

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2004～2008

課題番号：16101007

研究課題名（和文）

脂肪酸生合成リボザイムとRNA生命体の創成

研究課題名（英文）

Generation of ribozymes that catalyze fatty acid biosynthesis

研究代表者

氏名（アルファベット） 菅 裕明（Suga Hiroaki）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：00361668

研究成果の概要：

本研究は、有機化学的なアプローチを試験管内 RNA 分子進化法により積極的に取り入れることで複雑且つ洗練された人工リボザイムを創成することに挑んだ。具体的には、脂肪酸生合成に関わる酸化還元リボザイムと tRNA アシル化リボザイムの創製を試み、その応用としてそれらのリボザイムを用いて遺伝暗号リプログラミング技術を開発した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	19,800,000	5,940,000	25,740,000
2005 年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2006 年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2007 年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2008 年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
総計	86,200,000	25,860,000	112,060,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：リボザイム、RNA 触媒、分子進化、特殊ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

「RNA ワールド」の仮説が提唱され、既に 20 年以上の歴史があった。天然で見つかる RNA 酵素いわゆるリボザイムは、生命が誕生する程の多様性に富んだ触媒機能は発見されていない。それは進化によって、そういった機能が既に蛋白質酵素に置き換えられた、すなわち淘汰されたからかもしれない。そういった酵素を人工的に試験管内で進化することができるのであろうか？これが本研究の命題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、有機化学的なアプローチを試験管内 RNA 分子進化法により積極的に取り

入れることで、リボザイムによる脂肪酸の生合成系構築に挑む。これまで、複数のステップを連続して触媒する複合リボザイム触媒系は構築されたことがなく、この脂肪酸の生合成系を構築することができれば、複雑な生合成プロセスを RNA が触媒できることを示す世界で最初の例となる。本研究の成果は、RNA ワールドの仮説を強く支持する実験的根拠となるばかりでなく、RNA 触媒の潜在能力を最大限に引き出したことになる。また、この RNA 触媒をリボソームに包含することで、リボソーム内でリボザイムにより合成された脂肪酸が脂質膜の一部となり、そのサイズが

成長し、分化していくことを示すことを最終目標に定める。この研究が成功すれば、生合成系と膜、すなわちコンパートメライズした触媒系という「生命の発生」に不可欠な要因が出そろふこととなり、RNA生命体の創成に向けた一歩を踏み出すことになる。

また、本計画書と平行して申請した基盤研究Aでは「人工リボザイムを用いた遺伝暗号のリプログラミングと高機能蛋白質の創製」と題した立案をした。この研究も上記と同様、既に申請者の研究室で創製したリボザイム(フレキシザイム)を基礎として展開させる研究として計画した。基盤研究Sの採択によりこの研究計画は予算を受けていないが、この関連研究についても本研究予算内で平行して推進したので、本研究成果のひとつとして修了報告書に記載する。

### 3. 研究の方法

基盤研究Sの本研究計画は、4種類の脂肪酸合成に関与する酵素機能をもったリボザイムをランダム配列のRNAプールからセレクションし、それらを同定した後、組み合わせることでRNAによる脂肪酸合成系を構築しようと綿密に計画を練った。しかし、申請書にも記載したが、上記の酵素には2つの酸化還元酵素が含まれるが、酸化還元反応自体はかなり難易度の高いもので過去には申請者の研究者が獲得したベンジルアルコールを酸化還元するRiboxのみが知られているに過ぎない。今回は、ベンジル位の酸化よりさらに困難な位ケト基の還元を目指すためその難易度はさらに高く、それに加えクライゼン縮合と脱水反応という全く未開拓の反応を目指すため、ハイリスク・ハイリターン研究であると申請書でも位置づけた。一方、基盤Aで申請した研究計画は、既知のアミノアシルtRNA合成活性をもつフレキシザイムの更なるエンジニアリングと翻訳合成系へ応用展開する内容であり、計画のリスクは比較的強く抑えられている。既に述べたように、基盤研究Aでの研究も継続すべき研究として、本計画内予算でこれらの研究を平行して推進した。

計画に従い、研究組織を3グループに分けた。研究代表者の菅の総括のもと、研究分担者の村上(助教) 脂肪酸合成リボザイム創製チーム、フレキシザイム創製チーム、

遺伝暗号リプログラミングチームから構成させた。本研究課題の主題である脂肪酸

合成リボザイム創製チームには、博士研究員二井を本チームのリーダーとしまし平成16年度に配置し、次年度から修士課程1年生で博士課程進学を希望していた神、さらに研究課題開始当時積極的に研究をしてみたいと希望して来た当時学部2年生の宮島を配置させた(宮島は17~18年度の2年間に渡り本研究に従事した)。その後、基盤研究Aの研究課題には、修士1年で博士進学を希望していた太田を平成16年度に配置して研究をスタートさせ、次年度に博士入学した2名の博士学生(佐古・後藤)さらに平成19年度には博士入学した川上を配置した。また、平成18年度には博士入学した大内および修士1年丹羽をフレキシザイム創製チームに配置した。

