

## 論文内容の要旨

論文題目            NMRによるハンマーヘッドリボザイムの金属イオン結合部位の解析

氏 名            鈴 村 謙 一

ハンマーヘッドリボザイムは当初、最小の植物病原体（ウイロイド）の複製機構を担う RNA 配列として発見された。選択的に RNA 配列を切断することができるため医療への応用が活発に研究されている。しかし、X 線結晶構造が解析されているにもかかわらず、切断反応過程の詳細は未だ不明であり、特に切断反応に必要とされる金属イオンの機能と役割については、様々な見解が述べられている。今までの速度論解析からハンマーヘッドリボザイムの切断反応において、切断サイトと A9/G10.1 サイトが、切断反応に関わるメタルバインディングサイトであると考えられている。A9/G10.1 サイトは、エンザイムのストランドの 9 番の Adenine と 10.1 番の guanine から形成されるメタルバインディングサイトである(図1)。そして、どちらのサイトも phosphorothioate を利用した速度論解析から pro-Rp 酸素に金属イオンが結合して切断反応が進行するとした説が一般的に受け入れられていた。しかし、どちらのメタルバインディングサイトにおいても、X 線結晶構造が、矛盾無くハンマーヘッドリボザイムの切断反応に関わる金属イオンを明らかにしているとはいえなかった。そこで、NMR を利用してハンマーヘッドリボザイムのメタルバインディングを明らかにし、切断反応における金属イオンの配位を解析することにした。

### 切断サイトの解析

一般にphosphateをphosphorothioateに変換して反応速度を検討する手法は、pro-Sp, pro-Rpの酸素におけるメタルバインディングを明らかにする手法として用いられる。phosphorothioateはRNAのphosphateのpro-Rp, pro-Spの酸素を硫黄に置換した分子である。置換する酸素がpro-Sp, pro-RpによってSp-, Rp-phosphorothioateになる。HSAB則からhard acidの $Mg^{2+}$ イオンはhard baseの酸素と親和性が高いが、soft baseの硫黄とは親和性が低い。そのためphosphorothioateと $Mg^{2+}$ イオンの相互作用は弱い。一方、soft acid

の $Cd^{2+}$ イオンは硫黄と親和性が高いため、 $Cd^{2+}$ イオンの添加により $Cd^{2+}$ イオンはphosphorothioateに結合する。この現象を利用して反応速度を測定し、メタルバインディングを解明する手法が採られている。この応用として検出手法にphosphorothioateの $^{31}P$  NMRを利用した。もし金属イオンが相互作用するのであればphosphorothioateの $^{31}P$  NMRのシグナルは移動する。相互作用しなければ移動しない。そのためphosphorothioateの $^{31}P$  NMRシグナルを追跡することにより、ribozyme-substrate complex (R32-S11S, 図1) と金属イオンの相互作用を検出できる。また、R32-S11S complexの他に既知のmetal-binding motifであるGA10SpSとGA10RpSをポジティブコントロールとして用いた(図1)。GA10SpSとGA10RpSはA6(P9)の位置に、Sp- phosphorothioateあるいはRp- phosphorothioateを導入したオリゴマーである(図1)。測定の結果、phosphorothioateを切断サイトに導入したR32-S11SではpH 5.9, pH 8.5の両方の条件にて、19等量の $Cd^{2+}$ イオンを添加してもphosphorothioateの $^{31}P$  NMRシグナルのシフトは0.1 ppm以下であった。一方、ポジティブコントロールとして用いたGA10SpSとSA10RpSは9等量の $Cd^{2+}$ イオンの添加によりphosphorothioateのシグナルは、それぞれ6ppm, 10ppmと大きく高磁場シフトした。以上より、金属イオンは切断サイトのpro-Sp, pro-Rp 酸素と相互作用しないことを示唆していた(図2)。

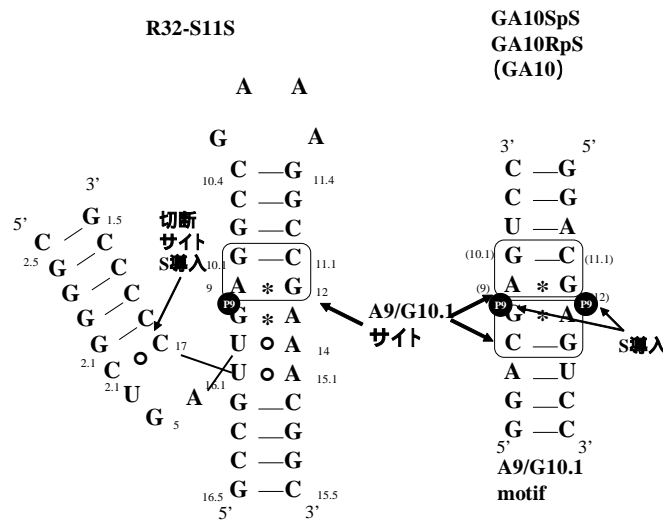


図1 R32-S11S 複合体, 及びGA10SpS, GA10RpS の2次構造

### A9/G10.1 サイトの解析

A9/G10.1 サイトの検討では、詳細なコンフォメーションを議論するため、A9/G10.1 サイトのメタルバインディングモチーフであるGA10SpSとGA10RpSを解析に用いた(図1)。これらのオリゴマーは比較的小型なため、ほとんどの $^1H$ ,  $^{31}P$  NMRのシグナルの追跡が可能である。また、GA10SpSとGA10RpSの元になったGA10が、ハンマーヘッドリボザイムのA9/G10.1 サイトのメタルバインディングモチーフであることは、すでに田中らによって詳細に検証されている。初めに、各 $^1H$ ,  $^{31}P$  NMRシグナルについて2次元NMRを用いてアサインメントを行った。そして、 $Cd^{2+}$ イオン添加における各NMRシグナルのケミカルシフト変化を調査した。GA10SpSに $Cd^{2+}$ イオンを添加すると、 $^{31}P$  NMRにおいて、

