

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20550145

研究課題名（和文） 遺伝子治療薬リボザイムのラショナルデザイン

研究課題名（英文） Rational Design of Gene-Therapeutic Ribozyme

研究代表者

田中 好幸 (TANAKA YOSHIYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70333797

研究成果の概要（和文）：

リボザイムによる遺伝子治療では mRNA に UC、UA、UU のいずれかの配列が無ければ異常 mRNA を切断できないが、これがリボザイムの遺伝子治療応用への障害となっている。そこで本研究では三次元構造に基づきリボザイムを改変し、上記を越える広範囲の配列を切断可能なリボザイム創製に成功した（切断必須配列の改変・拡張）。これによりリボザイムで切断可能な異常 mRNA の数が飛躍的に増え、リボザイムを汎用的な遺伝子治療薬とできると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Gene therapy using hammerhead ribozyme were studied. It is known that hammerhead ribozyme can only cleave RNAs with UC or UA or UU sequence near the cleavage site. Based on the crystal structure of the hammerhead ribozyme, we drastically expanded the variations of the cleavable sequences, in a logical and rational manner (base-substitutions or a non-standard base-introduction into the hammerhead ribozyme). These modified ribozymes with wider cleavable sequences could be useful for a gene therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学

1. 研究開始当初の背景

遺伝治療に於いては異常 mRNA の変異をおこした部位の配列を特異的に認識して、その mRNA の発現のみを押さえることが必要である。発現抑制の方法としては、異常 mRNA と二重らせん形成 (hybridization) して翻訳抑制を行うアンチセンス核酸法と、異常 mRNA 配列を切断する方法とが存在する。後者の方法には RNA 干渉を利用した方

法と、リボザイムのような RNA 鎖切断活性を有した酵素 RNA 分子を利用する方法が存在する。RNA 干渉法が点変異 (point mutation) の認識を苦手としているのに対して (異常配列のみでなく正常配列の発現抑制: off-target 効果)、リボザイムでは酵素の反応の基質 (配列) 特異性を利用して異常 mRNA のみの発現抑制が原理的に可能である。そこでリボザイム法の問題点を解決し、

より汎用性の高い方法へと改良することを試みた。なお今回は基質となるための配列要求性が低いハンマーヘッド型リボザイムの改良を行った。

ところで、ハンマーヘッド型リボザイムによる遺伝子治療では mRNA に UC、UA、UU のいずれかの配列が無ければ異常 mRNA を切断できないが、これがリボザイムを遺伝子治療応用する際の障害となっている。そこで本研究では三次元構造に基づきリボザイムを改変し、上記以外の配列も切断可能なリボザイムを創製（切断必須配列の改変・拡張）することを目指した。これによりリボザイムで切断可能な異常 mRNA の数が飛躍的に増え、リボザイムを汎用的な遺伝子治療薬とできると期待される。

2. 研究の目的

上述の背景に示した通り、ハンマーヘッド型リボザイムでは切断可能な RNA 配列のバリエーションが限られている。即ち、治療可能な異常 mRNA と不可能な mRNA が存在する。ハンマーヘッド型リボザイムのこの制限をなくして、より汎用性の高いリボザイムを作成できれば有効な遺伝子治療薬となる。

しかしながら触媒する化学反応の基質特異性が高いのがリボザイムのような酵素の最大の特徴であり、簡単には達成できない目標である（散発的な変異導入等では到底到達不能である）。即ち、酵素分子（ハンマーヘッド型リボザイム）の構造化学特性を把握した上で、メカニズムに根ざした明確な改変指針を立てて論理的かつシステムティックな改変を加えることが必要となる。

ハンマーヘッド型リボザイムに対してこのような改変を行うにあたり、重要な発見が二つある。一つ目は、活性中心となるコア配列の外側に、二重らせん領域同士を近づけるためのループ・ループ相互作用モチーフが存在し (Figure 1)、本モチーフを有したリボザイムが高活性となる、という発見である (Khvorova et al. *Nature Structural Biology*, 2003, 10, 708-712.)。二つ目は、このループ・ループ相互作用モチーフを有したハンマーヘッド型リボザイムの結晶構造が解かれていることである (Martick and Scott, *Cell*, 2006, 126, 309-320.) (Figure 2)。

