

小胞体ストレスセンサーIre1p による *HAC1* mRNA  
切断機構の解析

河原 郁美  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学研究室  
(真木 壽治)  
平成 23 年 12 月 20 日

# 目次

略語表	5
<b>1. 序論</b>	<b>7</b>
1.1 小胞体ストレス応答	7
1.2 RNA 分子の構造と溶液 NMR を用いた構造解析	8
1.3 本研究の目的	9
<b>2. Ire1p RNase ドメインの同定と酵素化学的特性解析</b>	<b>14</b>
2.1 緒言	14
2.2 材料と方法	15
2.2.1 細胞質ドメイン全長のプラスミド構築と精製	15
2.2.2 細胞質ドメイン全長の限定分解	15
2.2.3 RNase ドメインのプラスミド構築と精製	15
2.2.4 NMR を用いた相互作用解析のための基質 RNA のデザインと調製	16
2.2.5 Stemloop 型基質 RNA の構造解析	17
2.2.6 NMR を用いた Ire1p 944-1115 RNase ドメインと基質 RNA の相互作用解析	18
2.2.7 基質切断実験系の構築	18
2.2.8 切断活性測定	19
2.2.9 ループ配列における切断反応後のフラグメントの解析	20
2.3 結果	20
2.3.1 Ire1p RNase ドメインの同定	20
2.3.2 NMR を用いた Ire1p 944-1115 RNase ドメインと基質 RNA の相互作用解析	21
2.3.3 基質切断実験系の構築	23
2.3.4 <i>in vitro</i> 切断活性測定による Ire1p 切断配列の同定	24
2.3.5 ループ配列における切断反応後のフラグメントの解析	25

2.4	考察	25
2.5	結論	26
<b>3.</b>	<b>基質 RNA の構造学的研究</b>	<b>41</b>
3.1	緒言	41
3.2	作業仮説 - 新規 RNA 部位特異的安定同位体標識法 -	42
3.3	材料と方法	43
3.3.1	モデル配列を用いた <i>HAC1</i> mRNA ループ内塩基対の同定	43
3.3.2	RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発 (配列のデザインと合成)	44
3.3.3	RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発 (グアノシン導入反応と連結反応の最適化; HHRz)	46
3.3.4	RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発 (NMR サンプルの調製)	47
3.3.5	部位特異的安定同位体標識 RNA 分子の NMR 測定	47
3.4	結果	47
3.4.1	モデル配列を用いた <i>HAC1</i> mRNA ループ内塩基対の同定	47
3.4.2	RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発	48
3.4.3	野生型配列を用いた <i>hXBPI</i> mRNA ループ内塩基対の同定	50
3.5	考察	50
3.5.1	RNA 部位特異的安定同位体標識法の確立	50
3.5.2	Ire1p 基質 RNA における構造モチーフの存在と意義	51
3.6	結論	52

<b>4.</b>	<b>基質 <i>HAC1</i> mRNA と Ire1p RNase ドメインの相互作用研究</b>	<b>70</b>
4.1	緒言	70
4.2	材料と方法	70
4.2.1	NMR 測定条件の決定	70
4.2.2	基質 RNA を用いた NMR 滴定実験	71
4.2.3	小麦胚芽無細胞翻訳系をもちいたアミノ酸特異的標識によるタンパク質主鎖の帰属	71
4.3	結果	71
4.3.1	NMR 測定条件の決定	71
4.3.2	基質 RNA を用いた NMR 滴定実験	72
4.3.3	小麦胚芽無細胞翻訳系を用いた Ire1p 944-1115 RNase ドメイン主鎖の帰属	72
4.4	考察	73
4.5	結論	73
<b>5.</b>	<b>総括</b>	<b>82</b>
5.1	緒言	82
5.2	考察	82
5.3	本論文のまとめ	83
<b>6.</b>	<b>謝辞</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>参考文献</b>	<b>85</b>

## 略語表

RNA	ribonucleic acid
UPR	unfolded protein response
NMR	nuclear magnetic resonance
mRNA	messenger RNA
NOE	nuclear overhauser effect
RNase	ribonuclease
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	luria broth
HRV3C	human rhinovirus 3C protease
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid
PCR	polymerase chain reaction
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
THF	tetrahydrofuran
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
TOCSY	total correlation spectroscopy
IGS	internal guide sequence

HHRz	hammerhead ribozyme
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
GMP	guanosine 5'-monophosphate
TE buffer	Tris-EDTA buffer
DNase	deoxyribonuclease
ATP	adenosine 5'-triphosphate
GTP	guanosine 5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
TOROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
SDS	sodium dodecylsulfate

# 1 序論

## 1.1 小胞体ストレス応答

様々な環境要因によって変性タンパク質や未成熟タンパク質が小胞体内腔に蓄積することを小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質にとって、翻訳、成熟のための重要な場であり、小胞体内に異常タンパク質が多く蓄積することは、生命を維持する上で大きな障害となる。そこで、この小胞体ストレスに対して Unfolded Protein Response (UPR) という生体応答が知られている (Kozutsumi et al., 1988; Chapman et al., 1998; Schröder, M., and Kaufman, R. J., 2005; Khono, 2007; Ron et al., 2007; Chakarabarti et al., 2011; Hetz et al., 2011)。これは酵母からヒトまであらゆる真核生物で保存されており、ヒトなど高等真核生物においてはこの UPR の破綻は神経変性疾患など様々な疾患の原因となるとして (Salminen et al., 2009)、その機構解明を目指した研究が広くなされている。

現在ヒトなど高等真核生物では小胞体ストレスを検知し、UPR をコントロールする遺伝子として、Inositol Requiring Kinase 1 (IRE1)、Activating Transcription Factor 6 (ATF6)、PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) が、出芽酵母においては *IRE1* (*Ire1p*) が同定されている (Cox et al., 1993; Mori et al., 1993; Harding et al., 1999)。*Ire1p* は高等真核生物の IRE1 のホモログであり、出芽酵母における唯一の小胞体ストレスセンサーである事から、UPR において *Ire1p* 並びに IRE1 が関係する応答反応は進化上保存された経路である事が分かる。

*Ire1p*/IRE1 はどちらも I 型膜タンパク質で、小胞体内腔に折りたたみ異常タンパク質を検知するセンサードメイン、細胞質側に Kinase ドメインと RNase ドメインを持ち (Shamu, C. E., and Walter, P., 1996; Sidarauski et al., 1997)、一次配列上の相同性も高い。また、下流で制御を受ける因子として、酵母では *HAC1*、線虫からヒトまでの種では *XBPI* が知られており (Kawahara et al., 1997; Kawahara et al., 1998; Yoshida et al., 2001; Calfon et al., 2002; Mori, 2003; Niwa et al., 2005)、どちらも UPR 関連遺伝子を制御する転写因子をコードしている (Nikawa et al., 1996; Cox, J. S., and Walter, P., 1996)。これら 2 つの遺伝子の mRNA は、核内で転写され細胞質に移行された段階ではまだ余計なイントロンが残ったままであり、そのままでは転写因子として機能するタンパク質をコードしない。つまりコードした配列が転写因子として機能するためには細胞質でのスプライシングが必要となる。*Ire1p* と IRE1 の RNase ドメインは小胞体ストレス存在下で、これらの mRNA を部位特異的に切断することでイントロンを切り出し、スプライソソーム非

依存的な細胞質スプライシングを引き起こし、転写誘導型の Hac1p, XBP1 の発現を誘導する(Figure 1.1)。

Ire1p/IRE1 による基質 mRNA 内のイントロン切り出しでは、mRNA 上の 2 カ所 (スプライシング部位) が部位特異的に切断される。この切断部位には 5'-CNGNNGN-3'配列(Sidaraski et al., 1997; Gonzalez et al., 1999)が *HAC1*, *XBPI* 双方で保存されており、この配列は Ire1p/IRE1 が切断を行うためのコンセンサス配列とされている。また、短い基質を用いた *in vitro* の *HAC1* mRNA 切断実験(Sidaraski et al., 1997; Gonzalez et al., 1999)から Ire1p は他の外部因子(共役的に働くタンパク質など) なしにこの部位特異的な切断を行うことが分かっているため、Ire1p 自体にコンセンサス配列を認識して部位特異的な切断を行う能力があると考えられている。

## 1.2 RNA 分子の構造と溶液 NMR を用いた構造解析

RNA を構成する塩基は、修飾塩基を除くと、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、ウラシル(U)の 4 つであり、Figure 1.2 で示した A-U, G-C 間で形成された塩基対はワトソン-クリック型の塩基対と呼ばれる。この塩基対形成によって二次構造が形成されそれを元に三次元構造が形作られる。RNA 分子中の二次構造要素を Figure 1.3 に示す。中でもステムループ構造のループ配列はタンパク質相互作用部位として利用されることが多く、その例として、tRNA アンチコドンループ(Kim et al., 1974)やスプライソソーム形成因子の一つである U1A タンパク質が結合する snRNA 内のステムループ構造(Pomeranz et al., 2009)などが挙げられる。

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)分光法で得られる情報には以下の様な特性がある。化学構造上異なる位置に含まれる原子は異なる化学シフト値にシグナルを与える。具体例として、RNA 分子内のプロトンの典型的な化学シフト値を Figure 1.4a で示す。さらに、RNA 分子のような生体高分子では同一分子内に同種ヌクレオチドが幾つも含まれるが、同種残基の同じ位置の原子であっても、各原子の化学シフト値は原子周辺の化学的環境(隣接残基の種類等)が異なるため異なる化学シフト値を有する。その結果、NMR 分光法では、分子中に含まれる水素 ( $^1\text{H}$ )、窒素 ( $^{15}\text{N}$ )、炭素 ( $^{13}\text{C}$ )、リン ( $^{31}\text{P}$ )の個々の原子が個別にシグナルを与える。その結果、RNA 分子内の各原子とシグナルが基本的に 1 対 1 で対応する。従って、一旦シグナルがどの原子に由来するか帰属がつけば、原理的に RNA 分子内の特定の位置からの情報を引き出すことが可能となる。この特性を利用することで、NMR スペクトルから他分子との相互作用部位の同定が可能となる。

$^1\text{H}$  NMR 分光法を用いて得られる RNA 分子の構造情報のうち、イミノプロトンによる塩基対形成の情報と、距離依存的に観測される NOE



(Nuclear Overhauser Effect)を指標としたプロトン間の距離情報は、解析対象の RNA 分子の二次構造および三次元構造を決定する上で重要な情報である。

イミノプロトン (グアニン H1、ウラシル H3) シグナルは、Figure 1.4a で示す通りシグナルの観測領域が 11-15 ppm とほかのアミノ基や糖由来のプロトンと比べてかなり低磁場側に観測されるため、他のプロトンシグナルとの区別が容易である。なおイミノプロトンの化学シフト値は塩基対の種類 (G-C, A-U) によって、特異的な化学シフト値に観測されるため (Figure 1.4a)、シグナルが観測された時点で、G-C/A-U 塩基対形成の確認および塩基対の種類を推測が可能となる。また通常、水溶液中に露出したイミノプロトンは水分子のプロトンとの交換によるシグナルの広幅化 (exchange broadening) が起こるため、NMR スペクトル上で観測することが難しいが、塩基対が形成された場合その交換が制限され、NMR によって観測が容易となる。このことから RNA 分子内に塩基対が形成されていることが確認可能である。

NOE は空間的に近接した (5Å 以内) プロトン間で観測される交差シグナルである。RNA 分子の場合、隣り合ってスタックしている塩基対のイミノプロトン間や、残基内或は配列上隣り合う塩基-糖のプロトン間などで観測される。A 型二重らせん構造において NOE が観測されるプロトンの組み合わせを (Figure 1.4b) に示す。このように二重らせん構造中で観測される NOE は距離依存的に特定のプロトン間で観測されるため、NOE シグナルをたどることによって、連鎖的に塩基-糖部のプロトンを帰属する事が可能である。また、特定の領域で連鎖的に NOE が帰属可能かどうかで二重らせん構造の形成が判別できるため、NOE シグナルの連鎖帰属によって該当領域の二重らせん構造形成の同定が可能となる。

### 1.3 本研究の目的

Ire1p は mRNA 上にある 7 塩基のコンセンサス配列を認識し、2 カ所のスプライシング部位で部位特異的な切断を行う。しかしながら現在コンセンサス配列として同定されている 5'-CNGNNGN-3'配列 (Sidaraski et al., 1997; Gonzalez et al., 1999) は mRNA 上には複数回登場するため、Ire1p が配列だけを認識しているとすると切断部位の選択性を説明できない。また、Ire1p 以外の外部因子を必要とせず切断部位を認識するため、スプライシング部位そのものに一次配列を超えた何か構造的な特徴があるのでは無いかと考えられる。

本研究では、この Ire1p による基質認識機構に焦点をあて、HAC1 mRNA 切断機構を構造学的な視点から解明する事を目指して研究を行った。

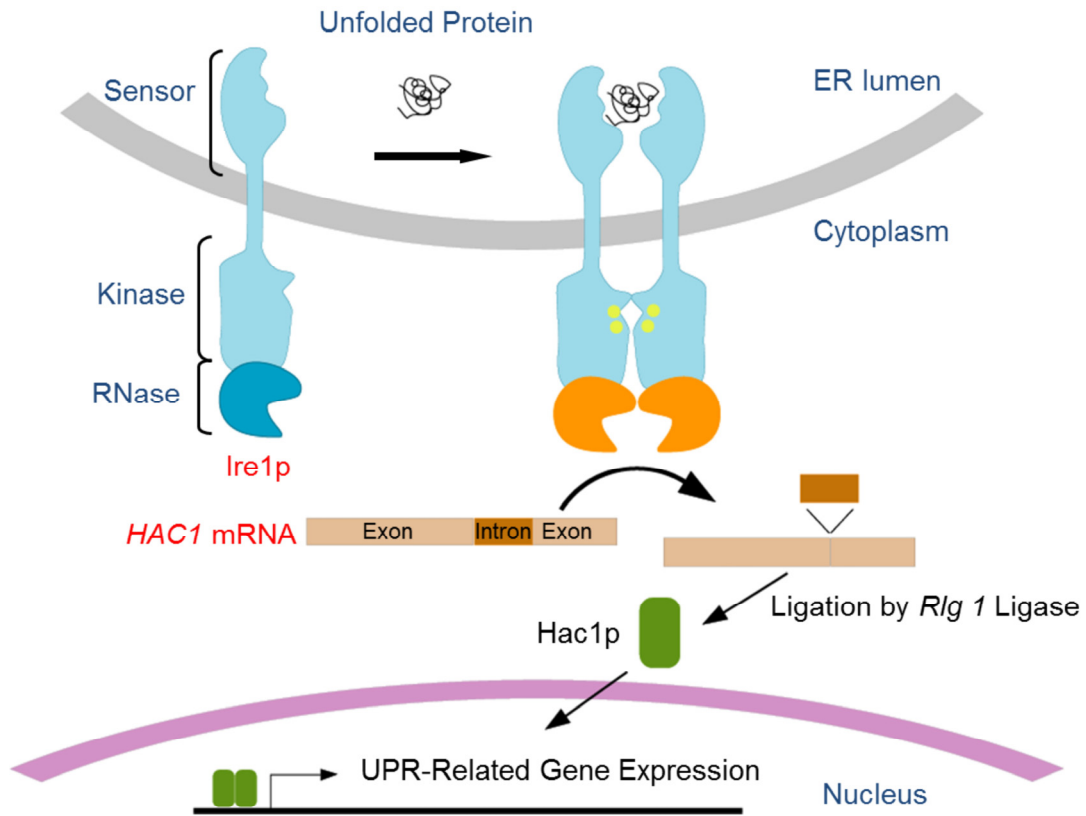
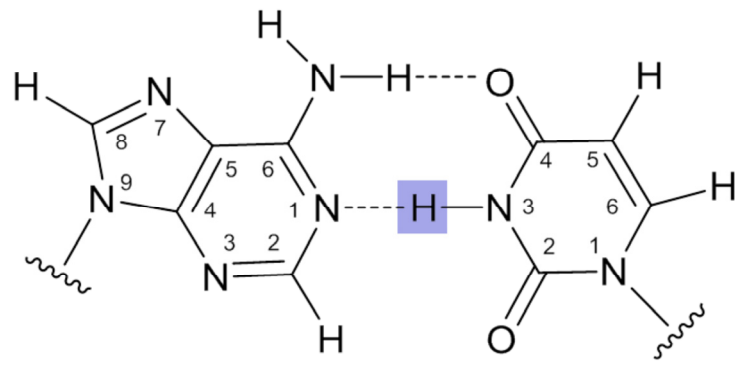
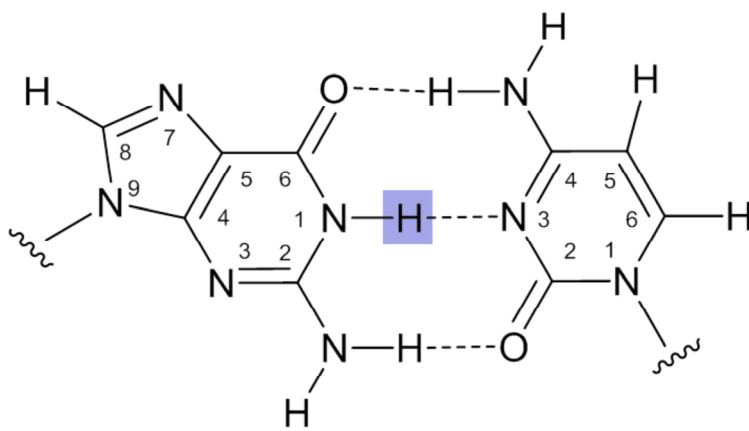


Figure 1.1. 出芽酵母における UPR 経路: 折りたたみ異常のタンパクを認識したのち、Ire1p は多量体化および Kinase ドメインのリン酸化を経て RNase ドメインの活性化が起こる。Ire1p によって切断を受けた *HAC1* mRNA は Rlg1 Ligase によって連結される。



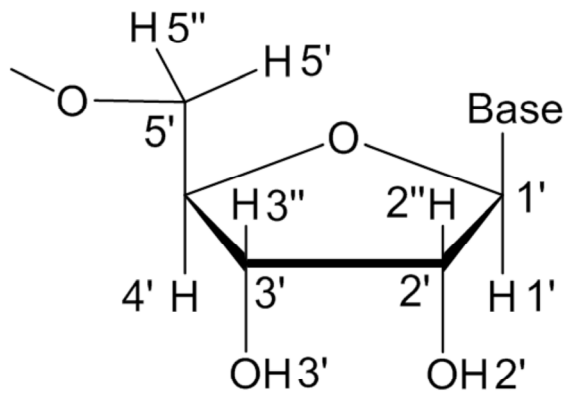
Adenine (A)

Uracil (U)



Guanine (G)

Cytosine (C)

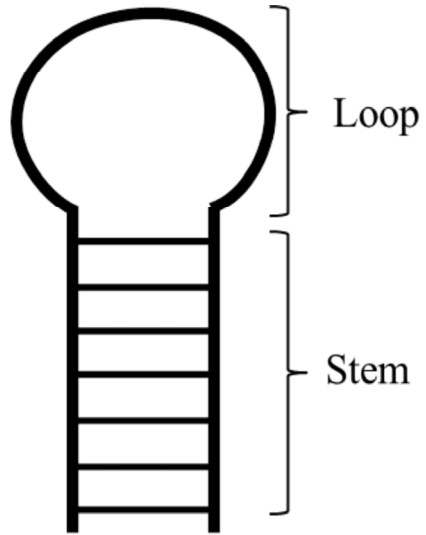


D-ribose

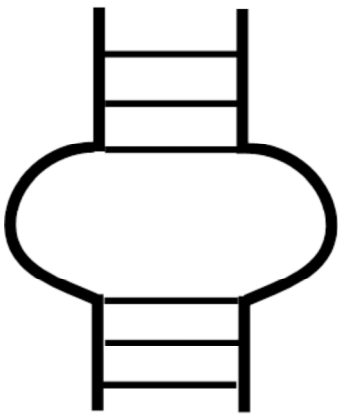
Figure 1.2. RNAの核酸塩基と糖における原子位置番号並びにワトソン-クリック型塩基対の結合様式：イミノプロトンを青の背景で示す。



Duplex



Stem-loop (Hairpin)



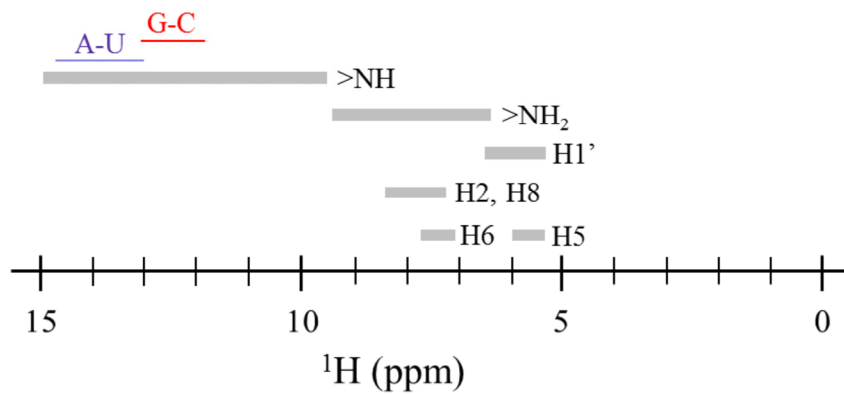
Internal-loop



Bulge-loop

Figure 1.3. RNA 二次構造要素

(a)



(b)

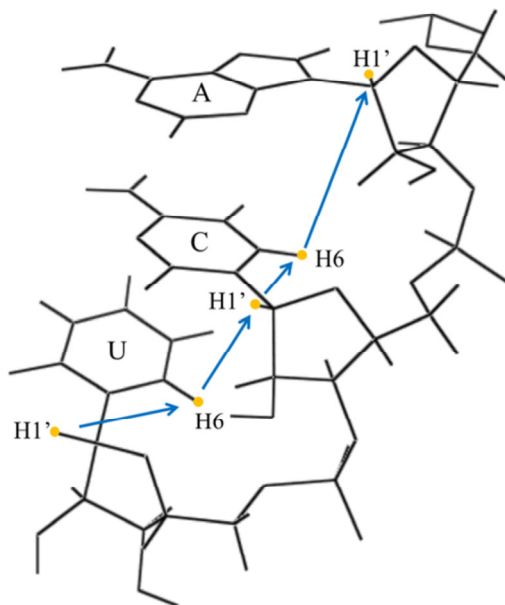


Figure 1.4. 核酸分子  $^1\text{H}$  シグナルの典型的化学シフト値と NOE による  $^1\text{H}$  シグナルの連鎖帰属( $\text{H1}'$ - $\text{H6}/\text{H8}$ ): (a)化学シフト値。図中の A-U、G-C の下線はそれぞれ A-U 塩基対、G-C 塩基対のイミノプロトンが観測される領域を示す。(b) 連鎖帰属( $\text{H1}'$ - $\text{H6}/\text{H8}$ )。図中、オレンジの丸は NOE 交差シグナルから帰属可能なプロトンを示す。NOE 交差シグナルは隣接する糖  $\text{H1}'$  と塩基  $\text{H6}$  (pyrimidine)/ $\text{H8}$  (purine)間で観測されるため矢印の方向に連鎖的にプロトンを帰属することが可能である。(PDB ID: 2L8F, 5'-rACU-3')

## 2 Ire1p RNase ドメインの同定と酵素学的特性解析

### 2.1 緒言

Ire1p は全長 1115 アミノ酸からなる I 型膜貫通タンパク質である。N 末端から 520 番目付近までは内腔ドメインと呼ばれ、小胞体内腔に位置している。一方膜貫通領域を隔てて C 末端までは Kinase ドメインと RNase ドメインが存在し、細胞質側に位置している (Figure 1.1)。Kinase ドメインは Ser/Thr kinase である cyclin-dependent-kinase cdc2 と高い相同性を示す。また、Kinase ドメインから続く RNase ドメインは配列特異的に切断する endoribonuclease として働き、転写因子 *HAC1* mRNA のスプライシングを担う。

現在のところ Ire1p/IRE1 の基質として出芽酵母では *HAC1* mRNA、線虫、ヒトなどでは *XBPI* mRNA が同定されている。いずれの場合も UPR 関連の遺伝子を制御する転写因子をコードし、スプライシング時に Ire1p/IRE1 によって二カ所で切断を受ける。Ire1p/IRE1 によって切断を受ける部位には 5'-CNGNNGN-3' のコンセンサス配列があることが知られており、RNA 鎖は下線部グアノシン残基の後ろで切断される。また、このコンセンサス配列周辺の配列は二次構造予測からステムループ構造をとると考えられており、コンセンサス配列はそのループ部分に相当する (Sidaraski et al., 1997; Mori et al., 2000; Rügsegger et al., 2001; Hooks and Griffiths-jones, 2011)。予測されるスプライシング部位の二次構造と切断部位を中心とした残基の番号付けを Figure 2.1a に示す。切断部位直前のグアノシンを G(-1) とし、コンセンサス配列中に保存された残基は 5' 側からそれぞれ C(-3), G(-1), G(+3) となる。

生化学的な研究 (Gonzalez et al., 1999; Korennykh et al., 2011) から Ire1p/IRE1 の切断様式は、脱プロトン化された G(-1) の 2' 水酸基が 3' 側に結合しているリン原子を攻撃しリン酸ジエステル結合が開裂、RNA 鎖の切断が起こる。この切断反応によって生成した 5' 側 RNA フラグメントの 3' 末端は 2',3'-環状リン酸基 (2',3'-cyclic phosphate) となり、3' 側 RNA フラグメントの 5' 末端は水酸基を生成する反応機構が提唱されている (Figure 2.1b)。このような 2' 水酸基を求核種とした RNA 切断反応は一般的な RNA の切断機構の一つとして知られている (Steyaert and Wyns., 1993; Xue et al., 2006)。

この章では、タンパク質限定分解法を用いた構造的に安定な Ire1p RNase ドメインの同定と、NMR 分光法と *in vitro* 切断実験を用いた Ire1p の認識配列の検討について記述する。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 細胞質ドメイン全長のプラスミド構築と精製

細胞質側ドメイン全長(662-1115)は pET200-D-TOPO ベクター(invitrogen)上に構築した。目的タンパク質は N 末端に 6 残基のヒスチジン(ポリヒスチジンタグ)をもつ融合タンパク質の形で大腸菌内に発現される。またそのタンパク質の発現はベクター内に存在する *lac* オペロンの転写制御によって調節されている。

プラスミドを BL21 (DE3) Rosetta 大腸菌株に形質転換を行い、安定同位体標識を行わない場合は LB 培地、安定同位体標識を行う場合には  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む M9 最小培地にて培養を行った。終濃度 1 mM IPTG 添加後、25 °C にて 4 時間タンパク質の発現を誘導したのち菌体を培地中から回収した。回収した菌体を buffer A (50 mM HEPES (pH7.4), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 12 mM e-Mercaptoethanol)に懸濁し超音波破碎機を用いて菌体の破碎を行った。破碎した菌体液を Type 45Ti ローター(Beckman Coulter)を用いて超遠心(35000 rpm, 30 min)を行い、可溶性画分のみを収集した。回収した可溶性画分を  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA アガロースカラム(QIAGEN)に吸着させた後、10 mM イミダゾールを含む buffer A にて非吸着成分を洗浄し、buffer B (50 mM HEPES (pH7.4), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 12 mM e-Mercaptoethanol, 150 mM Imidazole)を用いて目的タンパク質を溶出した。最後に、Buffer C (50 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl)で平衡化した HiLoad Superdex200 カラム(GE Healthcare)を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、目的タンパク質を単離した。

### 2.2.2 細胞質ドメイン全長の限定分解

RNase ドメインに相当する構造ドメインを同定するために、タンパク質分解酵素による限定分解を行った。単離した Ire1p 662-1115 タンパク質 1.2 mg/mL (50 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT)に対して終濃度がそれぞれ 1, 5, 10 pg/mL となるように Elastase を添加し、4 °C または 25 °C にて反応を行った。また、分解反応は 1 時間ごと、3 時間までトレースした。分解されたタンパク質断片は SDS-PAGE により分離し、質量分析及びエドマン分解法を用いた N 末端アミノ酸シーケンシング(ABI model 492cLC)により配列を同定した。

### 2.2.3 RNase ドメインのプラスミド構築と精製

タンパク質分解酵素を用いた限定分解により同定した、構造的に安定な RNase ドメインの候補 Ire1p 884-1115, 886-1115, 944-1115, 975-1115 は pCold1 ベクター(Takara)または pCold1-PSP ベクター(Hayashi et al., 2010)上に構築した。目的タンパク質は N 末端に 6 残基のヒスチジン(ポリヒスチジンタグ)をもつ融合タンパク質の形で大腸菌内に発現され、ポリヒスチジンタグと目的タンパク質の間には Factor Xa または HRV3C プロテアーゼの切断サイトが存在している。またそのタンパク質の発現はベクター内に存在する *lac* オペロンの転写制御によって調節されている。

