

研究課題別評価書

1. 研究課題名

「純和製リボザイム DSL」を基盤とした RNA 工学の開発

2. 氏名

井川 善也

3. 研究のねらい

「機能性生体高分子のテーラーメイドな創製」は、RNA に限らず広く生体高分子の研究において、基礎化学・生物学的に、さらに医療・バイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。従来、その創製法としては、「立体構造的知見に基づく合理的な分子設計(デザイン法)」と「ランダム配列ライブラリーからの進化工学を用いた選択(セレクション法)」という、原理が異なる2つのアプローチが試みられてきたが、両手法は固有の長所と短所を有している。本研究では、両手法を融合化することで短所を克服し、長所を組み合わせた次世代の機能性生体高分子の人工創製法である「Design & Selection 法(DS 法)」を基盤とし、以下の2課題について研究を行った。(1)新規な機能性 RNA の創製による DS 法の汎用性の実証。(2)DS 法により創製されたリボザイムのモジュール集積構造を活かした高機能化。

4. 研究成果

(1)新規な機能性 RNA の創製による DS 法の汎用性の実証

(A) DS 法による新規モジュール集積型リボザイム YFL の創製および機能・構造解析

Design & Selection法の有用性は本研究以前に高機能リガーゼ・リボザイムDSLの創製により実証されていたが、その汎用性の実証には、複数の異なる機能性RNAの人工創製例が必要である。本研究では、DSLリボザイムと類似のRNA構造体を骨格構造として、DS法により、 β -NMNを脱離基とする人工リボザイムの創製を行い、YFLと命名した新規リボザイムの創製に成功した。

YFLリボザイムはDS法に基づくモジュール集積型の構造を有し、その触媒ユニットは β -NMN依存的なRNA断片間の連結反応を 10^5 倍加速することを明らかにした。さらに機能・構造相関の解析より、YFLリボザイムは連結反応の脱離基として β -NMNだけでなく、ピロリン酸も利用できることを明らかにした。RNAワールド仮説において

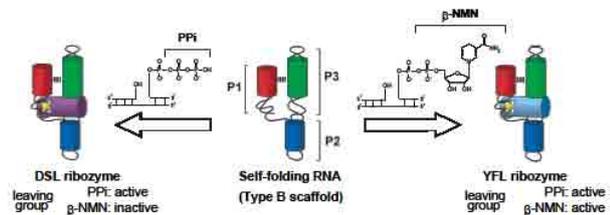


図1 DSL、YFL リボザイムのモジュール構成

リガーゼあるいはポリメラーゼリボザイムは、核酸型の脱離基を用いるタイプからピロリン酸を用いるタイプへと進化した可能性が提唱されている。YFLリボザイムの脱離基特性はこの仮説の実証モデルの初めての例である。生化学的な構造解析より、YFLリボザイムの触媒ユニットは3および13塩基からなる小さな内部ループで構成されていることを明らかにした。従来の人工リガーゼ・リボザイムにない単純な触媒ユニットは、3'-末端の一本鎖領域による干渉(不活性構造の形成)に敏感であり、その干渉を低減するために、3'-末端のヘアピン構造(図2)が重要な役割を果たしている事を明らかにした。

