



Title	ヒトδ型肝炎ウイルス(HDV)リボザイムの構造活性相関に関する研究
Author(s)	川上, 純司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	甲第3373号
Issue Date	1994-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3076644
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50004
Type	doctoral thesis
File Information	000000272677.pdf



ヒト δ 型肝炎ウイルス (HDV) リボザイムの
構造活性相関に関する研究

川 上 純 司

①

ヒト δ 型肝炎ウイルス (HDV) リボザイムの
構造活性相関に関する研究

1994年

川上純司

略語表

RNA	ribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
A	adenine, adenosine, 2' - deoxyadenosine
G	guanine, guanosine, 2' - deoxyguanosine
C	cytosine, cytidine, 2' - deoxycytidine
U	uracil, uridine
T	thymine, 2' - deoxythymidine
N	any bases, any nucleosides
NTP	ribonucleotide triphosphate
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
Pu	purine bases, purine nucleosides
Py	pyrimidine bases, pyrimidine nucleosides
nts	nucleotides
bp	base pair
rRNA	ribosomal RNA
tRNA	transfer RNA
mRNA	messenger RNA
HDV	human hepatitis delta virus
HDAg	hepatitis delta antigen
ORF	open reading frame
β - gal	β - galactosidase
RNase	ribonuclease
DNase	deoxyribonuclease
PCR	polymerase chain reaction
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
HPLC	high performance liquid chromatography
NMR	nuclear magnetic resonance
UV	ultra violet
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate

目次

序論	1
本論	7
第一章 HDVリボザイムの機能性二次構造の検討	7
第一節 HDVリボザイムの調製	11
第二節 一本鎖領域A (SSrA) に存在する塩基の重要性の検討	13
第三節 一本鎖領域B (SSrB) に存在する塩基の重要性の検討	17
第四節 一本鎖領域C (SSrC) に存在する塩基の重要性の検討	20
第五節 まとめ及び考察	28
第二章 HDVリボザイムによるターゲットRNA鎖の切断	34
第一節 分子間反応を触媒するHDVリボザイムの作成	34
第二節 分子間反応の酵素反応速度論的解析	37
第三章 HDVリボザイムによるRNA鎖切断反応様式の解析	42
第一節 基質のチオリン酸化による切断反応への影響	42
第二節 金属イオン濃度の切断反応への影響	45
第三節 切断反応の律速段階に関する考察	48
第四章 分子間反応を触媒するHDVリボザイムの高機能化	55
第一節 ステムII領域への変異導入	55
第二節 活性発現に寄与しない領域の削除	60
第三節 さらなる高機能化の可能性	63
結論	67
謝辞	68

実験の部	69
実験材料	69
実験操作及び手法	74
第一章の実験	87
第二章の実験	93
第三章の実験	96
第四章の実験	96
引用文献	98

Enzyme	Reaction	Nucleophile	Chemical structure
Large	transcription	3'-OH of D	3-5 linkage / 3'-OH
	hydrolysis	water	5'-P / 3'-OH
group II	transcription	2'-OH of A	2-6 linkage / 3'-OH
	hydrolysis	water	5'-P / 2'-OH
Etiam P	hydrolysis	water	5'-P / 3'-OH
Small			
hydrolysis	transcription	2'-OH (adjacent)	2-6 linkage P / 3'-OH
hydrolysis			

表1 RNA切断を触媒するリボヌクレアーゼ

また、アンチセンス法と呼ばれる方法論¹¹⁾がこの分野で大きく注目されてきた。アンチセンスとは、標的となる遺伝子配列(セクエンス)と相補的な配列という意味を持っている。本来アンチセンス法は標的となる遺伝子の塩基配列の複製を阻害するRNA(ヒン入組)と相補的なアンチセンス鎖を導入して標的と結合させ、複製を阻害するものとして知られていたが¹²⁾、現在では目的と異なる配列標的鎖に限定して阻害、また標的鎖には標的内RNAase阻害剤RNase inhibitor

序論

近年、生命の起源がRNAであるという説が信憑性をもってきている。いわゆる"Chicken - and - Egg Paradox"に終止符を打つきっかけとなったのは、Cechらによるリボザイム (Ribonucleic AcidとEnzymeの合成語) の発見であった^{1,2)}。彼らは原生動物であるテトラヒメナのrRNAの研究中、イントロンが蛋白質酵素の存在しない系でRNAの自己切断によって切り出されることを見いだした。Cechは1981年以来のこの業績により、tRNA前駆体が切断を受ける際に働くリボザイムを発見したAltman³⁾と共に1989年のノーベル化学賞を受賞したが、この発見を機に様々な反応を触媒するリボザイムが見いだされている^{4,5)}。

これまでに知られているリボザイムのうち、多くのものはリン酸ジエステル結合の切断及び結合を触媒するものであり⁶⁻¹⁰⁾、表1に示すようにいくつかに分類することができる。

Ribozyme	Reaction	Nucleophile	Chemical signature
Large			
group I	transesterification	3'-OH of G	3'-5' linkage / 3'-OH
	hydrolysis	water	5'-P / 3'-OH
group II	transesterification	2'-OH of A	2'-5' linkage / 3'-OH
	hydrolysis	water	5'-P / 3'-OH
RNase P	hydrolysis	water	5'-P / 3'-OH
Small			
hammerhead, hairpin, and δ	transesterification	2'-OH (adjacent)	2',3'-cyclic P / 5'-OH

表1 RNA切断を触媒するリボザイム⁵⁾

また、アンチセンス法と呼ばれる方法論¹¹⁾がこの数年で大きく注目されてきた。アンチセンスとは、標的となる遺伝子配列 (センス) と相補的な配列という意味を持っている。本来アンチセンス法は標的となる蛋白質の遺伝情報の伝達を担うmRNA (センス鎖) に相補的なアンチセンス鎖を導入してmRNAと結合させ、翻訳阻害を行なうことを目的とするものであったが^{12,13)}、現在では標的となる段階は翻訳に限らず (図1)、また機能発現には細胞内RNase IIIやRNase Hによる標的

鎖の切断等が深く関与していることなどが明らかになってきている¹⁴⁻¹⁷⁾。

転写阻害

1. 三本鎖形成
2. 転写開始部位への結合
3. 合成途中のmRNAへの結合
4. 高次構造の変化による
ρ因子非依存の転写終結

スプライシング阻害

5. エクソンとイントロンの
境界への結合

核膜透過阻害

6. 標的領域非依存の二重鎖RNA形成

翻訳阻害

7. 翻訳開始因子の結合阻害
8. 翻訳開始領域への結合
9. リボゾームのsliding阻害

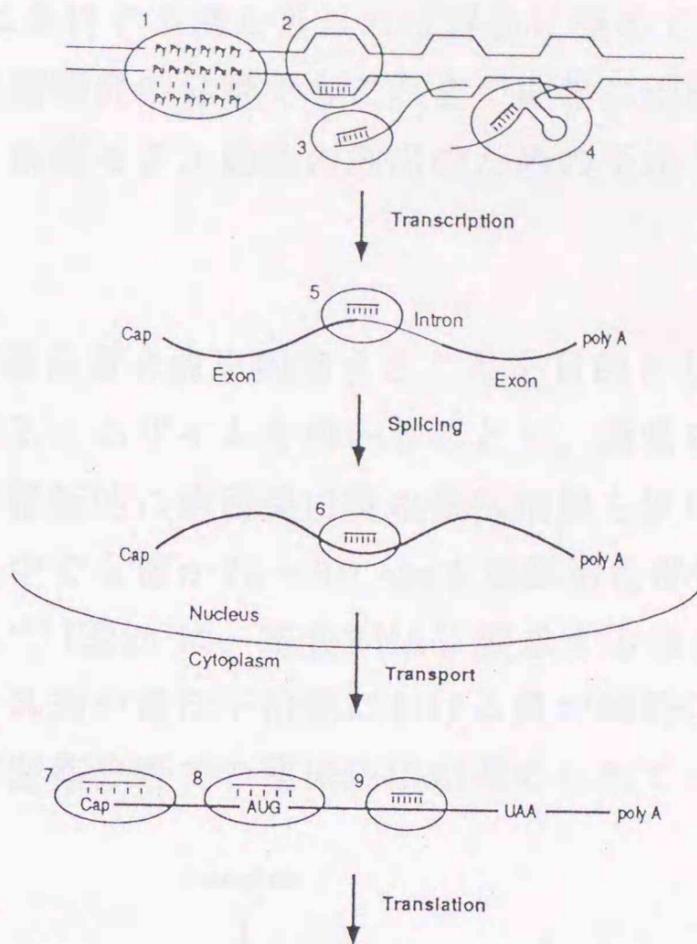


図1 アンチセンス核酸の標的^{14,16)}

生体内における種々の反応はほとんど蛋白質が担っている。ウイルスは宿主の蛋白質合成系を利用して複製に必要な蛋白質を得て増殖し、また癌や多くの遺伝病では正常な生命維持活動を阻害する蛋白質の大量発現が病因であることが明らかとなっている。薬学分野においてはこれまで病因蛋白質の構造又は機能にターゲットをおき、治療を目指す方法がとられてきたが、アンチセンス法は遺伝情報源を断ち、標的となる蛋白質を発現させないことを目的としている点で既存の治療法と大きく異なる。

特定の酵素に対する特異的阻害剤の合成は至難の業であり、通常は弱いながらも他の酵素に対しても作用するために副作用を引き起こす。アンチセンス法は核酸を標的とする手法であるため、標的遺伝子の塩基配列情報から高度に特異的な阻害剤を容易に設計し、作成することができるという点で非常に汎用性が高い。また、アンチセンス核酸は通常RNAという生体高分子をそのまま使用することから毒性は皆無に等しく、予期せぬ副作用を引き起こすことがないと考えられる。特異性に関しては、遺伝情報がA, G, C, Tの4塩基の配列で決定することから、

細胞あたり約30億塩基対のDNAを含んでいるヒトの場合には、計算上特定の17 ntsの核酸に相補的な配列は遺伝子中に1箇所しか存在しない ($4^{17} > 30 \text{億} \times 2 \text{本鎖}$)。このようにして、アンチセンス法は条件さえ満たされれば容易に極めて特異性の高い遺伝子制御が可能であり、基礎研究の分野でもこれまで非常に困難であった未知の遺伝子の機能の探索¹⁸⁾や、疾病モデル動物の創出のための手法¹⁹⁾としても利用されてきている。

アンチセンス核酸はmRNAに結合して蛋白質合成を阻害することを目的としているが、リン酸ジエステル結合を切断するリボザイムを用いることで、通常のアンチセンス核酸としての機能に加えて、積極的に病因蛋白質の遺伝情報を破壊する機能を保持させることが可能となる。中でも僅か20~30 ntsで触媒活性部位を構成するハンマーヘッド型リボザイム¹⁰⁾ (図2) は、基質RNAに要求する塩基配列の制限が少ないため、実際に抗ウイルス剤や遺伝子治療における負の制御因子といった機能性アンチセンス分子として医薬分野での臨床応用が進められている^{20,21)}。

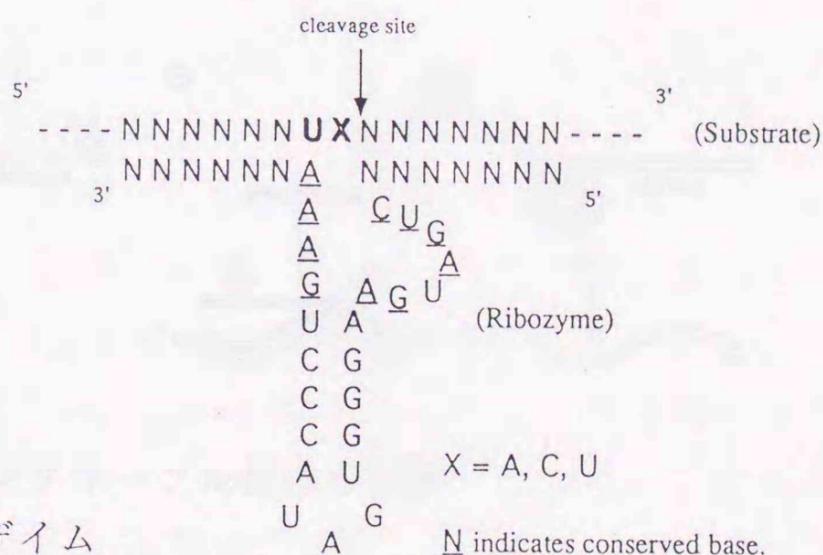


図2 ハンマーヘッド型リボザイム

しかし、ハンマーヘッド型リボザイムに関しては*in vivo*の活性が*in vitro*の評価と必ずしも一致しない結果がしばしば得られており、人体内で安定に活性を発現するリボザイムの開発が望まれる。

ヒトδ型肝炎ウイルス (human hepatitis delta virus, HDV) は、B型肝炎ウイルスが感染した細胞にのみ特異的に感染するサテライトウイルスであり^{22,23)}、その遺伝子は1679塩基の一本鎖環状RNAから成る²⁴⁻²⁷⁾ (図3)。HDVはハンマーヘッド型リボザイムの起源である植物ウイルソイド等と類似のローリングサークル様式²⁸⁾で複製し (図4)、ゲノム鎖 (688/689) 及びアンチゲノム鎖 (903/904) の双

方に存在する自己切断活性により1ユニット毎に切り出される^{9,29-33}。

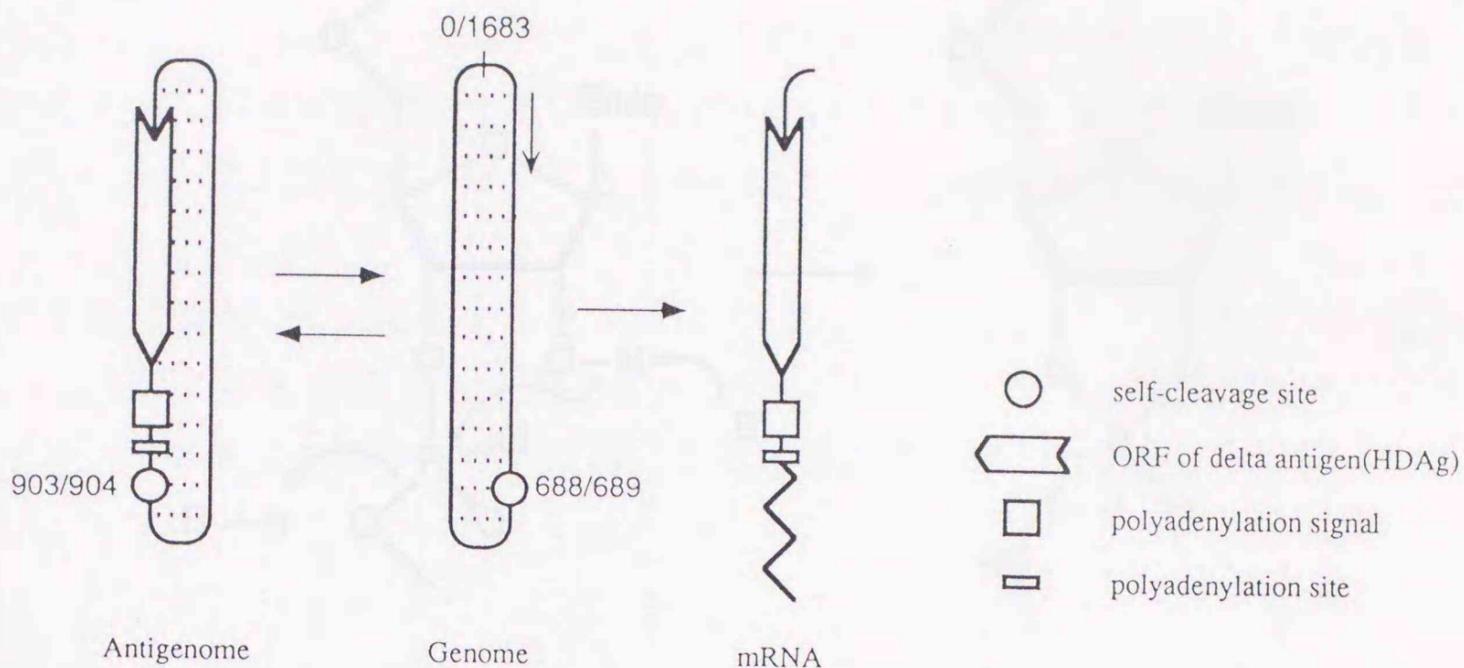


図3 HDV RNAの構造²⁷⁾

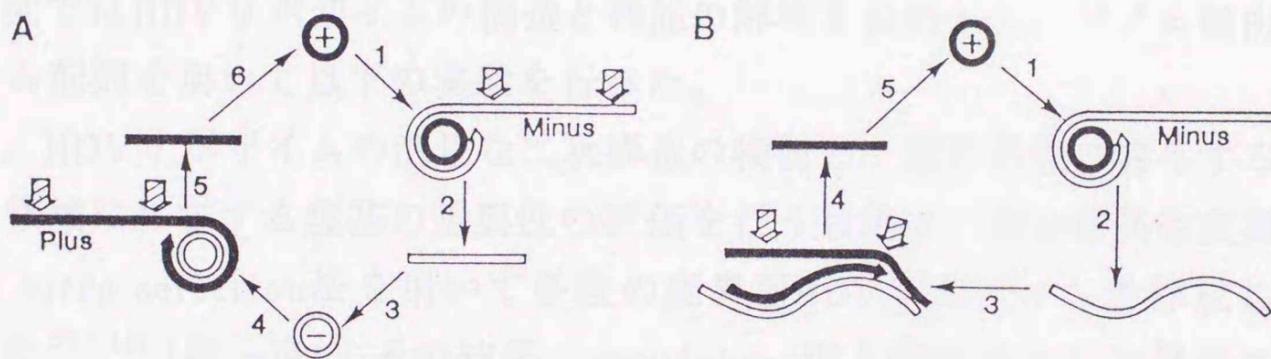


図4 ローリングサークル様式の複製³⁴⁾

HDVは天然においてヒトの細胞中で働くリボザイムとして見いだされたものである。このため、HDVリボザイムはヒト細胞中で効率よく活性を発現するよう温度、pH、金属イオンの種類及び濃度等に対して最適化されていることが考えられ、他の起源を有するリボザイムと比較して人体での応用に有利である可能性が高い。

HDVにおけるRNA鎖の自己切断では、ゲノム鎖、アンチゲノム鎖ともにハンマーヘッド型及びヘアピン型リボザイムと同じく、二価金属イオン存在下に5'水酸基と2',3'環状リン酸が生じることが明らかになっている^{9,29,35,36} (図5)。現在までに、自己切断反応に必要な塩基は100 nts以下の領域に存在することが明らかとなったが、このHDVリボザイムは他に知られているリボザイムとは一次あるいは予想される二次構造上に共通性が見いだされていない^{29,31,34}。

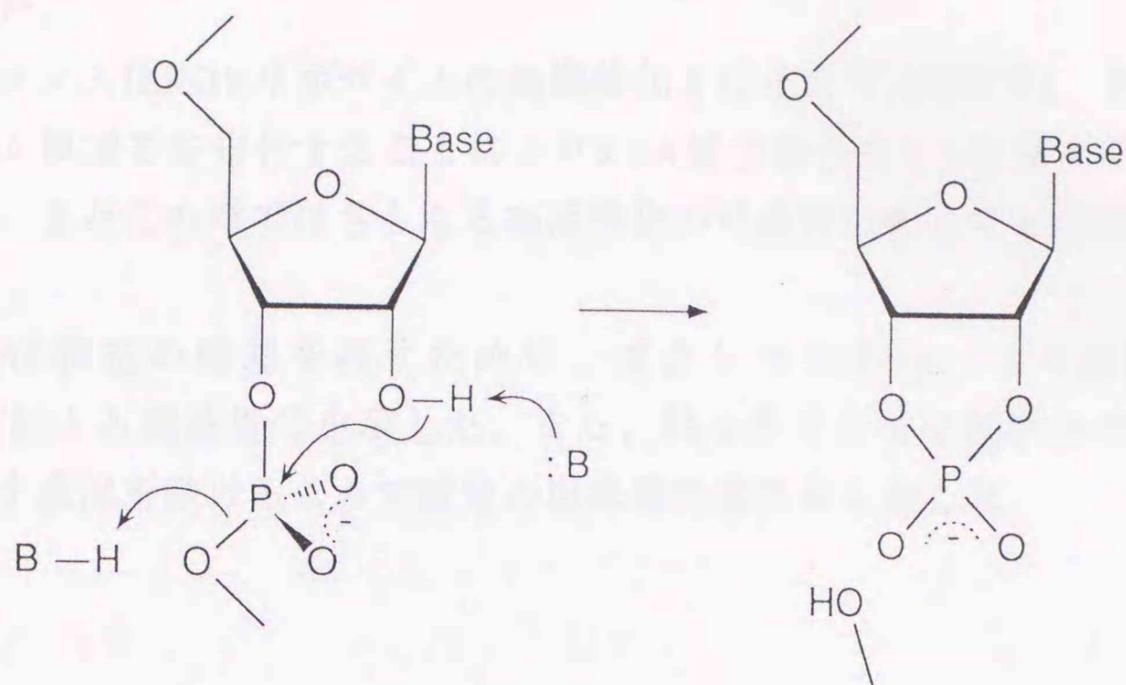


図5 5'水酸基と2',3'環状リン酸を生じるRNA鎖の切断

本研究ではHDVリボザイムの構造と機能の解明を目的とし、ゲノム鎖由来のリボザイム配列を用いて以下の実験を行った。

まず、HDVリボザイムの活性化二次構造の検討と、活性発現に関与すると考えられる領域に存在する塩基の重要性の評価を行う目的で、部位特異的変異導入法及び*in vitro* selection法を用いて多数の変異型HDVリボザイムを作成し、解析を行った³⁷⁻⁴⁰⁾ (第一章)。その結果、pseudoknot型と呼ばれる二次構造モデルが妥当であることを示し、機能上重要であると考えられる一本鎖領域に存在する特定残基の重要性を明らかにした。各一本鎖領域の機能についても考察し、2つの一本鎖領域は触媒のchemical stepに関与し、残る1つは構造保持に重要である可能性が高いことを示した。

次に実際のアプリケーションを目指し、分子内(シス)反応系であるゲノム鎖RNAを様々なパターンで分割し、分子間(トランス)反応を触媒するHDVリボザイムを作成した⁴¹⁾ (第二章)。その結果、ただ1つの分割パターンが有意な切断活性を保持することを明らかにし、またHDVリボザイムによるRNA鎖切断活性の評価系を構築した。

また、作成したトランス化HDVリボザイムを使用して、酵素反応速度論的解析を行った⁴²⁾ (第三章)。数種の基質を用いた実験により、HDVリボザイムの活性発現には、金属イオンが少なくとも2つの段階で関与することを明らかにし、律速

段階がリン酸ジエステル結合への求核攻撃に先立つ構造変化であると考えられることを示した。

最後にトランス化HDVリボザイムの高機能化を行った⁴¹⁾ (第四章)。その結果、特定のステム領域を安定化することによりRNA鎖切断活性を2桁増大させることに成功した。またこの章ではさらなる高活性化の可能性についても考察した。

本文中では特定の残基を表すために、ヌクレオチドの一文字表記の後にMakinoら²⁶⁾による残基番号を示した。また、残基番号の後に置換後のヌクレオチドの一文字表記を続けることで特定の塩基置換変異体を表した。

本論

第一章 HDVリボザイムの機能性二次構造の検討

HDVリボザイムの応用に先立って、活性発現に必要な塩基配列及び二次構造は不可欠な情報である。しかしこのリボザイムは尿素、ホルムアミド等の変性剤存在下に高活性を発現する⁴³⁻⁴⁶⁾という極めて特異な性質を有しているため、NMR等の分光学的手法やX線結晶構造解析あるいは熱力学的構造予測により得られる安定構造は活性発現に必要な機能構造と異なることが予想された。

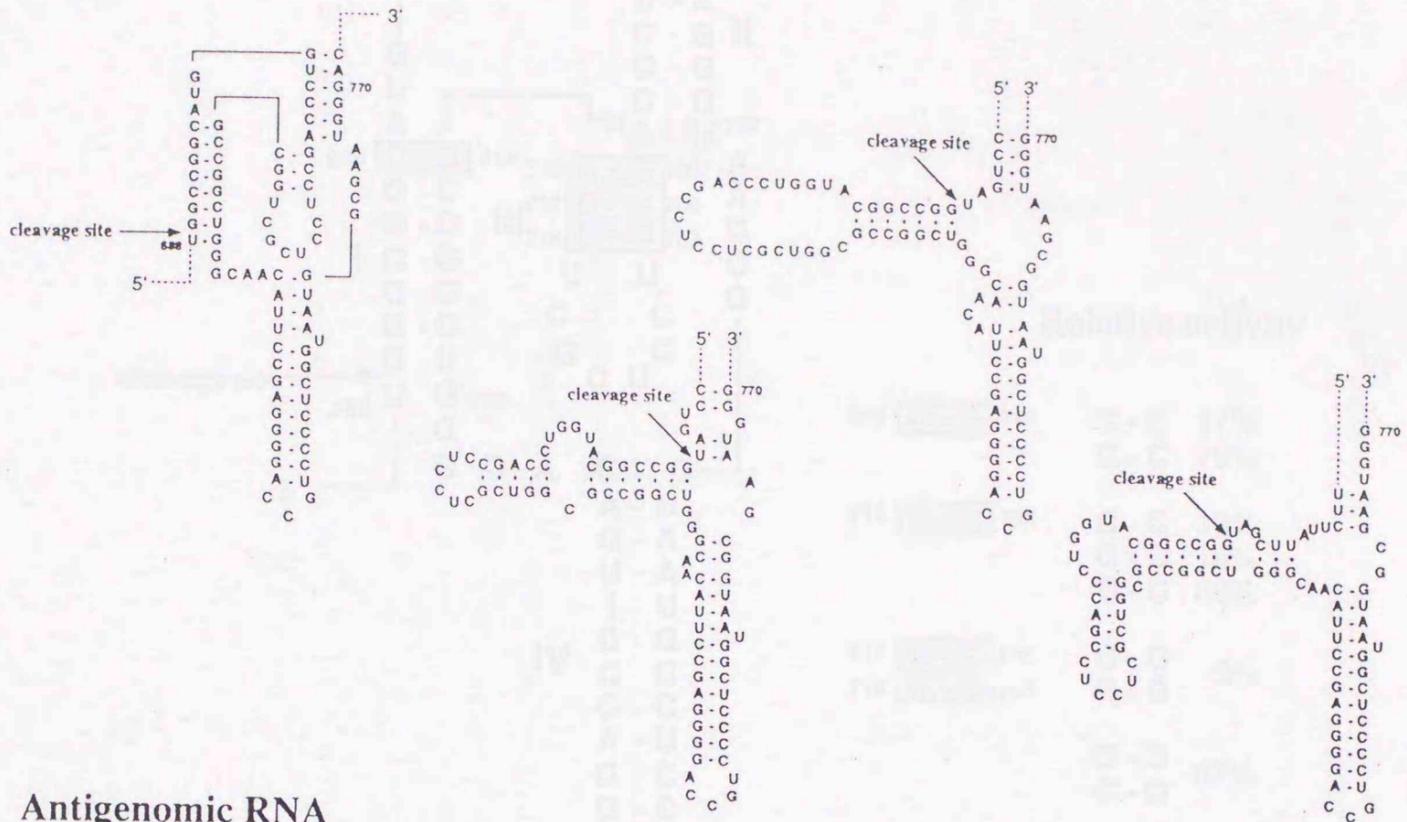
図6にいくつかのグループから提出された活性中心の二次構造モデル^{31,46-51)}を示した。著者がHDVリボザイムの構造に関する研究を開始した時点で、Laiら³¹⁾及びGottliebら⁴⁷⁾がすでに二次構造モデルを提出していたが、その後Beenら⁴⁸⁾とBranchら⁴⁹⁾が新たに二次構造モデルを提出し、先の二グループからも改良型のモデルが提出された^{46,50,51)}。著者の行った実験とこれらのモデルの発表時期とは前後しているが、簡略化のために全てのモデルは最終の形で表し、並列に論じるものとする。

LaiらのモデルはtRNA様のクローバーリーフモデルを基にしており、Gottliebらのモデルと共に熱力学的な安定性が考慮されている。Beenらの"pseudoknot"モデル及びBranchらの"axehead"モデルは、主に塩基置換による変異体作成の結果とアルカリ等を用いた限定分解のパターンを考慮して構築されたものであり、特にaxeheadモデルはハンマーヘッド型リボザイムとの類似性を強調している。

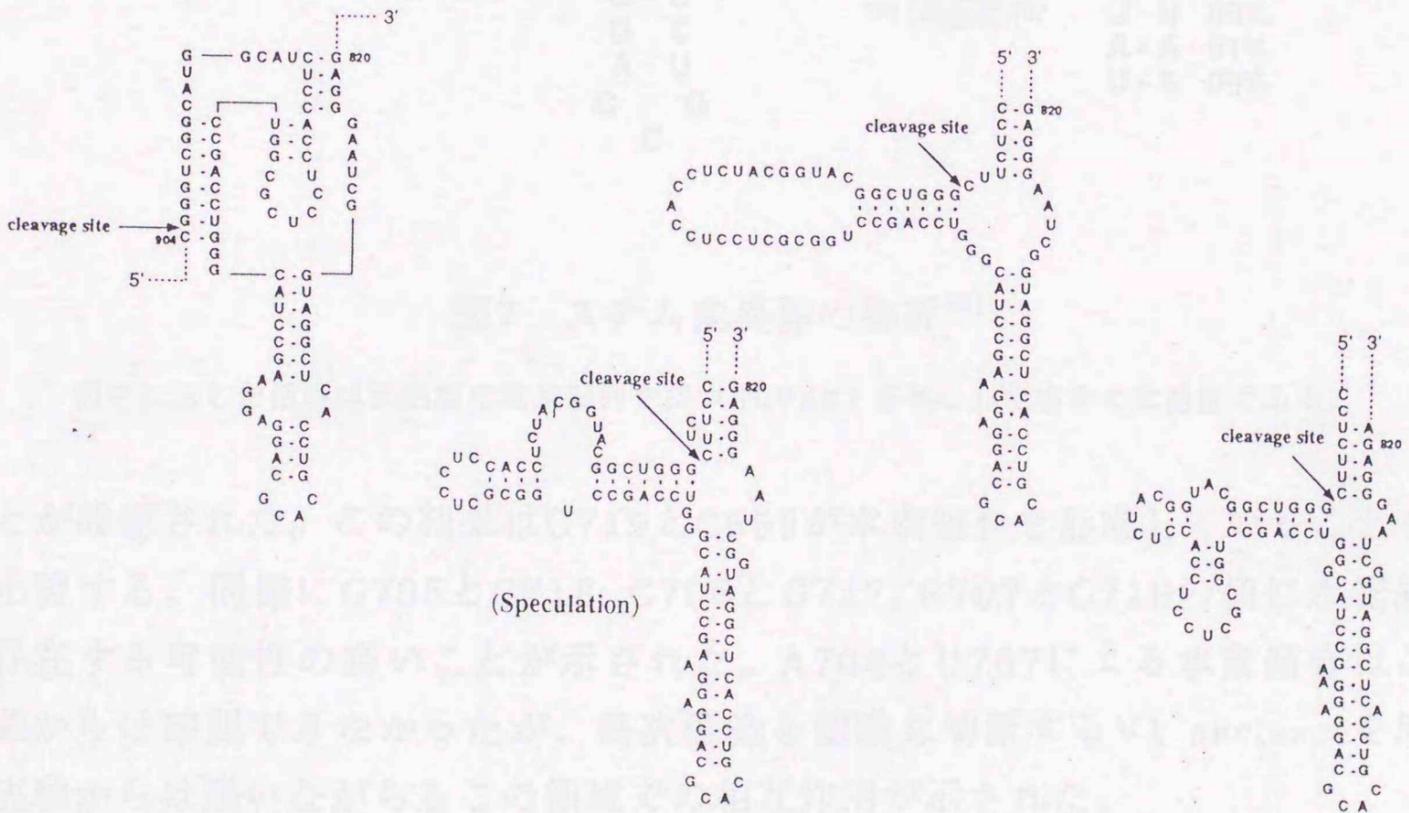
先に述べた理由により、活性発現の際の二次構造を決定する目的には、自己切断活性を指標にする評価系が最も適しているものと考えられる。ステムを形成する領域に対する塩基置換が活性に与える影響を系統的に調査することが二次構造モデルを評価する最も直接的な手法であるが、いずれの構造においても共通にステムを形成するのはU734からA759までの領域のみである。

著者の研究グループでは主にSuhがこの領域がステムループを形成することを確認し、ある程度の欠失が可能であることと共にすでに報告している⁵²⁾。また主にKumarが特定の構造モデルに特徴的なステム領域への変異導入を行い、pseudoknotモデルにおいて特徴的なステムの存在を示唆した^{53,54)} (図7)。本章第一節で述べる活性測定を行った結果、G719をCに置換することで活性は17%にまで減少したが、さらにC695をGに置換することで活性は79%にまで復活する

Genomic RNA



Antigenomic RNA



by Perrotta & Been

by Wu & Lai

by Branch & Robertson

by Gottlieb

図6 HDVリボザイムの活性中心の二次構造モデル

Wuらはアンチゲノム鎖に関してモデルを提出していないので、ゲノム鎖から推定した。

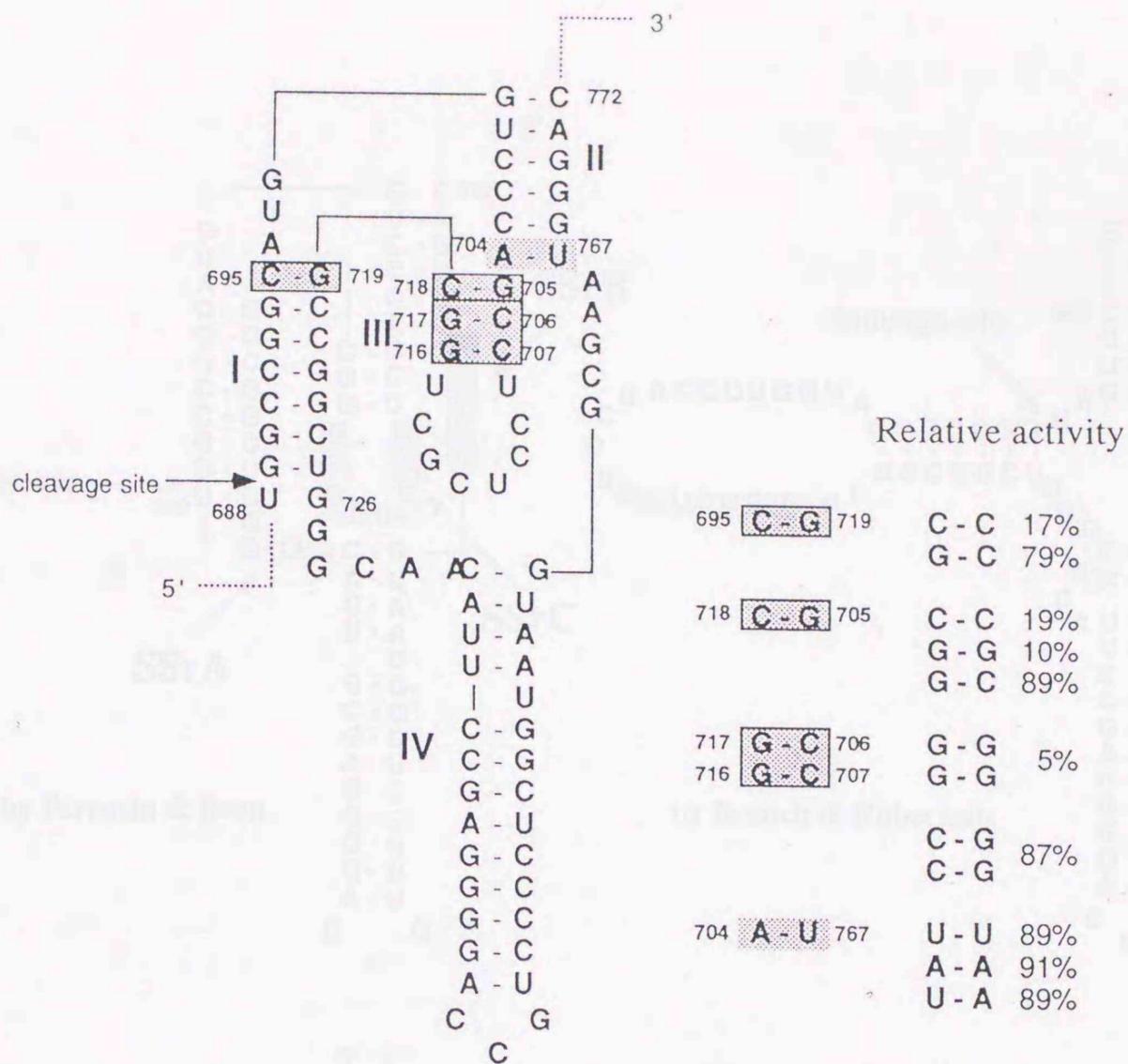


図7 ステム変異体の解析⁵³⁾

図中に示した活性は天然型の塩基配列を持つHDV88を基準とした場合の比活性である。

ことが確認された。この結果はG719とC695が水素結合を形成していることを強く示唆する。同様にG705とC718, C706とG717, C707とG716の間に水素結合が存在する可能性の高いことが示された。A704とU767による水素結合はこの実験からは確認できなかったが、高次構造を認識し切断するV1 nucleaseを用いた実験からは弱いながらもこの領域での相互作用が示された。

