

ハンマーヘッド型リボザイム-金属イオン相互作用の分光学的解析

田中好幸

Spectroscopic Analyses of the Interaction between Hammerhead Ribozymes and Metal Ions

Yoshiyuki TANAKA

Laboratory of Molecular Transformation, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Aobayama, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received February 6, 2003)

Biologically active RNA molecules utilize metal ions to fold into specific conformations or to form a catalytic center. Hammerhead ribozymes also contain a metal ion-binding motif in their conserved core region. This motif and bound metal ions have recently been focused on from the viewpoint of whether the metal ions are a catalytic metal or a structural metal. We studied the interaction between metal ions and an RNA oligomer, r(GGACGAGUCC), which mimics the metal ion-binding motif of hammerhead ribozymes, using NMR spectroscopy in solution. Using ^{15}N -labeled RNA oligomers, the chemical shift of N7 of the G7 residue [N7(G7)] in the metal ion-binding motif was specifically perturbed upon the addition of Cd(II). It was also found that the ^{31}P resonance of the phosphate of the A9 residue showed the largest perturbation of all the ^{31}P resonances during titration. These data indicate that divalent cations can bind to the metal ion-binding motif in solution, and that the binding sites for cations are N7(G7) and the phosphate of A9. More importantly, the metal ion-binding motif is an independent functional module that can capture divalent cations without the assistance of other conserved residues in hammerhead ribozymes.

Key words—RNA; metal; interaction; NMR; ribozyme

1. はじめに

核酸はタンパク質と並び、生体を構成する重要な因子である。中でも RNA 分子は DNA の遺伝情報が蛋白質に変換される際の媒体としてのみでなく、RNA 分子自身が積極的に機能を担っていることが分かってきている。テトラヒメナ (*tetrahymena*) のグループ I イントロン (group I intron) が RNA 鎖の部位特異的切断及び結合反応を触媒していることが発見されて以来、RNA 分子はタンパク質同様に酵素活性を有する分子として注目されるようになってきた。¹⁻⁵⁾ これら酵素活性を有する RNA 分子はリボザイム (**Ribonucleic Acid + Enzyme : Ribozyme**) と総称されており、上記以外にもハンマーヘッド型リボザイム、⁴⁾ ヘアピン型リボザイム⁵⁾ な

どが知られている。これらの中でハンマーヘッド型リボザイムは最も分子量が小さく、RNA 分子による RNA 鎖切断反応のメカニズム解明に適した分子である。加えて遺伝子治療薬としての応用^{6,7)} も期待される分子で、その酵素活性発現のメカニズムの解明が望まれている。

ハンマーヘッド型リボザイムは基質 RNA 鎖を塩基対形成により認識し、部位特異的に切断する RNA 酵素である (Fig. 1)。二次構造が金槌型をしていたことからこのように命名された (以下本稿では、ハンマーヘッド型リボザイムを単にリボザイムと呼ぶことにする)。リボザイムは二価金属イオンを補因子として有しており、生理条件下では二価金属イオンが活性種本体であることが示されている。⁸⁾ リボザイムの結晶構造解析の結果から、多くの結晶構造中で金属イオンの結合が見られた塩基配列がある (Fig. 1)。⁹⁻¹²⁾ この配列がリボザイムの保存配列の中に含まれていたことから、切断活性を担う触媒金属であるかどうか検討されている金属イ

東北大学大学院薬学研究科・分子変換化学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉)

e-mail: tanaka@mail.pharm.tohoku.ac.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会東北支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

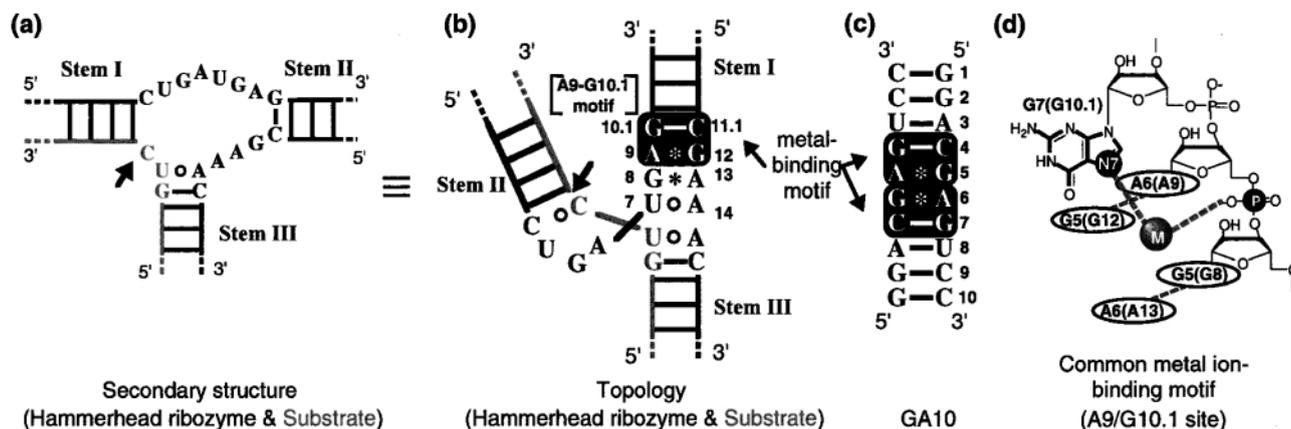


Fig. 1. Schematic Representations of Secondary Structures of Hammerhead Ribozymes and GA10, and the Metal Ion-Binding Motif