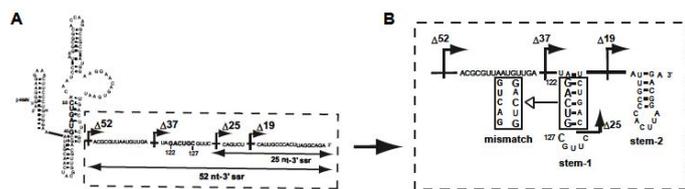


図2 YFL リボザイムの活性構造。3 領域が stem-1'ヘアピンを形成し、不活性構造を誘起する配列 (R41-46) を遮蔽する。

(B) モジュール集積型 RNA によるペプチド連結システムの構築および機能解析

mRNA の遺伝情報をペプチド配列に翻訳する過程の主役であるリボソームは mRNA 配列に対応してアミノアシル tRNA を配置し、ペプチド結合の形成を促進する。近年の構造解析からリボソーム上でのペプチド結合生成の加速機構は近接効果が主たる駆動力であり、反応加速におけるリボソームの役割は mRNA 配列依存的に二つの反応基質を正しく配置する鑄型機能であることが明らかになりつつある。RNA-RNA 間の高次相互作用モジュールと RNA-ペプチド相互作用モジュールを DS 法により集積することで、リボソーム類似の鑄型効果を発揮する RNA を構築し RNA 上でのペプチド形成反応のモデル系を創製した。モジュール集積型 RNA として、天然リボザイムの構造ドメイン、人工創製された RNA 構造体を用い、DS 法により2組のペプチド認識モチーフを導入した。ペプチドのみでは反応がほとんど進行しない条件下、人工 RNA の添加により連結反応は大きく促進された。鑄型のプラットフォームとして用いる RNA 構造体としては人工創製された自己組織能をもつ tectoRNA(図3)が最も優れていることを明らかにした。この結果は、リボソーム、スプライセオソーム等、高次機能を有する RNP の RNA 成分が複数の RNA 分子から構成されることと関連して興味深い。

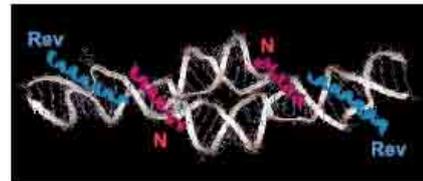


図3 tectoRNAを基盤とする人工RNP

(2) DS 法により創製されたリボザイムのモジュール集積構造を活かした高機能化

(A) モジュール工学による DSL リボザイムのターンオーバー能力の最適化

DS 法により最初に創製された人工リボザイム DSL は基質ユニットと触媒ユニットが共有結合で連結されているが、両ユニット間の認識モチーフを非共有結合相互作用モチーフである GNRA ループ/レセプターで置き換えることにより、基質ユニットと触媒ユニットの物理的分割が可能となる。基質と触媒ユニット間の認識が2組の GNRA ループ/レセプター相互作用に担われる transDSL リボザイムは、人工リガーゼ・リボザイムとしては例外的にターンオーバー能力を有する。2組の GNRA ループ/レセプター相互作用モジュールの組み合わせを系統的に変化させ、ターンオーバー能が最大となる組み合わせを探索した。その結果、GGAA/R(1)とGAAA/R(11nt)の2種のモジュールを上部および下部にそれぞれ導入した transDSL リボザイムは、1分間に約1回、総計 500 ターンオーバーの触媒能を示した。この値は類似の反応を触媒する蛋白質酵素には及ばないが、生成物阻害を受け易いリガーゼ・リボザイムとしては卓越した値である。

(B) モジュール工学による DSL リボザイムの基質認識モチーフの改変

トランス型人工リボザイム DSL (transDSL) はそのモジュール性に基づき、二組の相互作用モジュールを介して基質ユニットと触媒ユニット間の分子認識を達成している。transDSL リボザイムに対するモジュール工学の適用範囲を検討するため、二組の相互作用モジュールに対し、GNRA ループ/レセプター・モジュール、ワトソン-クリック塩基対モジュール、C-loop/レセプター・モジュールを系統的に導入し、その活性への影響を検討した。その結果、ワトソン-クリック塩基対モジュールを上部ユニットに有する変異体(図4、transDSL-upBP)のみ活性が見られないものの、その他の相互作用モジュールの組み合わせは、いずれも触媒活性を保持していた。この結果は DSL リボザイムの基質認識ユニットに対し、モジュール工学が有効かつ柔軟に適用できることを示している。また、下部モジュールとして11塩基対を有する変異体(transDSL-S2E)はターンオーバー能を保持する事も明らかにした。これは以前に報告された下部モジュールとして10塩基対を有する類似の変異体がターンオーバー能を示さないのと異なり、ワトソン-クリック塩基対モジュールについても適切な分子設計により、高次機能を付与できることを示唆している。

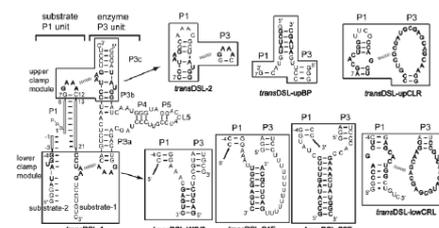


図4 基質認識モジュールの交換

5. 自己評価

研究期間内にDS法により新規な人工リボザイムYFLの構築と機能解析、およびペプチド連結を促進するモジュール型RNAの創製に成功したことは、DS法の汎用性の実証として一定の成果と考えている。本研究期間中にDS法の適用例が他グループからも報告されていることを考えると、「DS法のRNA工学の汎用法としての確立」という当初目的はかなり達せられたと言える。しかしながら、バイオセンシングなど「役立つツール」の創製まで至らなかった事は力不足であった。現在進展中の課題には応用展開に有望な結果が得られつつあるため、それらの完成により本研究の当初目的の完全な達成を目指したい。