著者は標的として逆にループを形成する可能性のある領域に注目し、変異を導入することとした。ハンマーヘッド型リボザイムなど他の機能性RNAにおいては、塩基対形成に関与しないループ領域が活性発現に重要な働きを担っていることから、一本鎖領域への変異導入は機能性二次構造の同定と同時に、活性中心において重要な機能を有する残基の同定をも可能にすることが期待された。

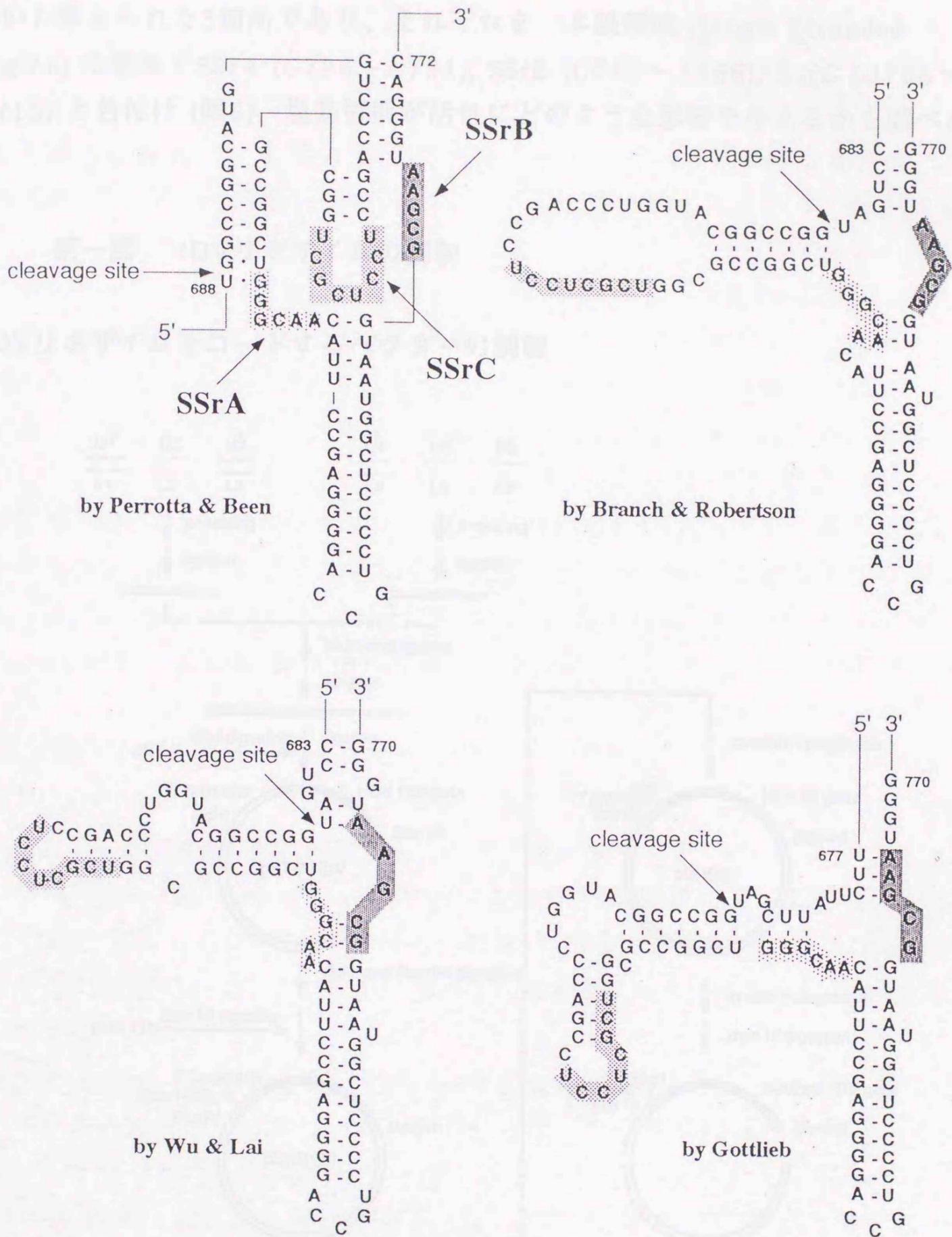


図8 HDVリボザイムに存在する3箇所的一本鎖領域

著者が注目したのは、いずれの二次構造モデル上でも塩基対形成への関与が少ないと考えられた3箇所であり、それぞれを一本鎖領域 (Single Stranded Region) の意味でSSrA (G726~A731), SSrB (G762~A766), SSrC (U708~U715) と名付け (図8)、塩基置換が活性にどのような影響を与えるかを調べた。

第一節 HDVリボザイムの調製

HDVリボザイムをコードするベクターの調製

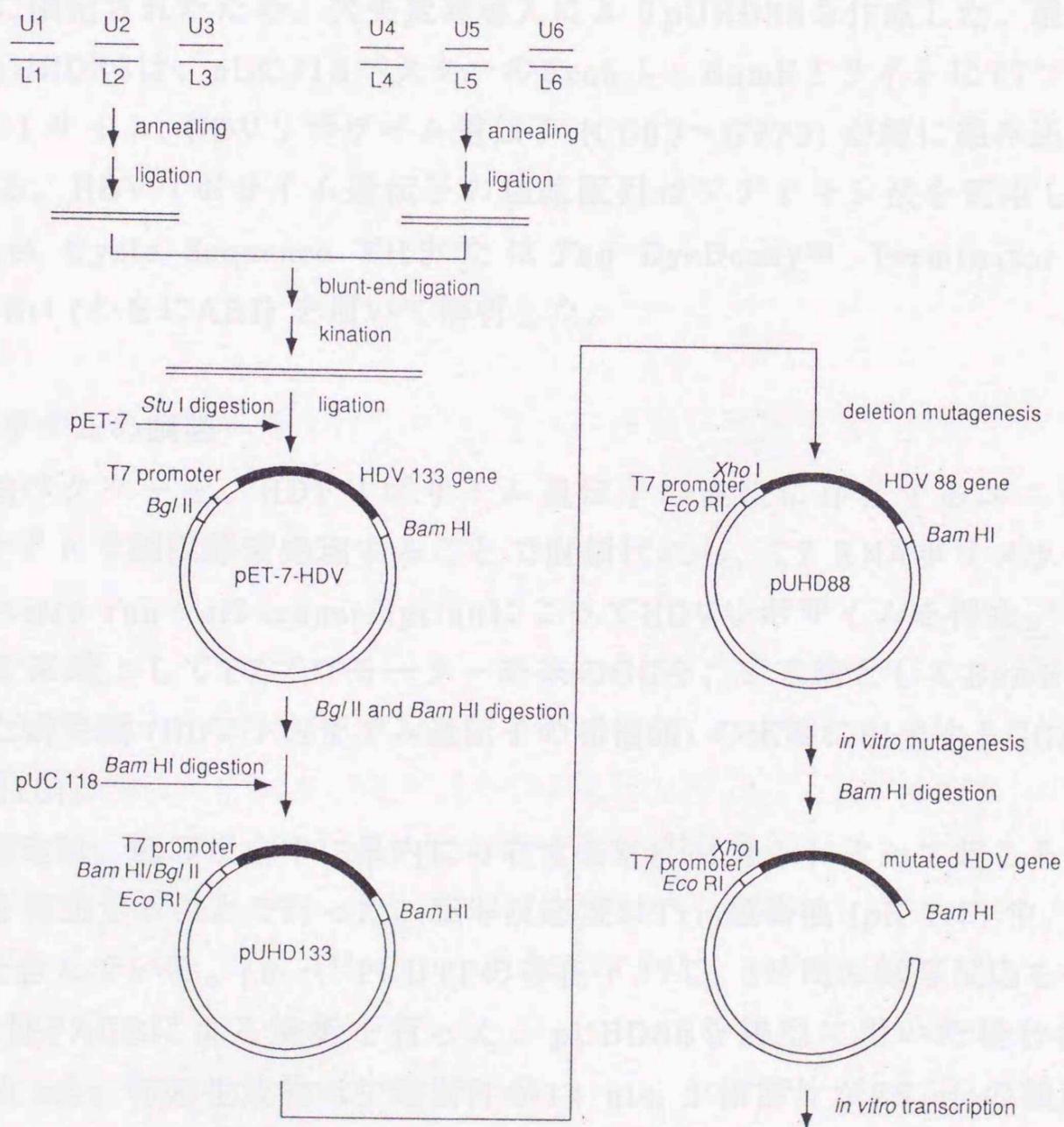


図9 HDVリボザイムをコードするベクターの構築⁵²⁾

HDVリボザイム遺伝子は、図9に示すように化学合成DNAフラグメントを酵素的に連結することで調製した⁵²⁾。C654からU786までの133 ntsを含むこのHDV遺伝子断片をT7プロモーターを含むプラスミドベクターに組み込むことで、T7 RNAポリメラーゼを用いた転写 (transcription) 反応によってHDVリボザイムを得ることができるpET7-HDVを構築した。

変異導入を容易にする目的で、T7プロモーターとHDV遺伝子を含むpET7-HDVのBglII-BamHI遺伝子断片をプラスミドベクターpUC118に組み込み、pUHD133を得た。pUHD133はpUC118に由来するM13ファージのintergenic領域を持つため、ヘルパーファージM13-KO7の存在下に閉環状一本鎖DNAを生じ、部位特異的変異導入法による変異導入及びジデオキシ法による塩基配列解析の際の鋳型となることができる。その後HDVリボザイムの必須配列の存在する領域がさらに限定されたため、欠失変異導入によりpUHD88を作成した。最終的に得られたpUHD88は、pUC118ベクターのEcoRI-BamHIサイトにT7プロモーター、XhoIサイト、HDVリボザイム遺伝子 (C683~G770) が順に組み込まれたものである。HDVリボザイム遺伝子の塩基配列はジデオキシ法を利用したTaq Dye Primer Cycle Sequence KitまたはTaq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequence Kit (ともにABI) を用いて解析した。

HDVリボザイムの調製

pUHD88ベクターを、HDVリボザイム遺伝子の直後に存在するユニークなBamHIサイトで制限酵素処理することで直鎖状にし、T7 RNAポリメラーゼを用いた*in vitro* run-off transcriptionによってHDVリボザイムを得た。得られるRNAは5'末端としてT7プロモーター終末のGGを、3'末端としてBamHIサイトで生じた鋳型鎖 (HDVリボザイム遺伝子の相補鎖) の末端に由来するGGAUCを有する (図10)。

活性の測定は、転写反応中に系内に存在するMg²⁺イオンによって起こる自己切断の割合を算出することで行った。転写反応液はTris緩衝液 (pH 7.5) 中、6 mMのMgCl₂を含んでいる。[α -³²P] UTPの存在下37℃、2時間の転写反応を行った後、8%変性PAGEによる解析を行った。pUHD88を鋳型に用いた場合前駆体RNAは100 nts、切断生成物は5'側断片が14 nts、3'側断片が86 ntsの鎖長を有している。泳動後100 ntsと86 ntsの断片の放射活性を測定し、86 ntsの断片の全体に占める割合を算出した。天然型のHDVリボザイム (HDV88) はこの活性測定の下ではほぼ100%の切断率を示した。

Template DNA

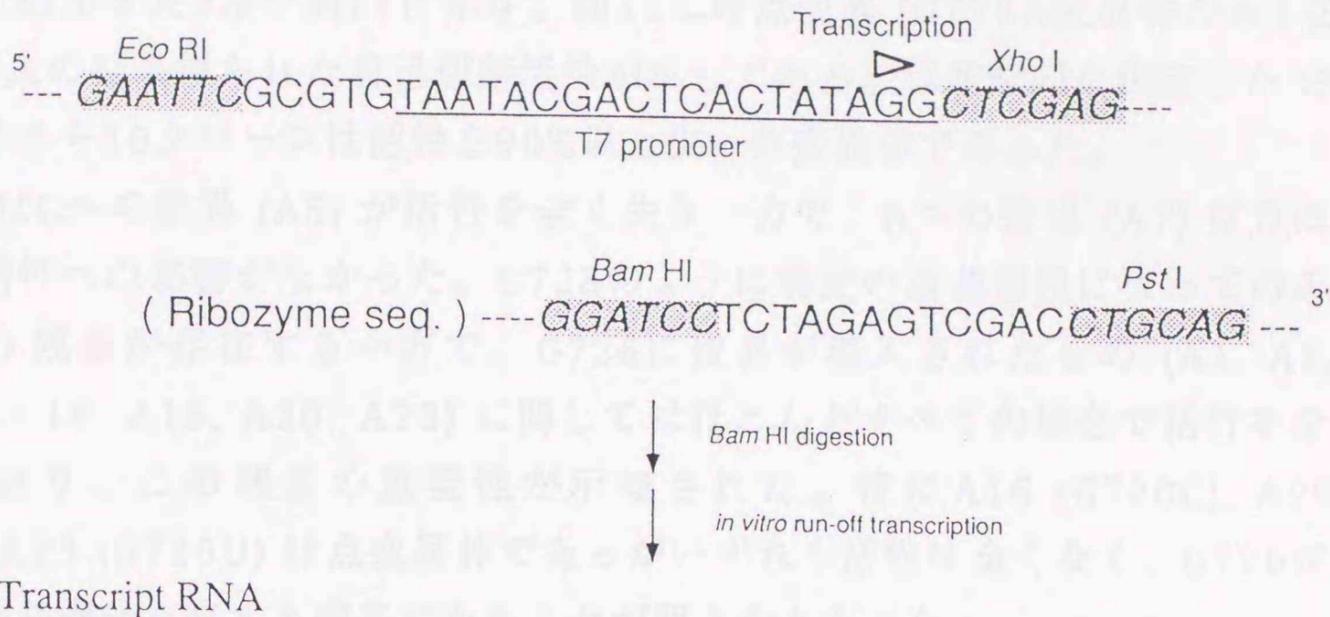


図10 *in vitro* run-off transcriptionによって得られるRNA

第二節 一本鎖領域A (SSrA) に存在する塩基の重要性の検討³⁷⁻³⁹⁾

SSrAへのランダム変異導入

まず、4塩基の混合ホスホアミダイトを用いてSSrAに相当する領域にランダムな塩基置換を導入した、C714からA744に相補的な配列を持つ31 ntsのプライマー d(TCCCCTCGGAATGTTGCCAGCCGGCGCCAG) を合成した。下線部の残基には天然型の塩基が62.5%、それ以外の3種の塩基が12.5%ずつ含まれている。一本鎖pUHD88ベクターを鋳型とした部位特異的変異導入法により、SSrAに変異が導入された変異型HDVリボザイム遺伝子をコードするベクターを作成した。このベクターによって大腸菌MV1184を形質転換し、単一化したコロニーから一本鎖及び二本鎖ベクターDNAを回収した。*Bam*HI処理により直鎖化した二本鎖ベクターDNAを鋳型として*in vitro* transcriptionを行い、自己切断活性を調べた。重要な残基への塩基置換が施された変異体では活性低下が観測されると考えられるため、明らかな活性低下が見られたものについて、一本鎖ベクターDNAより塩基配列を決定した。

SSrAにおけるランダム変異の解析

得られた結果を表2及び図11に示す。図11には点変異 (G728A変異体のみ2点変異) の導入の結果得られた自己切断活性が示してある。塩基配列を決定した23クローンのうち18クローンは活性を90%以上失った変異体であった。

G728ではCへの変異 (A5) が活性を全く失う一方で、Aへの変異 (A7) はそれほど大きな活性への影響がなかった。G728のように特定の塩基置換によってのみ活性を失う残基が存在する一方で、G726に変異が導入されたもの (A1, A3, A12, A14 - 16, A19, A20, A23) に関してはほとんどすべての場合で活性を全く失っており、この残基の重要性が示唆された。特にA16 (G726C), A20 (G726A), A23 (G726U) は点変異体であるがいずれも活性は全くなく、G726が非常に重要な機能を有する残基であることが明らかとなった。

逆にC729に関しては、変異導入が活性低下の原因となったと考えられる変異体が見られず、機能上の重要性が少ない残基である可能性が示唆された。

	726 G	727 G	728 G	729 C	730 A	731 A	Cleavage activity (%)
A1	A	U	-	G	-	-	1
A2	-	-	C	-	G	-	0
A3	A	C	-	-	-	-	6
A4	-	A	C	U	-	-	4
A5	-	-	C	-	-	-	0
A6	-	-	C	-	-	U	1
A7	-	-	A	-	U	-	62
A8	-	-	A	A	-	C	19
A9	-	-	A	U	C	U	12
A10	-	C	U	-	C	-	0
A11	-	A	C	-	-	-	3
A12	A	-	-	-	C	-	0
A13	-	-	-	-	C	-	32
A14	A	-	A	G	-	-	0
A15	U	U	-	-	-	C	4
A16	C	-	-	-	-	-	0
A17	-	-	-	-	C	C	0
A18	-	C	-	A	-	G	0
A19	A	C	-	-	-	C	2
A20	A	-	-	-	-	-	0
A21	-	C	-	-	-	-	0
A22	-	-	-	-	-	C	39
A23	U	-	-	-	-	-	0

表2 SSrAにおけるランダム変異体³⁷⁾

点変異では活性を示さないものが、複数の変異によって活性を再獲得する例も見られた。点変異で完全に失活するG726への変異を含むA1, A3, A15, A19で

は、いずれもその活性は低いものの自己切断活性を復活している。特にクローン A3ではともに点変異では失活するG726A変異 (A20) とG727C変異 (A21) が同時に導入された結果、活性を再度獲得する結果となっていた。このような変異の組み合わせによる活性への影響を議論することは個々の残基の機能を考察する上で非常に重要であるが、現時点では一般的結論を導くことができず、今後課題を残すこととなった。

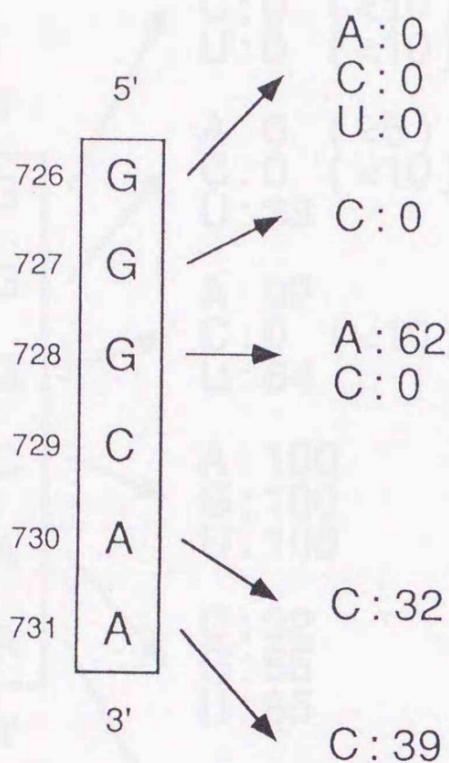


図11

SSrAへのランダム変異導入の結果³⁷⁾

二次構造を考察する上では、活性を失うことのない変異の情報も必要である。そこで単独の変異による活性への影響を詳しく考察するために、次にSSrAにおける点変異体を作成した。

SSrAへの点変異導入

SSrAへの点変異の導入は、ランダム変異の導入と同様に一本鎖pUHD88ベクターを鋳型とした部位特異的変異導入法により行なった。点変異導入に際しては特定の点変異体に対応するプライマーを合成し、各々の変異体について別個に変異導入を行なった。

SSrAにおける点変異の解析

得られた結果を数値化したのが図12 - aである。転写反応中での自己切断が認

められなかった6種の変異体に関しては、前駆体を変性PAGEから回収し、50 mM Tris - HCl (pH 8.0), 25 mM MgCl₂, 50°Cのより強い条件下で3時間の自己切断反応を行ない、自己切断活性を測定した (図12 - a中括弧内に示した値)。

大きく活性が低下した6種の変異体を含む、G726, G727, G728における変異体の自己切断パターンを図12 - bに示した。

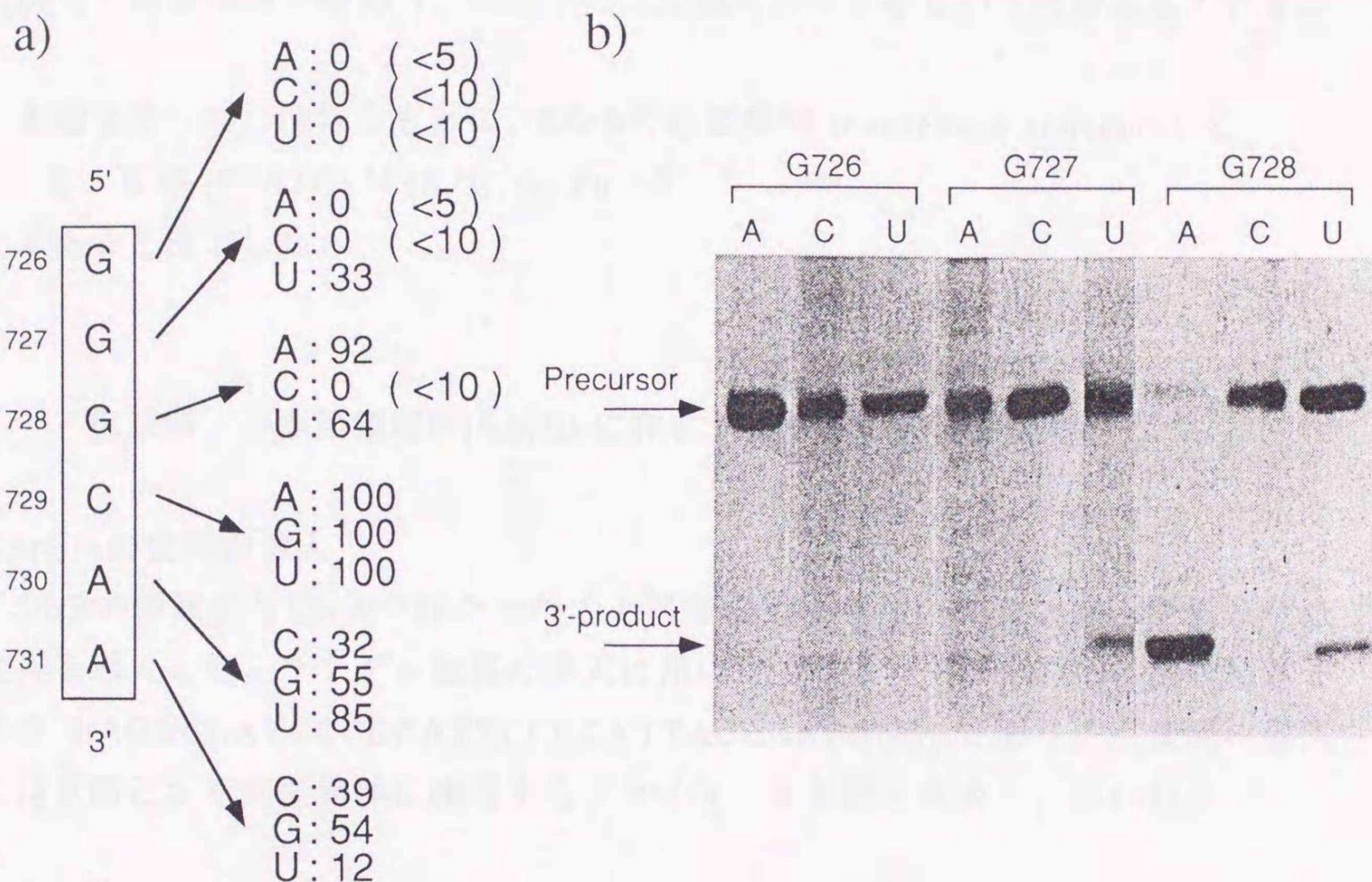


図12 SSrAにおける点変異の影響³⁸⁾

G726に関しては、いずれの塩基置換によってもほぼ完全に活性が失われる結果となり、この残基がHDVリボザイムの触媒機能の発現に重要な働きを持つことが示された。

逆に、C729, A730, A731はいくつかの塩基置換である程度の活性低下が見られるものの、基本的にA, G, C, Uのいずれであっても活性に大きな影響を及ぼさない。これらの残基については、二次構造上への影響がないものと考えられる。

axeheadモデルではC729とA730が水素結合を形成する必要がある。同様にLaiらのモデルでもC729が水素結合の形成に寄与している。しかしC729及び

A730、特にC729はいずれの塩基であっても活性に影響はなく、水素結合には関与しないと考えられるため、axeheadモデルとLaiらのモデルは少なくともこの部分での正当性を欠いていると言える。

WuらはSSrAに相当する“ヒンジ領域”への変異導入を行なっている^{50,55)}。使用したRNA配列の相違によるものと考えられる細部での差異も見られるが、G726に関しては重要性を確認し、活性中心の形成に寄与するという考察をしている。

本節で得られた情報をもとに、SSrAの必要配列 (consensus sequence) を

5' G G (G/A/U) N (A/U/G) Pu 3'

であると決定した。

第三節 一本鎖領域B (SSrB) に存在する塩基の重要性の検討³⁷⁻³⁹⁾

SSrBへの変異の導入

SSrBの領域にもSSrAで行なったのと同様の手法を用いてランダム変異及び点変異を導入した。ランダム変異の導入に用いたプライマーは下線部に混合塩基を含む d(AGAGGATCCCCCATTCGCCATTACCGAGGGG) であり、点変異の導入には目的とする点変異体に相当するプライマーを別個に合成し、用いた。

SSrBにおけるランダム変異の解析

得られた結果を表3に示す。塩基配列を決定した20クローンのうち17クローンで活性を90%以上失っていた。

SSrBではSSrAでのランダム変異と比較して点変異体が少なかった。しかし、G764U変異は活性に影響しない (B4) が、B1は活性を失うことから、A765C変異は重要であることが推察できる。同様にG762U変異は重要ではない (B3, B4) がB6及びB10は失活することからA766 (C/G) 変異は重要である。このようにして点変異の影響であることが予想できる4種の変異体と点変異体5種とについて図13に自己切断活性を示した。

SSrBにおいてもSSrAで見られたG726と同様、非常に重要であると考えられる残基が存在した。B8 (C763A), B18 (C763U), B19 (C763G) は点変異であるが

いずれも活性は全くなく、C763は活性発現に大きく寄与する残基であることが明らかとなった。

またSSrAにおけるC729と同様、G764に関しては変異導入が活性低下の原因となったと考えられる変異体を得られず、機能上の重要性が少ない残基であると考えられた。

	762 G	763 C	764 G	765 A	766 A	Cleavage Activity (%)
B1	-	-	U	C	-	0
B2	-	G	-	U	-	0
B3	U	-	-	-	-	78
B4	U	-	U	-	-	100
B5	-	A	-	-	G	0
B6	U	-	-	-	C	0
B7	-	-	-	U	-	79
B8	-	A	-	-	-	0
B9	A	-	A	-	-	10
B10	U	-	-	-	G	0
B11	A	-	-	U	-	0
B12	-	G	-	U	-	0
B13	C	G	-	C	-	0
B14	C	U	A	-	-	0
B15	C	G	A	C	-	0
B16	A	G	C	-	U	0
B17	-	A	A	-	-	0
B18	-	U	-	-	-	0
B19	-	G	-	-	-	0
B20	-	G	A	-	U	0

表3 SSrBにおけるランダム変異体³⁷⁾

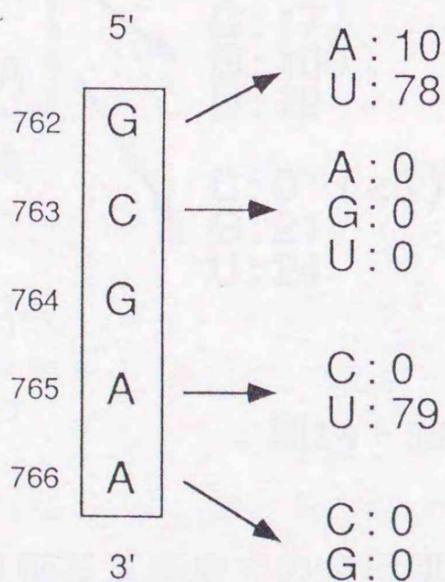


図13 SSrBへのランダム変異導入の結果³⁷⁾

SSrAにおけるG726はいずれの塩基置換によっても単独で活性をほぼ完全に失ったが、いくつかの変異体で複数の変異によって活性を再獲得する例が見られた。

しかしC763が置換された場合、他の部位への変異によって活性を復活する例は見られず、G726よりも活性に対して直接的な機能を有していることも考えられる。

SSrBにおける点変異の解析

得られた結果を数値化したのが図14 - aである。3つの残基への6種の変異体に関して転写反応中での自己切断が認められなかったため、回収した前駆体RNAを用いて前節に示した強い条件下での自己切断反応を行ない、自己切断活性を測定した(図14 - a中括弧内に示した値)。

大きく活性が低下した変異体を含むC763, A765, A766における変異体の自己切断パターンを図14 - bに示した。ランダム変異の実験でも認められたC763のみが、いずれの塩基置換によっても完全に活性を失った。

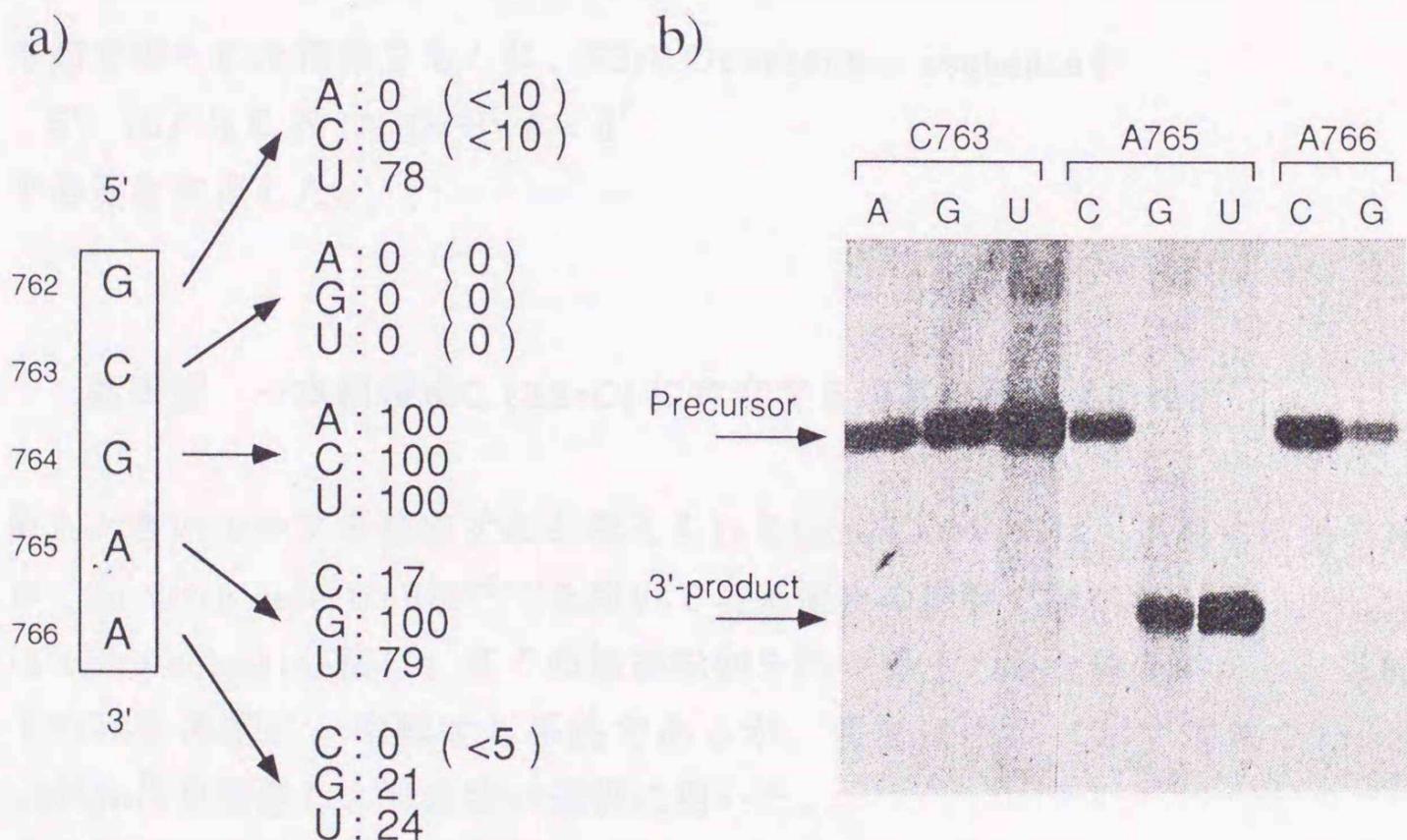


図14 SSrBにおける点変異の影響³⁸⁾

やはり転写反応中での自己切断を起こさないG726の変異体では、高Mg²⁺イオン濃度存在下に高温で自己切断反応を行なうと10%以下という効率ながら自己切断活性が認められたのに対して、C763への塩基置換はこの条件下においても全く自己切断が認められなかった。すなわちこの残基がHDVリボザイムの触媒機能

の発現に必須であることが示された。

塩基置換による失活は塩基部における相互作用の喪失が主な理由であるが、塩基対形成にのみ関与するものであればミスマッチ塩基対による幾らかの活性回復が期待される。従ってSSrAにおけるG726とSSrBにおけるC763の2つの残基は塩基対形成以外の塩基部での相互作用、恐らくは金属等との配位に関与し、RNAの切断に直接的な影響を及ぼす残基である可能性が高いと考えられた。

塩基置換が活性に大きな影響を及ぼさなかった残基はG764とA765の2つであった。SSrAで行なったのと同様の考察を行なうと、Gottliebらのモデルではこれらの二次構造上への影響がないものと考えられる残基が水素結合の形成に寄与しており、正しいモデルでない可能性が高いと考えられた。

本節で得られた情報をもとに、SSrBのconsensus sequenceを

5' (G/U) C N (A/G/U) A 3'

であると決定した。

第四節 一本鎖領域C (SSrC) に存在する塩基の重要性の検討⁴⁰⁾

最も大きいループを形成すると考えられるSSrCについては、迅速に結果を得るため、*in vitro* selection法^{56,57)}を用いて塩基置換の影響を調べた。

in vitro selection法は、多くの塩基配列を持つ分子の集合体の中から、目的の分子のみを選択し、増幅する手法であるが、著者は図15に示す簡便な*in vitro* selection法を開発し、目的物の選択に用いた。

まずPCRを利用した変異導入法により、SSrCのいずれかの残基に変異が導入された種々の点変異体HDVリボザイムをコードする遺伝子断片を作成した。T7プロモーターを含むこの遺伝子断片をT7 RNAポリメラーゼによって転写することで、SSrCに変異を含む多数のHDVリボザイムの混合物を得、高濃度Mg²⁺の存在下で自己切断させた。ここで活性に大きな影響を及ぼす塩基置換が施された分子は自己切断活性を失い、切れ残る。

次いで、DNase I及びBAL31 Nucleaseによる鋳型DNAの消化を行い、反応液中にRNA分子のみを残し、逆転写反応を行った。自己切断活性を失った分子と、

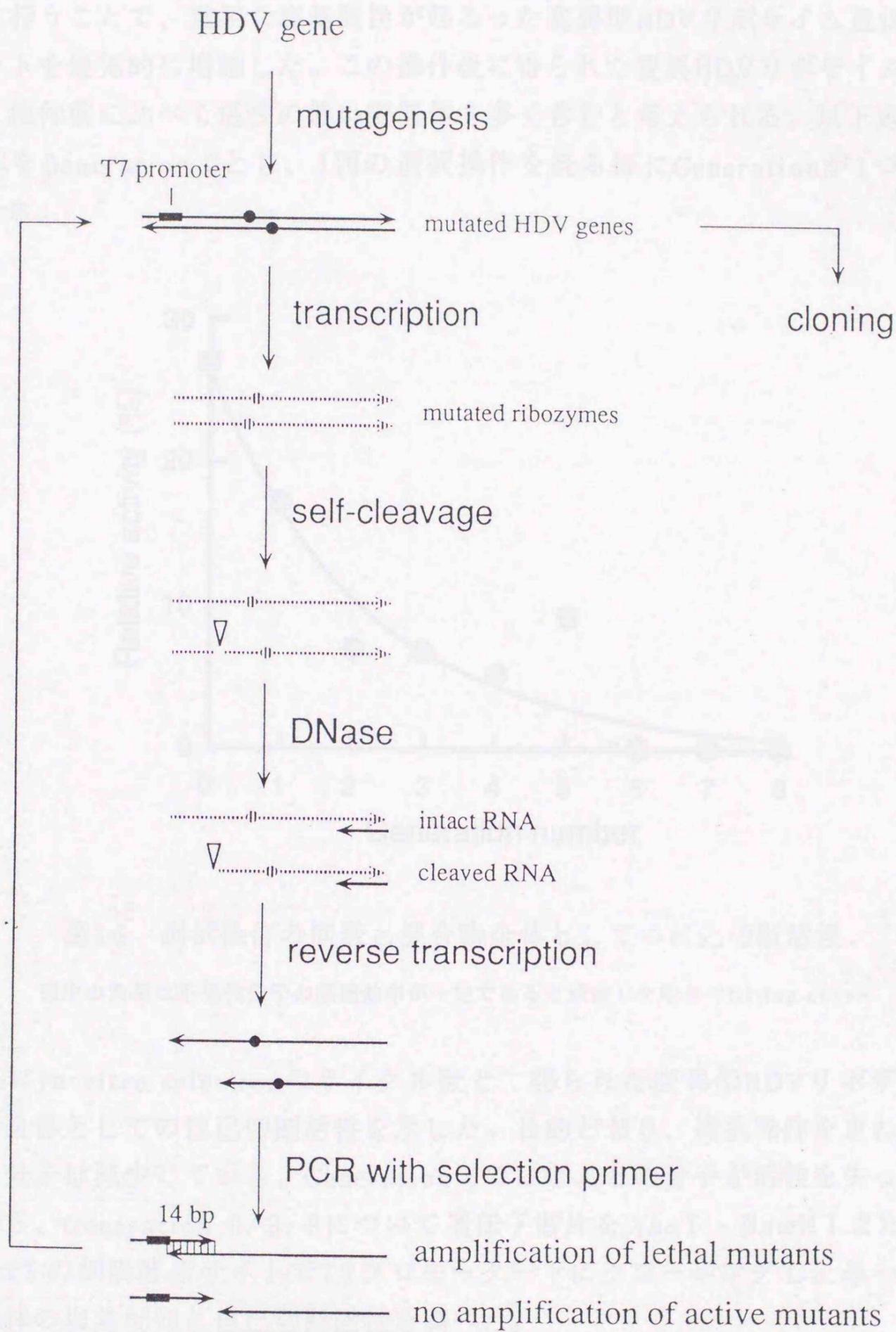


図15 PAGEからの分離抽出操作を含まない *in vitro* selection法⁴⁰⁾

自己切断により短鎖となった分子に由来する2種類の鎖長の相補鎖DNAが生じるが、不活性な分子由来の長鎖DNAにのみ選択的に結合するプライマーを用いたPCRを行うことで、重要な塩基置換が起こった変異型HDVリボザイム遺伝子フラグメントを優先的に増幅した。この操作後に得られた変異HDVリボザイムの混合物は、操作前に比べて活性の低い変異体を多く含むと考えられる。以下選択前の集合体をGeneration 0とし、1回の選択操作を経る毎にGenerationが1つ増すものとする。