(a) Conserved sequences and the secondary structure of hammerhead ribozymes. (b) The topology of hammerhead ribozymes based on the crystal structures with numbering systems. (c) GA10 with numbering systems. (d) Schematic representation of the metal ion-binding motif (the A9/G10.1 site) of hammerhead ribozymes. The residue numbers in GA10 are shown, and the residue numbers in hammerhead ribozyme are also shown in parenthesis. In (b) and (c), the metal-binding motif (the A9/G10.1 site) in hammerhead ribozymes and GA10 is highlighted. In (a) and (b), enzyme and substrate strands are shown in black and gray, respectively, and the cleavage site is indicated by a black arrow. In (d), a metal ion is shown in a gray ball with a character "M", and is linked to binding sites via dashed lines. The tandem G-A pairs are indicated by black dashed lines with residue names. Watson-Crick base-pairs, non-Watson-Crick base-pairs, and sheared-type G-A pairs are indicated in bars, open circles and asterisks. Putative metal ion-binding sites (N7 of G7, and the phosphate of A9) are highlighted.

オン結合モチーフである.¹³⁻¹⁹⁾したがって、本研究ではこの金属イオン結合モチーフと二価金属イオンとの相互作用を NMR を用いて解析した.²⁰⁻²¹⁾

2. 金属イオン結合モチーフ

リボザイムの金属イオン結合モチーフは X 線結晶構造解析により見つかったものであり、この部位への金属イオンの結合がリボザイムの結晶中で最も保存されている (Fig. 1).⁹⁻¹²⁾ このモチーフはハンマーヘッド型リボザイムのステム II の G10.1-C11.1 塩基対とそれに隣接するコア領域 (保存度の高い塩基が集中しているループ領域) 中の連続する A-G ミスマッチ (A9-G12, G8-A13 塩基対) より形成されている (Fig. 1). このモチーフ内の塩基に対して塩基置換や化学修飾等の変異をいれると活性が大きく落ちることが知られている.^{13-19,22-26)} さらにこのモチーフに対して二価金属イオンが結合するに従って、リボザイム活性が上昇することが速度論解析の結果より示されている。これら結果に基づき、金属イオン結合モチーフに結合した金属イオンが、RNA 鎖の切断に直接関与する金属イオン (触媒金属) であるという説¹⁶⁾と、そうではなく構造形成に必要な金属イオン (構造金属) であるという 2 つの説¹⁹⁾が存在し、このモチーフと金属イオンの相互作用を解析することが、メカニズム解明に必須のステップとなっている。

ここまで金属イオンが核酸に結合するという漠然

とした言い方をしてきたが、金属イオンの核酸に対する結合を配位化学の観点からとらえ直してみたい。一般に金属イオンは水溶液中では、配位結合あるいは単に静電相互作用により水分子に取り囲まれている。中でも二価金属イオンの一次水和水は金属イオンに対して配位していると考えられる。したがって金属イオンが核酸の特定の官能基に対して結合するといった場合には、これらの配位子を介した (水素結合と静電相互作用による) 結合 (outer-sphere binding) と、配位子を介さない金属核と官能基間の配位結合 (inner-sphere coordination) の 2 種類が存在する (Fig. 2)。配位子を介した結合の場合、金属配位子と核酸官能基間で水素結合のプロトン供与基と受容基が立体構造的に対合する必要があり、配位結合の場合、金属イオンの配位水をはぎ取って核酸官能基が代わりに配位する。このように金属イオンの核酸への結合では金属核まわりの配位構造を無視できない。

さらに有機化学反応においては、有機金属錯体の配位子の種類や結合様式によって、その反応性、触媒活性、立体及び部位選択性などが大きく影響を受けることが知られている。²⁷⁻³¹⁾したがって着目している金属イオンが触媒金属であった場合、リボザイム分子による認識様式 (outer-sphere binding 又は、inner-sphere coordination)、及び金属核の配位子の種類は金属イオンの触媒能を議論する上で欠く

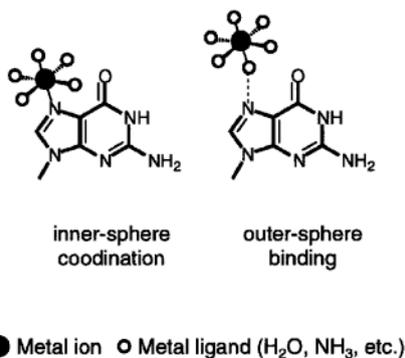


Fig. 2. Two Kinds of Metal Ion-Recognition Modes
The left panel represents inner-sphere coordination and the right panel represents outer-sphere binding [hydrogen bonding through metal ligands].