6. 研究総括の見解

機能を持つ人工RNAの創製は、基礎化学、生物学、さらには医療やバイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。これまで、創製法として、「立体構造的知見に基づく合理的な分子設計(デザイン法)」と「ランダム配列ライブラリーからの進化工学を用いた選択(セレクション法)」の2つのアプローチが試みられてきた。本研究では、これら創製法の長所を組み合わせ「Design and Selection法(DS法)」を基盤とし、機能性人工RNAの創製を行った。その結果、DS法により新規な人工リボザイムの構築に成功し、さらにペプチド連結反応を促進するモジュール型RNAの創製に成功したことは高く評価出来る。今後、さらに天然の機能性RNAの機能レベルに迫る人工RNA分子の創製に向けた研究を加速して欲しい。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表 *Corresponding author

1. Y. Fujita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Tailoring RNA modular unit on a common scaffold: a modular ribozyme with a catalytic unit for β -nicotinamide-activated RNA ligation. *RNA* **15**, 877-888 (2009).
2. J. Ishikawa, S. Matsumura, L. Jaeger, T. Inoue, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Rational optimization of the DSL ligase ribozyme with GNRA/receptor interacting modules. *Arch. Biochem. Biophys.* **490**, 163-170 (2009).
3. N. Kashiwagi, K. Yamashita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Designed RNAs with two peptide binding units as artificial templates for native chemical ligation of RNA binding peptides. *ChemBioChem* **10**, 2745-2752 (2009)
4. Y. Fujita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Evolutionary optimization of a modular ligase ribozyme: a small catalytic unit and a hairpin motif masking an element that could form an inactive structure. *Nucleic Acids Res.* **38**, in press (2010)
5. J. Ishikawa, N. Isomoto, Y. Fujita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** The *trans*DSL ligase ribozyme can utilize various forms of modules to clamp its substrate and enzyme units. *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, in press (2010).

(2) 総説

1. 井川善也 RNA医薬としてのリボザイムの現状と展望
「核酸医薬の最前線」(CMC出版), p176-186 (2009)
2. 井川善也 RNAワールドへの逆進化 「最新RNAと疾患研究」(遺伝子医学MOOK)
(メディカルDO), p198-202 (2009)

(3) 招待講演

1. RNA Technology through Design & Evolution 56th Global Seminar, Joint Seminar on "DNA/RNA Nanobio" (福岡, H20年9月5日)
2. RNA Science & Technology through Design & Evolution Prof. Jean-Marie Lehn

Symposium III (福岡, H20 年 10 月 17 日)

3. RNA モジュール工学: 分子デザインと進化工学の複合法による機能性 RNA の人工創製 第 23 回日本薬物動態学会年会(若手研究者シンポジウム)(熊本, H20 年 11 月 1 日)
4. Toward a reciprocal evolution system between RNA and peptides as an artificial model for the early RNP world The 6th international symposium on nucleic acids chemistry (高山, H21 年 9 月 28 日)
5. RNP ワールドの単純モデル系としてのデザイン型 RNA-ペプチド複合体 第 82 回日本生化学会年会 シンポジウム (生命の起源と初期進化)(神戸, H21 年 10 月 21 日)

(B) 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

1. S. P. Ohuchi, Y. Ikawa and Y. Nakamura Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3600-3607 (2008).
2. Y. Ikawa, S. Moriyama and H. Furuta Facile syntheses of BODIPY derivatives for fluorescent labeling of the 5' and 3' ends of RNAs. *Anal. Biochem.* **378**, 166-170 (2008).
3. Y. Ikawa, T. Shiohara, S. Ohuchi and T. Inoue Concerted effects of two activator modules on the group I ribozyme reaction. *J. Biochem.(Tokyo)* **145**, 429-435 (2009).
4. N. Kashiwagi, H. Furuta and Y. Ikawa Primitive templated catalysis of a peptide ligation by self-folding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2574-2583 (2009).
5. S. Matsumura, R. Ohmori, H. Saito, Y. Ikawa and T. Inoue Coordinated control of a designed trans-acting ligase ribozyme by a loop-receptor interaction. *FEBS Lett.* **583**, 2819-2826 (2009)