従って、本研究においてはループ・ループ相互作用モチーフを有した高活性ハンマーヘッド型リボザイムを用いて、上記結晶構造に基づき、論理的に切断可能配列を拡張するための配列改変を試みた。

3. 研究の方法

3 (1) ループ・ループ相互作用モチーフを有した天然型ハンマーヘッド型リボザイムの

切断可能配列の再検討

背景の章にて、ハンマーヘッド型リボザイムでは、基質 RNA 鎖の切断部位に UC、UA、UU のいずれかの配列があることが切断を受けるために必須であることを述べた。しかしこの認識はループ・ループ相互作用モチーフの存在が明らかになる前に決められたものであり、高活性型のループ・ループ相互作用モチーフを有したリボザイムでも同様の配列が切断を受けるための必須配列であるかどうかはデータが存在しない。そこで最初に高活性型リボザイムが切断可能な配列を調べることから着手した。

具体的には切断部位に必要な二塩基分の配列として（二次構造上 UX として示されている配列）、考えられる 16 種類の配列を導入した RNA 配列 (21 塩基) を調製した。なお基質のその他の配列およびハンマーヘッド型リボザイムの配列は、先の結晶構造の論文 (Martick and Scott, *Cell*, 2006, 126, 309-320.) において用いられていた塩基配列とした。

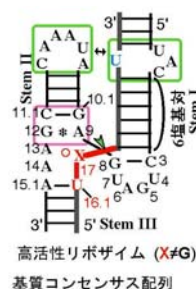


Figure 1. ループ・ループ相互作用モチーフを有したハンマーヘッド型リボザイムの二次構造

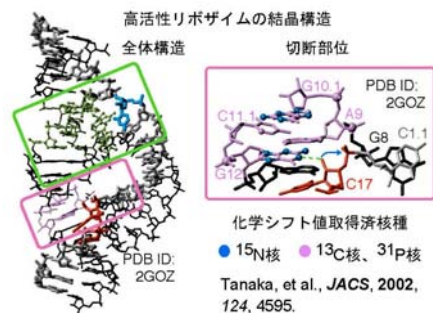


Figure 2. ループ・ループ相互作用モチーフを有したハンマーヘッド型リボザイムの三次元構造

3 (2) 改変型ハンマーヘッド型リボザイムの切断可能配列の検討

先の結晶構造の論文 (Martick and Scott, *Cell*, 2006, 126, 309-320.) において、C3 残基と G8 残基が塩基対を形成していることが明らかとなっている。加えて、グアノシンとシチジンを入れ替えた G3-C8 変異体も活性をもつことが示されており、この位置の二つの塩基は塩基対形成していることが活性をもつために必要条件であることが示された。従って、本変異体の切断可能配列は天然型

リボザイムと似た配列となることが予想されるが、微妙な構造特性の違いにより、切断可能な配列のバリエーションが天然型と異なる可能性も充分にある。しかしながら、本変異体に関する切断可能な基質配列を網羅的に調べたデータは存在しない。そこで、G3-C8 変異体 (Figure 3) を作製し、各変異体の切断可能配列を調べることにした。

またこの二つの塩基が塩基対を形成することが必要充分条件であるなら、この部位の塩基を U3-A8 に改変することも可能であると期待される。そこで U3-A8 変異体 (Figure 3) についても作製して、本変異体が切断可能な基質配列について検証した。

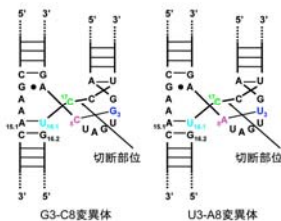


Figure 3. G3-C8 変異体及び U3-A8 変異体のコア配列と二次構造

3 (3) 立体構造に基づくハンマーヘッド型リボザイムの切断可能配列の改変への挑戦

ここでは UX 配列の U (U16.1) が C (C16.1) に置換されても切断可能なリボザイムを設計した (Figure 4)。切断配列に U が必要な理由は、塩基対の相手が A15.1 であること、さらに A15.1 残基が G5 残基と van der Waals 接触・水素結合をして基質結合ポケットを形成しているためである (Figure 4a)。この三次元相互作用を保存しつつ U を C に置換するには C16.1 の塩基対の相手をイノシン (I15.1) にすればよい (G15.1 では立体反発で構造が崩れる)。そこで、配列改変 (CX 配列切断) リボザイムを作製し (Figure 4b)、活性を評価した。