### 4. 研究成果

#### 脂肪酸合成リボザイム創製

結論から言うと、研究課題修了現時点でも目的のリボザイムの創製には成功していない。しかし、本課題推進中に2度に渡る戦略の立て直しを行い、最終的に目的とは異なるものの想定外の反応機構をもつ酸化触媒リボザイム0x4の創製に成功した。以下、戦略の立て直しに至ったネガティブデータを例示しながら、如何に研究戦略の修正を行ったか、また最終的に創製した新規リボザイムの構造と機能を以下に報告する。

戦略 (申請時に建てた戦略:平成16年度)

本戦略では、ベンジルアルコールの酸化反応を触媒するRiboxを創製した戦略(図1A)を踏襲した。5'末端にホスホチオエートを導入したRNAランダムライブラリーを作製し、それをアセチルCoA類似体あるいは3-ヒドロキシアシルCoA類似体で修飾後、一連のクライゼン縮合、酸化反応、脱水反応触媒機能をもつリボザイムを創製する計画であった。初年度には、基質となるRNAライブラリーの調製、またこれらの反応が触媒されることで生成する化合物も同時に調製することで、コントロール実験として活性種を釣り上げる技術を確立、反応条件・セレクション方法等、綿密に詰めた(詳細略)。その上で目的の試験管セレクションを開始、初年度修了直後には第1次結果が出た。セレクションの1次評価では、エノイルCoA還元(酸化)酵素リボ

ザイムを除く、3つの反応で活性種の濃縮が確認された。しかし、最終ラウンド活性プールあるいはそれから獲得されたクローン数個を常法に従いストラプトアビジン依存的電気泳動ゲルシフトによる解析を行った結果、いずれの場合も基質非依存的なバンドのシフトが起き、目的とする反応が進行している事実は確認できなかった。これらのクローンについてさらなる詳細な検討はしなかったが、上記の結果はビオチン化反応過程で何らかの機構でRNA構造のヒドラジドあるいはチオール基をもつビオチンが反応する活性種が濃縮されたと判断した。

戦略（修正戦略その1：平成17～18年度）

上記の失敗を受け、戦略の修正を行った。基質依存的な活性種だけを釣り上げるため、5'末端に修飾する基質に光壊裂型リンカーを導入、光照射によって釣り上げたストラプトアビジンレジンから活性種のみを選択的に溶出することを目指した。これより基質依存的に反応した活性種のみを回収することが可能になる。セレクション開始前にコントロール化合物を合成、RNAライブラリーに修飾してその回収率を査定したところ、セレクションが推進できるぎりぎりの量（活性種約50%：過去の申請者の経験値）の回収が可能であることが判った。この実験結果を受け、まずチオラーゼリボザイム及び3-ケトアシルCoA酸化酵素リボザイムのセレクションを試みた。再試を含め2度に渡る10ラウンドのセレクションを行ったが、いずれのセレクションにおいても活性種の濃縮が確認されなかった（詳細略）。この戦略では、かなりの労力を使い複雑な基質の化学合成を行ったが、光照射による活性種獲得の実験操作が複雑化し、極微量のRNAを取り扱うにはロスが嵩み活性種の濃縮がかからなかったと考えられた。そこで、初心に帰り、活性種の単離戦略は戦略を使い、RNAプールの再構築で活性種獲得を目指すことにした。

戦略（修正戦略その2：平成19～20年度）

上記の実験に平行して、Ribox構造の不必要な構造を除外する最小化研究を推進していた。その結果、もともと全長80塩基あった構造を45塩基まで最小化でき、ほぼ活性部位とそれを3D的に折り畳むための最小構造が判明