プラスミドを BL21 (DE3) Rosetta 大腸菌株に形質転換を行い、安定同位体標識を行わない場合は LB 培地、安定同位体標識を行う場合には  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む M9 最小培地にて培養を行った。終濃度 1 mM IPTG 添加後、15 °C にて終夜タンパク質の発現を誘導したのち菌体を培地中から回収した。回収した菌体を buffer A (50 mM HEPES (pH7.4), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 12 mM e-Mercaptoethanol)に懸濁し超音波破碎機を用いて菌体の破碎を行った。破碎した菌体液を Type 45Ti ローター(Beckman Coulter)を用いて超遠心(35000 rpm, 30min)を行い、可溶性画分のみを収集した。回収した可溶性画分を  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA アガロースカラム(QIAGEN)に吸着させた後、100 mM イミダゾールを含む buffer A にて非吸着成分を洗浄し、buffer D (50 mM HEPES (pH7.4), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 12 mM e-Mercaptoethanol, 300 mM Imidazole)を用いて目的タンパク質を溶出した。最後に、Buffer C (50 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl)で平衡化した HiLoad Superdex75 カラム(GE Healthcare)を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、目的タンパク質を単離した。

#### 2.2.4 NMR を用いた相互作用解析のための基質 RNA のデザインと調製

Ire1p RNase ドメインと基質 RNA との相互作用を NMR スペクトルで観測するために基質 RNA の配列を種々調製した(Table 2.1)。2'水酸基を求核種とする RNA 切断機構(Figure 2.1b)が想定される場合、通常基質鎖の切断を防ぐために、2'位をデオキシ化または  $\text{OCH}_3$  化した基質 RNA を使用する。しかしながら本実験では通常の基質認識に近い状態を観測するために、天然型 RNA を用いることとした。この理由として、今回同定した RNase ドメインはセンサードメインと Kinase ドメインを欠くため、基質の切断能力は全長の Ire1p と比べて非常に低いことが想定されたため、基質 RNA 切断前に通常の基質認識に近い状態が観測できる可能性があったためである。

*HAC1* mRNA は全長で 1000 残基以上あるため、全長のまま NMR の測定を行うことは難しい。そこで切断部位近傍の配列に焦点を絞って実験を行うこととした。前述したとおり二次構造予測上で切断部位近傍の配列はス



テムループ構造を取っていると考えられている。また、この構造は *HAC1*, *XBPI* 間で種を超えて保存されているため、この構造が基質の認識に重要であることが推測される。短いフラグメントでも構造的に安定かつ、コンセンサス配列がステムループのループ部分に配置される様な配列を探索した結果、*HAC1* mRNA の 5'側のスプライシング部位を含む 21 塩基の配列 (5'-CGUAAUCCAGCCGUGAUUACG-3'; 下線部はコンセンサス配列を含むループ配列) を実験に用いることとした。以降この配列を Stemloop-1 と呼ぶ。この Stemloop-1 は FASMAC Co., Ltd. から化学合成をした標品を購入した。

Stemloop-1 に加え、*HCAI* mRNA の 5'側のスプライシング部位を解析対象とし、コンセンサス配列に保存された各残基の切断への寄与を調べるため、ループ配列 (コンセンサス配列) のみまたはそれらを改変した配列を含む Loop-1 から Loop-11 までの配列をデザインした (Table 2.1)。デザインしたループ配列は DNA/RNA 合成機 (ABI model 392) を用いてホスホアミダイド法で合成した。固相単体上に合成された核酸は 1 pmol 合成スケールあたり 2 mL 2.0 M Ammonia in ethanol (SIGMA-ALDRICH) 溶液中で 55 °C, 16 時間反応を行い固相単体からの核酸の切りだし、核酸塩基部分の脱保護を行った。反応後の溶液から固相単体を除去後完全に溶液を乾固させ、2'水酸基の保護基である tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基を脱保護するために 1 pmol 合成スケールあたり 1 mL 1.0 M Tetrabutylammonium fluoride in THF (TBAF; SIGMA-ALDRICH) 溶液中で 37 °C, 16 時間反応を行った。TBAF と脱離した保護基を除去するために弱陰イオン交換樹脂 DEAE Toyopearl (TOSOH) を用いて陰イオンクロマトグラフィーを行った。目的の鎖長の核酸を単離するために、陰イオン交換カラム mono-Q (GE healthcare) を用いて変性状態 (8 M 尿素存在下) でイオン交換クロマトグラフィーを行った。分収した核酸サンプルの脱塩にはゲル濾過カラム (TSK-GEL G3000PW; TOSOH) を用いた。

### 2.2.5 Stemloop 型基質 RNA の構造解析

Stemloop-1 のイミノプロトンの帰属を行うために、1 mM (10 mM Sodium Phosphate (pH 7.4), 0.1 mM EDTA) に調製した Stemloop-1 の 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY (mixing time = 200 msec), TOCSY スペクトルを測定した。測定は DRX800 NMR spectrometer を使用し 283 K で行った。スペクトルの処理は NMRPipe 3.0 プログラムを用いて行い、シグナルの帰属は Sparky 3.112 プログラムを用いて行った。

## 2.2.6 NMR を用いた Ire1p 944-1115 RNase ドメインと基質 RNA の相互作用解析

Stemloop型基質と Ire1p 944-1115の相互作用解析を行うために、Ire1p 944-1115 RNaseドメインを2.2.3に記載された方法で調製した。Ire1pによる Stemloop-1のシグナルの変化を観測するため、60 pM Ire1p 944-1115 (50 mM Potassium Phosphate (pH 7.4), 50 mM KCl)に100 pM Stemloop-1 (10 mM Sodium phosphate (pH 7.4), 0.1 mM EDTA)を0.5, 1, 2当量ずつ混合し、各ポイントで1D  $^1\text{H}$  NMRスペクトルを測定した。測定にはDRX800 NMR spectrometerを使用し283 Kで測定を行った。

ループ配列と Ire1p 944-1115の相互作用解析を行うために、Ire1p 944-1115 RNaseドメインは2.2.3に記載された方法で調製した。また、実験にはLoop-1からLoop-11までの配列を使用した。Ire1pとループ配列との相互作用をNMRスペクトル上で観測するために、200 pM Ire1p 944-1115 (200 mM Potassium Phosphate (pH 7.4), 50 mM KCl, 0.5 mM DTT)に対し、超純水に溶解したループ配列を0.1, 1, 10 (5)当量ずつ混合し、各ポイントで1D  $^1\text{H}$  NMR、2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSYスペクトルを測定した。測定にはDRX800 NMR spectrometer、Bruker Avance-I 800 spectrometerを使用し310 Kで測定を行った。また、測定後のサンプルは変性条件下で陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、切断の有無を確認した。

## 2.2.7 基質切断実験系の構築

*In vitro*での基質切断反応の溶液条件を決定するため緩衝剤(X)、pH (Y)を Table2.2 に示す組み合わせで切断反応を行った。反応条件は以下の通りである。160 pM Ire1p 944-1115, 200 pM Loop-1 RNA, 100 mM X buffer (pH Y), 50 mM KCl, 1 mM DTT。反応は37 °C, 90 分行い、切断効率は変性条件下で陰イオンクロマトグラフィーのクロマトグラムより見積もった。

次に基質切断反応の初速度 ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ )を決定するための溶液条件の検討を行った。短鎖 RNA を基質とした切断実験の場合、切断後のフラグメントを電気泳動で分離する既存の方法(Back et al., 2005)では短鎖の定量が、が難しかった。そこで260 nmの紫外吸光度変化 ( $GA_{260}$ )から基質切断反応を追跡することとし、初速度 ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ )決定に最適な酵素基質量比を検討した。反応は酵素量 Z, 基質量 W とすると、Z pM Ire1p 944-1115, W pM Loop-1 RNA, 100 mM HEPES (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT、25 °Cで行った(Table2.3)。反応を追跡するために260 nmの紫外吸光度を12000秒間10秒ごとに測定した。検討の結果、切断反応初速度を決定可能な  $GA_{260}$ -時間プロファイルが得られる条件は以下のようになった。溶液:100 pM RNA, 10

pM protein (100 mM HEPES (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT)、温度：25 °C。

260 nm の吸光度変化( $GA_{260}$ )からの初速度決定を行う際の原理は次の通り。オリゴヌクレオチドは、塩基間のスタッキング相互作用の影響で構成ヌクレオチドのモル吸光係数から想定される吸光度よりも低く観測されることが知られている (淡色効果)。ゆえに RNA 鎖が切断を受けた場合 (変性による二重鎖の解離でも起きる)、スタッキング相互作用の一部が解消されるため、全体としての吸光度は上昇する (濃色効果)。この吸光度変化 ( $GA_{260}$ )が基質切断割合 (切断された基質 P の濃度 [P])に比例しているため、この現象を利用して、切断された基質 P の濃度 [P]を吸光度変化 ( $GA_{260}$ )により決定できる。なお 12000 秒後でも RNA 鎖切断反応は未飽和のため、モニター終了時点での基質切断割合を、カラムクロマトグラフィにより決定し、各基質 RNA の  $GA_{260}$  と [P] (切断された基質の濃度)の換算を行った。 $GA_{260}$  の時間プロファイルの測定開始間もない直線近似可能な領域の傾きより切断反応の初速度  $d[P]/dt$  ( $M^{-1}\cdot sec^{-1}$ )を求めた。その後、初速度を酵素濃度で規格化して  $k_{obs}$  ( $sec^{-1}$ )とした。

## 2.2.8 切断活性測定

Irelpの基質切断に対する金属イオンの要求性と各ループ配列での切断活性の違いを検証するために *in vitro* で切断活性測定を行った。

Irelp 944-1115 RNaseドメインは2.2.3に記載された方法で調製した。この時ゲル濾過クロマトグラフィーは、タンパク質由来の金属イオンとbufferからのリン酸の混入を避けるため、0.1 M EDTAで処理した粗精製サンプルをbuffer Cの代わりにbuffer D (20 mM HEPES (pH 7.0), 30 mM KCl)で平衡化したカラムを用いて行った。反応は25 °C, 100 pM RNA, 10 pM protein (100 mM HEPES (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT)で行った。切断反応に用いた金属の組み合わせはTable2.4、配列の組み合わせはTable2.5に示す。、反応の追跡は260 nmの吸光度変化( $GA_{260}$ )を12000秒測定した。次に、測定後のサンプルは変性条件下で陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、反応終了時の切断率を見積もった。これらの情報をもとに、時間プロファイルの反応初期の勾配から切断反応の初速度 (切断フラグメント生成の初速度( $M^{-1}\cdot sec^{-1}$ ))を求めた。次に切断反応の初速度( $M^{-1}\cdot sec^{-1}$ )を酵素濃度で規格化し、 $k_{obs}$  ( $sec^{-1}$ )を求めた。

金属要求性の実験結果(Table2.4)から、Irelpによる切断反応には金属イオンの要求性はないと判断されたため、金属イオンを含まない反応溶液条件下で、種々の基質RNA (Loop-1 - 7)の $k_{obs}$  ( $sec^{-1}$ )を決定した(Table2.5)。切断活性測定に使用した紫外吸光度変化 ( $GA_{260}$ )-時間プロファイルをFigure 2.2、Figure 2.3, Figure 2.4に示す。また、以下に述べる理由によりいくつかの条件

下での測定は参考値とした。Figure 2.2, Figure 2.3より、本体ならば吸光スペクトルの変化は核酸の切断に伴って特定の吸光度を漸近線とする指数関数様の曲線として観測されるはずであるが、一部測定条件において吸光度変化にうねりや傾きの急激な変化が観測された(Figure 2.4a,b)。これにより Table2.5のEntry-8で求めた $k_{\text{obs}}$ の値は参考値とした。また、切断率を求める陰イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムが複雑な形状を示し、正確な切断量を算出する事が難しかったTable2.5のEntry-5については切断の有無のみを示した。Table2.4のEntry-5についてはFigure 2.4aに示す通り吸光度変化のうねりが激しいため切断量比のみを求めた。Table2.5のEntry-2については陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて切断が確認されず、また260 nmの吸光度変化が測定誤差範囲内であるため切断不可能な配列条件と判断した。また、技術的な問題から陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて切断効率を求める事が出来なかったTable2.5のEntry-7についても、260 nmの吸光度変化が測定誤差範囲内であることと、相互作用解析で用いたNMRスペクトル上でシグナルの変化が全く観測されなかった事から、切断不可能な配列条件と判断し、Table2.5のEntry-5と同様切断の有無のみを示した。

### 2.2.9 ループ配列における切断反応後のフラグメントの解析

ループ配列が部位特異的に且つ全長の mRNA と同じ様式で切断されているのか確かめるために質量分析と 1D  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルの測定を行った。リンの NMR スペクトルを測定するために、50 pM Ire1p 944-1115 RNase domain, 100 pM Loop-1 RNA (wild-type sequence of *HAC1* 5'splicing site), 20 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM DTT 条件で 37 °C, 24 時間反応を行い、室温、10%重水存在下で 1D  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルの測定を行った。NMR の測定には ECA600 spectrometer (日本電子)を使用した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 Ire1p RNase ドメインの同定

Ire1p の RNase ドメインに相当する構造ドメインを同定するために、RNase ドメインが含まれる細胞質ドメイン全長に相当する Ire1p 662-1115 フラグメントの限定分解を行った。限定分解とは配列特異性の低いタンパク質分解酵素をあえて至適条件外の条件で切断反応を行う方法である。このような条件下では酵素の切断活性が低いため、基質タンパク質中でループのような運動性の高い領域が切断を受けやすく、構造的に安定な領域は切断を受けにくいという構造に依存した切断部位の選択が起こる。そのた

め切断後のフラグメントを解析することで構造的にまとまった単位を同定することが可能となる。限定分解の結果、884-1115、886-1115、944-1115、975-1115の4つの構造的に安定なフラグメントの候補を得た(Figure 2.5a)。それぞれを pCold1 ベクター上に構築しタンパク質の発現を調べたところ、886-1115、944-1115 のフラグメントにおいて可溶性画分に大量のタンパク質の発現を確認した。また、その2つのフラグメントの<sup>15</sup>N 標識体を精製し 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定したところ(Figure 2.5b,c)、944-1115 のフラグメントからピークが良く分離した NMR スペクトルを得た(Figure 2.5c)。一方 886-1115 のフラグメントについては、NMR スペクトル上で有益なシグナルを観測することができず(Figure 2.5b)構造的に不安定なドメインであることが示唆された。このことから構造的に安定な RNase ドメインとして Ire1p 944-1115 を同定した。この同定したドメインは N 末端から 50 残基までは cdc2 Kinase と相同性が高く、RNase ドメインのみを含む配列ではないが、プロテアーゼの限定分解で同定されたことから構造的にまとまったユニットである可能性が高く、NMR スペクトル上からも溶液中での性質が良いドメイン単位であることが推測されるため、RNase ドメインの解析を行う対象として 944-1115 のフラグメントを使用することにした。

### 2.3.2 NMR を用いた Ire1p 944-1115 RNase ドメインと基質 RNA の相互作用解析

NMR を用いて Ire1p RNase ドメインと *HAC1* mRNA との相互作用解析を行った。今回同定した Ire1p 944-1115 RNase ドメインはセンサードメインと Kinase ドメインの大部分を欠くため、基質の切断能力は全長の Ire1p と比べて非常に低活性であることが想定された。そこで通常の基質認識に近い状態を観測できる様に、天然型化学構造を持つ RNA 分子、即ち、切断部位 2' をデオキシ化または OCH<sub>3</sub> 化していない RNA 分子を用いて実験を行った。

*HAC1* mRNA は全長で 1000 残基以上あるため、分子量の問題から全長のまま NMR の測定を行うことは難しい。そこで切断部位近傍の配列に焦点を絞って実験を行った。*HAC1* mRNA の 5' 側スプライシング部位はコンセンサス配列を挟んで 5' 側と 3' 側 7 塩基が自己相補的な配列となっており、ステムループ構造を取ることが予測される。また、このコンセンサス配列前後に見られる自己相補的な配列は *HAC1*, *XBPI* 間で種を超えて保存されているため、すべてのスプライシング部位でコンセンサス配列をループとしたステムループ構造の形成が想定される。故にこのステムループ構造が基質の認識に重要であることが推測される。短いフラグメントでも構造的に安定かつ、コンセンサス配列がステムループのループ部分に配置される

様な配列を探索した結果、*HAC1* mRNA の 5'側のスプライシング部位を含む 21 塩基の配列 (5'-CGUAAUCCAGCCGUGAUUACG-3'; 下線部はコンセンサス配列を含むループ部位)を実験に用いることとした。以降この配列を Stemloop-1 と呼ぶ。

精製された Ire1p 944-1115 存在下および非存在下で Stemloop-1 の 1D  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定した結果、Figure 2.6 に示す様なスペクトルを得た。なお示したスペクトルはイミノプロトンの領域のみを示す。観測されたイミノプロトンのシグナルのうち矢印で示した 12 ppm 付近のシグナルが Ire1p 944-1115 存在下で低磁場側へ大きくシフトし、13.9 ppm 付近のシグナルも同時に低磁場側へシフトする様子が確認された。

Figure 2.6 で大きく低磁場側にシフトしたイミノプロトンがどの残基に由来するのかを確かめるために Stemloop-1 のイミノプロトンについての帰属を行った。その結果を Figure 2.7 に示す。シグナルの帰属を行った結果、Ire1p 944-1115 存在下で顕著に低磁場側にシフトしたイミノプロトンのシグナルは G890 (+5 位), U881 (-5 位)残基に由来するものであることが分かった(Figure 2.7c,d)。また同時に、H1'- H6/H8 について帰属を行った結果(Figure 2.7b)、C875-C882, G890-G896 の領域について連鎖的に NOE シグナルを帰属することが可能であったため、この領域が二重鎖を形成していることが確認された。Figure 2.6 の NMR スペクトルから、Ire1p 944-1115 RNase ドメインの有無で顕著な変化を示す Stemloop-1 のイミノプロトンはループ近傍の配列のみであり、ループとループ近傍の配列のみが Ire1p の影響を受けると考えられた。この事から *HAC1* RNA の認識に必要なのはステム領域ではなくループ近傍の配列であり、ループ配列のみでも基質として認識出来る可能性が考えられた。

この仮説に従って、ループ配列のみを持つ RNA と Ire1p 944-1115 との相互作用を確認するため、Ire1p 944-1115 存在下および非存在下で各種ループ配列の 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトルを測定した。ループ配列は一本鎖であるため、イミノプロトンを指標とする観測が出来ない。そこでタンパク質との相互作用の有無は 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトルを用いてピリジミジン塩基の H5, H6 プロトン間の交差シグナルを指標に測定を行った。相互作用解析を行ったループ配列の 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトルうち、代表的ものを Figure 2.8 に示す。2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトルから Loop-2 (5'-CACCCGU-3'), Loop-3 (5'-GACCCCU-3'), Loop-7 (5'-GC-3') 以外の配列において Ire1p 944-1115 存在下でシグナルの新生またはシフトが観測された(Figure 2.8a,d)。

実験に用いた Ire1p 944-1115 は RNase としての活性が弱いと想定していたため、このスペクトルの変化は Ire1p との結合によって引き起こされたと考えた。しかしながら測定後の NMR サンプルを陰イオン交換カラムに

よって分離し、測定後の基質の状態を確認したところ、2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトル上でスペクトルの変化のあった条件では測定前の基質には存在しなかったループ配列よりも溶出時間が短い(低分子量)核酸分子の存在が確認され、NMR 測定条件下での Ire1p によるループ配列の切断が示唆された。また、2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトル上でスペクトルの変化が見られなかった3つの配列ではこの低分子量の核酸の存在が確認されなかったため、今回 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトル上で観測されたシグナルの変化は、Ire1p の基質切断に伴って生じた切断後のフラグメントと切断前のフラグメントの化学シフト値の差である可能性が最も高いと考えられる。これらの事実から、Ire1p RNase ドメインは Kinase ドメイン無しでも RNA 鎖切断活性をもつこと、及び、Ire1p はたった7塩基のループ配列 (コンセンサス配列) のみでも基質として認識し、切断反応を起こす事が示された。

今回相互作用解析を行った配列のうち、Loop-11 (5'-CUGCAGC-3'; *hXBPI* mRNA 3' splicing site)では Ire1p 944-1115 存在下でもスペクトルの変化が微弱で(Figure 2.9a)かつ測定後のサンプルから見積もった切断後のフラグメントの生成量が、100%切断されている Loop-1 と比べて 10%以下と極端に少なかった。この配列は Figure 2.9b で示す通り分子間での塩基対形成が起りやすい配列となっている。実際に融解温度( $T_m$ )を測定すると、濃度依存的な  $T_m$  値の上昇が観測され、分子間での二重鎖の形成が示唆された。このことから、コンセンサス配列が分子間で二重鎖を形成するような条件では Ire1p による切断は抑制されると考えられた。

### 2.3.3 基質切断実験系の構築

NMR を用いた相互作用解析から NMR 測定条件下でも非常にゆっくりではあるものの、Kinase ドメイン無しで切断活性があることが示された。そこで RNase ドメイン自身の活性をより正確に評価する目的で、*in vitro* で基質切断実験を行った。また、7塩基のループ配列でも切断可能であることが示されたので、基質としては Loop-1 (*HAC1* mRNA 5' splicing site)を用いて実験を行った。

種々の溶液条件で Loop-1 の切断を行った結果、緩衝液を Potassium Phosphate から別の緩衝液に変えることで、RNase ドメインは非常に高い RNA 鎖切断活性を示すことが判った (Table 2.2)。最終的に最も活性が高いと決定された条件は、100 mM HEPES pH 7.0, 50 mM KCl, 1 mM DTT であった。一方、200 mM Potassium Phosphate を緩衝剤として使用したとき、pH はほとんど変わらないにも関わらず、切断効率がほかの2つの緩衝剤と比べて低下することが示された。これは NMR 測定条件下では Potassium Phosphate が基質の切断反応に阻害的に働いている可能性を示唆した。

次にこの高活性の溶液条件下で切断反応初速度の決定をめざし、初速度決定可能な紫外吸光度-時間プロファイルが得られる基質/酵素濃度を検討した。その結果、反応条件 (溶液: 100 pM RNA, 10 pM protein (100 mM HEPES (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT)、温度: 25 °C)を得た。

過去の研究から(Korenykh et al., 2009) Ire1p の切断反応は  $Mg^{2+}$  イオンに非依存적であるという報告がなされていたため、ここまでの実験条件では基質切断反応に対する二価金属イオンの影響は考慮されていない。しかしながら、核酸の切断反応では二価金属イオンの存在が切断効率に影響する場合が多く見られる。そこで最終的な溶液条件を決定する目的で、切断反応における二価金属イオン( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ )の影響を調べた(Table 2.4)。切断反応を追跡するために、上記の高活性の溶液条件と紫外吸光度変化を用いる実験系を使用し、基質として Loop-1 配列を使用した。

Table 2.4 より, Entry-2 から Entry-5 までと金属イオン非存在下で切断した Entry-1 を比較すると、金属イオンの有無による切断速度の大きな変化は確認されなかった。このことから実験に用いた 4 つの二価金属イオンについて、Ire1p の基質切断反応に必須ではないと考えられた。従って、2.3.3 で決定した二価金属イオンを含まない溶液条件で、RNase ドメインで切断を受ける塩基配列および二次構造要素の詳細な検討を行った。

#### 2.3.4 *In vitro* 切断活性測定による Ire1p 切断配列の同定

各配列の切断活性測定の結果を Table 2.5 に示す。同じ野生型の *HAC1* mRNA 5'側スプライシング部位のコンセンサス配列を切断している Entry-1 (Loop-1)と Entry-8 (Stemloop-1)を比較すると、ステム領域のない Loop-1 (5'-CAGCCGU-3'; 下線部は保存残基の位置)でもステムのある Stemloop-1 とほぼ同程度の効率で切断反応が進行している事が確認された。この事から切断反応にステム領域の有無は影響しないことが分かった。

加えて Entry-2 (5'-CACCCGU-3')と Entry-3 (5'-GACCCCU-3')より、G(-1)をシトシンに変更したループ配列では全長の mRNA と同じように切断反応が阻害された。このことから切断部位の認識には G(-1)が大きく関わっている事が示唆された。しかしながら G(-1)と+1 位のみを含む Loop-7 (5'-GC-3')配列は切断する事が出来なかった。このことから G(-1)のみでは切断部位の認識条件として不十分である事が分かった。

さらに、Entry-4, Entry-5, Entry-6 より、保存された C(-3)並びに G(+3)へ二塩基置換変異を導入したループ配列でも切断が確認された。この事から、コンセンサス配列中の保存残基 G(-1)部位以外の場所については、すでに知られている配列よりも自由度があるということが示された。加えて、この実験条件下で使用した Loop-4 (5'-GAGCCCU-3'), Loop-5 (5'-UAGCCAU-3'),



Loop-6 (5'-AAGCCUU-3')はどれも Loop-1 の C(-3), G(+3)に対する変異体であるが、その個々の配列は野生型の配列と同じように保存された-3 と+3間にある相補的な塩基関係を保持した変異体である。このことから C(-3)と G(+3)間での塩基対形成が示唆された。

### 2.3.5 ループ配列における切断反応後のフラグメントの解析

Loop-1 配列 (野生型コンセンサス配列) が部位特異的に且つ全長の mRNA と同じ様式で切断されているのか確かめるために質量分析と 1D <sup>31</sup>P NMR スペクトルの測定を行い、切断後のフラグメントの配列と切断末端の化学構造を決定した。

1D <sup>31</sup>P NMR スペクトル(Figure 2.10)より切断反応後に 2 つのシグナルが観測された。そのうち 0 ppm 付近のシグナルは未反応の Loop-1 配列で観測されたリンのシグナルと一致するため、各残基間のリン酸ジエステル結合に由来すると考えられた。一方 20 ppm 付近に観測されたシグナルは、未反応の Loop-1 配列では観測されなかった。またこのシグナルは、水溶液中で測定した guanosine-2',3'-cyclic monophosphate のリンの化学シフト値と良く一致するため、この低磁場側のシグナルは 2',3'-cyclic phosphate に由来し、切断末端には 2',3'-cyclic phosphate が生成されていることが解った。

質量分析を行った結果、切断反応後の溶液に 2179.121, 1199.140, 979.148 の質量をもつ断片が含まれることが分かった。これらの断片はそれぞれ、未反応の Loop-1 配列 (5'-CAGCCGU-3')、5', 3'両末端が水酸基の CCGU 配列、5'末端が水酸基、3'末端側が 2',3'-cyclic phosphate である CAG 配列であると仮定した場合最も観測値と一致した。この時誤差は最大で 0.1%であった。このことから Loop-1 配列は全長と同じ部位で切断を受けることが分かった。さらに切断末端に 2',3'-cyclic phosphate が観測されたことから、その切断様式は通常の Ire1p の切断様式と同等であると示された。RNA 鎖切断反応にのみ注目した場合、化学反応論的には天然型全長 mRNA と全く同じ化学反応が進行していると結論された。

## 2.4 考察

- 構造的に安定な Ire1p RNase ドメインの同定と認識配列 -

タンパク質分解酵素による限定分解を行った結果、RNase ドメインとして 994-1115 までのフラグメントを同定した。このドメインは NMR スペクトル上で良好なシグナルを与えるため、構造的にも安定なドメインと考えられる。また、切断活性測定から、このドメインは単独で高い切断活性を

有していることが確認されたため、Ire1p の RNase ドメインは機能的には非常に独立性が高い事も示された。

同定された RNase ドメインと基質 RNA を用いた切断実験から、Ire1p は 7 塩基からなるコンセンサス配列 (ループ配列) のみでも基質として部位特異的に切断することがわかった。また切断後のフラグメントの 3'末端の化学構造解析から、その化学構造は全長 mRNA の場合と同じであることが確認された。これらのことから Ire1p RNase ドメインによる切断に必要な配列条件はコンセンサス配列 (ループ配列) のみである事が示された。しかしながら分子間で二重鎖を形成していると考えられる Loop-11 の相互作用解析の結果から、コンセンサス配列が二重鎖を形成するような場合、Ire1p による切断は抑制されるという結果が得られた。このことから、Ire1p が切断を行うためにはコンセンサス配列が一本鎖の状態で存在することも必要であると示唆された。

G(-1)をシトシンに変更した 7 塩基のコンセンサス配列 (ループ配列) では、長鎖の mRNA 同様に切断反応が阻害された。このことから Ire1p による切断部位の認識は RNase T1 (Gohda et al., 1994)と同様な切断部位 5'側のグアノシン残基 G(-1)を Ire1p が認識する機構が想定された。しかしながら RNase T1 では切断可能な guanosyl (3'-5') cytidine (Loop-7; 5'-GC-3')配列を対象とした切断実験では Ire1p による基質の切断を確認することが出来なかった。このことから Ire1p の基質認識には別の配列条件も必要である事も示唆された。