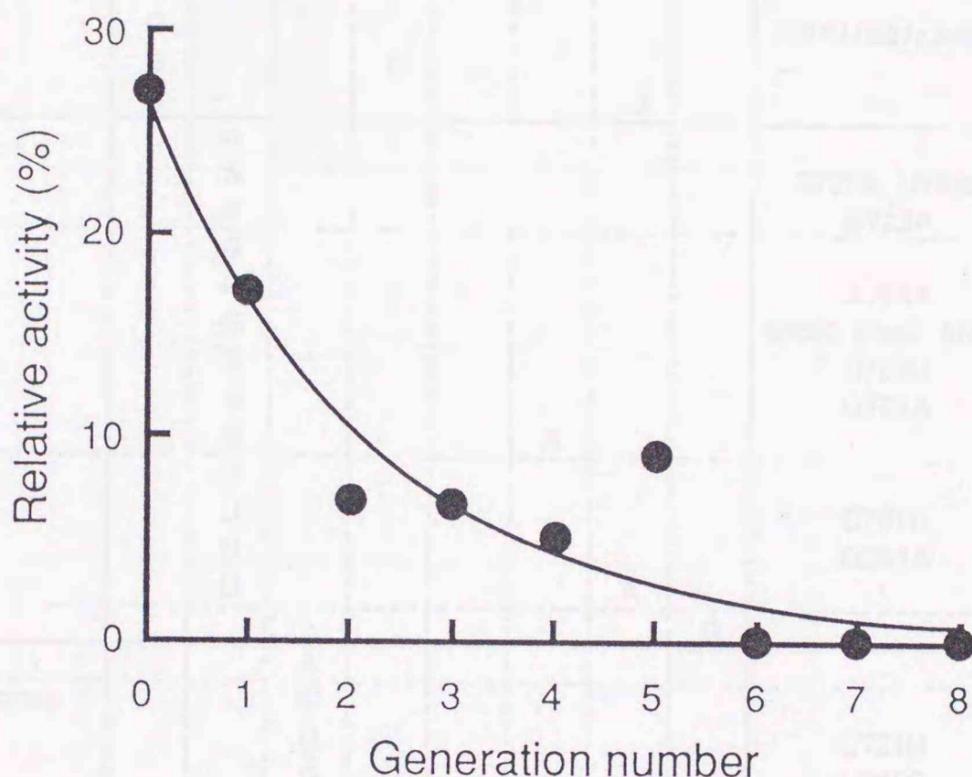


図16 選択操作の回数と混合物全体としての自己切断活性

図中の曲線は不活性分子の濃縮効率が一定であると仮定した場合のfitting curve

図16に*in vitro* selectionのサイクル数と、得られた変異型HDVリボザイムの混合物全体としての自己切断活性を示した。目的どおり、選択操作を重ねる毎に活性な分子は減少していき、Generation 6でほとんどの分子が活性を失った。この中から、Generation 0, 3, 8について遺伝子断片を *Xho*I - *Bam*H I または *Xho*I - *Pst*I の制限酵素サイトでT7プロモーター下にクローニングし、単一化された変異体の塩基配列と自己切断活性を調べた。

なおSSrCへの変異導入には、クローニングの際 β -galの α 相補性を利用する目的で、pUHD88の *Bam*H I サイト直前に存在するGGを除いたpHDV86ベクターを鋳型に用いた。

Isolated clone	U708	C709	C710	U711	C712	G713	C714	U715	Other mutations	Relative activity
Control (HDV86)										100
G3-029	A									8
G0-006	A								C732U	0
G3-008	A								G690U, U725A	0
G3-069	A								C706U, G742A	0
G3-083	A								C763U	0
G3-127	A								C751U, A765U	0
G8-222	A				A				U734C	0
G3-115, +2	C									25
G3-044	C								C707U	0
G3-061	C								U697C, G770A	BamHI disappeared
G3-078	C	G						A		0
G3-062	C							G		0
G0-101	G									78
G0-079	G								C737U, U687Δ, A688Δ	100
G0-120	G			C						44
G0-136	G						U			100
G3-033, 064		A								13
G3-036		A							G727A, U748C	4
G3-116		A							G723A	BamHI disappeared
G3-015		G								0
G3-011		G							G764A	0
G3-013		G							G723C, G728U, A744C	0
G3-110		G							C729U	3
G3-112		G							G762A	0
G3-151		G				A				9
G3-039		U								7
G3-007		U							C701U	24
G3-100		U							G761A	46
G3-079		U					A			100
G0-061			C					G		0
G0-007			A							100
G0-113 and 2 clones			G							94
G0-114			G						C721U	62
G3-038			G						U725C	52
G3-002			G		U					0
G0-129, 105			U							100
G0-082, 109				C						100
G0-088					A					100
G3-131						A				BamHI disappeared
G0-112						A	A			91
G3-025						C			U700C	0
G8-148						U			clone site dup.	83
G0-103, 015							A			100
G0-030							A		U725A	100
G0-050							G		A688Δ	100
G3-031							G		C724A, G743A	19
G0-118 and 6 clones							U			100
G0-133								A		100
G0-038								C		100
G0-110								C	A696G	38
G0-135								G		100
G0-107								G	G723A	91
G0-121									A731G	100

表4 SSrCにおける変異体

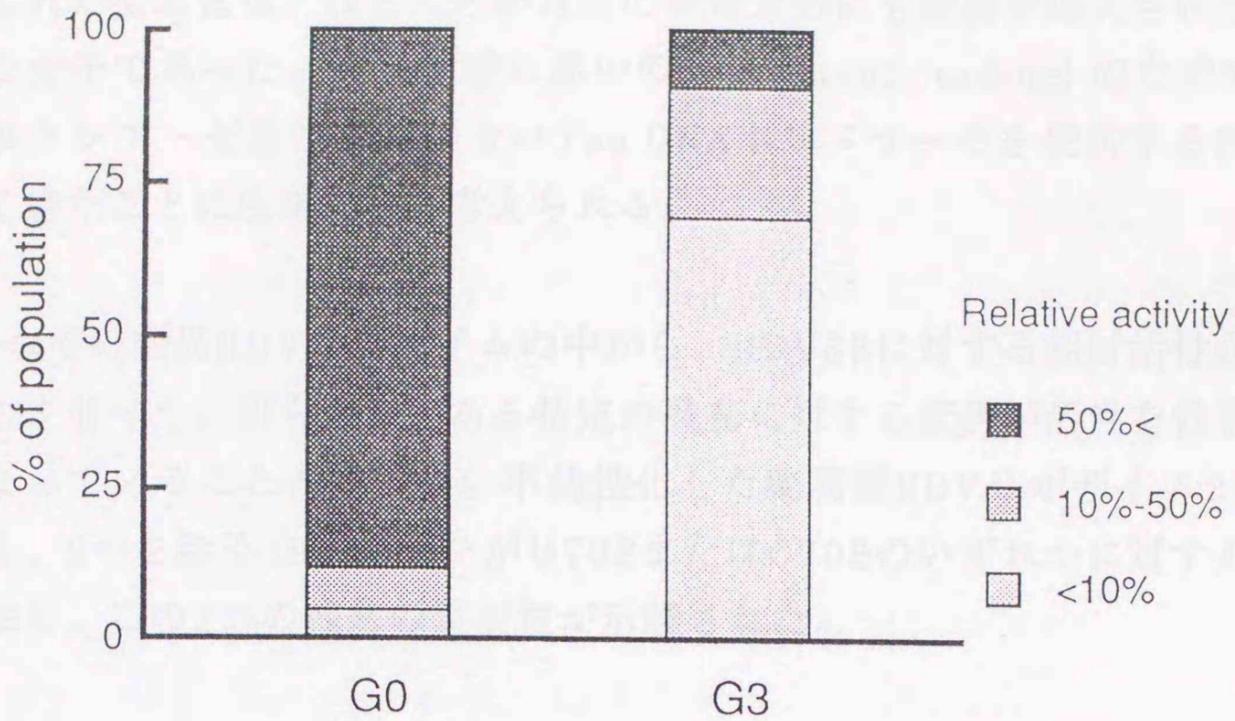


図17 選択操作による不活化HDVリボザイム変異体の濃縮

	708	709	710	711	712	713	714	715	Relative activity (%)	Other mutations
	U	C	C	U	C	G	C	U		
G3-29	A	-	-	-	-	-	-	-	<10	
G0-6	A	-	-	-	-	-	-	-	0	C732U
G3-8	A	-	-	-	-	-	-	-	0	G690U, U725A
G3-69	A	-	-	-	-	-	-	-	0	C706U, G742A
G3-83	A	-	-	-	-	-	-	-	0	C763U
G3-127	A	-	-	-	-	-	-	-	0	C751U, A765U
G8-222	A	-	-	-	A	-	-	-	0	U734C
G3-44	C	-	-	-	-	-	-	-	0	C707U
G3-62	C	-	-	-	-	-	-	G	0	
G3-78	C	G	-	-	-	-	-	A	0	
G3-15	-	G	-	-	-	-	-	-	0	
G3-11	-	G	-	-	-	-	-	-	0	
G3-13	-	G	-	-	-	-	-	-	0	G764A
G3-112	-	G	-	-	-	-	-	-	0	G723C, G728U, A744C
G3-110	-	G	-	-	-	-	-	-	0	G762A
G3-151	-	G	-	-	-	A	-	-	<5	C729U
G0-61	-	C	-	-	-	-	-	G	<10	
G3-36	-	A	-	-	-	-	-	-	0	
G3-39	-	U	-	-	-	-	-	-	<5	G727A, U748C
G3-2	-	-	G	-	U	-	-	-	<10	
G3-25	-	-	-	-	-	C	-	-	<5	U700C

表5 重要な残基に変異が導入された不活化HDVリボザイム変異体

表4及び図17にランダムに変異体を選び、塩基配列及び自己切断活性を調べた結果を示した。SSrCの領域に均一な変異が導入されたと考えられるGeneration 0では、活性を失ったHDVリボザイムは僅か3% (2/60) であったが、3回の選択

操作後には66% (21/32) の変異体が活性を90%以上失っていた。Generation 8から得られた変異体は、ほとんどが目的の部位以外にも変異が導入されたものや不完全な分子であった。これは読み違いの修復 (proof reading) のための3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持たない *Taq* DNAポリメラーゼを使用するPCRの操作を多く経たことに由来すると考えられる。

表5に全ての変異HDVリボザイムの中から、HDV88に対する相対活性が10%以下のものを並べた。明らかに、ある特定の残基に対する変異が活性を低下させる原因となっていることが解った。不活性化した変異型HDVリボザイム21クローンのうち、2つを除く19クローンがU708またはC709のいずれかに対する変異を有しており、この2つの残基の重要性が示唆された。

	708	709	710	711	712	713	714	715	Relative activity (%)
	U	C	C	U	C	G	C	U	
G3-29	A	-	-	-	-	-	-	-	<10
G0-101	G	-	-	-	-	-	-	-	78
G3-115	C	-	-	-	-	-	-	-	85
G3-33	-	A	-	-	-	-	-	-	<10
G3-15	-	G	-	-	-	-	-	-	0
G3-39	-	U	-	-	-	-	-	-	<10
G0-7	-	-	A	-	-	-	-	-	100
G0-113	-	-	G	-	-	-	-	-	94
G0-129	-	-	U	-	-	-	-	-	100
G0-82	-	-	-	C	-	-	-	-	100
G0-88	-	-	-	-	A	-	-	-	100
G3-2	-	-	G	-	U	-	-	-	<5
G3-25	-	-	-	-	-	C	-	-	<5
G8-148	-	-	-	-	-	U	-	-	83
G3-131	-	-	-	-	-	A	-	-	100
G0-112	-	-	-	-	-	A	A	-	91
G0-103	-	-	-	-	-	-	G	-	100
G0-50	-	-	-	-	-	-	U	-	100
G0-118	-	-	-	-	-	-	-	U	100
G0-133	-	-	-	-	-	-	-	A	100
G0-135	-	-	-	-	-	-	-	G	100
G0-38	-	-	-	-	-	-	-	C	100

表6 SSrCにおける点変異の影響⁴⁰⁾

表6にはSSrCにおける点変異の影響を調べた結果を示した。SSrA, Bでの結果と比較して、活性に大きな影響を及ぼす変異は多くはないが、表5の結果から予想されたU708、C709に対する変異がやはり点変異で十分活性を低下させることが確認できた。単独で自己切断活性を90%以上抑えた点変異は、U708A, C709 (A/G/U), G713Cの5種であった。SSrCにおいてもっとも重要であると考えられ

たのはC709であり、いずれの塩基置換によっても活性は10%以下に低下した。しかしSSrA, Bにはいかなる塩基置換によっても完全に失活する残基が存在したのに対し、SSrCにおける点変異体で活性が全く失われたのはC709Gのみであった。

ThillらはSSrCを構成する8塩基のうち1塩基を欠失して7塩基ループを形成させ、その影響を調べている⁵⁸⁾。このとき、C709 (またはC710) を欠失した場合が最も大きく自己切断活性を失う結果を得ており、C709が活性発現に重要な寄与を果たすという著者の得た知見と一致する。

一方、C710とC714、そしてU715はどの塩基に置換した場合にもほとんど、あるいは全く活性を失わなかった。Laiらのモデル及びGottliebらのモデルではC714とU715に水素結合の形成を要求しているが、実際にはこれらの残基は水素結合に関与しないと考えられる。

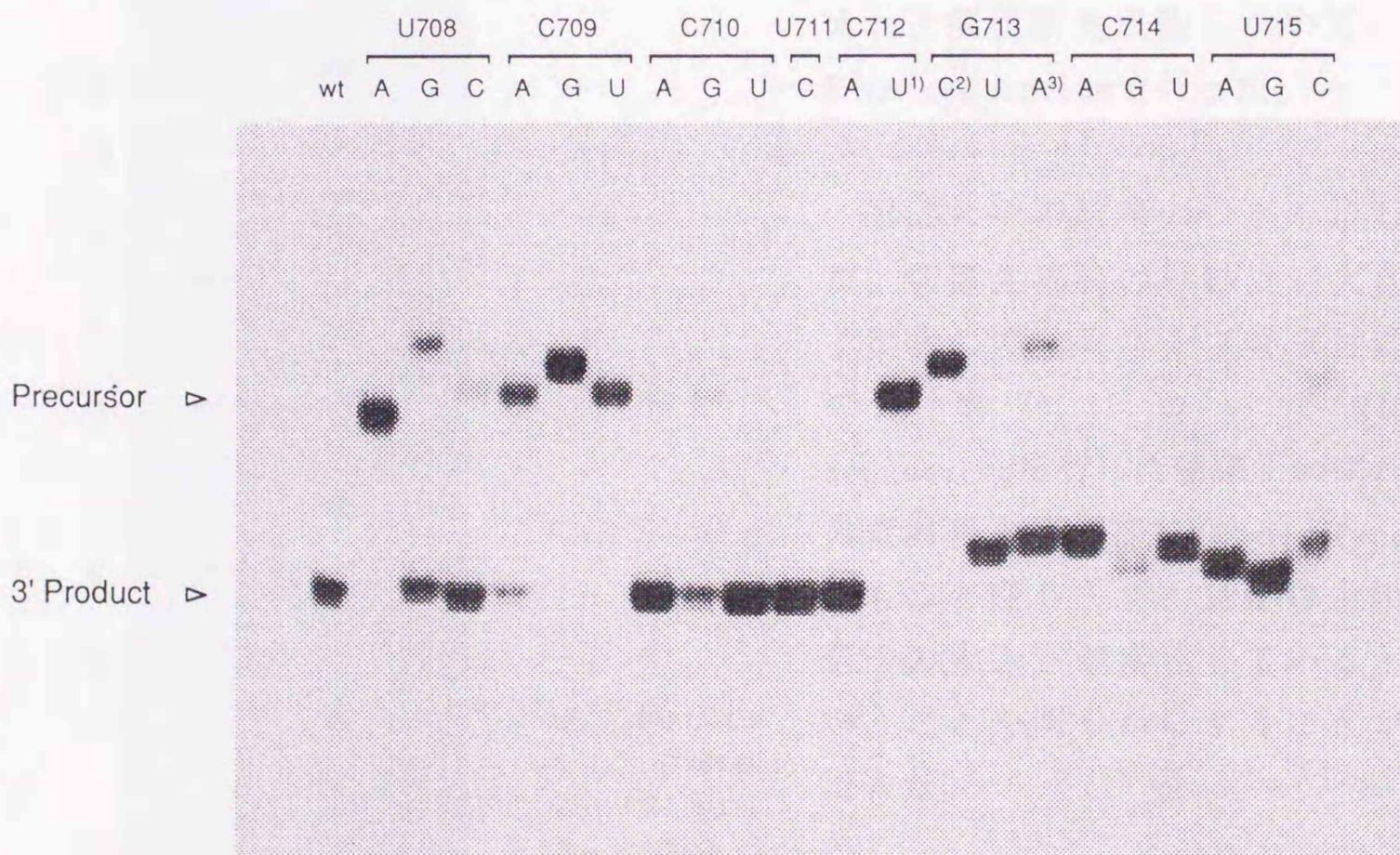


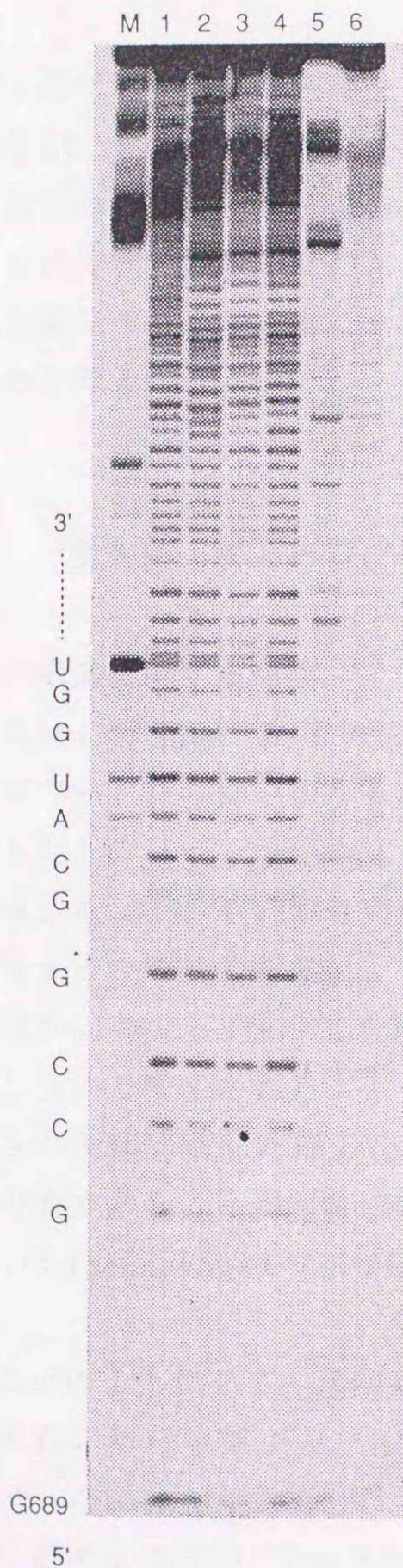
図18 SSrCにおける点変異体の変性PAGEによる解析⁴⁰⁾

肩に番号を付した3種の変異体は 1) C710G, 2) U700C, 3) C714A にも変異を有している。

以上の情報をもとに、SSrCのconsensus sequenceを

5' (U/C/G) C N N (C/A/G) (G/A/U) N N 3'

であると決定した。



M	σM (A+U)
1	HDV86 (w.t.)
2	G713U
3	C714A
4	C714G
5	U715A
6	U715G

図18には表6に示した変異体の自己切断パターンを変性PAGEによって解析した結果を示した。

切断部位が同一であれば切断生成物は変性ゲルで等しい泳動度を有すると考えられるが、様々な位置にバンドがシフトする変異体が多く見られた。

著者はこれがHDVリボザイムの切断部位が変化した結果を示すものであるという可能性を考え、3'側切断生成物について、RNA sequencingを行った。

図19にその結果の一部を示した。切断生成物の移動度が大きく変化しているループ終末付近の変異体についてRNA sequencingを行った結果、いずれの変異体も切断部位はwild typeのものと変わらず、見かけ上の分子の大きさが変化しているということを明らかにすることができた。

図19

3'切断生成物の5'末端の比較

これらの現象はSSrA及びSSrBへの変異導入では見られなかったことであり、SSrCの機能を考察するうえで重要な情報であると考えられる。すなわち、著者はSSrCに活性発現に必要な残基が存在しないこと、またこの領域に対する変異導入が分子の構造の安定性に影響を与えることから、SSrCは触媒作用の発現に対する直接の関与よりも、むしろ構造保持に重要な領域であると結論した。

リボザイム活性を利用した*in vitro* selection法は、通常変性PAGEによって前駆体RNAと切断生成物を分離精製する操作を含む⁵⁷⁾。著者が行なったSSrCへの変異体の*in vitro* selectionでは、変性PAGEにおいて前駆体RNA、切断生成物がともに非常に拡散したバンドとして観察されたために分離精製操作を省いた改良法を開発する必要が生じたが、これは上に示した理由による特殊な事例であったものと考えられる。

第五節 まとめ及び考察

二次構造に関する考察

図20に、SSrA, B, Cでの塩基置換により得られた知見をまとめた。白抜きで示したのはいかなる塩基置換によっても大きく活性を失うものを、四角で囲んだものはいくつかの塩基置換で活性を失うものを示し、逆にグレーで示したのは、A, G, C, Uいずれの塩基であっても活性にほとんど影響を及ぼさないことが分かった残基である。

図20における4種の二次構造モデル上、いくつかの部分で二次構造の形成に寄与しないと考えられるグレーの残基が水素結合を形成している例が見られる(白抜きの矢印で示した部分)。つまり、著者の実験によってSSrA, B, Cにおいて置換可能であることが明らかとなった残基がいずれも水素結合に関与しないとされているpseudoknotモデルが最も可能性の高い二次構造であると考えられた。

以上のようにして、著者はステム領域及び一本鎖領域における塩基置換による変異体の解析結果より、HDVリボザイムの二次構造としてpseudoknotモデルを支持した。

切断部位の5'側には1ヌクレオチド存在すれば十分な活性を発現するという報告^{44,45,48,59,60)}がなされているが、この知見によっても切断部位の5'側配列に水素

結合を要求しない pseudoknot モデルが支持されると考えられる。また最近になって Wu らが NMR による構造解析を行ない、pseudoknot モデルを支持した⁶¹⁾。本章の冒頭でも述べたが、NMR による構造解析で得られるのは安定構造であり、これが活性構造と一致するとは限らない。85 nts 程度の短鎖 HDV リボザイムにおいてもやはり尿素やホルムアミドといった変性剤存在下でのいくらかの高活性化が見られる場合が多い。しかし著者が活性測定を指標とした実験結果より支持した活性構造が pseudoknot モデルであることから考察すると、活性中心のみを残す形で不要配列を除去していく過程で、最安定構造が pseudoknot モデルで示される構造になった可能性が高い。すなわち、変性剤存在下での高活性化は単に競合する高次構造よりも pseudoknot 型の活性構造が変性剤存在下での安定性に有利であることを示しているに過ぎないと考えられる。

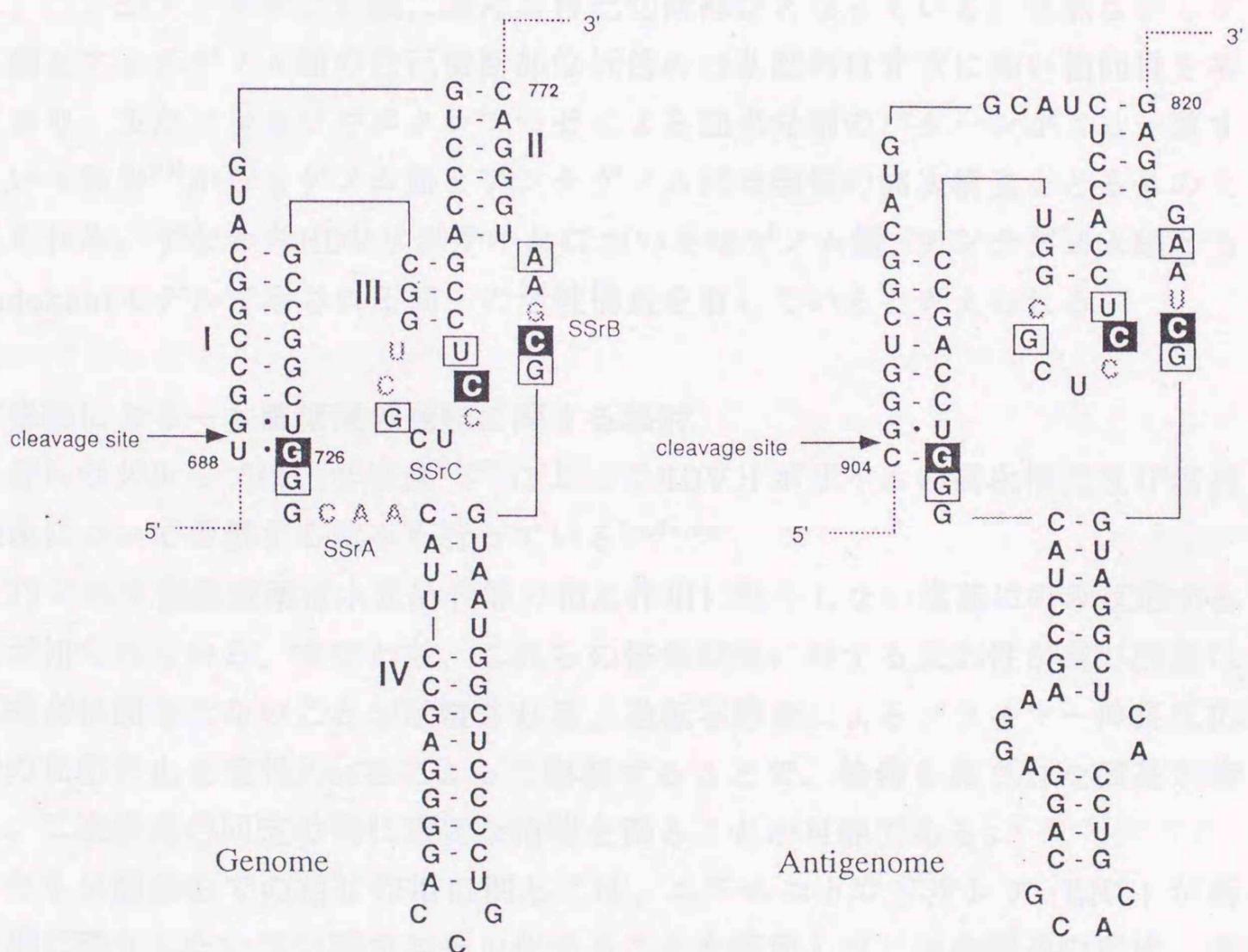


図21 ゲノム鎖及びアンチゲノム鎖HDVリボザイム (pseudoknotモデル)

図21に、ゲノム鎖とアンチゲノム鎖を pseudoknot モデルで描き示した。著者

が得た結果から置換可能であることが明らかとなった、SSrAのC729, A730, A731の3残基はアンチゲノム鎖に存在せず、SSrBのG764はアンチゲノム鎖ではUとなっている。また、SSrCでアンチゲノム鎖に存在しないU715もゲノム鎖では置換可能であり、しかもこれらは全てアンチゲノム鎖においてもループ領域に位置する残基となっている。

多くのリボザイムの起源であるウイロイドやサテライトRNAと同様、HDVは環状一本鎖RNAを遺伝子に持つ。一本鎖RNAは非常に分解されやすいため、通常エクソヌクラーゼからの攻撃を防ぐために環状となり、エンドヌクラーゼからの攻撃を防ぐために分子内水素結合によって棒状の二次構造 (rod like structure) を形成している (図3)。このため、HDVのゲノム鎖では自己切断部位近傍の塩基配列に相補する領域が同一分子内に存在する。従って、転写によって生じるアンチゲノム鎖にはゲノム鎖の自己切断配列に相補する領域の相補鎖が存在し、ここがアンチゲノム鎖における自己切断部位となっている。当然ながらゲノム鎖とアンチゲノム鎖の自己切断部位近傍の塩基配列は非常に高い相同性を有しており、またアルカリやヌクラーゼによる加水分解のパターンがよく一致するという報告⁵⁹⁾からもゲノム鎖とアンチゲノム鎖は類似の高次構造をとるものと考えられる。すなわちHDVリボザイムにおいてはゲノム鎖、アンチゲノム鎖とも pseudoknotモデルで示される同一の活性構造を有していると考えられる。

化学修飾による一本鎖領域の機能に関する検討

著者らのグループは化学修飾^{62,63)}によってHDVリボザイムの高次構造及び塩基の機能について考察する試みも行っている^{54,64,65)}。

図22に示す修飾試薬は水素結合等の相互作用に関与しない塩基にのみ反応することが知られている。すなわち、これらの修飾試薬に対する反応性が高い残基は水素結合に関与しないことが示唆される。逆転写酵素によるプライマー伸長反応の際の反応停止を変性PAGEによって解析することで、修飾を施された残基を特定し、二次構造の同定の際に重要な情報を得ることが可能である。

またリン酸部位での相互作用に関しては、エチルニトロソウレア (ENU) が相互作用に関与しないリン酸をエチル化することを利用して、高次構造の形成、または金属との配位に関与する可能性のあるリン酸を特定できる。

金属との相互作用に関しては、リボザイムの活性発現に必須な Mg^{2+} の存在下に鉛によるRNA鎖の非特異的切断がどのように阻害を受けるかを調べることも情報を得ることができる。

SSrA, B, Cはいずれも塩基対を形成しない一本鎖領域として存在すると考えられ、またこの領域に存在するG726, C763, C709の3残基は塩基対形成以外の相互作用によって活性発現に重要な働きをしていることが示された。

SSrA, B, Cはいずれも金属との相互作用が示唆され、SSrCについては機能として構造的な寄与があるものと考えられた。SSrA, Bにはいかなる塩基置換によっても活性を失う残基が存在した。特にSSrBに存在するC763は Mg^{2+} の直接の配位が起こる可能性があることから、SSrBは切断部位近傍のSSrAと共に切断反応に直接の寄与をすることが考えられた。

第二章 HDVリボザイムによるターゲットRNA鎖の切断

第一節 分子間反応を触媒するゲノム鎖由来HDVリボザイムの作成⁴¹⁾

リボザイムを機能性アンチセンス分子として医薬分野へ応用するためには、リボザイムを分割し、分子間(トランス)反応を触媒させることが必須である。第一章においてHDVリボザイムの二次構造としてpseudoknotモデルが示唆されたので、pseudoknotモデルにおいて二次構造の形成を阻害しないと考えられるいくつかの様式で分子内(シス)反応性のゲノム鎖由来HDVリボザイムを基質鎖と酵素鎖へ分割した(図24)。

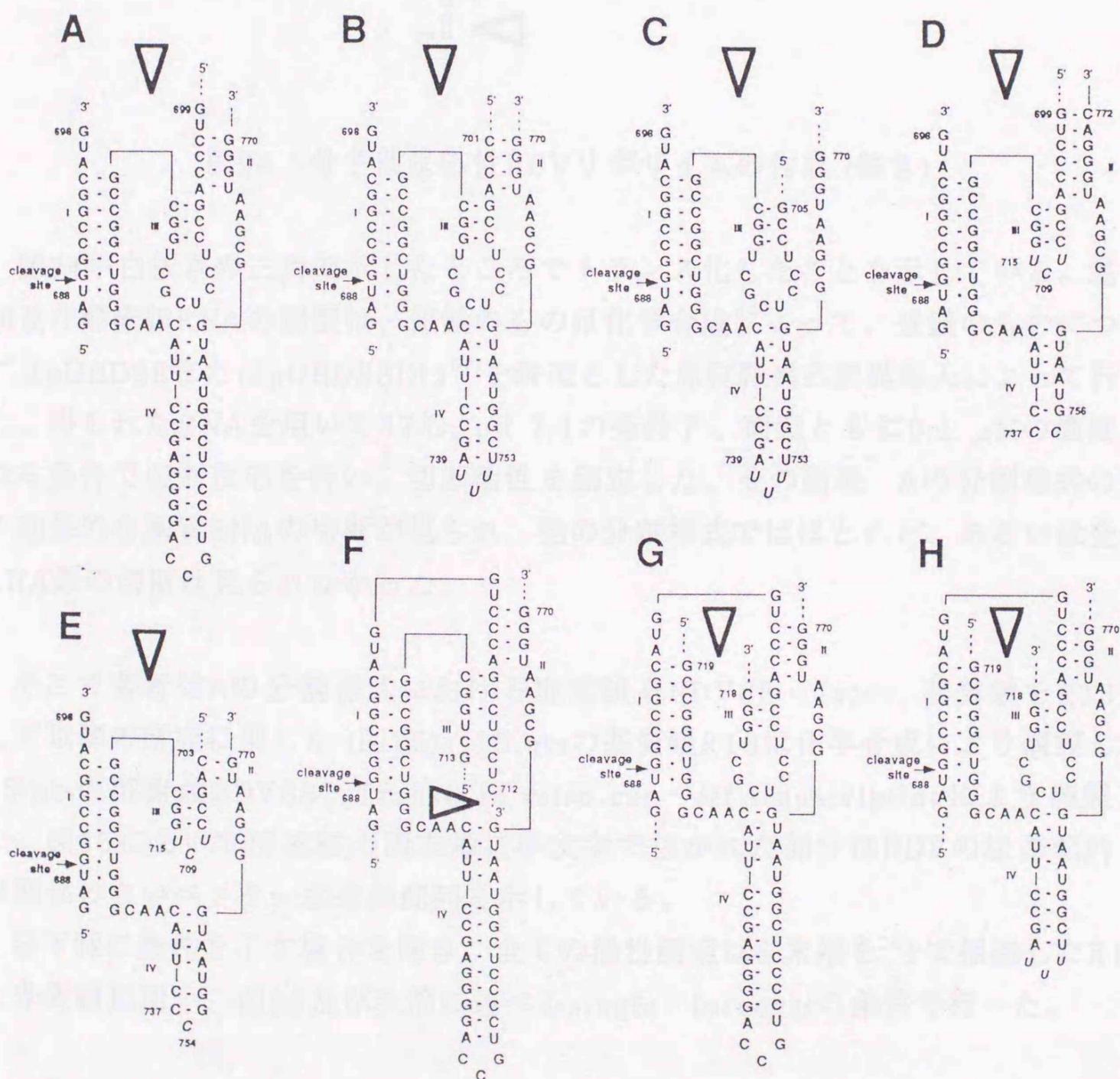


図24 分子間反応性HDVリボザイムの作成

ベクター由来の末端配列は点線で示した。

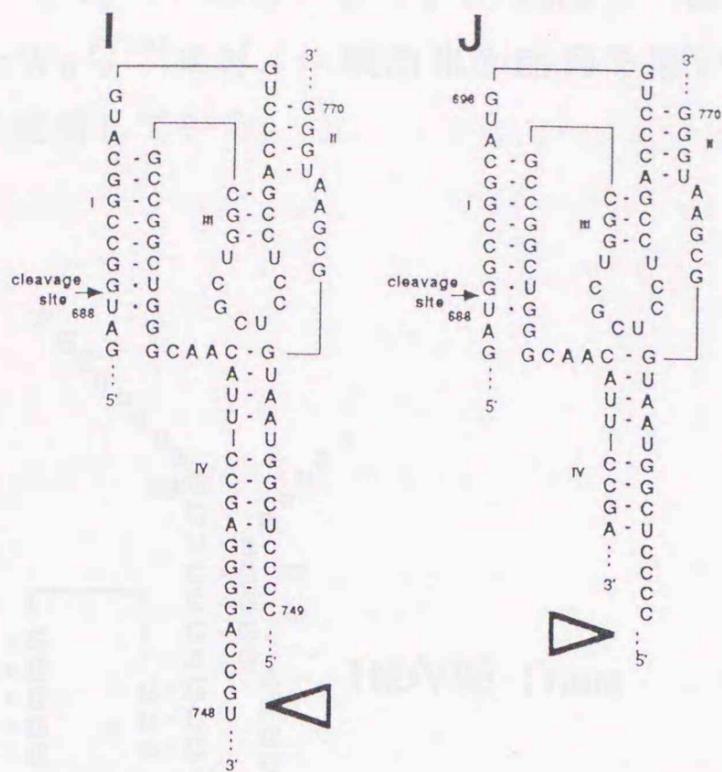


図24 分子間反応性HDVリボザイムの作成 (続き)