した（論文作成中）。そこで、この構造の活性部位のみをランダム化することでRNAプールの構築を計った。このプールでは、RNAの3D構造の折り畳みが固定した配列により保証されると予想され、活性種獲得の確立が高くなると期待した。活性種の選別法は戦略の方法論をそのまま踏襲し、3-ヒドロキシアシルCoA酸化酵素リボザイムと3-ヒドロキシアシルCoAデヒドラターゼリボザイムの創製を試みた。両者のセレクションとも活性種濃縮が確認され、さらにそのプールの活性は基質修飾依存的であることが確認された。前者の活性種は既にクローン化され、それらの活性確認スクリーニングを行った。そのうち最も高活性のクローン0x4について更なる検討を加えた。ストラプトアビジン依存的電気泳動ゲルシフトによる解析は全て期待した通り（基質・NAD<sup>+</sup>・ビオチン化依存的、詳細略）であり、目的のリボザイムが獲得できたかに見えた。しかし、3位の水酸基を除いた基質（ブチレート）をクローンの5'末端に修飾しても、全く同様の活性を示すことがわかった。これはこの水酸基が生成物形成に関与していない可能性を示すもので、全く別の機構で基質依存的に酸化反応が進行している可能性が高い。これまでの詳細な実験検討から、チオリン酸を脱離させながらグアノシンの5'末端のNAD<sup>+</sup>依存的に酸化を進める機構をもつリボザイムである可能性が示唆された。それを最も強く支持する間接的証拠として、反応生成物が2次元TLC上で他の4塩基とは移動挙動が異なることが挙げられる。その移動挙動が最も類似しているのはグアノシンであり、その誘導体である可能性が極めて高い。さらに、この化合物のスポットはビオチンヒドラジドとの反応により消滅し、新たに異なる移動挙動を示す化合物に変換される。現在、この生成物（5'-アルデヒド-グアノシン3'モノリン酸）を蛍光色素でトラップして単離、質量分析を試みている。このリボザイムは目的のリボザイムではないが、これまで2段階反応の協奏的還元反応を触媒するリボザイムの単離は世界初で、その触媒機構は注目に値する。また、もう一方の3-ヒドロキシアシルCoAデヒドラターゼリボザイムについてもその機能解析を現在進めている。

フレキシザイム創製

本研究では、現在までに創製され

たフレキシザイムの機能の向上を目指し、2種類の新規フレキシザイム誘導体を創製した。以下限られたスペースで詳細を述べることはできないため、その機能のみを報告する。低Mg<sup>2+</sup>濃度で機能するフレキシザイム：既存のdFxに新たなアクセサリドメインを付加することで、翻訳系内の10mM程度のMg<sup>2+</sup>でもアシル化機能をもつフレキシザイムの創製に成功した。このフレキシザイムは無細胞翻訳系と共役させることで、翻訳系内で特殊アミノ酸をペプチド鎖に導入させることに成功した(論文作成中)。現在は、このフレキシザイムを細胞内で機能させるための研究を継続推進中。

高水溶性脱離基を有するアミノ酸基質に選択活性性をもつフレキシザイム：dFxおよびeFxはそれぞれ3,5-ジニトロベンジルアルコール基(DBE)および4-クロロベンジルチオール基(CBT)を認識し様々な側鎖を有するアミノ酸を高効率でtRNAにチャージする機能をもつが、唯一現在問題となっているのは、脂溶性の高い基質を用いた際に基質が反応水溶液に溶解せず、反応が進行しない場合である。そこで、脱離基に水溶性を高める官能基を導入した脱離基(ABT)をデザイン・合成し、dFxの誘導体aFxを創製した(論文掲載済み)。

#### 遺伝暗号リプログラミング

本研究は、フレキシザイムシステム(dFxとeFx)を駆使し、普遍遺伝暗号を初期化・改変する技術を開発、それを応用して様々な特殊ペプチドの翻訳合成法を開発した。本技術の特筆すべき点は、天然物として単離される非蛋白質製アミノ酸を含むペプチドの構造的特徴を抽出した特殊ペプチドをリプログラミングされた遺伝暗号に沿って mRNA 上の配列から合成できる点にある。本技術の開発に伴い、ペプチドの環状化を非還元結合で達成する技術やペプチド主鎖骨格にN-メチル基やアルキル基、さらには探索技術も含めた汎用性の高い技術も開発してきた。その成果として2007年12月~2009年4月のわずか1年半あまりで、18報に及ぶ原著論文を発表している(全ての論文で基盤Sへの謝辞あり)。本研究は、Sの採択に伴い採択されなかった基盤Aで計画したものではあるが、想定以上の研究進捗がみられ、結果として4人の研究者(ただし博士課程学生のみ)を投入することになり、上記のめまぐるしい成果が上がった。