3 つの二塩基置換変異体 5'-GNGNNCN-3'、5'-ANGNNUN-3'、5'-UNGNNAN-3'(下線部は変異導入部位)でも Ire1p は部位特異的な切断反応を示すことがわかった。これまで 3 つの保存残基への一塩基変異導入は切断効率を大きく低下させるため(Gonzalez et al., 1999)保存された C(-3), G(-1), G(+3)残基は切断に必須であるものとされてきたが、この結果から Ire1p の認識配列がこれまで知られている配列より自由度を持っている事が示された。また同時に、これらの二塩基置換体では保存残基 C(-3), G(+3)間の相補的な塩基対関係が損なわれていないことから、保存残基 C(-3), G(+3)間で塩基対が形成されることが示唆された。

以上より、Ire1p の認識には G(-1)が必須であり、加えてコンセンサス配列は一本鎖である必要性が考えられた。また、その他の配列条件として相補的な塩基関係を持つ-3 位と+3 位の残基も必要であると考えられた。

## 2.5 結論

タンパク質分解酵素 Elastase による限定分解を行った結果、RNase ドメインとして構造的に安定な 994-1115 までのフラグメントが同定された。ま

た、切断活性測定から、このドメインは単独で高い RNA 切断活性を有していることが確認された。

同定されたドメインを用いた切断実験から、Ire1p は 7 塩基からなるループ配列 (コンセンサス配列 ; 5'-CNGNNGN-3')のみでも基質として部位特異的に切断可能であり、その反応機構は全長の mRNA を基質とした場合と同等であると考えられた。また、様々な種類のループ配列を用いた切断実験より、切断配列としては G(-1)が必須であり、-3、+3 位の残基は保存残基 C(-3)-G(+3)に加えて、G(-3)-C(+3)、A(-3)-U(+3)、U(-3)-A(+3)が許されることが分かった。特にループ配列の-3、+3 位二塩基置換変異体の解析から、保存残基 C(-3), G(+3)間での塩基対形成が示唆された。

また、NOE シグナルの連鎖帰属結果から、21 塩基からなる *HAC1* mRNA 5'スプライシング部位(C876-G896)のうち C875-C882, G890-G896 は右巻きの二重らせん構造をとり、ステムを形成することを決定した。また、コンセンサス配列(C883-G889)の領域は連鎖的な NOE シグナルの帰属が不可能であったため、この二重らせん中に含まれないループ領域であると考えられる。

Table 2.1. 実験に用いた RNA 配列

Sequence name	Sequence <sup>a</sup>	Mutation	Origin <sup>b</sup>
Stemloop-1	5'-CGUAAUCCAGCCGUGAUUACG-3'	-	HAC1 5'
Loop-1	5'-CAGCCGU-3'	-	HAC1 5'
Loop-2	5'-CACCCGU-3'	G(-1)C	HAC1 5'
Loop-3	5'-GACCCU-3'	C(-3)G, G(-1)C, G(+3)C	HAC1 5'
Loop-4	5'-GAGCCU-3'	C(-3)C, G(+3)C	HAC1 5'
Loop-5	5'-UAGCCAU-3'	C(-3)U, G(+3)A	HAC1 5'
Loop-6	5'-AAGCCUU-3'	C(-3)A, G(+3)U	HAC1 5'
Loop-7	5'-GC-3'	C(-3), A-2, C+2, G(+3), U+4 deletion	HAC1 5'
Loop-8	5'-CCGAAGC-3'	-	HAC1 3'
Loop-9	5'-CCCAAGC-3'	G(-1)C	HAC1 3'
Loop-10	5'-CCGCAGC-3'	-	hXBP1 5'
Loop-11	5'-CUGCAGC-3'	-	hXBP1 3'

<sup>a</sup> 下線で示した残基はコンセンサス配列(CNGNNGN)中の保存残基の位置。

<sup>b</sup>Origin として *HAC1* mRNA、*hXBP1* mRNA どちらの配列であるか、5', 3' 側どちらのスプライシング部位由来の配列であることを記載。

Table 2.2. 緩衝剤と pH の検討条件

Entry	Buffer (X)	pH (Y)	Cleavage ratio <sup>a</sup> (%)
1	Tris-HCl	9	0
2	Tris-HCl	8	48.6
3	HEPES	8	73.6
4	HEPES	7	100
5	HEPES	7	93.5 <sup>b</sup>
6	HEPES	6	N.D. <sup>c</sup>
7	HEPES	5	N.D. <sup>c</sup>
8	Potassium Phosphate	7.5	31.8

<sup>a</sup>1.5 時間後の切断割合。<sup>b</sup>5 分後の切断割合。<sup>c</sup> 反応溶液中で激しく沈殿が起きたため測定不能。

Table 2.3. 基質酵素比の検討条件

Entry	Enzyme (Z) $\mu\text{M}$	Substrate (W) $\mu\text{M}$
1	5	0.5
2	10	5
3	10	10
4	10	100
5	10	200
6	15	5
7	20	50
8	30	30

Table 2.4. 切断活性測定の結果 (金属存在下)

Entry	Metal	Sequence name	Cleavage ratio (%)	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{sec}^{-1}$ )
1	-	Lopp-1	78.5	$2.71 \times 10^{-3}$
2	$\text{Mg}^{2+}$	Loop-1	74.1	$1.55 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>
3	$\text{Mn}^{2+}$	Loop-1	67.9	$1.74 \times 10^{-3}$
4	$\text{Ca}^{2+}$	Loop-1	72.1	$1.66 \times 10^{-3}$
5	$\text{Cd}^{2+}$	Loop-1	98.9	-

<sup>a</sup> 参考値。

Table 2.5. 切断活性測定の結果 (配列)

Entry	Sequence name	Sequence <sup>a</sup>	Cleavage ratio (%)	$k_{\text{obs}}$ (sec <sup>-1</sup> )
1	Loop-1	5'- <u>C</u> AGCC <u>G</u> U-3'	78.5	2.71 x10 <sup>-3</sup>
2	Loop-2	5'- <u>C</u> ACCC <u>G</u> U-3'	0	-
3	Loop-3	5'- <u>G</u> ACCC <u>C</u> U-3'	0 <sup>b</sup>	-
4	Loop-4	5'- <u>G</u> AGCC <u>C</u> U-3'	53.4	1.96 x10 <sup>-3</sup>
5	Loop-5	5'- <u>U</u> AGCC <u>A</u> U-3'	Cleaved <sup>c</sup>	-
6	Loop-6	5'- <u>A</u> AGCC <u>U</u> U-3'	61.2	2.11 x10 <sup>-3</sup>
7	Loop-7	5'- <u>G</u> C-3'	Not Cleaved <sup>c</sup>	-
8	Stemloop-1	5'-CGUAAUCC <u>A</u> GCC <u>G</u> UGAUUACG-3'	31.9	3.43 x10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 下線で示した残基はコンセンサス配列(CNGNNGN)中の保存残基の位置。

<sup>b</sup>NMR 測定後のサンプルから求めた切断割合。 <sup>c</sup> 参考値。

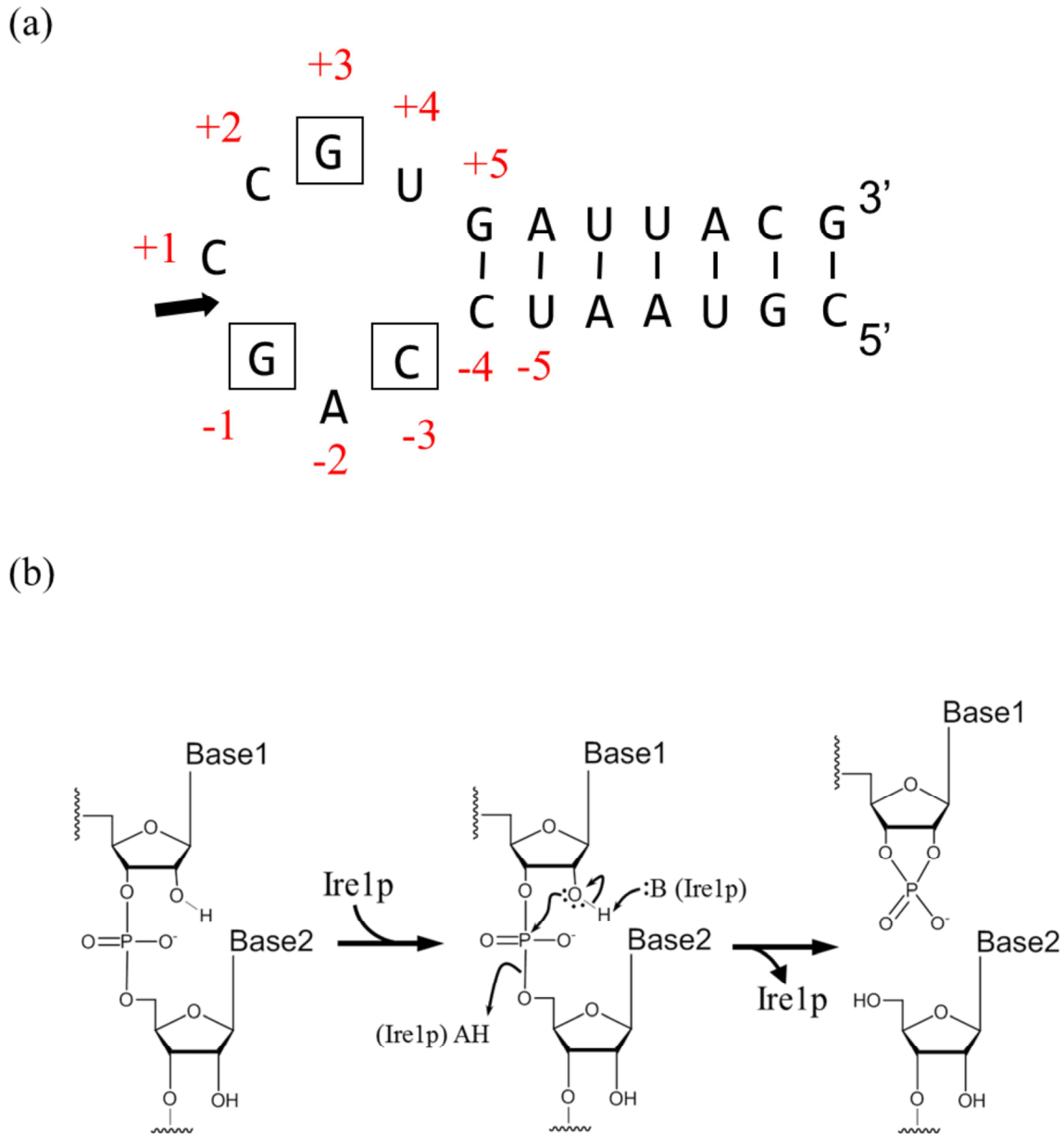


Figure 2.1. Ire1p による *HAC1* mRNA の切断配列と反応機構 : (a) *HAC1* mRNA の 5'側スプライシング部位。コンセンサス配列(5'-CNGNNGN-3')はステムループ構造のループ部分に相応する。図中の矢印は切断部位を表し、四角で囲まれた残基は保存残基を示す。切断部位直前のグアノシンを-1位とし C(-5)から G(+5)までコンセンサス配列内に番号を割り振った。(b)切断生成物から推測される *HAC1* mRNA 切断機構。B (Ire1p)は RNA 切断反応で塩基触媒として働く Ire1p 内のアミノ酸残基、(Ire1p) AH は酸として働くアミノ酸残基を示す。

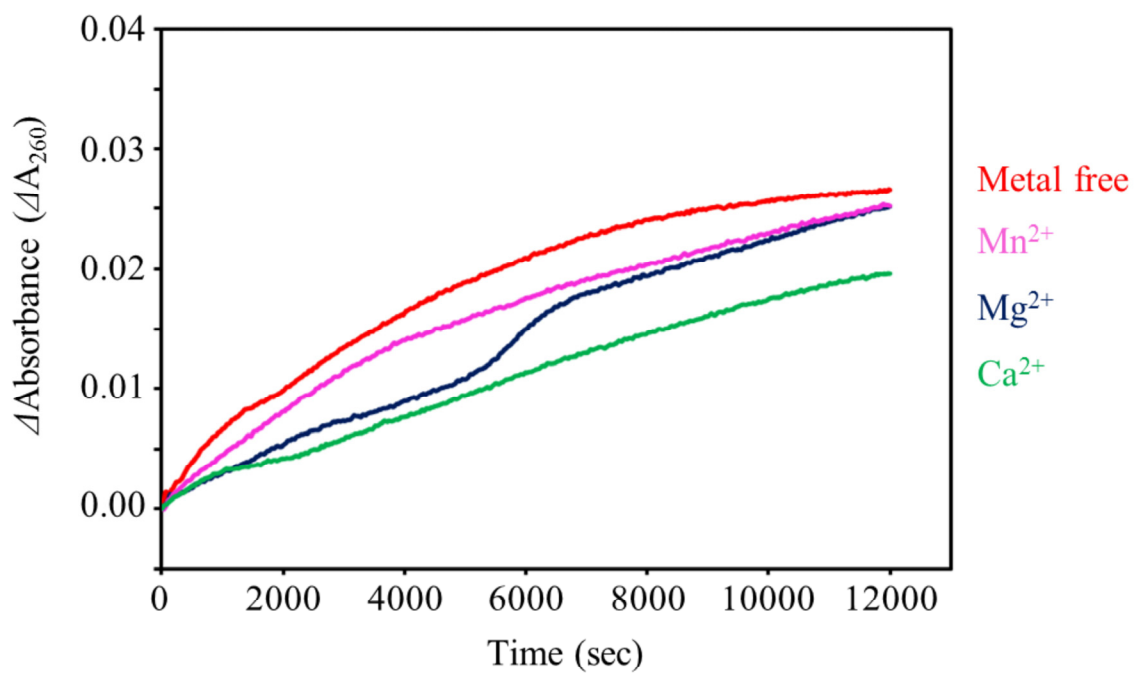


Figure 2.2. 260 nm での紫外吸光度変化( $\Delta A_{260}$ )を指標とした Ire1p 944-1115 による基質 RNA 切断反応に伴う  $\Delta A_{260}$ -時間プロファイル(二価金属イオンの影響): Metal free は二価金属イオンを含まない条件下での切断を示し、赤色でプロットをした。以下  $Mn^{2+}$  を含む条件下はピンク、 $Mg^{2+}$  は青、 $Ca^{2+}$  は緑でそれぞれプロットした。



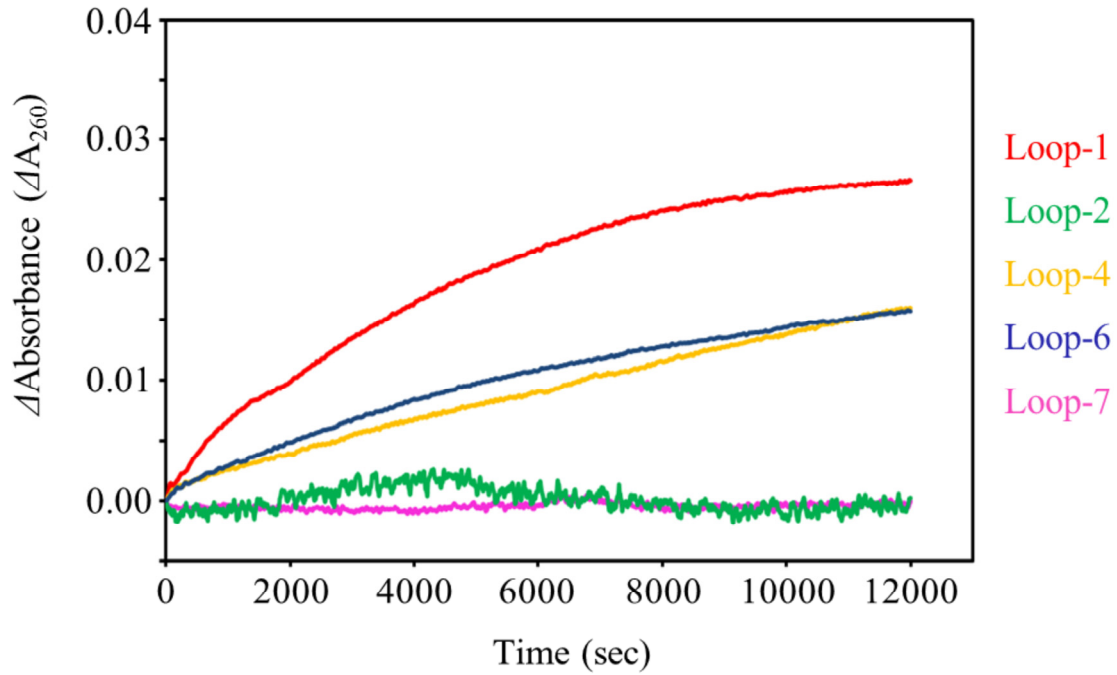


Figure 2.3. 260 nmでの紫外吸光度変化( $\Delta A_{260}$ )を指標としたIre1p 944-1115による基質RNA切断反応に伴う $\Delta A_{260}$ -時間プロファイル (塩基配列の影響) : Loop-1 (5'-CAGCCGU-3'), Loop-2 (5'-CACCCGU-3'), Loop-4 (5'-GAGCCCU-3'), Loop-6 (5'-AAGCCUU-3'), Loop-7 (5'-GC-3')の結果についてプロットをした。各配列についてのプロットの色分けは図右側に示す。

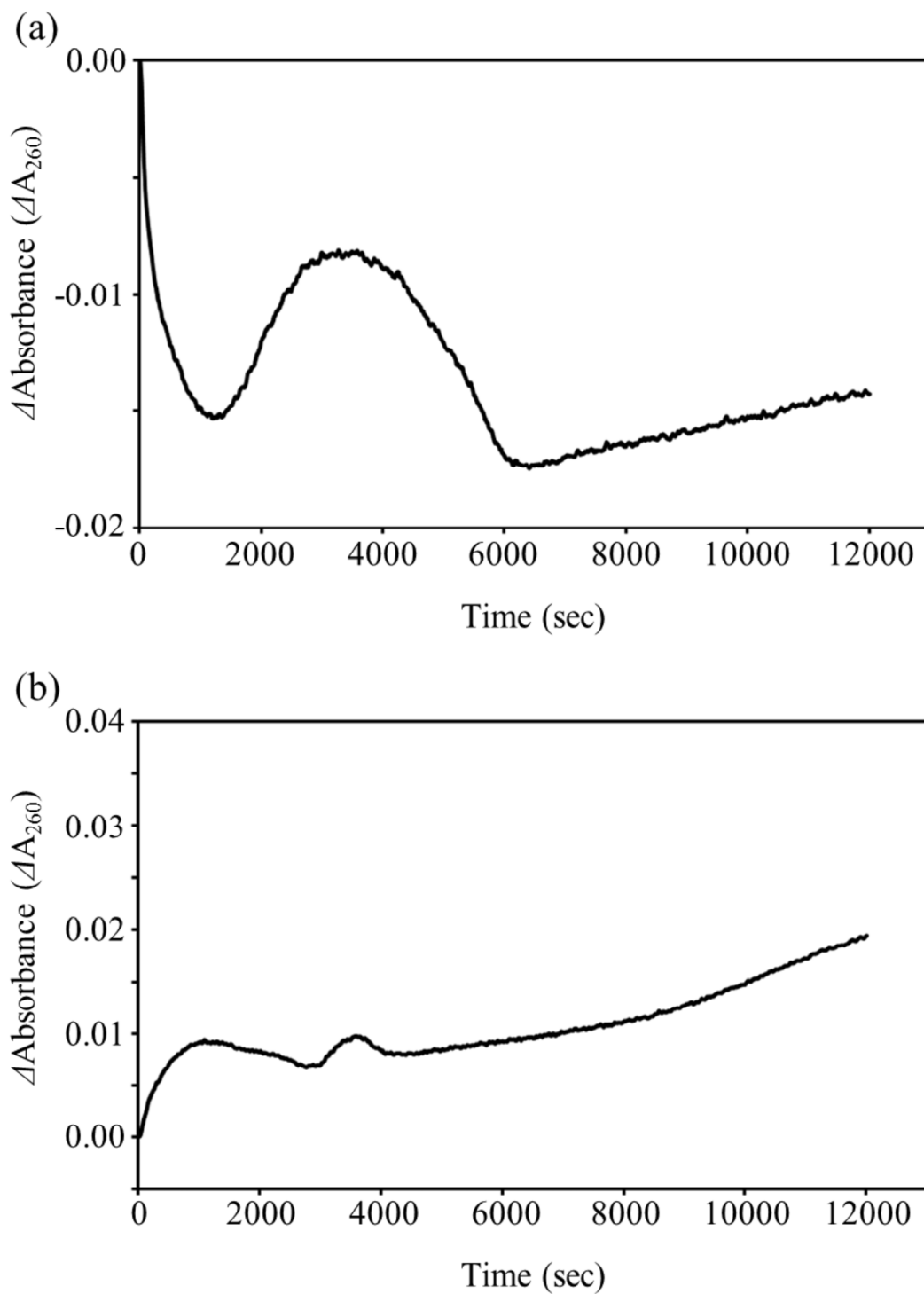


Figure 2.4. 260 nm での紫外吸光度変化( $\Delta A_{260}$ )を指標とした Ire1p 944-1115 による基質 RNA 切断反応に伴う  $\Delta A_{260}$ -時間プロファイル(Figure 2.2 や 2.3 で示されているような指数関数様の曲線が観測されなかった基質) : (a) Loop-1 を基質として  $\text{Cd}^{2+}$ を含む条件下での  $\Delta A_{260}$ 。 (b) Stemloop-1 を基質とした時の  $\Delta A_{260}$ 。

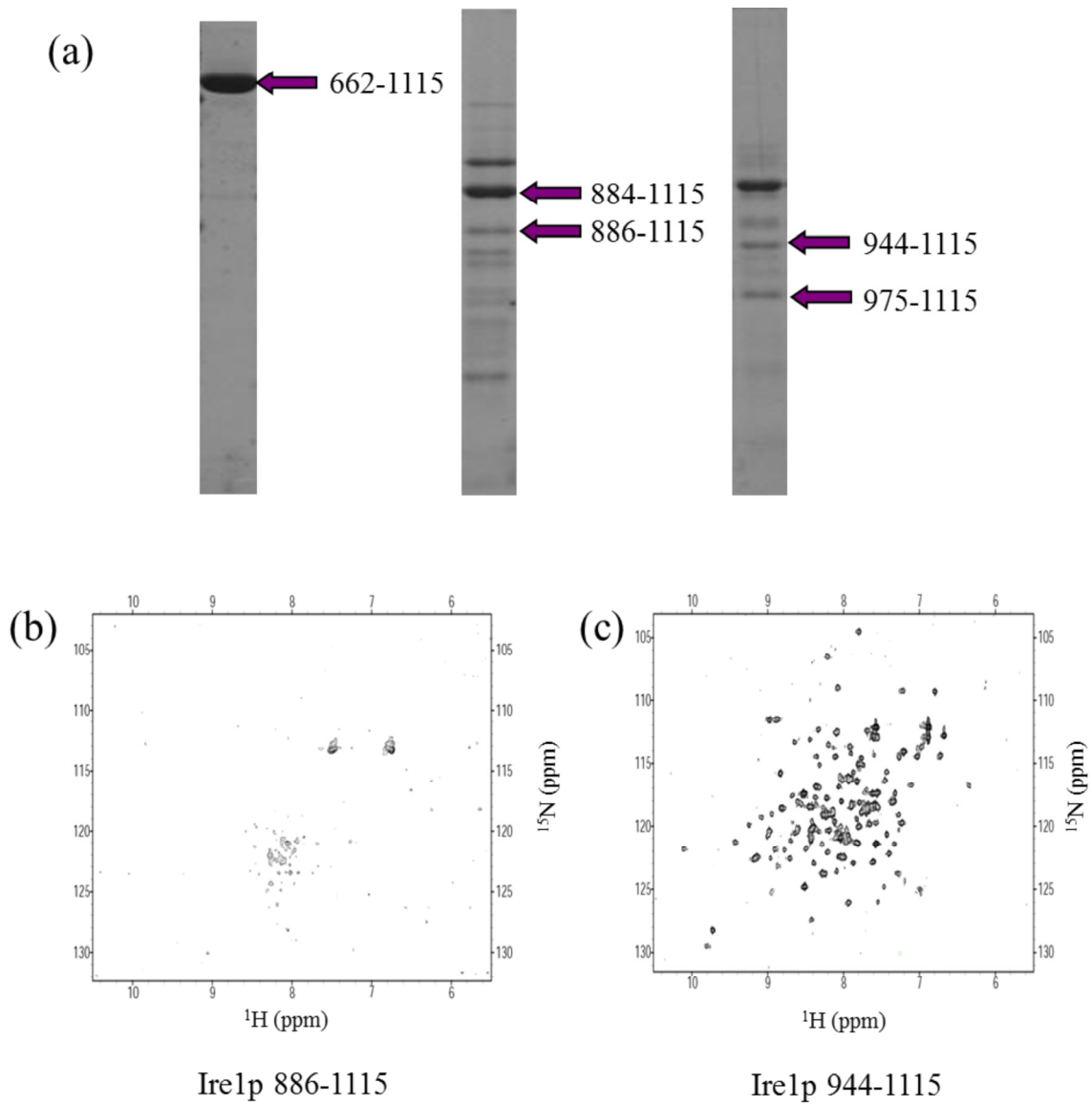


Figure 2.5. Ire1p RNase ドメインの同定 : Ire1p C 末端全長の限定分解の結果(a)、その結果に従って同定した RNase ドメイン Ire1p 886-1115 (b)と Ire1p 944-1115 (c)の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを示す。SDS-PAGE 上に見られるバンドのフラグメント長は質量分析または N 末端配列解析によって決定した。

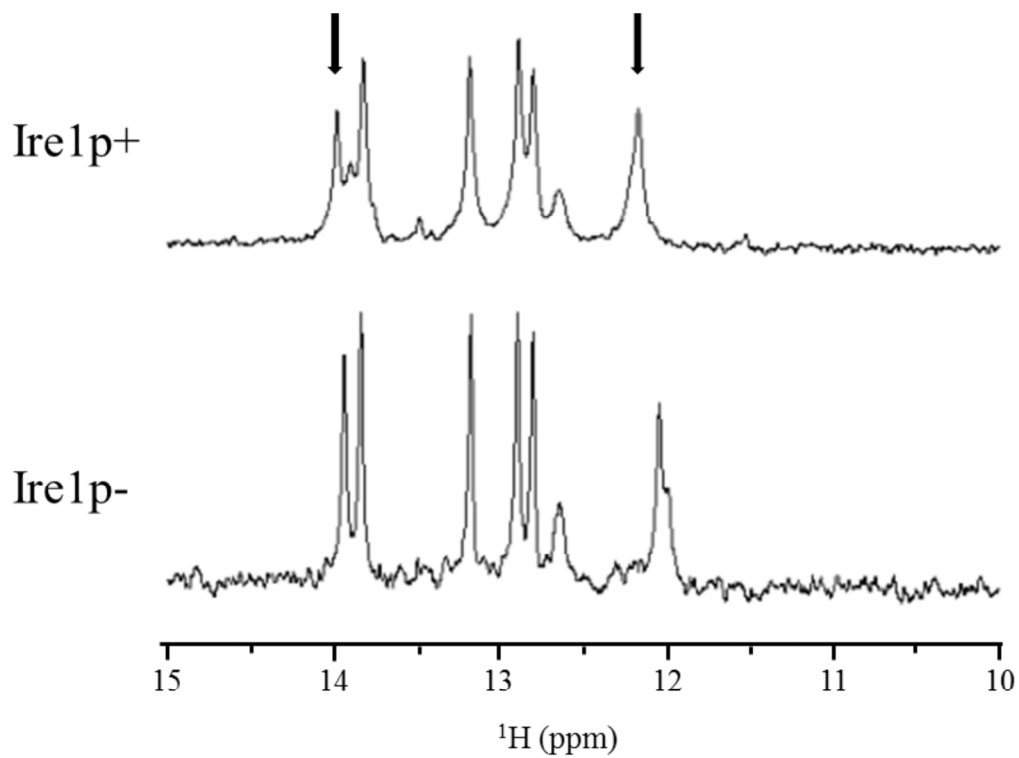


Figure 2.6. Stemloop 型基質(Stemloop-1)の 1D <sup>1</sup>H NMR スペクトル：スペクトルは 10-15 ppm のイミノプロトン観測領域のみを示す。Ire1p+は Ire1p 944-1115 存在下、Ire1p-は Ire1p 944-1115 非存在下である事を示す。矢印で示した 2 つのシグナルは Ire1p 944-1115 存在下でシグナルのシフトが確認された。