図24中白抜きの三角で示したところでトランス化したことを示している。基質鎖及び酵素鎖RNAの調製は、短鎖のものは化学合成によって、長鎖のものについてはpUHD88またはpUHD88DI3⁵²⁾を鋳型とした部位特異的変異導入によって行った。得られたRNAを用いて37℃, pH 7.1の条件下、両鎖ともに0.1 μMの濃度となる条件で切断反応を行い、切断活性を測定した。その結果、Aの分割様式のみで効果的な基質RNAの切断が見られ、他の分割様式ではほとんど、あるいは全くRNA鎖の切断は見られなかった。

そこで著者はAの分割様式における酵素鎖をHDV88 - Trans, 基質鎖をR13として以降の研究に供した (図25)。13 ntsの基質鎖R13は化学合成により調製し、85 ntsの酵素鎖HDV88 - Transは*in vitro* run-off transcriptionにより調製した。図25において酵素鎖の両末端に小文字で描かれた部分はHDVの塩基配列とは関係のないベクター由来の配列を示している。

以下特に条件を示す場合を除き、全ての活性測定は5'末端を³²Pで標識したR13を基質鎖に用い、図25及び次節に述べるsingle-turnoverの条件で行った。

著者のほかにもいくつかのグループがトランス化を試みている。著者が活性を認めたAの分割様式は、Beenらがアンチゲノム鎖由来の配列を用いてトランス化

を行なった様式⁶⁶⁻⁶⁸⁾と同一である。また、Branchら⁴⁹⁾はアンチゲノム鎖由来の配列を用いて、またWuら⁵⁰⁾はゲノム鎖由来の配列を用いてIまたはJに相当する様式でトランス化に成功している。

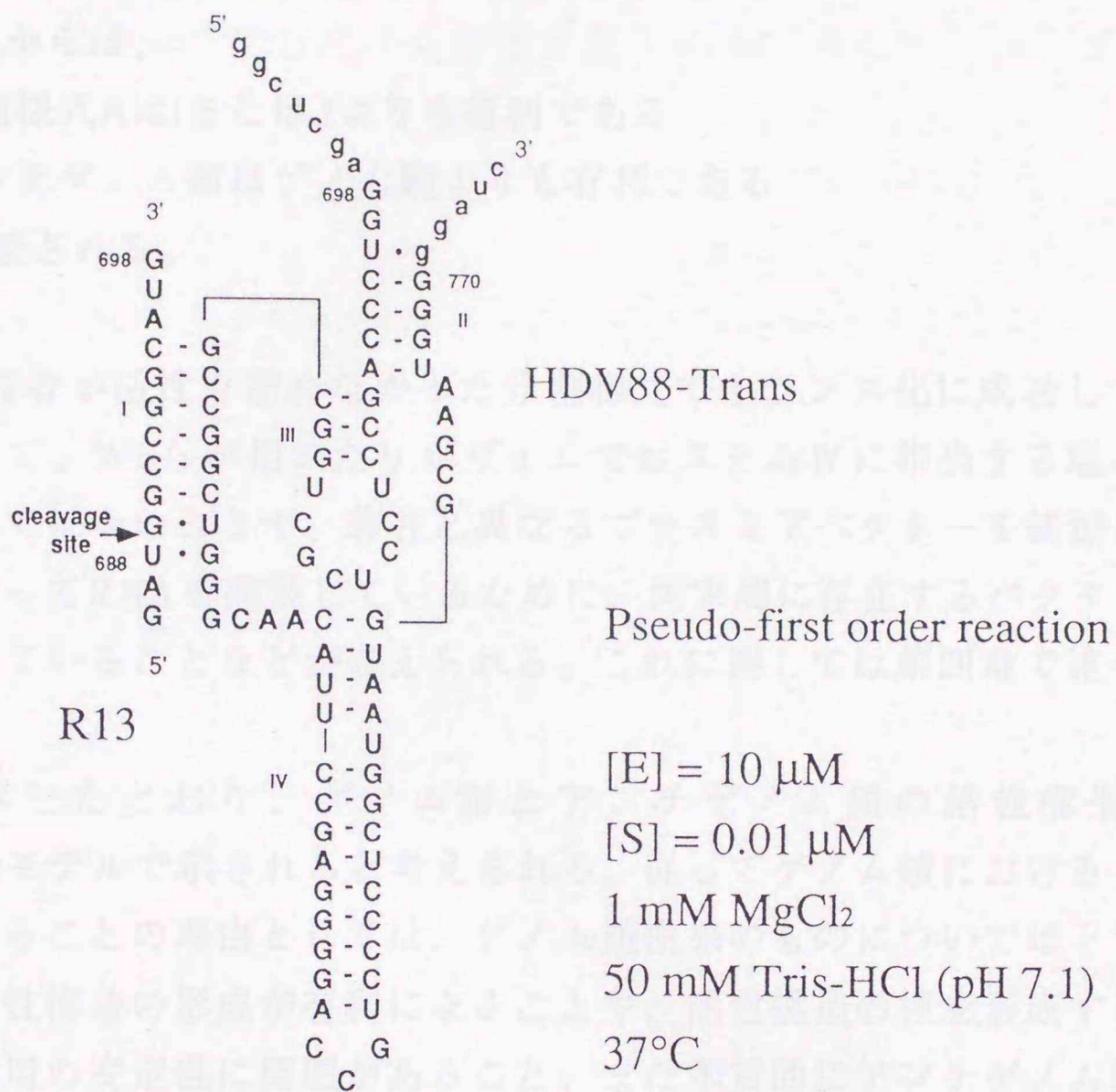


図25 基本形となるゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイム

次節で詳説するが、HDV88-TransによるR13の切断速度定数は 0.022 min^{-1} であった。他の報告に見られる基質切断の速度定数を比較すると以下のようになる。

分割様式A

ゲノム鎖	著者	0.022 min^{-1} (37°C, pH 7.1)
アンチゲノム鎖	Beenら	2.8 min^{-1} (55°C, pH 7.4)

分割様式IまたはJ

ゲノム鎖	著者	(切断活性を認めず)
	Wuら	0.011 min^{-1} (50°C, pH 7.2)
アンチゲノム鎖	Branchら	0.29 min^{-1} (37°C, pH 8.0)

この結果からは、

1. 分割様式AはIまたはJよりも有利である
2. アンチゲノム鎖はゲノム鎖よりも有利である

の2点が示唆される。

Wuらは著者が活性を認めなかった分割様式でトランス化に成功している。この理由として、Wuらを用いたリボザイムではステムIVに相当する塩基配列が天然型のものではないことや、著者と異なるプラスミドベクターを鋳型に用いた転写反応によってRNAを調製しているために、両末端に存在するベクター由来の配列が異なっていることなどが考えられる。これに関しては第四章で述べる

すでに示したとおり、ゲノム鎖とアンチゲノム鎖の活性構造はともに pseudoknotモデルで示されると考えられる。従ってゲノム鎖におけるトランス化が不利であることの原因としては、ゲノム鎖由来のものについてはトランス化によって不活性構造の形成が有利になることや、活性構造の核を形成するために必要な相互作用の安定性に問題があること、また本質的にアンチゲノム鎖の有するリボザイム活性が高いことなどが考えられた。最後の可能性については第四章で述べるように可能性は低く、前者のいずれかによるものであろう。

第二節 分子間反応の酵素反応速度論的解析⁴²⁾

分子間反応性のHDVリボザイムを作成したことにより、酵素反応速度論的な研究が可能となった。二次反応の条件下では、アンチゲノム鎖由来のトランス化HDVリボザイムによる基質切断の律速段階は切断生成物のリボザイムからの解離であることが報告されている⁶⁶⁾。そこで、活性中心における切断速度を直接観測することが可能であると考えられる実験条件として、基質濃度に対する擬一次反応の条件を用いてsingle-turnoverでの解析を行った。

擬一次の解析で求まる反応速度定数 k_{obs} は、厳密な意味での切断の速度を規定する k との間に $k_{obs} = k \cdot [E] / (K_M + [E])$ の関係が成り立つ。本研究における活性測定の下では、リボザイム濃度 ($10 \mu\text{M}$) はアンチゲノム鎖で報告されている K_M 値 (55°C において約 $0.7 \mu\text{M}$)^{66,67)}の約14倍になるため、その 10^{-3} 倍量 (10 nM) の基質鎖はほぼ全てが基質酵素複合体を形成することが期待される。従って、得られる基質の切断速度は基質酵素複合体濃度、すなわち基質濃度に対して一次に表されると考えられる。

反応は 37°C において行い、二価の金属イオンには Mg^{2+} を用いた。

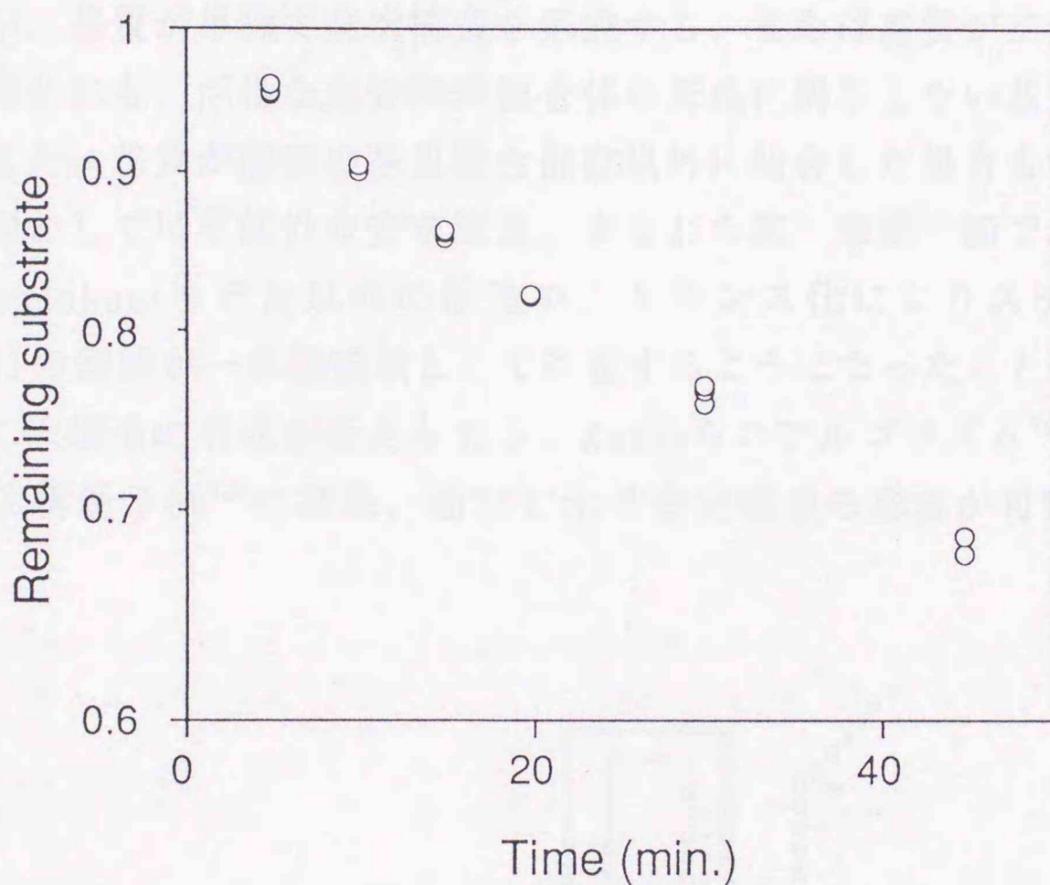


図26 基質残存量の時間依存 (対数プロット)

反応速度定数を求めるため、基質の残存量を時間に対して対数プロットしたのが図26である。著者はこの反応が基質濃度に対して一次であるものとして、

$v = -d[S] / dt = k_{obs} \cdot [S]$ から $\ln([S] / [S]_0) = -k_{obs} \cdot t$ の関係を得⁶⁹⁾、基質残存量の対数プロットから反応速度定数が求まることを期待した。正しく基質が酵素で飽和されている条件下ではこのプロットは直線を与えるが、図26に示されたデータポイントは直線性を持たないことが明らかであり、他の因子の関与が示唆された。

この原因として基質酵素複合体の形成が不十分であることが第一に考えられたため、100 nMから50 μ Mの種々の酵素濃度において切断反応を行なったが、酵素濃度5 μ Mで最大の切断率を示し、酵素濃度を増してもそれ以上の切断率の上昇は見られなかった。図26の対数プロットの結果はこの反応が基質濃度に対する一次反応ではない、すなわち基質酵素複合体濃度を基質濃度に近似する妥当性を欠くことを示している。しかし酵素濃度10 μ Mの条件下では基質は十分に酵素によって飽和されているため、基質酵素複合体に活性な構造と不活性な構造が存在しているものと考えられた。

不活性な基質酵素複合体の形成は、主に酵素側の高次構造の問題に由来すると考えられるが、基質が単独で高次構造を形成する、または基質が二量体を形成するといった場合にも、活性な基質酵素複合体の形成に関与しない基質の存在が観測される。また、基質が酵素の基質結合部位以外に結合した場合も同様である。酵素側の問題としては不活性な安定構造、すなわち第一章第一節で示した二次構造のうち pseudoknotモデル以外の構造や、トランス化によりステム I を含む G719~A731の領域が一本鎖領域として存在するようになったことで可能となった、新たな二次構造の形成が考えられる。Zukerらのアルゴリズム⁷⁰⁻⁷²⁾を使用したRNAの二次構造予測⁷³⁾の結果、図27に示す安定構造の形成が可能であると予想された。

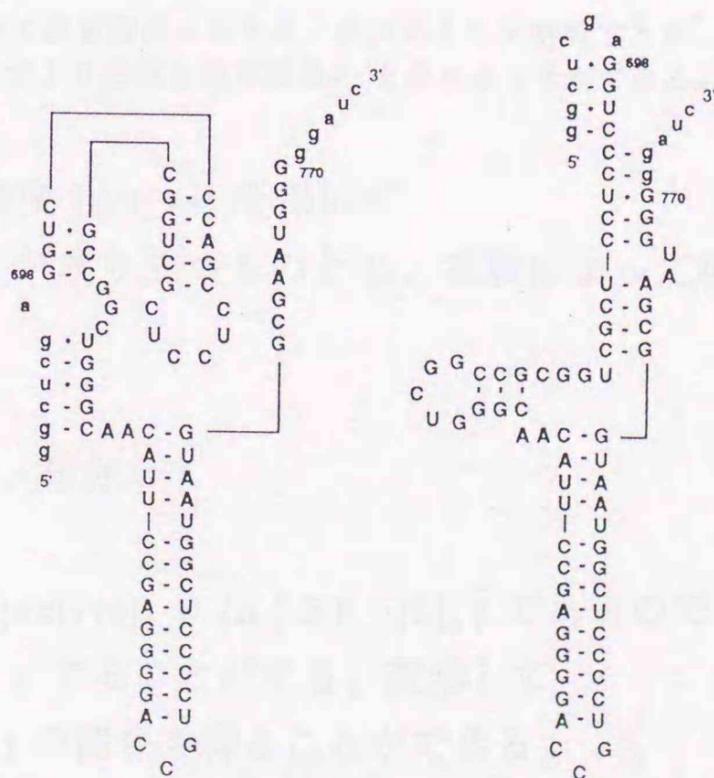


図27 考えられる安定構造

トランス化により安定化される二次構造

そこで著者は $t = 0$ での活性な複合体を形成する基質の割合を示す反応終結点 End Point (EP), 活性な複合体における切断反応速度定数 k_{cleavage} (k_{cl}) という新

たなパラメーターを設定し、以下のことを仮定した。すなわち、反応終結点に相当する量の基質が活性な基質酵素複合体を形成し、反応はこの活性な基質酵素複合体濃度に対して一次に進行する。このとき活性な基質酵素複合体の形成は平衡反応でないか、平衡反応であってもその交換反応の速度定数は切断の速度定数と比較して非常に小さいものである (図28)。

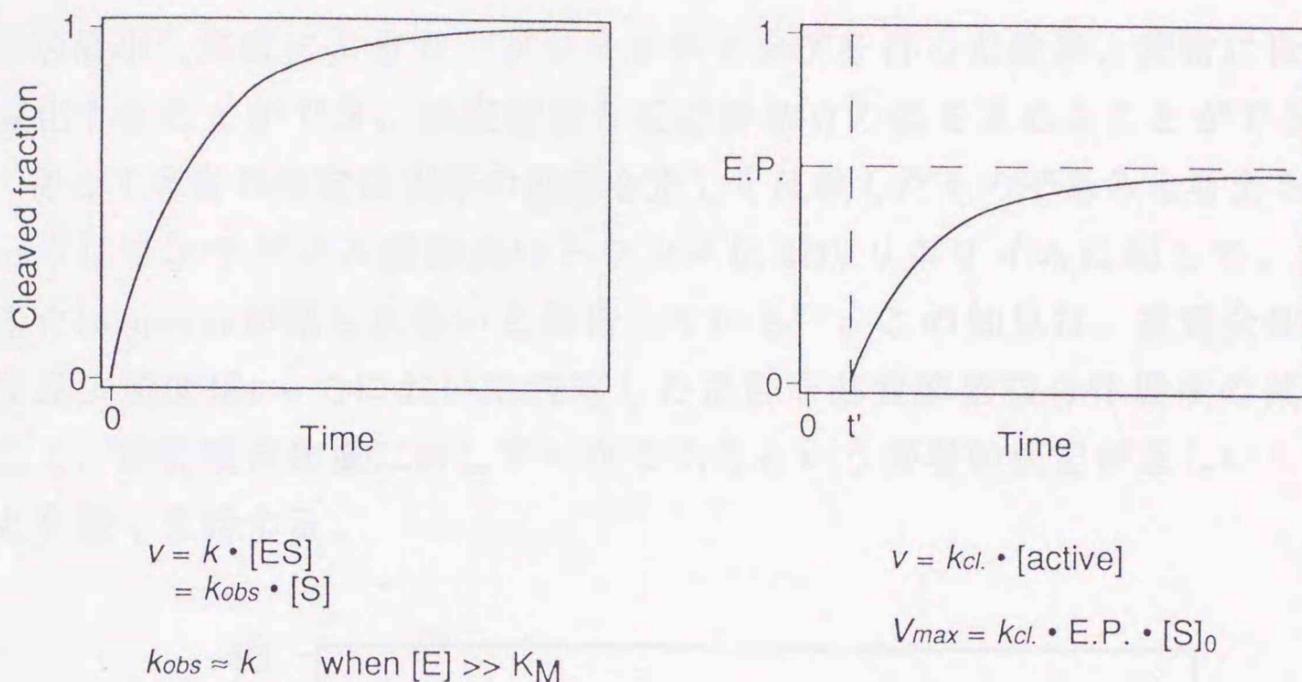


図28 擬一次反応の解析

通常は酵素大過剰の条件下、 $k \approx k_{obs}$ の仮定で基質濃度に対する一次反応として解析するが、基質酵素複合体量の有効濃度を設定することでより正確な速度定数 k_{cl} を求めることができる。

以上の仮定から、著者は活性複合体濃度 [active] を用いて

$v = -d[\text{active}] / dt = k_{cl} \cdot [\text{active}]$ が成り立つものとし、実験によって得られた値の解析を行なった。

まず、上記の関係式を

$[\text{active}]^{-1} \cdot d[\text{active}] = k_{cl} \cdot dt$ とし、積分して

$\ln[\text{active}] + \alpha = k_{cl} \cdot t$ を得た。

積分定数 α は $t = 0$ の条件から $\alpha = \ln[\text{active}]_0 = \ln(EP \cdot [S]_0)$ であるので

$\ln([\text{active}] / (EP \cdot [S]_0)) = k_{cl} \cdot t$ とすることができ、変形して

$\exp(k_{cl} \cdot t) = [\text{active}] / (EP \cdot [S]_0)$ の関係を得ることができる。

著者の設定した実験条件下では、変性PAGE後の解析によって求まる切断生成物量は遊離の生成物及び生成物酵素複合体の総量を表すため、

$[\text{active}] = EP \cdot [S]_0 - [P]$ ($[P]$ は切断生成物濃度) を代入して変形し、解析を簡

易にすることができる。

得られた $[P] / [S]_0 = EP \cdot (1 - \exp(-k_{cl} \cdot t))$ の関係にカーブフィッティングの際の誤差の発生を防ぐために反応開始時のタイムラグ t' を導入し、最終的に

$[P] / [S]_0 = EP \cdot (1 - \exp(-k_{cl} \cdot (t - t')))$ の関係式を導き、切断生成物量の時間依存から EP , k_{cl} 及び t' を算出した。

非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行った結果、非常に良い相関で最適化することができ、速度定数と反応終結点の値を求めることができた (図29)。従って著者の仮定は実際の反応を正しく反映したものであると考えられる。

Beenらはアンチゲノム鎖由来のトランス化HDVリボザイムに関して、37℃では酵素のturnoverが見られないと報告している⁶⁶⁾。この知見は、基質全体としての濃度減少速度は $t = 0$ において決定した活性な基質酵素複合体濃度の減少速度に等しく、活性複合体量に対して一次であるという著者の仮定が正しいものであることを強く支持する。

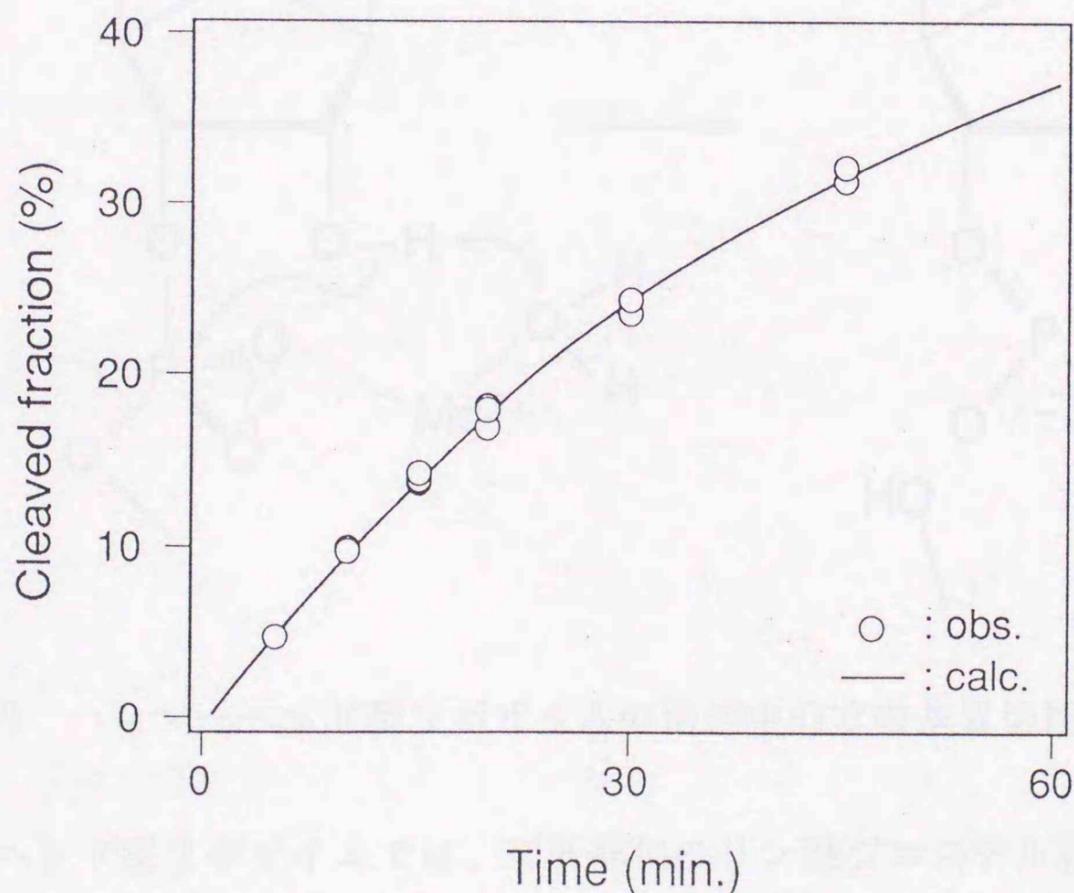


図29 カーブフィッティングによる速度論量の算出

図中の実線が最適化された係数をもとに描いた理想曲線である。

第三章 HDVリボザイムによるRNA鎖切断反応様式の解析

この章では活性中心における金属イオンの配位を中心とした切断反応の解析について述べる。

第一節 基質のチオリン酸化による切断反応への影響⁴²⁾

良く知られているハンマーヘッド型リボザイムにおいて提唱されている活性中心でのRNA鎖の切断様式を図30に示した⁷⁴⁻⁸⁰⁾。

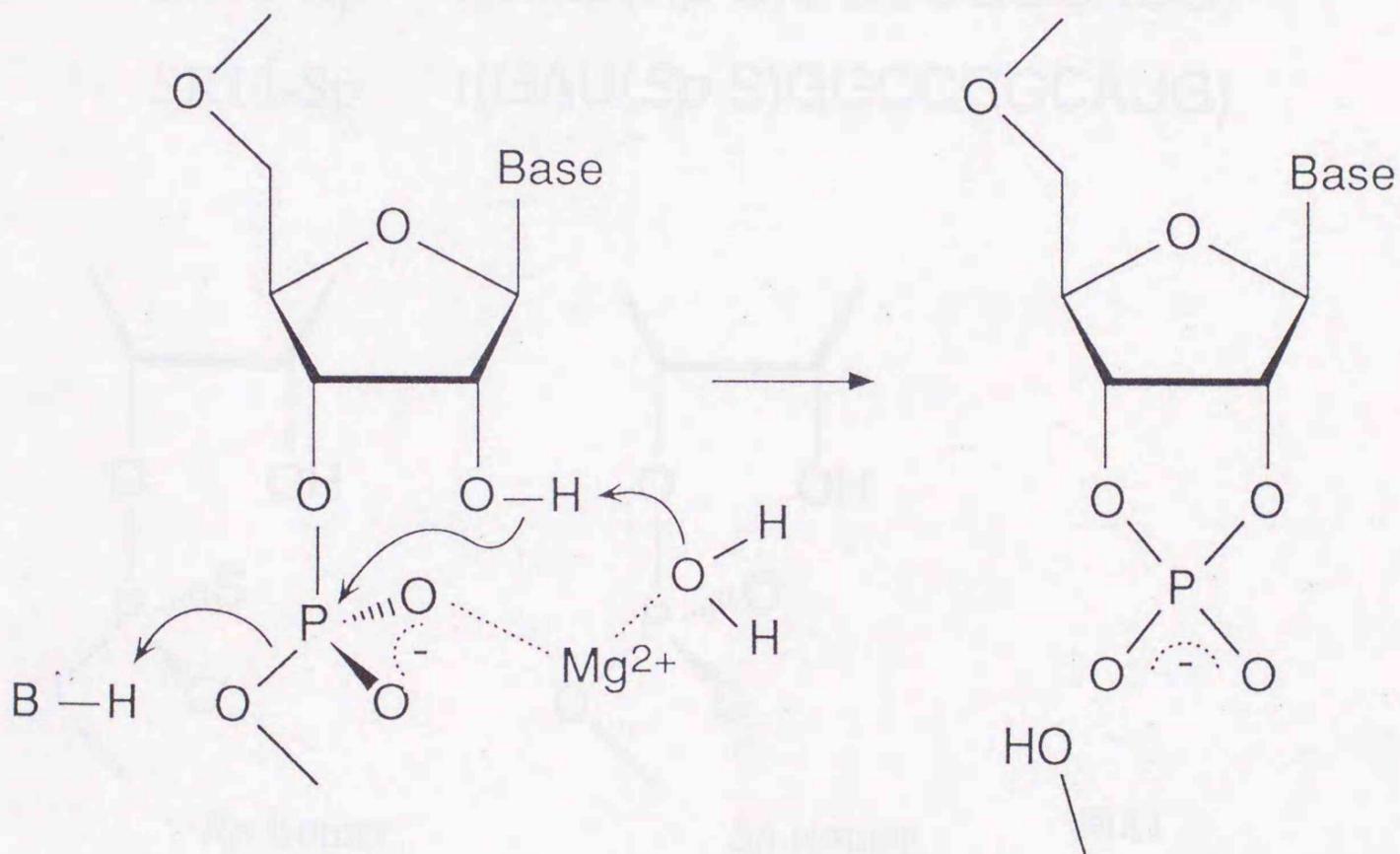


図30 ハンマーヘッド型リボザイムの活性中心での基質切断様式

ハンマーヘッド型リボザイムでは、切断部位のリン酸ジエステル結合において金属が *pro-R* 酸素へ配位し、金属に配位した水分子がリボースの2'水酸基を攻撃することにより反応が開始するものと考えられている^{74-76,79,80)}。この反応機構において、金属が *pro-R* 酸素へ結合する段階が反応の律速段階であるか、もしくは律速段階が金属と *pro-R* 酸素との配位の安定性に依存するとすれば、配位に関与する酸素原子を金属の配位子となりにくい硫黄原子へと置換したチオリン

酸結合の切断の際には、反応速度の減少が見られる。

著者はHDV88 - TransによるRNA鎖切断反応を詳しく解析する目的で、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種類を合成した (図31)。HDVリボザイムがハンマーヘッド型リボザイムと同様の反応機構であるならば、SR13 - Rpを切断するときのみ切断速度の減少が観測されることが予測される。

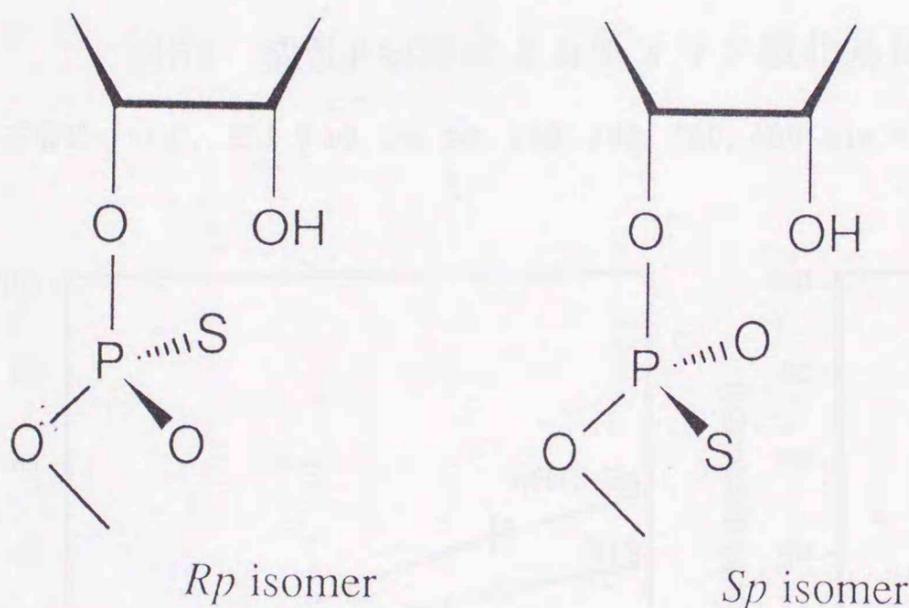
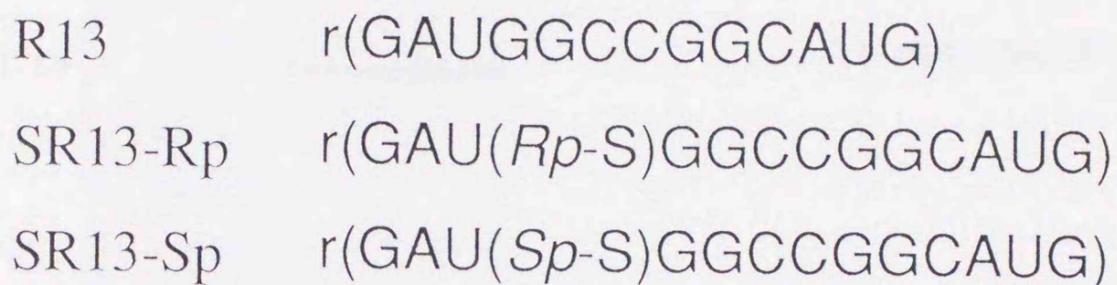


図31
チオリン酸化基質

HDV88 - Transを酵素鎖として用い、single - turnoverの条件で反応させた結果、図32に示すようにSR13 - Rpに関してのみ著しい切断生成物量の低下が見られるという、ハンマーヘッド型リボザイムでの報告と類似の結果を得た。

しかし第三章で述べた解析を行なうと、R13, SR13 - Rp, SR13 - Spのいずれも活性な複合体が切断を受けるときの速度定数 k_{cl} は 0.02 min^{-1} の値でほぼ一致するという結果が得られた (図33, 表7)。

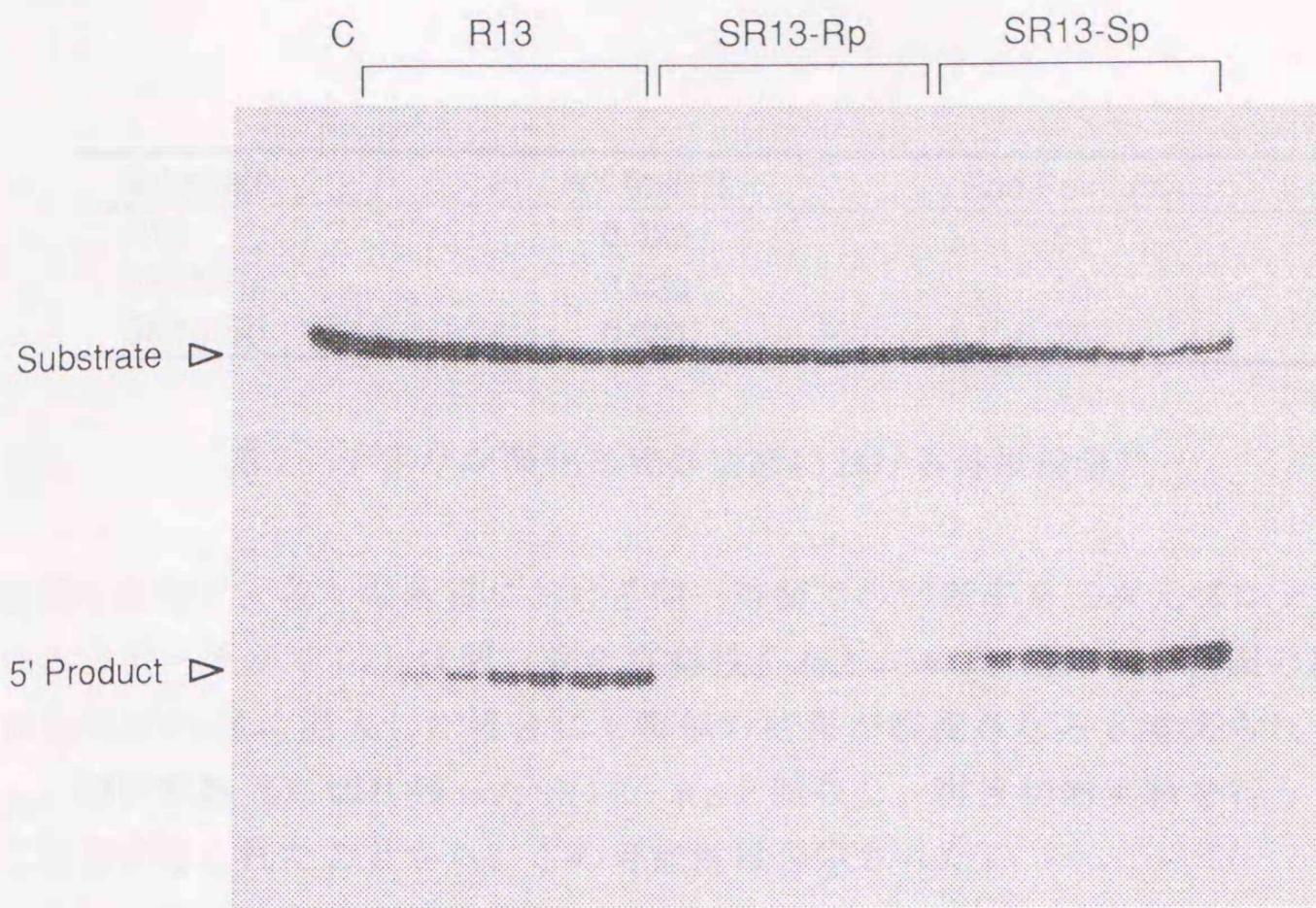


図32 変性PAGEによるチオリン酸化基質の切断の解析

各基質について、左より10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 min.の反応後にサンプリングした。