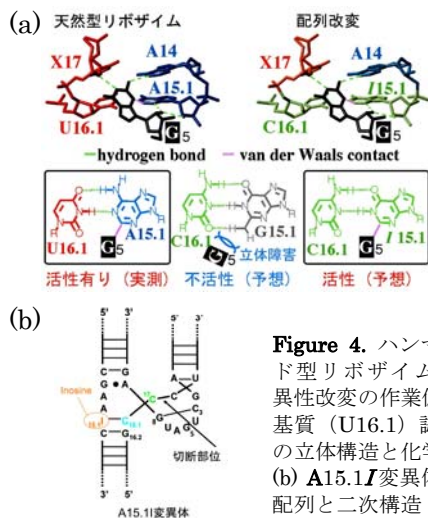


Figure 4. ハンマーヘッド型リボザイム基質特異性改変の作業仮説。(a) 基質 (U16.1) 認識部位の立体構造と化学構造。(b) A15.1I 変異体のコア配列と二次構造

4. 研究成果

4 (1) ループ・ループ相互作用モチーフを有した天然型ハンマーヘッド型リボザイムの切断可能配列の再検討

本サブテーマでは、高活性型のループ・ループ相互作用モチーフを有したリボザイムの切断可能な配列のバリエーションを調べた。

Figure 1 に示す天然型配列を有したハンマーヘッド型リボザイム、および、切断部位に 16 通りのバリエーションをもたせた基質配列を化学合成により調製した。次にリボザイムによる基質切断実験を行った。今回はリボザイムによる切断反応が飽和した時点での切断割合を指標として活性を評価することとした (Figure 5)。

本実験の結果、ループ・ループ相互作用モチーフを有した高活性型ハンマーヘッド型リボザイム (天然型配列) は、従来知られていた切断可能配列のバリエーションより広い基質配列を切断可能であることが示された (Figure 5)。従来は UX (X≠G) という配列が必須であったが、今回の実験により ZX (Z≠C; X≠G) および CC という配列が切断可能であることが示された (Figure 5)。この発見は 20 年来信じられてきた知見 (切断部位の必須配列) を大きく覆すものである。特に遺伝子治療という観点からは、ループ・ループ相互作用を導入することで、切断可能な配列バリエーションが大幅に上げられることが示されたことの意義は大きい。

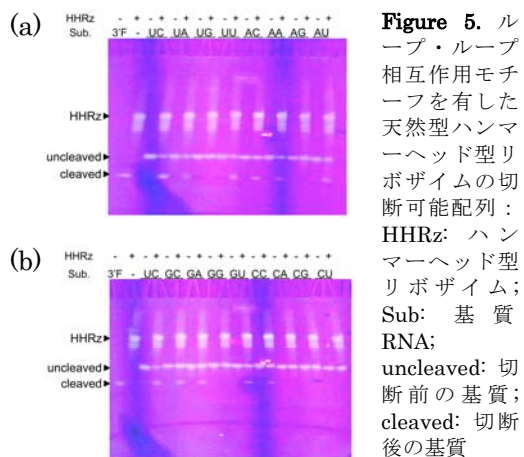


Figure 5. ループ・ループ相互作用モチーフを有した天然型ハンマーヘッド型リボザイムの切断可能配列: HHRz: ハンマーヘッド型リボザイム; Sub: 基質 RNA; uncleaved: 切断前の基質; cleaved: 切断後の基質

4 (2) 改変型ハンマーヘッド型リボザイムの切断可能配列の検討

ここでは、高活性型のループ・ループ相互作用モチーフを有したリボザイムの配列に変異を導入した改変型リボザイムの切断可能な配列のバリエーションを調べた。

Figure 3 に示す改変型ハンマーヘッド型リボザイム、および、切断部位に 16 通りのバリエーションをもたせた基質配列を化学

合成により調製した。改変型リボザイムとしては、G3-C8 変異体 (Figure 3)、U3-A8 変異体 (Figure 3) の二種類の改変リボザイムを調製した。次にリボザイムによる基質切断実験を行った。今回もリボザイムによる切断反応が飽和した時点での切断割合を指標として活性を評価することとした (Figure 6)。