ことのできない情報である。現在までにマグネシウムイオン、マンガンイオン、コバルトイオンのモチーフへの結合が結晶学的に確認されており、⁹⁻¹²⁾速度論解析の結果からはこれらのイオンに加えてカルシウムイオン、カドミウムイオンも結合できることが示されている。¹³⁻¹⁹⁾ HSAB 則 (Hard and Soft, Acid and Base) に沿って考えるとこれらのイオンには硬いルイス酸 (Hard Acid) と比較的軟らかいルイス酸 (Soft Acid) のいずれもが含まれている。硬いルイス酸と軟らかいルイス酸では配位子になりやすい元素が異なるため、配位化学の観点からも興味深い。

3. 金属イオンの結合検出法

NMR は分子量が数千から数万 (原子数: 数百-数千) となるような高分子であっても、原理的には特定の 1 原子に由来するシグナルを検出できる優れた分光法である。³²⁾ したがって生体高分子 (タンパク質、核酸など) の局所的な環境を知ることができる。しかしながら実際の NMR 測定では分子量が大きくなるとシグナルが広幅化し感度が落ちることに加えて、原子数の増加に伴いシグナルが込み合って帰属が難しくなる。これらの問題からハンマーヘッド型リボザイム全残基 (分子量約 10000) のシグナルの帰属は相当な困難が伴うことが予想される。したがって生理活性をもつ RNA 分子から機能をもったモジュールのみを取り出して低分子量化できれば、NMR 測定上有利となる。そこで今回の金属イオン結合モチーフについても、その近傍の配列のみを取り出してオリゴマー化できるかどうかを検討した。

金属イオンの認識部位は G10.1 残基の N7 及び

A9 残基のリン酸基に限られることが結晶構造より分かっている (Fig. 1d).⁹⁻¹²⁾ ここで A9 残基は G12 残基と sheared 型の G-A 塩基対を形成し、さらに隣接する G8, A13 も同様に sheared 型の G-A 塩基対を形成している。⁹⁻¹²⁾ したがって連続した sheared 型 G-A 塩基対、及び G10.1 残基を含む C-G 塩基対を含むような構造モチーフを取り出すことができれば金属イオン結合モチーフの活性を損なわず、オリゴマー化できるのではないかと考えた。この要件を満たす RNA オリゴマーとして、 $r(\text{GGACGAGUCC})_2$ という配列が既に知られている (Fig. 1c).³³⁾ この配列を以下、GA10 と呼ぶことにする。GA10 は自己相補的に塩基対を組み、二重らせん中央に連続した sheared 型 G-A 塩基対と、その両端で C-G 塩基対を形成することが分かっている (Fig. 1c).³³⁾ したがってこの配列を用いて、金属イオン結合モチーフと二価金属イオンの相互作用を調べることにした。

ここで金属イオンは GA10 の G7 残基 (リボザイム中では G10.1 残基) 中の N7 に結合すると予想される (Fig. 1)。よって核酸中の窒素原子の NMR シグナルを観測することにより、金属イオンの結合をモニターできると考えられる。しかし窒素原子の中で天然存在比の最も高い安定同位体は ¹⁴N 核で NMR による観測に適した核種ではない。幸いにも窒素原子には NMR 観測に適したスピン量子数 ($I=1/2$) の ¹⁵N 核 (天然存在比 0.3%) が存在する。そこで窒素原子を ¹⁵N 核で標識した RNA オリゴマーを作製し、結合部位の N7 窒素の ¹⁵N NMR シグナルを観測することにより金属イオンの結合をモニターしようと考えた。¹⁵N 核で標識することにより、金属イオンの結合が以下の 2 つの方法で検出可能となる。

1) 二価金属イオン源として ¹¹³CdCl₂ ($I=1/2$) を用いると、カドミウムイオンが N7 窒素核に直接配位した場合、¹⁵N 核と ¹¹³Cd 核の間に *J*-カップリング (¹*J*_{Cd-N}) が観測されることが期待される。^{34,35)} 配位結合は配位共有結合とも言われるくらい、共有結合性の高い結合だからである。そこで一次元 ¹⁵N NMR スペクトルにより、*J*-カップリングの検出を試みる

2) 金属イオンが N7 窒素核に結合した場合、窒素原子まわりの環境の変化のため、N7 窒素の化学

シフト値が変化することが期待される.^{36,37)} そこで塩化カドミウムによる滴定実験で N7 窒素核の化学シフト値の変化を追跡する.

そこで GA10 に含まれる 4 つのグアノシン残基にそれぞれ ¹⁵N 標識グアノシンを導入した 4 種類の RNA オリゴマーを化学合成した.

GA10G1L : r(GGACGAGUCC)

GA10G2L : r(GGACGAGGCC)

GA10G5L : r(GGACGAGACC)

GA10G7L : r(GGACGAGCCC)

配列中、下線で示したグアノシン残基が金属イオンの結合残基で、太字で示したグアノシン残基が安定同位体標識されたグアノシン残基である。したがって配列 GA10G7L が金属イオンの結合を調べるための配列で、*J*-カップリングのデータが得られる可能性がある。さらに金属イオン結合に伴う、化学シフト値変位のデータが得られる。その他の配列は、カドミウムイオンの結合とは別の要因による、カドミウムイオン濃度依存的な化学シフト値変位を知るためのネガティブ・コントロール配列とした。

一般に RNA 分子の調整法としては、化学合成による方法と *in vitro* 転写系を用いる方法の 2 種類がある。化学合成の場合、各残基を一残基毎伸長していく方法をとるため、任意の一残基に安定同位体標識したヌクレオチドを導入することが可能である。