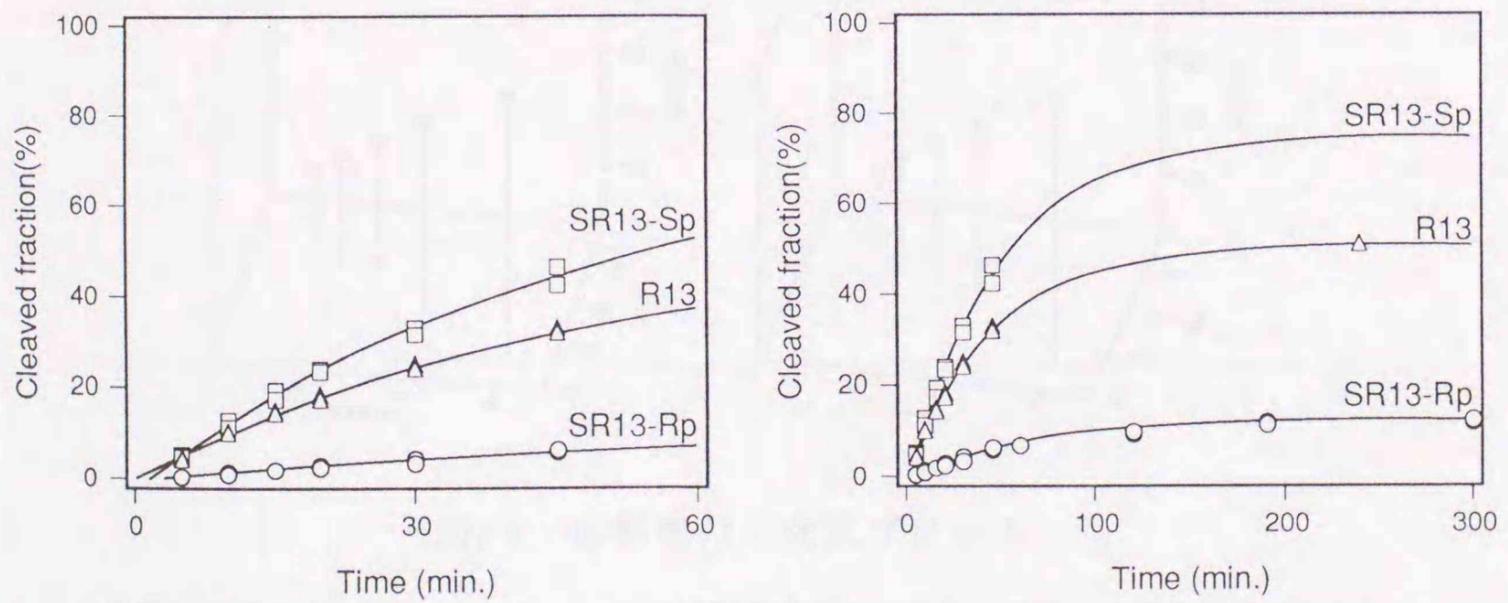


図33 チオリン酸化基質の切断における速度論量の算出

同一のプロットを異なる時間軸で表した。

速度定数が一致するという事は、これら3種の基質の切断率の変化が図33の縦軸方向に相似であるということと同義である。

Substrate	k_{cl} (min^{-1})	End Point (%)
R13	0.022	51
SR13-Rp	0.020	10
SR13-Sp	0.021	75

表7 チオリン酸化基質の切断における速度論量⁴²⁾

確認の目的で、各々の基質における同一時間での切断率を三次元プロットしたところ、データポイントは明らかな直線性を有していた(図34)。精製の際に少量のSp体がRp体に混入した場合にも類似の結果が観測されることが考えられる。しかし、切断実験後に切れ残ったSR13-Rpを回収し、再度切断実験を行うと全く同じ結果が得られたことから、この可能性は否定された。

従って、図34に見られる直線性はいずれの基質が切断される場合も切断の律速段階が変化していないことを示している。すなわち切断部位のチオリン酸化で変化するのではなく、活性な複合体の量であることが明らかとなった。

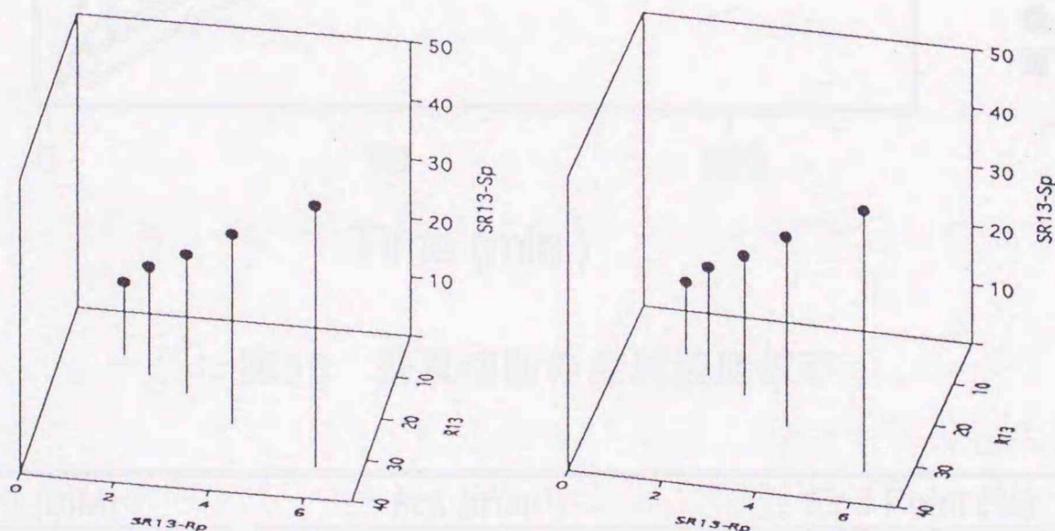


図34 切断率の三次元プロット

各基質の5, 10, 15, 20, 30, 45 min.での切断率をプロットし、ステレオグラムで表した。

第二節 金属イオン濃度の切断反応への影響

前節で基質のチオリン酸化が活性な基質酵素複合体の量を変化させることを示

したが、チオリン酸化のみならず金属の濃度もまた活性複合体の量を変化させることを確認した (図35, 表8)。しかし、高濃度の Mg^{2+} を共存させると End Point が逆に低下してしまうという現象が観測された。これは恐らく余分な金属の配位によって、酵素側に構造変化が引き起こされるためであると考えられる。この理由により活性部位での正確な K_{Mg} を算出することはできなかったが、少なくとも活性な基質酵素複合体の量は切断されるリン酸の酸素原子, 特に *pro-R* 酸素と金属濃度の両方に依存して変化するものであることが明かとなった。

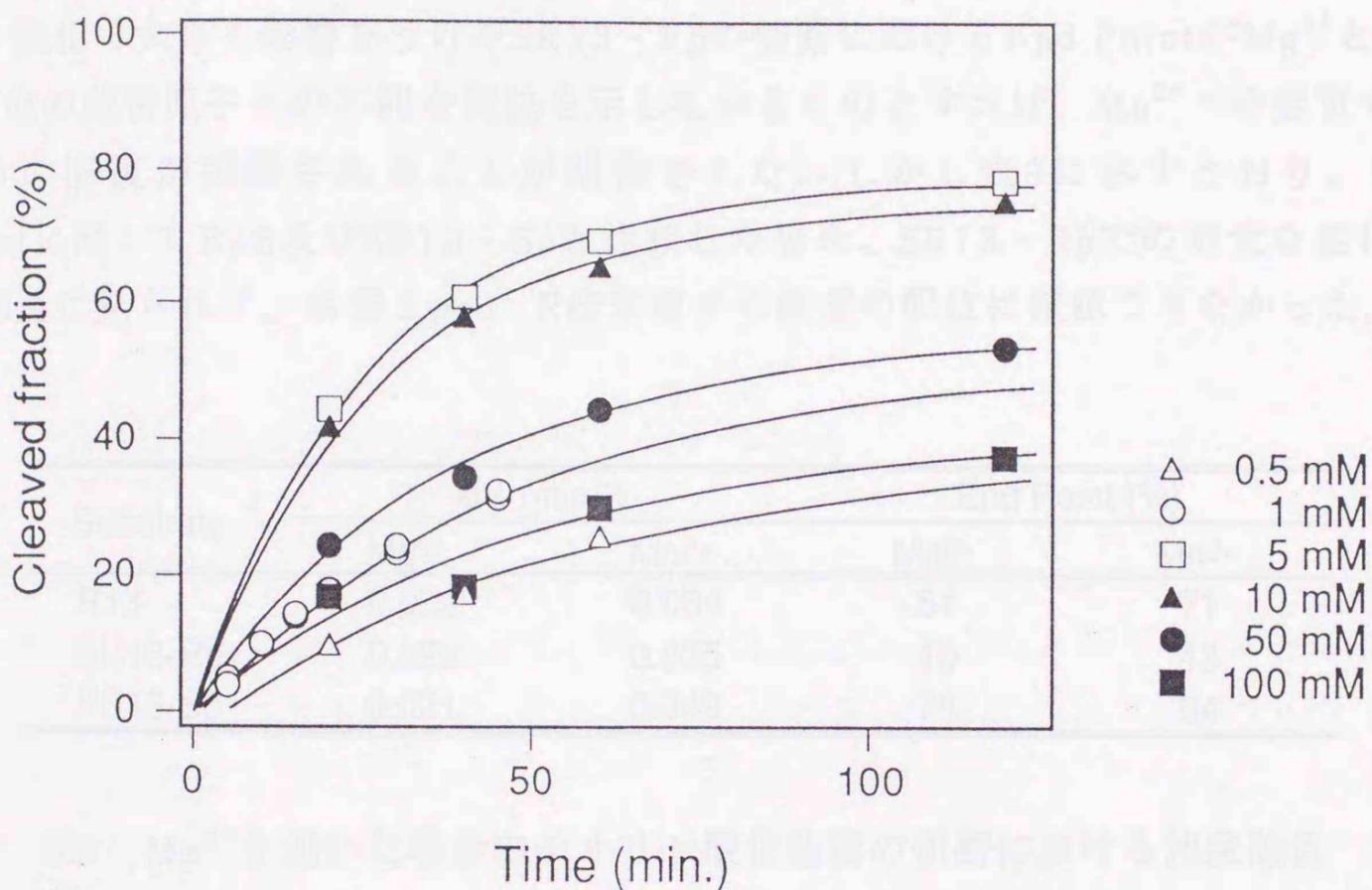


図35 基質切断の金属濃度依存

[Mg ²⁺] (mM)	<i>k</i> _{cl.} (min ⁻¹)	End Point (%)
0.1	ND	ND
0.5	0.015	40
1.0	0.022	51
5.0	0.039	78
10	0.038	75
50	0.027	55
100	0.020	41

ND : not determined

表8 種々の金属濃度での速度論量

さらに、金属濃度の変化が活性複合体量と同時に、反応速度へも影響を及ぼすことを確認した(表8)。これによって、反応開始時に速やかに起こる活性複合体の形成と触媒反応の律速段階という、少なくとも2つの段階に金属が関与していることが示された。

活性複合体の形成には金属イオンと切断部位であるリン酸の酸素原子(特に*pro-R*酸素)が共に関与することが示された。これらが直接配位しているか否かを明らかにすることを目的とし、著者は金属を「硬い」 Mg^{2+} よりも硫黄原子との配位に有利な、より「柔らかい」 Mn^{2+} に変更し、同様の実験を行なった。チオリン酸化で大きく影響を受けたSR13-Rpの切断におけるEnd Pointが Mg^{2+} と*pro-R*位の硫黄原子との不利な配位を示しているものとするれば、 Mn^{2+} への変更でかなりの回復が観測されることが期待された。しかし表9に示すとおり、End Pointに関してR13及びSR13-Spと比較した場合、SR13-Rpでの有意な変化率の相違は見られず、金属と*pro-R*酸素原子の直接の配位は確認できなかった。

Substrate	<i>k</i> cl. (min ⁻¹)		End Point (%)	
	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
R13	0.022	0.034	51	71
SR13-Rp	0.020	0.035	10	13
SR13-Sp	0.021	0.049	75	94

表9 Mn^{2+} を用いた場合のチオリン酸化基質の切断における速度論量

表9に示した速度論量は Mg^{2+} , Mn^{2+} ともに1 mMの濃度で行った切断実験の結果得られた値である。すでに述べたとおり、切断に関与する金属の解離定数を正確に算出することができないため、これらの速度論量を単純に比較することには問題があるが、End Point及び速度定数に対して金属は間接的な寄与を行っていることも考えられる。

また、RNAの好むA型らせん構造においては*pro-S*酸素がらせんの外側に飛び出しているのに対して、*pro-R*酸素はメジャーグループ側へ向くことが知られている(図36)。酸素原子を約1.3倍の原子半径を有する硫黄原子に変換したことで、*pro-R*位での置換に際してのみ金属、2'水酸基、リン酸等の間の局所的な位置関係の崩れが引き起こされるという可能性も否定できず、確認の必要がある。

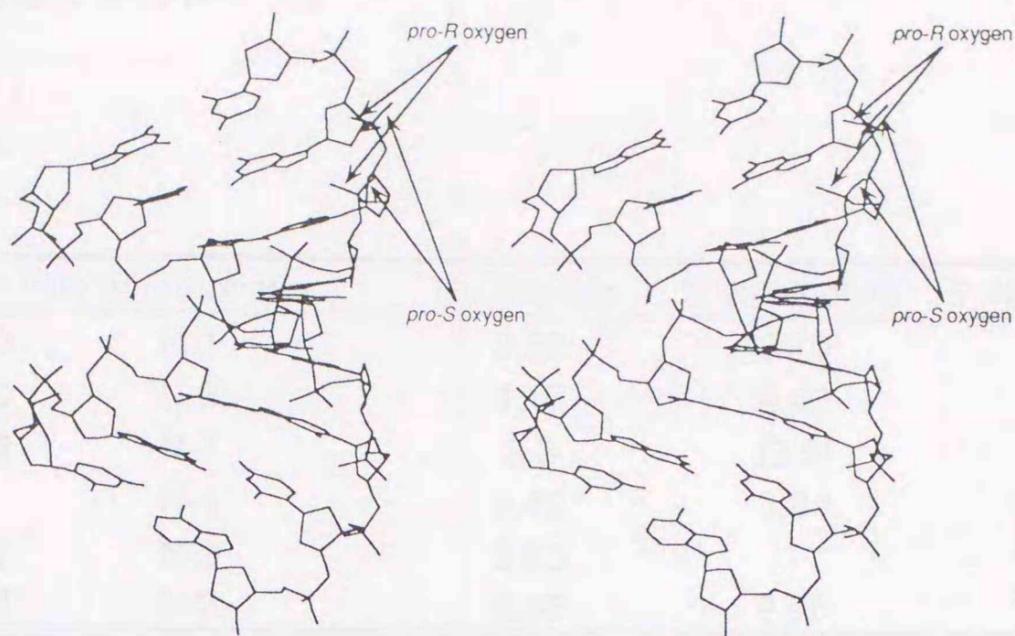


図36 A型らせん構造における *pro-R*, *pro-S*酸素

第三節 切断反応の律速段階に関する考察

活性複合体が切断を受ける際の反応定数 k_{cl} が、2'水酸基への求核攻撃に始まるリン酸ジエステル結合の加水分解反応（以後chemical stepと称する）の速度定数であるとすれば、pH変化に対して $\log(k_{cl})$ が傾き1の直線性を示すはずである。HDVリボザイムにおいてもハンマーヘッド型リボザイムと同じく Mg^{2+} に配位した水分子が塩基触媒として機能しているとするれば、その $pK_a = 11.4$ 以下のpH域では1 pHユニットの水素イオン濃度の変化によって活性種が10倍増減することが期待される^{80,81)}。

リボザイムにおいてはその高次構造が機能の発現に重要であると考えられ、従って高次構造の形成における最も基本的な相互作用である水素結合を阻害する塩基部のプロトン化及び脱プロトン化の影響も活性に大きく影響を及ぼすことが予想される。著者は構造的な影響が少なく、実験から求められる反応速度ができる限り純粋に律速段階の速度変化を反映するようにpHを7から8の間で3点設定した。

塩基部の pK_a は表10に示したとおりであり⁸²⁾、環境の変化によるある程度の変化を考慮しても著者の設定したpH域においては通常のWatson - Crick塩基対の形成を妨げる塩基部の変化はないものと考えられる。しかし図37及び表11に示すように速度定数 k_{cl} はpHにほとんど依存せず、逆にpHの増加に従って活性は微

減傾向にあることがわかった。

Base (site of protonation)		Nucleoside	3'-Nucleotide	5'-Nucleotide
A	N-1	3.52	3.70	3.88
C	N-3	4.17	4.43	4.56
G	N-7	3.3	(3.5)	(3.6)
	N-1	9.42	9.84	10.00
T	N-3	9.93	-	10.47
U	N-3	9.38	9.96	10.06

under zero salt concentration at 20°C

表10 核酸塩基のpKa⁸²⁾

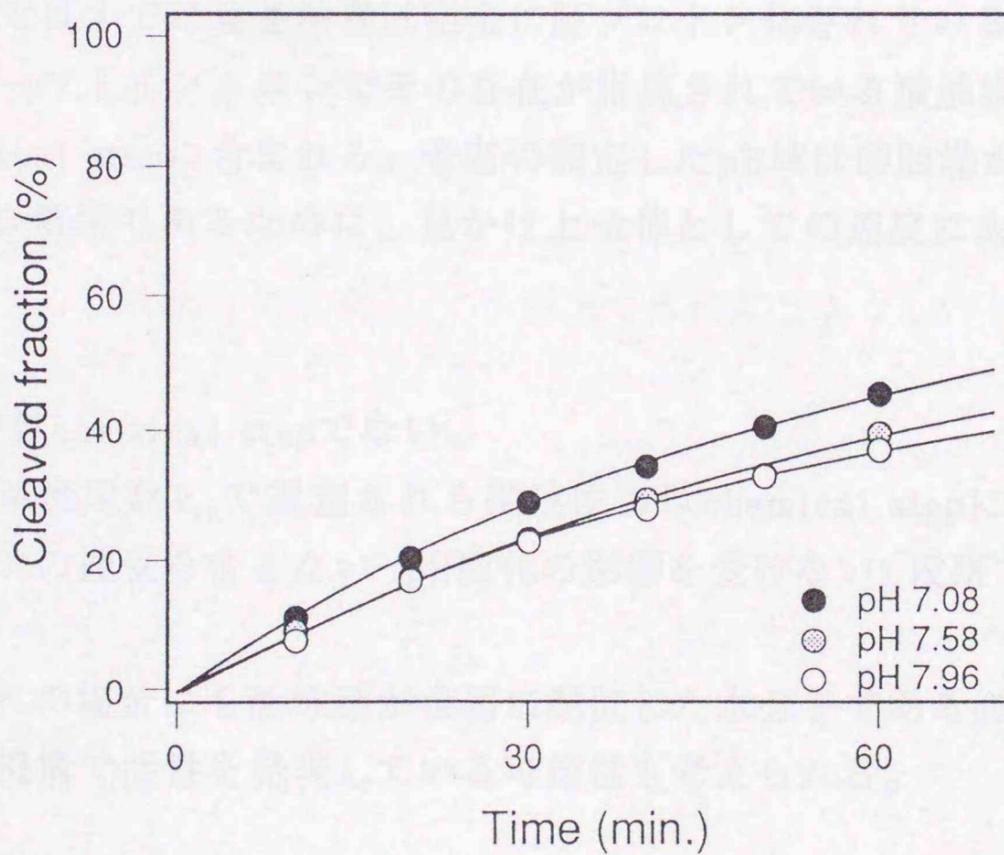


図37 HDV88 - Transによる基質切断のpH依存

pH	k_{cl} (min^{-1})	End Point (%)
7.08	0.018	68
7.58	0.015	65
7.96	0.017	57

表11 各pHでの速度論量^{注)}

この結果の解釈について可能性が高いと考えられるものを、律速段階が chemical stepである場合とそうでない場合に分けて以下に示した。

- ① 律速段階はchemical stepである。
- ① - 1 HDVリボザイムの活性中心では塩基触媒が外部の水素イオン濃度の変化の影響を受けにくくなっている。
- ① - 2 同様に特殊環境下で塩基触媒のpKaが大きく変化したために、測定したpH域ではすでに塩基触媒は完全に脱プロトン化されている。
- ① - 3 グループIイントロンでその存在が指摘されている酸触媒による反応がchemical stepに含まれる。著者の設定したpH域は酸触媒が脱プロトン化される領域であるために、見かけ上全体としての速度に大きな変化がない。

- ② 律速段階はchemical stepでない。

この場合速度定数 k_{cl} で規定される律速段階はchemical stepに先立つ遅い、かつプロトンの授受を含まない(pH変化の影響を受けない)段階である。

なお、いずれの場合にも活性種が金属に配位した水分子である必要はなく、全く新しい反応機構で活性を発現している可能性も考えられる。

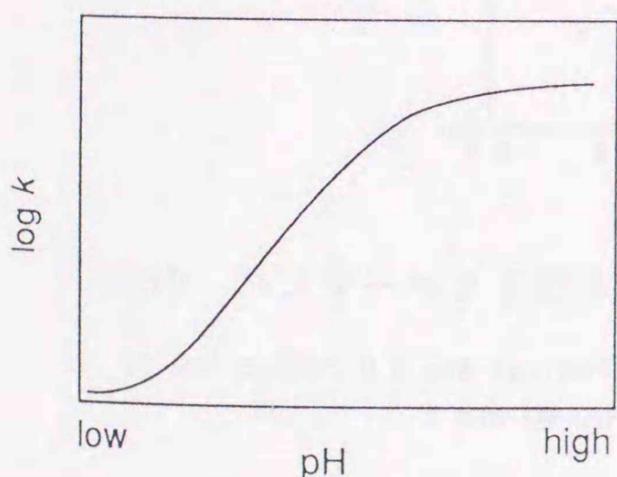
注) 表7に示したpH 7.1での切断と比較して整合性に問題のある部分がある。

各実験における再現性は非常によいため、用いた酵素のロットの違いによる差異であるものと考えられる。原因として最も可能性が高いのは、酵素鎖の精製の過程で変性PAGEからの切り出しの際に行う紫外線照射によってcross linkを起こした分子が存在することであると考えられるため、現在精製手順の再検討を行っている。

上記の可能性のうち、いずれがHDVリボザイムの反応機構を正しく示すものであろうか。まず活性種については、RNAがA, G, C, Uのわずか4種の構成単位から成り立つことを考えると、多様な側鎖を利用する蛋白質酵素と違い、数十ヌクレオチドの鎖長に内包される構造的な情報のみによって2'水酸基の引き抜きに十分なだけ側鎖の塩基性度を変化させることは困難である。一般論ではあるが、これまでにRNA単独で活性を発現することが確認されたりボザイムは存在せず、構造保持あるいは活性発現に他の補因子を必要とする。RNAの切断に関してもやはり周囲に存在する金属を利用する反応機構が有利であり、活性種はおそらくハンマーヘッド型リボザイムと同一であろうと考えられる。

①-1に関しては、pHの増加に伴う活性低下が説明できない。ただしpH変化が構造に及ぼす影響がchemical stepの速度増加以上の活性低下を引き起こすものであれば説明可能ではある。しかしpH7~8の領域は核酸の高次構造形成に大きな不利益を与えるpH域ではなく、また本来ヒトの細胞中で働くHDVリボザイムが細胞内に近い中性条件付近で大きく構造を崩すことは考えにくい。実際、Wu & Laiによってシス反応性のHDVリボザイムについて活性のpH依存性が調べられているが、pH 5~9の範囲で1/2~1/3の活性変化しか観測されていない⁸³⁾。彼らの得た結果に示される活性とは本論文中で言うEnd Pointであると考えられ、構造変化の影響が大きく反映すると考えられるEnd PointのpHに依存した変化が少ないというこの知見は、やはり①-1を否定する傍証となるものと考えられる。

a) base catalyst only



b) base and acid catalyst

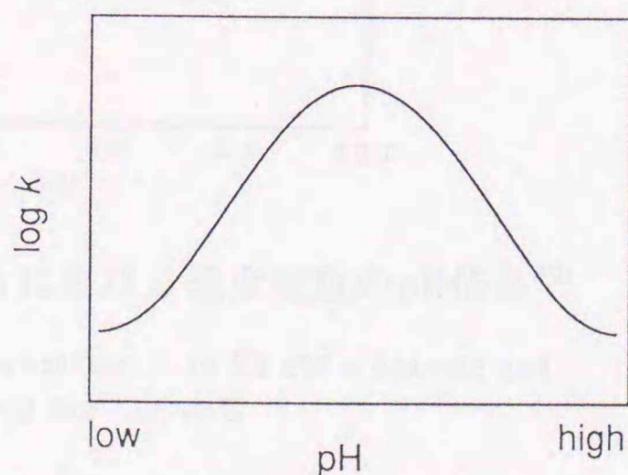


図38 単純な系における速度定数のpH依存性のモデル

①-2, 3に関してはいくらか可能性がある。しかし、本章第一節で述べたとお

リチオリン酸を含む基質の切断では速度変化が見られず、従って k_{cl} はchemical stepの速度ではないという可能性が高い。

また k_{cl} がchemical stepで規定される速度定数であるとする、これらの仮定の下では図38に示すようにこのpH域での活性は最大の値を示しているはずであり、 k_{cl} がchemical stepであるとするには、 $k_{cl} = 0.02 \text{ min}^{-1}$ で与えられる速度は遅すぎる。ハンマーヘッド型リボザイムでは、中性条件下における37℃でのRNA鎖切断の律速段階がchemical stepであるとき、反応速度定数は $\sim 1 \text{ min}^{-1}$ である^{80,81)} (図39)。またBeenらによって、アンチゲノム鎖由来のトランス化HDVリボザイムにおいては、55℃での測定ではあるが $k_{cat} = 2.8 \text{ min}^{-1}$ という非常に高い活性を有していることが報告されている⁶⁶⁾。

ローリングサークル様式の複製に利用されるリボザイムの天然における働きは、環状RNAから生じる直鎖状RNAの切断及び連結反応を触媒する事である。ローリングサークル様式の複製で生じる長鎖RNAには、分子内水素結合を形成することができるユニットが複数存在し、非常に容易に複雑な相互作用で凝集体を形成することが可能であると考えられる。従って、これらのリボザイムには1単位長

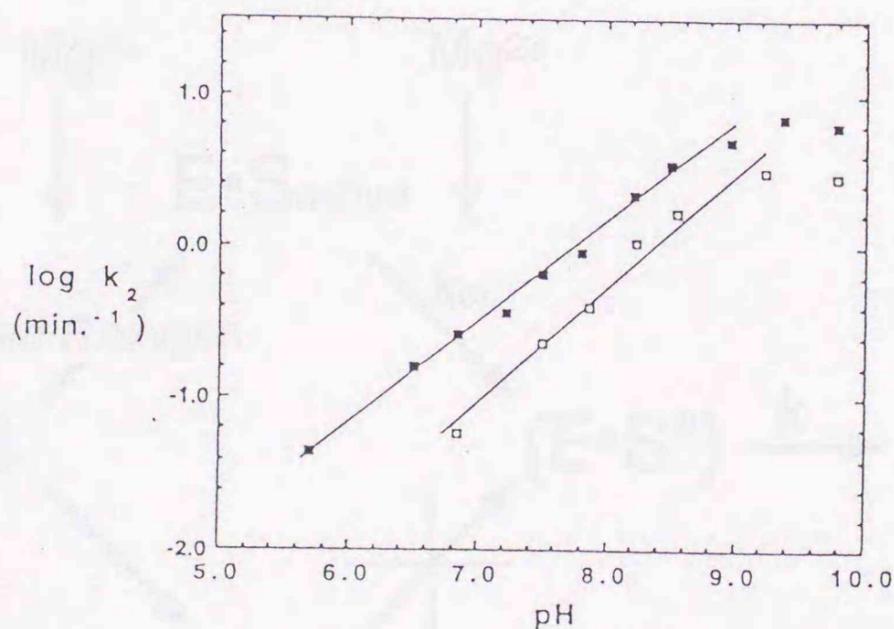


図39 ハンマーヘッド型リボザイムにおける速度定数のpH依存⁸⁰⁾

50 mM buffer, 0.5 mM spermine, 1 μM substrate, 5 to 50 nM ribozyme and
2 mM (■) or 10 mM (□) Mg^{2+} at 25°C

のゲノム鎖あるいはアンチゲノム鎖の生合成と少なくとも同程度の速度で切断を起こすことが要求され、この条件を満たすよう最適化されていることが考えられる。HDVのゲノム鎖はアンチゲノム鎖 (15,000~60,000 copy/cell) と比較して

非常に多コピー (~300,000 copy/cell) であるため^{27,84)}、複製の際には単位時間あたりに活性を発現する頻度はゲノム鎖の方が多い。従ってゲノム鎖のリボザイムがアンチゲノム鎖のリボザイムよりも高い活性を発現する必然性があり、また複製に利用されるポリメラーゼの相違を考慮しても、ハンマーヘッド型リボザイムと少なくとも同程度の速度でRNAを切断する能力を有していることが期待される。このことから、著者の作成したHDV88 - Transは最大活性を発現するに至っておらず、従って少なくともこのHDV88 - Transの律速段階はchemical stepではないと考えられた。

以上のようにして、著者はHDV88 - TransによるRNAの加水分解反応の律速段階は②に示したようにchemical stepではないと結論した。

これは k_{cl} を規定する反応の律速段階が活性複合体形成後、切断までに存在する物理的変化であることを示唆している。一般的にこの条件を満たすものとして構造変化が考えられるが、HDVリボザイムによるRNA鎖の切断においてもchemical stepの前に微細な構造変化が存在すると考えられた。

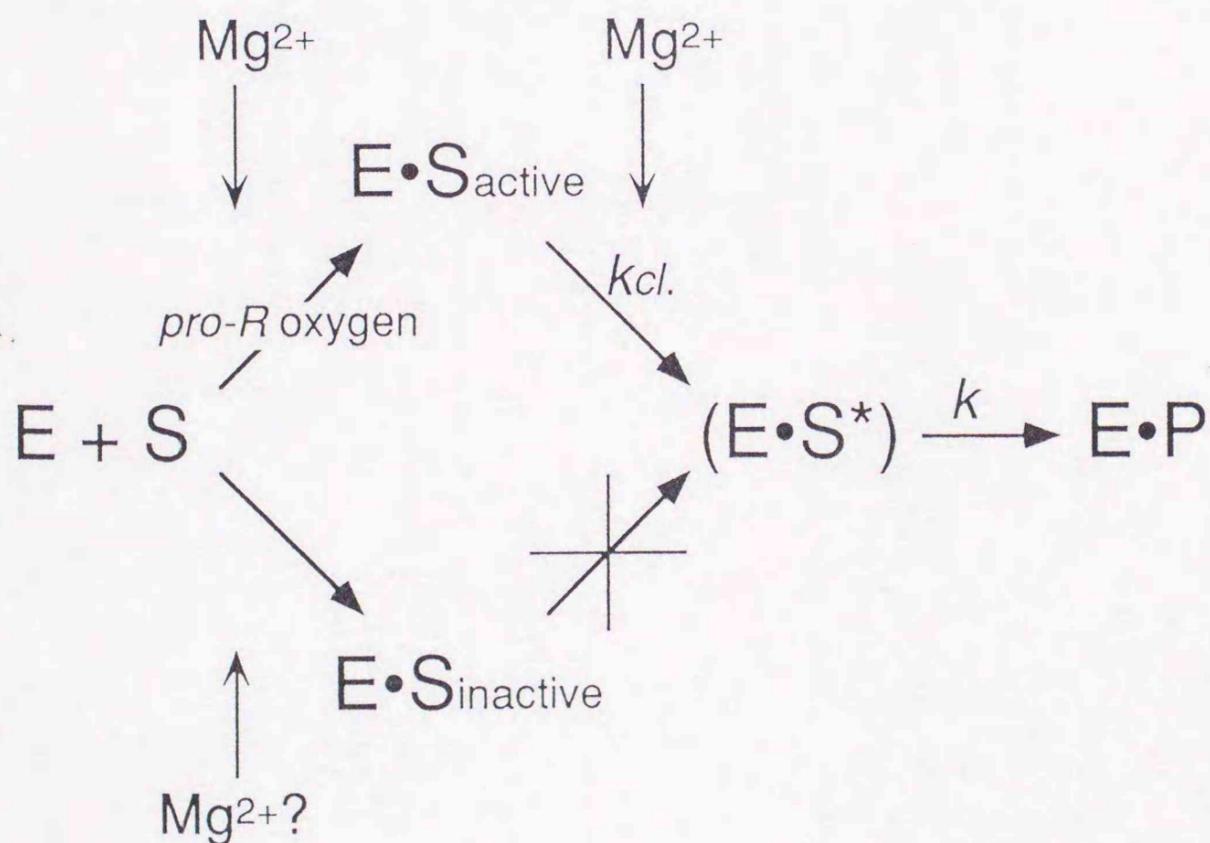


図40 HDVリボザイムにおいて予想される基質切断の反応様式

図40に以上の結果から考えられる、HDVリボザイムの切断反応様式について

まとめた。反応開始時、非常に速く活性複合体と不活性複合体への移行が起こる。活性複合体と不活性複合体は互いに交換しないか、あるいは交換するための逆反応が非常に遅いため、反応開始時に決定された活性複合体の量に対して一次の速度で切断が進行する。この反応の律速段階は切断に先立つ恐らくは微細な構造変化であると考えられ、その後速やかに切断が起こる。

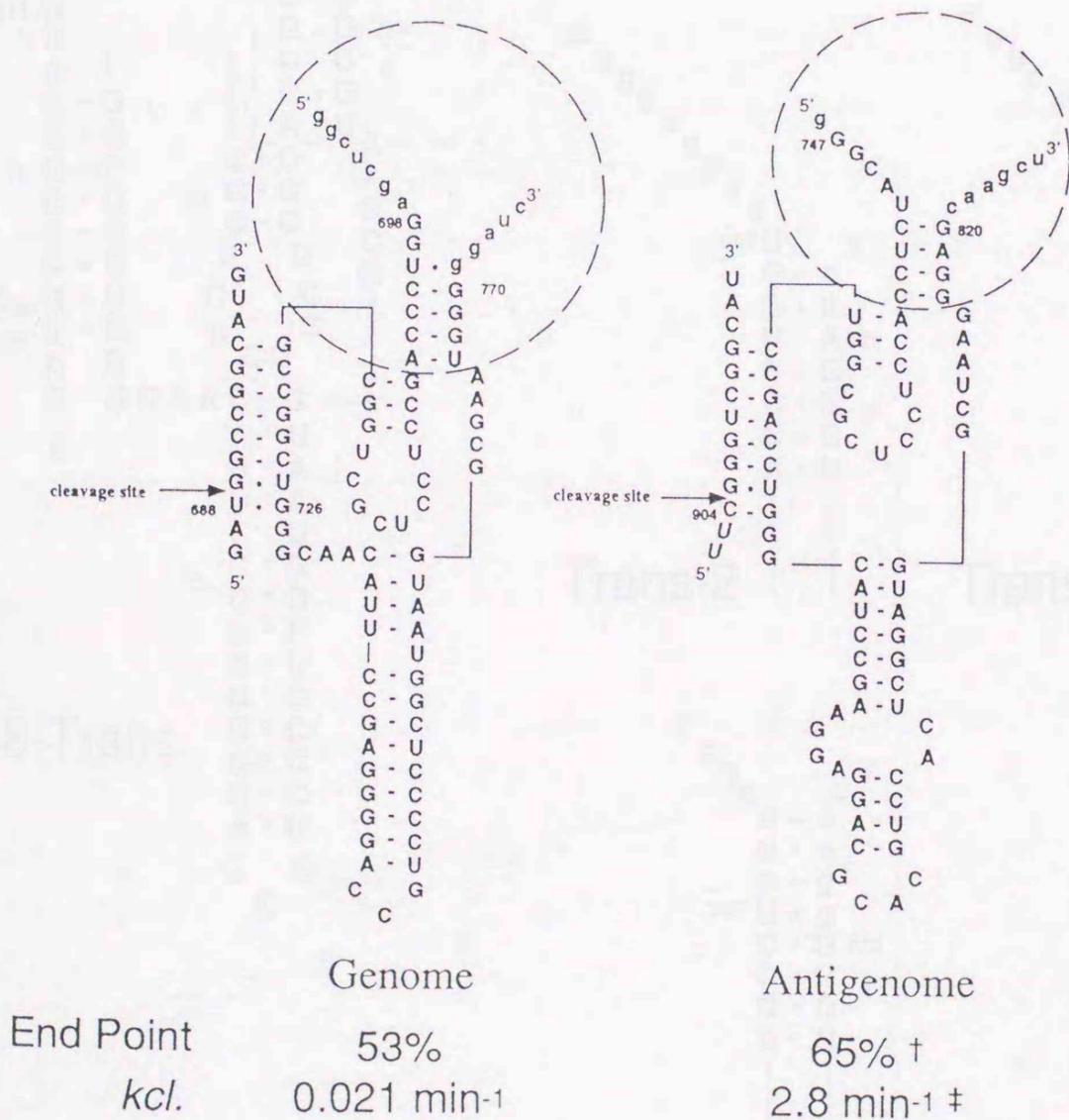
金属は活性複合体の形成と律速段階である構造変化という、少なくとも2つの段階で反応に関与している。これが一分子の金属の働きであるのか、複数の金属の独立した機能であるのかについては回答を得ていない。また、活性複合体の形成には金属と共に切断されるリン酸の *pro-R* 酸素が関与するが、この2つが直接配位しているか否かについても現在検討中である。

