2'-O-methyl RNA等の2'位に大きな置換基を持つ残基が存在する場合、らせんの構造に歪みが出来る事が示された。フラノース環のコンフォメーションでも三者の構造的特徴がはっきりと現れていた。DNA残基のコンフォメーションでは、DHD, DDHのDNA-RNA hybrid duplexの部分のDNA残基はC2'-endoとC3'-endoの中間のコンフォメーションにばらついているのに対し、2MeにおいてはDNA残基は全てC3'-endo付近のコンフォメーションを示し、C4'-exoであるのは14Tのみであった。また、NMRから得られた $J_{1..2.}$, $J_{1..2.}$ の結果もこれを支持した。このことは、DNA-RNA hybrid duplexの部分のDNA残基は、相補鎖側の性質に影響を受けるのみでなく、らせんの全体構造に大きな影響を受けることを示していると思われる。

一方でRNA残基のコンフォメーションは5'側の残基の種類によって大きく変化することを見いだした。RNA残基の3'側にDNA残基がある場合はRNA残基は一般的なC3'-endoのコンフォメーションを保っているのに対して、RNA残基の5'側にDNA残基がある場合は、RNA残基は、C3'-endoとC2'-endoの中間のコンフォメーションを示した。

2'-O-methyl RNA残基のフラノース環のコンフォメーションは、全てC3'-endoであることが判明し、NMRから得られているカップリング定数もそれを支持した。またその性質はDm, mD両接合部で変わらず、2'-O-methyl RNA残基のコンフォメーションはRNA残基よりさらにC3'-endoが優勢であると考えられた。

2) RNase Hとの相互作用と構造との関係

実際の RNase H の認識部位である DNA-RNA hybrid duplex の構造は、これまでに NMR より決められている構造に基づいて、副溝側から見たリン酸残基の距離 (minor groove width) が、9-10 Å であることを酵素が認識し、基質特異性を示すと推測されてきた。ところが RNase H は、DHD, DDH, 2Me を基質として認識し切断するが、minor groove width は切断部位において共通しないことが分かった。DHD, 2Me は共に切断箇所が一箇所のみに限定されているが、その場所の minor groove width は 11.5-12 Å で、今までに考えられていた最適な minor groove width とは異なることが観察された。これより、RNase H は、溶液中の核酸の構造そのものを認識して基質特異性を示しているのではないことを明らかにした。

以上の構造解析研究は博士(薬学)の学位を受けるに値するものと認めた。