一方、*in vitro* 転写系では原料として始めに安定同位体標識したグアノシン三リン酸を加えてしまうため、すべてのグアノシンが標識されてしまい、一残基毎の標識体は作り得ない。すなわち、今実験のサンプル調製には化学合成が非常に適した手法であると言える。ところで今回用いた標識グアノシンは残基内のすべての窒素原子と炭素原子が ¹⁵N, ¹³C 核で安定同位体標識されたものを用いた。

4. 滴定実験

今回のサンプルではグアノシン内のすべて窒素原子が ¹⁵N 標識されているため、一次元 ¹⁵N NMR スペクトル上にグアノシンに含まれる 5 つの窒素原子 (N1, N2, N3, N7, N9) のシグナルが観測される (Fig. 3)。上記 4 種類の配列について、種々のカドミウムイオン濃度で一次元 ¹⁵N NMR スペクトルを測定して、グアノシン内の全窒素原子の化学シフト値変位をモニターした。まず、GA10G7L の滴定結果について述べる。カドミウムイオンの濃度上昇に

伴って、G7 残基の N7 の化学シフト値が大きく高磁場シフト (−20 ppm) することが分かった (Fig. 3)。G7 残基内の他の窒素原子 (N1, N2, N3, N9) の化学シフト値に関しては、カドミウムイオン濃度が上昇してもほとんどシフトせず、G7 残基内の金属イオン結合部位は N7 であることが分かった (Fig. 3)。次にその他のネガティブ・コントロール配列の一次元 ¹⁵N NMR スペクトルについても Fig. 3 に示した。さらにこれらの滴定実験の結果を窒素原子の種類毎 (N1, N2, N3, N7, N9) にまとめて各残基毎の化学シフト値変位としてグラフ化したのが Fig. 4 である。グラフより、金属イオン結合残基である G7 残基の N7 には大きな高磁場シフトが見られたが、モチーフ外の G1 及び G2 残基の N7 のシグナルはそれほど高磁場シフトしなかった (−5 ppm) (Fig. 4)。G5 残基の N7 については金属イオン結合に伴って構造変化が誘起され、若干大きな化学シフト値変化 (−10 ppm) が見られたが、それでも G7 残基の半分程度であった (Fig. 4)。これらの実験データより、当初の予想通り金属イオンの結合残基は G7 残基であり、その中でも N7 窒素に対して金属イオンが結合することが分かった。ちなみに G1, G2, G5 残基の N7 以外の窒素原子の化学シフト値変位も非常に小さいことが、Fig. 3 及び Fig. 4 より読みとれる。

上記の実験結果より、次の 2 つの結論が得られた。まず第 1 に、今回の金属イオン結合モチーフは溶液中においても金属イオンを結合できる。すなわち結晶構造で観測された金属イオンのモチーフへの結合が、結晶中でのアーティファクトでないことが証明された。次に、金属イオンの結合にはハンマーヘッド型リボザイムの他の保存配列は必要なく、金属イオン結合モチーフとそれを保持するための二重らせん構造があればよいことが分かった。すなわちリボザイム中に見られた金属イオン結合モチーフは独立した機能モジュールであり、他の分子中でも機能しうると考えられる。例えばリボゾーム RNA (rRNA) の構造中にもこの金属イオン結合モチーフと同様あるいは類似の配列が多数含まれていることが報告されており、³⁸⁾ 生理活性を有する RNA 分子が機能モジュールとして、このモチーフを選んで用いている可能性が示唆される。またこれらの部位では二価金属イオンが RNA に対して結合する可能