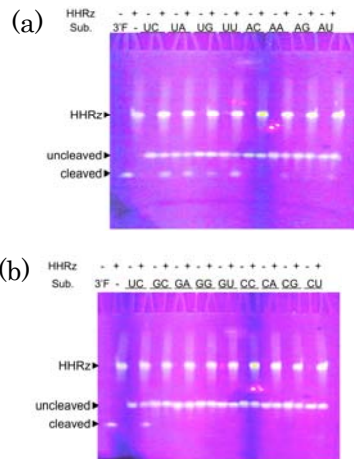


Figure 6. 改変型ハンマーヘッド型リボザイム (G3-C8) の切断可能配列の検証: HHRz: ハンマーヘッド型リボザイム; Sub: 基質 RNA; uncleaved: 切断前の基質; cleaved: 切断後の基質

まずは改変型ハンマーヘッド型リボザイム (G3-C8) の結果について述べる (Figure 6)。本改変型リボザイムは従来の報告通り、活性を有していた。しかし天然型リボザイムと比べると、おしなべて活性が低いことが判った。切断可能配列という観点からは、本改変型リボザイム (G3-C8) は天然型と非常に近い切断可能配列を有していると思われる。しかし残念ながら、本改変型リボザイムは活性自体が低いため、結果論的に切断可能と言える配列バリエーションが天然型より少なくなっている。切断可能配列のバリエーションが少なくなったとはいうものの、この結果も従来知られていた切断可能配列のバリエーションより広い基質配列を切断可能であることが示された。

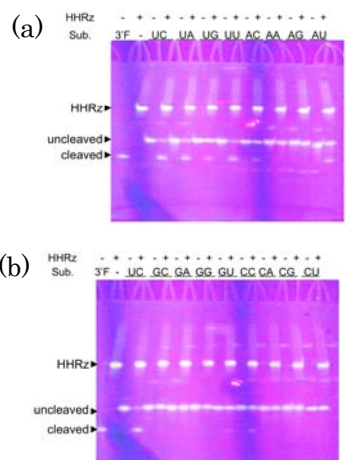


Figure 7. 改変型ハンマーヘッド型リボザイム (U3-A8) の切断可能配列の検証: HHRz: ハンマーヘッド型リボザイム; Sub: 基質 RNA; uncleaved: 切断前の基質; cleaved: 切断後の基質

次に改変型ハンマーヘッド型リボザイム

(U3-A8) の結果について述べる。本改変型リボザイムも従来の報告通り、活性を有していた (Figure 7)。先の改変型リボザイム (G3-C8) と同様、天然型リボザイムより活性が低かった (Figure 7)。切断可能配列という観点でも、改変型リボザイム (G3-C8) に非常に近い配列特異性を有していると思われる (Figure 7)。その理由については、改変型リボザイム (G3-C8) と同じ議論が成り立つものと考えている。しかしこの結果も、従来知られていた切断可能配列のバリエーションより広い基質配列を切断可能であることを示しており、ループ・ループ相互作用モチーフを有したリボザイムが高活性であることの証拠であろう。

4 (3) 立体構造に基づくハンマーヘッド型リボザイムの切断可能配列の改変への挑戦

ここでは UX 配列の U (U16.1) が C (C16.1) に置換されても切断可能なりボザイムを設計した (Figure 4)。具体的には A15.1 残基をイノシン (I15.1) に置換した改変型リボザイム (A15.1I) を作製し、その切断可能配列の検証を行った。ここでも切断部位に 16 通りのバリエーションをもたせた基質配列を利用して基質切断実験を行った。今回もリボザイムによる切断反応が飽和した時点での切断割合を指標として活性を評価することとした (Figure 8)。

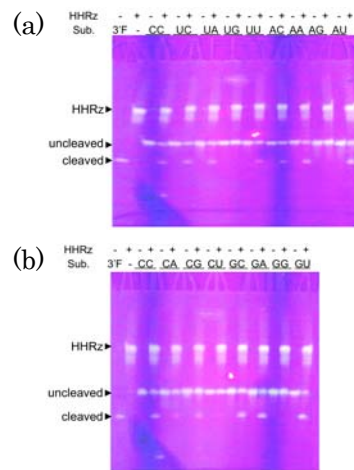


Figure 8. 改変型ハンマーヘッド型リボザイム (A15.1I) の切断可能配列の検証: HHRz: ハンマーヘッド型リボザイム; Sub: 基質 RNA; uncleaved: 切断前の基質; cleaved: 切断後の基質