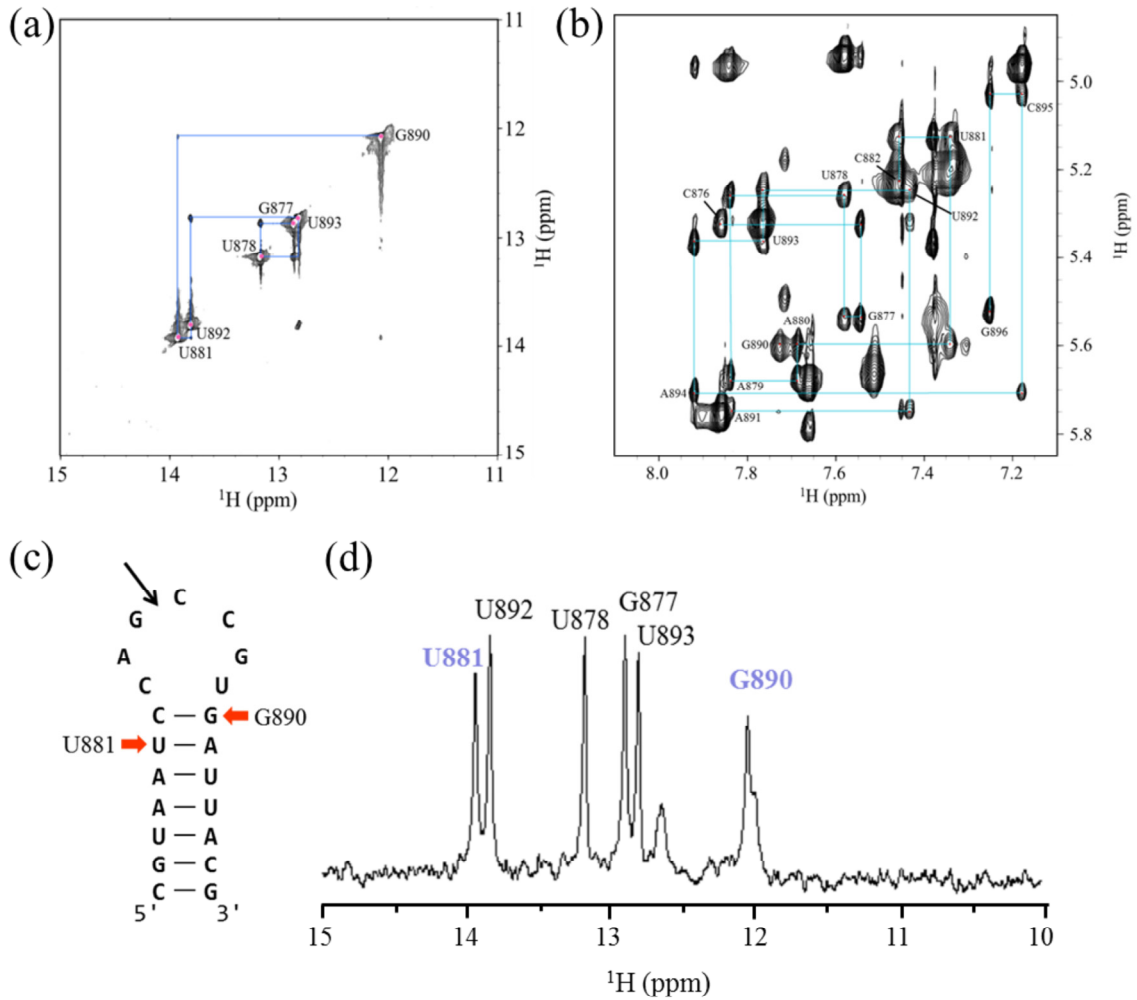


Figure 2.7. Stemloop-1 の帰属結果 : 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY スペクトル(a)イミノプロトン領域, (b)H1'H6/H8 領域を示す。青線は NOE シグナルを利用した連鎖帰属の結果を示す。帰属結果から得られた Stemloop-1 の二次構造(c)、イミノプロトンの帰属結果(d)に示す。Ire1p 944-1115 存在下でシグナルの変化が大きかった残基は青字で示す。

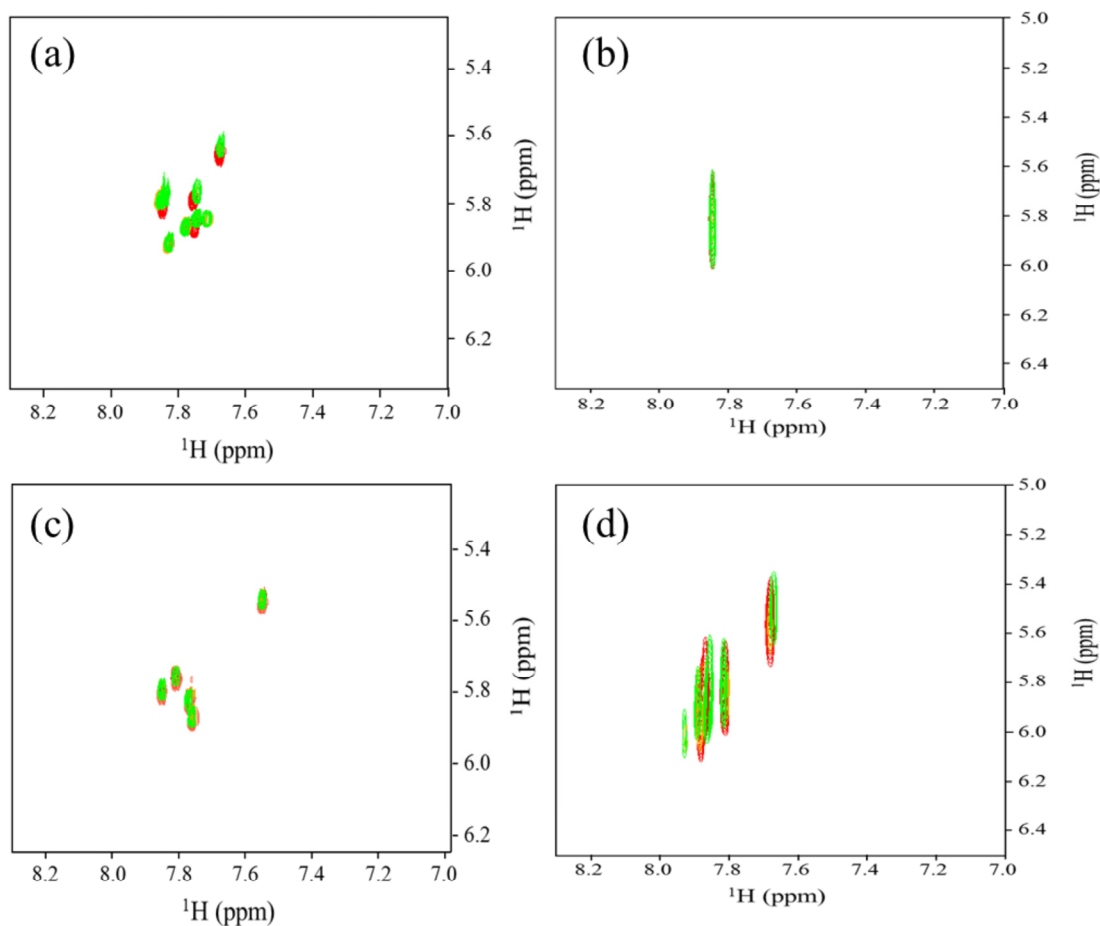


Figure 2.8. Ire1p 944-1115 存在下および非存在下のループ配列の 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトル(a) Loop-1 (*HAC1* mRNA 5' splicing site), (b) Loop-7 (5'-GC-3'), (c) Loop-2 (defective mutation at G(-1) residues of *HAC1* mRNA 5' splicing site), (d) Loop-4 (C(-3) and G(+3) residues were swapped)。Ire1p 944-1115 に対する RNA の当量によりスペクトルを色分けした。核酸のみ (赤), 1 当量 (オレンジ), 10 当量 (緑)。2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトル上でシグナルの変化が見られたスペクトル(a,d)では測定後 RNA の部位特異的な切断が見られたが、スペクトルの変化が見られなかった(b,c)では RNA 鎖の切断が見られなかった。

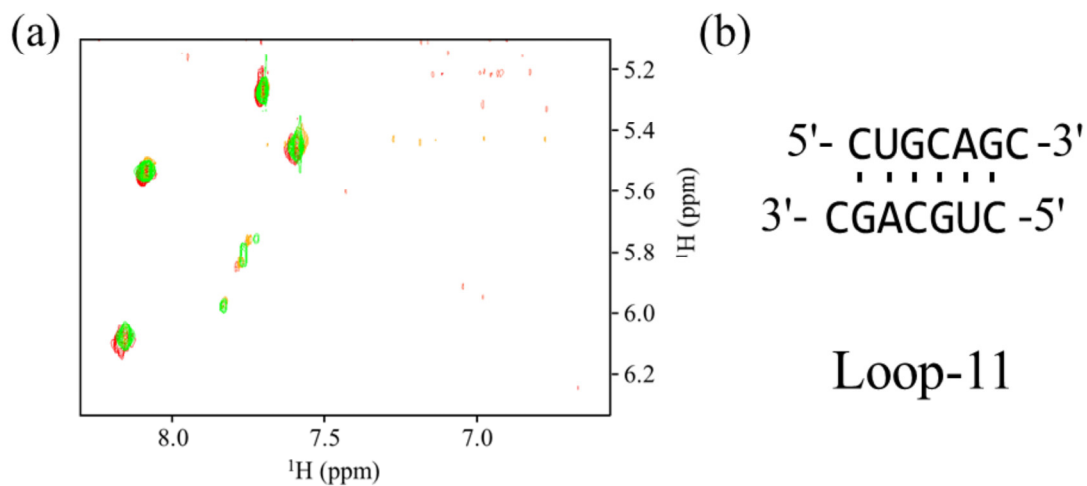


Figure 2.9. Ire1p 944-1115 存在下および非存在下の Loop-11 の 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトルと Loop-11 塩基配列：2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY スペクトル(a)、Loop-11 配列が分子間で塩基対を組んだ場合の想定図(b)。Loop-11 は *hXBPI* 3'側スプライシング部位のコンセンサス配列を持つ 7 塩基の配列である。Ire1p 944-1115 に対する RNA の当量によりスペクトルを色分けした。核酸のみ (赤), 1 当量 (オレンジ), 10 当量 (緑)。

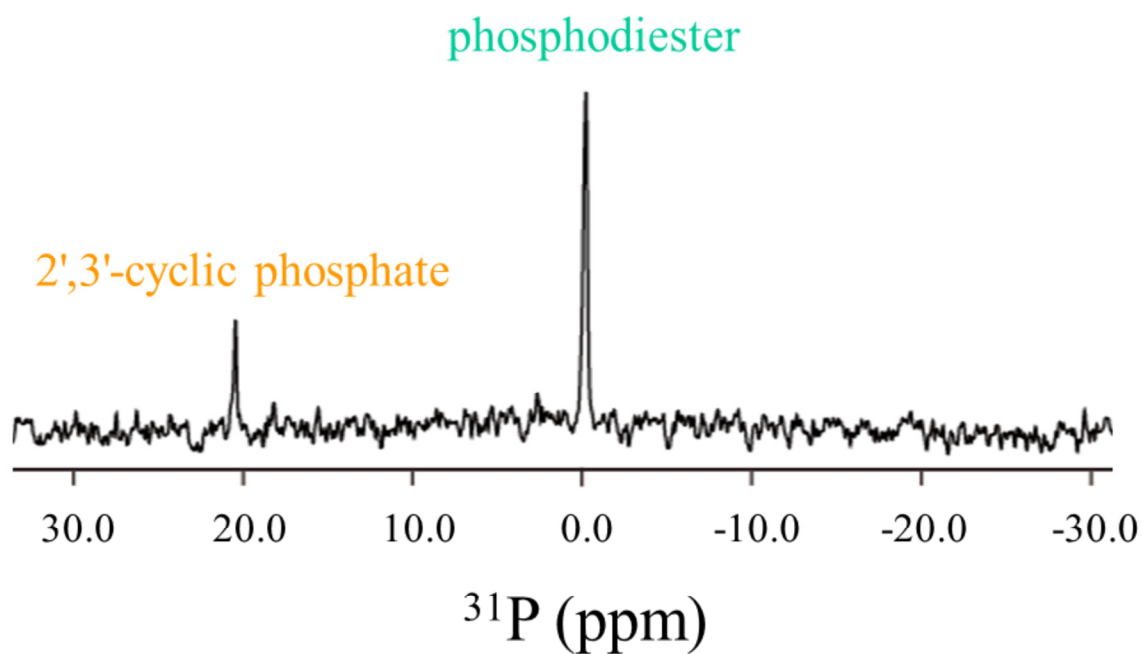


Figure 2.10. Loop-1 を Ire1p 944-1115 で切断した後の 1D  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトル: 1D  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトル上に観測された 0 ppm 付近のシグナルは RNA 分子中のホスホジエステル結合位のリン酸由来の複数シグナルの重ね合わせ。



## 3 基質 RNA の構造学的研究

### 3.1 緒言

通常 NMR を用いて RNA の構造解析を行うためには各残基をすべて  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  などの安定同位体で標識し、多核相関スペクトルからシグナルの帰属を行う (Nikonowicz E. P. and Pardi A., 1992; Batey et al., 1992)。しかしながら部分構造を決定したいケースではこの方法は不向きである。なぜならば、この方法では対象残基のシグナルの帰属を確定させるために観測された全シグナルの帰属が必須となるため、必要な情報を得るまでに膨大な時間と労力が必要となるからである。また、同一配列の RNA 分子が複数の異なる構造をとること (構造多型) がしばしばあるため、一つの残基から化学シフト値の違う複数の NMR シグナルが観測されることがある。このような場合、その化学シフト値の違いが構造多型に由来するものなのか別の残基に由来するシグナルなのか判断する事が難しく、シグナルの帰属そのものが難しくなるケースがある。特にループのように運動性が高いと推測される構造の残基ではそのような問題が生じる可能性が高い。このような問題を解決するために、対象残基のみを選択的に標識した RNA を用いて解析を行うことが行われる。この方法を用いれば多核相関スペクトル上で得られる残基のシグナルは対象残基由来のシグナルのみとなるため、不要なシグナルの帰属をする事無く確実に対象残基の構造情報を NMR スペクトルから得ることが出来るからである。

一般に RNA 分子の特定の残基に特異的に安定同位体標識を導入することは、化学合成法を用いて行われてきた (Zhang et al., 1998; Tanaka et al., 2000; Wang et al., 2004)。しかしながら化学合成には安定同位体標識されたヌクレオシドのアミダイト体 (RNA の化学合成原料) を有機合成によって調製する必要があるため、簡単に利用できる技術とは言い難い。また、鎖長が 20 塩基以上となるような長鎖 RNA 分子を合成する場合、合成反応の性質上収率が低下するため NMR 測定に必要な大量のサンプルを得ることが難しい。

この章では、化学合成法では難しい長鎖の RNA に対して部位特異的に安定同位体標識をする方法論の確立と、その方法論を利用したコンセンサス配列の構造解析について記述する。

### 3.2 作業仮説 - 新規 RNA 部位特異的安定同位体標識法 -

C(-3), G(+3)間の塩基対形成を検証するために、長鎖 RNA に対して部位特異的安定同位体標識を行う方法を開発した。今回開発した部位特異的安定同位体標識方法は、自己触媒活性を有する RNA 分子(**Ribonucleic acid enzyme: Ribozyme**)による目的鎖への標識グアノシンの付加反応と、Ligase による標識鎖と非標識鎖の連結の 2 段階からなり、鎖長に関係なく任意の場所に安定同位体標識したグアノシン残基を導入することが可能である。

Group I intron (Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982)はグアノシンをコファクターとして自己スプライシングを行う Ribozyme である(Figure 3.1)。バクテリアを初め、下等真核生物、高等植物で保存されている。本来自己配列内のイントロンのスプライシングを触媒するため、切断配列は酵素鎖のシス配列として存在している。しかしながら過去の研究から、切断部位を含む配列を基質鎖化してトランスで与えても反応が進行することが示されている(Zaug et al., 1986; Burke et al., 1986; Murphy, F. L., and Cech, T. R., 1989; Cech et al., 1990)。そこで今回、この Group I intron を目的配列中に標識グアノシンを導入する酵素として利用した。また、Group I intron の種類については古くから研究がなされており、知見の多い *Tetrahymena Thermophila* 種の配列を利用した(Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982)。Group I intron 内には基質認識配列として Internal Guide Sequence (IGS) 配列が存在し、*Tetrahymena Thermophila* 由来の Group I intron では 5'-NNNGAUCUCG-3'(N は任意の配列) という配列である。基質鎖はこの IGS 配列と相補的に結合し、4 番目のグアノシンと基質鎖 Anti-IGS 配列中のウリジンが G・U の wobble-pair を形成する。この wobble-pair を形成したウリジンの 3'側が切断部位となっており、切断後、コファクターとして加えたグアノシンが 3'側の切断フラグメントの 5'末端に付加されたものが産生する。本方法論ではこのグアノシン付加反応を利用して、任意の配列の 5'末端に <sup>15</sup>N 標識したグアノシンを付加し、その後残りの非標識鎖を Ligase を用いて連結させる事で一残基のみ <sup>15</sup>N 標識された RNA サンプルを調製する。なお、本来のスプライシング反応ではこの付加反応に引き続いて、エキソン間の連結反応が自己触媒的に起こるが、本方法では一段階目の付加反応で反応を終結させるため、連結反応を触媒する領域の配列を除去した Group I intron を使用した。標識体調製方法の概要は Figure 3.2a,b に示す。

安定同位体を導入する対象として、*HAC1* mRNA, *hXBPI* mRNA の G(+3) 位 (*HAC1*; G888, *hXBPI*; G544) のほかに *Schistosoma mansoni* 由来の hammerhead ribozyme (HHRz) (Martick, M., and Scott, W. G., 2006)の金属結合残基 G10.1 を選んだ(Figure 3.2c)。これは本方法論を開発するうえで、最

最終的に NMR スペクトルから、目的の位置に正しく標識残基が導入されたのか判断する必要があるが、*HAC1* 並びに *hXBPI* については NMR を用いて解析された例が本研究以外に存在せず、得られている NMR スペクトルデータ (各残基の  $^1\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}$  の化学シフト値など) の情報が非常に少ない。そのため最終サンプルの NMR スペクトルを測定しても目的の位置に正しく導入されているのか判断が難しくなる可能性があった。そこでこの判断を正しく行うために、すでに各残基について多くの NMR スペクトルデータが得られている HHRz をテストサンプルとした。HHRz は 43 塩基からなり、3 つのステムと高度に保存された 15 塩基からなる活性コアをもつ (Figure 3.2c)。そのうち G10.1 残基は金属結合残基とされ (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995; Tanaka et al., 2002)、今回この金属結合残基 G10.1 部位に  $^{15}\text{N}$  標識グアノシンを導入することとした。

### 3.3 材料と方法

#### 3.3.1 モデル配列を用いた *HAC1* mRNA ループ内塩基対の同定

野生型の基質 RNA を用いてループ配列の構造解析を行う事に先立って、保存配列内の C(-3)と G(+3)が塩基対を形成しているかどうか以下の通りモデル配列を作成し NMR を用いて検証を行った。配列中のグアノシン残基は 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 上で G(+3)由来のイミノプロトンと同定するために  $^{15}\text{N}$  標識を行った。

5'-(G)UUAAUAAUUAUCAGCCGUAUAUAUUAUUA-3' (Stemloop-2)

5'-(G)UUAAUAAUAUACCAGCCGUGUAUAUAUUAUUA-3' (Stemloop-3)

(G)は転写開始点。

Stemloop-2 は二次構造予測上で 11 A-U 塩基対のステムと Loop-1 に相当するループ (下線で示した配列) からなるステムループ構造をとる (Figure 3.4)。また、Stemloop-3 は Stemloop-2 のループ直下のステム領域 A-U 塩基対を *HAC1* mRNA の配列と同じ G-C 塩基対に変更したものである。核酸の調製は以下の DNA をテンプレートとし、T7 RNA polymerase を用いた *in vitro* 転写反応により調製した。

Top strand (Stemloop-2 and Stemloop-3): 5'-TAATACGACTCACTATAG-3'

Bottom strand (Stemloop-2):

5'-TTAATAATATATACGGCTGATATATTATTA ACTATAGTGAGTCGTATTA-3'

Bottom strand (Stemloop-3):

5'-TTAATAATATACACGGCTGGTATATTATTA ACTATAGTGAGTCGTATTA-3'

転写のテンプレートを調製するために、STE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)に終濃度 10 pM となるように Top strand,

Bottom strand を混合した。混合した溶液は 90 °C, 5 分加熱し 10 分室温に放置しアニーリングを行った。転写には AmpliScribe™ T7 Flush Transcription kits を使用し、37 °C, 6 時間反応を行った。なお、配列内のグアノシン残基を <sup>15</sup>N 標識するために転写に用いる guanosine 5'-triphosphate (GTP)は <sup>15</sup>N 標識体を使用した。また、転写後の RNA 産物は 5'末端に転写開始点であるグアノシンが1残基付加された状態で産出される (塩基配列中(G)と表記した)。反応後の溶液からポリメラーゼを除去するためにフェノール/クロロフォルム処理を行い、エタノール沈殿によって核酸を回収した。回収した核酸は変性 PAGE (8 M urea, 15% Acrylamide/Bis (19:1))により単離し、EluTrap (GE healthcare)を用いてゲル片から核酸の回収を行った。精製した核酸の脱塩にはゲル濾過カラム(TSK-GEL G3000PW)を用いた。

Stemloop-2, Stemloop-3 の NMR スペクトルを測定するために以下の通り精製された核酸を調製した。Stemloop-2; 141 pM RNA, 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 50 mM NaCl, Stemloop-3; 96.7 pM RNA, 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 50 mM NaCl。核酸のアニーリングのため、65 °C, 5 分加熱し、氷上で急冷して測定に使用した。NMR の測定には Bruker Avance-I 800 spectrometer を用い、1D <sup>1</sup>H NMR, 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定した。

### 3.3.2 RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発 (配列のデザインと合成)

Group I intron と Ligase を用いて部位特異的標識をした RNA を調製するためには3種類の RNA と1種類の DNA オリゴマーを合成する必要がある。HHRz を例に標識体調製に必要なオリゴマーを Figure 3.3 に示した。個々のサンプルにおいて調製した RNA 鎖と、DNA bridg の配列については Table 3.1 に示した。DNA bridge は invitrogen 社もしくはつくばオリゴサービス株式会社から購入した。HHRz の標識体調製用の 3' fragment precursor と 5' fragment は 2.2.4 の方法を用いて化学合成にて調製した。また、Group I intron を含む他の RNA 配列は以下の方法で調整した。

Group I intron:

<sup>15</sup>N 標識されたグアノシンを導入するための Group I intron は script MAX™ Thermo T7 Transcription kit (TOYOBO)を用いて *in vitro* 転写反応によって合成した。そのためのテンプレートは、配列ごとに以下のプライマーを用いて、野生型の *Tetrahymena* Group I intron が構築されたプラスミド pTZIVSU (Williamson et al., 1989; Williams et al., 1992)から PCR を用いて調製した。

Forward primer (HHRz):

5'-GAAGAGGCGTAATACGACTCACTATAGGGATCGGAGATCTCAAAAGT  
TATCAGGCATGCACCTGGTAGC-3'

Forward primer (*HAC1* mRNA):

5'-GAAGAGGGCGTAATACGACTCACTATAGGGGATCTCAGATCTCGAAAAGTT  
ATCAGGCATGCACCTGGTAGC-3'

Forward primer (*hXBPI* mRNA):

5'-GAAGAGGGCGTAATACGACTCACTATAGGGTGGATCTCAAAAAGTTATCA  
GGCATGCACCTGGTAGC-3'

Reverse primer (共通):

5'-GTACTCCAAAATAATCAATATACTTTTCGCATACAAATTAG-3'

転写後の RNA はフェノール/クロロホルム処理をしタンパク質成分を除去した。また、溶液中の未反応の rNTP とピロリン酸を除去するために透析を行った。

3' fragment precursor と 5' fragment :

Ampliscrib T7 Fulash RNA Transcription kit (EPICENTRE)を用いて *in vitro* 転写反応によって合成した。配列ごとの調製方法は以下に示す。

3' fragment precursor (*HACI* mRNA) :

転写に用いたテンプレートは以下の DNA をアニーリングして使用した。

Top strand:

5'-GCGTAATACGACTCACTATAG-3'

Bottom strand:

5'-mCmGTAATCAAATCTCGCCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGC-3'

(mN = 2'OMe (2'OCH<sub>3</sub>)修飾残基。ただし、N = A, U, G, C)

アニーリングの方法は 3.2.1、精製方法は 2.2.4 に記載した陰イオン交換カラムを用いた方法採用した。

3' fragment precursor (*hXBPI* mRNA) :

転写に用いたテンプレートは、以下のプライマーを用いて野生型の *hXBPI* を構築したプラスミド pColdGST-PSPXBP1u から PCR を用いて調製した。

Forward primer (3' fragment precursor):

5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACGAGATTCACTCAGACTACGTG  
CACCTCTGCAGC-3'

Reverse primer (5' fragment):

5'-TGACAACCTGGGCCTGCACCTGCTGC-3'

転写した RNA は 3.2.1 に記載した変性 PAGE 法を用いて精製した。

5' fragment (*hXBPI* mRNA) :

転写に用いたテンプレートは以下の DNA をアニーリングして使用した。

Top strand:

5'-GCGTAATACGACTCACTATAGCCAGTGGCCGGGTCTGCTGAGTCCGCA-  
3'

Bottom strand:

5'-TGCGGACTCAGCAGACCCGGCCACTGGCTATAGTGAGTCGTATTACGC-

3'

アニーリングの方法は 3.2.1、転写した RNA は 3.2.1 に記載した変性 PAGE 法を用いて精製した。

### 3.3.3 RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発 (グアノシン導入反応と連結反応の最適化; HHRz)

効率よく  $^{15}\text{N}$  標識されたグアノシンを導入するために反応の最適化を行った。検討した項目は  $\text{Mg}^{2+}$ 濃度、酵素(Group I intron)濃度、反応温度、guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP)量、反応スケールの 5 項目とした。それぞれの反応は以下の方法で行った。リフォールディングを行うため、反応溶液中(30 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (3-30 mM))で反応前に Group I intron (0-25  $\mu\text{M}$ )を 80 °C に熱したあと、反応温度(48-68 °C)まで徐冷を行った。リフォールディング後の Group I intron に 50  $\mu\text{M}$  3' fragment precursor, と 5'-GMP (0.05-2 mM)を加え、所定の温度で反応させた。それぞれの具体的な濃度、温度などは Figure 3.5, 3.6 に記載した。反応スケールの検討以外の項目はすべて 12  $\mu\text{L}$  のスケールで反応を行った。また、反応の効率は 8 M 尿素を含む変性 PAGE にて確認をした。また、T4 DNA Ligase を用いたグアノシン付加後の 3' fragment と 5' fragment の連結反応であるが、核酸成分の濃度比は Xu らの方法 1:2:1.5 (3' fragment: 5' fragment: DNA bridge)に従い(Xu et al., 1996)、反応スケールと反応時間の検討のみを行った。それぞれの具体的な濃度、温度などは Figure 3.7 に記載した。

### 3.3.4 RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発 (NMR サンプルの調製)

配列ごとに 3.3.3 で示した反応条件の最適化を行い、最終条件を決定した。決定された反応条件を元に、NMR スペクトルを測定するため以下の方法で HHRz、*hXBP1* mRNA (516-591)の一残基標識体を調製した。

HHRz:

3 mL の反応溶液 (30 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3 mM  $\text{MgCl}_2$ )中で 14  $\mu\text{M}$  の Group I intron のリフォールディングを行った。リフォールディング後、50  $\mu\text{M}$  3' fragment precursor, 2 mM uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled 5'-GMP を加え、反応温度 58 °C、4 時間反応を行った。反応後のサンプルは変性条件下での陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行い、エタノール沈殿を用いて核酸を回収した。回収後の核酸は TE buffer に再溶解をした。

$^{15}\text{N}$  標識グアノシンが付加された 3' fragment と 5' fragment の連結は T4 DNA Ligase を用いて以下の方法で行った(Xu et al., 1996)。Ligase 以外を含む 2.5 mL の反応溶液(100  $\mu\text{M}$  5' fragment, 50  $\mu\text{M}$  3' fragment, 75  $\mu\text{M}$  DNA

bridge, 40 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM 5'-ATP) を 90 °C に加熱し 37 °C まで徐冷する事でオリゴマーのアニーリングを行った。2.5 mL あたり 850 units T4 DNA Ligase を加え、37 °C、12 時間反応を行った。反応後、DNase I を用いて DNA bridge を分解した後、変性条件下での陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。サンプルの脱塩にはゲル濾過カラムを使用した。

*hXBPI* mRNA (516-591):