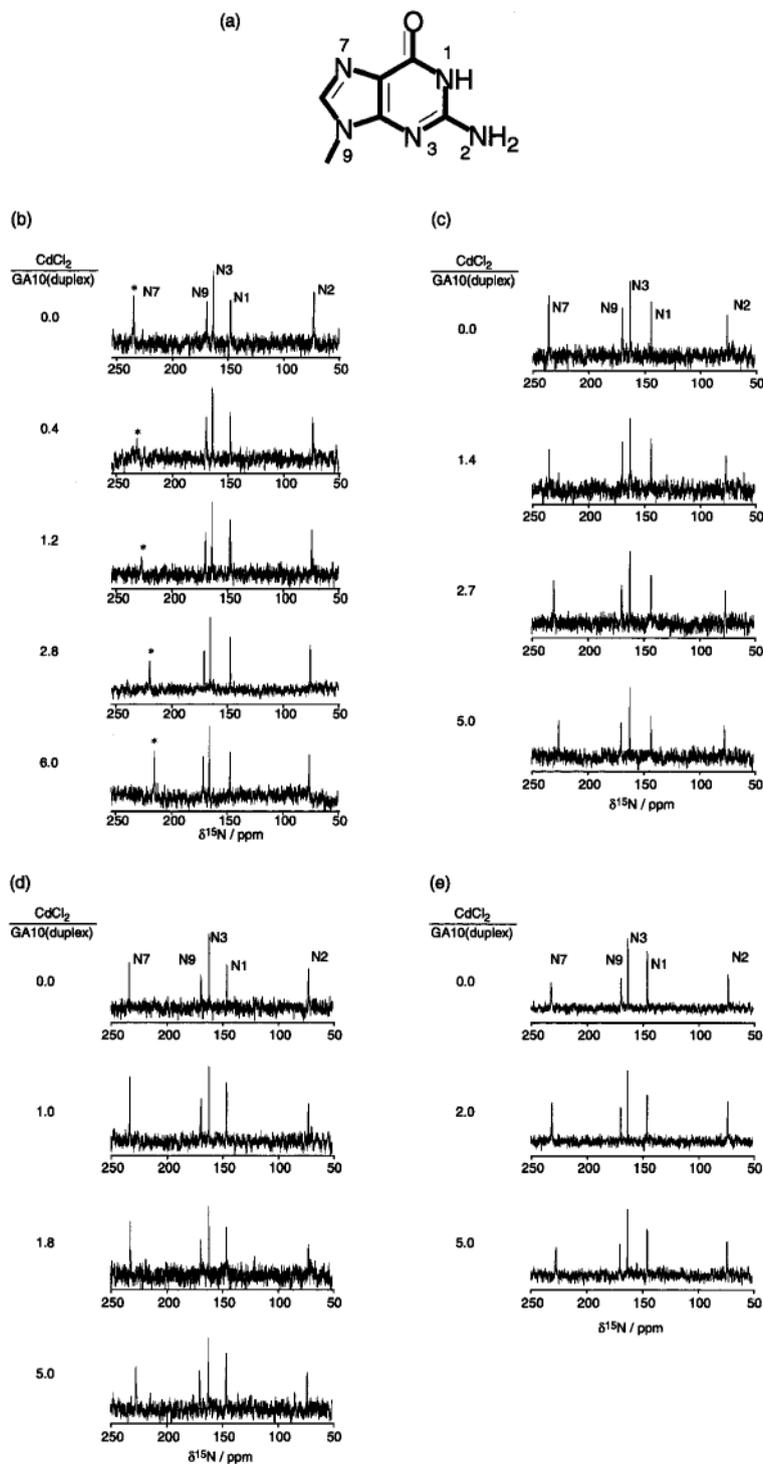


Fig. 3. One-Dimensional (1D) ^{15}N -NMR Spectra

(a) Chemical structure of guanosine and numbering system. (b) Titration spectra of GA10G7L (0.9 mM as a single strand). (c) Those of GA10G5L (0.74 mM as a single strand). (d) Those of GA10G2L (0.68 mM as a single strand). (e) Those of GA10G1L (1.2 mM as a single strand). The ratios of $[\text{CdCl}_2]/[\text{GA10}(\text{duplex})]$ are indicated on the left of each spectrum. Resonances are labeled with their names of the nuclei in the spectrum at the top. The resonances of N7 (G7) are labeled with asterisk. The spectrum was recorded at 313 K, with a Bruker DMX800 NMR spectrometer. Typical spectra were recorded with a spectral width of 20000 Hz digitized into 16384 points (1.2 Hz/point and 0.015 ppm/point), and 20000 scans were averaged. These spectra were processed with an exponential window function to give a line-broadening of 10 Hz.

性が考えられる。

次にカドミウムイオンの配位環境について考察し

たい。まず実験データとして、一次元 ^{15}N NMR スペクトル上でカドミウムと窒素原子間の J -カップ

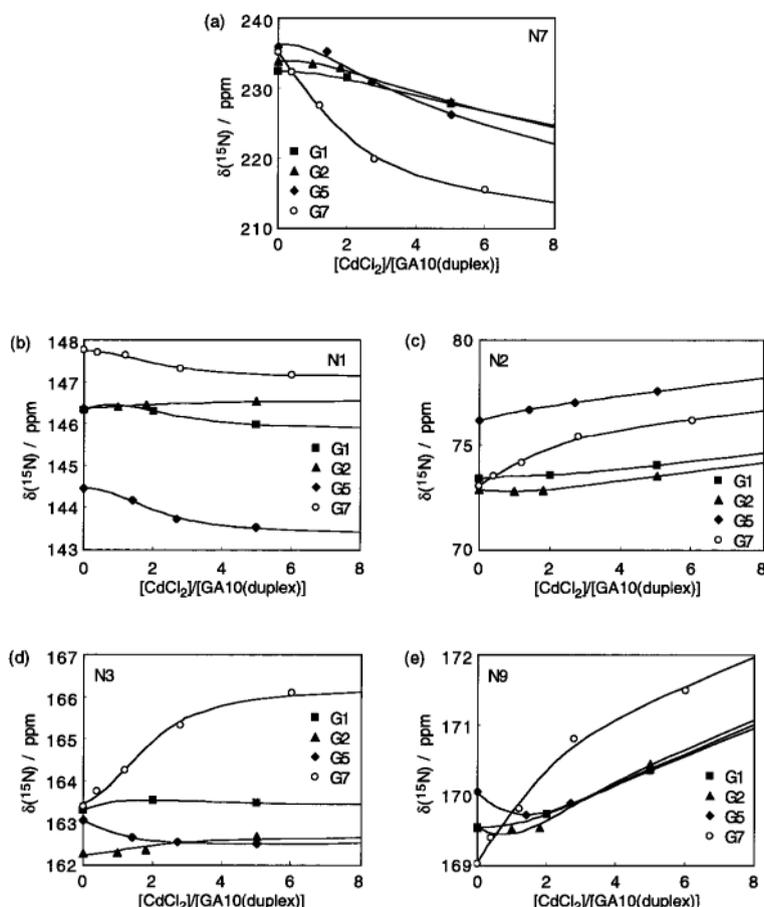


Fig. 4. Plots of ^{15}N -Chemical Shifts against the Molar Ratio ($[\text{CdCl}_2]/[\text{GA10}(\text{duplex})]$)

