

## 審査の結果の要旨

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 配列を切断できるため医療への応用研究が活発に行われている。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なとされる金属イオンの機能と役割については、様々な報告がある。今回、NMR を利用してハンマーヘッドリボザイムの metal-binding 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した。

### 切断サイトの解析

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が、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 metal-binding を明らかにする手法として用いられる。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、metal-binding 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と考えられる。phosphorothioate の  $^{31}P$  NMR シグナルを追跡することにより、ribozyme-substrate complex 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。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。測定の結果、phosphorothioate を切断サイトに導入した R32-S11S では、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が示された。

### 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 metal-binding motif である GA10SpS と GA10RpS を解析に用いた。これらのオリゴマーは比較的小さいため、ほとんどの  $^1H$ 、 $^{31}P$  NMR のシグナルの追跡が可能である。はじめに、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精査した。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  $Cd^{2+}$  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、 $\text{Cd}^{2+}$  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。 $\text{Cd}^{2+}$  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 $\text{Cd}^{2+}$  イオンが結合していることを示唆した。次に、塩基の6位または8位の $^1\text{H}$  NMRシグナルにおける $\text{Cd}^{2+}$  イオン添加によるケミカルシフト変化を検討した。 $^{31}\text{P}$  NMRと同様にGA10SpSとGA10RpSにおいて、 $\text{Cd}^{2+}$  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 $^{31}\text{P}$  NMRの結果と一致した。従って、GA10SpSとGA10RpSの検討から、A9/G10.1 metal-bindingサイトでは、pro-Rpとpro-Spの両方に金属イオンが結合することが示された。

#### Phosphorothioate の構造への影響

金属イオンの非存在下でのGA10、GA10SpS、GA10RpSの $^1\text{H}$  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、 $^1\text{H}$  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、 $^{31}\text{P}$  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。

以上、本研究では、ハンマーヘッドリボザイムの2個のmetal-binding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 $\text{Cd}^{2+}$  イオンの配位はなく、一方、A9/G10.1サイトでは、motifを用いた実験において、 $\text{Cd}^{2+}$  イオンの添加で、Sp-、Rp-phosphorothioateの $^{31}\text{P}$  NMRシグナルは移動し、またphosphorothioate近傍を中心にphosphorothioate以外の $^1\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$  NMRシグナルも移動し、全体に同一なmetal-bindingフォームに変化することを明らかにした。

上記の研究成果は薬学の基礎研究に与える寄与は大きく、博士(薬学)の学位に値するものと判断した。