1 mL の反応溶液 (30 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) 中で 2.8 μM の Group I intron のリフォールディングを行った。リフォールディング後、50 μM 3' fragment precursor, 2 mM uniformly <sup>15</sup>N-labeled 5'-GMP を加え、反応温度 58 °C、3 時間反応を行った。反応後、エタノール沈殿を用いて核酸を回収した。回収後の核酸は TE buffer に再溶解をした。

<sup>15</sup>N 標識グアノシンが付加された 3' fragment と 5' fragment の連結は T4 DNA Ligase を用いて以下の方法で行った。Ligase 以外を含む 3 mL の反応溶液(52 μM 5' fragment, 50 μM 3' fragment, 75 μM DNA bridge, 40 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM 5'-ATP)を 90 °C に加熱し 37 °C まで徐冷する事でオリゴマーのアニーリングを行った。3 mL あたり 1500 units T4 DNA Ligase を加え、37 °C、16 時間反応を行った。反応後、DNase I を用いて DNA bridge を分解した後、3.2.1 に記載した変性 PAGE 法を用いて精製した。サンプルの脱塩にはゲル濾過カラムを使用した。

### 3.3.5 部位特異的安定同位体標識 RNA 分子の NMR 測定

NMR 測定サンプルは以下の通り調製した。

HHRz: 0.5 mM HHRz, 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 50 mM NaCl in 5 ( <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 95% <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O

*hXBPI* mRNA (516-591): 0.2 mM *hXBPI* mRNA, 10 mM sodium phosphate (pH 7.0), 50 mM NaCl, in 10 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 90% <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O

測定には DRX800 NMR spectrometer、Bruker Avance-I 800 spectrometer, を使用し、1D <sup>1</sup>H NMR, 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定した。また比較のため、それぞれの配列について同一配列の非標識サンプルも同時に測定を行った。

## 3.4 結果

### 3.4.1 モデル配列を用いた *HAC1* mRNA ループ内塩基対の同定

前章で行った 3 つの C(-3), G(+3)への二塩基置換配列(Loop-4, 5, 6)の切断

活性測定の結果から、コンセンサス配列内の保存された C(-3)と G(+3)間で塩基対形成がなされている事が示唆された。この事について詳細に解析するためにコンセンサス配列についての構造解析を行った。野生型の基質 RNA を用いてループ配列の構造解析を行う事に先立って、保存配列内の C(-3)と G(+3)が塩基対を形成しているかどうか以下の通りモデル配列を作成し NMR を用いて検証を行った。

5'-(G)UUAAUAAUUAUCAGCCGUAUAUAUUAUUAAA-3' (Stemloop-2)

5'-(G)UUAAUAAUUAACCAGCCGUGUAUAUAUUAUUAAA-3' (Stemloop-3)

(G)は転写開始点のグアノシン残基。

Stemloop-2 は二次構造予測上で 11 A-U 塩基対のステムと Loop-1 に相当するループ (下線で示した配列) からなるステムループ構造をとる(Figure 3.4)。また、Stemloop-3 は Stemloop-2 のループ直下のステム領域 A-U 塩基対を *HAC1* mRNA の配列と同じ G-C 塩基対に変更したものである。2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上でグアノシン由来のイミノプロトンを同定するために、配列中のグアノシン残基のみを  $^{15}\text{N}$  標識した。また、このモデル配列はステムを A-U 塩基対とすることで配列中のグアノシン残基数を少なくしシグナルの簡素化を図った。

Stemloop-2, Stemloop-3 の NMR スペクトルと二次構造を Figure 3.4 に示した。2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上で Stemloop-2 では 11.8 ppm 付近に一つ、Stemloop-3 では 12.1 ppm と 12.8 ppm 付近に 2 つのイミノプロトンと N1 の交差ピークを観測した。また、それぞれのイミノプロトンの化学シフト値は、ワトソン-クリック型 G-C 塩基対の観測領域内であった。観測したシグナルのうち、Stemloop-3 で観測された 12.8ppm 付近の低磁場側のシグナルは Stemloop-2 では観測されず、ループ配列に隣接する G-C 塩基対のイミノプロトンと考えられる。一方、12.1 ppm の高磁場側のシグナルは Stemloop-2 のシグナル(11.8 ppm)と比較的的化学シフト値に近い位置に観測され、かつ、化学シフト値から G-C 塩基対に由来すると考えられるため、ループ内の G(+3)のイミノプロトンであることが強く示唆された。また、温度を変化させて測定した 1D  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの結果から、このイミノプロトンシグナルは 37 °C でも観測可能であった。

以上の事から、Stemloop-2 と Stemloop-3 で共通に塩基対形成が可能なグアノシン残基は G(+3)以外には考えられず、コンセンサス配列中の C(-3), G(+3)間で塩基対形成が行われている可能性が極めて高くなった。

### 3.4.2 RNA 部位特異的安定同位体標識法の開発

3.4.1 で示した通り、*in vitro* 転写反応によってサンプルを調整する方法ではすべてのグアノシン残基が  $^{15}\text{N}$  標識をされるため、G(+3)由来のイミノ



プロトンシグナルを帰属するために人工的な配列を設計しなければならない。しかしながら G(+3)のみを  $^{15}\text{N}$  標識したステムループ配列を調製できれば、天然の配列のイミノプロトンシグナルの帰属を確定する事が出来る。そこで、このような部位特異的標識 RNA 分子の調製を目指して、RNA 分子の部位特異的安定同位体標識法を開発した。HHRz の配列を用いて標識グアノシン付加反応の最適化を行った結果を Figure 3.5, 3.6 に示す。Figure 3.5a より  $\text{Mg}^{2+}$ 濃度と酵素基質比は 3 mM  $\text{Mg}^{2+}$ 、Group I intron と基質 3' fragment precursor 量比 1:10 が最も反応が良く進行した。NMR サンプル調製の際のさらなる検討結果より、最終的な反応条件を 14  $\mu\text{M}$  Group I intron 50  $\mu\text{M}$  3' fragment precursor (約 1:4)とした。5'-GMP 濃度の検討の結果 (Figure 3.5b)、2 mM の濃度で反応が最もよく進行した。反応温度を検討した結果 (Figure 3.6a)、変性 PAGE 上で反応産物の量が最も多いと思われる 58  $^{\circ}\text{C}$  を NMR サンプル調製では採用した。また、反応溶液のスケールについては 3 mL までの検討しか行っていないが、スケール依存的な反応効率の低下などは観察されなかった事より (Figure 3.6b)、3 mL より大きなスケールでの付加反応も可能であると考えられた。

最終的な NMR サンプル調製条件は 3.3.4 に示した通りである。HHRz と *hXBPI* mRNA で決定された条件を見るとどちらもほぼ同じ反応条件下で最も反応が進行しており、本方法論においてサンプルの違いによる反応条件の大幅な変更は必要ないと考えられた。しかしながら *HCAI* mRNA をサンプルとしたとき、様々な条件検討をしたものの、グアノシン導入反応は効率よく進行しなかった。これについての考察は 3.5.1 に示す。

T4 DNA Ligase を用いたグアノシン付加後の 3' fragment と 5' fragment の連結反応において、核酸成分の濃度比は Xu らの方法 1:2:1.5 (3' fragment: 5' fragment: DNA bridge)に従い (Xu et al., 1996)、反応スケールと反応時間の検討のみ行った (Figure 3.7)。また、HHRz の NMR サンプル調製では付加反応後の 3' fragment をイオン交換カラムにて単離して連結反応を行ったが、*hXBPI* では未精製のまま連結反応を行った。その結果、連結反応効率の顕著な違いは両者で確認されなかったため、Group I intron などのグアノシン付加反応で用いた核酸分子は連結反応を阻害しないことが分かった。

NMR サンプルを調製した際のゲル写真を Figure 3.8 に示す。最終精製後の収率は HHRz で 34%、*hXBPI* mRNA で 19%となった。

HHRz の NMR スペクトルの測定結果を Figure 3.9 に示す。Figure 3.2c の HHRz の二次構造から G10.1 残基はシトシンと G-C 塩基対を形成するため、イミノプロトンを指標としたシグナルの解析が可能である。標識体と非標識体の 1D  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの比較から、本方法論で調製したサンプルは配列上全く同一のサンプルであることが示された (Figure 3.9, a and b)。2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルから、1 残基のグアノシンのみ  $^{15}\text{N}$  標識したサン

プルにおいて、イミノプロトンと窒素の相関ピークが1つだけ観測された (Figure 3.9, c and d)。また、このシグナルの  $^{15}\text{N}$ 、 $^1\text{H}$  化学シフト値は、過去の HHRz G10.1 残基についての研究で示された化学シフト値 (Orita et al., 1996; Tanaka et al., 2002) と良い一致を示しており、G10.1 残基のみに正しく  $^{15}\text{N}$  標識されたグアノシンが導入されている事が確認された。

### 3.4.3 野生型配列を用いた *hXBPI* mRNA ループ内塩基対の同定

開発した部位得的安定同位体標識法を用いて調製した G(+3) 残基  $^{15}\text{N}$  標識 *hXBPI* mRNA (516-591) の NMR スペクトルを Figure 3.10 に示す。この配列は 5'側、3'側両方のスプライシング部位を含み、 $^{15}\text{N}$  標識は 5'側の G(+3) 位 (G544) のみに導入している。2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルから、イミノプロトンと N1 の相関ピークを1つ観測した。この事から 3.3.1 で示した *HACI* mRNA のモデル配列内だけではなく、天然の配列内に存在するコンセンサス配列中でも保存された G(+3) 由来の G-C 塩基対形成が示された。

## 3.5 考察

### 3.5.1 RNA 部位特異的安定同位体標識法の確立

条件の最適化を行った結果、長鎖 RNA の任意の位置に効率よく安定同位体標識をしたグアノシンを導入する方法を確立した。しかしながら作製を行った3サンプルのうち、*HACI* mRNA のヘアピン (Stemloop-1) についてはグアノシン付加反応の効率が非常に低かったため、標識体を得ることが出来なかった。本方法論は *hXBPI*, HHRz 両方で一残基標識体を得ることが出来たため、配列に対する依存性は本来存在しない。しかしながら、Group I intron による基質鎖の認識は IGS, Anti-IGS 間の塩基対形成によって行われるため、IGS または Anti-IGS と分子内で塩基対形成を組むような高次構造とる場合、反応の阻害が起こることが他のサンプルを対象とした実験から確認されている (Figure 3.11)。 *HACI* mRNA の場合、二次構造予測上でそのような塩基対形成は予測されなかったが、Anti-IGS のすぐ近傍に比較的安定なテトラループをもつヘアピン構造の存在が予測された。おそらくこのヘアピン構造が立体障害となり、正常な IGS, Anti-IGS 間の塩基対形成を妨げたため、反応が効率よく進行しなかったと考えられた。

### 3.5.2 Ire1p 基質 RNA における構造モチーフの存在と意義

*HAC1* mRNA のスプライシング部位を模倣したモデル配列と一残基標識をした *hXBPI* mRNA スプライシング部位の NMR スペクトルからコンセンサス配列内の保存残基 G(+3)は G-C 塩基対を形成していることが明らかとなった。観測に用いた配列はコンセンサス配列の両側に自己相補的な配列を持ち、コンセンサス配列をループとしたステムループ構造を安定にとり得る事から、観測された塩基対はループ内の保存された C(-3), G(+3)間で形成されたものである可能性が高い。このことから C(-3)および G(+3)の残基間で塩基対形成したループ構造が mRNA 上に存在し、Ire1p によって G(-1)とこの構造が認識される様式が考えられた。

また、2章で述べたとおり、*HAC1*, *XBPI* のスプライシング部位にはコンセンサス配列をループとしたステムループ構造が種を超えて保存されている。しかしながら切断実験から、このステム領域の有無で切断効率は変化せず、切断反応に必須の最少単位はループ配列 (コンセンサス配列) のみという結果が得られた。このことから Ire1p が直接ステム領域を認識する必要はないと考えられた。加えて Loop-11 を用いた Ire1p 944-1115 との相互作用解析から、コンセンサス配列が二重鎖構造をとる場合、Ire1p による切断が抑制されるという結果が得られた。これらのことから Ire1p が認識可能な構造は一本鎖状態のコンセンサス配列であるという事が示された。以上の実験結果から、このコンセンサス配列をループとしたステムループ構造が保存されている理由として、コンセンサス配列の 7 塩基を一本鎖の状態に Ire1p に提示するために必要であるためと考えられた。

以上より、*HAC1* および *hXBPI* mRNA スプライシング部位には Figure 3.12 で示す様な C(-3)、G(+3)塩基対によるテトラループが存在し、このテトラループ上の 2 塩基目に G(-1)が提示されたもののみが Ire1p/IRE1 の基質として認識されていると考えられた。実際 *HAC1* mRNA 上に見られた 10 カ所の 5'-CNGNNGN-3'配列のうち、そのような構造をとる配列は本来のスプライシング部位のみであった (Figures 3.13, 3.14)。また、特にテトラループ上の G(-1)の位置は、Ire1p/IRE1 が基質を認識する上で重要な意味を持つと考えられる。なぜならば、Figure 3.14c,d,e で示されるように、スプライシング部位以外の CNGNNGN 配列でもループ内残基が塩基対を形成し、テトラループを形成し得る配列が存在した。しかしながらこれらの配列では G(-1)の位置はテトラループの 2 塩基目ではなかった。加えて 2章での切断実験から G(-1)は基質認識または切断反応に必須であるという結果が得られている。これらのことから、このグアノシン残基がテトラループの 2 番目、切断部位の直前に存在しなければ Ire1p/IRE1 が認識出来ないと考えられ、コンセンサス配列が形成する固有のテトラループ構造を認識していること

が推測される。さらに、現在報告がなされている IRE1 $\alpha$  において切断可能な *XBPI* mRNA 以外の基質(Oikawa et al., 2010)についても、切断部位におけるテトラループ構造を確認した結果、*HAC1/hXBPI* mRNA のスプライシング部位同様の構造が確認された(Figure 3.15)。このことから二残基目にグアノシン残基を持つテトラループ構造が Ire1p/IRE1 の基質認識に重要であると考えられる。

また細胞内において、一本鎖のコンセンサス配列であれば Ire1p/IRE1 は本来の基質である *HAC1* mRNA だけでなく他の mRNA 上に存在する CNGNNGN 配列も切断可能である。しかしながら出芽酵母において現在知られている Ire1p の基質は *HAC1* mRNA のみである。この理由の一つとして、本研究で示した Ire1p の基質配列条件を満たすためには CNGNNGN 配列がすべてループとなったステムループ構造または一本鎖である事が必要であるため、周辺配列の影響を強く受ける事が挙げられる。前述の通り、*HAC1/hXBPI* mRNA 上に見られた CNGNNGN 配列では本来のスプライシング部位以外でその要件を満たす配列は存在せず、同様の事が他の mRNA 上の CNGNNGN 配列についても想定される。また、RNA 分子は空間的に離れた相補鎖間の塩基対形成など配列に依存して様々な二次構造をとるため、仮にコンセンサス配列が存在しても上述の構造特性と異なる二次構造要素中に含まれる部位は基質とならない。加えてもう一つの重要な理由として、細胞中で RNase 活性そのものが小胞体ストレスによる制御を受けているため Ire1p が恒常的に活性を持つ RNase ではないこと、また、Ire1p は膜タンパク質であるため細胞中を自由に拡散することが不可能であるため活性発現の場所が空間的に制限されている。即ち、Ire1p RNase ドメインは自由拡散可能な RNase と比較して、不特定多数の基質と遭遇回数が少ない特殊な RNase である事が挙げられる。一方、基質である *HAC1/hXBPI* mRNA 前駆体はそれぞれ異なる方法を用いて小胞体膜上に局在する事が報告されており(Aragón et al., 2009; Yanagitani et al., 2009; Yanagitani et al., 2011)、小胞体膜上の Ire1p/IRE1 と選択的にかつ効率良く相互作用する事が可能である。以上の理由から Ire1p は *HAC1* mRNA のみを基質としていると考えられた。

### 3.6 結論

2章で示唆されたコンセンサス配列中の保存残基 C(-3), G(+3)間での塩基対形成を検証した。

G(+3)由来のイミノプロトンシグナルを確実に帰属するため、グアノシン残基すべてを  $^{15}\text{N}$  標識したモデル配列(*HAC1* mRNA 5'側のコンセンサス配列を持つ)と *hXBPI* mRNA 516-591 の G544 (5'側スプライシング部位の

G(+3))を  $^{15}\text{N}$  標識した一残基標識体を作成した。この二つの配列について 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの測定を行った結果、*hXBPI* と *HAC1* モデル配列両方で G(+3)由来のイミノプロトンシグナルを観測する事ができた。その化学シフト値より、保存残基 G(+3)は塩基対を形成していることが分かった。

また、*hXBPI* の G544 残基のみ安定同位体標識するために、Group I intron と T4 DNA Ligase を用いて、長鎖 RNA の任意のグアノシンを効率よく安定同位体標識する方法を開発した。これにより、これまで難しかった長鎖の RNA のグアノシン一残基標識が可能となった。

Table 3.1. 本方法論で実際に調製した Group I intron 以外の配列

	Sequence <sup>a</sup>	Note
HHRz	5'- <u>CGAGAUU</u> UCCCAAUAGGACGAAACGCC-3'	3' fragment precursor
	5'-GGAUGUACUACCAGCUGAUGA-3'	5' fragment
	5'-CGTCCTATTTGGGACTCATCAGCTGGTAG-3'	DNA bridge
HAC1	5'-GGGAGACCUC <u>GAGAUU</u> UGAUUACG-3'	3' fragment precursor
	5'-CGUAAUCCAGCC-3'	5' fragment
hXBP1	5'-GGGAGAC <u>GAGAUU</u> CACUCAGACUACGUGCACC UCUGCAGCAGGUGCAGGCCAGUUGUCA-3'	3' fragment precursor
	5'-GCCAGUGGCCGGGUCUGCUGAGUCCGCA-3'	5' fragment
	5'-GCACGTAGTCTGAGTGCTGCGGACTCAGCAGAC CC-3'	DNA bridge

<sup>a</sup> 下線部は Anti-IGS 配列。

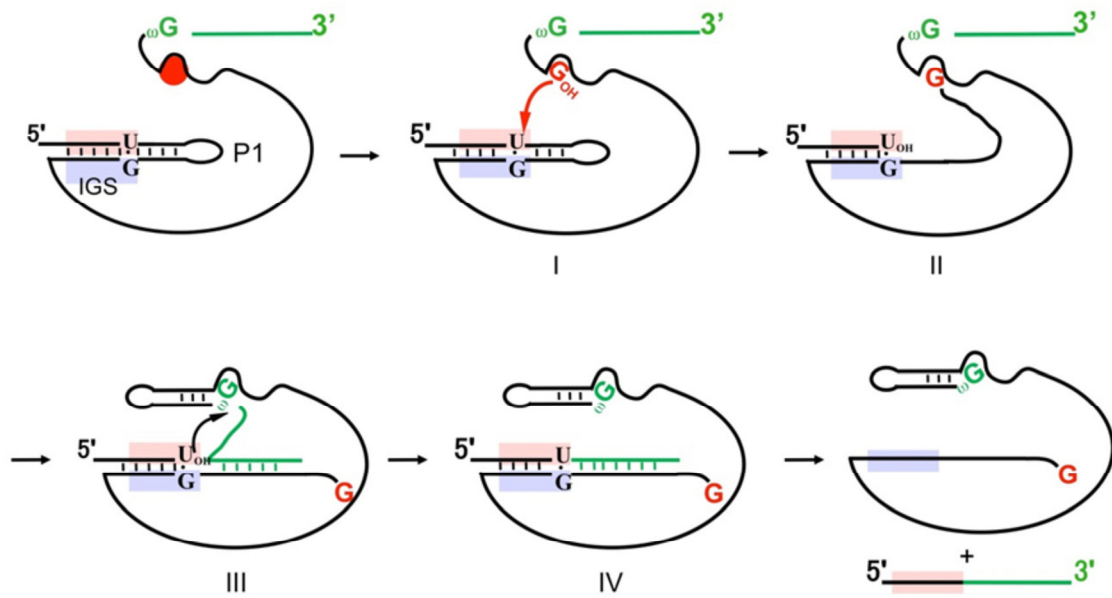


Figure 3.1. Group I intron の Self-splicing 経路 : IGS 配列は青の背景、Anti-IGS はピンクの背景で示す。また、コファクターのグアノシンを赤字で、内部因子  $\omega$ G を緑で示す。

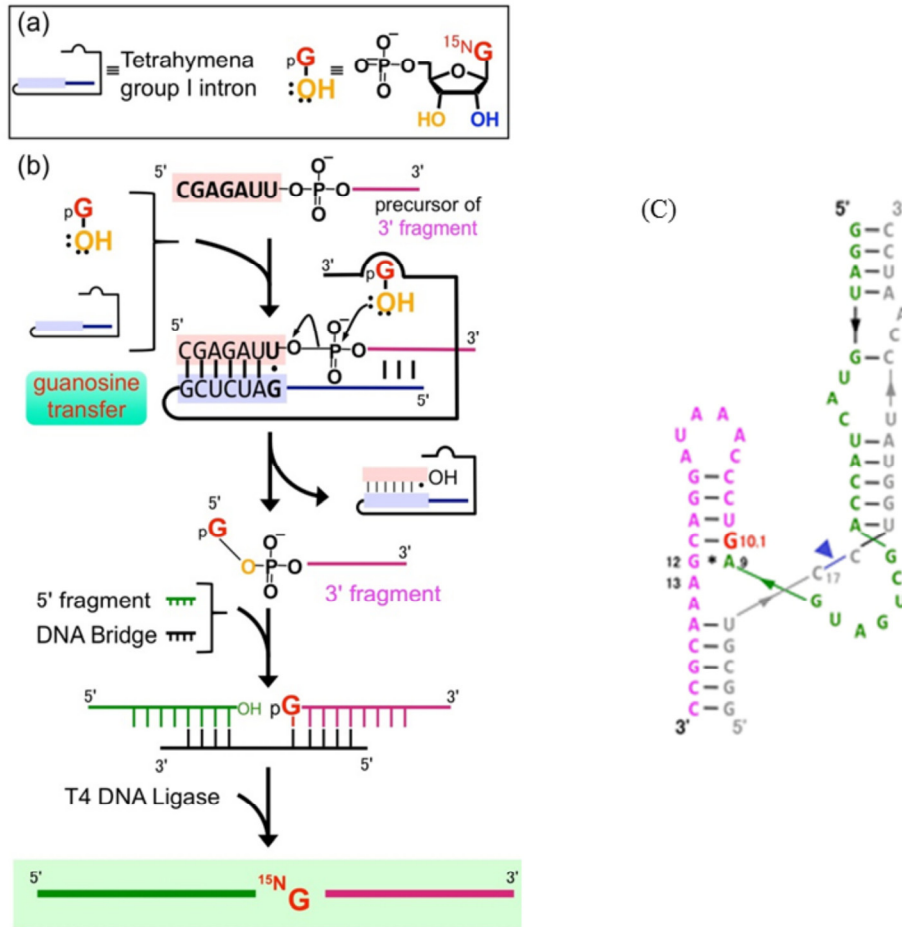


Figure 3.2. 部位特異的安定同位体標識法の概要と HHRz の二次構造図 : Group I intron と T4 DNA Ligase を用いた部位特異的安定同位体標識法の概要(a,b)と HHRz の二次構造図(c)で示す。配列上の残基はそれぞれ 3' fragment をピンク、5' fragment を緑、<sup>15</sup>N 安定同位体標識をした残基を赤で示す。また、灰色の配列は HHRz の基質鎖を示す。



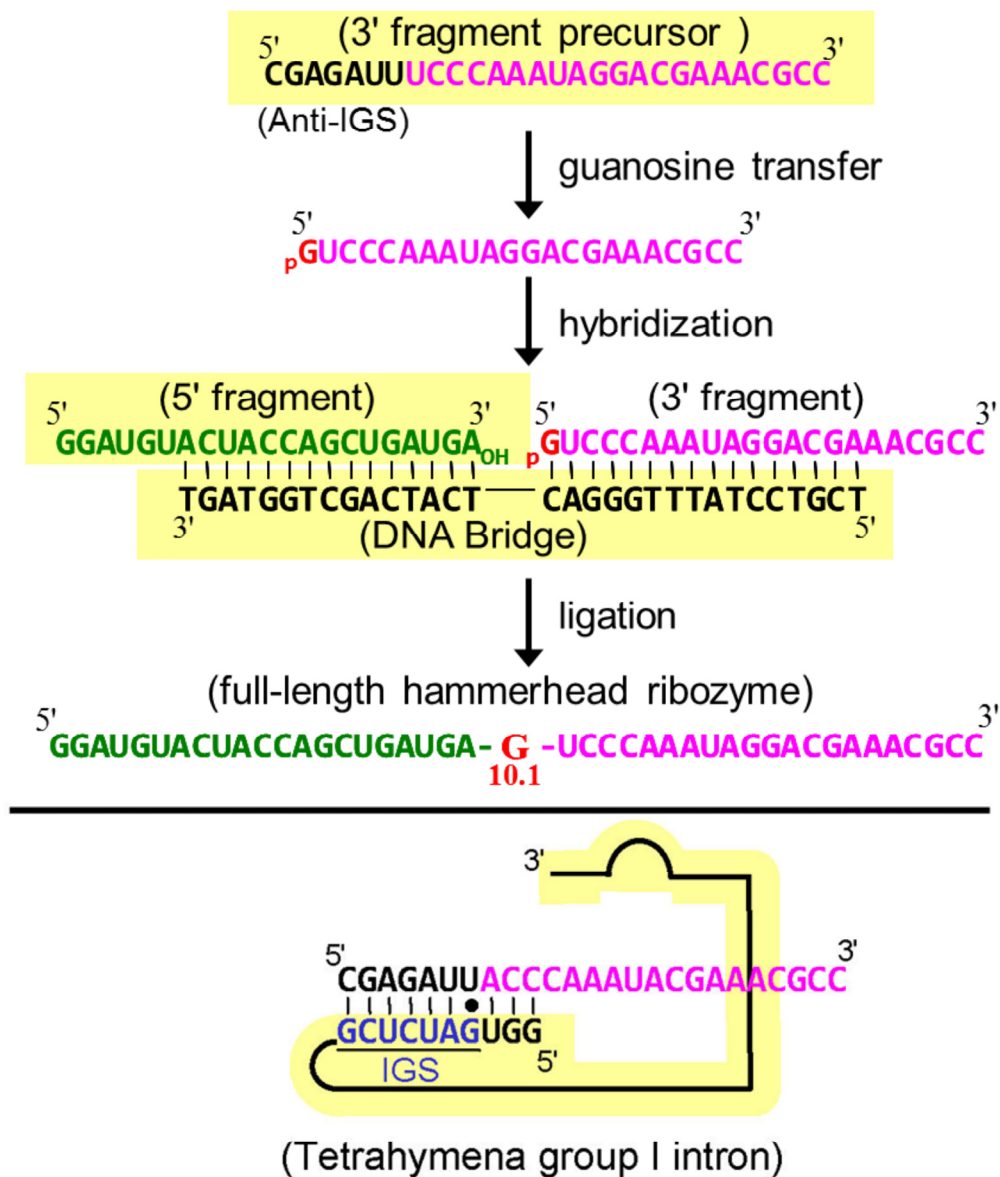


Figure 3.3. 標識体調製に必要な核酸分子：黄色の背景で示した配列が本方法論で調製が必要な核酸である。最終産物の 5'側の配列を緑、3'側の配列をピンクで示し、<sup>15</sup>N 標識をしたグアノシン残基は赤字で示す。