(a) Those of N7, (b) Those of N1, (c) Those of N2, (d) Those of N3, and (e) Those of N9. Squares, triangles, diamonds and open circles represent corresponding resonances of G1, G2, G5 and G7, respectively. The theoretical curves were generated as described previously.²¹⁾

Table 1. Summary of ^{15}N NMR Data

| Metal ligands | [ligand]/mM | Metals | Res. | $\Delta\delta(^{15}\text{N})^a/\text{ppm}$ | $^1J_{\text{N-M(II)}}^b/\text{Hz}$ | Ref. |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|------|--|------------------------------------|------|
| r(GGACGAGUCC) ₂ [GA10] | 0.4 | CdCl ₂ | G7 | -19.6 (6.0 eq) | not detected | 5 |
| Guanosine monomer | 500 | Zn(NO ₃) ₂ | — | -20.1 (1.0 eq) | — | 31 |
| Guanosine monomer | 500 | Hg(NO ₃) ₂ | — | -20.5 (1.0 eq) | not reported | 31 |
| Inosine monomer | 1000 | Zn(NO ₃) ₂ | — | -15.2 (0.7 eq) | — | 32 |
| Inosine monomer | 1000 | Hg(NO ₃) ₂ | — | -4.8 (0.75 eq) | not detected | 32 |

—: not applicable. *a*) Chemical shift perturbations of N7(guanosine) from the unmetalated state. Minus and plus values indicate higher and lower field shifts, respectively. *b*) *J*-coupling between metalated nitrogens (^{15}N) and metal ions ($I=1/2$), such as ^{113}Cd and ^{199}Hg .

リング ($^1J_{\text{Cd-N}}$) は観測されなかった (Table 1). このことを単純に解釈すれば、カドミウムイオンは 7 位窒素原子に配位結合はしていないと考えられる。しかしながら、*J*-カップリングは速い解離平衡の存在によって見かけ上消失することがあり、金属イオンの配位環境については慎重に結論しなければならぬ。

同様の実験として、dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液中でのカドミウムイオンとグアノシン (及びイノシン) の NMR による滴定実験のデータがある。^{36,37)} 興味深いことにカドミウム-グアノシン/DMSO 系においても、カドミウムイオンの結合に伴って、7 位窒素原子が約 20 ppm の高磁場シフトを起こした (Table 1)。さらに、カドミウムと窒素

原子間の J -カップリング ($^1J_{\text{Cd-N}}$) は観測されておらず,^{36,37)} 我々の系と同様の現象を示している (Table 1). ここでカドミウム-グアノシン/DMSO 系におけるカドミウムイオンの結合状態について考察する. DMSO 溶液中のカドミウムイオンは DMSO 分子によって溶媒和 (恐らくスルホキド酸素が配位子) されていると考えられる. この時 DMSO 分子には水素結合のプロトン受容基は存在するがプロトン供与基が存在しない. またカドミウムイオンが結合しているグアノシン 7 位窒素原子の周りにはプロトン受容体のみしか存在しない. したがってカドミウムイオンがグアノシンに結合する時に, 溶媒を介した結合には適した環境ではないと言える. 裏を返せばカドミウムイオンのグアノシンへの結合は配位結合であると考えるのが妥当である. その場合, 7 位窒素原子の約 20 ppm の高磁場シフトはカドミウムイオンが 7 位窒素原子に結合したことによると考えられる. 同様に, GA10 の G7 残基 7 位窒素原子の約 20 ppm の高磁場シフトはカドミウムイオンの G7 残基 7 位窒素原子に対する配位結合によるものと考えられる. この結果は Electron Paramagnetic Resonance (EPR) スペクトルによる構造計算の結果³⁹⁾ とも一致する. また隣接する 6 位カルボニル酸素原子の配位についても, カルボニル炭素の ^{13}C NMR 化学シフトの値より検討した. その結果, 化学シフト値には有意な変位が見られなかったことから, 6 位カルボニル酸素はカドミウムイオンの配位子ではないと結論した.

