

3A15

ハンマーヘッドリボザイムの活性構造のNMRによる研究

(大阪大学たんぱく質研究所) ○天野まゆみ

[序]ハンマーヘッドリボザイムは約 50RNA 塩基からなる小型リボザイムである。3つのステムと必須な塩基配列を有するコア領域から成り、 Mg^{++} イオン存在下、リン酸ジエステル結合が解裂する。近年、このリボザイムの結晶構造が解析されたが、その構造では、反応がいかない不活性構造であり、活性構造はまだ解明されていない。今回、活性構造を明らかにするため、RNA オリゴマーを合成し、溶液 NMR による構造解析を行った。

[実験]ハンマーヘッドリボザイムを2つの RNA オリゴマー、酵素鎖 3 2 マーと、基質鎖 1 1 マーに分け、合成した。この混合物を 0.1MNaCl,3mMcacodylate, 1mMEDTA,pH6.8,10%D₂O 水溶液に溶かし、ブルッカー500, 600MHz H-NMR で測定した。イミノプロトンの帰属は、2次元 NOESY、及び、温度変化測定により行った。さらに、ステム部モデルオリゴマーを合成し、NMR 測定し、比較解析して、帰属を完全に行った。 Mg^{++} イオンの付加のスペクトルを測定し、 Mg^{++} イオンの構造に及ぼす影響を調べた。また、必須塩基対 G10.1C11.1 を C10.1G11.1 に、又、C15.2G16.2 を G15.2C16.2 に、置換したリボザイムを合成し、同様に H-NMR 測定し、構造解析を行った。この NMR データーを用いて、今までの活性データーを考慮し、InsightII-Discover を用いて活性構造のモデリングを行った。

[結果と考察] 図 2 に 20°C のイミノプロトン領域のスペクトルを示す。ステム III と II と I の AU と G1.2C2.2 のイミノプロトンが2つのピークに分離している。また、9,9 と 9,7ppm のシグナルはそのケミカルシフトから判断して、sheared GA-AG 塩基対のイミノプロトンに帰属できる。また、このピークはプロトン半分の強度しかない。これら NMR の解析より、このリボザイムは溶液中、2つの構造が存在することがわかった。1つは、結晶構造と同じ構造で、sheared GA-AG 塩基対を有し、ステム II と I が U4 でシャープにターンした Y-shape 構造を形成している。他方は、Watson-Crick GA-AG 塩基対を有し、ステム II と I がターンしていない linear な構造をしていた(図 1 B)。 Mg^{++} イオンの添加により(図 2 B-E)、Y-shape 構造は、GA-AG 塩基対とその近傍の A11.2U10.2 がシフトし、反応部位近傍 G1.2C2.2 のシグナルがブロードかした。結晶構造において、 Mg^{++} イオンは A9 リン酸と G10.1 の N7 に結合しているが、溶液中でも同様に結合しているものと考えられる。さらに溶液中では反応部位にも結合することが予想される。また、時間の経過とともに反応生成物に由来するピークが現れた(図 2 E)。しかしながら、もう一方の Y-shape 構造をとらない構造は Mg^{++} イオンを加えても変化しなく、反応もおこらなかった。また、必須塩基を置換したリボザイムも同様に解析し、wild タイプとの比較を行った。以上の結果から、活性構造の形成には Y-shape 構造形成が必要であること。又、Y-shape 構造形成には