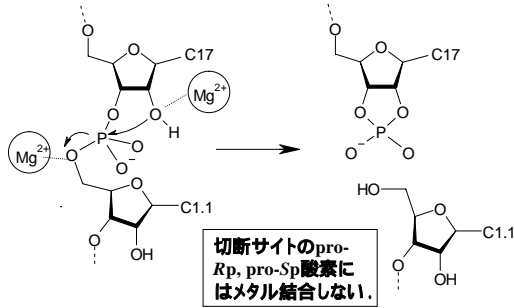
phosphorothioateのシグナルだけでなく 0 ~ 4ppmのphosphateのシグナルも変化を起こす。同様に GA10RpSでもCd<sup>2+</sup>イオンの添加でphosphorothioateのシグナルだけでなくphosphateのシグナルも変化した。つまり、Cd<sup>2+</sup>イオンの添加でバックボーンを含めたコンフォメーション変化がGA10SpSとGA10RpSに生じている。Cd<sup>2+</sup>イオンの添加におけるケミカルシフト変化を、GA10と比較すると、GA10SpS、GA10RpSのケミカルシフト変化はGA10に良く似ていることが判明した。また、ケミカルシフトの変化はGA mismatches近傍で大きく、Rp-, Sp- phosphorothioateにCd<sup>2+</sup>イオンが結合していることを示唆していた。次に、塩基の6位または8位の<sup>1</sup>H NMRシグナルにおけるCd<sup>2+</sup>イオン添加によるケミカルシフト変化を調査した。<sup>31</sup>P NMRと同様に、GA10SpSとGA10RpSにおいて、Cd<sup>2+</sup>イオン添加のケミカルシフトの変化はGA mismatches近傍で生じていた。そして、ケミカルシフト変化はGA10と良く似ており<sup>31</sup>P NMRの結果と一致した。従って、GA10SpSとGA10RpSの検討から、A9/G10.1 メタルバインディングサイトでは pro-Rp とpro-Spの両方にメタルイオンが結合することが示唆された(図2) また GA10SpS、GA10RpSの各残基の<sup>31</sup>P、<sup>1</sup>H NMRのケミカルシフト変化はGA10によく似ており、GA10SpSとGA10RpSはGA10と同じメカニズムで金属イオンを捕捉していると推定した。

### Phosphorothioateの構造への影響

金属イオンの非存在下でのGA10、GA10SpS、GA10RpSの<sup>1</sup>H NMRのケミカルシフトの比較において、GA10SpSとGA10とのケミカルシフトの差は0.02 ppm以下と小さいのに対し、GA10RpSとGA10では最大0.46 ppmと大きな差が観測された。当初は高々1個の硫黄の置換によってGA10へのコンフォメーションの変化は生じないと予想していた。しかし、<sup>1</sup>H NMRからGA10SpSには構造変化は生じ無いが、GA10RpSには構造変化が起きることが示唆された。一方、<sup>31</sup>P NMRでは、GA10SpSとGA10RpSは共にGA10と同じケミカルシフトであり、バックボーンの構造はGA10と同じであると推定した。すなわち、Rp- phosphorothioateの導入はオリゴマーのバックボーンには影響を与えないが、導入された近傍においてわずかにコンフォメーションを変化させることを示唆した。今までの速度論解析ではphosphorothioateによる硫黄の置換が、構造に変化を与えないことが前提にある。すなわち、ハンマーヘッドリボザイムのphosphorothioateによる速度論解析では、バリエーションな硫黄原子をpro-Rpに導入したことよりコンフォメーションが変化したために反応速度が悪化した可能性がある。一方、Sp-phosphorothioateはハンマーヘッドリボザイムのコンフォメーションに影響を与えることが無いため、非修飾のハンマーヘッドリボザイムと同じ挙動を示す。このように解釈することも可能であるため、phosphorothioateを用いた速度論解析では、硫黄導入によるコンフォメーションへの影響を考慮する必要がある。

本論文では、ハンマーヘッドリボザイムの2個のメタルバインディングサイトである切断サイトとA9/G10.1サイトについて、NMRを用いて解析を行い、金属イオンの配位状態について検討を行った。切断サイトではCd<sup>2+</sup>イオンの配位は観測されなかった。一方、A9/G10.1サイトでは、モチーフを用いた実験において、Cd<sup>2+</sup>イオンの添加で、Sp-, Rp- phosphorothioateの<sup>31</sup>P NMRシグナルは移動し、またphosphorothioate近傍を中心にphosphorothioate以外の<sup>1</sup>H、<sup>31</sup>P NMRシグナルも移動し、全体に同一なメタルバインディングフォームに変化した。つまり、Cd<sup>2+</sup>イオンの配位が観測された。

### 切断サイト



### A9/G10.1サイト

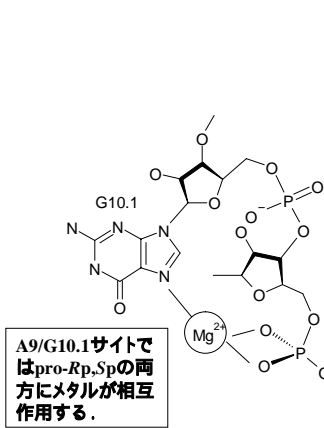


図2 切断サイトと A9/G10.1 サイトの模式図