第四章 分子間反応を触媒するHDVリボザイムの高機能化

第一節 ステムII領域への変異導入⁴¹⁾

第三章でゲノム鎖由来の配列より作成したトランス型HDVリボザイムHDV88-TransはステムIとステムIIの連結部位で自己切断性RNAを分割したものであった。Beenらは同一の箇所アンチゲノム鎖RNAを分割したトランス型HDVリボザイムを作成しており、異なる活性測定条件下ではあるが、約 10^2 倍の速度で基質鎖を切断している⁶⁶⁻⁶⁸⁾ (図41)。

この反応性の相違がゲノム鎖とアンチゲノム鎖の本質的な差であるとするれば、ゲノム鎖由来のHDVリボザイムを用いることは不利であると結論せざるを得ない。



† : *cis*-reaction at 37°C
‡ : *trans*-reaction at 55°C

図41 ゲノム鎖及びアンチゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムの比較

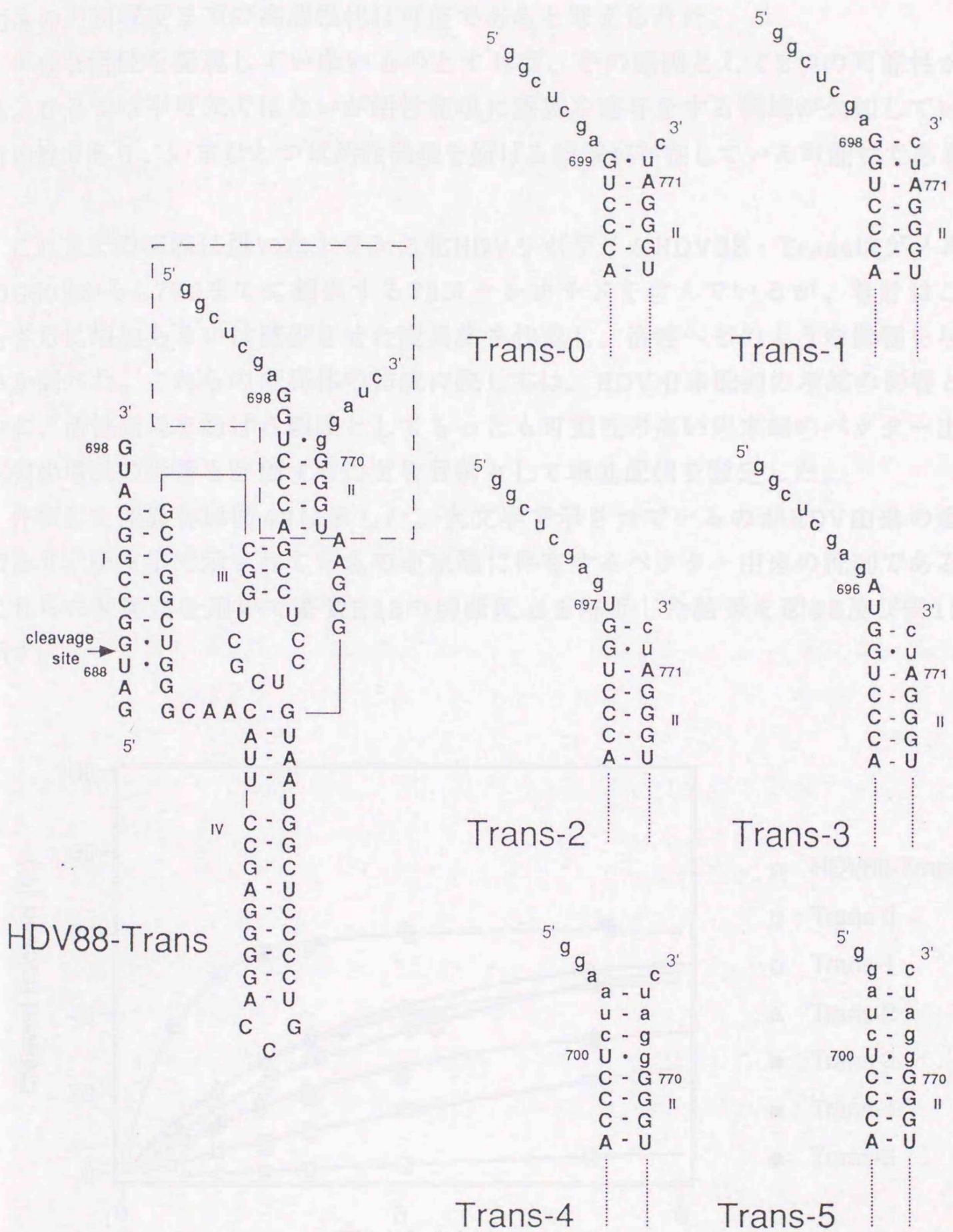


図42 末端配列を変更した変異型トランス化HDVリボザイム

しかしながら第三章第三節で述べたとおり、著者の作成したトランス化HDVリボザイムは本来の活性を十分に発現しておらず、少なくともアンチゲノム鎖由来のものと同程度までの高活性化は可能であると考えられた。

十分な活性を発現していないものとするれば、その原因として2つの可能性がある。ひとつは不可欠ではないが活性発現に重要な寄与をする領域が欠如している可能性であり、いまひとつは活性発現を妨げる領域が存在している可能性である。

これまでの実験に用いたトランス化HDVリボザイムHDV88-Transはゲノム鎖のG698からG770までに相当する73ヌクレオチドを含んでいるが、著者はこれをさらに増加あるいは減少させた変異体を作成し、活性へどのような影響を与えるか調べた。これらの変異体の作成に際しては、HDV由来配列の増減の影響と同時に、活性発現を妨げる領域としてもっとも可能性の高い両末端のベクター由来配列の増減の影響も評価することを目的として塩基配列を設定した。

作成した変異体は図42に示した。大文字で示されているのがHDV由来の塩基であり、小文字で示されているのが末端に存在するベクター由来の配列である。これらの変異体を用いて基質R13の切断反応を解析した結果を図43及び表12に示す。

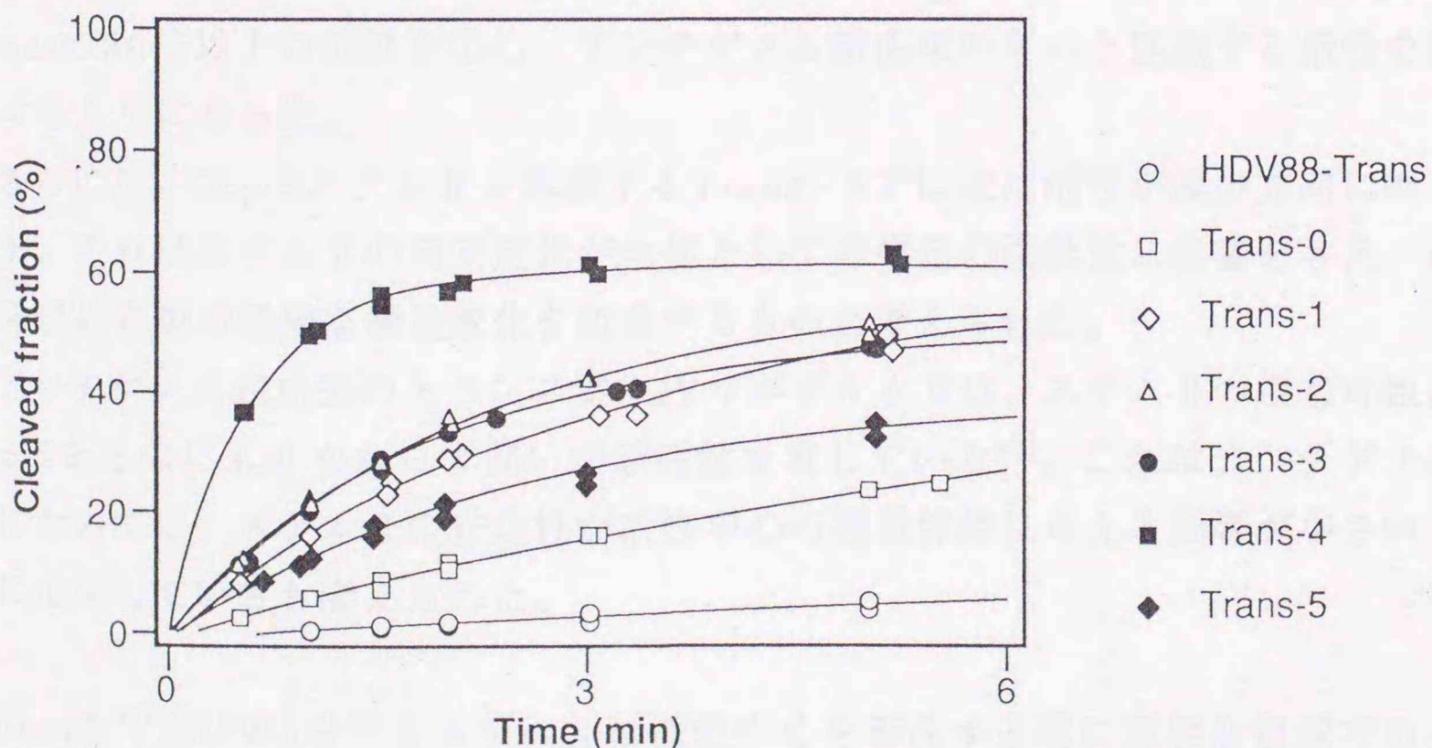


図43 変異型トランス化HDVリボザイムによる基質切断

Ribozyme	k_{cl} (min ⁻¹)		End point (%)
HDV88-Trans	0.021	(1)	53
Trans-0	0.12	(5.7)	52
Trans-1	0.32	(15)	60
Trans-2	0.47	(22)	56
Trans-3	0.53	(25)	51
Trans-4	1.7	(81)	61
Trans-5	0.30	(14)	45

表12 各トランス化HDVリボザイムによる基質切断の速度論量

HDV88 - Transの k_{cl} を基準とした場合の相対値を括弧内に示した。

全ての変異体において活性の増加が見られたが、活性とゲノム鎖由来の塩基数には相関が見られなかった。ここで著者は末端配列の変化に起因するステムIIの塩基対数がこの高活性化と深く関与することを見いだした。

HDV88 - Transは5bpのステムIIを形成するが、新たに作成した変異体ではいずれにおいても結果的にこれが長くなっている(図44)。6bpのステムIIを形成するTrans - 0、7bpのステムIIを形成するTrans - 1, 2, 3、と次第に活性は上昇し、8bpのステムIIを形成するTrans - 4では37℃で $k_{cl} = 1.7 \text{ min}^{-1}$ とHDV88 - Transの80倍以上の活性を示し、アンチゲノム鎖由来のものと匹敵する活性を発現するようになった。

さらに長い9bpのステムIIを形成するTrans - 5では逆に活性が減少方向に転じたが、これはステムIIの高安定化が全体としての構造の柔軟性に影響を与え、活性発現に必須の微細な構造変化を阻害するものと考えられた。

アンチゲノム鎖由来のトランス型HDVリボザイムでは、ステムIIの塩基対数は4bpであるのにもかかわらず高い切断活性を有している⁶⁶⁾。これはアンチゲノム鎖においては、ステムIIの安定性が活性中心の構造保持に与える影響が小さいことに由来していると考えられた。

Beenら⁶⁷⁾及びWuら⁵⁵⁾もステムIIは活性中心を形成する際に重要な領域であると推測している。またGottliebらはアンチゲノム鎖由来のリボザイム配列において、3'末端に存在するGGAGA配列が変性剤存在下での活性発現に重要であると報告している⁴⁶⁾。この配列はpseudoknotモデルではステムIIを形成する領域に相

当することから、彼らの結論はステム II が変性剤存在下での活性発現に重要であると言換えることができる。これらの報告においては反応速度との相関について深く言及されてはいないが、いずれもステム II が活性構造の形成に重要であるという著者の考察と一致する。

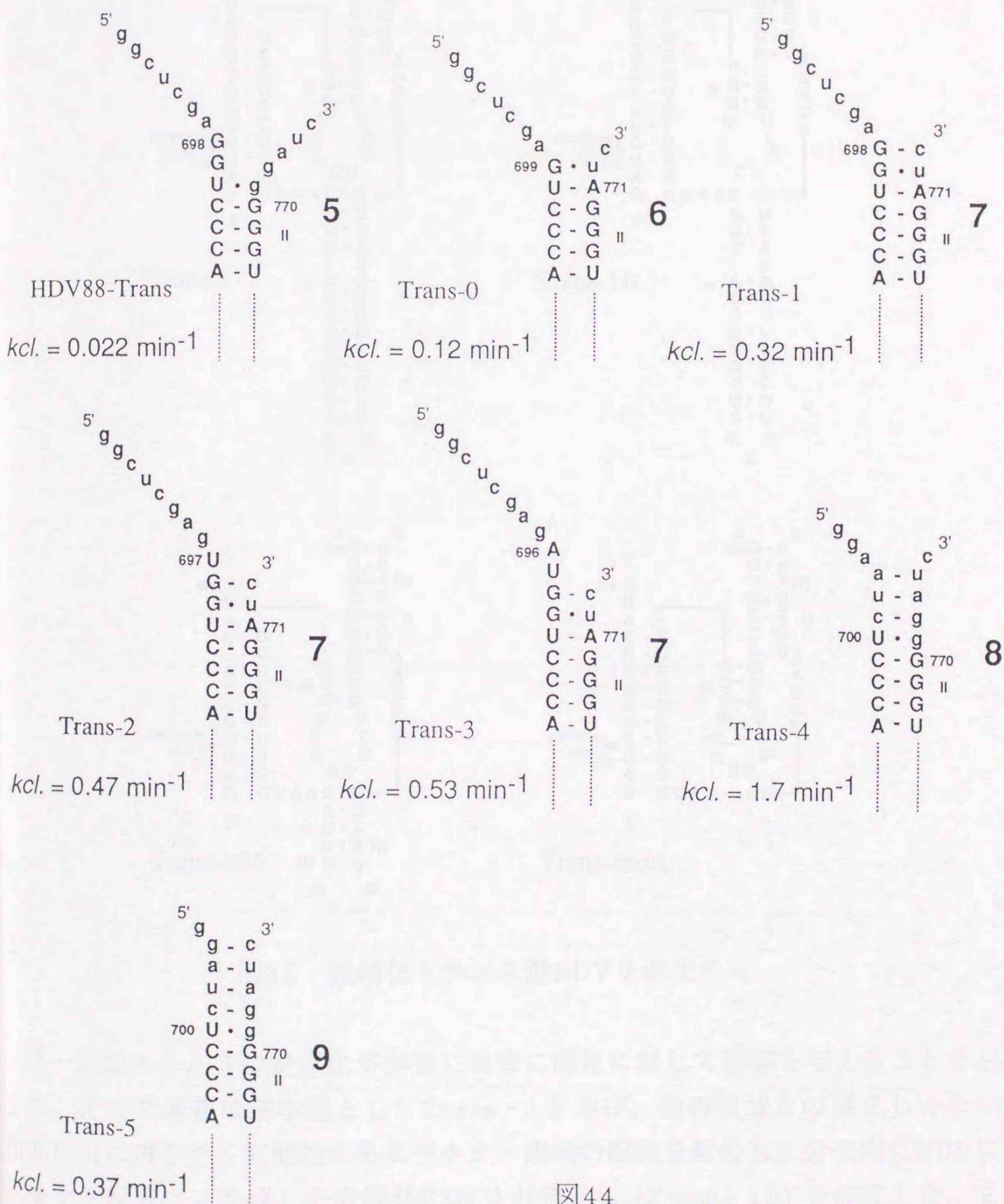


図44

ステム II の塩基対数と活性の相関

第二節 活性発現に寄与しない領域の削除⁴¹⁾

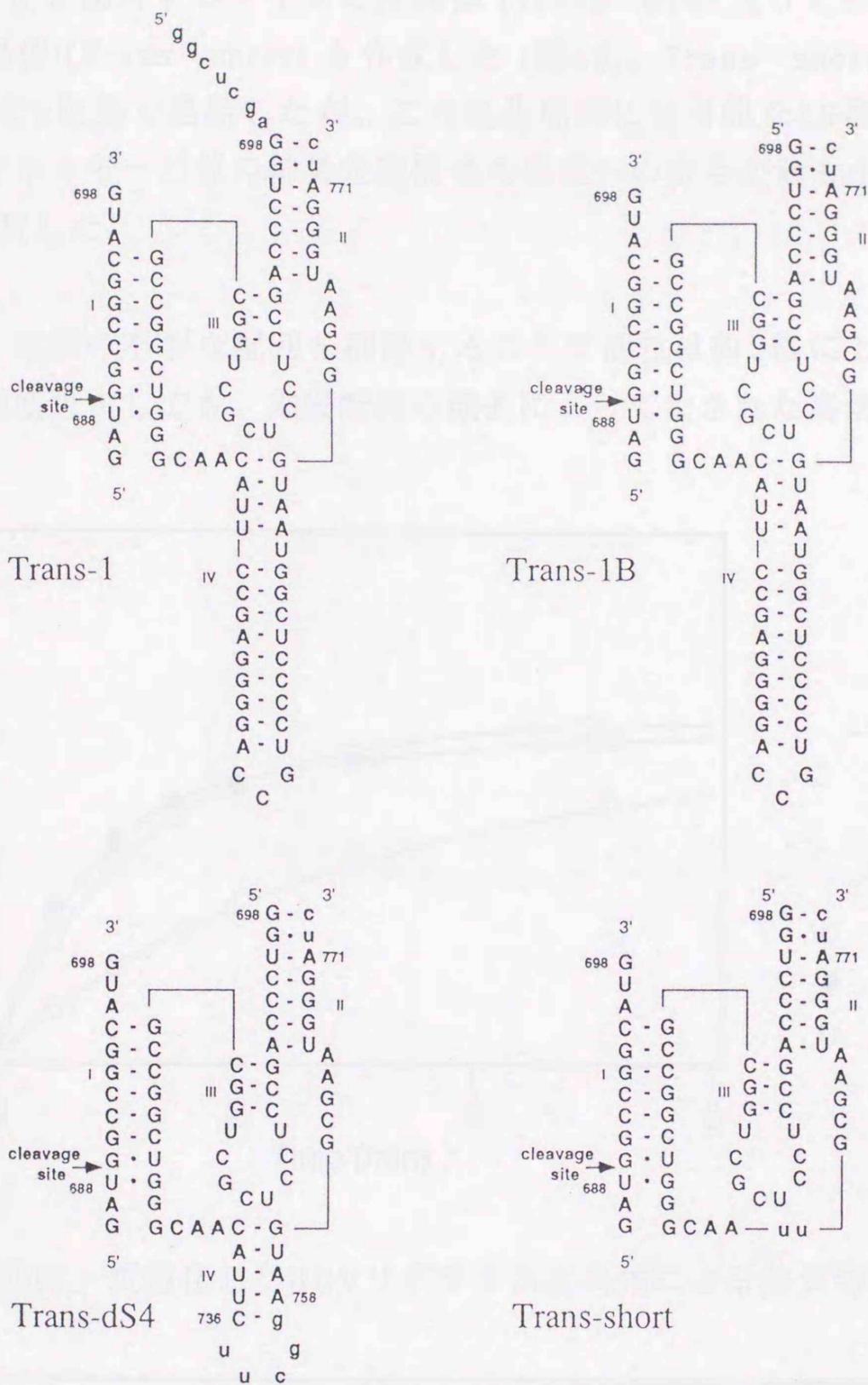


図45 短鎖化トランス型HDVリボザイム

第一節でステムIIの安定化が非常に鋭敏に活性に対して影響を与えることを示した。そこで著者は基本型としてTrans-1を選び、他の領域との望ましくない相互作用に参与する可能性のあるベクター由来の配列を除去し、分子内にHDVに由来する配列のみを残した変異体HDVリボザイム(Trans-1B)を作成した。またシス反応性のHDVリボザイムにおいてステムIVはある程度の欠失が可能である

ことから、短鎖の高活性化HDVリボザイムの作成を目的として、安定化ループで5bpのステムIVを保持するタイプの変異体 (Trans - dS4) 及び完全にステムIVを欠失した変異体 (Trans - short) も作成した (図45)。Trans - shortにおいては、SSrAとSSrBを2塩基で連結したが、この塩基配列には可能な16通りの組み合わせのうち、エネルギー計算の結果安定構造の形成への寄与が最も小さいと考えられたUUを選択した。

その結果、末端の不要な配列を削除することで活性は約3倍に上昇した。ステムIVをある程度欠失しても、末端配列の除去によってなされた高活性化にはほと

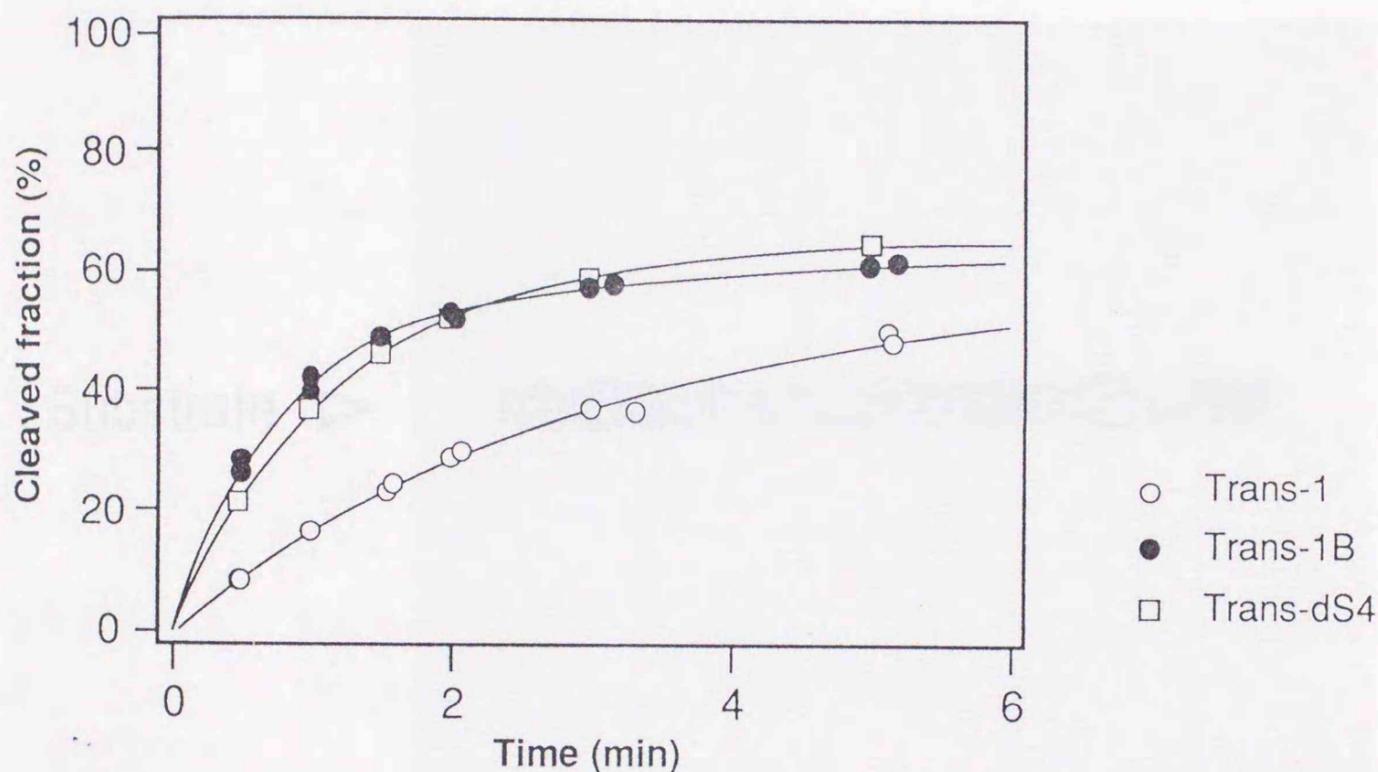


図46 短鎖化したHDVリボザイム変異体による基質切断

Ribozyme	k_{cl} (min ⁻¹)	End point (%)
Trans-1	0.32 (1)	60
Trans-1B	1.1 (3.4)	60
Trans-dS4	0.82 (2.6)	65
Trans-short	(0.0003)	(50)

表13 各短鎖化変異体による基質切断の速度論量

Trans - 1の k_{cl} を基準とした場合の相対値を括弧内に示した。基質切断が非常に遅いTrans - shortに関しては、カーブフィッティングの際の誤差が大きかった。表中には、参考のためEnd Pointが50%である場合の速度定数を示した。

んど影響はなかったが、完全にステムIVを除いたTrans-shortでは2桁から3桁の活性低下が見られた(図46, 表13)。

以上をまとめると、著者はpseudoknotモデルをもとにトランス型HDVリボザイムを作成し、ステムIIの安定化によって活性(k_{cl})を2桁増大させることに成功した。また、トランス型HDVリボザイムに於てもシス型と同様にステムIVは配列に関係なく、ある程度の安定性をもつステムを形成することが重要であるものと考えられた。

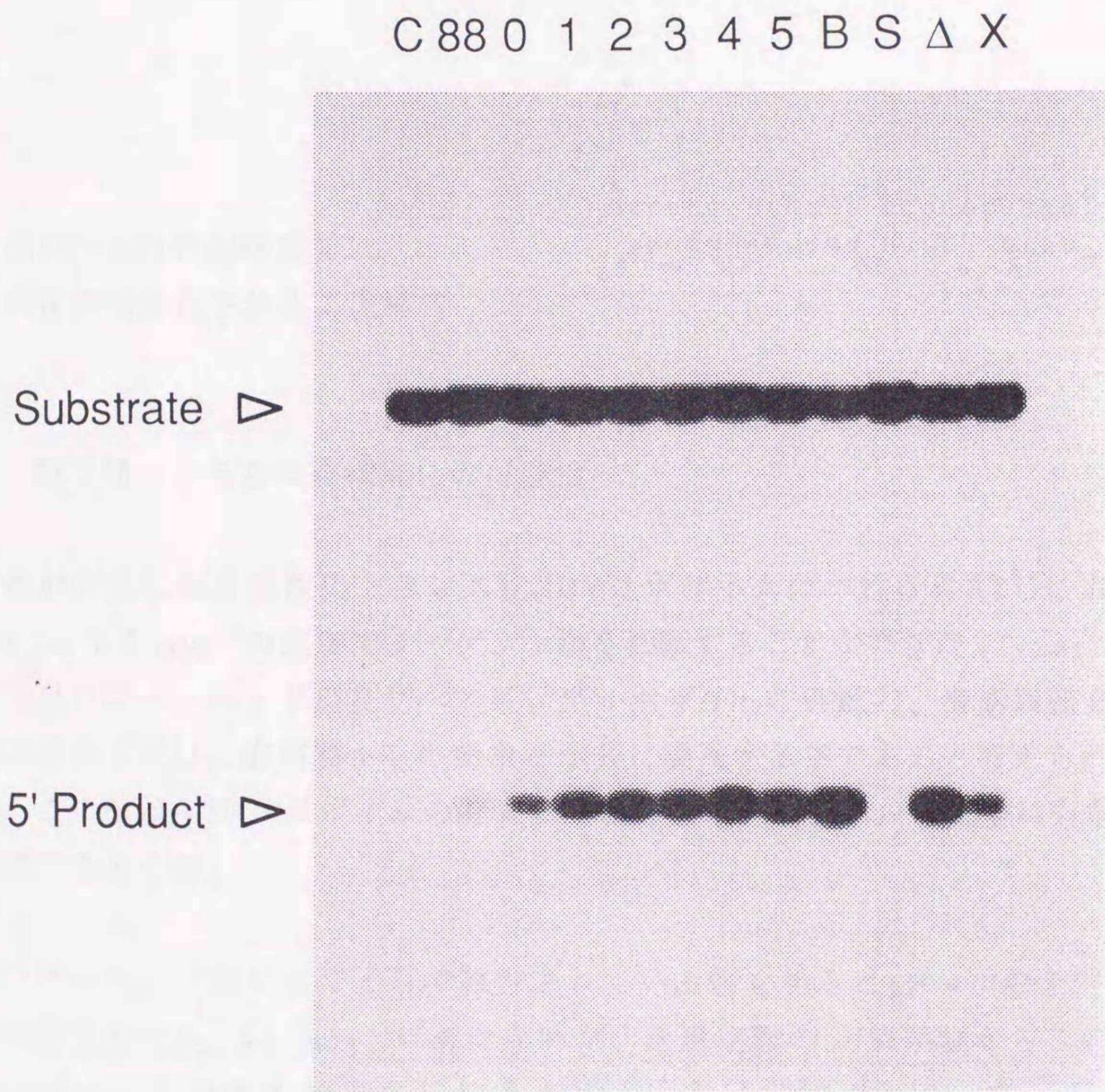


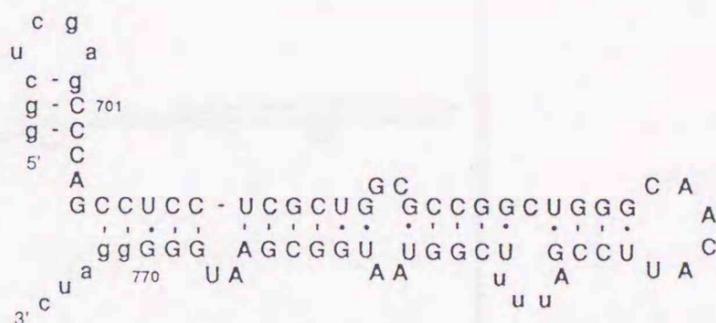
図47 末端配列に変異を有するトランス化HDVリボザイムによる基質切断

左よりコントロール, HDV88-Trans, Trans-0, 1, 2, 3, 4, 5, 1B, short, dS4
右端のXはHDV88-Transと同一の末端配列, Trans-dS4と同一のステムIVを有する変異体

図47に第一節及び第二節で作成した変異体によるR13の切断を示した。全て反応開始後60秒で反応を停止し、変性PAGEによって解析した。1 min⁻¹の速度定数を持つリボザイムであれば、60秒間に活性複合体の63%で基質鎖を切断している。

ステムIVの欠損型であるTrans-dS4は第二章第一節におけるBの分割様式に相当する。二次構造予測⁷³⁾の結果、BにおけるステムIVの配列によって図48に示す形の安定な二次構造が形成可能となることが判明し、これがBで活性が見られなかった主な原因であると考えている。

図48 Bの分割様式で
高度に安定化される二次構造



第三節 さらになる高機能化の可能性

著者が作成した高活性化トランス化HDVリボザイムは中性条件37℃において最高 $k_{cl} = 1.7 \text{ min}^{-1}$ の速度でターゲット鎖を切断することができた (Trans-4)。この値はハンマーヘッド型及びヘアピン型リボザイムに匹敵し、酵素回転を無視し得る条件下では、応用面からの要求を十分に満足する値であると考えられる。しかしこの値はHDVリボザイムの有する潜在的なポテンシャルを完全に引き出した結果であろうか。

ハンマーヘッド型リボザイムで報告されている例を見るとpH = 7の条件下37℃で測定された k_{cat} は1 min⁻¹に満たないが、速度定数のpH依存性からこの値はchemical stepの速度を規定していると考えられる^{80,81)} (図39)。第三章ではHDV88-Transの活性発現における律速段階について、chemical stepに先立つ微細な構造変化であると結論づけたが、Trans-4はHDV88-Transと比較して2桁の速度増加がみられている。速度増加は律速段階の構造変化が加速された結果であることは明らかだが、高活性化HDVリボザイムにおいてもなお反応に含まれ

るすべての段階でこの構造変化が最も遅い段階であるかどうかは疑問である。

著者は第三章においてHDV88 - Transについて行ったのと同様にTrans - 4で $k_{cl.}$ のpH依存性を調べた (図49, 表14)。第三章でも触れたように、測定を行った条件下で速度定数 $k_{cl.}$ がchemical stepを反映しているものであるならば、水素イオン濃度の変化は速度変化を誘起し、理想的には1 pHユニットの上昇は10倍の速度増加を引き起こす。

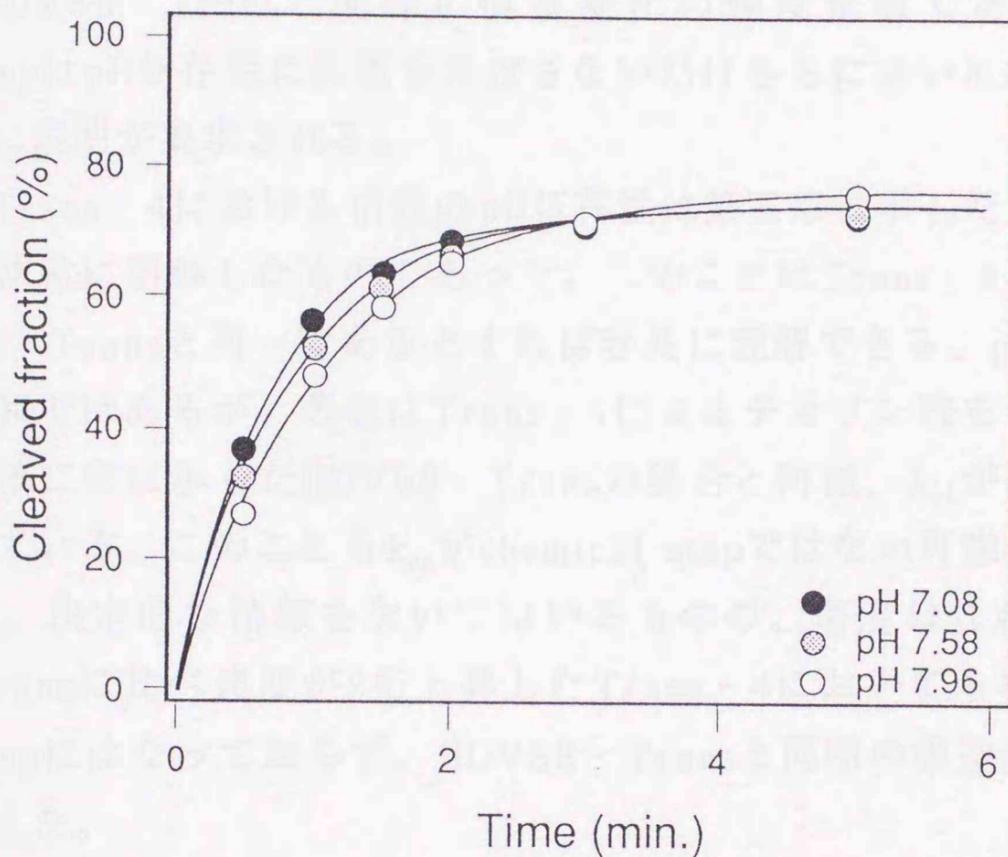


図49 高活性化したTrans - 4による基質切断のpH依存

pH	$k_{cl.}$ (min ⁻¹)	End Point (%)
7.08	1.4	73
7.58	1.2	73
7.96	0.96	77

表14 各pHでの速度論量

しかしながら図49から求められる速度定数はほとんどpHに依存せず、逆にpHの上昇に従って速度定数は微減傾向にあるという、HDV88 - Transとほぼ同様の

現象が観測されることが明かとなった。

ここで、Trans - 4による基質切断の律速段階に関して、第三章第三節で述べた4つの可能性 (① - 1~3, ②) を考察する。

① - 1に関しては第三章と同様の理由をもって否定できる。HDV88 - Transに関する考察では、これらの可能性のうち① - 2, 3についてはチオリン酸を含む基質の切断で速度変化が見られないことと反応速度が遅いということから否定したが、Trans - 4に関してはどうであろう。1 min⁻¹以上というTrans - 4で求められる k_{cl} がHDV88 - Transと同様に構造変化の速度定数であるとするれば、chemical stepはpH依存性に影響を及ぼさないだけさらに速い反応である必要があり、ここに説明が要求される。

しかし、Trans - 4における活性のpH依存性は第三章に示したHDV88 - Transでの結果と非常に類似したものであった。このことはTrans - 4における律速段階がHDV88 - Transと同一であるとするれば容易に理解できる。preliminaryな実験からの情報ではあるが、著者はTrans - 4によるチオリン酸を含む基質の切断においても第二章に示したHDV88 - Transの場合と同様、 k_{cl} が変化しないという結果を得ている。このことも k_{cl} がchemical stepではない可能性が高いことを示している。決定的な情報を欠いてはいるものの、著者はこれらのことからHDV88 - Transに比べ速度が2桁上昇したTrans - 4においてもなお律速段階はchemical stepにはなっておらず、HDV88 - Transと同様の構造変化が律速段階であると考えた。

構造変化が律速段階であるとするれば、HDVリボザイムによるRNA鎖切断のchemical stepはハンマーヘッド型リボザイムに比べ非常に速いと考えられる。Uhlenbeckらによって、Mg²⁺に配位した水分子が最大限利用された時のpH 7でのRNA鎖切断速度は、そのpKaから13000 min⁻¹となることが予測されている⁸⁰⁾。従って短鎖RNAから構成されるハンマーヘッド型リボザイムよりも、HDVリボザイムが効率よく活性種となる金属イオンを保持することができるとする考察は無理があるものではない。また、chemical stepを加速する機構や相互作用が存在する可能性も考えられる。

構造変化が律速段階であるとするれば、さらなる高活性化の余地を残しているものと考えられる。また機能性アンチセンス核酸としての利用を目的とするれば、他

のリボザイムと比較して長鎖のRNAから構成されるHDVリボザイムの大きさは改善されなければならない重要な問題の一つであり、本章第二節で試みたような短鎖化HDVリボザイムの作成が必須である。