改変型ハンマーヘッド型リボザイム (A15.1I) においては、当初の計画通り CN 配列 (N = A, G, C, U) が切断可能となった (Figure 8b)。立体構造に基づく酵素の論理的機能改変は想定外の事象がおきて望む機能を出せないことが多いのに対して、今回の論理的機能改変が成功したことは非常に意義深い。

なお本成果を遺伝子治療の観点からみると、改変型リボザイム (A15.1I) は、天然型

ハンマーヘッド型リボザイム（最も広い切断可能配列を有したリボザイム）でも切断が不可能であった CN 配列（N = A, G, C, U）を切断可能とするリボザイムである。

本結果をメカニズム解明の観点から眺めると、A15.1 残基の具体的な役割が見えてくる。A15.1 残基は基質 RNA 鎖の UX 配列の U16.1 残基を塩基対形成により認識するという役割に加えて、コア配列の G5 残基が活性中心の正しい位置に結合できるようなプラットフォームとして機能していることが示された。

立体構造上、A15.1 残基をグアノシンにした場合は、マイナーグループ側にアミノ基が突き出す形になり、活性が大幅に下がることが知られている（Figure 4a）。一方、アデノシンとイノシンにはマイナーグループ側に突き出した官能基がないため、マイナーグループの正しい位置に G5 残基を誘導して、活性中心を形成するのに寄与していると考えられる。即ち、論理的設計に基づく酵素の機能改変実験を通じて、メカニズム解明に通じる成果を得ることまでできた。

		Hammerhead Ribozymes			
		Wild HH	HH(KGC +C3G)	HH(KGA +C3U)	HH(A15.1)
Substrates	GUC	+++	++	+++	++
	GUU	+	++	++	++
	GUG	+	+	+	-
	GUU	++	++	++	++
	GAC	++	-	+	++
	GAA	++	+	±	++
	GAG	-	-	-	-
	GAU	++	+	+	++
	GSC	++	-	±	++
	GGA	++	-	-	++
	GSG	-	-	-	-
	GGU	++	±	±	++
	GCC	++	-	+	++
	GCA	-	-	-	++
	GCG	-	-	-	+
	GCU	-	-	-	±

Table 1. ループ・ループ相互作用を有したハンマーヘッド型リボザイムの基質配列特異性

まとめとして、天然型および改変型リボザイムの基質配列ごとの切断の可否についてまとめる（Table 1）。この結果から判ることとして、改変リボザイム（A15.1I）は天然型リボザイムで切断可能な配列は全て切断できるという非常に広範囲の基質配列を切断できるリボザイムであることも判明した。上述のように、改変リボザイム（A15.1I）は CX 配列（N = A, G, C, U）も切断可能なため、今回検証を行ったリボザイムの中で最も広い切断可能配列を有していることが判った。このように本研究により、論理的分子設計による、新規の基質切断特性を獲得した人口改変リボザイムの創製に成功した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