またもう 1 つの配位子となる可能性のある, A6 残基 (リボザイム中では A9 残基) のリン酸基についても結合の有無を一次元 ^{31}P NMR スペクトルによりモニターした. リン原子の帰属には二次元 ^1H - ^{31}P HMQC NOESY スペクトルを用いた (Fig. 5). カドミウム滴定の結果, 結合することが予測される A6 残基のリン酸基に最も大きな高磁場シフト (二本鎖 GA10 に対しカドミウム 10 当量: 0.86 ppm) が見られた²⁰⁾. このことよりカドミウムイオンは A6 残基のリン酸基に対しても結合していることが分かった. ただし, この実験のみからはリン酸の非架橋酸素原子がカドミウムイオンの配位子となっているかどうかは原理的に結論できない. この点について, DeRose らのグループは EPR スペクトルを用いて, リボザイムの金属イオン結合モチーフ

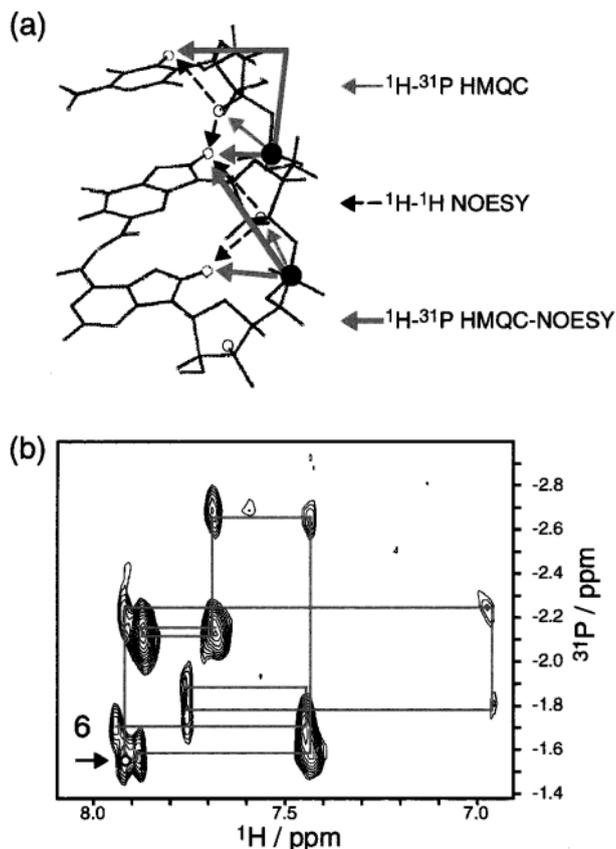


Fig. 5. 2D ^1H - ^{31}P HMQC-NOESY Spectrum

(a) Correlations observed in 2D ^1H - ^{31}P HMQC-NOESY spectrum. (b) 2D ^1H - ^{31}P HMQC-NOESY spectrum of GA10. The results of sequential assignments are depicted by gray lines. The cross peaks between P (A6) and H (G5) are depicted as an open circle with an arrow. The spectrum was recorded at 305 K with a Bruker DMX500 NMR spectrometer. The spectrum was recorded with 1024*32 complex points for a spectral width of 5040.32*404.913 Hz, 4096 scans were averaged, and the mixing time for NOESY was 150 ms.

に対するマンガンイオンの結合をモニターしている.⁴⁰⁾ その実験によるとリボザイムの A9 残基のリン酸基がマンガンイオンの配位子となっていることが示されている. さらにマンガンイオンと, カドミウムイオンは HSAB 則上, 比較的ソフトなルイス酸と分類されており, マンガンイオンで見られた現象はカドミウムイオンでも同様に起こりうると考えられる. したがって, カドミウムイオンで見られた GA10 の A6 残基の ^{31}P NMR シグナルの高磁場シフトはカドミウムイオンのリン酸基に対する配位と考えるのが妥当と思われる.

5. おわりに

以上の結果より, カドミウムイオンはハンマーヘッド型リボザイムの金属イオン結合モチーフに対して, 溶液中でもリン酸基, 7 位窒素原子に対して結

合することが分かり、いずれも配位子を介さない配位結合であることが示唆された。さらに金属イオン結合モチーフは独立した機能モジュールであり、リボザイムの他の保存配列なしに金属イオンを結合できることが分かった。本研究により、カドミウムイオンの配位子がほぼ同定されたが、このような配位構造をとった場合にどのような化学反応を触媒できるかについて現時点では明らかとなっていない。さらに、モチーフに結合した金属イオンの役割（構造金属であるか触媒金属であるか）についても明らかとなっておらず、この点を明らかとするための研究を引き続き行っている。今後もハンマーヘッド型リボザイムの RNA 鎖切断に果たす金属イオンの役割を解析し、切断反応のメカニズムの全容を解明していきたいと考えている。

