

氏名(本籍)	高木康臣(静岡県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第5715号
学位授与年月日	平成23年3月25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	生命環境科学研究科
学位論文題目	Analysis of Reaction Mechanism of Hammerhead Ribozyme (ハンマーヘッド型リボザイムの反応機構の解析)

主査	筑波大学准教授	理学博士	中村幸治
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本哲男
副査	筑波大学准教授	理学博士	坂本和一
副査	筑波大学准教授	理学博士	桑原朋彦

論文の内容の要旨

RNAの機能解析などの成果から、様々なリボザイムが同定されている。これらの機能解析の結果、リボソーム上でのペプチド結合生成反応の触媒や pre-rRNA のスプラッシング反応の触媒など、生命の維持活動の中で重要な役割を担うリボザイムが存在することが明らかとなってきた。また、リボザイムの機能を利用した遺伝子治療や生物工学などの産業分野への展開を目的にリボザイムエンジニアリングなどの研究開発もなされている。このようにリボザイムの機能解明や産業応用の観点から、リボザイムの反応機構や触媒機構の解析は重要な課題である。

ハンマーヘッド型リボザイムは、植物ウイルスのウイロイドに由来するリボザイムである。ウイロイドのゲノム複製はローリングサークルメカニズムに従う。この複製過程でポリユニット化された RNA 鎖上の分子内においてリボザイム活性構造が形成され、分子内自己切断反応(リン酸ジエステル結合の開裂反応)を行うことにより、モノマー RNA 鎖が生じる。この分子内のリボザイム反応を分子間のリボザイム反応に人工的に再構築したハンマーヘッド型リボザイムは、他の種類のリボザイムに比べ、様々な分子設計が容易であり、産業応用への利用可能性を秘めている。しかし、その反応機構の特質や触媒機構について不明な部分も多い。

本研究では、反応速度論的手法を用いて、種々のカチオン依存性のハンマーヘッド型リボザイムの反応機構の解析と1価カチオン依存のハンマーヘッド型リボザイム反応における触媒機構の解明を行った。

まず、異なるカチオン共存下におけるリボザイム反応の観測に適切な実験条件を見出すべく、一定濃度の Mg^{2+} 存在下、様々な種類の1価カチオン (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ または、 NH_4^+) をリボザイム反応系に共存させ、リボザイム活性の1価カチオン濃度依存性を調べた。その結果、1価カチオン濃度依存的にリボザイム反応の阻害効果及び促進効果が観測された。次に、これらの効果が最も顕著に観測された Li^+ を用い、 Mg^{2+} - Li^+ 共存下のリボザイム反応系における新しい反応経路の有無を調べた。 Mg^{2+} 依存のリボザイム反応経路、及び、 Li^+ 依存のリボザイム反応経路に関するキネティックパラメーターを実験的に求め、次に、2 M Li^+ 存在下における Mg^{2+} 濃度依存性のリボザイム活性プロファイル、及び、10 mM Mg^{2+} 存在下における Li^+ 濃度依存性のリボザイム活性プロファイルを観測した。この後、両イオン存在下の反応経路のモデルを複数組み立

て、各モデルに対し反応速度論式を導き、非線形最小二乗法により実験データへのフィッティングを行った。その結果、全プロファイルに対し、非常に高いフィッティングを示す第三の反応経路の詳細なモデルとこの反応経路に関わる Mg^{2+} 、 Li^+ の個数、これらカチオンの各々の解離定数 (K_d)、及び、切断反応速度定数 (k) が明らかとなり、 Mg^{2+} - Li^+ 共存下で見出される新しい反応経路の存在を示唆する結果が得られた。この第三の経路の発見により、阻害効果の詳細な機構が初めて明らかになったとともに、細胞内ではハンマーヘッド型リボザイム活性が、協同的反応経路に関わる K^+/Na^+ によって、低下している可能性が示唆された。

一方、 NH_4^+ 存在下のハンマーヘッド型リボザイム反応において切断部位のリン原子から脱離する 5' 側の酸素原子に関与する触媒を検討すべく、反応速度論的重水素同位体効果の実験を行った。重水素同位体効果の実験条件で観測される反応速度定数 (k_{obs}) が、リボザイム反応の律速である化学的段階を反映していることを確認するため、 NH_4^+ 存在下でのリボザイム反応の pH プロファイル (pH vs k_{obs}) を調べた。その結果、pH7.25-pH8.99 において直線性が高く、その傾きが 1.22 であることが分かった。次に、pL 8.00 (L=H or D) における 4M NH_4Cl 反応溶液中でのリボザイム反応の反応速度定数を実験的に求めたところ、見かけ上の反応速度論的重水素同位体効果 ($k_{app}^{H_2O}/k_{app}^{D_2O}$) は 7.68 ± 0.59 であり、 Mg^{2+} 存在下でのリボザイム反応の見かけ上の重水素同位体効果値 4.4 よりも明らかに大きい数値が観測された。この NH_4^+ 存在下でのリボザイム反応の見かけ上の値を実質的重水素同位体効果の値に換算すると 2 となり、 Mg^{2+} 存在下でのリボザイム反応の実質的な換算値 1 よりも大きい値となった。これにより NH_4^+ 存在下のハンマーヘッド型リボザイム反応の律速段階には水素転移があることが判明し、 NH_4^+ が触媒基として作用している可能性が示唆された。

以上の結果から、ハンマーヘッド型リボザイムの反応経路に、複数の異なるカチオンが関与する協同的反応経路が存在することを新しく見出し、さらにこの協同的反応経路に起因する阻害効果により細胞内ではハンマーヘッド型リボザイムの反応効率が悪化することが示唆された。加えて、 Mg^{2+} など 2 価金属イオンが触媒基として作用していると考えられているハンマーヘッド型リボザイムの触媒機構において、 NH_4^+ などの 1 価カチオンも触媒基として作用することが初めて示唆された。本研究から得られた知見は、遺伝子治療など生体内利用目的で行うハンマーヘッド型リボザイムのエンジニアリングにあたり、今後、検討すべき具体的な課題として資するものであり、加えて、リボザイムを取り巻く環境に応じて反応経路や触媒の種類を変えられる柔軟性・多様性を RNA が有することを示唆することから RNA ワールドにおける RNA 進化の理解に寄与するものとする。

審査の結果の要旨

リボザイムを含め様々な機能性 RNA が次々と発見同定され、予想以上に様々な局面で重要な役割を RNA が担っていることが明らかとなり、RNA 研究の重要性は年々増している。このような中、RNA の切断機能を有するハンマーヘッド型リボザイムの触媒機構は、生物学的にも化学的にも関心の高い領域である。また、任意の mRNA を特異的に切断するリボザイムエンジニアリングに最も適するのがハンマーヘッド型リボザイムであることから、遺伝子治療や分子標的薬としての利用目的でのハンマーヘッド型リボザイムの研究開発も試みられている。従って、ハンマーヘッド型リボザイムの反応機構や触媒機構の解析は重要な研究課題といえる。本研究によって、ハンマーヘッド型リボザイムによる遺伝子治療など生体内での利用にあたり、今後検討すべき具体的な課題として協同的反応経路による阻害効果の存在が提示された。また、リボザイムの進化の過程において、取り巻く環境に応じて反応経路や触媒基の種類を変えられる RNA の柔軟性が示唆されたことは重要である。本研究で得られた知見は、今後のハンマーヘッド型リボザイムの応用研究や RNA ワールドにおける RNA 進化を解明する上で多大なる寄与をすることが期待される。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。