しかしヒト細胞中で活性を発現するための、また効率よく金属を配位するための情報がその長鎖RNAに保持されているとすれば、任意の標的配列の切断や高活性化及び短鎖化といった諸問題を解決すると同時に、これらのHDVリボザイムの特徴を損なわない変異体を作成することが今後の研究の課題であると考えられる。

結論

1. ヒト δ 型肝炎ウイルス (HDV) ゲノム鎖由来のリボザイムにおいて、pseudoknot型の二次構造が活性構造であることを明らかにした。

2. 活性中心において切断反応に直接関与すると考えられる一本鎖領域の塩基の重要性を評価し、consensus sequenceを以下のように決定した。

SSrA 5' G G (G/A/U) N (A/U/G) Pu 3'

SSrB 5' (G/U) C N (A/G/U) A 3'

SSrC 5' (U/C/G) C N N (C/A/G) (G/A/U) N N 3'

これらの一本鎖領域に存在する残基の中でG726, C763, C709が活性発現に中心的な役割を有している可能性を示し、切断部位近傍のSSrAと金属の配位が示唆されたSSrBは直接の触媒作用に、SSrCは主にリン酸部位における相互作用によって構造保持に関与することを示唆した。

3. HDVゲノム鎖由来のリボザイムを様々に分割し、分子間反応によってRNA鎖を切断する分割様式を示した。ステムII領域を安定化することで、このトランス化HDVリボザイムの活性を2桁増強することに成功した。

4. HDVリボザイムによる基質切断には、切断されるリン酸ジエステル結合の *pro-R* 酸素原子と、金属イオンが共に要求される。金属イオンは少なくとも2つの段階で関与し、律速段階は求核攻撃に先立つ金属依存の微細な構造変化であると考えられた。

5. ステムII領域の安定化によるゲノム鎖由来トランス化HDVリボザイムの高活性化は、基質切断の際の律速段階である構造変化を加速することで達成される。著者の作成した変異体トランス化HDVリボザイムの中で、最も速く基質を切断するTrans-4においてもなお律速段階はchemical stepではない可能性が高く、さらなる高活性化の余地を残しているものと考えられた。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導御鞭撻をいただきました北海道大学 薬学部 遺伝子有機化学講座 大塚栄子教授、ならびに通産省 工技院 生命工学工業技術研究所 分子遺伝学研究室 西川諭室長に深く感謝いたします。

共同研究者として、貴重なサンプル及びデータを御供与くださいました Penmecha K. R. Kumar博士、Young - Ah Suh博士、Yeon - Hee Jeoung博士、ならびに西川富美子氏、湯田和洋氏に心より感謝いたします。

大阪大学 薬学部においてHDVリボザイム遺伝子の構築に御協力いただきました現・横浜国立大学 工学部 上杉晴一教授、ならびに中井忍氏に感謝いたします。

研究上の討論に参加していただき、有益な御助言をいただきました多比良和誠博士をはじめとする分子遺伝学研究室の皆様、ならびに井上英夫助教授をはじめとする遺伝子有機化学教室の皆様に感謝いたします。

最後に、論文作成までの物質的、精神的援助をいただきました家族と友人達そして大阪大学、北海道大学の諸先輩に深く感謝いたします。

1994年 3月

川上純司

実験の部

実験材料

オリゴヌクレオチド合成試薬

Applied Biosystems Inc. (ABI)

American Bionetics Inc. (ABN)

ベクターDNA

pUC118

宝酒造

M13 KO7

宝酒造

放射性同位体標識化合物

[γ - ^{32}P] ATP

Amersham

[α - ^{32}P] CTP

Amersham

[α - ^{32}P] UTP

Amersham

電気泳動関係 (いずれも電気泳動用特級)

アクリルアミドモノマー

半井化学

N,N - メチレンビスアクリルアミド

半井化学

過硫酸アンモニウム

半井化学

N,N,N',N' - テトラメチルエチレンジアミン

半井化学

尿素 (分子生物学研究用)

半井化学

アガロース

SEA KEM LE

FMC

SEA PLAQUE

FMC

Xylene cyanol FF (XC)

半井化学

Bromophenol blue (BPB)

半井化学

臭化エチジウム

半井化学

トリスベース

Sigma

EDTA・2Na

同仁化学

ホウ酸

半井化学

DNA分子量マーカー

ϕ X174 - <i>Hae</i> III digest	東洋紡績
1357, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp	
λ - <i>Hind</i> III digest	東洋紡績
23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 bp	

酵素

T4ポリヌクレオチドキナーゼ	宝酒造 日本ジーン
----------------	--------------

制限酵素

	宝酒造
	東洋紡績
	BRL
Taq DNA polymerase	宝酒造 和光純薬
MLV Reverse Transcriptase	東洋紡績
AMV Reverse Transcriptase	東洋紡績
DNase I, RNase - free	Boehringer Mannheim
BAL31 nuclease	宝酒造
卵白リゾチーム	Sigma
RNase A	Sigma

菌株

	宝酒造
JM 109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ (<i>lac - proAB</i>)
	F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15]
MV 1184	Δ (<i>lac - proAB</i>) <i>ara thi</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>strA</i> Δ (<i>str - recA</i>) 306:: <i>Tn10</i> (<i>tet^r</i>)
	F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15]

培地

バクト・トリプトン	Difco
バクト・酵母エキス	Difco
バクト・カザミノ酸	Difco

バクト・細菌用寒天

Difco

抗生物質ほか培地関連試薬

アンピシリン

明治製菓

カナマイシン

Vitamin B1

半井化学

IPTG

Sigma

X - gal

和光純薬

その他の試薬

dNTP

宝酒造

エタノール

和光純薬

イソプロパノール

和光純薬

フェノール

和光純薬

クロロホルム

和光純薬

その他の試薬は半井化学, 和光純薬, 同仁化学及びSigmaのものを用いた。

カラム担体

SEP - PAK C18 CARTRIDGE

Waters

Oligonucleotide Purification Cartridge

ABI

QIAGEN Tip - 5, 20, 100, 500

DIAGEN

Bio Spin Column 30

BIO - RAD

HPLCカラム

CHEMSORB 5 - ODS - H 4.6 × 250 (S)

島津製作所

Shim - Pack CLC - ODS 0.15m × 6.0 φ

島津製作所

Pep RPC™ 15 μm HR 10/10

Pharmacia

キット

Sequencingキット

Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit

ABI

Taq DyeDeoxy™ Terminator

Cycle Sequencing Kit

ABI

Ligation Kit	宝酒造
Site - directed mutagenesis キット	
IN VITRO MUTAGENESIS	Amersham
Muta - Gene	BIO - RAD
PCRキット	
GeneAmp™ PCR Reagent Kit	宝酒造
RT - PCRキット	
GeneAmp™ RNA PCR Kit	宝酒造
GeneAmp™ Thermostable <i>rTth</i>	
Reverse Transcriptase RNA PCR Kit	宝酒造
T7転写反応キット	
MEGAscript™	Ambion
MAXIscrip™	Ambion
Paired - Promoter T7 System	Amersham
<i>Ampliscribe</i> ™ T7 Transcription Kit	EPICENTRE TECHNOLOGIES
RNA Sequencingキット	
Expanded RNA Sequencing Kit	Pharmacia
機器	
UVメーター	
UV - 2100	島津製作所
Gene Quant 80 - 2103 - 98	Pharmacia
DV - 50	BECKMAN
pHメーター	
HORIBA H - 7LD	堀場製作所
HPLC	
LC - 4A	島津製作所
核酸自動合成機	
Model 380A DNA synthesizer	ABI
Model 392B DNA/RNA synthesizer	ABI
DNAシーケンサー	
Model 373A DNA Sequencer	ABI
冷却遠心機	

MR - 150	トミー精工
RS - 206	トミー精工
SCT 15B	日立製作所
Thermal Cycler	
PJ1000NV	PERKIN ELMER CETUS
電気泳動関連	
Mupid - 2	コスモバイオ
パワーサプライ SJ - 1065	アトー
トランスイルミネーター	フナコシ薬品
イメージアナライザー	
BA - 100	Fuji Film
Imaging Plate TYPE - BA	Fuji Film
振盪培養機	
TGR	いわしや生物化学
RMR - S	いわしや生物化学
BIO SHAKER	TAKASAKI Scientific
インキュベーター	
Air Incubator IS - 61	ヤマト科学
Dry Thermo Unit TA - 2L	TAITEC
COOLNIT BATH EL - 8	TAITEC
その他	
X線フィルム (MEDICAL X - RAY FILM)	Fuji Film
濾紙 (3MM Chr)	Whatman
フィルター	
HA 0.45 μm	日本ミリポア
Trans - Blot Transfer Medium 0.45 μm	Bio Rad
Sterile Acrodisk 0.22 μm , 0.45 μm	Gelman Sciences

実験操作及び手法

以下に示さない事項に関しては文献85)に従った。

緩衝液及び溶液

TE緩衝液

10 mM Tris - HCl (pH 8.0), 1mM EDTA

TBE緩衝液

90 mM Tris base, 90 mM ホウ酸, 2 mM EDTA

通常は10倍濃度の保存溶液 (10 × TBE) を作成し、要時希釈して用いる。

40% (w/v) アクリルアミド溶液 (29:1)

アクリルアミド 193.3 g

N,N - メチレンビスアクリルアミド 6.7 g

蒸留水を加えて全量を500 mlにし、0.22 μ mのフィルターで濾過した。

6 × Loading solution

0.25% XC, 0.25% BPB, 30% Glycerol

2 × 反応停止液

40 mM EDTA, 0.083% XC, 0.083% BPB, 9M 尿素

抽出用緩衝液

500 mM 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM EDTA,

0.1% SDS

RNAの抽出用には、酢酸マグネシウムを除いたものを作成して用いた。

滅菌

通常はオートクレーブにより、120°C, 20分間の高温高圧滅菌を行った。

ピペット及び試験管は180°C, 4時間の乾熱滅菌を行った。

加熱が不適当な場合、0.22 μ mのフィルターによる濾過滅菌を行った。

DNAの化学合成及び精製

合成はABI Model 380A DNA自動合成機またはModel 392B DNA/RNA自動合成機を用いて行った。使用説明書に従い、CPG樹脂0.2 μ molを使用した伸長反応を行い、反応終了後濃アンモニア処理を行って樹脂から切り出した。切り出されたDNAを含む濃アンモニア水はバイアル瓶に回収し、濃アンモニア水を加えて全量を2 mlとした。これを55°Cで8時間以上加熱し、塩

基部の脱保護を行った。

精製は5'末端にジメトキシトリチル基を残したものについては、C18シリカゲルカラムであるOligonucleotide Purification Cartridge (OPC) によって行い、5'末端を水酸基としたものについては7 M尿素を含む20%変性PAGEからの回収によって行った。高純度のものを必要とする場合、その後HPLCによってさらに精製した。

OPCによる精製

脱保護後、蒸留水を1 ml加え全量を3 mlとした。OPCに5 mlのアセトニトリルを流して洗った後、5 mlの2 Mトリエチルアミン - 酢酸緩衝液 (pH 7.0) をゆっくりと (1~2滴/秒) 流して平衡化した。DNA溶液をカラムにゆっくりと2回通して樹脂に吸着させた。5 mlの1/10希釈アンモニア水をゆっくりと3回通してジメトキシトリチル基を持たない短鎖のものを除き、5 mlの蒸留水で2回洗った。ジメトキシトリチル基を除去するため、5 mlの2%トリフルオロ酢酸を約5分かけてゆっくりとカラムに通した後、5 mlの蒸留水で2回洗ってトリフルオロ酢酸を除いた。精製するDNAが40塩基長以上であれば、その後5 mlの希アンモニア水を通し、5 mlの蒸留水で2回洗った。カラムに残った完全脱保護のDNAは1 mlの20%アセトニトリル水溶液で溶出し、溶媒を留去した後蒸留水またはTE緩衝液に再溶解した。

変性PAGEからの回収による精製

脱保護後に溶媒を留去し、7 M尿素を含む20%変性PAGEを行った。泳動後、紫外線ランプ ($\lambda = 254 \text{ nm}$) を用いて吸収のあるDNAバンドを検出し、目的のDNAバンドを切り出した。Crush and Soak法あるいはElectroelution法により、ゲル片からDNAの回収を行った。回収液をエタノール沈殿することで、または濃縮後C18逆相カラムクロマトグラフィーを行うことで精製DNAを得た。

(PAGE、Crush and Soak法及びElectroelution法は後述)

RNAの化学合成及び精製

合成はABI Model 392B DNA/RNA自動合成機を用いて行った。使用説明書に従い、CPG樹脂0.2 μmol または1 μmol を使用した伸長反応を行った。反応終了後、酸処理により5'末端を水酸基とし、エタノール - 濃アンモニア (3 : 1) 処理を行って樹脂から切り出した。切り出し後のRNA溶液はバイア

ル瓶に回収し、濃アンモニア水を加えて全量を2 mlとした。これを55℃で8時間以上加熱し、塩基部の脱保護を行った。エッペンドルフチューブ内で試料を真空乾燥した後、2'保護のt-Butyldimethylsilyl基を除去するために200 μ lの1 M Tetrabutylammonium fluoride in THFを加え、室温で一晩放置した後、1 mlの0.1 M Triethylammonium acetate緩衝液を加えて反応を停止した。SEP-PAK C18 CARTRIDGEまたはOPCによりRNAを回収し、20%変性PAGEまたはHPLCによって精製した。

核酸の定量及び保存

真空乾燥した核酸を適当量の滅菌水またはTE緩衝液に溶解し、一部を希釈して260 nm, 280 nm, 320 nmにおけるUV吸収 (光路長 = 1 cm) を測定した。各吸収をそれぞれ A_{260} , A_{280} , A_{320} としたとき、試料 (原液) の濃度は以下のように求めた。

$$\text{二本鎖DNA} \quad (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{希釈率} \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{一本鎖DNA} \quad (A_{260} - A_{320}) \times 37 \times \text{希釈率} \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{一本鎖RNA} \quad (A_{260} - A_{320}) \times 40 \times \text{希釈率} \quad \mu\text{g/ml}$$

なお、1 kbの鎖長を有するものであれば、 Na^+ 塩で以下の分子量を持つのでモル換算が可能である。

$$\text{二本鎖DNA} \quad 6.5 \times 10^5 \text{ daltons}$$

$$\text{一本鎖DNA} \quad 3.3 \times 10^5 \text{ daltons}$$

$$\text{一本鎖RNA} \quad 3.4 \times 10^5 \text{ daltons}$$

主にモル数を問題とする短鎖のものについては、塩基の偏りを補正するためにモル吸光係数を以下の式で算出した。

$$15.2 \times \text{A数} + 7.4 \times \text{C数} + 11.5 \times \text{G数} + 8.3 \times \text{T数} + 10 \times \text{U数}$$

オリゴデオキシリボヌクレオチドであればヌクレオチドの平均分子量を330として重量濃度の算出に用いた。

また、純度の指標として A_{260}/A_{280} を A_{320} とともに用いた。プラスミドDNAであれば $A_{260}/A_{280} = 1.8$ 以上、オリゴヌクレオチドであれば $A_{260}/A_{280} = 1.9$ 以上の値を示すものを実験に用いた

全て核酸試料は -20°C で保存した。

ブタノール濃縮

試料の核酸濃度が低い場合、必要に応じてブタノール濃縮を行った。核酸

溶液と等量のn-ブタノールを加え、攪拌の後遠心分離した。水層を回収し、目的の量になるまでこの操作を繰り返した。ブタノール濃縮は損失なく核酸を回収することが可能であるが、塩も等しく濃縮される。均一層になった場合は、少量の水を加えて核酸を抽出した。

エタノール沈殿

試料に対して1/9容量の3 M NaOAc (pH 5.4) または1/3容量の10 M NH₄OAcと、2.5倍容量のエタノールを加えて混和し、-20℃に30~60分間放置した。4℃で12000 × g, 10~15分間遠心して上清を除去し、沈澱(DNA, RNA)を回収した。適当量(エッペンドルフチューブの場合100~500 μl)の70%エタノール水を加えて沈澱を洗浄し、~5分遠心して沈澱を回収した後、真空乾燥または放置してエタノールを除去した。なお100 bp以下の短鎖の回収もしくは核酸が20 ng/ml以下の濃度の時は、MgCl₂を最終濃度10 mMになるように加えてから上記の操作を行った。

イソプロパノール沈殿

試料の液量が多い時は、試料に対して0.6~1倍容量のイソプロパノールを加えて0℃に15~30分間放置し、エタノール沈澱と同様の操作で沈澱を回収した。ただしエタノール沈澱に比べて塩の析出が多いので、70%エタノールによる洗浄を必要に応じて複数回行った。

ポリエチレングリコール(PEG)沈殿

大腸菌からのプラスミドDNA回収の際、エタノール沈殿及びイソプロパノール沈殿によって得られるのはDNAとRNAの混合物である。DNAのみを回収する必要があるときは、長鎖RNAをRNaseAによって処理(プラスミドDNAの回収の項を参照)して短鎖とした後に、QIAGEN TipまたはPEG沈殿によってRNAを除いた。処理する核酸が少量の場合にPEG沈殿を行った。プラスミドDNAと短鎖RNAの混合物を適当量のTE緩衝液に溶解し、0.6倍容量の20% (w/v) ポリエチレングリコール(平均分子量8000), 2.5 M NaCl溶液を加えた。よく攪拌し、氷中に1~6時間静置した。4℃で12000 × g, 10~15分間遠心した後RNAを含む上清を注意深く完全に除去し、沈澱としてDNAを回収した。70%エタノール水により沈澱を洗浄した後、真空乾燥または放置してエタノールを除去した。

フェノール・クロロホルム抽出

50 mM Tris - HCl (pH 7.5) で飽和したフェノール:クロロホルム混液 (1:1) を試料に対して等容量加えて抽出操作を行い、遠心後水層 (上層) を回収した。必要に応じて、有機層 (下層) を蒸留水またはTE緩衝液で逆抽出した。回収した水層に対して同じ操作をもう一度繰り返した後、エタノール沈澱で試料を回収した。必要があればエタノール沈殿に先立って、クロロホルム、ジエチルエーテルによる水層からの有機溶媒の除去を行った。

Kination

オリゴデオキシリボヌクレオチドの5'水酸基のリン酸化は、通常50 mM Tris - HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 10 mM β - ME, 1 mMスベルミンを含む緩衝液中、37℃で30~90分間反応させた。反応終了後、90℃で3分間加熱して反応を止めた。核酸の5'末端標識の際には、[α - ³²P] ATPを系内に存在させた。

Ligation

アニーリング処理 (75℃, 15分間加熱後、室温まで徐冷した。) したオリゴデオキシリボヌクレオチド、あるいは遺伝子断片とベクターDNAとの結合反応は、通常等量 (w/w) のDNAを用いてLigation Kit (宝酒造) により行った。16℃で1~12時間反応させた後、必要があればエタノール沈殿によってDNAを回収した。

制限酵素によるDNAの切断

通常1 μgのDNAを切断するのに2~5 unitの制限酵素を使用し、各制限酵素に添付の緩衝液、または20 mM Tris - HCl (pH 7.6), 7 mM MgCl₂, 10 mM β - MEを含む10~100 μlの緩衝液中、各制限酵素の至適濃度の塩を添加して、37℃で2~12時間反応させた。反応終了後、加熱あるいはフェノール処理で反応を止めた。

PCR

鋳型とプライマーの種類及び濃度以外の反応条件は、終濃度で10 mM Tris - HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP,

0.001% (w/v) gelatinである。これに適当量のプライマー (通常5~50 pmol/20 μ l反応液) 及び酵素 (0.5~2.5 unit/20 μ l反応液) を加え、最後に鋳型鎖を少量加えた。ミネラルオイル添加後、Thermal Cyclerによって、熱変性 (94°C), アニールリング (37~65°C), 鎖伸長反応 (60~72°C) のサイクルを20~35回繰り返した。反応終了後はフェノール・クロロホルム抽出を行なうことで酵素を失活させた。

PAGE

40%アクリルアミド溶液と1/10容量の10 × TBE緩衝液を蒸留水により希釈することで、目的の濃度のアクリルアミド溶液を調製した。これに過硫酸アンモニウムとN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを適当量加え、2枚のガラス板で作った枠 (厚さ0.7 mm, 幅7~20 cm, 長さ7~20 cm) の中に流し込み、ゲル化させた。試料に1/6容量の6 × Loading solutionを加え、TBEを泳動用緩衝液として100~400 Vの定電圧で泳動した。泳動後、核酸が十分量あれば紫外線ランプ ($\lambda = 254$ nm) を用いて吸収のある核酸のバンドを直接検出した。少量のDNAを泳動した場合はゲルを1~5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で染色し、紫外線ランプ (トランスイルミネーター, $\lambda = 302$ nm) を用いて蛍光を持つDNAバンドを検出した。泳動パターンはポラロイドカメラで撮影し、必要の際は目的のDNAのバンドを切り出した。

変性PAGE

数十ヌクレオチドまでの一本鎖DNAまたはRNAの解析には変性PAGEを用いた。ゲル液の作成時尿素を終濃度7 Mとなるように溶解し、幅25 cm, 長さ50 cmのガラス板を使用した以外は、PAGEと同様の操作を行った。試料に等量の2 × 反応停止液を加え、90°C, 2分間の熱変性処理の後急冷し、ゲルにアプライした。泳動は1500~2000 Vの定電圧で行った。

放射性同位元素を含む試料を泳動した際は、泳動後片側のガラス板を取り去り、ゲル表面にラップを張り、X線フィルムまたはイメージアナライザー用イメージングプレートを接着した。

アガロースゲル電気泳動

1 gまたは2 gのアガロースに20 mlの10 × TBE緩衝液と蒸留水を加えて200 mlにした (1%または2%アガロースゲル)。電子レンジで溶解させた後、

臭化エチジウムを0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、水平板装置に流し込んでゲル化させた。試料はPAGEの場合と同様にLoading solutionに溶解し、TBEを泳動用緩衝液として100 Vの定電圧で泳動した。泳動後トランスイルミネーターを用いて泳動パターンの解析を行い、必要があればDNAバンドを切り出した。

基本的に100 bpまでの短鎖DNAの解析にはPAGEを、500 bpまでのものには2%アガロースゲル電気泳動を、それ以上の長鎖DNAの解析には1%アガロースゲル電気泳動を利用した。

PAGE (変性PAGE) からのDNA, RNAの回収

Crush and Soak法

ゲル片をエッペンドルフチューブに入れ、細かく砕いた。400 μl の抽出用緩衝液を加え、室温で2~6時間振盪した。上清を回収し、エタノール沈澱によってDNAまたはRNAを回収した。抽出操作は必要に応じて複数回行った。臭化エチジウムを含むゲルからの回収の際には、エタノール沈殿に先立ってフェノール・クロロホルム抽出を行った。

Electroelution法

ゲル片と400 μl の0.5 \times TBEを透析チューブに入れた。透析チューブの両端をクローサーでとめ、0.5 \times TBEをはった泳動槽に浮かべ、100~150 mAの定電流で15分間通電した。泳動槽は発熱するので、周囲を氷で冷やしながら行った。ゲル片にDNAが残っていないことを蛍光で確認した後、溶出液をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱によってDNAを回収した。

培地の調製

LB培地

バクト・トリプトン	10 g
バクト・酵母エキス	5 g
NaCl	5 g

蒸留水を加えて1 lとし、10 N NaOHでpH 7.4に調製した。

寒天プレートを作る場合は、寒天粉末15 gを加えた。

オートクレーブ (120°C, 20分) で滅菌した。

抗生物質を加えるときは、アンピシリンは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、クロ

ラムフェニコールは25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。

M9培地

Na_2HPO_4	5.5 g
KH_2PO_4	3.0 g
NaCl	5.0 g
NH_4Cl	1.0 g

蒸留水を加えて1 ℓ とし、オートクレーブ (120 $^\circ\text{C}$, 20分) で滅菌した。
放冷後、以下のもの (すべて滅菌したもの) を加えた。

グルコース	10 ml of 40% (w/v) stock solution
MgSO_4	1 ml of 1 M stock solution
CaCl_2	1 ml of 0.1 M stock solution
チアミン (Vit.B1)	1 ml of 10 mg/ml stock solution

YT培地

バクト・トリプトン	8 g
バクト・酵母エキス	5 g
NaCl	5 g

蒸留水を加えて1 ℓ とし、10 N NaOH でpH 7.4に調製した。

寒天プレート (下層) を作る場合は、寒天粉末15 gを加えた。

上層寒天 (Soft Agar) は寒天粉末7 gを加えて作った。

オートクレーブ (120 $^\circ\text{C}$, 20分) で滅菌した。

2 \times YT培地

バクト・トリプトン	16 g
バクト・酵母エキス	10 g
NaCl	5 g

蒸留水を加えて1 ℓ とし、10 N NaOH でpH 7.4に調製し、オートクレーブ (120 $^\circ\text{C}$, 20分) で滅菌した。

SOB培地

バクト・トリプトン	20g
バクト・酵母エキス	5g
NaCl	0.6 g
KCl	0.5 g

蒸留水を加えて1 ℓ とし、オートクレーブ (120 $^\circ\text{C}$, 20分) で滅菌した。

放冷後、以下のもの (すべて滅菌したもの) を加えた。

MgCl₂ 10 ml of 1 M stock solution

MgSO₄ 10 ml of 1 M stock solution

SOC培地

バクト・トリプトン 20 g

バクト・酵母エキス 5 g

NaCl 0.6 g

KCl 0.2 g

蒸留水を加えて1 lとし、オートクレーブ (120℃, 20分) で滅菌した。

放冷後、以下のもの (すべて滅菌したもの) を加えた。

MgCl₂ 10 ml of 1 M stock solution

MgSO₄ 10 ml of 1 M stock solution

グルコース 20 ml of 1 M stock solution

菌株の保存

スタンプ カルチャー

滅菌したスクリューキャップ付バイアル (4 mlの容量) にLB寒天培地を2 ml入れて固めた。培養液、または単一コロニーを滅菌した白金耳につけ、バイアル中の寒天培地に突き刺した。キャップを少しゆるめて37℃で一晩培養した後、しっかりと閉めて室温または4℃の暗所に保存した。

グリセリンストック

スクリューキャップ付バイアル (4 mlの容量) に、60% (v/v) グリセリン溶液を0.33 ml入れてオートクレーブで滅菌した。これに培養菌液を1 ml入れ混和した後、-70℃に保存した。

大腸菌の形質転換

コンピテントセルの調製 (CaCl₂法)

LB培地10 mlで対数増殖期 ($2 \sim 5 \times 10^8$ cells/ml) まで増殖させた大腸菌を氷中で冷却後、5分間遠心し集菌した。これにあらかじめ氷冷しておいた50 mM CaCl₂を5 ml加え懸濁した後、氷中に30分間放置し、再度低速で遠心して集菌し、氷冷した50 mM CaCl₂を1 ml加え、おだやかに懸濁した。コンピテントセルをあらかじめ大量に調製する場合は、P.A.Morrisonらの方法に従った。LB培地100 mlで、約 5×10^8 cells/ml ($OD_{660} = 0.22$) まで培養させた大腸菌を氷中に30分間放置し冷却した。培

養液を5分間遠心し集菌した。菌を氷冷した50 mM CaCl₂ 50 mlに懸濁した後、氷中に60分間放置した。低速で遠心して集菌し、氷冷した50 mM CaCl₂, 20% Glycerol 10 mlを加えおだやかに懸濁させた。これを100~500 μlずつエッペンドルフチューブに分注し、-70℃に保存した。使用に際しては氷中で融解させた。

コンピテントセルの調製 (Hanahan法)

〈試薬〉

Transformation buffer 1 (TFB - 1)

RbCl	12.0 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.9 g
CH ₃ CO ₂ K	30 ml of 1 M stock solution (pH 7.5)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5 g
Glycerol	150 g

水を加えて1 lにした後、0.2 Mの酢酸を用いてpH 5に調整した。

0.22 μmのメンブレンフィルターを通して滅菌した。

Transformation buffer 2 (TFB - 2)

MOPS	20 ml of 0.5M stock solution (pH 6.8)
RbCl	1.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.1 g
Glycerol	150 g

水を加えて1 lにした後、0.22 μmのメンブレンフィルターで滅菌した。

MOPSはNaOHを用いてpH 6.8に調整した。

〈操作〉

SOB培地200 mlで対数増殖期 (OD₅₅₀ = ~0.3) まで増殖させた大腸菌をポリプロピレンチューブに移し、塩氷上で15分冷却した後、4℃で3000 × gの遠心を5分間行って集菌した。これにあらかじめ氷冷しておいたTFB - 1を培養液50 mlにつき16 ml加えて穏やかに懸濁した後、氷中に15分静置した。4℃で3000 × gの遠心を5分間行って菌体を回収し、氷冷したTFB - 2を培養液50 mlに対して4 ml加えて穏やかに懸濁した後、4℃に数時間放置した。これを500 μlずつエッペンドルフチューブに分注し、液体窒素で瞬間的に凍らせ、-70℃で保存した。使用に際しては氷中で融解させた。

形質転換

コンピテントセル100~200 μl とDNA溶液10~20 μl をおだやかに混ぜて、水中に30分放置後42°Cで2分間処理し、再度水中に戻す。5分後、900 μl のSOC培地を加え、37°Cで30~60分間緩やかに振盪した後、適量をマーカーとなる抗生物質を含んだLBまたはYT寒天プレートにまいて、37°Cで一晩培養した。

大腸菌からのプラスミドDNAの調製及び精製

アルカリ法

ミニ・スクリーニング等、分析用に少量のプラスミドDNAを調製する場合はアルカリ法を行った。

〈試薬〉

Soln. I

50 mM グルコース, 25 mM Tris - HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA

Soln. II

0.2N NaOH, 1% SDS

Soln. III

5M 酢酸カリウム (3 M K^+ , 5 M AcO^-) pH 4.8

RNase溶液

RNase A凍結乾燥品を0.04 M酢酸緩衝液 (pH 5.6) で10 mg/mlとなるように溶かし、100°Cで15分間処理後、-20°Cで凍結保存した。

〈操作〉

目的のプラスミドをもつ大腸菌を、5 mlのLB培地またはYT培地中、37°Cで培養した。遠心し菌体を集め、100 μl のSoln. Iに懸濁させた。これに200 μl のSoln. IIを加えおだやかに混和し、水中に5分間放置し溶菌させた。150 μl のSoln. IIIを加え中和後、水中にさらに5分間放置した。遠心によって沈澱 (KDS等) を除き、上清を別のチューブに移した。試料中に含まれる長鎖のRNAを除去する必要があるときはここでRNase溶液を2 μl 加え、37°Cで30~60分間処理して短鎖にした。450 μl のフェノール・クロロホルムによって抽出処理した。回収した水層に1 mlのエタノールを加えて、室温でエタノール沈澱させた。さらに70%エタノールで洗浄し、乾燥させたのちTE緩衝液20 μl に溶解して保存した。

リゾチーム - SDS法

高純度のプラスミドを大量に調製する場合は、リゾチーム - SDS法を行った。得られた粗DNAは、塩化セシウム密度勾配遠心法またはQIAGEN Tipを用いて精製した。

《試薬》

TN緩衝液

10 mM Tris - HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl

TE - ショ糖液

25% (w/v) ショ糖, 50 mM Tris - HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

リゾチーム溶液

0.25 M Tris - HCl (pH 8.0) で10 mg/mlに調製した。

エチジウムブロマイド (EthBr) 溶液

エチジウムブロマイドを10 mg/mlになるように水に溶かした。

CsCl - TE緩衝液飽和イソプロパノール

イソプロパノールに50% (w/v) CsCl, TE緩衝液を加えて激しく攪拌し、静置後上層 (イソプロパノール層) を使用した。

《操作》

プラスミドを保持する大腸菌を5 mlのLB培地またはYT培地中、37℃で一晩培養し、全量を300 mlの培地に植え継ぎ、37℃で培養した。必要があればOD₆₆₀が約0.2になった時にクロラムフェニコールを175 µg/mlとなるように加え、さらに16時間程度培養を続けた。培養液を5000 × gで10分間遠心して得られた菌体を、30 mlのTN緩衝液に懸濁した。これを再度集菌し、得られた菌体を10 mlのTE - ショ糖液に懸濁し、2 mlのリゾチーム溶液を加えた。0℃で10分間放置した後、4 mlの0.5 M EDTAと10% (w/v) SDSを加え穏やかに攪拌し、5 mlの5 M NaClを加えて60分間放置した。15000 × gで60分間遠心して上清を回収した後30 µlのRNaseA (10 mg/ml) を加え、37℃で30分間反応させた。フェノール処理後、イソプロパノール沈澱によりDNAを回収した。

密度勾配遠心法によるプラスミドDNAの精製

沈澱として得られたプラスミドDNAを7 mlのTE緩衝液に溶かし、これに7.3 gのCsClを加えて溶解させた後、400 µlのEthBr溶液を加え混合した。コントロール TGA - 65超遠心機 (type65 アングルローター) を用いて20℃、40000 rpm、40時間遠心した後、試料を紫外線ランプで照らして、

蛍光のあるバンドのうち closed circular DNAの部分 (チューブ中央部の二本のバンドのうち下のバンド) をシリンジで回収した。回収したDNA溶液からEthBrを除去するため、CsCl - TE緩衝液飽和イソプロパノールを用いて抽出操作を行った。この操作を4~5回繰り返して、EthBrを完全に取除いた後、TE緩衝液に対して透析してCsClを除去した。この溶液をエタノール沈澱してプラスミドDNAを回収し、適当量のTE緩衝液に溶解して-20℃に保存した。

QIAGEN Tipを用いたプラスミドDNAの精製

《試薬》

QBT緩衝液

750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% EtOH, 0.15% Triton X-100

QC緩衝液

1.0 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% EtOH

QF緩衝液

1.25 M NaCl, 50 mM Tris - HCl (pH 8.5), 15% EtOH

《操作》

Tip 100を使用したときの液量を示す。

RNase A, フェノール処理後のプラスミドDNA溶液を、4 ml のQBTで平衡化したTipにロードした。10 mlのQCを2度通して短鎖のRNAを除去し、5 mlのQFでプラスミドDNAを溶出した。イソプロパノール沈澱によって沈澱としてプラスミドDNAを回収した。

一本鎖ベクターの調製

pUC118由来のプラスミドベクターはM13のintergenic regionを有しており、一本鎖閉環状DNAを生じる。intergenic regionに変異を有するヘルパーファージM13 KO7の共存によって、pUC118由来の一本鎖DNAは優先的にパッケージングされ、ファージ粒子として回収可能である。

pUC118由来ベクターによって形質転換された大腸菌MV1184をAmpicillinを含む培地で前培養した。前培養液30 μ lに等量のヘルパーファージ液を加え、37℃で30分間静置した。予め37℃にした150 μ g/ml Ampicillin, 70 μ g/ml Kanamycin, 0.01% thiamineを含む2 \times YT培地を3 ml加え、37℃で~18時間培養した。培養液から菌体を除き、上清1 ml

に対して200 μ lのPEG - NaCl液を加えた。室温で15分間放置後、遠心分離して沈殿を回収し、TE緩衝液に溶解させた。フェノール処理によりコート蛋白質を変性させ、エタノール沈殿によって一本鎖DNAを回収した。

DNAの塩基配列分析

基本的にキットの使用説明書に従った。一本鎖ベクターを鋳型に用いる場合はTaq Dye Primer Cycle Sequencing Kitによって塩基配列を決定し、二本鎖ベクターを鋳型に用いる場合はTaq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kitを使用した。

RNAの塩基配列分析

Pharmacia社のRNA Sequencingキットの使用説明書に従った。キットの内容はアルカリ及びRNase T1 (G特異的), RNase U2 (A特異的), RNase Phy M (A + U特異的), *B. cereus* nuclease (U + C特異的)の各酵素と専用緩衝液である。

第一章の実験

HDVリボザイム遺伝子の構築

図9に示したpET7 - HDVの構築は、大阪大学薬学部において主に中井によって行われた。化学合成DNAの配列は以下に示すとおりである。

U1 5' GGGCTGCAGGGTCCGCGT 3'
U2 5' TCCATCCTTTCTTACCTGATGGCC 3'
U3 5' GGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGG 3'
U4 5' CGCCGGCTGGGCAACATTCCGAG 3'
U5 5' GGGACCGTCCCCTCGGTA 3'
U6 5' ATGGCGAATGGGACGCACAAATCTCTCTCCC 3'
L1 5' GATGGAACGCGGACCCTGCAGCCC 3'
L2 5' CATGCCGGCCATCAGGTAAGAAAG 3'
L3 5' CGGCGCCAGCGAGGAGGCTGGGAC 3'
L4 5' GGTCCCCTCGGAATGTTGCCAGC 3'
L5 5' TCCCATTCGCCATTACCGAGGGGAC 3'

L6 5' GGGAGAGAGATTTGTGCG 3'

U1及びL6以外のものに5'リン酸化した後、同一の番号を持つU鎖とL鎖をアニーリングし、1, 2, 3及び4, 5, 6の組み合わせで3ピースのLigationを行った。目的の鎖長のものをゲルから回収後、この2鎖を連結した。

pUHD88の作成の際の欠失変異導入は、二本鎖pUHD133を鋳型に用いたPCRにより行った。欠失導入のための正逆プライマーの配列は以下のとおりである。

88L 5' GCCGGCCATCAGGT 3'

88R 5' CCCATTCGCCATTAC 3'

PCRにより得られた遺伝子断片の末端をEcoR I - BamH Iによって処理し、pUHD133のEcoR I - BamH Iサイトに組み込んだ。

in vitro run - off transcription

Amershamのキットを使用した。BamH I処理したプラスミドベクター1~2.5 μ gを鋳型に用いた。前駆体 (100 nts) と切断生成物 (86 nts) の放射活性はイメージアナライザーBA100 (Fuji Film) によって測定し、86 ntsの断片の全体に占める割合を算出した。