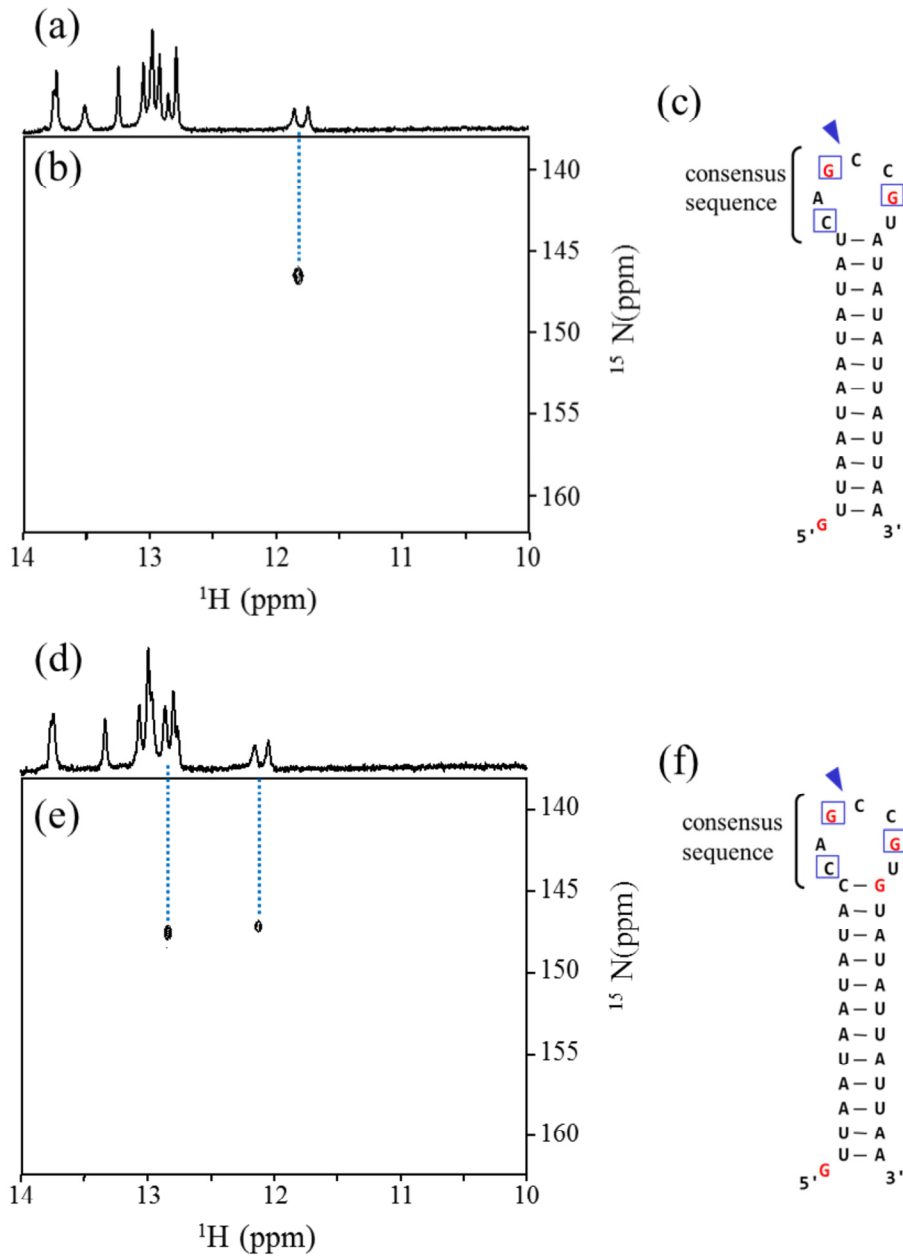


Figure 3.4. Stemloop-2 と Stemloop-3 の NMR スペクトルと二次構造図 : Stemloop-2 の 1D  $^1\text{H}$  NMR スペクトル(a)と 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル(b)と二次構造図(c)。Stemloop-3 の 1D  $^1\text{H}$  NMR スペクトル(d)と 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル(e)と二次構造図(f)。NMR スペクトルはイミノプロトンの測定領域のみを示した。二次構造配列中、四角で囲まれた残基がコンセンサス配列中の保存残基、赤字は  $^{15}\text{N}$  標識をした残基(全グアノシン)を示す。

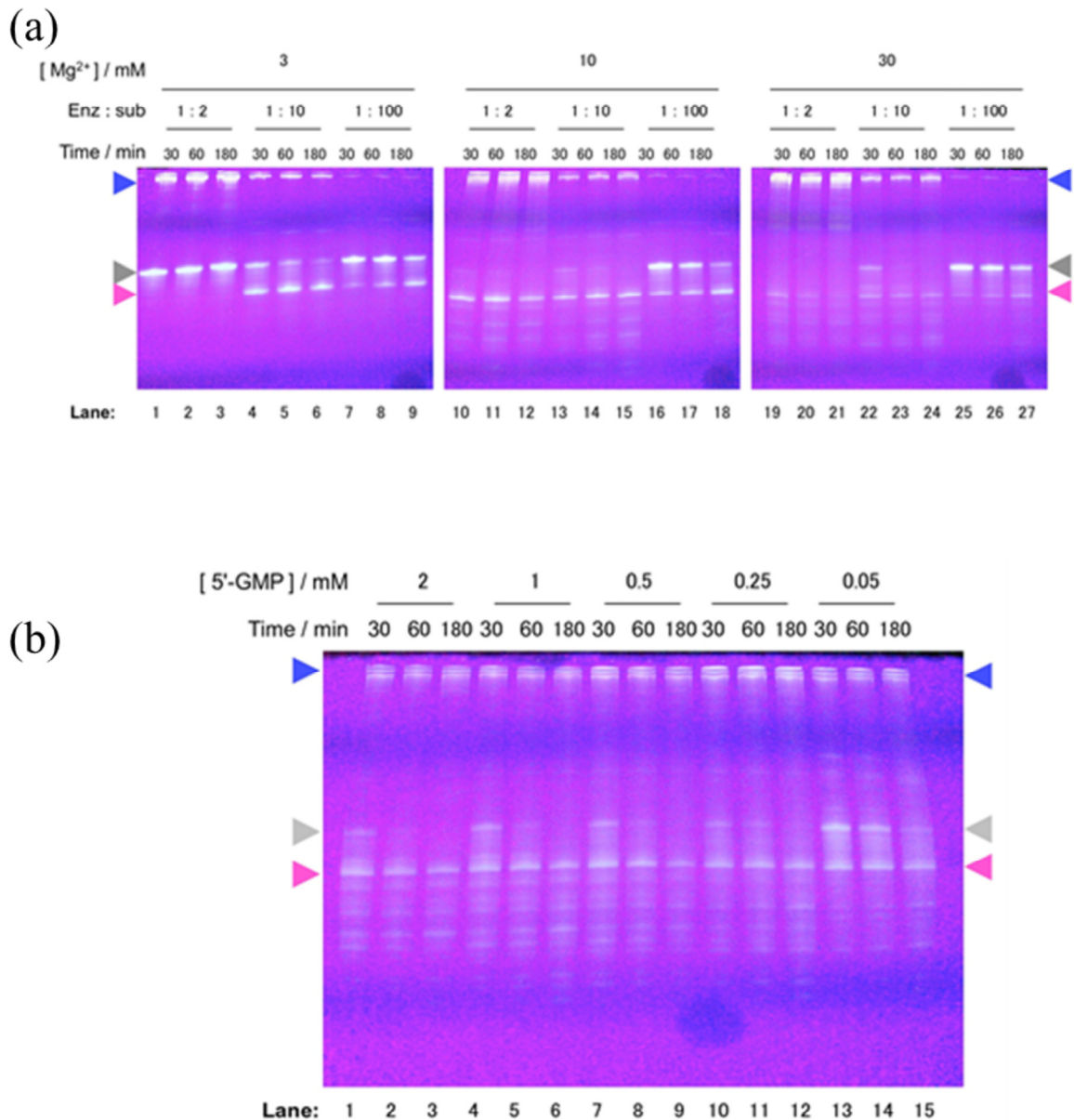


Figure 3.5. グアノシン付加反応の条件検討 1: (a) グアノシン付加反応における酵素基質量比と Mg<sup>2+</sup>濃度の検討結果。(b) 5'-GMP 濃度の検討結果。青の三角形は Group I intron、灰色の三角形は反応前の 3' fragment precursor、ピンクの三角形はグアノシンが付加された 3' fragment を示す。3 mM Mg<sup>2+</sup> 条件下では酵素基質量比 1:2 で反応が全く進行しなかった(panel (a), lane 1-3)。これは、酵素濃度の増加に伴って Group I intron のカウンターイオンとして Mg<sup>2+</sup>が消費されたため、触媒中心の Mg<sup>2+</sup>が不足したため Group I intron のグアノシン付加反応が進行しなかったためと考えられる。また、3 mM より多い Mg<sup>2+</sup>条件下(panel (a), lane 10-27) では非特異的な RNA の分解が目立った。

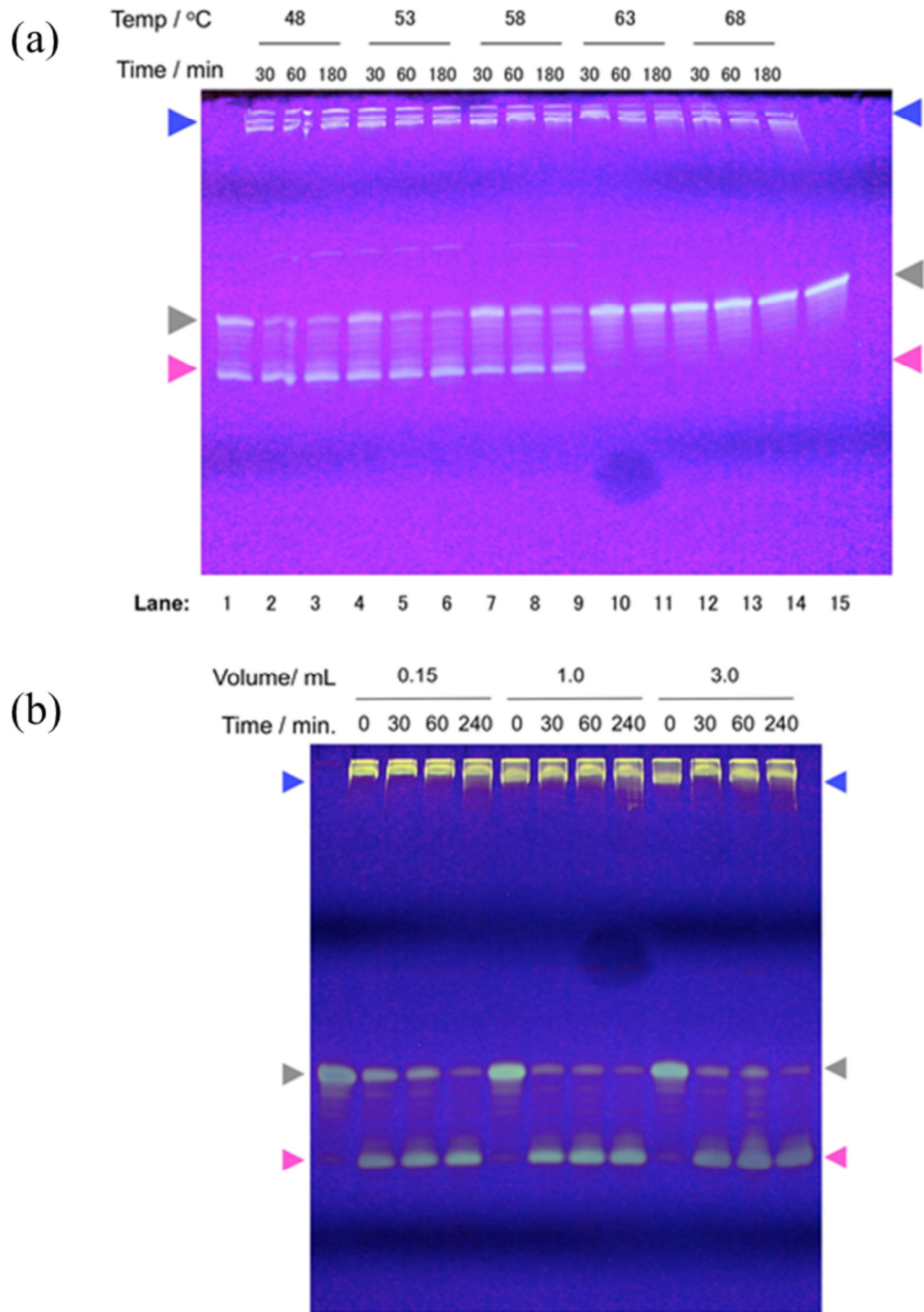


Figure 3.6. グアノシン付加反応の条件検討 2: (a) グアノシン付加反応における温度の検討結果。(b) 反応スケールの検討結果。青の三角形は Group I intron、灰色の三角形は反応前の 3' fragment precursor, ピンクの三角形はグアノシンが付加された 3' fragment を示す。

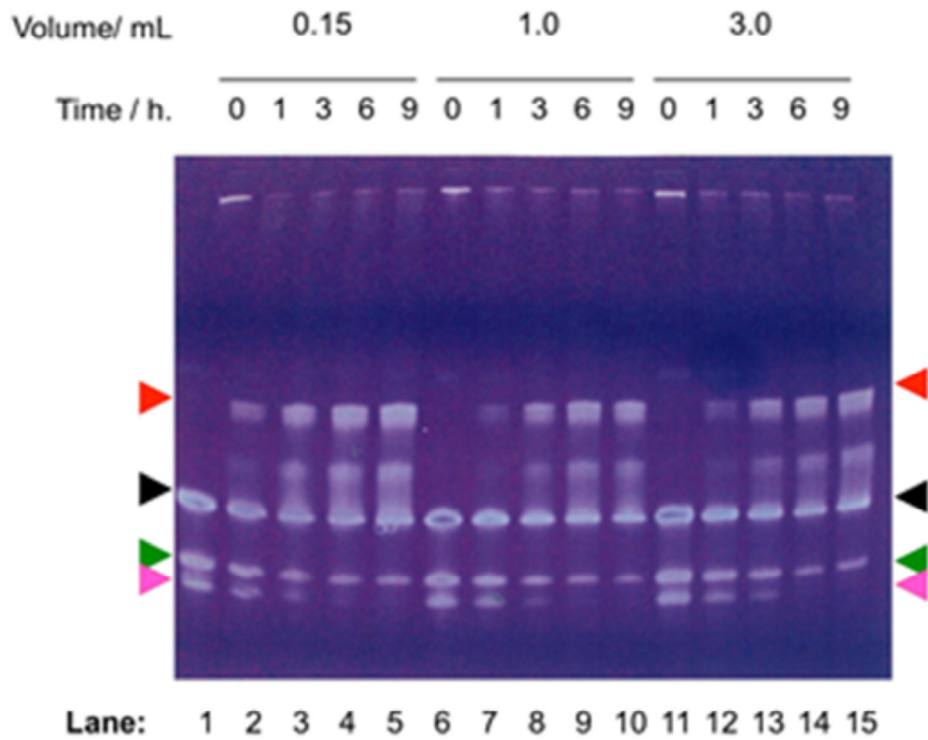


Figure 3.7. 連結反応の反応スケールと反応時間の検討：ピンクの三角形はグアノシンが付加された 3' fragment、緑の三角形は 5' fragment、黒の三角形は DNA bridge、赤色の三角形は完全長の HHRz、を示す。

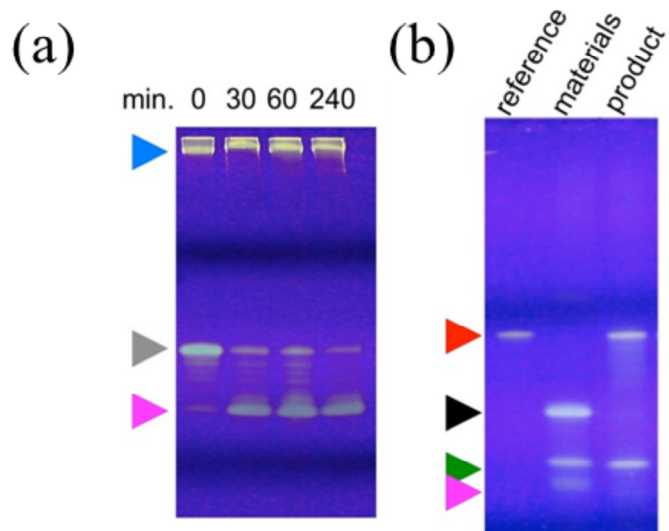


Figure 3.8. HHRz の NMR サンプル調製 : (a) グアノシン付加反応。(b) T4 DNA Ligase による連結反応。青の三角形は Group I intron、灰色の三角形は反応前の 3' fragment precursor, ピンクの三角形はグアノシンが付加された 3' fragment、緑の三角形は 5' fragment、黒の三角形は DNA bridge、赤色の三角形は完全長の HHRz を示す。

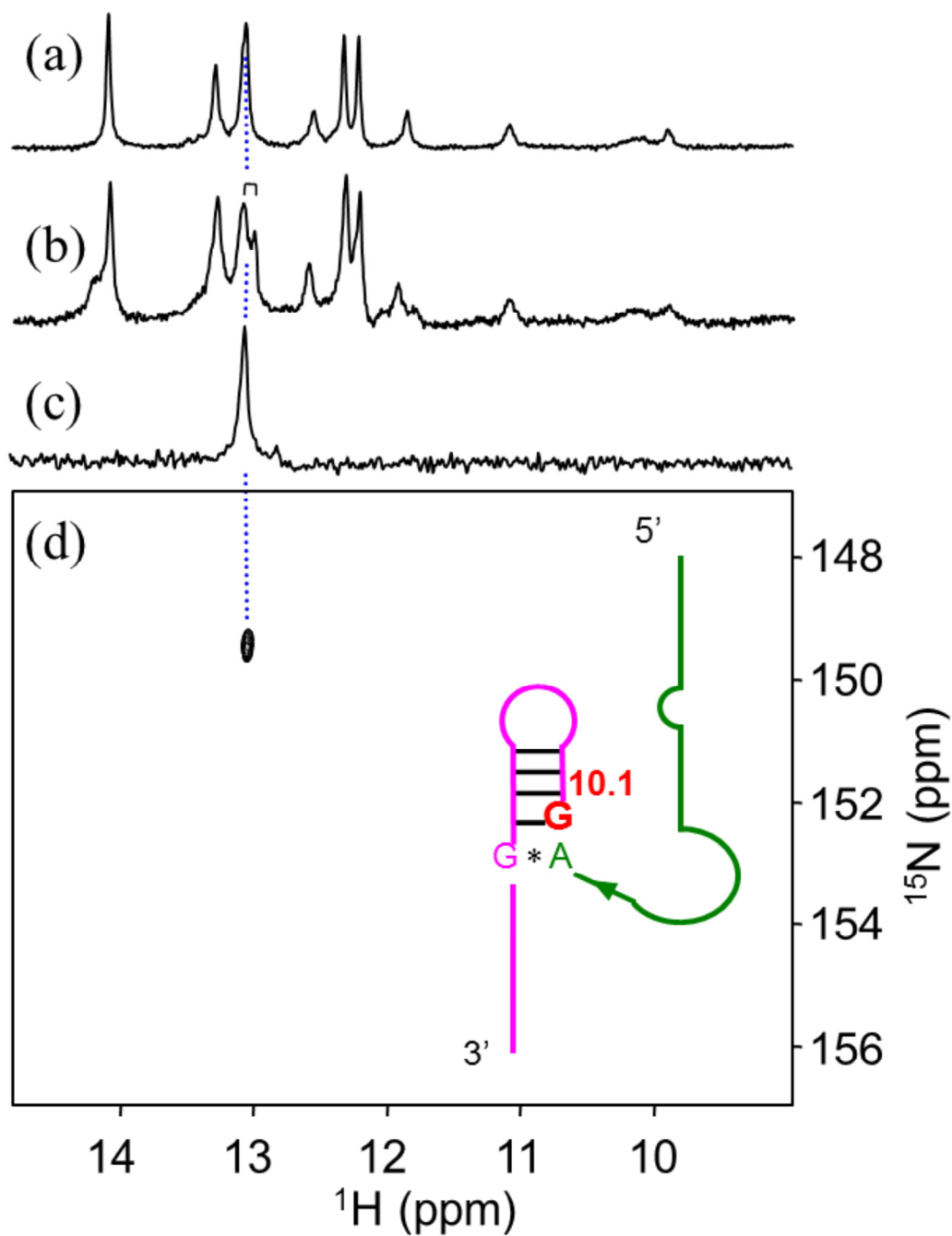


Figure 3.9.  $^{15}\text{N}$  標識 HHRz の NMR スペクトル : (a) 非標識の HHRz。 (b) G10.1 残基に部位特異的標識をした HHRz の 1D  $^1\text{H}$  NMR スペクトル。 (c)  $^{15}\text{N}$ -edited  $^1\text{H}$  NMR スペクトル。 (d) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC。また、HHRz の二次構造と標識残基の略図を 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル内に示した。

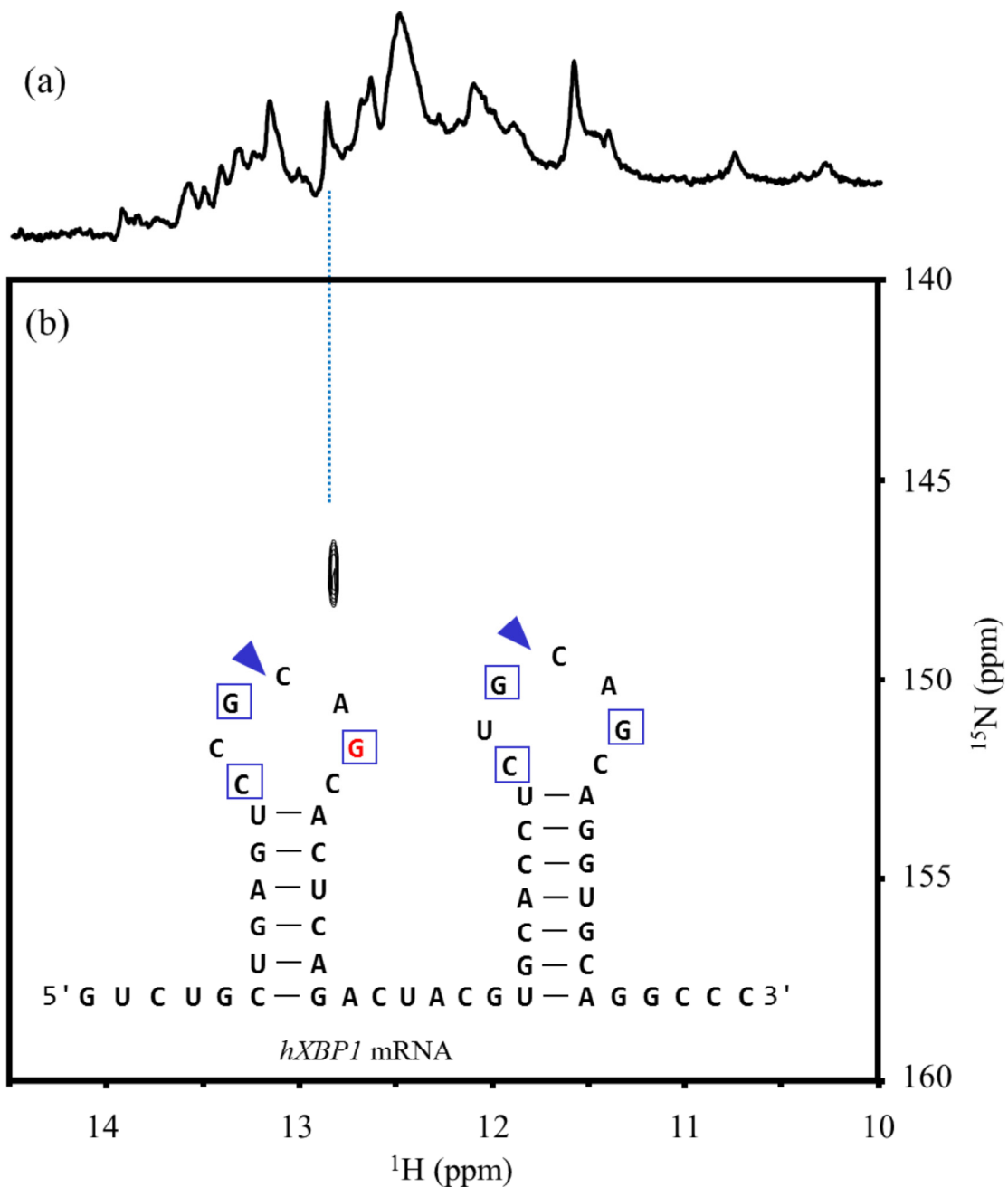
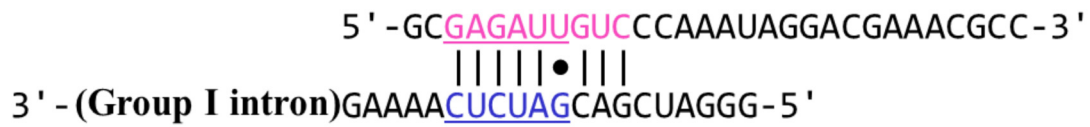


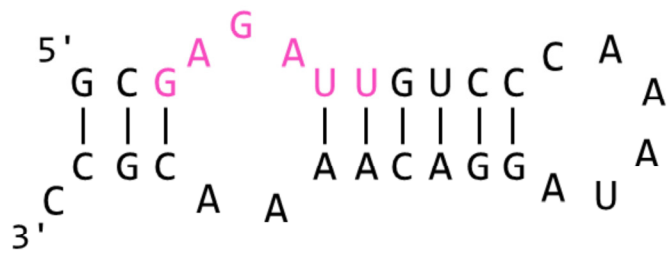
Figure 3.10. G544 残基を部位特異的に標識した *hXBP1* mRNA516-591 の NMR スペクトル : (a) 1D  $^1\text{H}$  NMR。 (b) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC。 *hXBP1* mRNA516-591 の二次構造を 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル内に示した。四角で囲まれた残基はコンセンサス配列中の保存残基、赤字が  $^{15}\text{N}$  標識をしたグアノシン残基(G544)を示す。



(a)

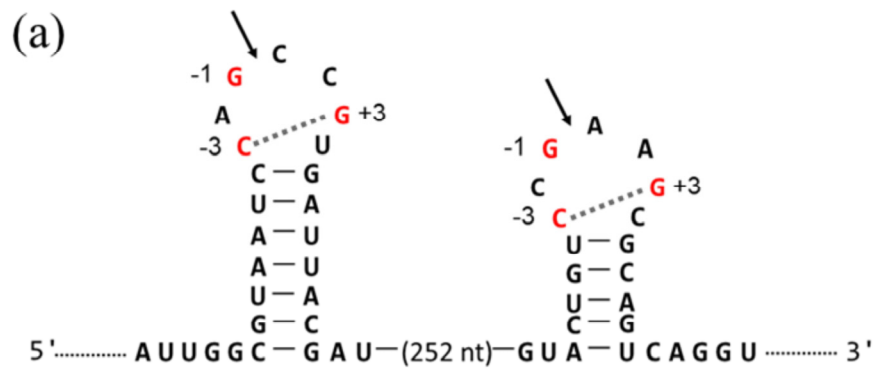


(b)

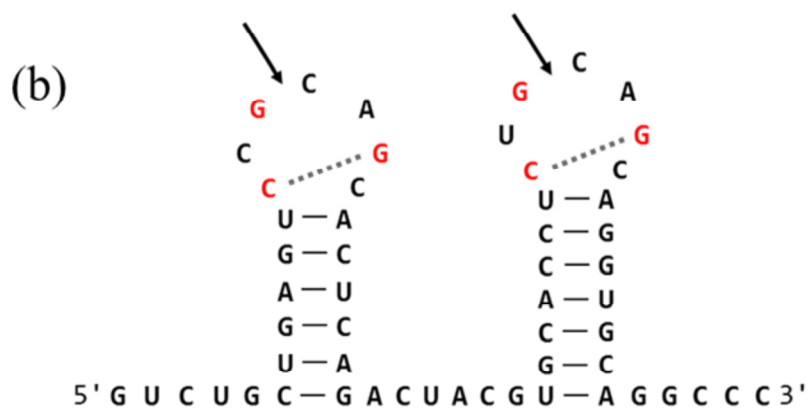


3' fragment precursor

Figure 3.11. Group I intron によるグアノシン付加反応が阻害される例：  
(a) 理想的な IGS と Anti-IGS 間の塩基対形成。(b) グアノシン付加反応が  
阻害された基質 3' fragment precursor の二次構造。ピンク色の配列が  
Anti-IGS 配列を示す。



HAC1 mRNA



hXBPI mRNA

Figure 3.12. *HAC1* mRNA, *hXBPI* mRNA のスプライシング部位の推定二次構造：赤字は保存配列、矢印は切断部位を示す。

AUGGAAAUGACUGAUUUUGAACUAACUAGUAAUUCGCAAUCGAACUUGGCUAU  
CCCUACCAACUUCAAGUCGACUCUGCCUCCAAGGAAAAGAGCCAAGACAAAAGA  
GGAAAAGGAACAGCGAAGGAUCGAGCGUAUUUUGAGAAA **CAGAAGA** GCUGCUC  
Site-1

ACCAGAGCAGAGAGAAAAAAGACUACAU **CUGCAGU** AUCUCGAGAGAAAUGU  
Site-2

UCUCUUUUGGAAAUUUACUGAACAGCGUCAACCUUGAAAAACUGGCUGACCA  
CGAAGACGCGUUGACUUGCAGCCACGACGCUUUUGUUGCUUCUCUUGACGAG  
UACAGGGAAUUCAGAGCACGAGGGGCGCUUCACUGGACACCAGGGCCAGUUC  
GCACUCGUCGUCUGAUACGUUCACACCUUCACCUCUGAACUGUACAAUGGAGC  
CUGCGACUUUGUCGCCAAGAGUAUGCGCGAUUCCGCGUCGGACCAAGAGACU  
UCAUGGGAG **CUGCAGAUGU** UUAAGACGGAAAUGUACCAGAGUCGACGACGCU  
Site-3, Site-4