#### 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 16 件)

1. "Ribosomal synthesis of dehydrobutyrine- and methyllanthionine-containing peptides" Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami and H. Suga\*, **Chemical Communication**, *in press* (2009).
2. "A flexizyme that selectively charges amino acids activated with a water-friendly leaving group" N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga\*, **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, *in press* (2009).
3. "Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides" Y. Goto, H. Suga\*, **Journal of American Chemical Society** *131*, 5040-5041 (2009).
4. "Bases in the anticodons loop of tRNA<sup>Ala</sup><sub>GCC</sub> prevent misreading" H. Murakami, A. Ohta, H. Suga\*, **Nature Structural & Molecular Biology** *16*, 353-358 (2009).
5. "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga\* **Journal of American Chemical Society** *130*, 16861-16863 (2008).
6. "Expression of histone H3 tails with combinatorial lysine modifications under the reprogrammed genetic code for the investigation on epigenetic markers" T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga\* **Chemistry & Biology** *15*, 1166-1174 (2008).
7. "Polymerization of  $\alpha$ -hydroxy acids by ribosomes" A. Ohta, H. Murakami, H. Suga\* **ChemBioChem** *in press* (2008).
8. "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D'Amare\* **Nature** *454*, 358-361 (2008).
9. "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga\* **Journal of American Chemical Society** *130*, 7932-7934 (2008).
10. "Initiating translation with D-amino acids" Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* **RNA** *14*, 1399-1410 (2008).

11. "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, **H. Suga\*** **Journal of American Chemical Society** *130*, 7932-7934 (2008).
12. "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" T.-J. Kang, **H. Suga\*** **Biochemistry and Cell Biology** *86*, 92-99 (2008).
13. "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" A. Ohta, Y. Yamagishi, **H. Suga\*** **Current Opinion in Chemical Biology** *12*, 159-167 (2008).
14. "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, **H. Suga\*** **ACS Chemical Biology** *3*, 241-249 (2008).
15. "Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, **H. Suga\*** **ACS Chemical Biology** *3*, 120-129 (2008).
16. "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" T. Kawakami, H. Murakami, **H. Suga\*** **Chemistry & Biology** *15*, 32-42 (2008).

〔学会発表〕(計 13 件、全て菅が発表)

1. 2009 年 1 月 8 日 ETH Zurich, Institute of Organic Chemistry Seminar, Zurich, Switzerland
2. 2009 年 3 月 27 日 日本化学会年会「第 2 次先端ウオッチング-生合成化学」西船橋
3. 2008 年 8 月 28 日 The 17th Meeting of Methods in Protein Structural Analysis, 札幌
4. 2008 年 9 月 11 日 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting 2008, Veyrier du Lac, France
5. 2008 年 9 月 16 日 International Symposium on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, 東京
6. 2008 年 10 月 16 日 BioJapan, 横浜
7. 2008 年 10 月 30 日 Japanese German Frontier of Science, Heidelberg, Germany
8. 2008 年 11 月 12 日 RIKEN Conference

Chemical Biology, 成田

9. 2008 年 3 月 28 日: 第 128 回日本薬学会年会・特別講演、横浜
10. 2008 年 5 月 19 日: 日本ケミカルバイオロジー研究会シンポジウム、東京
11. 2008 年 6 月 6 日: 第 7 回新規素材探索研究会セミナー、横浜
12. 2008 年 6 月 7 日: 第 56 回日本化学療法学会総会、岡山
13. 2008 年 6 月 18 日: 前期有機合成化学講習会、東京

〔図書〕(計 3 件)

1. 「セルアラカルト: ケミカルバイオロジーの夜明けから 20 年、潮流が大きな波に変わるには」菅裕明 細胞工学 2009 4 月号, 28, 372-373.
2. 「特殊ペプチドの翻訳合成から天然物化学, 創薬へ」鳥飼浩平・菅裕明 ファルマシア 2009 2 月号, 45(2), 115-119.
3. 「特殊ペプチドの翻訳合成と薬剤探索」菅裕明・山岸祐介 新規素材探索-医薬品リード化合物・食品素材を求めて- シーエムシー出版 2008 9 月 30 日, 第五章, 55-66
4. 「新創薬技術 RAPID システムとマイクロ・ナノデバイスへの期待」村上裕・菅裕明 化学工業 2008 6 月号, 59(6), 463-469.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅 裕明

東京大学・先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号: 00361668

(2) 研究分担者

村上 裕

東京大学・先端科学技術研究センター・助教  
研究者番号: 10361669

(3) 連携研究者

二井一樹

東京大学・先端科学技術研究センター・特任  
研究員  
研究者番号: 30418644

(4)研究協力者

神 紘一郎 (博士大学院生)

大内政樹 (博士大学院生)

太田 淳 (博士大学院生)

川上隆史 (博士大学院生)

丹羽慶吉 (修士大学院生)