SSrA及びSSrBへのランダム変異導入プライマー

塩基配列は本文中に示した。プライマー合成の際、A, G, C, Tの混合ホスホアミダイトをボトル1~4のホスホアミダイトと等濃度になるようにアセトニトリルに溶解し、ボトル5に装着した。ランダムな塩基置換を施す領域では、通常の塩基とボトル5の混合アミダイトを等量 (v/v) カップリングに使用した。この条件では理想的には4種の塩基は (4 + 1) : 1 : 1 : 1の比で導入される。一本鎖pUHD88を鋳型として、Amersham社のMutagenesis Kitを使用して変異体を作成した。

SSrA及びSSrBへの点変異導入プライマー

変異導入を目的とする残基の両側に9 bpを形成するように個々の変異体に対する変異導入プライマーを作成し (9 + 1 + 9 = 19 nts)、一本鎖pUHD88を鋳型として、Amersham社のMutagenesis Kitを使用して変異体を作成した。

pHDV86の構築

pUHD88の *EcoR* I サイトと T7 プロモーター配列の連結部位に 1 塩基挿入することで *Nru* I サイトを新たに設け、*Bam*H I サイトの直前で 2 塩基の欠失を行った pHDV86 は、PCR による変異導入により作成した。変異導入に用いた正逆プライマーの配列は以下のとおりである。

+ primer 5' ATGATTACGAATTCGCGATGTAATACGACT 3'

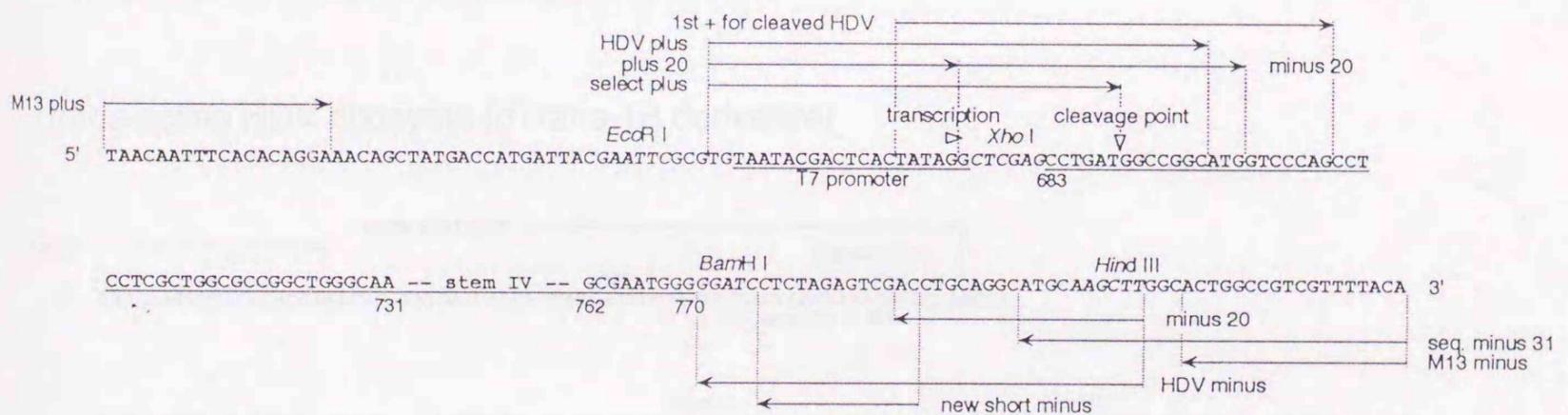
- primer 5' GACTCTAGAGGATCCCATTTCGCCATT 3'

PCR により得られた遺伝子断片の末端を *EcoR* I - *Bam*H I によって処理し、pUHD88 の *EcoR* I - *Bam*H I サイトに組み込んだ。

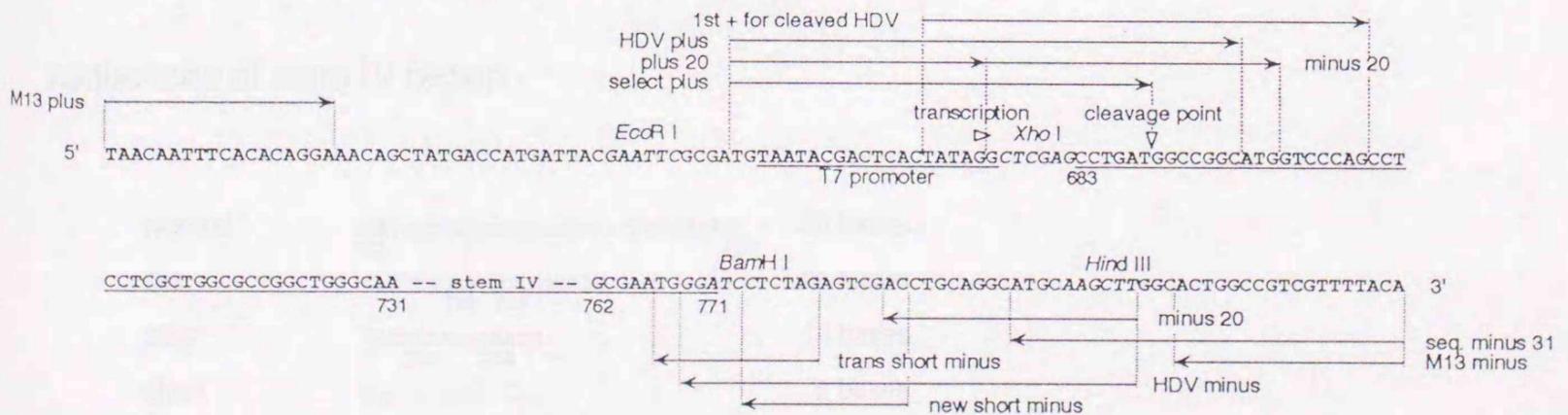
汎用 PCR プライマー

本研究では変異導入、プラスミドベクターへ導入した挿入配列長の確認及び塩基配列分析等の際に PCR を多用した。このため、多くの遺伝子断片作成の際に共通に使用することのできる汎用プライマーを作成し、様々に組み合わせて利用した。汎用プライマーの鋳型鎖への結合部位を以下に示す。

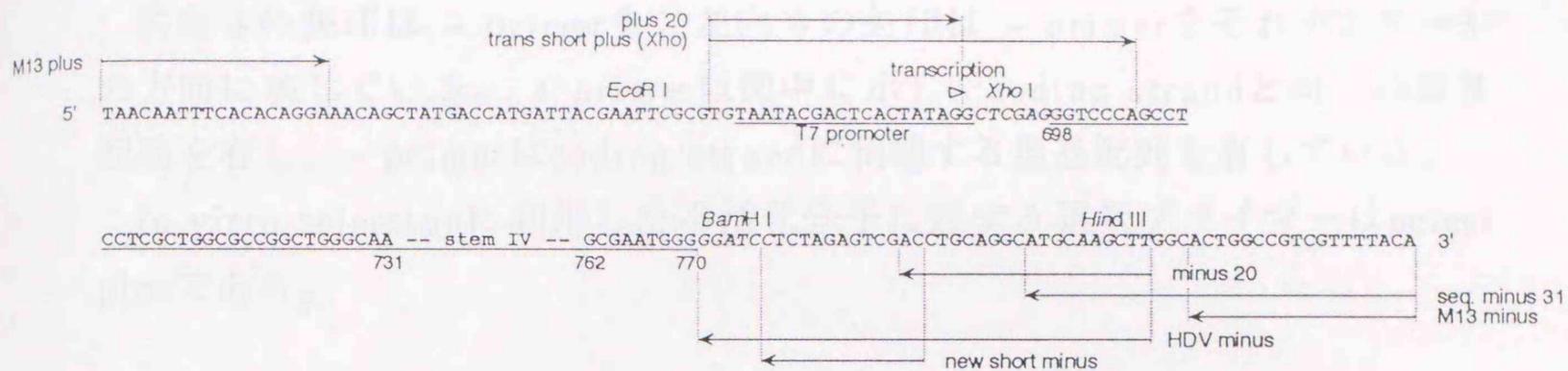
cis-acting HDV ribozyme (pUHD88 derivative)



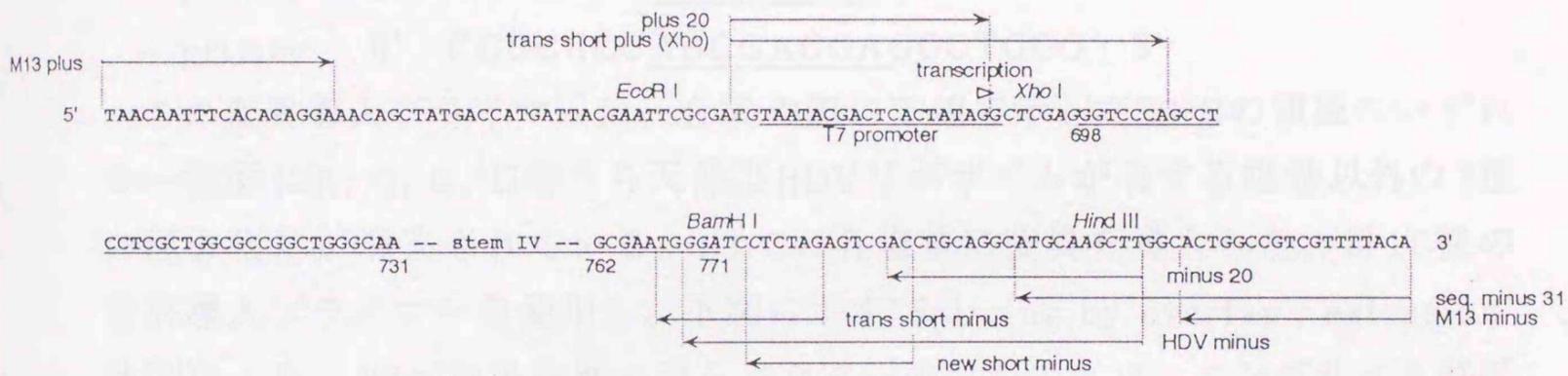
cis-acting HDV ribozyme (pHDV86 derivative)



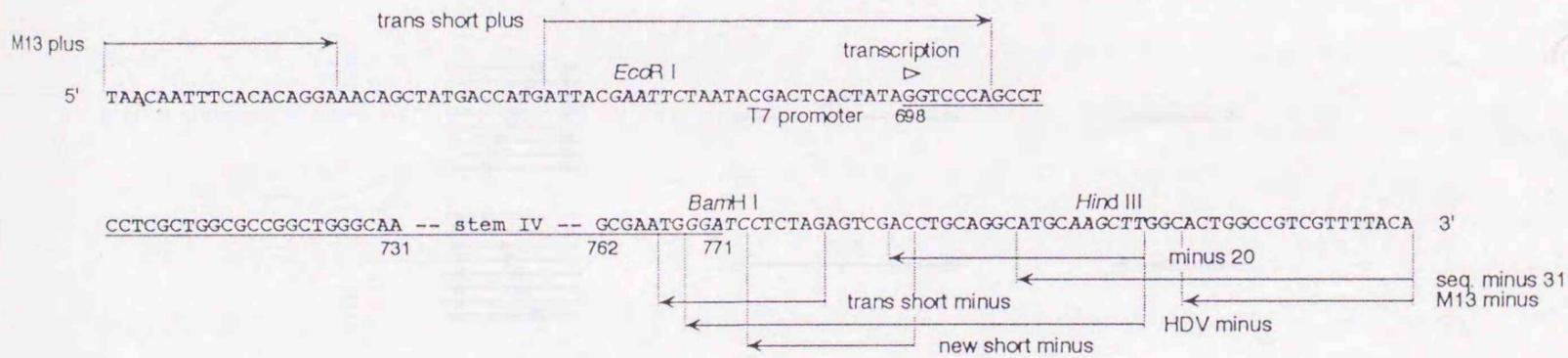
trans-acting HDV ribozyme (pUHD88 derivative)



trans-acting HDV ribozyme (pHDV86 derivative)



trans-acting HDV ribozyme (pTrans-1B derivative)



sequences of stem IV region

Normal	CATTCGAGGGGACCGTCCCCTCGGTAATG 732 761	30 bases
DI3	CATTCGAtttTCGGTAATG 739 753	20 bases
dS4	CATTCttcggAATG 736 758	14 bases
short	tt	2 bases

右向きの矢印は + primerを、左向きの矢印は - primerをそれぞれ5'→3'の方向に表している。+ primerは図中に示したcoding strandと同一の塩基配列を有し、- primerはcoding strandに相補する塩基配列を有している。

in vitro selectionに利用した不活化分子に対する選択プライマーはselect plusである。

SSrCへの変異導入プライマー

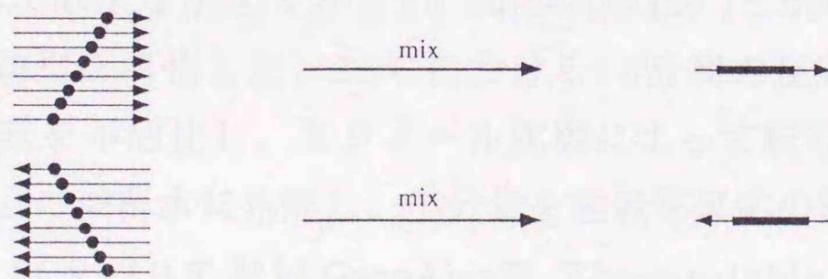
SSrCへの変異導入はPCRを用いて行った。まず、SSrCの両端7 baseを含むC701からG722に相当する領域の両鎖に変異を導入した。

+ primer 5' CCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCG 3'

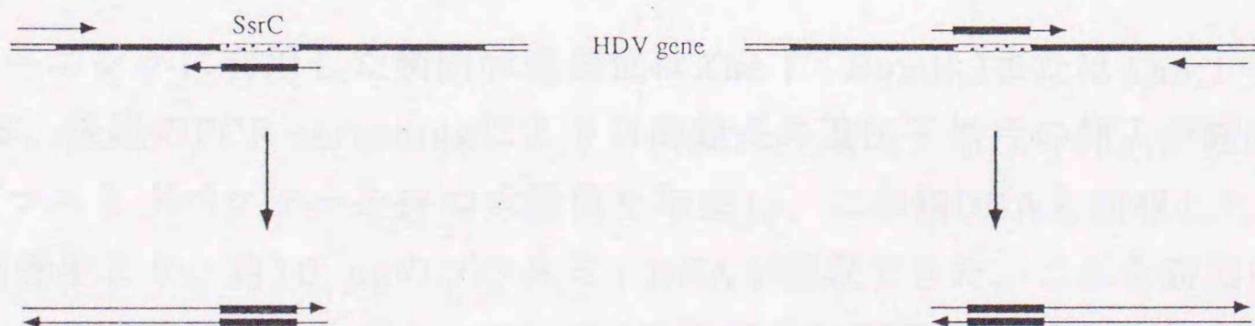
- primer 5' CGGCGCCAGCGAGGAGGCTGGG 3'

この変異導入プライマーは、合成の際に下線で示したSSrCの領域のいずれか一箇所にA, G, C, Uのうち天然型HDVリボザイムが有する塩基以外の3種の混合塩基が導入されている。SSrCの各塩基に変異を導入した、計16種の変異導入プライマーを使用し、下図に示す"Splicing by overlap - extension"法⁸⁶⁾により、T7プロモーターからベクターのマルチクロニングサイト終端のHind IIIまでの149 bpの遺伝子断片を調製した。鋳型にはpHDV86を用いた。この遺伝子断片の両端に相当するのは、plus20とminus20である。

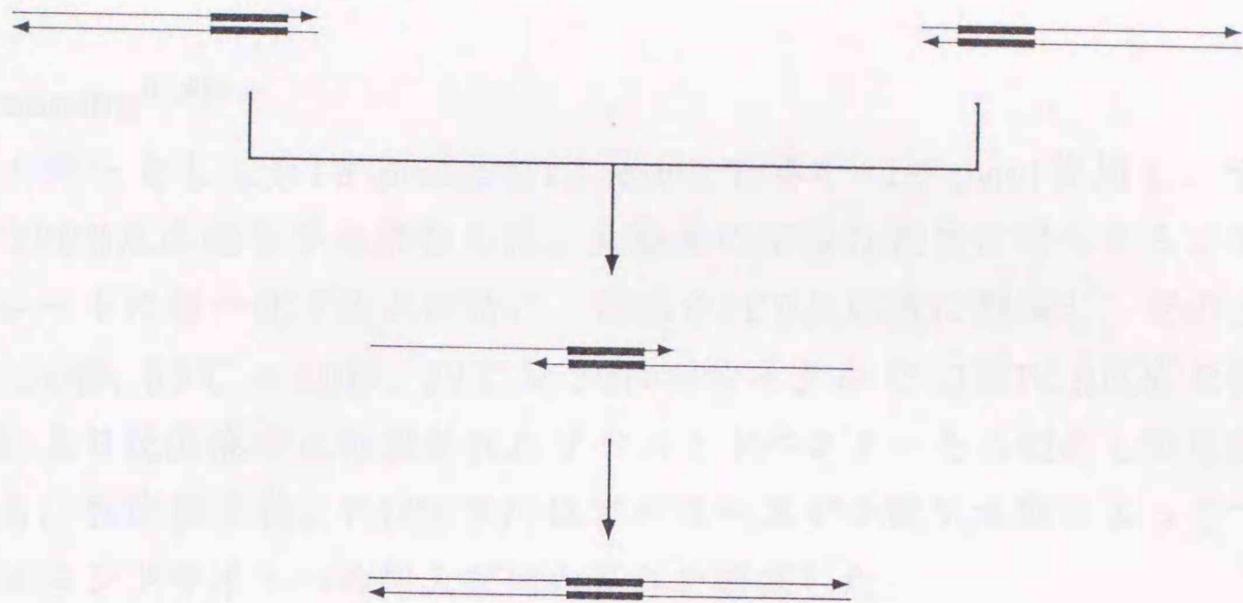
1. Synthesis of single mutation primers (plus & minus)



2. 1st PCR for making half molecules



3. 2nd PCR for making the complete molecule



SSrCでの*in vitro* selection

PCRによる増幅は、select plusとminus20を各20 pmolずつ使用し、全量を100 μ lとして94°C × 1分, 55°C × 2分, 72°C × 2分のサイクルを30回繰り返した。フェノール処理後エタノール沈殿を行って遺伝子断片を回収し、20 μ lの滅菌水に溶解した。アガロースゲル電気泳動により純度ならびに濃度を確認し、0.5~2 pmolを鋳型に使用してAmershamの転写キットにより37°Cで2時間の転写反応を行った。反応後、自己切断を完了させるためにMgCl₂を終濃度50 mMとなるように加え、42°Cでさらに30分間反応させた。4 mMとなるようにCaCl₂を加えてから20 unitのDNase Iと50 unitのBAL31 nucleaseを加え、鋳型を消化した。25°Cにおける15分間の反応の後、フェノール処理を行い酵素を不活化し、エタノール沈殿によって転写物RNAを回収した。RNAは20 μ lの滅菌水に溶解し、分量を逆転写反応の鋳型に用いた。GeneAmp™ RNA PCR KitまたはGeneAmp™ Thermostable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kitによって逆転写反応を行った。プライマーにはminus 20を20 pmol使用し、続くPCRに先だってselect plusを20 pmol添加した。

クローニングに利用した制限酵素部位はXho I - BamH IまたはXho I - Pst Iである。後述のPCR screeningにより目的鎖長の遺伝子断片の挿入が確認されたプラスミドベクターを持つ大腸菌を培養し、二本鎖DNAを回収した。3 mlの培養液より、約10 μ gのプラスミドDNAが回収できた。これを鋳型に用いることで塩基配列を決定し、BamH I処理後に転写反応を行うことで自己

切断活性を評価した。

PCR screening^{87,88)}

プライマーとしてM13 plusとM13 minusを各4~10 pmol使用し、全量10 μ lのPCR反応液を予め調製した。大腸菌の形質転換後に得られるコロニーをプレートに単一化すると同時に、菌体をPCR反応液に懸濁し、そのまま94°C × 30秒, 55°C × 30秒, 72°C × 30秒のサイクルで30回PCR反応を行った。熱により反応液中に放出されたプラスミドベクターを鋳型として反応は進行する。反応終了後、PAGEまたはアガロースゲル電気泳動によってマルチクローニングサイトへの挿入配列の長さを確認した。

RNA sequencing

PharmaciaのRNA Sequencing Kitを用いて行った。³²Pにより5'末端標識したRNAを各反応に10⁴ cpmずつ使用し、説明書に従ってアルカリラダー、RNase T1及びRNase Phy Mによる限定分解を行った。

第二章の実験

分子間反応を触媒するゲノム鎖由来HDVリボザイムの作成

一本鎖プラスミドベクターを鋳型とした部位特異的変異導入によってSuhを中心にベクターの構築を行った。

分割様式A

pUHD88を鋳型に用い、

5' GAGGAGGCTGGGACCTCGAGCCTATAGT 3'

を変異導入プライマーとして酵素鎖を構築した。

基質鎖は化学合成により調製した。

分割様式B

ステムIVの欠失変異を含むpUHD88DI3⁵²⁾を鋳型に用い、

5' GCGAGGAGGCTGGGCTCGAGCCTATAGT 3'

を変異導入プライマーとして酵素鎖を構築した。

基質鎖は分割様式Aと同じ。

分割様式C

pUHD88DI3を鋳型に用い、

5' GCCAGCGAGGAGGCCTCGAGCCTATAGT 3'

を変異導入プライマーとして酵素鎖を構築した。

基質鎖は分割様式Aと同じ。

分割様式D

G699に始まりC772までの52 ntsのRNAを化学合成により調製した。

基質鎖は分割様式Aと同じ。

分割様式E

C703に始まりG770までの45 ntsのRNAを化学合成により調製した。

基質鎖は分割様式Aと同じ。

分割様式F

pUHD88DI3を鋳型に用い、

5' CCAGCCGGCGCCAGCCTCGAGCCTATAGTG 3'

を変異導入プライマーとして酵素鎖を構築した。

pUHD88を鋳型に用い、

5' ACTCTAGAGGATCCGAGGAGGCTGGGAC 3'

を変異導入プライマーとして基質鎖を構築した。

分割様式G

pUHD88を鋳型に用い、

5' GTTGCCCAGCCGGCCTCGAGCCTATAGT 3'

を変異導入プライマーとして酵素鎖を構築した。

pUHD88を鋳型に用い、

5' ACTCTAGAGGATCCGCCAGCGAGGAGGC 3'

を変異導入プライマーとして基質鎖を構築した。

分割様式H

pUHD88DI3を鋳型とし、分割様式Gの酵素鎖構築に用いた変異導入プライ

マーを使用して酵素鎖を構築した。

基質鎖は分割様式Gに同じ。

分割様式I

pUHD88を鋳型に用い、

5' GCCATTACCGAGGGGCTCGAGCCTATAGTG 3'

を変異導入プライマーとして酵素鎖を構築した。

同様にpUHD88を鋳型に用い、

5' ACTCTAGAGGATCCACGGTCCCCTCGGA 3'

を変異導入プライマーとして基質鎖を構築した。

分割様式J

酵素鎖は分割様式Iに同じ。

pUHD88DI3を鋳型に用い、

5' ACTCTAGAGAATCCTCGGAATGTTGCCC 3'

を変異導入プライマーとして基質鎖を構築した。

活性測定

分割様式の比較には、酵素鎖、基質鎖ともに0.1 μM となるように混合し、90°Cで2分間変性した後、氷中に30分間静置した。その後100 mM Tris-HCl (pH 7.1) + 50 mM MgCl_2 溶液を等量 (v/v) 加えることで反応を開始した。37°Cまたは55°Cで1時間切断反応を行い、等量の2 × 反応停止液を加えて反応を停止した。90°Cで2分間変性操作を行った後急冷し、20%変性PAGEで切断を解析した。

擬一次反応の解析の際には、5'末端を ^{32}P で標識した基質鎖を0.01 μM 、酵素鎖を10 μM となるように50 mM Tris-HCl (pH 7.1)とともに混合した。90°Cで2分間変性した後、氷中に10分間静置し、その後 MgCl_2 を終濃度1 mMとなるように加えることで反応を開始した。38°Cのエアインキュベーター中に37°Cに設定したドライブブロックを置き、目的の時間に一部を取り出し、等量の2 × 反応停止液に加えて反応を停止した。90°Cで2分間変性操作を行った後急冷し、20%変性PAGEにより未反応の基質鎖と切断生成物を分離した。イメージアナライザーによって放射活性を測定し、13 ntsの基質鎖と3 nts

Trans - 1B + primer
5' ATTACGAATTCTAATACG
ACTCACTATAGGTCCCA 3'

- primer
5' CTAGAGGATCCCA 3'

Trans - dS4 + primer
Trans - 1Bのプラスプライマーと同一
- primer
5' CTAGAGGATCCCATTTCGCC
ATTCCGAAGAATGTTGCC 3'

Trans - shortに関しては、鋳型も化学合成により調製した。

5' TCGAGGGTCCCAGCCTCCTCGCTG
GCGCCGGCTGGGCAATTGCGAAT 3'

+ primer
Trans - 1Bのプラスプライマーと同一
- primer
Trans - 1Bのマイナスプライマーと同一

T7プロモーターとリボザイム配列間に*Xho* Iサイトが存在するものについては*Xho* I - *Bam*H Iでベクターに組み込んだ。

T7プロモーターとリボザイム配列が直結するものについては*Eco*R I - *Bam*H Iでベクターに組み込んだ。

リボザイムの調製は非常に効率の良い *Ampliscribe*TM T7 Transcription Kitでの転写反応により行った。1 pmol (2.2 μ g) の直鎖状ベクターDNAを鋳型とした反応によって得られるRNAの平均収量は700 pmol (20 μ g) であった。精製は変性PAGEからの切り出しによって行ったが、本文中でも述べたとおり、ロット間で反応性に若干の差異を生ずる例も見られ、精製法に関する再検討が必要であると考えている。

引用文献

- 1) Cech, T.R., Zaug, A.J. and Grabowski, P.J. (1981) *Cell* **27**, 487 - 496.
- 2) Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982) *Cell* **31**, 147 - 157.
- 3) Guerrier - Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) *Cell* **35**, 849 - 857.
- 4) Symons, R.H. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 641 - 671.
- 5) Cech, T.R. (1993) in "THE RNA WORLD" (eds. Gesteland, R.F. and Atkins, J.F.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp239 - 269.
- 6) Michel, F., Jacquier, A. and Dujon, B. (1982) *Biochimie* **64**, 867 - 881.
- 7) Davis, R.W., Waring, R.B., Ray, J.A., Brown, T.A. and Scazzocchio, C. (1982) *Nature* **300**, 719 - 724.
- 8) Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M. and Cruz, P. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 299 - 304
- 9) Sharmeen, L., Kuo, M.Y.P., Dinter - Gottlieb, G. and Taylor, J. (1988) *J. Virol.* **62**, 2674 - 2679.
- 10) Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nature* **328**, 596 - 600.
- 11) Zamecknick, P.C. and Stephenson, M.L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 280 - 284.
- 12) Simons, R.W. and Kleckner, N. (1983) *Cell* **34**, 683 - 691.
- 13) Ma, C and Simons, R.W. (1990) *EMBO J.* **9**, 1267 - 1274.
- 14) Cazenave, C. and Helene, C. (1991) in "Antisense Nucleic Acids and Proteins" (eds. Mol, J.N.M. and van der Krol, A.R.) Marcel Dekker, New York, pp47 - 93.
- 15) 川上純司、西川諭、多比良和誠 (1992) *PharmTech Japan* **8**, 247 - 264.
- 16) 川上純司、嶋山隆、大川淳、湯山則子、安田香央里、内丸忠文、上林正巳、西川富美子、西川諭、多比良和誠 (1992) *PharmTech Japan* **8**, 395 - 411.
- 17) 大川淳、川上純司、湯山則子、安田香央里、嶋山隆、西川富美子、井口義夫、武部豊、西川諭、多比良和誠 (1992) *PharmTech Japan* **8**, 491 - 512.
- 18) Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) *Nature* **365**, 448 - 451.
- 19) Katsuki, M., Sato, M., Kimura, M., Yokoyama, M., Kobayashi, K. and Nomura, T. (1988) *Science* **241**, 593 - 595.
- 20) Barinaga, M. (1993) *Science* **262**, 1512 - 1514.
- 21) Sullenger, B.A. and Cech, T.R. (1993) *Science* **262**, 1566 - 1569.
- 22) Rizzetto, M., Canese, M.G., Gerin, J.L., London, W.T., Sly, D.L. and Purcell, R.H.

- (1980) *J. Infect. Dis.* **141** , 590 - 602.
- 23) Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W. - K., Purcell, R.H. and Gerin, J.L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** , 6124 - 6128.
- 24) Wang, K. - S., Choo, Q. - L., Weiner, A.J., Ou, J. - H., Najarian, R.C., Thayer, R.M., Mullenbach, G.T., Denniston, K.J., Gerin J.L. and Houghton, M. (1986) *Nature* **323** , 508 - 513.
- 25) Kos, A., Dukema, R., Amberg, A.C., van der Meide, P.H. and Schellekens, H. (1986) *Nature* **323** , 558 - 560.
- 26) Makino, S., Chang, M. - F., Shieh, C. - K., Kamahora, T., Vannier, D.M., Govindarajan, S. and Lai, M.M.C. (1987) *Nature* **329** , 343 - 346.
- 27) Taylor, J.M. (1990) *Cell* **61** , 371 - 373.
- 28) Branch, A.D. and Robertson, H.D. (1984) *Science* **223** , 450 - 455.
- 29) Kuo, M.Y. - P., Sharmeen, L., Dinter - Gottlieb, G. and Taylor, J. (1988) *J. Virol.* **62** , 4439 - 4444.
- 30) Sharmeen, L., Kuo M.Y. - P. and Taylor, J. (1989) *J. Virol.* **63** , 1428 - 1430.
- 31) Wu, H. - N., Lin, Y. - J., Lin, F. - P., Makino, S., Chang M. - F. and Lai, M.M.C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** , 1831 - 1835.
- 32) Wu, H. - N. and Lai, M.M.C. (1989) *Science* **243** , 652 - 654.
- 33) Taylor, J.M. (1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** , 253 - 276.
- 34) Forster A.C. and Symons, R.H. (1987) *Cell* **50** , 9 - 16.
- 35) Taylor, J. (1990) *Semin. Virol.* **1** , 135 - 141.
- 36) Branch, A.D., Benenfeld, B.J., Paul, C.P. and Robertson, H.D. (1989) *Methods Enzymol.* **180** , 418 - 442.
- 37) Kumar, P.K.R., Suh, Y. - A., Miyashiro, H., Nishikawa, F., Kawakami, J., Taira, K. and Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20** , 3919 - 3924.
- 38) Suh, Y. - A., Kumar, P.K.R., Kawakami, J., Nishikawa, F., Taira, K. and Nishikawa, S. (1993) *FEBS Lett.* **326** , 158 - 162.
- 39) Nishikawa, S., Suh, Y. - A., Kumar, P.K.R., Kawakami, J., Nishikawa, F. and Taira, K. (1992) *Nucleic Acids Symposium Series* **27** , 41 - 42.
- 40) Kawakami, J., Kumar, P.K.R., Suh, Y. - A., Nishikawa, F., Kawakami, K., Taira, K., Ohtsuka, E. and Nishikawa, S. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217** , 29 - 36.
- 41) Kawakami, J., Yuda, K., Suh, Y. - A., Kumar, P.K.R., Nishikawa, F., Jeoung, Y. - H., Taira, K., Ohtsuka, E. and Nishikawa, S. (in preparation)

- 42) Kawakami, J. Yuda, K., Suh, Y. - A., Kumar, P.K.R., Nishikawa, F., Taira, K., Ohtsuka, E. and Nishikawa, S. (in preparation)
- 43) Rosenstein, S.P. and Been, M.D. (1990) *Biochemistry* **29**, 8011 - 8016.
- 44) Perrotta, A.T. and Been, M.D. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 6821 - 6827.
- 45) Smith, J.B. and Dinter - Gottlieb, G. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 1285 - 1289.
- 46) Smith, J.B., Gottlieb, P.A. and Dinter - Gottlieb, G. (1992) *Biochemistry* **31**, 9629 - 9635.
- 47) Belinsky, M. and Dinter - Gottlieb, G. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 559 - 564
- 48) Perrotta, A.T. and Been, M.D. (1991) *Nature* **350**, 434 - 436.
- 49) Branch, A.D. and Robertson, H.G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10163 - 10167.
- 50) Wu, H. - N., Wang, Y. - J., Hung, C. - F., Lee, H. - J. and Lai M.M.C. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 233 - 245.
- 51) Belinsky, M.G., Britton, E. and Dinter - Gottlieb, G. (1993) *FASEB J.* **7**, 130 - 136.
- 52) Suh, Y. - A., Kumar, P.K.R., Nishikawa, F., Kayano, E., Nakai, S., Odai, O., Uesugi, S., Taira, K. and Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 747 - 753.
- 53) Kumar, P.K.R., Suh, Y. - A., Taira, K. and Nishikawa, S. (1993) *FASEB J.* **7**, 124 - 129.
- 54) Nishikawa, S., Kumar, P.K.R., Jeoung, Y. - H., Kawakami, J., Nishikawa, F., Suh, Y. - A., Ohtsuka, E. and Taira, K. (1993) *Nucleic Acids Symposium Series* **29**, 119 - 120.
- 55) Wu, H. - N., Lee, J. - Y., Huang, H. - W., Huang, Y. - S. and Hsueh, T. - G. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 4193 - 4199.
- 56) Joyce, G.F. (1989) *Gene* **82**, 83 - 87.
- 57) 川上純司、西川諭 (1992) *化学と生物* **30**, 244 - 248.
- 58) Thill, G., Vasseur, M. and Tanner, N.K. (1993) *Biochemistry* **32**, 4254 - 4262.
- 59) Rosenstein, S.P. and Been, M.D. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 5409 - 5416.
- 60) Thill, G., Blumenfeld, M., Lescure, F. and Vasseur, M. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 6519 - 6525.
- 61) Lee, B. - S., Wu, H. - N. and Huang, T. - H. (1993) *FEBS Lett.* **324**, 296 - 300.
- 62) Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J. - P. and Ehresmann, B. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 9109 - 9128.
- 63) Krol, A. and Carbon, P. (1989) *Methods Enzymol.* **180**, 212 - 227.
- 64) Kumar, P.K.R., Jeoung, Y. - H., Kawakami, J., Nishikawa, F., Suh, Y. - A., Taira, K.

- and Nishikawa, S. (in preparation)
- 65) Kumar, P.K.R., Taira, K. and Nishikawa, S. (1994) *Biochemistry* **33**, 583 - 592.
 - 66) Perrotta, A.T. and Been, M.D. (1992) *Biochemistry* **31**, 16 - 21.
 - 67) Been, M.D., Perrotta, A.T. and Rosenstein, S.P. (1992) *Biochemistry* **31**, 11843 - 11852.
 - 68) Puttaraju, M.P., Perrotta, A.T. and Been, M.D. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 4253 - 4258.
 - 69) 大西正健 (1987) "酵素反応速度論実験入門", 学会出版センター.
 - 70) Zuker, M. (1989) *Science* **244**, 48 - 52.
 - 71) Jaeger, J.A., Turner, D.H. and Zuker, M. (1989) *Proc. Natl. Sci. USA* **86**, 7706 - 7710.
 - 72) Jaeger, J.A., Turner, D.H. and Zuker, M. (1989) *Methods Enzymol.* **183**, 281 - 306.
 - 73) Zuker, M., Jaeger, J. and Gilbert, D. (1990) A program for prediction of RNA secondary structure by free energy minimization. "MulFold ver2.0"
 - 74) Koizumi, M. and Ohtsuka, E. (1991) *Biochemistry* **30**, 5145 - 5150.
 - 75) Slim, G. and Gait, M.J. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 1183 - 1188.
 - 76) Darm, S. - A.C. and Uhlenbeck, O.C. (1991) *Biochemistry* **30**, 9464 - 9469.
 - 77) Fu, D. - J. and McLaughlin, L.W. (1992) *Biochemistry* **31**, 10941 - 10949.
 - 78) Fedor, M.J. and Uhlenbeck, O.C. (1992) *Biochemistry* **31**, 12042 - 12054.
 - 79) Pyle, A.M. (1993) *Science* **261**, 709 - 714.
 - 80) Dahm, S. - A.C., Derrick, W.B. and Uhlenbeck, O.C. (1993) *Biochemistry* **32**, 13040 - 13045.
 - 81) 嶋山隆、澤田慎矢、多比良和誠 (1993) *細胞工学* **12**, 261 - 271.
 - 82) Blackburn, G.M. (1990) in "Nucleic Acids in Chemistry and Biology" (eds. Blackburn, G.M. and Gait, M.J.) IRL Press, Oxford, pp21.
 - 83) Wu, H. - N. and Lai, M.M.C. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5575 - 5579.
 - 84) Hsieh, S. - Y., Chao, M., Coates, L. and Taylor, J. (1990) *J. Virol.* **64**, 3192 - 3198.
 - 85) "Molecular Cloning" 2nd Edition (1989, eds. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - 86) Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) *Gene* **77**, 61 - 68.
 - 87) Güssow, D. and Clackson, T. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4000.
 - 88) Clackson, T., Güssow, D. and Jones, P.T. (1991) in "PCR" (eds. McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R.) IRL Press, Oxford, pp210 - 213.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