謝辞 本研究は私が科学技術特別研究員（科学技術振興事業団）として、産業技術総合研究所（旧工業技術院）の多比良和誠教授のもとで行った研究で、研究遂行にあたり終始激励、御助言頂きましたことに御礼申し上げます。¹⁵N 標識ヌクレオチド（アミダイト）と NMR のマシンタイムを御供与頂きました東京都立大学・理学部の甲斐荘正恒先生、小野晶先生に感謝いたします。また NMR 測定に御協力頂きました愛媛大学・遺伝子実験施設の森田勇人先生、奈良先端科学技術大学院大学の児嶋長次郎先生、産業技術総合研究所の山崎和彦博士に感謝いたします。本研究は笠井康博君をはじめとする多比良研究室の学生及び研究員の方並びに東北大学大学院・薬学研究科の根東義則教授の御協力により遂行できたものです。併せて御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Cech T. R., Zaug A. J., Grabowski P. J., *Cell*, **27**, 487-496 (1981).
- 2) Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R., *Cell*, **31**, 147-157 (1982).
- 3) Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., *Cell*, **35**, 849-857 (1983).
- 4) Forster A. C., Symons R. H., *Cell*, **49**, 211-220 (1987).
- 5) Buzayan J. M., Hampel A., Bruening G., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 9729-9743 (1986).
- 6) Koseki S., Tanabe T., Tani K., Asano S., Shioda T., Shimada T., Nagai Y., Ohkawa J., Taira K., *J. Virol.*, **73**, 1868-1877 (1999).
- 7) Kuwabara T., Warashina M., Orita M., Koseki S., Ohkawa J., Taira K., *Nature Biotechnol.*, **16**, 961-965 (1998).
- 8) Zhou J.-M., Zhou D.-M., Takagi Y., Kasai Y., Inoue A., Baba T., Taira K., *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2374-2382 (2002).
- 9) Pley H. W., Flaherty K. M., McKay D. B., *Nature*, **372**, 68-74 (1994).
- 10) Scott W. G., Finch J. T., Klug, A., *Cell*, **81**, 991-1002 (1995).
- 11) Scott W. G., Murray J. B., Arnold J. R., Stoddard B. L., Klug A., *Science*, **274**, 2065-2069 (1996).
- 12) Murray J. B., Terwey D. P., Maloney L., Karpeisky A., Usman N., Beigelman L., Scott W. G., *Cell*, **92**, 665-673 (1998).
- 13) Peracchi A., Beigelman L., Usman N., Herschlag D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 11522-11527 (1996).
- 14) Peracchi A., Beigelman L., Scott E. C., Uhlenbeck O. C., Herschlag D., *J. Biol. Chem.*, **272**, 26822-26826 (1997).
- 15) Scott E. C., Uhlenbeck O. C., *Nucleic Acids Res.*, **27**, 479-484 (1999).
- 16) Wang S., Karbstein K., Peracchi A., Beigelman L., Herschlag D., *Biochemistry*, **38**, 14363-14378 (1999).
- 17) Yoshinari K., Taira K., *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1730-1742 (2000).
- 18) Nakamatsu Y., Warashina M., Kuwabara T., Tanaka Y., Yoshinari K., Taira K., *Genes Cells*, **5**, 603-612 (2000).
- 19) Murray J. B., Scott W. G., *J. Mol. Biol.*, **296**, 33-41 (2000).
- 20) Tanaka Y., Morita E. H., Hayashi H., Kasai Y., Tanaka T., Taira K., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11303-11310 (2000).
- 21) Tanaka Y., Kojima C., Morita E. H., Kasai Y., Yamasaki K., Ono A., Kainosho M., Taira K., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4595-4601 (2002).
- 22) Buzayan J. M., van Tol H., Feldstein P. A., Bruening G., *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4447-4451 (1990).
- 23) Ruffner D. E., Uhlenbeck O. C., *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6025-6029 (1990).

- 24) Ruffner D. E., Stormo G. D., Uhlenbeck O. C., *Biochemistry*, **29**, 10695–10702 (1990).
- 25) Kuimelis R. G., McLaughlin L. W., “Nucleic Acids and Molecular Biology,” Vol. 10, ed. by Eckstein F., Lilley D. M. J., 1996, pp. 197–215.
- 26) McKay D. B., *RNA*, **2**, 395–403 (1996).
- 27) Uchiyama M., Koike M., Kameda M., Kondo Y., Sakamoto T., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8733–8734 (1996).
- 28) Uchiyama M., Kameda M., Mishima O., Yokoyama N., Koike M., Kondo Y., Sakamoto T., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4934–4946 (1998).
- 29) Kondo Y., Shilai M., Uchiyama M., Sakamoto T., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3539–3540 (1999).
- 30) Imahori T., Uchiyama M., Sakamoto T., Kondo Y., *Chem. Commun.*, **23**, 2450–2451 (2001).
- 31) Uchiyama M., Miyoshi T., Kajihara Y., Sakamoto T., Otani Y., Ohwada T., Kondo Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8514–8515 (2002).
- 32) Tanaka Y., Kojima C., Yamazaki T., Kodama T. S., Yasuno K., Miyashita S., Ono A., Ono A., Kainosho M., Kyogoku Y., *Biochemistry*, **39**, 7074–7080 (2000).
- 33) Katahira M., Kanagawa M., Sato H., Uesugi S., Fujii S., Kohno T., Maeda T., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2752–2759 (1994).
- 34) Damblon C., Prospero C., Lian L. Y., Barsukov I., Soto R. P., Galleni M., Frere J. M., Roberts G. C. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11575–11576 (1999).
- 35) Hagen R., Warren J. P., Hunter D. H., Roberts J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5712–5716 (1973).
- 36) Buchanan G. W., Stothers J. B., *Can. J. Chem.*, **60**, 787–791 (1982).
- 37) Buchanan G. W., Bell M. J., *Can. J. Chem.*, **61**, 2445–2448 (1983).
- 38) Gautheret D., Konings D., Gutell R. R., *J. Mol. Biol.*, **242**, 1–8 (1994).
- 39) Morrissey S. R., Horton T. E., Grant C. V., Hoogstraten C. G., Britt R. D., DeRose V. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9215–9218 (1999).
- 40) Morrissey S. R., Horton T. E., DeRose V. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3473–3481 (2000).