

氏名(国籍)	ハミッド ファウジ (インドネシア)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,824号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Study on the Structure and Cleavage Reaction Mechanism of Human Hepatitis Delta Virus(HDV) Ribozyme (ヒトデルタ型肝炎ウイルスリボザイムの構造と反応機構に関する研究)		
主査	筑波大学教授	Ph. D. (理学)	多比良 和 誠
副査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔
副査	筑波大学教授	農学博士	祥 雲 弘 文
副査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌

論文の内容の要旨

ヒトデルタ型肝炎ウイルス (HDV) はB型肝炎ウイルスのサテライトウイルスとして発見された。その遺伝子は一本鎖の環状RNAで、長さ約1,700ヌクレオチドからなる。遺伝子の複製は植物のウイルソイドと同じように、ローリングサークルの様式で行われ、その過去で1ユニットごとに自己切断により切り出せる。この自己切断反応に必要な領域がHDVリボザイムと呼ばれ、反応に Mg^{2+} イオンを必要とし、切断部位では2',3'環状リン酸と5'OHを生成する。いわゆるハンマーヘッド型やヘアピン型リボザイムと同じ反応様式であるが、それらのものとは塩基配列も二次構造も全く異なっている。哺乳類由来のリボザイムであると、ならびにハンマーヘッド型やヘアピン型との共通性、相違性の観点から今までこのHDVリボザイムについて、活性を示すのに必要な構造や、必須の塩基が明らかにされてきた。本研究ではHDVリボザイムの切断反応の機構とその最小構造について研究を行った。

HDVリボザイムの切断反応の機構について、特に Mg^{2+} イオンの役割を解析するため、切断部位のリン酸に結合している酸素をイオウに置換したRp体の基質を用い、シングルターンオーバーの条件下(基質0.01 μ M, リボザイム5 μ M, 10mM $MgCl_2$, 37 $^{\circ}C$)で切断反応を行なった。その結果、反応は一次反応で、pH4からpH6の範囲では切断速度(k_{clv})の対数値は、pHの上昇とともに増加し、その傾きは約1であった。このことは少なくともこのpH範囲においては、 k_{clv} 値はchemical stepであることを示している。活性複合体の量はSp体では天然型とほぼ同じであるのに対して、Rp体では20%であった。一方、 k_{clv} 値はいずれの基質においても同じであった。このように、イオウ原子置換により k_{clv} 値には影響のないこと、ならびに Mn^{2+} イオンによるrescue効果のないことから、 Mg^{2+} イオンはpro-R酸素に直接相互作用していないこと、しかし活性複合体の形成には重要であることを初めて見出した。

HDVリボザイム(88nt)の二次構造は、構造を保つために必要な4つのステムと3つの一本鎖領域を持つユニークなシェードノット構造をとることがほぼ明らかとなっている。ステムIは切断部位を形成し、ステムII, IIIは触媒領域を保持するのに重要である。ステムIVは背骨に相当するが、今までの研究結果からある程度短くすることは可能であった。本研究では、立体構造解析に適した最も小さいHDVリボザイムを作るために、ステムIVを完全に欠失し、UU, CG, A, C, G, Uに置換した種々のものを作製し(MTS-N)、それらの活性を速度論的に解析

した。CGあるいはGに置換したもの以外はどれも活性が認められたが、特にUに置換したMTS-UはステムⅣを除く前のものにほぼ近い活性を保っており、今までで最も小型のHDVリボザイム（47nt）をつくることができた。さらにMTS-Uにおいては一本鎖領域の残基が、短くする前のHDVリボザイム（88nt）以上に重要であることを明らかにした。二次構造予測からGに置換したものは、別の安定構造をとるために失活することが推測された。以上のことからステムⅣは活性には必須ではないが、活性に必要な構造を安定に保つのに重要であることを明らかにした。この最小のHDVリボザイムは立体構造解析の材料として非常に有用である。

審査の結果の要旨

本研究はヒトデルタ型肝炎ウイルス（HDV）リボザイムのRNA鎖切断反応の機構を詳しく解析する目的で、特に反応に関与する Mg^{2+} イオンの役割の解明とその最小構造について解析を行ったものである。

基質鎖として全て通常のリン酸ジエステル結合を持つR13、切断部位にRp体のチオリン酸結合を持つSR13（Rp）、同様にSp体のチオリン酸結合を持つSR13（Sp）の3種類を合成し、シングルターンオーバーの条件下での切断反応を解析した結果、測定pH範囲においては切断速度（ k_{clv} ）値はchemical stepであり、いずれの基質においても同じ k_{clv} 値であることを見出した。結果として、 Mg^{2+} イオンは、活性複合体の形成と切断反応の少なくとも2つの段階で反応に関与していることを明らかにした。また Mg^{2+} イオンは*pro-R*酸素に直接相互作用していないことをHDVリボザイムにおいて初めて明らかにした。

HDVリボザイムの二次構造に見られる4つのステムのうち、ステムⅣを欠失させ、それぞれ、UU, CG, A, C, G, Uに置換した各リボザイム（MTS-N）を作製し、それらの切断反応を速度論的に解析した結果、基本的にステムⅣは活性発現に必要なことを初めて明らかにした。このことにより、今までで最も小型のHDVリボザイム（47nt）を作成することに成功した。またMTS-Nの一本鎖領域の残基は小型化する前のHDVリボザイムの残以上に重要であることを明らかにした。

本研究はハンマーヘッド型やヘアピン型と同じ反応様式をもつHDVリボザイムについて、その切断反応における Mg^{2+} イオンの役割について初めて詳細に考察し、またその最小機能構造を明らかにするために最も小型のHDVリボザイムを作製しえた点において極めて意義深い成果である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。