1. Ladislav Benda, Michal Straka,* Yoshiyuki Tanaka, and Vladimír Sychrovský*, On the Role of Mercury in the Non-Covalent Stabilisation of Consecutive U-Hg^{II}-U Metal-Mediated Nucleic Acid Base Pairs: Metallophilic Attraction Enters the World of Nucleic Acids, 査読有, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 100-103 (2011).
2. Yuya Egawa*, Yoshiyuki Tanaka, Ryota Gotoh, Satoshi Niina, Yu Kojima, Naoki Shimomura, Hiroko Nakagawa, Toshinobu Seki, and Jun-ichi Anzai, Nitrogen-15 NMR Spectroscopy of Sugar Sensor with BN Interaction as a Key Regulator of Colorimetric Signals, 査読有, *Chemistry Letters*, 39, 1188-1189 (2010).
3. 田中好幸*, DNA 分子を利用した水銀除染法及び機能性核酸構造解析法の開発研究, *The ANNALS of Intelligent Cosmos Academic Foundation*, 14, 9-12 (2010). 査読無（依頼総説）
4. Junpei Yamamoto, Yoshiyuki Tanaka and Shigenori Iwai*, Spectroscopic analysis of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct: Insights into the (6-4) photolyase reaction, 査読有, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7, 161-166 (2009).
5. Ikumi Kawahara, Kaichiro Haruta, Chojiro Kojima and Yoshiyuki Tanaka*, NMR studies of *HAC1* mRNA, 査読無, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 53, 269-270 (2009).
6. Hisaaki Tateoka, Ikumi Kawahara, Satomi Hasegawa, Kaichiro Haruta, Yoshinori Kondo, Chojiro Kojima and Yoshiyuki Tanaka*, Preparations of hammerhead ribozymes for investigations of their cleavable sequences, 査読無, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 53, 277-278 (2009).
7. Yoshiyuki Tanaka* and Akira Ono*, Nitrogen-15 NMR spectroscopy of N-metallated nucleic acids: Insights into ¹⁵N NMR parameters and N-metal bonds, 査読有, *Dalton Transactions*, 4965-4974 (2008). (Download Ranking Top 10 article in 1 Month)
8. Akira Ono*, Shiqi Cao, Humika Togashi, Mitsuru Tashiro, Takashi Fujimoto, Tomoya Machinami, Shuji Oda, Yoko Miyake, Itaru Okamoto, and Yoshiyuki Tanaka, Specific interactions between Silver(I) Ions and Cytosine-Cytosine Pairs in DNA Duplexes,

査読有, *Chemical Communications*, 4825-4827(2008).

9. 田中好幸, 鳥越秀峰, 小野晶, 新規ナノデバイス材料としてのメタロ DNA 分子の構造, *生物物理*, 48, 119-124 (2008). 査読無 (依頼総説)

[学会発表] (計 18 件)

1. Yoshiyuki Tanaka, Masato Kato, Yoshiyuki Matsuda, Vladimir Sychrovsky, Nitrogen-15 NMR Chemical Shift as a Physicochemical Probe of Key Residues in Catalytic RNAs, **10th HFSP Awardees Annual Meeting**, 2010 年 11 月 1-3 日、ケララ州 (インド) (HFSP Grant 受賞者招待)
2. 田中好幸、DNA 中で形成される古くて新しい塩基対 (T-Hg(II)- T) と N-Hg(II) 結合の性質、**第 17 回生体分子科学コロキウム**、2010 年 9 月 1 日、茨城大学・いばらき量子ビーム研究センター (招待講演)
3. 田中好幸、NMR 分光法を用いた Catalytic RNA (hammerhead ribozyme) による RNA 鎖切断機構の解析、**日本化学会第 4 回関東支部大会**、2010 年 8 月 30 日、つくば (シンポジウム - 生体高分子を機能場とする物質化学の開拓 -: シンポジスト)
4. 田中好幸、Detection of metal ion-interactions with DNA/RNA with NMR spectroscopy, **第 47 回日本生物物理学会**、2009 年 10 月 30 日、徳島 (シンポジウム - New Developments on Molecular Spectroscopy of Biometals by Young Researchers -: シンポジスト)
5. 田中好幸、NMR 分光法による核酸-金属複合体の機能・構造解析、**平成 21 年度 学術講演会** (日本薬学会東北支部主催)、2009 年 7 月 11 日、仙台 (招待講演)
6. Yoshiyuki Tanaka, Masato Kato, Yoshiyuki Matsuda, Vladimir Sychrovsky, Sample Preparation of a Catalytic RNA (Hammerhead Ribozyme) for Spectroscopy and Crystallography, **9th HFSP Awardees Annual Meeting**、2009 年 6 月 1-4 日、東京 (日本) (HFSP Grant 受賞者招待)

[図書] (計 1 件)

1. Yoshiyuki Tanaka* and Akira Ono*, Structural Studies on Mercury^{II}-mediated T-T Base-pair with NMR Spectroscopy (Chapter 16), In Nick Hadjiladis and Einar Sletten Eds., "**Metal Complexes - DNA Interactions**", John Wiley & Sons, West Sussex, UK (2009) pp439-462.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 好幸 (TANAKA YOSHIYUKI)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：70333797

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

加藤 義雄 (KATO YOSHIO)
独立行政法人産業技術総合研究所・
セルエンジニアリング研究部門・研究員
研究者番号：20415657