AC **CUGCCGU** AGACAACAACAAUUUGUUUGAUG **CGGUGGC** CUCG **CCGUUGG** CAG  
Site-5 Site-6 Site-7

ACCCACUCUGCGACGAUUAUAGCGGGAAACAGUCUACCCUUUGACAAUUCAAU  
GAUCUUGACAAUUGGCGUAAUC **CAGCCGU** GAUUACGAUGACCAGGAAACUACA  
Site-8 (5' splicing site)

GUGAACAAAGAACACUAGCCCCAGCUUUUGCUUUCUGCUUUUUUUUCUUUUUUU  
UUUUUUUUUAGUCGUGGUUCU **CUGAUGG** GGGAGGAGCCGGUAAAAGUACCUUC  
Site-9

AAAAGCAGAAUGCAGGGUUAUUGGAAGCUUUCUUUUUUUCUUUUUAUGCUAGU  
UUUUCUGAACAAAUAGAGCCAUUCUUUUCUUAUUACUAAGAAAUGGACGGCU  
UGCUUGUACUGU **CCGAAGC** GCAGUCAGGUUUGAAUUCAUUUGAAUUGAAUGA  
Site-10 (3' splicing site)

UUUCUUCAUCACUUCAUGA

Figure 3.13. *HAC1* mRNA の全長配列 : *HAC1* mRNA の全長配列中の 5'-CNGNNGN-3'配列(Site-1 から Site-10)を黄色の背景で示す。スプライシング部位(Site-8, Site-10)は赤字で示す。

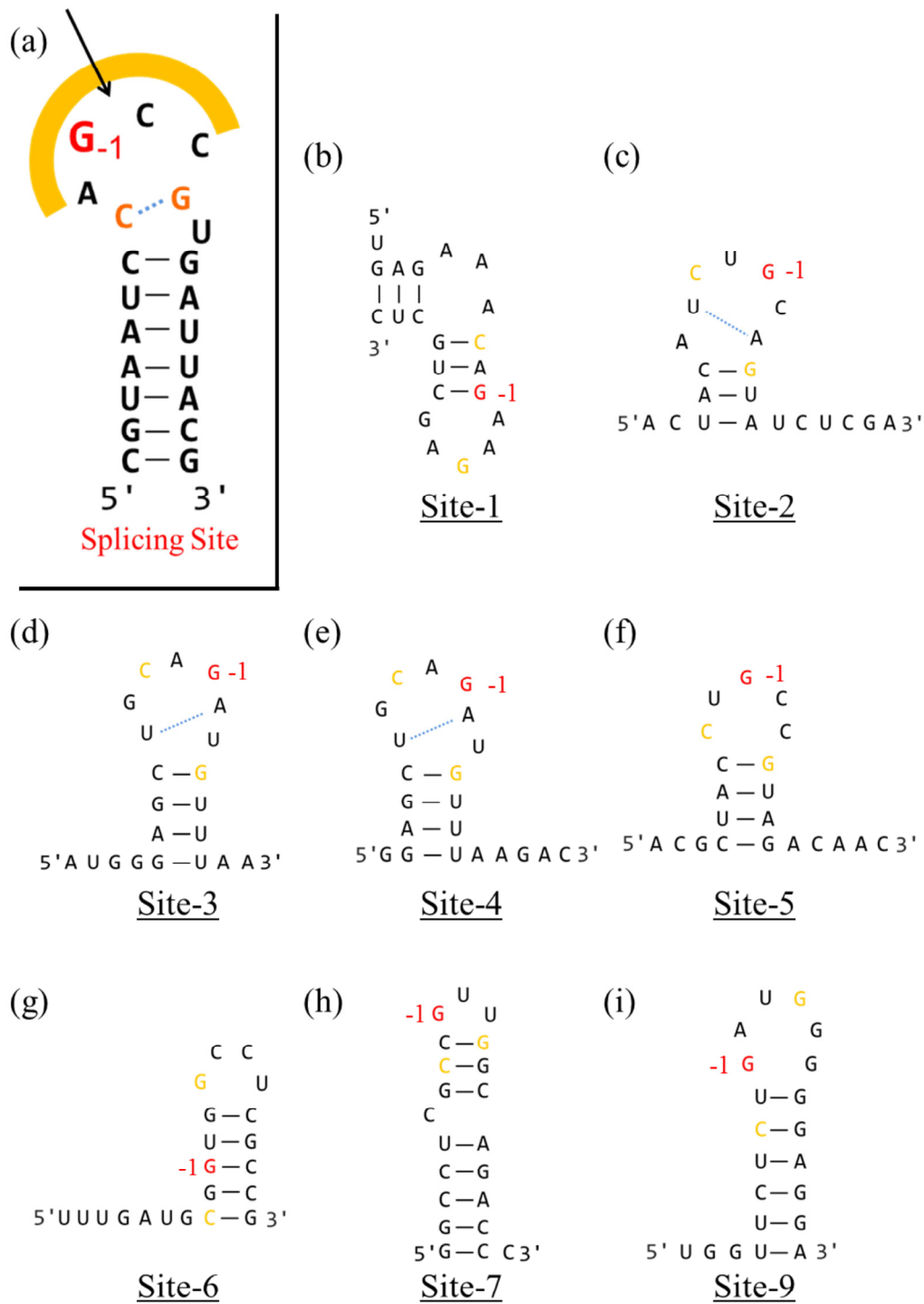
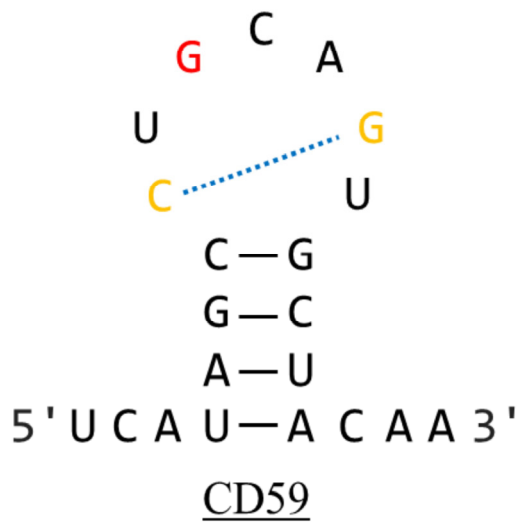
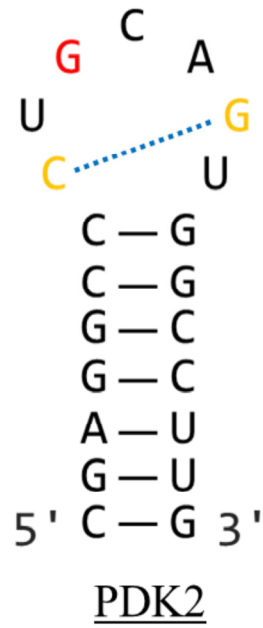


Figure 3.14. *HAC1* mRNA 配列内 5'-CNGNNGN-3'配列の二次構造：Site-1 から Site-9 までの二次構造を示す。(a) 5'側スプライシング部位 (Site-8)、(b) Site-1、(c) Site-2、(d) Site-3、(e) Site-4、(f) Site-5、(g) Site-6、(h) Site-7、(i) Site-9。赤字残基は G(-1)に相当する残基、オレンジの残基は C(-3)または G(+3)に相当する残基を示す。

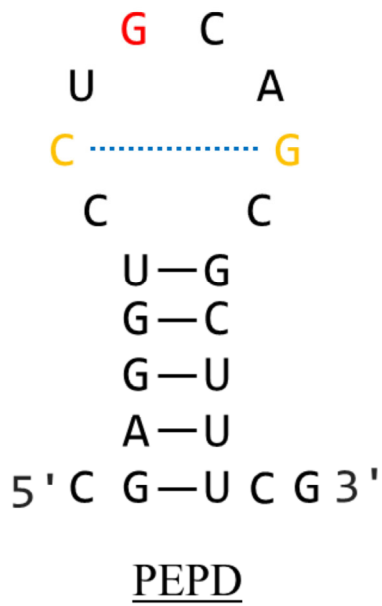
(a)



(b)



(c)



(d)

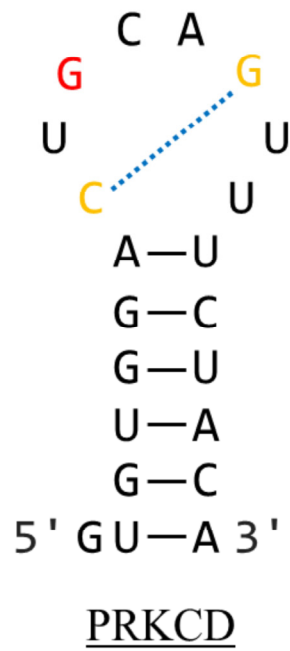


Figure 3.15. IRE1 $\alpha$  によって切断を受ける mRNA の二次構造：各二次構造の下に遺伝子名を示す。赤字残基は G(-1) に相当する残基、オレンジの残基は C(-3) または G(+3) に相当する残基を示す。

## 4 基質 *HAC1* mRNA と Ire1p RNase ドメインの 相互作用研究

### 4.1 緒言

2008年、2009年にそれぞれ別のグループから Ire1p の細胞質側ドメインの X 線結晶構造が報告された(Lee et al., 2008; Korennykh et al., 2009)。その結晶構造から Ire1p の RNase ドメインは 8 つの  $\alpha$  ヘリックスからなる新規の構造を取ること決定された。決定された立体構造と変異体を用いた解析から  $\alpha$  ヘリックス 3 と  $\alpha$  ヘリックス 4 並びにその間のループ領域が活性コアであると示唆され(Figure 4.1, 4.2)、 $\alpha$  ヘリックス 4 の H1061 とループ Y1043 を触媒活性残基とした酸-塩基触媒的切断メカニズムが提唱されている(Lee et al., 2008; Korennykh et al., 2011)。しかしながらこの領域、特に保存性の高いアスパラギン 1036 からアルギニン 1041 までの領域が(Tirasophon et al., 2000; Dong et al., 2001)、報告された 2 つの結晶構造の両方において構造決定することができ無かったこと、加えて未だ基質鎖との複合体構造が決定されていないことから、現在のところ Ire1 がどのように基質を認識し部位特異的な切断を行っているのか決定するに至っていない。

この章では、Ire1p 944-1115 RNase ドメインに対する基質 RNA の NMR 滴定実験(NMR を用いた相互作用解析)を行い、RNase ドメイン内の基質結合に関与するアミノ酸残基 (基質滴定により影響を受けるアミノ酸残基) について調べた結果を記述する。

### 4.2 材料と方法

#### 4.2.1 NMR 測定条件の決定

Ire1p 944-1115 の NMR スペクトルの改善を目指して、測定条件の最適化を行った。944-1115 のフラグメントはよく分離した 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NMR スペクトルを与えるが、初期測定条件下ではピーク間のシグナル強度の不均一と、アミノ酸残基数に対して観測されるシグナル数が少ないという問題点があった。シグナルの帰属に適したよりよい NMR スペクトルを得るために測定溶液の条件検討を行った。Ire1p 944-1115 に対してゲル濾過クロマトグラフィーを行った所、濃度依存的に見かけの分子量が増大するという結果が得られた。また、NMR 測定後、0.2 mM 以上の濃度では大量にサンプル中に沈殿が生じる。この事から溶液中での非特異的な会合が示唆された。そ

ここで初めに界面活性剤添加によるスペクトルの向上を目指した。次に Potassium phosphate、HEPES を用いて緩衝剤の検討を行った。

#### 4.2.2 基質 RNA を用いた NMR 滴定実験

実験には Loop-1 から Loop-11 までの配列を使用した。Ire1p 944-1115 RNase ドメインは 2.2.3 に記載された方法で調製した。Ire1p とループ配列との相互作用を NMR スペクトル上で観測するために、200 pM Ire1p 944-1115 (200 mM Potassium Phosphate (pH 7.4), 50 mM KCl, 0.5 mM DTT) に対して超純水中に溶解した Loop RNA を 0.1, 1, 10 (5) 当量ずつ滴定を行い、各ポイントで 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (もしくは 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY) スペクトルを測定した。測定には DRX800 NMR spectrometer、Bruker Avance-I 800 spectrometer, を使用し 310 K で測定を行った。また、測定後のサンプルは変性条件下で陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、基質 RNA 鎖の切断の有無を確認した。

#### 4.2.3 小麦胚芽無細胞翻訳系をもちいたアミノ酸特異的標識によるタンパク質主鎖の帰属

小麦胚芽無細胞翻訳系を使用して調製したアミノ酸選択標識タンパク質を用いて NMR シグナルの帰属を行う方法 (MAGICAL 法: Method for AssiGnments with Intelligent Combinatorial Amino acid Labeling (Endou et al., 2004; Endou and Kohno, 2005; Kohno, 2005)) を用いて Ire1p 944-1115 の主鎖の帰属を行った。用いたアミノ酸標識体の組み合わせは、1 種類のアミノ酸を  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  標識かつ残りのアミノ酸を  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  標識をし、Ire1p 944-1115 には存在しないシステインを除く 19 通りの組み合わせの標識サンプルを作成した。プロリンについては  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  標識の代わりに  $^2\text{H}$  標識を用いた。それぞれについて 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル、HN(CA), HN(CO) 三次元相関スペクトルを測定し、帰属に用いた。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 NMR 測定条件の決定

初期測定条件下ではピーク間のシグナル強度の不均一性と、アミノ酸残基数に対して観測されるシグナル数が少ないという問題点があったため、Ire1p 944-1115 の NMR スペクトルの改善を目指して、測定条件の最適化を行った。Ire1p 944-1115 は溶液中での会合傾向が見られたため、CHAPS, SDS,

コール酸の 3 種類の界面活性剤存在下で NMR スペクトルを測定したところ、50 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl, 7 mM CHAPS の条件下で若干のスペクトルの改善が見られたが、大幅な改善には至らなかった。次に緩衝剤の検討を行った。その結果、200 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT の条件下でスペクトルの改善が見られた。しかしながら同条件下でも消失したシグナルを観測することはできなかった。ただしこの条件では NMR スペクトルの再現性が当初の測定条件(50 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl)より良くなるため、本条件(200 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT)を最終条件とした。

#### 4.3.2 基質 RNA を用いた NMR 滴定実験

Ire1p とループ配列との相互作用を NMR スペクトル上で観測するために、200 pM Ire1p 944-1115 (200 mM Potassium Phosphate (pH 7.4), 50 mM KCl, 0.5 mM DTT)に超純水中に溶解した Loop RNA を 0.1, 1, 10 (5)当量ずつ滴定を行い、各ポイントで 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (もしくは 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY)スペクトルを測定した。実験には Loop-1 から Loop-11 までの配列を使用した。NMR の測定結果の重ね合わせを Figure 4.3 に示す。2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC と 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY スペクトルはタンパク質主鎖 N-H の観測領域のみを示した。2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC および 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY スペクトルの結果から、矢印で示された一部のシグナルが核酸の滴定に伴ってシフトする様子が確認された。特に図中赤矢印で示したシグナルは Loop-7 (5'-GC-3')を滴定したスペクトル以外で共通して著しい変化を観測し、核酸の認識または切断への関与が強く示唆された。なお、それ以外のシグナルは各滴定点間で良い一致を示しており、この実験系で用いた RNA 鎖のタンパク質への非特異的結合は少ないと判断された。したがって基質鎖の滴定によって得られたシグナルの変化は特定の相互作用を観測したものであると考えられた。

#### 4.3.3 小麦胚芽無細胞翻訳系を用いた Ire1p 944-1115 RNase ドメイン主鎖の帰属

アミノ酸選択的標識法を用いて Ire1p 944-1115 の主鎖の帰属を行った。その結果を Figure 4.4 に示す。全 172 残基のうち、147 残基の主鎖の帰属を行うことが出た。シグナルが得られなかった残基は 11 個のプロリンおよび、E1038-M1049 までの領域、L1072, M1073 であった。E1038-M1049 までの領域は結晶構造中でループ構造であると示されている領域とほぼ一致するため(Figure 4.2)、運動性が高い領域である事が推測され、そのためにシグナ



ルの観測が出来なかったと考えられる。

#### 4.4 考察

- NMR 滴定実験より相互作用が考えられる残基の帰属 -

アミノ酸選択標識法で得られたシグナルの帰属結果を基に、NMR 滴定実験で得られた基質存在下で化学シフト値が変化する 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上のシグナルについて、残基の特定を行った。その結果、基質存在下でシグナルの変化が観測できた残基は D955, H977, W1025, L1051, F1062, G1079, F1080 (Figure 4.5)であった。特に W1025 (2), F1062 (5), G1079 (1), F1080 (4)は顕著なシグナルの変化を示した(括弧の中は Figure 4.3 で変化の大きかったシグナルに割り振った番号)。これらの残基はどれも X 線結晶構造上で活性中心とされている領域近傍に位置しており(Figure 4.1, 4.2, 4.5)、活性残基への基質の結合または切断反応によってシグナルのシフトが確認されたと考えられる。特に F1062 は基質の存在によるシグナルのシフトが顕著であった。F1062 残基は触媒残基と推測されている H1061 (Lee et al., 2008; Korennykh et al., 2009; Korennykh et al., 2011)の隣接残基であり、現在提案されている切断機構と矛盾しない。また、W1025 と L1051 はともに種間で高度に保存されている(Figure 4.2)。L1051 は結晶構造中で  $\alpha$  ヘリックス 4 に含まれる残基で、側鎖がタンパク質内部に埋もれている疎水性残基である。W1025 は  $\alpha$  ヘリックス 3 に含まれる残基で、側鎖が溶媒側に露出しているため基質鎖との相互作用が考えられる。ただし H1061 や Y1043 などの触媒残基と推定されている残基からは離れた位置に存在している。L1051 と W1025 は配列上ループ領域を挟んで位置しているが、結晶構造中では空間的には近い位置に側鎖同士が配置されている(Figure 4.6)。そのため、基質の結合ならびに切断反応によるループ領域の構造や運動性の変化などによってシグナルの変化が現れた可能性も考えられる。

#### 4.5 結論

アミノ酸特選択標識法を用いて Ire1p 944-1115 RNase ドメインの主鎖の帰属を行い、2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上に観測された N-H 相関シグナルのうち、147 のシグナルについての帰属を完了した。また、帰属結果と 7 塩基のループ配列を基質とした NMR 滴定実験の結果から D955, H977, W1025, L1051, F1062, G1079, F1080 の 7 つの残基について、基質存在下での NMR シグナルの変化を観測した。特に X 線結晶構造上で活性中心とされている領域近傍に位置している W1025, F1062, G1079, F1080 については

顕著な NMR シグナルの変化を観測した。基質存在下での NMR シグナルの変化が特定の残基に限られる事から、この NMR 滴定実験の結果は Ire1p 944-1115 による基質の認識を反映したものであると考えられる。

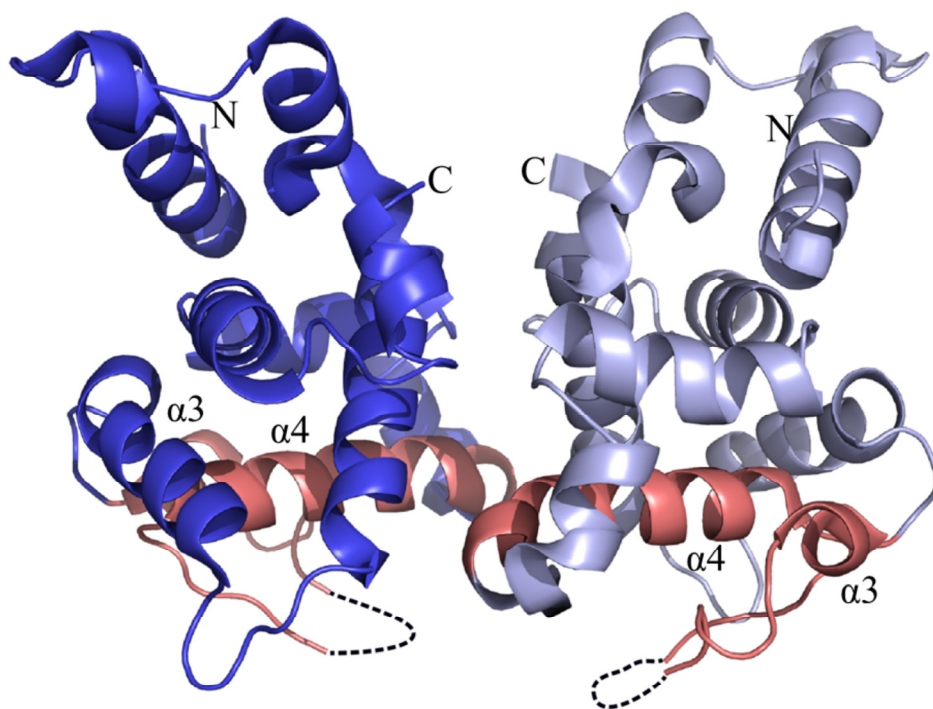


Figure 4.1. Ire1p RNase ドメインの立体構造。二量体の Ire1p 944-1115 領域を示した。ピンクで示した領域( $\alpha 3$ , loop,  $\alpha 4$ )は RNase ドメインの活性中心と推定されている(Lee et al., 2008; Korennykh et al., 2009; Korennykh et al., 2011)。図中 N, C はそれぞれ N 末端、C 末端を示し、黒の点線は結晶構造中で座標が決定されていない領域(N1036-R1041)を示す。(PDB ID: 2RIO; Lee et al., 2008)

Irelp_yeast	-----LHDRSLIAEATDLISQIMDHDPLKRP
IRE1a_human	CVFYVVSEGSHPFGKSLQRQANILLGACSLDCLHPEKHEDVIARELI EKMIAMDPQKRP
IRE1b_human	CVFYVVL SGGSHPF GDSL YRQANIL TGVPCLAHLEEEVHDKVVARDLVAAMLSLLPQARP
IRE1a_mouse	CVFYVVI SEGNHPFGKSLQRQANILLGACNLDCFHSDKHEDVIARELI EKMIAMDPQQRP
IRE1b_mouse	CVFYVVL SGGSHPF GESL YRQANIL SGDPCLAQLQEETHDKVVALDLVRAML SLLPQDRP
IRE1_c. elegans	CIFYYVL TSGTHPF GKSLHRQANIVNGEYTLNKL-ADLDDWSLADDL I SSMLNVEPLHRL
RNaseL_human	RLVLYVVKKGSISF-EDLKAQSN-----EEVQLSPDEE-----TKDLI HRLFHPGEHVRD
RNaseL_mouse	RLVLYVVMKGEIPF-ETLKTQND-----EVLLTMSPEE-----TKDLI HCLFSPGENVKN

Irelp_yeast	TAMKVLRHPLFWPKSKKLEFL LKVS DR--LEI ENRDPPSALLMKFDAGSDFVIPS-GDWT
IRE1a_human	SANDVLKHPFFWSLEKQLQFFQDVSDR--IEKESLDGP--IVKQLERGGRAVVK--MDWR
IRE1b_human	SAPQVLAHPFFWSRAKQLQFFQDVSDW--LEKESEQEP--LMRALEAGGCTVVR--DNWH
IRE1a_mouse	SAKHVLKHPFFWSLEKQLQFFQDVSDR--IEKEALDGP--IVRQLERGGRAVVK--MDWR
IRE1b_mouse	SAGVWLAHPFFWSRAKELQFFQDVSDW--LEKEPDQGP--LVSAL EAGSYKVVR--EDWH
IRE1_c. elegans	TADAVLNHPFFWTSEKRLAYFSDVSDR--VEKEEDNSP--VVRR IETDARIVVC--GGWR
RNaseL_human	CLSDLLGHPFFWTWESRYRTL RNVGNESDIKTRKSESE--ILRLLQPGPSEHSKSFDKWT
RNaseL_mouse	CLVDLLGHPFFWTWENRYRTL RNVGNESDIKVRKCKSD--LLRLLQHQTLEPPRSFDQWT

Irelp_yeast	VKFDKTFMDNLERYRKYHS-----SKLMDLLRALRNKYHHFMDLPEDIAELMGPVPD----
IRE1a_human	ENITDPLQTDLRKFRTYKG-----GSVRDLLRAMRNKKHHYRELPAEVRETLGTLPD----
IRE1b_human	EHISMP LQIDLRKFRSYKG-----TSVRDLLRAVRNKKHHYREL PVEVRQALGQVPD----
IRE1a_mouse	ENITVPLQTDLRKFRTYKG-----GSVRDLLRAMRNKKHHYREL PVEVQETLGSIPD----
IRE1b_mouse	KHISAPLQADLRKFRSYKG-----TSVRDLLRAMRNKKHHYRELPAEVRQTLGQLPA----
IRE1_c. elegans	EKICDALKEDLRKFRTYKS-----FSVRDLLRAMRNKKHHYREL PEDVRQSLGDIPD----
RNaseL_human	TKINECVMKMNKFYEKRG-NFYQNTVGDLLKFI RNIGEHIDE---EKHKMKLKI G----
RNaseL_mouse	SKIDKNVMDENHFYEKRKNPYQDTVGDLLKFI RNIGEHINE---EKKRGMKEILG----

Irelp_yeast	GFYDYFTKRFNLLIGVYMI VKENLSDDQILREFLYS
IRE1a_human	DFVCYFTSRFP HLLAHTYRAMEL-CSHERLFQPYFHEPPEPQPPVTPDAL
IRE1b_human	GFVQYFTNRFPQLLLHTHRVMRS-CASESLFLPYPPDSEARGPCPGAAGR
IRE1a_mouse	DFVRYFTSRFP HLLSHTYQAMEL-CRHERLFQTYWHEPTEPQPPVIPYAL
IRE1b_mouse	GFIQYFTQRFPRLLHHTHRAMRT-CASESLFLPYPPALEARRPDATKS
IRE1_c. elegans	QFLHYFTSRFP RLLHVVYKATEY-CSGEAVFKRYSSDDVRARMYPIVEEEERVRKK- (39)
RNaseL_human	DPSLYFQKTFPDLVIYVYTKLQN-TEYRKHFPT HSPNKPQCDGAGGASGLASPGC
RNaseL_mouse	DPSRYFQETFPDLVIYIYKLLKE-TEYRKHFQPPPRLSVPEAVGPGGIQS

Figure 4.2. Ire1p RNase ドメインの一次配列アライメントと二次構造 : Ire1p 944-1115 (Ire1p\_yeast)までの配列と *Homo sapiens* (human) IRE1 $\alpha$  (IRE1a\_human), human IRE1 $\beta$  (IRE1b\_human), *Mus musculus* (mouse) IRE1 $\alpha$  (IRE1a\_mouse), mouse IRE1 $\beta$  (IRE1b\_mouse), *Caenorhabditis elegans* IRE1 (IRE1\_c. elegans), human RNase L (RNaseL\_human), mouse RNase L (RNaseL\_mouse)のRNaseドメインについてアミノ酸シーケンスアライメントの結果を示す。*Caenorhabditis elegans* IRE1のアミノ酸配列についてはC末端側39残基を省略した。図中の二次構造は $\alpha$ Iから $\alpha$ LまでがIre1p kinaseドメインの $\alpha$ ヘリックスを示し、 $\alpha$ 1から $\alpha$ 8までがIre1p RNaseドメインの $\alpha$ ヘリックスを示すヘリックス間の直線はループ構造である事を示す。また、点線で示された領域は結晶構造中で座標が決定されていない領域(N1036-R1041)。ピンクで示された領域がRNaseドメインの活性中心と推定されている。シーケンスアライメント上緑で示したアミノ酸残基は、変異導入によりRNase活性が低下すると報告されている保存残基。また、赤丸で示した残基(Y1043, H1061)は推定触媒残基。