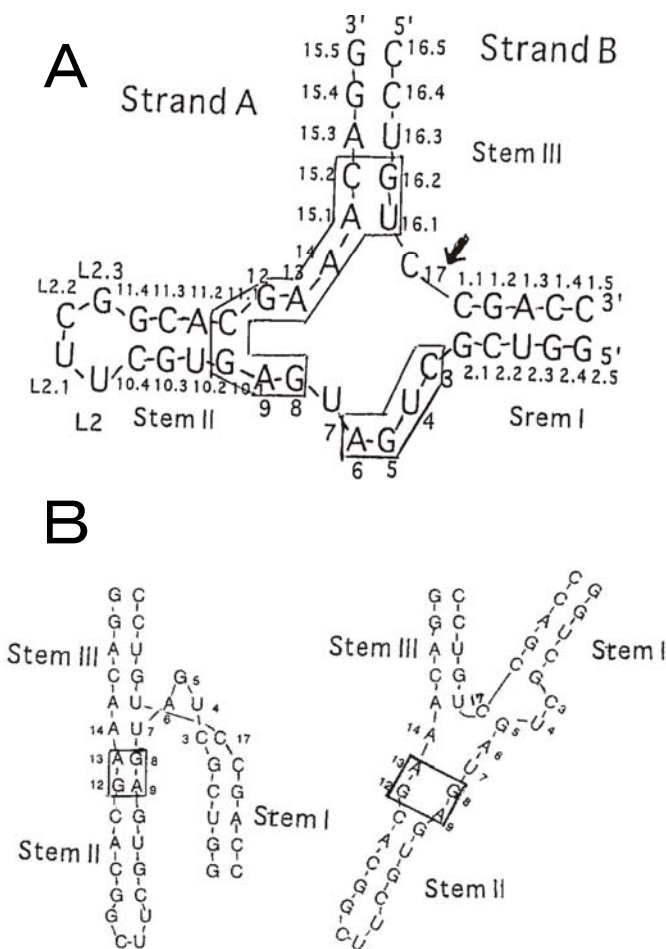


図1
A ハンマーヘッドリボザイムの2次構造。矢印は反応部位をしめす。Boxで囲んでいる部分は活性に必須な塩基を示す。

B ハンマーヘッドリボザイムの水溶液中の2つのモデル構造。Box内はsheared GA-AG塩基対とWatson-Crick GA-AG塩基対をしめす。

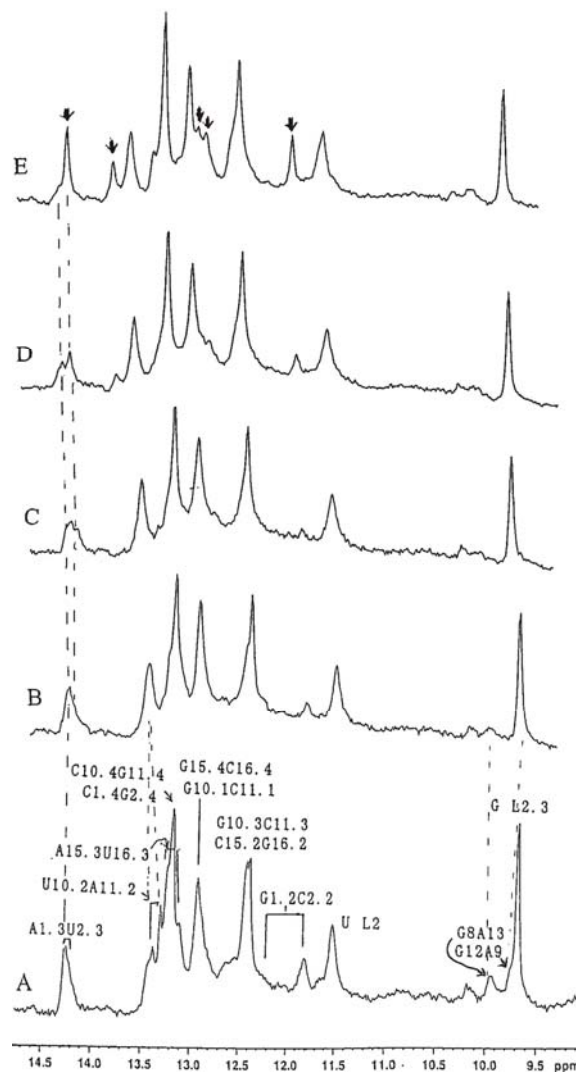


図2 ハンマーヘッドリボザイムのイミノプロトン領域のスペクトル。A:0mM, B:6mM, C,D, E:15mM MgCl₂, D:20°C 5日後、E:20°C 2週間後、矢印は生成物由来。

sheared GA-AG 形成が必須である。その為、sheared GA-AG に Mg⁺⁺イオンが結合し安定化することにより反応部位付近が活性構造に変化し、Mg⁺⁺イオンが結合して、解裂反応が起こるものと考えられる。結晶構造の Y-shape 構造では G5 塩基は溶媒に露出し、水素結合に関与してないが、塩基の化学置換により活性が落ちることより、G5 塩基は水素結合している事が予想される。活性構造のモデリングより、G5 が C17 付近に移動し C17 と逆 Watson-Crick 塩基対形成することにより、U4,C3 と解裂部位リン酸に Mg⁺⁺イオンが結合する空間が生じる。そして、C3 の NH₂ と C17 反応部位のリン酸 Rp-O が水素結合することにより、反応に必要なリン酸の反転をもたらす。そして、Mg⁺⁺イオンが G5 の C6=O と C3 の N3 と C17 の 2'O とリン酸の Sp-O に結合し、C17 の 2'O がリン酸をアタックして反応が起こるものと考えられる。