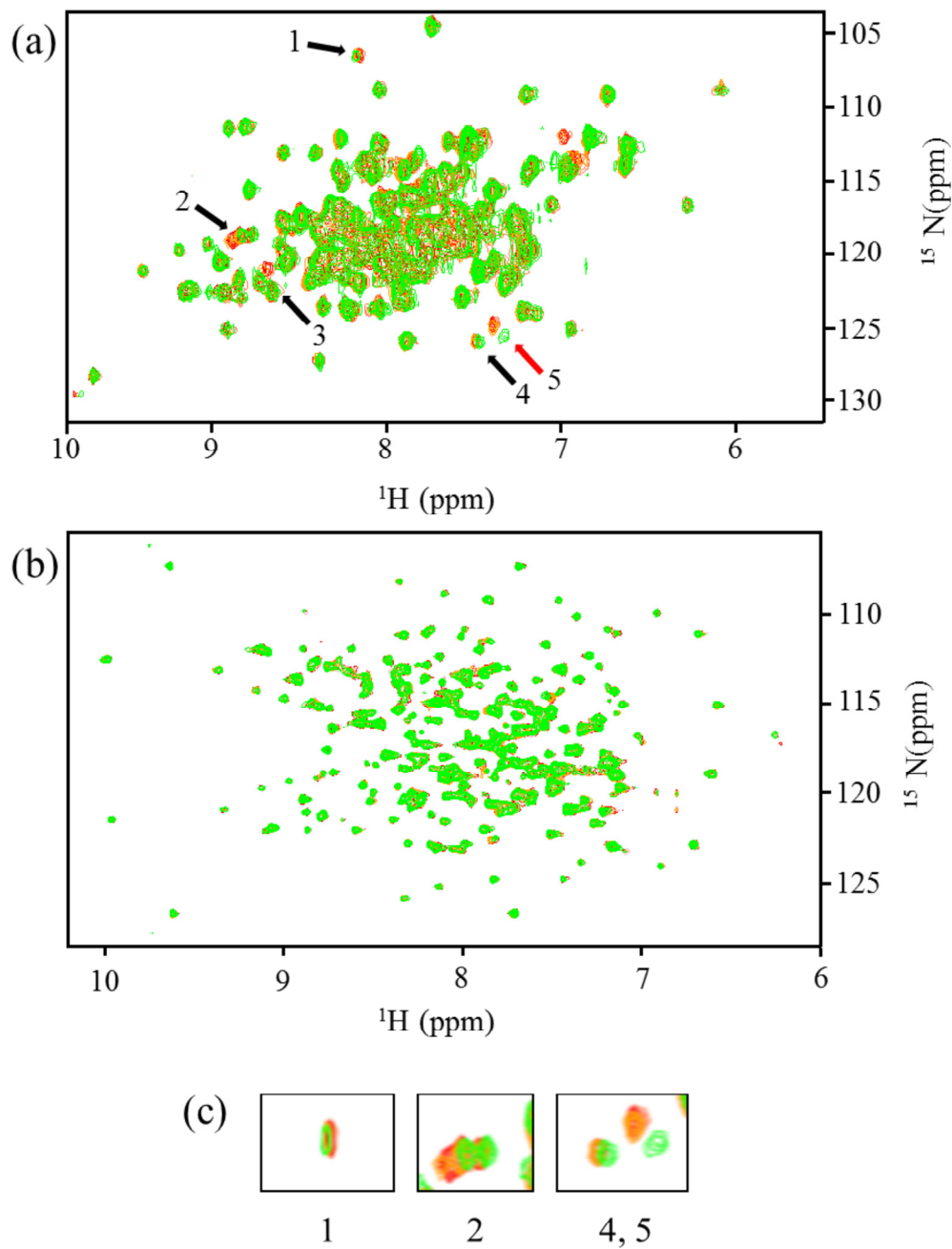


Figure 4.3. ループ配列を用いた NMR 滴定実験の結果(2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC /  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TOROSY スペクトル)の重ね合わせ : Loop-1 (*HAC1* mRNA 5'splicing site)を(a), Loop-7 (5'-GC-3')を(b)に示す。Loop-1 を用いた NMR 滴定実験の結果、2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC または 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TOROSY スペクトル上でシグナルの変化が見られたスペクトル(1, 2, 4, 5)の拡大図を(c)に示した。Irp1p 944-1115 に対する滴定を行った RNA の当量によりスペクトルを色分けした。Irp1p 944-1115 のみ(赤), 0.1 当量(ピンク), 1 当量(オレンジ), 10 当量(緑)。

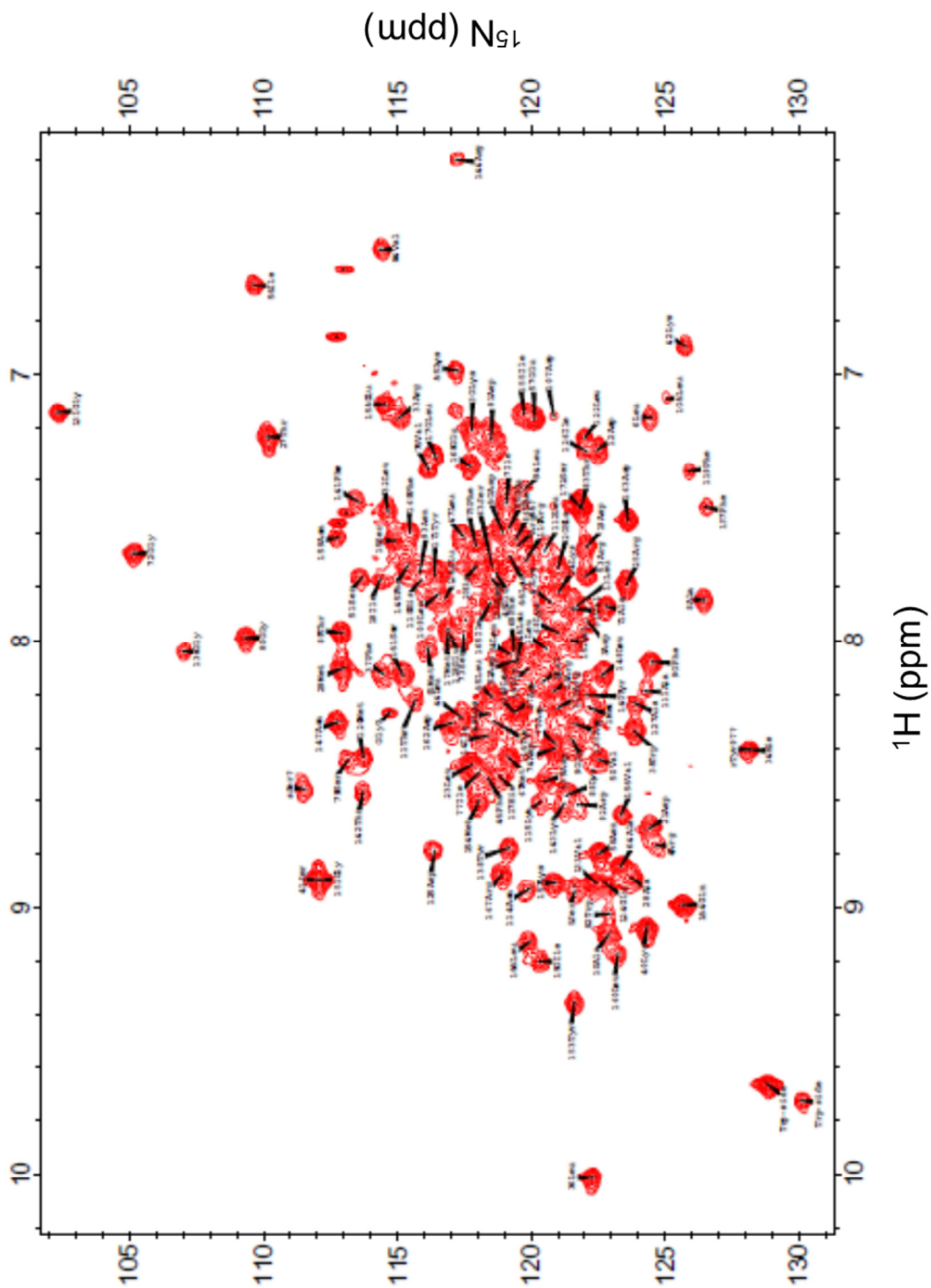


Figure 4.4. アミノ酸選択標識法による Ire1p 944-1115 の主鎖の帰属結果：帰属結果は 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上に示す。

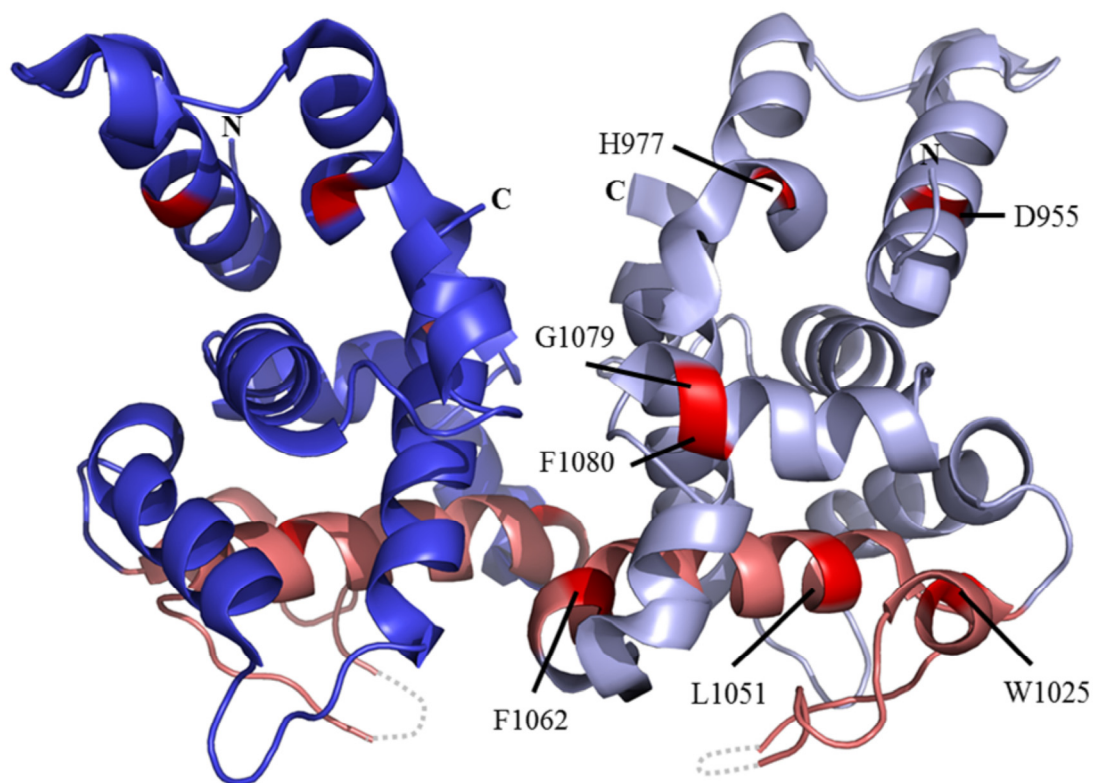


Figure 4.5. 基質存在下でシグナルの変化が観測された残基：NMR 滴定実験により基質存在下でシグナルの変化を観測した7残基を三次元構造上に表示す。ピンクで示された領域が RNase ドメインの活性中心と推定されている領域。ループ領域の途切れた領域(点線)は結晶構造中で座標が決定出来なかった残基の領域。(PDB ID: 2RIO)



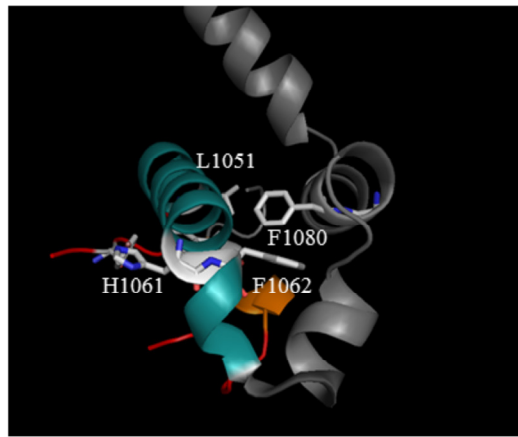
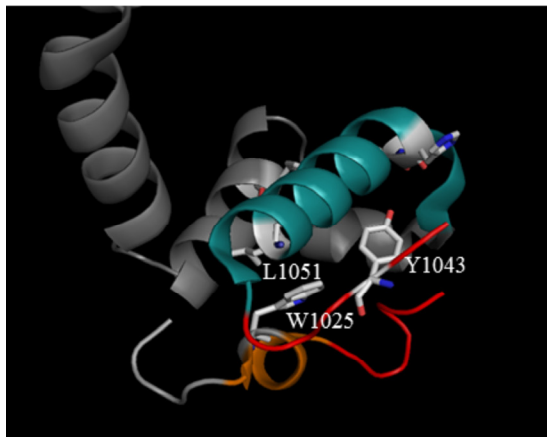
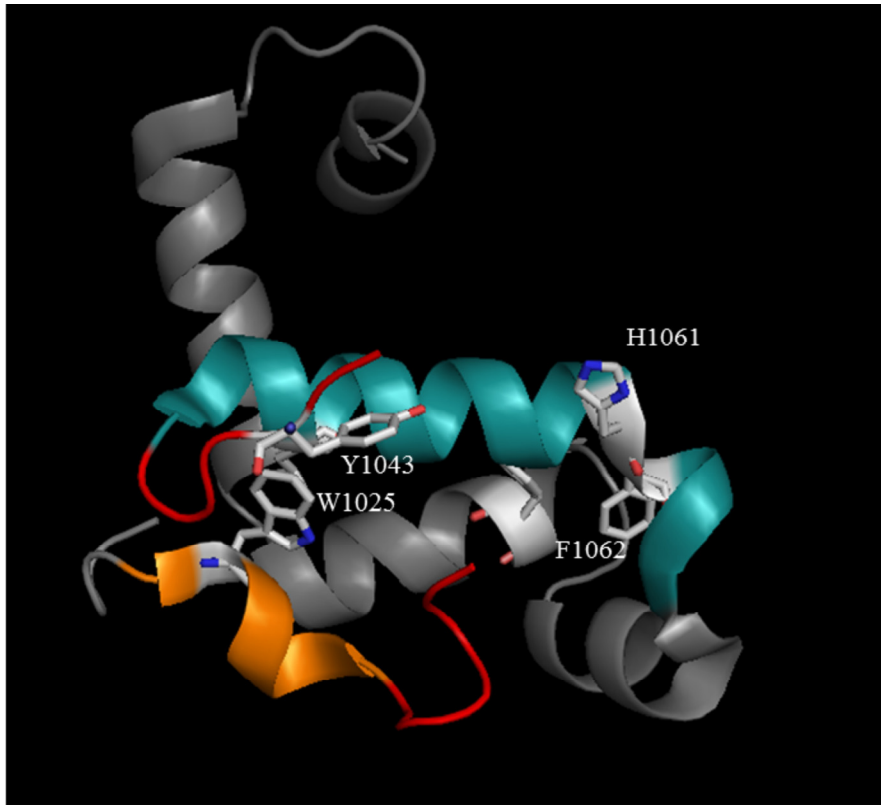


Figure 4.6. 活性コアと推定される領域のリボンモデル：活性コアと推定される領域のリボンモデルに推定触媒残基と基質存在下で変化の大きかった残基を示す。オレンジは $\alpha$ ヘリックス3、水色は $\alpha$ ヘリックス4、赤はその間のループ領域を示す。ループ領域の途切れた領域は結晶構造中で座標が決定出来なかった残基の領域。(PDB ID: 2RIO)

## 5 総括

### 5.1 緒言

本研究では、Ire1pによる基質認識機構に焦点をあて、*HAC1* mRNA切断機構を構造学的な視点から解明する事を目指して研究を行った。

2章では構造的に安定なRNaseドメインの同定を行い、Ire1p 944-1115のフラグメントを同定した。次に同定したRNaseドメインを用いてIre1pが認識する基質配列について詳細な検討を行った。mRNA内に存在するIre1pの認識配列として、5'-CNGNNGN-3'というコンセンサス配列が知られおり、Ire1pはこの7塩基からなるコンセンサス配列のみでも部位特異的に切断可能である事が分かった。またmRNAの変異体の解析から、コンセンサス配列内に保存されているC(-3), G(+3)間で塩基対が形成されている事が示唆された。

3章では2章で提唱した仮説に基づいて、C(-3), G(+3)間の塩基対形成の確認を行った。G(+3)を<sup>15</sup>N標識した基質鎖を用いて2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを測定した結果、G(+3)由来のイミノプロトンシグナルを同定し、その化学シフト値を決定した。これにより、G(+3)は塩基対を形成する事が明らかとなった。また、この実験を行うに当たって、これまで困難であった長鎖RNAの任意のグアノシン残基を一残基のみ安定同位体標識する方法を新規に開発した。

4章ではIre1p 944-1115の主鎖の帰属と基質RNAを用いたNMR滴定実験を行い、基質存在下で影響を受けるIre1p内のアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、基質存在下で顕著なNMRシグナル変化を示す7つの残基を同定した。

### 5.2 考察

Ire1pが認識する切断配列として5'-C(-3)NG(-1)NNG(+3)N-3'のコンセンサス配列があり、Ire1pはコンセンサス配列内のG(-1)の3'側を切断する。また、mRNA上でコンセンサス配列をループとしたステムループ構造の形成が種を超えて保存されている。

コンセンサス配列について詳細に検討を行った結果、Ire1pはこの7塩基のコンセンサス配列のみでも基質となる事が分かった。しかしながらコンセンサス配列が分子間で二重鎖を形成する場合、顕著な切断効率の低下が確認されたため、コンセンサス配列は一本鎖である必要も考えられた。さらに配列変異体を用いた実験から、コンセンサス配列中に保存されているG(-1)は、切断部位の認識に非常に重要である事が示された。しかしながらIre1pの認識配列としてこのG(-1)のみでは不十分で、コンセンサス配列

中の別の配列条件が必要である事も示された。

コンセンサス配列の変異体と NMR 分光法を用いたイミノプロトンシグナルの解析の結果から、コンセンサス配列内の保存残基 C(-3)と G(+3)が塩基対形成する可能性が示唆された。

以上より、Ire1p/IRE1 が切断部位として認識する基質配列はコンセンサス配列中の C(-3), G(+3)間で塩基対を形成し、二残基目に G(-1)を持つテトラループであると考えられた。実際 *HAC1* mRNA、*hXBPI* mRNA 双方の配列中に見られる CNGNNGN 配列について二次構造予測を行った結果、そのような構造をとる配列は本来のスプライシング部位のみであり、他の CNGNNGN 配列では確認されなかった。

### 5.3 本論文のまとめ

本研究において同定された Ire1p の RNase ドメインは、Kinase ドメインの関与無しに高い切断活性を有することが分かった。また、Ire1p が認識する RNA 配列として 7 塩基のコンセンサス配列(5'-C(-3)NG(-1)NNG(+3)N-3')だけで十分であること、切断部位の認識として保存残基である G(-1)が必須である事が分かった。また-3 位と+3 位の残基では、その 2 塩基間での相補的な配列関係を保持する事で塩基置換が可能である事が示された。

加えて、これまで困難であった長鎖 RNA 内の任意のグアノシン残基のみに安定同位体標識をする新規方法論を確立した。また本手法を上記コンセンサス配列中の G(+3)に適用し、G(+3)が塩基対形成していることを示すことに成功した。

## 6 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究を始めた初期から御指導、御鞭撻を賜り、また、長い学生生活において御理解と御助力を賜りました大阪大学蛋白質研究所、児嶋長次郎准教授に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、研究者としての考え方を御教示賜りました東北大学薬学研究科、田中好幸准教授に謹んで感謝いたします。

本論文の審査にあたり、御懇篤なる御指導並びに御助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、真木壽治教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本論文の審査にあたって、有益なる御指導ならびに御助言賜り、研究サンプルの御提供ならびに御助力を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、河野憲二教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益なる御指導並びに御助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、箱嶋敏雄教授ならびに橋本隆教授に厚く御礼申し上げます。

アミノ酸選択標識法を用いたNMRスペクトルの帰属にあたり、多大なる御助力を賜りました三菱化学生命科学研究所、河野俊之博士ならびに田中利好修士に厚く御礼申し上げます。

部位特異的安定同位体標識法開発にあたって、多大なる御助力を賜りました三井化学、春田佳一郎修士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに東北大学薬学研究科への出向にあたり、研究室へ暖かく迎え入れてくださり、御指導賜りました東北大学薬学研究科、根東義則教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御懇篤なる御助力を賜りました大阪大学蛋白質研究所、藤原敏道教授ならびに池上貴久准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、東北大学での3年間、共に過ごし御助力をいただきました東北大学薬学研究科分子変換化学分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究室へ暖かく迎え入れてくださった大阪大学蛋白質研究所機能構造計測学研究室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

また、精神的に支えてくれた友人に深く感謝いたします。

そして最後に、ここまでわがままな娘を、精神的ならびに経済的に支えてくれた両親と家族に深く感謝いたします。

平成 23年 12月 20日 河原郁美

## 7 参考文献

Aragón, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I. M., Korennykh, A. V., Rubio, C. a, and Walter, P. (2009). Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* 457, 736–740.

Back, S. H., Schröder, M., Lee, K., Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2005). ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* (San Diego, Calif.) 35, 395–416.

Batey, R. T., Inada, M., Kujawinski, E., Puglisi, J. D., and Williamson, J. R. (1992). Preparation of isotopically labeled ribonucleotides for multidimensional NMR spectroscopy of RNA. *Nucleic Acids Research* 20, 4515–4523.

Burke, J.M., Irvine, K.D., Kaneko, K.J., Kerker, B.J., Oettgen, A.B., Tierney, W.M., Williamson, C.L., Zaug, A.J. and Cech, T.R. (1986). Role of conserved sequence elements 9L and 2 in self-splicing of the *Tetrahymena* ribosomal RNA precursor. *Cell* 45, 167-176.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96.

Cech, T.R., Zaug, A.J. and Grabowski, P.J. (1981). In Vitro Splicing of the Ribosomal RNA Precursor of *Tetrahymena*: Involvement of Guanosine Nucleotide in the Excision of the Intervening Sequence. *Cell* 27, 487-496.

Cech, T.R. (1990). Self-splicing of group I introns. *Annual Review of Biochemistry* 59, 543-568 and references cited therein.

Chakrabarti, A., Chen, A. W., and Varner, J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2777–2793. and references cited therein.

Chapman, R., Sidrauski, C., Walter, P. (1998) Intracellular Signaling from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus. *Annual Review of Cell and Developmental*

Biology 14, 459-485. and references cited therein.

Cox, J. S., Shamu, C. E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein Kinase. *Cell* 73, 1197–1206.

Cox, J. S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87, 391–404.

Dong, B., Niwa, M., Walter, P., Dong, B., Niwa, M., Walter, P., and Silverman, R. H. (2001). Basis for regulated RNA cleavage by functional analysis of RNase L  
Basis for regulated RNA cleavage by functional analysis of RNase L and Ire1p. *RNA* 7, 361–373.

Endou, Y., Kohno, T., Morita, H. (2004). Method of nmr measurement of protein. Mitsubishi Chemical August 2004: Patent No. WO 2004/070371

Endou, Y. and Kohno, T. (2005). Method of synthesizing amino-acid-selectively labeled protein. Mitsubishi Chemical February 2005: Patent No. WO 2005/010195

Gohda, K., Oka, K., Tomita, K., and Hakoshima, T. (1994). Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 17531–17536.

Gonzalez, T. N., Sidrauski, C., Dörfler, S., and Walter, P. (1999). Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *The EMBO Journal* 18, 3119–3132.

Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident Kinase. *Nature* 398, 271-274

Hayashi, K., and Kojima, C. (2010). Efficient protein production method for NMR using soluble protein tags with cold shock expression vector. *Journal of Biomolecular NMR* 48, 147–155.

Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L. H. (2011). The Unfolded

Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1 $\alpha$ . *Physiological Reviews* 91, 1219–1243.

Hooks, K. B., and Griffiths-jones, S. (2011). Conserved RNA structure in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron. *RNA Biology* 8, 1–5.

Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1997). Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1845–1862.

Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 1802–1807.

Kim, S. H., Sussman, J. L., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, a, Wang, a H., Seeman, N. C., and Rich, a (1974). The general structure of transfer RNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 4970–4974.

Kohno, K. (2007). How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 2295–2303. and references cited therein.

Kohno, T. (2005). Nmr signal assignment method. Mitsubishi Chemical August 2005: Patent No. WO 2005/073747

Korenykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. a, Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., and Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* 457, 687–693.

Korenykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. a, Finer-Moore, J., Stroud, R. M., Zhang, C., Shokat, K. M., and Walter, P. (2011). Cofactor-mediated conformational control in the bifunctional kinase/RNase Ire1. *BMC Biology* 9, 48.

Kozutsumi, Y., Seal, M., Normington, K., Gething, M. J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of

glucose-regulated proteins. *Nature* 31, 462-464.

Lee, K. P. K., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T. E., and Sicheri, F. (2008). Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 132, 89–100.

Martick, M., and Scott, W. G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* 126, 309–320.

Mori, K., Ma, W., Gething, M. J., and Sambrook, J. (1993). A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743–756.

Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4660–4665.

Mori, K. (2003). Frame switch splicing and regulated intramembrane proteolysis: key words to understand the unfolded protein response. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 4, 519–528.

Murphy, F. L., and Cech, T. R. (1989). Alteration of substrate specificity for the endoribonucleolytic cleavage of RNA by the Tetrahymena ribozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9218–9222.

Nikawa, J., Akiyoshi, M., Hirata, S., and Fukuda, T. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Research* 24, 4222–4226.

Nikonowicz, E. P., Sirr, a, Legault, P., Jucker, F. M., Baer, L. M., and Pardi, a (1992). Preparation of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labelled RNAs for heteronuclear multi-dimensional NMR studies. *Nucleic Acids Research* 20, 4507–4513.

Niwa, M., Patil, C. K., DeRisi, J., and Walter, P. (2005). Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease. *Genome Biology* 6, R3.



Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., and Iwawaki, T. (2010). Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 $\alpha$ . *Nucleic Acids Research* *1*, 1–9.

Orita, M., Vinayak, R., Andrus, A., Warashina, M., Chiba, A., Kaniwa, H., Nishikawa, F., Nishikawa, S., and Taira, K. (1996). Magnesium-mediated Conversion of an Inactive Form of a Hammerhead Ribozyme to an Active Complex with Its Substrate. *The Journal of Biological Chemistry* *271*, 9447-9454.

Pley, H. W., Flaherty, K. M., Mckay, D. B. (1994), Three-dimensional structure of hammerhead ribozyme. *Nature* *372*, 68-74.

Pomeranz Krummel, D. a, Oubridge, C., Leung, A. K. W., Li, J., and Nagai, K. (2009). Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* *458*, 475–480.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* *8*, 519–529. and references cited therein.

Rüegsegger, U., Leber, J. H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* *107*, 103–114.

Salminen, A., Kauppinen, A., Suuronen, T., Kaarniranta, K., and Ojala, J. (2009). ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *Journal of Neuroinflammation* *6*, 41.

Schröder, M., and Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research* *569*, 29–63. and references cited therein.

Scott, W. G., Finch, J. T., and Klug, A. (1995). The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* *81*, 991–1002.

Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein

response. *Cell* 90, 1031–1039.

Shamu, C. E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO Journal* 15, 3028–3039.

Steyaert J. and Wyns L. (1993), Functional interactions among the His40, Glu58 and His92 catalytic sites of ribonuclease T1 as studied by double and triple mutants. *Journal of Molecular Biology* 229, 770-781.

Tanaka, Y., Kojima, C., Yamazaki, T., Kodama, T. S., Yasuno, K., Miyashita, S., Ono, A., Kainosho, M., and Kyogoku, Y. (2000). Solution structure of an RNA duplex including a C-U base pair. *Biochemistry* 39, 7074–7080.

Tanaka, Y., Kojima, C., Morita, E. H., Kasai, Y., Yamazaki, K., Ono, A., Kainosho, M., and Taira, K. (2002). Identification of the metal ion binding site on an RNA motif from hammerhead ribozymes using  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 124, 4595–4601.

Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., and Kaufman, R. J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes & Development* 14, 2725–2736.

Wang, G., Gaffney, B. L., and Jones, R. A. (2004). Differential binding of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$  at two sites in a hammerhead ribozyme motif, determined by  $^{15}\text{N}$  NMR. *Journal of the American Chemical Society* 126, 8908–8909.

Williams, K. P., Fujimoto, D. N., and Inoue, T. (1992). A region of group I introns that contains universally conserved residues but is not essential for self-splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10400–10404.

Williamson, C.L., Desai, N. M. and Burke, J. M. (1989) Compensatory mutations demonstrate that P8 and P6 are RNA secondary structure elements important for processing of a group I intron. *Nucleic Acids Research*. 17, 675-689.

Xu, J., Lapham, J., and Crothers, D. M. (1996). Determining RNA solution structure by segmental isotopic labeling and NMR: application to *Caenorhabditis*

*C. elegans* spliced leader RNA 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 44–48.

Xue, S., Calvin, K., and Li, H. (2006). RNA recognition and cleavage by a splicing endonuclease. Science (New York, N.Y.) *312*, 906–910.

Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Article Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA. Molecular Cell *34*, 191–200.

Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H. and Kohno, K. (2011). Translational Pausing Ensures Membrane Targeting and Cytoplasmic Splicing of XBP1u mRNA. Science *311*, 586–589.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, a, Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell *107*, 881–891.

Zaug, J., Been, M.D. and Cech, T.R. (1986) The *Tetrahymena* ribozyme acts like an RNA restriction endonuclease. Nature *324*, 429-433.

Zhang, X., Gaffney, B. L., and Jones, R. a (1998). <sup>15</sup>N NMR of RNA Fragments Containing Specifically Labeled GU and GC Pairs. Journal of the American Chemical Society *120*, 615–618.